

长效 GLP-1 化合物

技术领域

本发明涉及治疗性肽领域，具体涉及新的长效 GLP-1 化合物、其药物制剂、其与长效胰岛素的药物组合物、及所述化合物、药物制剂和药物组合物的医药用途。

背景技术

胰高血糖素样肽 1(GLP-1)及其类似物和衍生物在治疗 1 和 2 型糖尿病中非常有效，然而高清除率限制了这些化合物的有效性。为了提供在体内作用持续时间更长的 GLP-1 化合物，已经将一系列不同方法用于修饰胰高血糖素样肽 1(GLP-1)的结构。例如 WO99/43708 公开了具有连接至 C-端氨基酸残基的亲脂性取代物的 GLP-1(7-35)和 GLP-1(7-36)衍生物。WO00/34331 公开了酰化的 GLP-1 类似物。WO00/69911 公开了用于注射进患者体内的活化的促胰岛素肽。

目前已上市的 GLP-1 类药物中有例如：每天给药两次的天然的 GLP-1 类似物艾塞那肽(Exenatide)；每天给药一次的利拉鲁肽(Liraglutide)和利司那肽(Lixisenatide)，前者为十六烷酸修饰的 GLP-1 化合物，后者为对艾塞那肽进行结构改造修饰而得到的新分子；和每周给药一次的索玛鲁肽(Semaglutide)、艾塞那肽微球(ExenatideLAR)、阿必鲁肽(Abiglutide)、度拉糖肽(Dulaglutide)(也称杜拉鲁肽)和聚乙二醇洛塞那肽。其中，艾塞那肽微球是通过微囊化方法将艾塞那肽包裹至聚乳酸乙醇酸共聚物基质制备得到，阿必鲁肽是通过将两条修饰后的 GLP-1 肽链以二聚体形式与人白蛋白融合成为重组融合蛋白；度拉糖肽是将修饰后的 GLP-1 链通过二硫键融合到重组 G4 免疫球蛋白的 Fc 片段上得到；聚乙二醇洛塞那肽是在艾塞那肽的化学结构式基础上进行氨基酸改造和经聚乙二醇修饰而成；索玛鲁肽主要是通过 GLP-1(7-37)肽上使用非蛋白质性氨基酸 Aib 替换了第 8 位的 Ala 而实现了一周一次，但索玛鲁肽中非蛋白质性氨基酸的存在，相对于天然的氨基酸，在人体内可能存在未知的、各种潜在的副作用风险。

一方面，目前仍然需要开发能够相对于已上市的同类药物例如利拉鲁肽、度拉糖肽和索玛鲁肽，具有更好的效力、药效或功效、具有更小的潜在副作用的风险、具有更好的体重减轻和抑制饮食效果、具有更长

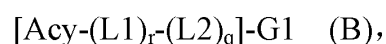
或相当的体内持续作用时间或体内半衰期的化合物，以为糖尿病患者提供更优的用药选项。

另一方面，随着全世界 2 型糖尿病人群快速增加，对于给药更简单的更有效的药物存在着更大的需求。例如包含胰岛素和 GLP-1 肽两种活性成分的复方制剂可能是非常有效的治疗剂。因此目前也仍然需要能够协同实现具有更好的物理和化学稳定性、更长的作用时间、以及药效更好的复方制剂。

发明内容

为克服或改善现有技术的至少一个缺点、或提供有用的替代品，本发明第一方面提供了新的 GLP-1 化合物(也称 GLP-1 衍生物)。所述新的 GLP-1 化合物相比于利拉鲁肽、度拉糖肽、索玛鲁肽等已上市的 GLP-1 衍生物，具有更好的效力、药效或功效、更小的潜在副作用的风险、更好的减轻体重的效果、更长的体内持续作用时间或体内半衰期，更好或相当的 GLP-1 受体结合亲和力，以及具有更好或相当的 DPP-IV 稳定性。且本发明的长效 GLP-1 化合物和本发明提供的长效胰岛素的药物组合物或组合制剂不仅不会削弱所述 GLP-1 化合物和所述胰岛素化合物的物理稳定性，而且，组合制剂具有比单药制剂更好的物理稳定性。与其他长效 GLP-1 化合物的组合制剂(例如利拉鲁肽和德谷胰岛素的组合制剂)相比，本发明的组合制剂的物理稳定性是出乎意料的。此外，组合制剂相比于单药制剂，还使得所述 GLP-1 化合物和酰化胰岛素的化学稳定性增加。本发明的 GLP-1 化合物，及本发明提供的含所述 GLP-1 化合物和胰岛化合物的组合制剂均能够很好地实现长的药代动力学(下文也称 PK)特征，使得对糖尿病患者一周两次、一周一次、两周一次、或更低频率的皮下治疗成为可能。

本发明第一方面提供的 GLP-1 化合物为式 B 的化合物，或其药学上可接受的盐、酰胺或酯：



其中 G1 为在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 1)的位置 34 处具有 Arg 及在位置 8 处具有 Ala 或 Gly 的 GLP-1 类似物， $[\text{Acy}-(\text{L1})_r-(\text{L2})_q]$ 是连接至所述 GLP-1 类似物的位置 26 的 Lys 残基的 ϵ 氨基上的取代基，其中

r 为 1-10 的整数， q 为 0 或 1-10 的整数；

Acy 是包含 20-24 个碳原子的脂肪族二酸，其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；

L1 是选自下述的氨基酸残基： γ Glu、 α Glu、 β Asp、 α Asp、 γ -D-Glu、 α -D-Glu、 β -D-Asp 或 α -D-Asp；

L2 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；

Acy、L1、和 L2 之间以酰胺键连接；和

L1 和 L2 在式(B)中出现的顺序可以独立地互换。

在一个实施方案中，G1 为 [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽或 [Arg34]GLP-1-(7-37) 肽，优选为 [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) 肽。

在一个实施方案中，r 为 1、2、3、4、5 或 6，优选地，r 为 1、2、3 或 4，优选地，r 为 1 或 2，优选地，r 为 1。

在另一个实施方案中，q 为 0、1、2、3、4、5、6、7 或 8，优选地，q 为 0、1、2、3 或 4，更优选，q 为 0、1、或 2。

在一个实施方案中，Acy 是包含 20-23 个碳原子的脂肪族二酸，优选 Acy 是包含 20、21、或 22 个碳原子的脂肪族二酸，其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除。

在一个实施方案中，L2 是：-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-C
O-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-
(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-CO-、-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₄-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
-HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₃-O-CH₂-CO-、或 -HN-(CH₂)₄-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CO-；
优选 L2 是 -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-。

在一个实施方案中，L1 选自 γ Glu 或 β Asp，优选 L1 为 γ Glu。

在一个实施方案中, Acy 是 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CO}-$ 或 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$, Acy 是 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CO}-$ 或 $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CO}-$ 。

在一个实施方案中, 式(B)中 Acy 、 L1 、和 L2 之间依次以酰胺键连接, L2 的 C 末端连接至所述 GLP-1 类似物的位置 26 的 Lys 残基的 ϵ 氨基上。

在一个实施方案中, 本发明第一方面所述化合物选自下述化合物:

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[21-羧基二十一烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[23-羧基二十三烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

$\text{N-}\epsilon^{26}\text{-[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽}$ 、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[21-羧基二十一烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[23-羧基二十三烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(23-羧基二十三烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或

N- ϵ^{26} -(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

在一个实施方案中，本发明第一方面所述化合物选自下述化合物：

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[21-羧基二十一烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[20-羧基二十烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[22-羧基二十二烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[20-羧基二十烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[22-羧基二十二烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Arg34]GLP-1-(7-37)肽、

N- ϵ^{26} -(20-羧基二十烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或

N- ϵ^{26} -(22-羧基二十二烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

在一个实施方案中，本发明第一方面所述化合物选自下述化合物：

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或
N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

本发明第二方面提供了一种药物制剂，其包含本发明第一方面所述的化合物和可药用赋形剂。

在一个实施方案中，所述可药用赋形剂选自缓冲剂、防腐剂、等渗剂、稳定剂和螯合剂中的一种或多种。在另一个实施方案中，所述可药用赋形剂为缓冲剂、防腐剂和等渗剂。

在一个实施方案中，所述药物制剂包含：本发明第一方面所述的化合物、等渗剂、防腐剂和缓冲剂。优选地，在所述药物制剂中，本发明第一方面所述的化合物为 $N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽、或 $N-\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽。

在一个实施方案中，所述等渗剂选自氯化钠、丙二醇、甘露醇、山梨醇、甘油、葡萄糖和木糖醇的一种或多种，优选为丙二醇、甘露醇或氯化钠。

在另一个实施方案中，所述防腐剂选自苯酚、间甲酚、对-羟基苯甲酸甲酯、对-羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对-羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、和苯甲醇中的一种或多种，优选为苯酚或间甲酚。

在另一个实施方案中，所述缓冲剂选自醋酸钠、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(羟甲基)-氨基甲烷中的一种或多种，优选为醋酸钠、柠檬酸盐、磷酸二氢钠、或磷酸氢二钠。

在一个实施方案中，所述制剂的 pH 为约 6.0 至约 10.0，优选为约 6.5 至约 10.0，优选为约 6.5 至约 9.5，优选为约 6.5 至约 8.5，更优选为约 7.0 至约 8.5、更优选为约 7.0 至约 8.1、进一步优选为约 7.3 至约 8.1。

在一个实施方案中，所述药物制剂含有如下成分：

约 0.1-1.2 mM、优选约 0.2-1 mM、优选约 0.3-0.7mM、更优选约 0.48-0.6mM 的本发明第一方面所述的化合物；

约 10-1500mM、优选约 13-800 mM、优选约 65-400 mM、优选约 90-240 mM、优选约 150-250mM、优选约 180-200mM、更优选约 183-195mM 的等渗剂，优选，所述等渗剂选自丙二醇、甘油、甘露醇或氯化钠中的一种或多种；

约 1-200 mM、优选约 5-150 mM、优选约 10-100mM、优选约 20-85mM、优选约 30-75mM、优选约 45-60mM、更优选约 50-60mM 的防腐剂，优选，所述防腐剂选自苯酚或间甲酚中的一种或多种；

约 3-35 mM、优选约 5-20mM、更优选约 5-15mM、更优选约 7-10mM 的缓冲剂，所述缓冲剂选自醋酸钠、柠檬酸盐、磷酸二氢钠或磷酸氢二钠中的一种或多种；和

所述药物制剂的 pH 为约 6.0 至约 10.0，优选为约 6.5 至约 9.5，优选为约 6.5 至约 8.5，更优选为约 7.0 至约 8.5、更优选为约 7.0 至约 8.1、进一步优选为约 7.3 至约 8.1。

在另一个实验方案中，所述药物制剂包含：约 0.3-0.7mM、更优选为约 0.48-0.6mM 的 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽或 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽；约 180-200mM、更优选约 183-195mM 的丙二醇；约 45-60mM、更优选约 50-60mM 的苯酚；约 5-15mM 的缓冲剂，优选约 7-10mM 的磷酸氢二钠；和所述药物制剂的 pH 为约 6.5 至约 8.5，更优选为约 7.0 至约 8.5、进一步优选为约 7.3 至约 8.3。

在另一个实验方案中，所述药物制剂包含：约 0.5mM 的 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽或 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽；约 184 mM 的丙二醇；约 58.5 mM 的苯酚；约 10mM 的磷酸氢二钠；和所述药物制剂的 pH 为约 6.5 至约 8.5，更优选为约 7.0 至约 8.5、更优选为约 7.0 至约 8.1、进一步优选为约 7.3 至约 8.1。

在另一个实验方案中，所述药物制剂包含：约 2.0mg/ml 的 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽或 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽；约 14mg/ml 的丙二醇；约 5.5 mg/ml 的苯酚；约 1.42mg/ml 的磷酸氢二钠；和

所述药物制剂的 pH 为约 6.5 至约 8.5，更优选为约 7.0 至约 8.5、更优选为约 7.0 至约 8.1、进一步优选为约 7.3 至约 8.1。

本发明第三方面提供了一种药物组合物，其包含本发明第一方面所述的 GLP-1 化合物、和酰化胰岛素。

在一个实施方案中，所述酰化胰岛素是 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-OEG), desB30 人胰岛素；A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素；或 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素。

在一个实施方案中，所述酰化胰岛素为下述的胰岛素：所述酰化胰岛素的胰岛素母体为天然存在的胰岛素或胰岛素类似物，且包含至少一个赖氨酸残基，所述酰化胰岛素的酰基部分与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或 N-末端氨基酸残基的氨基相连接，所述酰基部分如式(A)所示：

$\text{III}-(\text{II})_m-(\text{I})_n$ (A)，其中，m 为 0 或 1-10 的整数，n 为 5-20 的整数；I 是中性的、包含亚烷基二醇的氨基酸残基；II 是酸性的氨基酸残基；III 是包含 20-24 个碳原子的脂肪族二酸，其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除；III、II、和 I 之间以酰胺键连接；和 II 和 I 在式(A)中出现的顺序可以独立地互换。

在一个实施方案中，n 为 5-15，优选地，n 为 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14，优选地，n 为 5、6、7、8、9、10、11 或 12，优选地，n 为 5、6、7、8、9、或 10，优选地，n 为 5、6、7、8 或 9，优选地，n 为 5、6、7、或 8。

在另一个实施方案中，m 为 1-6，优选地，m 为 1、2、3、或 4，优选地，m 为 1 或 2，优选地，m 为 1。

在又一个实施方案中，III 是包含 20-23 个碳原子的脂肪族二酸，优选 III 是包含 20、21、或 22 个碳原子的脂肪族二酸，其中在形式上羟基已从所述脂肪族二酸的羧基之一中去除。

在另一个实施方案中，所述胰岛素母体包含一个赖氨酸残基。

在一个实施方案中，I 是：
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 、
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ 、
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}$
 $\text{O}-$ 、
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$
 $(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ 、 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-$ 、
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 、
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ 、
 $-\text{HN}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 、

-HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
 -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
 -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-(CH₂)₂-CO-、
 -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
 -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-NH-CO-CH₂-O-CH₂-CO-、
 -HN-(CH₂)₃-O-(CH₂)₃-O-CH₂-CO-、或 -HN-(CH₂)₄-O-(CH₂)₄-O-CH₂-CO-；
 优选 I 是 -HN-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-。

在另一个实施方案中，II 是选自下述的氨基酸残基：γGlu、αGlu、βAsp、αAsp、γ-D-Glu、α-D-Glu、β-D-Asp 或 α-D-Asp；优选地，II 选自 γGlu 或 βAsp。

在另一个实施方案中，III 是 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-、HOOC-(CH₂)₁₉-CO-、HOOC-(CH₂)₂₀-CO-、HOOC-(CH₂)₂₁-CO-或 HOOC-(CH₂)₂₂-CO-，优选地 III 是 HOOC-(CH₂)₁₈-CO-、HOOC-(CH₂)₂₀-CO-或 HOOC-(CH₂)₂₂-CO-。

在一个实施方案中，式(A)通过 I 的 C 末端与所述胰岛素母体的赖氨酸残基或 N-末端氨基酸残基的氨基连接。

在一个实施方案中，所述酰基部分与所述胰岛素母体的赖氨酸残基的 ε 氨基相连接。

在一个实施方案中，所述胰岛素母体的赖氨酸残基位于 B29 位处。

在一个实施方案中，所述胰岛素母体选自下述胰岛素或胰岛素类似物：desB30 人胰岛素(SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5，分别表示 A 链和 B 链)；A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素(SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7，分别表示 A 链和 B 链)；A14E, B16E, B25H, desB30 人胰岛素(SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:9，分别表示 A 链和 B 链)；人胰岛素(SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:11，分别表示 A 链和 B 链)；A21G 人胰岛素(SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13，分别表示 A 链和 B 链)；A21G, desB30 人胰岛素(SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15，分别表示 A 链和 B 链)；或 B28D 人胰岛素(SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17，分别表示 A 链和 B 链)。

在一个实施方案中，所述酰化胰岛素选自下述胰岛素：B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-5xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基-6xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素；B29K(N(ε)-二十烷二酰基

-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素;

A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-6xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-6xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-5xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-7xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-8xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-8xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-7xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-7xOEG-γGlu),

desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-8xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-8xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-7xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-7xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-8xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-8xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-7xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-βAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αGlu-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-αAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷

二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-6xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-5xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-5xOEG),

desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-γGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-5xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-6xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-6xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-5xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-βAsp-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-βAsp-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-αGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-αGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αAsp-5xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16E, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αAsp-6xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-γGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-γGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-7xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-8xOEG-γGlu), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-8xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-7xOEG-γGlu-γGlu), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-βAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-βAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-αGlu-7xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αGlu-αGlu-8xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αAsp-7xOEG), desB30 人胰岛素； B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-αAsp-8xOEG), desB30 人胰岛素； A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二

烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-8xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基-7xOEG- γ Glu- γ Glu), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- β Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二

烷二酰基- α Glu- α Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Glu- α Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- α Asp-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基

- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-7xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-10xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-11xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-10xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-11xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-10xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-11xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-10xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-11xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基

- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16E, B25H, B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-10xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-11xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-9xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-10xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-11xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十一烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十三烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; B29K(N(ϵ)-二十四烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素; A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-18xOEG), desB30 人胰岛素; 或 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-24xOEG), desB30 人胰岛素。

发明人出乎意料地发现, 本发明第一方面所述的化合物和酰化胰岛素的药物组合物不仅不会削弱所述化合物的物理稳定性, 而且, 组合制剂具有比单药制剂更好的物理稳定性。与其他长效胰岛素衍生物(例如德谷胰岛素和利拉鲁肽)的组合制剂相比, 本发明的组合制剂的物理稳定性是出乎意料的。此外, 组合制剂相比于单药制剂, 还使得所述酰化胰岛素的化学稳定性增加。

本发明第四方面提供了本发明第一方面所述的化合物、本发明第二方面所述的药物制剂或本发明第三方面所述的药物组合物用作药物的用途。

在一个实施方案中, 本发明第一方面所述的化合物、本发明第二方面所述的药物制剂或本发明第三方面所述的药物组合物用于治疗或预防高血糖症、糖尿病、和/或肥胖症。

本发明第五方面提供了本发明第一方面所述的化合物、本发明第二方面所述的药物制剂或本发明第三方面所述的药物组合物在制备用于治疗或预防高血糖症、糖尿病、和/或肥胖症的药物中的用途。

本发明第六方面提供了治疗或预防高血糖症、糖尿病、和/或肥胖症的方法, 所述方法包括施用有效量的本发明第一方面所述的化合物、本发明第二方面所述的药物制剂或本发明第三方面所述的药物组合物, 所述疾病包括但不限于例如高血糖症、糖尿病和肥胖症。

附图说明

图 1a 示出了本发明实施例 1-3 的标题化合物、利拉鲁肽、和溶媒 (vehicle) 对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间, 其中纵坐标的百分率是指, 以给药前基线血糖为基准, 给药后每个监测点的血糖与之相比所得的相应时间点的血糖百分率 (下同)。

图 1b 与图 1a 相对应地示出了本发明实施例 1-3 的标题化合物、利拉鲁肽、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 2a 示出了本发明实施例 2 的标题化合物、索玛鲁肽、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 2b 与图 2a 相对应地示出了本发明实施例 2 的标题化合物、索玛鲁肽、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 3a 示出了本发明实施例 3-4 的标题化合物、利拉鲁肽、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 3b 与图 3a 相对应地示出了本发明实施例 3-4 的标题化合物、利拉鲁肽、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 4a 示出了本发明实施例 1-3 的标题化合物、对照例 3-4 的标题化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果和作用时间。

图 4b 与图 4a 相对应地示出了本发明实施例 1-3 的标题化合物、对照例 3-4 的标题化合物、和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 5a 示出了本发明实施例 11 的标题化合物在 100 μ g/kg 和 300 μ g/kg 剂量时、对照例 2 的标题化合物、溶媒 (模型对照组) 对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠或正常小鼠 (正常对照) 降糖效果和作用时间。

图 5b 与图 5a 相对应地示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物、溶媒 (模型对照组) 对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠或正常小鼠 (正常对照) 降糖效果的 AUC。

图 5c 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物、溶媒 (模型对照组) 对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠或正常小鼠 (正常对照) 的减重效果。

图 6a 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物、溶媒 (模型对照组) 对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠或正常小鼠 (正常对照) 首次给药后 48 小时进行 ipGTT 时的降糖效果。

图 6b 与图 6a 相对应地示出了本发明实施例 11 的标题化合物在、对照例 2 的标题化合物、溶媒 (模型对照组) 对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL

小鼠或正常小鼠（正常对照）首次给药后 48 小时进行 ipGTT 时的降糖效果的 Δ AUC。

图 7a 示出了本发明实施例 2 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果。

图 7b 与图 7a 相对应地示出了本发明实施例 2 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的降糖效果的 Δ AUC。

图 7c 示出了本发明实施例 2 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的食物摄入量的控制效果。

图 7d 示出了本发明实施例 2 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的饮水量的控制效果。

图 8a 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的长期降糖效果。

图 8b 与图 8a 相对应地示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的长期降糖效果的 AUC。

图 8c 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的长期减重效果。

图 8d 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的长期食物摄入量的控制效果。

图 8e 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、对照例 2 的标题化合物和溶媒对 db/db 小鼠的长期饮水量的控制效果。

图 9a 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、实施例 2 的标题化合物、度拉糖肽和溶媒对 Kkay 小鼠的降糖效果。

图 9b 与图 9a 相对应地示出了本发明实施例 11 的标题化合物、实施例 2 的标题化合物、度拉糖肽和溶媒对 Kkay 小鼠的降糖效果的 AUC。

图 9c 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、实施例 2 的标题化合物、度拉糖肽和溶媒对 Kkay 小鼠的降 HbA1c 效果。

图 10a 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽、溶媒（模型对照组）对 db/db 小鼠或正常小鼠（正常对照）中的长期降糖效果。

图 10b 与图 10a 相对应地示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽、溶媒（模型对照组）对 db/db 小鼠或正常小鼠（正常对照）中的长期降糖效果的 Δ AUC。

图 10c 示出了施用本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽、溶媒（模型对照组）在 db/db 小鼠或正常小鼠（正常对照）中注射前、第三次、第五次和第十一次注射后的随机血糖值。

图 10d 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽、溶媒（模型对照组）对 db/db 小鼠或正常小鼠（正常对照组）首次给药后 48 小时进行 ipGTT 时的降糖效果。

图 10e 与图 10d 相对应地示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽、溶媒（模型对照组）对 db/db 小鼠或正常小鼠（正常对照组）首次给药后 48 小时进行 ipGTT 时的降糖效果的 AUC。

图 11a 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽、溶媒（模型对照组）对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠或正常小鼠（正常对照组）的长期减重效果。

图 11b 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽和溶媒（模型对照组）对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠的长期食物摄入量的控制效果。

图 11c 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽和溶媒（模型对照组）对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 雌性小鼠的卵巢周围脂肪减少效果。

图 11d 示出了本发明实施例 11 的标题化合物、度拉糖肽和溶媒（模型对照组）对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 雄性小鼠的附睾脂肪减少效果。

具体实施方式

定义

GLP-1 类似物、和 GLP-1 衍生物

本文所用的术语“GLP-1 类似物”或“GLP-1 的类似物”是指作为人胰高血糖素样肽-1(GLP-1(7-37))变体的肽或化合物，其中 GLP-1(7-37)的一个或多个氨基酸残基被替换、和/或其中一个或多个氨基酸残基被缺失、和/或其中增加了一个或多个氨基酸残基。具体地，GLP-1(7-37)的序列如序列表中的 SEQ ID NO: 1 所示。具有 SEQ ID NO: 1 所示序列的肽也可称为“天然”GLP-1 或“天然”GLP-1(7-37)。

在序列表中，SEQ ID NO: 1 的第一个氨基酸残基(组氨酸)编号为 1。然而，在下文中，依据本领域已建立的习惯，该组氨酸残基编号定为 7，并且其后的氨基酸残基也随之编号，结尾是 37 号甘氨酸。因此，通常，本文所涉及到的 GLP-1(7-37)序列的氨基酸残基编号或位置编号是开始于位置 7 的 His 和结束于位置 37 的 Gly 的序列。

[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽,是在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 1)位置 8 和位置 34 的位置处分别具有 Gly 和 Arg 的 GLP-1 类似物, [Arg34]GLP-1-(7-37)肽,是在对应于 GLP-1(7-37)(SEQ ID NO: 1)位置 34 的位置处具有 Arg 的 GLP-1 类似物。具体地, [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽和[Arg34]GLP-1-(7-37)肽的氨基酸序列分别如序列表中的 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示。

在 GLP-1 肽或其类似物的情况下,本文所用的术语“衍生物”是指经化学修饰的 GLP-1 肽或类似物,其中一个或多个取代基已与所述肽共价连接。取代基也可称为侧链。

除非另有说明,否则当提及与赖氨酸残基酰化时,理解为与其 ϵ -氨基进行。

本发明的式(B)的 GLP-1 衍生物可存在不同的立体异构体形式,其具有相同分子式和所连接的原子序列,但仅在其原子空间的三维方向上不同。除非另有说明,否则本发明涉及要求保护的衍生物的所有立体异构体形式。

术语“肽”当用于例如本发明的 GLP-1 类似物时,是指包含通过酰胺(或肽)键相互连接的一系列氨基酸的化合物。

在一个具体的实施方案中,肽很大程度上或主要由通过酰胺键相互连接的氨基酸组成(例如摩尔质量的至少 50%、60%、70%、80%或至少 90%)。在另一个具体的实施方案中,肽由通过肽键相互连接的氨基酸组成。

氨基酸是含有氨基和羧酸基的分子,任选含有一个或多个额外基团,通常称为侧链。

术语“氨基酸”包含蛋白质性的氨基酸(由遗传密码所编码,包括天然氨基酸和标准氨基酸)、以及非蛋白质性(在蛋白质中未发现,和/或在标准遗传密码中未编码)、和合成氨基酸。非蛋白质源性氨基酸是可以通过肽键整合进肽的部分,但不是蛋白质源性氨基酸。合成的非蛋白质源性氨基酸包括通过化学合成产生的氨基酸,即通过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)、3-氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、脱氨基-组氨酸、氨基酸的 β 类似物例如 β -丙氨酸等、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、和高组氨酸(homohistidine)等。

不由遗传密码所编码的氨基酸的非限制性实例是 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸、D-丙氨酸、D-谷氨酰胺和磷酸丝氨酸。合成氨基酸的非限制性实

例是氨基酸的 D-异构体, 例如 D-丙氨酸和 D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、 β -丙氨酸和 des-氨基-组氨酸(desH, 替代名称咪唑丙酸, 缩写 Imp)。

在下文中, 并未标明旋光异构体的所有氨基酸都理解为是指 L-异构体(除非另有说明)。

药学上可接受的盐、酰胺或酯

本发明的 GLP-1 衍生物、类似物和中间产物可以呈药学上可接受的盐、酰胺或酯的形式。盐可以是碱式盐、酸式盐, 或者中性盐。在水中碱式盐产生氢氧离子, 酸式盐产生水合氢离子。本发明衍生物的盐可以用分别与阴离子基团或阳离子基团反应的添加的阳离子或阴离子来形成。这些基团可位于肽部分内和/或在本发明衍生物的侧链内。

本发明衍生物的阴离子基团的非限制性实例包括侧链(如果有的话)以及肽部分中的游离羧基。肽部分通常包括 C-端的游离羧酸, 并且它也可包括在内部酸性氨基酸残基例如 Asp 和 Glu 上的游离羧基。

肽部分的阳离子基团的非限制性实例包括 N-端的游离氨基(如果有的话)以及在内部碱性氨基酸残基例如 His、Arg 和 Lys 上的任何游离氨基。

本发明衍生物的酯可以是例如通过游离羧酸基团与醇或酚反应而形成, 其导致至少一个羟基被烷氧基或芳氧基取代。酯的形成可涉及肽的 C-端的游离羧基, 和/或侧链的任何游离羧基。

本发明衍生物的酰胺可以是例如通过游离羧酸基团与胺或取代胺反应, 或通过游离或取代氨基与羧酸反应而生成。酰胺的形成可涉及肽的 C-端的游离羧基、侧链的任何游离羧基、肽的 N-端的游离氨基、和/或在肽和/或侧链中的任何游离或取代的肽氨基。

在一个具体的实施方案中, 本发明的 GLP-1 化合物或 GLP-1 衍生物呈药学上可接受的盐的形式。在另一个具体的实施方案中, 呈药学上可接受的酰胺的形式, 优选在肽的 C-端具有酰胺基。在再进一步的具体的实施方案中, 肽或衍生物呈药学上可接受的酯的形式。

本发明的 GLP-1(7-37)的肽和 GLP-1 类似物的制备方法是本领域公知的。例如, 可以通过经典的肽合成, 例如使用 t-Boc 或 Fmoc 化学法的固相肽合成或其他完善的技术, 来生产本发明衍生物的 GLP-1 肽部分(或其片段)以及本发明的 GLP-1 类似物, 参见, 例如, Greene 和 Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999, Florencio Zaragoza "Organic Synthesis on solid Phase", Wiley-VCH Verlag

GmbH, 2000, 以及由 W.C.Chan 和 P.D.White 编著的“Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis”, Oxford University Press, 2000。

在一个实施方案中, 本发明的完整 GLP-1 类似物例如[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽可以通过重组方法产生, 即通过培养宿主细胞, 该宿主细胞含有编码该类似物的 DNA 序列并能够在允许该肽表达的条件下在合适的营养培养基中表达该肽。适合表达这些肽的宿主细胞的非限制性实例是: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)以及哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系。在一些实施方案中, 生产工艺方法的这种完全重组发酵步骤是满足需要的, 例如出于生产经济性方面的考虑。

将含有 GLP-1 化合物主链的融合蛋白包涵体经过变性、复性, 得到含有正确构象的融合蛋白, 经酶切、调沉、离心等一系列处理后, 得到含量较高的 GLP-1 化合物主链。通过离子交换层析纯化, 处理后得到纯度较高的 GLP-1 化合物主链。

术语“赋形剂”广义上是指除了活性治疗成分之外的任何成分。赋形剂可以是惰性物质、无活性物质和/或并非药物活性物质。

赋形剂可用于多种目的, 例如作为载体、溶媒、稀释剂、片剂助剂、和/或用于改善给药、和/或活性物质的吸收。

药物活性成分与不同赋形剂的配制是本领域已知的, 参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy(例如第 19 版(1995), 和任何更新版本)。

赋形剂的非限制性实例是: 溶剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、等渗剂、螯合剂和稳定剂。

本发明的 GLP-1 衍生物和类似物具有 GLP-1 活性。具有 GLP-1 活性是指与 GLP-1 受体结合并引发信号转导途径而产生促胰岛素作用或其它生理效应的能力。

在一个具体的实施方案中, 效力、功效和/或活性是指体外功效, 即在功能性 GLP-1 受体测定中的表现, 更尤其是在表达克隆的人 GLP-1 受体的细胞系中刺激 cAMP 形成的能力。

在另一个具体的实施方案中, 本发明的衍生物在体内是强效的, 其可在任何合适的动物模型以及在临床试验中按照本领域已知方式来测定。例如糖尿病性 db/db 小鼠是合适动物模型的一个实例, 在这样的小鼠体内可测定血糖降低效应, 例如按照本发明的实施例部分所述。

术语“胰岛素”包括天然存在的胰岛素，例如人胰岛素，以及其胰岛素类似物、胰岛素衍生物。

术语“胰岛素类似物”包含这样的多肽，其具有在形式上可以通过缺失和/或置换(替换)在天然胰岛素中存在的一个或多个氨基酸残基和/或添加至少一个氨基酸残基，而衍生自天然存在的胰岛素(例如人胰岛素)的结构的分子结构。优选地，置换的氨基酸残基是可编码氨基酸残基。

此处，术语“胰岛素衍生物”指的是已被化学方式修饰过的天然存在的胰岛素或胰岛素类似物，该修饰可以是例如在胰岛素骨架的一个或多个位置上引入侧链或者氧化或还原胰岛素上氨基酸残基的基团或者将游离羧基转化成酯基或酰化游离氨基或羟基。本发明的酰化胰岛素即属于胰岛素衍生物。

术语“胰岛素母体”是指胰岛素衍生物或酰化胰岛素的胰岛素部分(在本文中也可称作母体胰岛素)，例如在本发明中是指酰化胰岛素的没有附加酰基的部分。胰岛素母体可以为天然存在的胰岛素，诸如人胰岛素或猪胰岛素。另一方面，母体胰岛素可以是胰岛素类似物。

此处，术语“氨基酸残基”包含从其中氢原子已从氨基中去除和/或羟基已从羧基中去除和/或氢原子已从巯基中去除的氨基酸。不精确地，氨基酸残基可以叫做氨基酸。

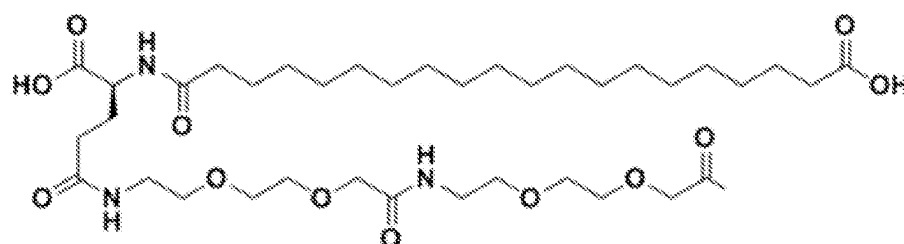
除非另有说明，本文提及的氨基酸都是 L-氨基酸。

此处，术语亚烷基二醇包含寡和聚亚烷基二醇部分以及单亚烷基二醇部分。单亚烷基二醇和聚亚烷基二醇包括例如基于单和聚乙二醇、基于单和聚丙二醇、和基于单和聚丁二醇的链，即基于重复单位-CH₂CH₂O-、-CH₂CH₂CH₂O-或-CH₂CH₂CH₂CH₂O-的链。亚烷基二醇部分可以是单分散(具有定义明确的长度/分子量)以及多分散(具有定义较不明确的长度/平均分子量)。单亚烷基二醇部分包括在每个末端处包含不同基团的-OCH₂CH₂O-、-OCH₂CH₂CH₂O-或-OCH₂CH₂CH₂CH₂O-。

术语“脂肪酸”包括直链或支链脂族羧酸，其具有至少两个碳原子并为饱和或不饱和的。脂肪酸的非限定实例为例如肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和二十烷酸。

此处，术语“脂肪族二酸”包括直链或支链脂族二羧酸，其具有至少两个碳原子并为饱和或不饱和的。脂肪族二酸的非限定实例为己二酸、辛二酸、癸二酸、十二烷二酸、十四烷二酸、十六烷二酸、十七烷二酸、十八烷二酸、二十烷二酸、二十二烷二酸和二十四烷二酸。

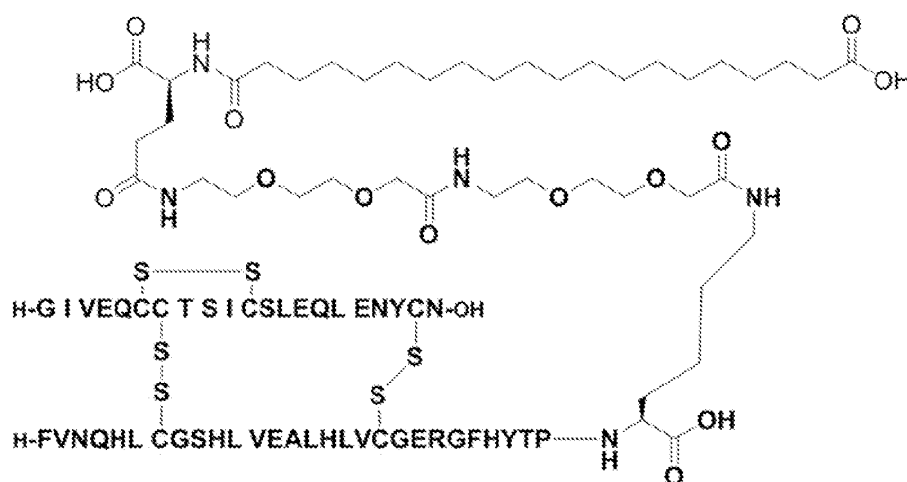
在本文中，胰岛素或 GLP-1 化合物的命名按照以下原则进行：按相对于人胰岛素的突变和修饰(例如酰化)、或天然 GLP-1(7-37)的突变和修饰(例如酰化)给予名称。对于酰基部分的命名，按照 IUPAC 命名法和在其它情况下按肽命名法进行命名。例如，命名下述酰基部分：



可例如命名为“二十烷二酰基- γ Glu-OEG-OEG”、“二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG”或“二十烷二酰基-gGlu-2xOEG”、“19-羧基十九烷酰基- γ Glu-2xOEG”或“19-羧基十九烷酰基- γ Glu-OEG-OEG”，其中 OEG 表示基团-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₂CO-(即，2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙酰基)的简写， γ Glu(以及 gGlu)是呈 L 构型的氨基酸 γ 谷氨酸的简写表示。或者，酰基部分可按照 IUPAC 命名法(OpenEye, IUPAC 格式)命名。根据该命名法，本发明的上述酰基部分被称为以下名称：“[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]”或“[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基]乙酰基]”。

例如，本发明实施例 6 的胰岛素(具有下文给出的序列/结构)被称为“B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素”、“B29K(N ϵ -二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素”、或“B29K(N ϵ -二十烷二酰基-gGlu-5xOEG), desB30 人胰岛素”以表示人胰岛素中位置 B29 的氨基酸 K 已通过在 B29 的赖氨酸残基的 ϵ 氮(称为 N ϵ 或(N(ϵ)))上被残基二十烷二酰基-gGlu-2xOEG 酰化而修饰，且人胰岛素中位置 B30 的氨基酸 T 已被缺失。又例如，对照例 5 的胰岛素(具有下文给出的序列/结构)被称为“A14E, B16H, B25H, B29K(N ϵ 二十烷二酰基-gGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素”或“A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-2xOEG),

desB30 人胰岛素”，表示人胰岛素中位置 A14 的氨基酸 Y 已被突变为 E，人胰岛素中位置 B16 的氨基酸 Y 已被突变为 H，人胰岛素中位置 B25 的氨基酸 F 已被突变为 H，人胰岛素中位置 B29 的氨基酸 K 已通过 B29 的赖氨酸残基的 ϵ 氮(称为 $N\epsilon$)上被残基二十烷二酰基-gGlu-2xOEG 酰化而修饰，和人胰岛素中位置 B30 的氨基酸 T 已被缺失。



本文中“ n xPEG”表示 $\text{-NH(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{CH}_2\text{CO-}$ ，其中 n 为整数。例如，“12xPEG”表示基团 $\text{-NH(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{12}\text{CH}_2\text{CO-}$ 。

胰岛素是由胰腺中 β -细胞分泌的多肽激素，由 A 和 B 两条多肽链构成，所述 A 链和 B 链由两个链间二硫键连接。此外，所述 A 链特征为有一个链内二硫键。

主要有三种方法用于在微生物中制备人胰岛素。两种涉及大肠杆菌，一种通过在细胞质中表达融合蛋白(Frank et al. (1981) in *Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium* (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.第 729-739 页)，另一种是使用信号肽以使之能够分泌至周质空间(Chan et al. (1981) *PNAS* 78:5401-5404)。第三种方法是利用酿酒酵母使胰岛素前体分泌到培养基中(Thim et al. (1986) *PNAS* 83:6766-6770)。现有技术公开了许多在大肠杆菌或酿酒酵母中表达的胰岛素前体的方法，参照例如美国专利第 5,962,267 号、WO95/16708、EP0055945、EP0163529、EP0347845 和 EP0741188。

胰岛素类似物的载体的构建、表达、处理和纯化可使用本领域技术人员公知的技术进行。例如可以通过美国专利第 6500645 号中所公开的众所周知的技术，通过在合适的宿主细胞中表达编码目标胰岛素类似物

的 DNA 序列来制备所述胰岛素类似物。例如也可以通过下述文献中报道的方法来制备胰岛素类似物：Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α -Helix for Receptor Binding; *Biochemistry* 2008 47 4743-4751。该文献中使用重叠延伸 PCR 将突变引入胰岛素编码载体。胰岛素类似物作为具有 Ala-Ala-Lys 小 C-肽的前胰岛素样融合蛋白在酿酒酵母菌株 MT663 中表达。使用水解无色杆菌(*A. lyticus*)内切蛋白酶，单链前体经酶促转化为双链 desB30 类似物。

经过分离的胰岛素类似物可通过本领域公知的酰化方法在所需位置酰化，这样的胰岛素类似物的实例在例如公布号为 CN1029977C、CN1043719A 和 CN1148984A 的中国专利申请中已有描述。

编码的各胰岛素类似物多肽的核酸序列可由已建立的标准方法通过合成来制备，例如由 Beaucage 等(1981)*Tetrahedron Letters* 22: 1859-1869 中所描述的方法、或 Matthes 等(1984)*EMBO Journal* 3: 801-805 中描述的方法。

以下通过实施例对本发明作进一步的说明。需要注意的是，这些实施例不构成对本发明保护范围的限制。

实施例

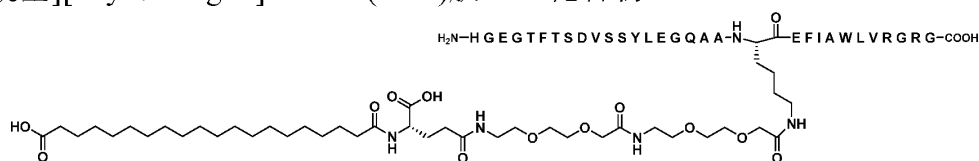
缩略语

cAMP 是环磷酸腺苷；
BHK 是幼仓鼠肾细胞；
DNA 是脱氧核糖核酸；
Na₂HPO₄ 是磷酸氢二钠；
NaOH 是氢氧化钠；
OEG 是氨基酸残基-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂OCH₂CO-；
OSu 是琥珀酰亚胺基-1-基氧基-2,5-二氧化-吡咯烷-1-基氧基；
OtBu 是氧叔丁基；
HCl 是氯化氢；
 γ Glu 或 gGlu 是 γ L-谷氨酰基；
NHS 是 N-羟基琥珀酰亚胺；
DCC 是二环己基碳二亚胺；
AEEA 是 2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸；

OH 是氢氧根;
 Gly 是甘氨酸;
 Arg 是精氨酸;
 TFA 是三氟乙酸;
 HbA1c 是糖化血红蛋白。

实施例 1

标题化合物: $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}4\text{-(}19\text{-羧基十九烷酰基氨基})\text{-}4\text{(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)肽}$ (化合物 1)



1、 $N\text{-}\epsilon^{26}\text{-}[2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}2\text{-(}2\text{-[}4\text{-(}19\text{-羧基十九烷酰基氨基})\text{-}4\text{(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基}][\text{Gly}8, \text{Arg}34]\text{GLP-1-(7-37)肽}$ 的制备

通过一般的蛋白质重组表达方法制备[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (具体方法参见 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*, Michael R. Green, Cold Spring Harbor Press, 2012)。使[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽(5g, 1.48mmol)溶解于 100mM Na_2HPO_4 水溶液(150mL)中, 并且加入乙腈(100mL), 并用 1N NaOH 将 pH 调整至 pH 10-12.5。使叔丁基二十烷二酰- $\gamma\text{Glu}(2\text{xOEG-OSu})\text{-OtBu}$ (1.59g, 1.63mmol)溶解于乙腈(50mL)中, 并且缓慢加入[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽溶液中。使 pH 维持在 10-12.5。在 120 分钟后, 将反应混合物加入水(150mL)中, 并且用 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 5.0。通过离心分离沉淀, 并且冻干。将粗产物加入三氟乙酸(60mL)与二氯甲烷(60ml)混合溶液中, 并且在室温下搅拌 30 分钟。将混合物浓缩至约 30ml, 倾注到冰冷的正庚烷(300mL)中, 通过过滤分离沉淀的产物, 并用正庚烷洗涤 2 次。真空干燥后, 产物通过离子交换层析(Ressource Q, 在 42.5%乙醇中的 0.25%-1.25% 乙酸铵梯度, pH7.5)、反相层析(乙腈, 水, TFA)纯化, 将纯化的级分合并, 用 1N HCl 将 pH 调整至 5.2, 分离沉淀物, 并冻干得到标题化合物。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1028.79[M+4H]^{4+}$

2、中间体叔丁基二十烷二酰- $\gamma\text{Glu}(2\text{xOEG-OSu})\text{-OtBu}$ 的制备

2.1 叔丁基二十烷二酰-OSu

氮气保护条件下，将二十烷二酸单叔丁酯(20g, 50.17mmol)和 NHS(5.77g, 50.17mmol)在二氯甲烷(400mL)中混合，加入三乙胺(13.95mL)，将得到的浑浊混合物在室温下搅拌，然后加入 DCC(11.39g, 55.19mmol)，将其进一步搅拌过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水进行水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 24.12g(收率 97%)的叔丁基二十烷二酰-OSu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=496.36(M+1)^+$

2.2 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-OSu(24.12g, 48.66mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌，依次加入 H-Glu-OtBu(10.88g, 53.53mmol)，三乙胺(12.49mL)，水(25mL)，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)，分液，下层有机相加入饱和盐水进行水洗，分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜。得到 27.27g(收率 96%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=584.44(M+1)^+$

2.3 叔丁基二十烷二酰- γ Glu(OSu)-OtBu。

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu(27.27g, 46.71mmol)溶于二氯甲烷(300mL)，加入三乙胺(11.99mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(5.38g, 50.17mmol)，接着加入 DCC(10.60g, 51.38mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水进行水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，加入甲基叔丁基醚，搅拌 30 分钟，抽滤，滤饼真空干燥过夜，得到 25.76g(收率 81%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu(OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

2.4 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu(OSu)-OtBu (25.76g, 37.83mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌，依次加入 2xAEAA (11.66g, 37.83mmol)，三乙胺(9.71mL)，水(25mL)，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室

温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)分液, 下层有机相加入饱和盐水进行水洗, 分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥, 真空干燥过夜。得到 30.75g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=874.59(M+1)^+$

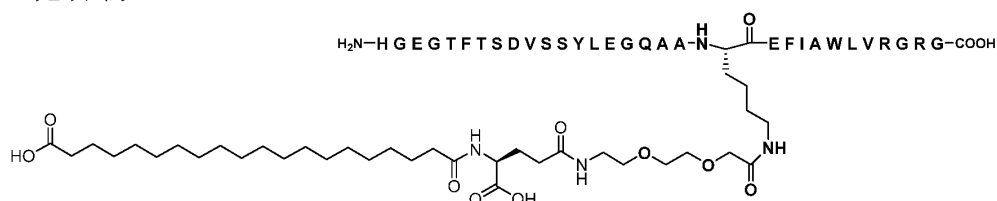
2.5 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

氮气保护条件下, 将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30.75g, 35.18mmol)溶于二氯甲烷(300mL), 加入三乙胺(9.03mL)搅拌 10 分钟, 再加入 NHS(4.05g, 35.18mmol), 接着加入 DCC(7.98g, 38.70mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤, 将得到的滤液浓缩至几乎干燥, 将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合, 搅拌 20 分钟, 分液, 上层有机相加入饱和食盐水进行水洗, 分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥、过滤, 将滤液减压浓缩至几乎干燥, 真空干燥过夜, 得到 31.09g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

实施例 2

标题化合物: N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 2)



以与实施例 1 第 1 部分类似的步骤制备 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-羧基十九烷酰基氨基]-4(S)-羧基丁酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

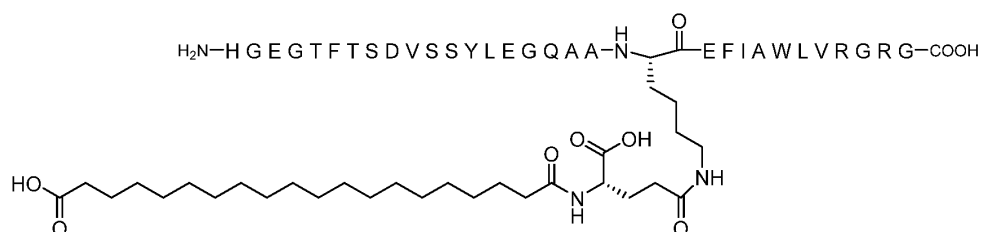
LC-MS(电喷雾): $m/z=992.52[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OEG-OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=826.54(M+1)^+$

实施例 3

标题化合物: N- ϵ^{26} -(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 3)



以与实施例 1 第 1 部分类似的步骤制备 N-ε²⁶-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

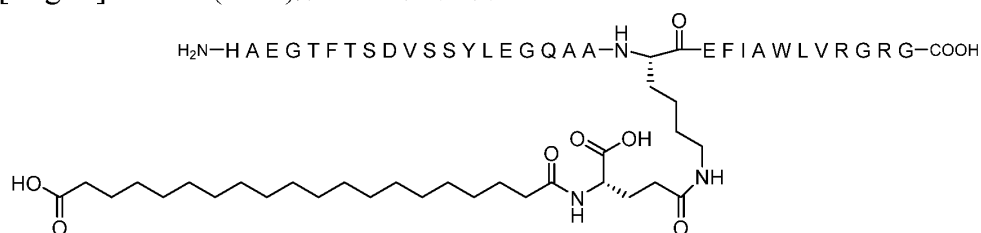
LC-MS(电喷雾): $m/z=956.25[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十烷二酰-γGlu-(OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

实施例 4

标题化合物: N-ε²⁶-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 4)



以与实施例 1 第 1 部分类似的步骤制备 N-ε²⁶-(19-羧基十九烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Arg34]GLP-1-(7-37)肽

LC-MS(电喷雾): $m/z=959.75[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十烷二酰-γGlu-(OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

对照例 1

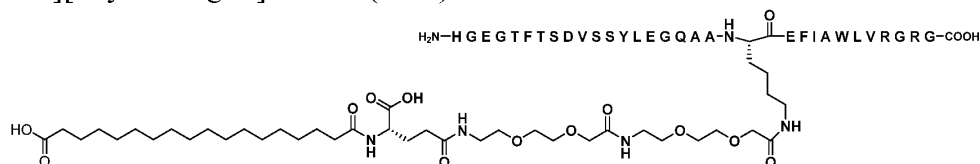
对照化合物利拉鲁肽, 按照专利 CN1232470A 的实施例 37 进行制备。

对照例 2

对照化合物索玛鲁肽, 按照专利 CN101133082A 的实施例 4 进行制备。

对照例 3

标题化合物：N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

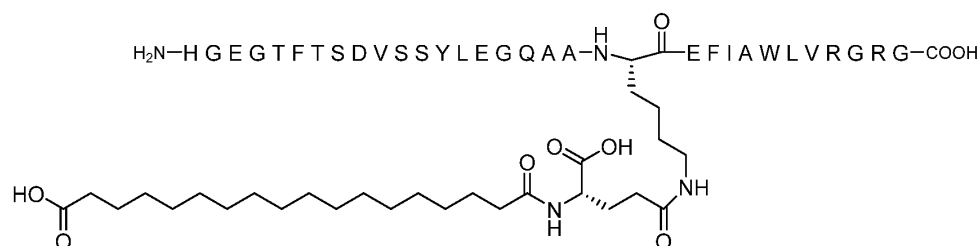


以与实施例 1 第 1 部分类似的步骤制备 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

LC-MS(电喷雾): $m/z=1021.78[M+4H]^{4+}$

对照例 4

标题化合物：N- ϵ^{26} -(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽



以与实施例 1 第 1 部分类似的步骤制备 N- ϵ^{26} -(17-羧基十七烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

LC-MS(电喷雾): $m/z=949.24[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基十八烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=653.43(M+1)^+$

实施例 5: 在 db/db 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于在糖尿病情况下证实本发明 GLP-1 衍生物对高血糖(BG)的调控效应。

在肥胖的 2 型糖尿病 (T2DM) 小鼠模型(db/db 小鼠)上, 在单剂量研究中测试实施例 1-4 和对照例 1-4 的标题化合物(也称 GLP-1 衍生物)。以 100 μ g/kg 的不同剂量测试所述 GLP-1 衍生物的降低血糖的药效效果。

8-9 周龄雄性 db/db (BKS/Lepr) 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中, 自由获取标准食物和纯化水, 环境条件控制在相对湿度为 40%-60%, 温度为 22 $^{\circ}$ C-24 $^{\circ}$ C。1-2 周的适应期后, 开始用于实验。

于当日实验开始前, 在时间约上午约 9:30 点评估基础血糖, 并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组, 接受如下处理: 皮下注射溶媒, 或皮下注射 GLP-1 衍生物 100 μ g/kg, 其中溶媒包含: 丙二醇 14mg/ml、苯酚 5.5mg/ml、磷酸氢二钠 1.133mg/ml, 所述溶媒的 pH 为 8.12。

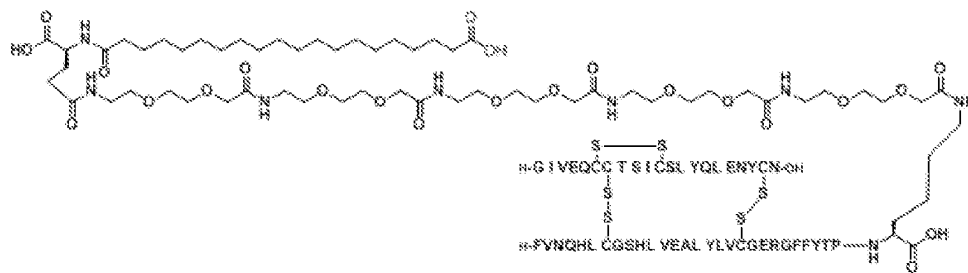
将所述 GLP-1 衍生物溶解在溶媒中至 20 μ g/ml 的给药浓度, 给药体积为 5ml/kg(即 50 μ l/10g 体重)。采用皮下给药方式, 颈背部皮下注射给药一次。在大约上午 10:30(时间 0)给予相应的 GLP-1 衍生物, 给药期间动物自由摄食和饮水, 在给药后 2、4、6、8、10、12、24、48 和 72 小时评估小鼠血糖。用酒精棉球清洁鼠尾部, 使用一次性采血针从尾巴采集血滴, 用血糖仪及配套试纸(罗氏)进行测定。给药 24、48 和 72h 分别测量小鼠摄食量和每只小鼠体重。

以给药前基线血糖为基准, 给药后每个监测点的血糖与之相比得相应时间点的血糖百分率, 对于每个单剂量的 GLP-1 衍生物绘制血糖百分率对时间的剂量反应曲线, 为了定量说明 GLP-1 衍生物对血糖的影响, 对于每个单独的剂量响应曲线, 计算从 0 至 72 小时的血糖百分率-时间的曲线下面积(AUC_{0-72h})。其中, AUC 是时间-血糖百分率曲线的曲线下面积, AUC 值越小, 表明降糖效果越好, 药效越好。

图 1a-4b 显示了本发明的 GLP-1 衍生物具有预料不到的增加的药效, 例如实施例 1-4 的标题化合物对 db/db 小鼠的降糖效果明显优于利拉鲁肽、和对照例 3-4 的化合物。特别是本发明实施例 2 的化合物的降糖效果优于索玛鲁肽。此外, 本发明的 GLP-1 衍生物例如实施例 1-4 的化合物在 db/db 小鼠中的有效作用时间相比于利拉鲁肽和对照例 3-4 的化合物有明显延长, 特别是实施例 2 的化合物在 db/db 小鼠中的降糖有效作用时间长于索玛鲁肽。

实施例 6

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-5xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 5)



1、des (B30) 人胰岛素的合成

des (B30) 人胰岛素根据中国专利 CN1056618C 实施例 101 中所述方法制备。

2、目标胰岛素的制备

将 desB30 人胰岛素(5g, 0.876mmol)溶解于 100mM Na₂HPO₄ 水溶液(150mL)中, 并且加入乙腈(100mL), 并用 1N NaOH 将 pH 调整至 pH 10-12.5。使叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OSu)-OtBu(1.36g, 0.964mmol)溶解于乙腈(50mL)中, 并且缓慢加入胰岛素溶液中。使 pH 维持在 10-12.5。在 120 分钟后, 将反应混合物加入水(150mL)中, 并且用 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 5.0。通过离心分离沉淀, 并冻干。将粗产物加入三氟乙酸(60mL)与二氯甲烷(60ml)混合溶液中, 并且在室温下搅拌 30 分钟。将混合物浓缩至约 30ml, 倾注到冰冷的正庚烷(300mL)中, 通过过滤分离沉淀的产物, 并用正庚烷洗涤 2 次。真空干燥后, 通过离子交换层析(Ressource Q, 在 42.5%乙醇中的 0.25%-1.25%乙酸铵梯度, pH7.5)、反相层析(乙腈, 水, TFA)纯化, 将纯化的级分合并, 用 1N HCl 将 pH 调整至 5.2, 并分离沉淀物, 冻干、得到标题化合物化合物 5。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1377.53 [M+5H]^{5+}$

3、中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OSu)-OtBu 的制备

3.1 叔丁基二十烷二酰-OSu

氮气保护条件下, 将二十烷二酸单叔丁酯(20g, 50.17mmol)和 NHS(5.77g, 50.17mmol)在二氯甲烷中混合, 加入三乙胺(13.95mL), 将得到的浑浊混合物在室温下搅拌, 然后加入 DCC(11.39g, 55.19mmol), 并进一步搅拌过夜。过滤, 将得到的滤液浓缩至几乎干燥, 将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合, 搅拌 20 分钟, 分液, 上层有机相加入饱和食盐水进行水洗, 分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后将滤液减

压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 24.12g(收率 97%)的叔丁基二十烷二酰-OSu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=496.36(M+1)^+$

3.2 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-OSu(24.12g, 48.66mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌，依次加入 H-Glu-OtBu(10.88g, 53.53mmol)，三乙胺(12.49mL)，水，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)，分液，下层有机相加入饱和盐水进行水洗，分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜。得到 27.27g(收率 96%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=584.44(M+1)^+$

3.3 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu(27.27g, 46.71mmol)溶于二氯甲烷(300mL)，依次加入三乙胺(11.99mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(5.38g, 50.17mmol)，接着加入 DCC(10.60g, 51.38mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水进行水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，加入甲基叔丁基醚，搅拌 30 分钟，抽滤，滤饼真空干燥过夜，得到 25.76g(收率 81%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

3.4 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu (25.76g, 37.83mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌，依次加入 2xAEEA (11.66g, 37.83mmol)，三乙胺(9.71mL)，水(25mL)，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)，分液，下层有机相加入饱和盐水进行水洗，分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜。得到 30.75g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=874.59(M+1)^+$

3.5 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30.75g, 35.18mmol)溶于二氯甲烷(300mL)，加入三乙胺(9.03mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(4.05g, 35.18mmol)，接着加入 DCC(7.98g, 38.70mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水进行水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 31.09g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

3.6 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu (31.09g, 32.01mmol)溶于二氯甲烷(350mL)搅拌，依次加入 3xAEEA (14.52g, 32.01mmol)，三乙胺(8.90mL)，水(25mL)，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL)，分液，下层有机相加入饱和盐水进行水洗，分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤、将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜。得到 38.99g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1309.81(M+1)^+$

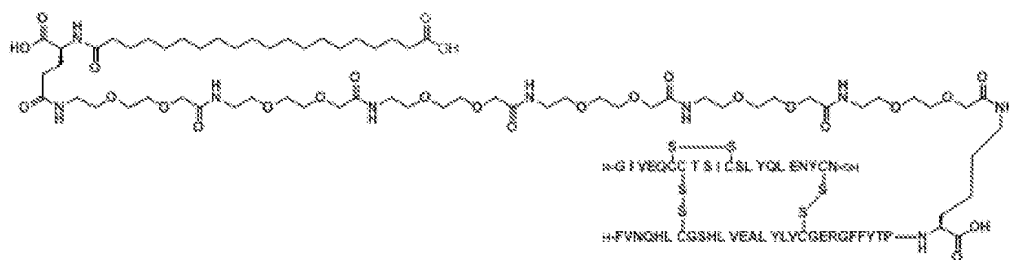
3.7 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OSu)-OtBu

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OH)-OtBu (38.99g, 29.77mmol)溶于二氯甲烷(400mL)，加入三乙胺(8.28mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(3.43g, 29.77mmol)，接着加入 DCC(6.76g, 32.75mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水洗涤，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 38.11g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(5xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1406.83(M+1)^+$

实施例 7:

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 6)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 6。

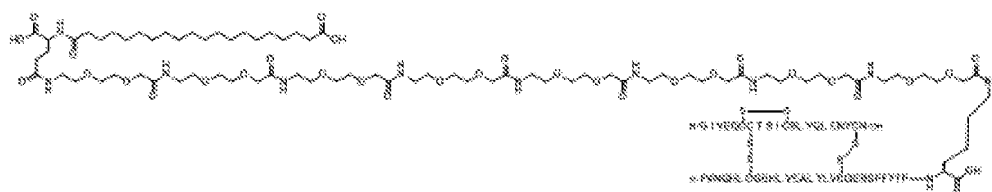
LC-MS(电喷雾): $m/z=1406.28[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十烷二酰基- γ Glu-(6xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1551.90(M+1)^+$

实施例 8:

B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 7)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 7。

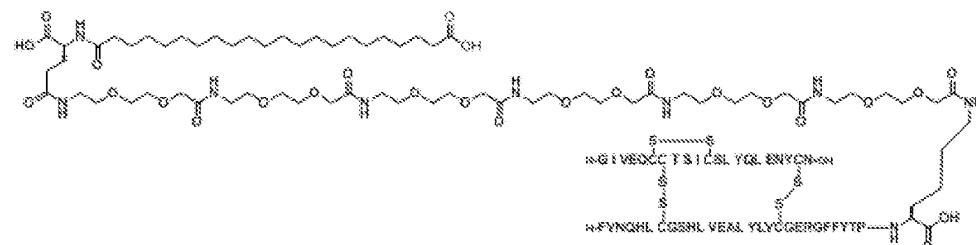
LC-MS(电喷雾): $m/z=1464.30[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十烷二酰基- γ Glu-(8xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1814.02(M+1)^+$

实施例 9:

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 8)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 8。

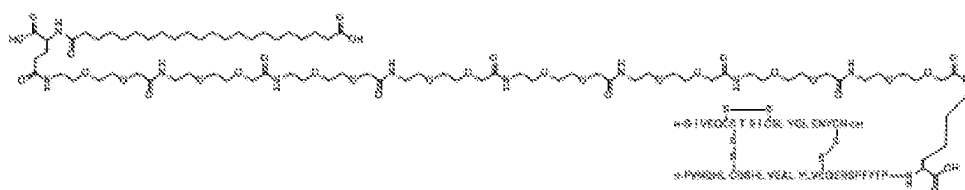
LC-MS(电喷雾): $m/z=1411.88[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰基- γ Glu-(6xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1579.94(M+1)^+$

实施例 10:

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-8xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 9)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 9。

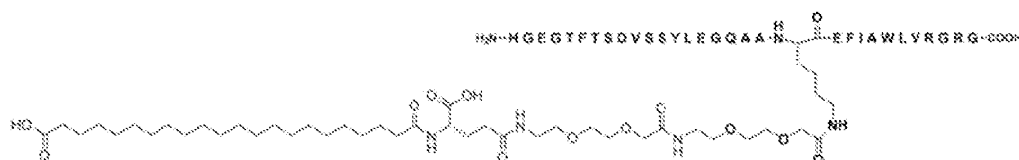
LC-MS(电喷雾): $m/z=1469.91[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰基- γ Glu-(8xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=1870.08(M+1)^+$

实施例 11:

标题化合物: N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽 (化合物 10)



以与实施例 1 第 1 部分类似的步骤制备 N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-羧基二十一烷酰基氨基)-4(S)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)肽

LC-MS(电喷雾): $m/z=1035.80[M+4H]^{4+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰基- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 1 第 2 部分类似的步骤进行制备。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=999.64(M+1)^+$

实施例 12: 体外效力或活性

本实施例的目的是测试本发明的 GLP-1 衍生物的体外效力或活性

复苏表达 GLP-1R 的细胞，使用 ham's-F12 培养基，将所述细胞接种至 25mL 细胞培养瓶中，37℃，5%CO₂ 培养过夜。实验当天分别配制本发明的实施例 11 的标题化合物(化合物 10)和利拉鲁肽至 150μg/mL，然后梯度稀释样品至 750ng/ml、150ng/ml、30ng/ml、6ng/ml、1.2ng/ml、0.24ng/ml、0.048ng/ml、0.0096ng/ml 和 0.00192ng/ml。调整细胞浓度至 1×10⁵ 个细胞/ml，每孔加入 200μl 细胞和 200μl 稀释后样品，混匀后吸取 100μl 至新 96 孔板中，3 复孔，在细胞培养箱中，培养 4 小时后加入荧光素酶试剂，振荡混匀后从 96 孔板中转至新 96 孔白色平底板，酶标仪读取信号值，数据用 GraphPad Prism 6 处理，计算 EC₅₀。体外效力实验在不同日期重复 4 次。

表 1：体外效力

实验对象	EC ₅₀ (nM)
利拉鲁肽	0.439
化合物 10	0.677

由实验结果可知，本发明的 GLP-1 衍生物具有令人满意的体外效力，其体外活性与利拉鲁肽接近，这证实了其具有 GLP-1 受体激动活性。

实施例 13：在高脂饮食诱导肥胖 C57BL 小鼠中的药效学实验

本研究的目的在于证实本发明的 GLP-1 衍生物在高脂饮食诱导肥胖 C57BL 小鼠中对血糖的调节效果及减重效果。

将 5 周龄、体重 17-22g 的 C57BL 小鼠（雌雄各半），于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中（3-5 只/盒），高脂饮食诱导组自由获取高脂饲料和纯化水，正常对照组自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%-60%，温度为 22℃-24℃，饲养 10 周，选择体重超过正常对照组小鼠体重的 30%-50% 的小鼠进行药效评价。

于当日实验开始前，在时间-1/1h（上午 9:30）评估基础血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将高脂饮食诱导组小鼠匹配分配到溶媒组（即模型对照组）或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射对照化合物索玛鲁肽 100μg/kg，或皮下注射本发明实施例 11 的标题化合物 100μg/kg 和 300μg/kg。其中溶媒包含：丙二醇 14mg/ml、苯酚 5.5mg/ml、磷酸氢二钠 1.133mg/ml，所述溶媒的 pH 为 7.4。

采用皮下给药方式，颈背部皮下给药一次（5 μ l/g 体重）。在大约上午 10:30（时间 0）给予 GLP-1 衍生物，在给药后 3、6、24、48 和 72 小时评估小鼠血糖。同时，每天监测小鼠体重。

对每个单剂量的 GLP-1 衍生物绘制 Δ 血糖-时间曲线。其中， Δ 是指给定时间的实际血糖减去基线，其中基线为在时间 0 时的血糖。因此，在这些曲线中， $y=0$ 表示基线。对于每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至监测终点的血糖-时间曲线下面积差（ Δ AUC）， Δ AUC 值越小，表明降糖效果越好，药效越好。

首次给药 48 小时后进行一次腹腔糖耐量试验（ipGTT）实验，步骤如下：于指定时间点尾尖采血测定空腹血糖（0min），之后腹腔给予葡萄糖溶液（200mg/ml, 10ml/kg），然后于糖负荷后 30min、60min 和 120min 测定血糖。

用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪（罗氏）及配套试纸进行测定。

对于每个单剂量的 GLP-1 衍生物绘制血糖对时间的剂量响应曲线、每日体重变化对时间的剂量响应曲线。为了更直观及定量说明本发明的 GLP-1 衍生物对血糖的影响，对于每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至监测终点的相对血糖-时间曲线下面积差（ Δ AUC）。其中， Δ AUC 值越小，表明降糖效果越好，药效越好。

图 5a-6b 显示了本发明的 GLP-1 衍生物具有预料不到的增加的药效，例如实施例 11 的化合物 10 对高脂饮食诱导的肥胖 C57BL 小鼠的降糖效果在同剂量下与已上市的对照化合物索马鲁肽没有明显差异，甚至由定量的图 5b 和 6b 可以看出，本发明的 GLP-1 衍生物的降糖效果还略优于索玛鲁肽。尤其在药后 72h 时，同剂量的化合物 10 组血糖平均值低于同剂量的索玛鲁肽组血糖平均值。此外，本发明的 GLP-1 衍生物的降糖效果具有剂量依赖性，随着本发明的 GLP-1 剂量的增加，其降糖效果也随之明显提高。

图 6a-6b 显示，在 ipGTT 实验中，实施例 11 的化合物 10，相比于溶媒，在高脂饮食诱导肥胖 C57BL 小鼠的首次给药后 48 小时进行 ipGTT 实验后，对血糖具有明显的抑制作用，且略优于同剂量的索马鲁肽的降糖效果。

图 5c 显示本发明的 GLP-1 衍生物例如实施例 11 的化合物 10 具有优异的体重减轻效果，其减重效果优于索马鲁肽。

实施例 14：在 II 型糖尿病 db/db 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于在糖尿病情况下证实本发明的 GLP-1 衍生物对血糖的调节效果。

在 db/db 小鼠上，以 0.3、1、3、10、30 和 100nmol/kg 的不同剂量测试实施例 11 的标题化合物和对照化合物利拉鲁肽的降低血糖效果，求算 ED₅₀。

8-9 周龄雄性 db/db (BKS/Lepr) 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%-60%，温度为 22℃-24℃。1-2 周的适应期后，开始用于实验。

于当日实验开始前，在时间上午 9:00 评估基础血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将糖尿病小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射实施例 11 的化合物或对照组化合物利拉鲁肽 0.3、1、3、10、30 和 100nmol/kg，其中溶媒包含：丙二醇 14mg/ml，苯酚 5.5mg/ml，磷酸氢二钠 1.133mg/ml，所述溶媒的 pH 为 7.4。

采用皮下给药方式 (50μl/10g 体重)，颈背部皮下注射给药一次。在大约上午 10:00 (时间 0) 给予实施例 11 化合物，在给药后 1、2、3、6、12、24、48 和 72 小时评估小鼠血糖。

用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪 (罗氏) 及配套试纸进行测定。

对于每个单剂量的 GLP-1 衍生物绘制 Δ 血糖对时间的剂量响应曲线。Δ 是指给定时间的实际血糖减去基线，其中基线为在时间 0 时的血糖。为了说明 GLP-1 衍生物对血糖的影响，对于每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至 72 小时的 Δ 血糖的曲线下面积 ΔAUC，并针对 ΔAUC 计算有效剂量 50%(ED₅₀，产生在基线与最大效应之间的一半响应的 GLP-1 衍生物剂量)。以下表 2 中示出了所获得的 ED₅₀ 值。

表 2：在 db/db 小鼠中对血糖影响的 ED₅₀ 值

样品名称	ED ₅₀ (nmol/kg)
利拉鲁肽	9.68
化合物 10	8.42

由试验结果可知，本发明的化合物 10 的体内降糖药效明显优于利拉鲁肽。

实施例 15 在 II 型糖尿病 db/db 小鼠中的药效学研究

本研究的目的在于证实本发明 GLP-1 衍生物对血糖、摄食量和饮水量的控制。

在 II 型糖尿病 db/db 小鼠上，在单剂量研究中测试实施例 2 的标题化合物和对照化合物索马鲁肽。

8-9 周龄雄性 db/db (BKS/Lepr) 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%-60%，温度为 22℃-24℃。1-2 周的适应期后，开始用于实验。

于当日实验开始前，在时间约上午 9:00 评估基础血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将糖尿病小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射实施例 2 的化合物或对照组化合物索马鲁肽 100μg/kg，其中溶媒包含丙二醇 14mg/ml，苯酚 5.5mg/ml，和磷酸氢二钠 1.133mg/ml，pH7.4。

将所述 GLP-1 衍生物溶解在溶媒中至 20μg/ml 的给药浓度，采用皮下给药方式（50μl/10g 体重），颈背部皮下注射给药一次。在大约上午 10:00（时间 0）给予实施例 2 化合物，在给药后 1、2、3、6、12、24、48 和 72 小时评估小鼠血糖。用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪（罗氏）及配套试纸进行测定。同时，每天测量小鼠摄食量及饮水量。

对于每个单剂量的 GLP-1 衍生物绘制血糖对时间的剂量响应曲线、摄食量对时间的剂量响应曲线、及饮水量对时间的剂量响应曲线。为了说明本发明的 GLP-1 衍生物对血糖的影响，对于每个单独的剂量响应曲线，计算从 0 至监测终点的血糖-时间的曲线下面积差（ΔAUC）。其中，ΔAUC 值越小，表明降糖效果越好，药效越好。

图 7a-图 7d 显示了本发明的 GLP-1 衍生物在给药后具有预料不到的增加的降糖药效、对食物摄入量和饮水量的提高的抑制效果。这进一步证明了实施例 2 的标题化合物在给药后对 db/db 小鼠的降糖效果优于同剂量下的索马鲁肽。此外，实施例 2 的标题化合物可以有效的控制食物摄入量和饮水量，其效果优于索马鲁肽，提示本发明的 GLP-1 衍生物具有更好的体重减轻效果。

实施例 16 在 II 型糖尿病 db/db 小鼠中的长期药效学研究

本研究的目的在于证实本发明 GLP-1 衍生物对 II 型糖尿病 db/db 小鼠的长期降糖效果、减重、及控制饮食效果。

在 II 型糖尿病 db/db 小鼠上测试实施例 11 的 GLP-1 衍生物和对照化合物索玛鲁肽。GLP-1 衍生物以 100 和 300 μ g/kg 的不同剂量及索玛鲁肽以 100 μ g/kg 的剂量给予小鼠，测定所述 GLP-1 衍生物及对照化合物索玛鲁肽降低血糖、降低体重、减少食物摄入量和饮水量的效果。

8-9 周龄雄性 db/db (BKS/Lepr) 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中，自由获取标准食物和纯化水，环境条件控制在相对湿度 40%-60%，温度为 22 $^{\circ}$ C-24 $^{\circ}$ C。1-2 周的适应期后，开始用于实验。

于当日实验开始前，在时间大约上午 9:00 评估基础血糖，并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将糖尿病小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组，接受如下处理：皮下注射溶媒，或皮下注射 GLP-1 衍生物 100 和 300 μ g/kg，或皮下注射对照化合物索玛鲁肽 100 μ g/kg。其中溶媒包含：丙二醇 14mg/ml，苯酚 5.5mg/ml，磷酸氢二钠 1.133mg/ml，所述溶媒的 pH 值为 7.4。

采用皮下给药方式 (50 μ l/10g 体重)，颈背部皮下注射给药，在大约上午 10:00 (时间 0) 给予 GLP-1 衍生物，分别于第 0、3、7、10、13、16、19、22、25、28 天给药，在每次给药前及最后一次给药后 72 小时评估小鼠血糖。第 0-17 天每天测量小鼠体重、摄食量和饮水量，第 17 天后每 3 天监测一次小鼠体重、摄食量和饮水量。

图 8a-8f 显示了本发明的 GLP-1 衍生物在长期给药后仍具有预料不到的增加的降糖药效、提高的体重减轻效果、及抑制摄食和饮水量的效果。如图 8a 和 8b 显示，相比于同剂量的索马鲁肽，实施例 11 的化合物 10 在长期给药后对 db/db 小鼠具有更优的降糖效果。图 8c-8d 显示，相比于同剂量的索马鲁肽，本发明的 GLP-1 衍生物例如实施例 11 的标题化合物具有更好的体重减轻效果、及抑制摄食和饮水量的效果。

实施例 17 在 II 型糖尿病 Kkay 小鼠中的长期药效学研究

本研究的目的在于证实本发明 GLP-1 衍生物对 II 型糖尿病 Kkay 小鼠的降糖效果

在 II 型糖尿病 Kkay 小鼠上测试实施例 11 的化合物 10、实施例 2 的化合物 2、和对照化合物度拉糖肽 (又称杜拉鲁肽)。化合物 10 和化合物 2 以 100 和 300 μ g/kg 的不同剂量、度拉糖肽以 600 μ g/kg 的剂量给予小鼠，测定本发明的 GLP-1 衍生物及对照化合物度拉糖肽降低血糖效果和 HbA1c 的效果。

12-14 周龄雄性 Kkay 小鼠于屏障环境内饲养于合适规格的饲养盒中, 自由获取标准食物和纯化水, 环境条件控制在在相对湿度 40%-60%, 温度为 22℃-24℃。1-2 周的适应期后, 开始用于实验。

于当日实验开始前, 在时间大约上午 9:00 评估基础血糖, 并对小鼠称重。根据随机血糖和体重将糖尿病小鼠匹配分配到溶媒组或治疗组, 接受如下处理: 皮下注射溶媒, 或皮下注射本发明的 GLP-1 衍生物 100 和 300 μ g/kg, 或皮下注射对照化合物度拉糖肽 600 μ g/kg。其中溶媒包含: 丙二醇 14mg/ml, 苯酚 5.5mg/ml, 磷酸氢二钠 1.133mg/ml, pH7.4。

采用皮下给药方式 (50 μ l/10g 体重), 颈背部皮下注射给药, 在大约上午 10:00 (时间 0) 给予本发明的 GLP-1 衍生物、度拉糖肽或溶媒, 每 2 天给药 1 次, 连续给药 16 次, 在首次给药后 3h、6h, 1 天和 2 天评估小鼠血糖, 末次给药 48h 后取 EDTA 抗凝检测 HbA1c。

图 9a-9b 显示了本发明的 GLP-1 衍生物给药后具有预料不到的增加的降糖药效, 实施例 11 和实施例 2 的标题化合物对 Kkay 小鼠的降糖效果明显优于度拉糖肽。图 9c 显示本发明的 GLP-1 衍生物对 II 型糖尿病 Kkay 小鼠降低 HbA1c 的效果明显优于度拉糖肽。

实施例 18: 药代动力学

本实施例的目的在于说明本发明化合物的体内药代动力学性质。

SD 大鼠的药代动力学

SD 大鼠 32 只, 每组 8 只 (雌雄各半), 分为化合物 10 低剂量组、化合物 10 中剂量组、和化合物 10 高剂量组, 分别皮下注射给药 15、90、540 μ g/kg, 以及化合物 10 静脉注射组, 经静脉注射给药 90 μ g/kg。化合物 10 低中高剂量组分别于给药前 (0min)、给药后 1、3、5、8、12、16、24、36、48、72、96、120h 采血测定血药浓度, 化合物 10 静脉注射组于给药前 (0min)、给药后 1min、10min、1、3、5、8、12、24、48、72、96、120h 采血测定血药浓度。使用 WinNonLin v6.4 软件的非房室模型计算药代参数 C_{max} 、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、MRT, 试验结果示出在表 3 中。

表 3: 向 SD 大鼠皮下注射化合物 10 后药代动力学参数

剂量(μ g/kg)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (hr)	$T_{1/2}$ (hr)	AUC_{0-t} (hr*ng/ml)	MRT(hr)
15	48.6	12	12.5	1489.9	21.2

90	296	14	13.0	9952.3	25.2
540	1490	16	13.3	61497.1	30.4
90(i.v.)	2540	—	13.0	23800	12.9

$C_{\max}$ =最大实测血浆浓度, $T_{\max}$ =最大实测血药浓度对应的时间, $T_{1/2}$ =末端消除半衰期, AUC_{0-t} =0-t 时间-血糖浓度时间曲线下面积, MRT =平均驻留时间

食蟹猴中的药代动力学

食蟹猴 24 只, 每组 6 只 (雌雄各半), 分为化合物 10 低剂量组、化合物 10 中剂量组、化合物 10 高剂量组, 分别皮下注射给予 10、60、360 μ g/kg, 以及化合物 10 静脉注射组, 经静脉注射 60 μ g/kg 化合物 10。化合物 10 低中高剂量组分别于给药前 (0min)、给药后 1、3、6、8、10、12、16、24、48、72、120、168、240h 采血测定血药浓度, 化合物 10 静脉注射组于给药前 (0min)、给药后 1min、10min、1、3、6、8、10、12、24、48、72、120、168、240h 采血测定血药浓度。使用 WinNonLin v6.4 软件的非房室模型计算药代参数, $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 、 $T_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 MRT , 试验结果示出在表 4 中。

表 4: 向食蟹猴皮下注射化合物 10 后药代动力学参数

剂量(μ g/kg)	$C_{\max}$ (ng/ml)	$T_{\max}$ (hr)	$T_{1/2}$ (hr)	AUC_{0-t} (hr*ng/ml)	MRT (hr)
10	80.7	9	58.4	7387	73.6
60	455	11	59.2	42256	76.0
360	2895	14	62.9	278528	74.5
60(i.v.)	1720	—	65.6	74200	63.5

由上述实验结果可知, 本发明的 GLP-1 衍生物化合物 10 在大鼠和食蟹猴体内均表现出较长的半衰期、较大的 AUC_{0-t} 、较长的 MRT 。且本发明的 GLP-1 衍生物均具有剂量依赖性, 其药效随着剂量的增加而提高。

实施例 19

本实验的目的在于测量本发明的 GLP-1 衍生物制剂的化学稳定性。

GLP-1 衍生物制剂

将化合物 10 溶解于 5.68mg/ml 的磷酸氢二钠溶液中至 8mg/ml 的最终浓度，根据在下表中各组分的量，依次加入含有丙二醇和苯酚的辅液，调节 pH 至下表中的值，产生最终 GLP-1 化合物浓度为 2mg/ml。

本实施例中制剂的化学稳定性能够用在 37℃ 存储 27 天后，高分子量蛋白(HMWP)相对于 0 天时的变化来显示，同时也能够用在 37℃ 存储 28 天后测得的有关物质的量的变化来表示。

高分子量蛋白（HMWP）的测定

通过高效液相色谱法（HPLC）测定高分子量蛋白（HMWP）的含量，在 Waters TSKgel G2000SWXL（7.8*300mm），5μm 柱上，在柱温为 30℃、样品池温度为 5℃ 时，用流动相以 0.5ml/min 的流速进行测试，其中，所述流动相包含 300ml 异丙醇，400ml 冰醋酸和 300ml 纯化水。检测波长为 276nm，进样量为 25μl。表 5 示出了，在 37℃ 存储 27 天相对于第 0 天时的 HMWP 的增加量。

有关物质的量的测定

通过高效液相色谱法（HPLC）测定 GLP-1 衍生物有关杂质的含量，在 Waters Kromasil 100-3.5-C8（4.6*250mm）柱上，在柱温为 35℃、样品池温度为 5℃ 时，用洗脱相以 1.0 ml/min 的流速进行测试。洗脱用由以下组成的流动相进行：

A 相包含 90mM 磷酸二氢钾和 10%乙腈（v/v），pH2.4

B 相为 75%（v/v）乙腈。

梯度：0-5 min 的 75%/25% A/B 至 55%/45% A/B 的线性变化，5-12 min 至 50%/50% A/B 的线性变化，12-42min 至 40%/60% A/B 的线性变化，42-60 min 的 10%/90% A/B 的线性变化，60-61min 至 75%/25% A/B 的线性变化，61-70 min 的 85%/15% A/B 的等度梯度。

检测波长为 214nm，流速为 1.0ml/min，进样量为 15μl。表 5 示出了，在 37℃ 存储 28 天相对于第 0 天时有关物质的增加量。

表 5

2mg/ml 化合物 10 14mg/ml 丙二醇 5.65 mg/ml 苯酚 1.42 mg/ml 无水磷酸二氢钠	37℃ 第 27 天时相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)	37℃ 第 28 天时相对于第 0 天时有关物质的增加 量 (%)
pH 值 6.5	0.822	4.35
pH 值 7.0	0.956	3.74
pH 值 7.7	1.808	2.92
pH 值 8.0	2.572	3.63

pH 值 8.4	4.048	4.62
----------	-------	------

有上表可知, 制剂在 pH 值 6.5-8.4 之间时, 均具有良好的化学稳定性, 并且在 pH 值处于 7.0-8.0 之间时, 制剂的化学稳定性最好。

实施例 20

本实验的目的在于测量本发明的 GLP-1 衍生物制剂的化学稳定性。

根据下表 6 和表 7 中各个组分的量, 按照与实施例 19 类似的步骤, 配制表 6 和表 7 中的 GLP-1 衍生物制剂。并按照与实施例 19 类似的步骤测定 HMWP 和有关物质的变化。下表 6 和表 7 示出了不同配方的 GLP-1 衍生物制剂的 HMWP 和有关物质的变化。

表 6

2mg/ml 化合物 10 14mg/ml 丙二醇 pH 7.3	25℃ 第 14 天 相对于第 0 天时 HMWP 的 增加量 (%)	25℃ 第 21 天 相对于第 0 天 HMWP 的增加量 (%)	37℃ 第 14 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)	37℃ 第 21 天 相对于第 0 天时 HMWP 的增加量 (%)
5.5 mg/ml 苯酚+ 1.42mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.16	0.21	0.41	0.62
5.65mg/ml 苯酚+ 1.42mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.13	0.17	0.36	0.58
6.2mg/ml 苯酚+ 1.42mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.12	0.18	0.41	0.60
5.5mg/ml 苯酚+ 1.133mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.16	0.2	0.67	1.00

表 7

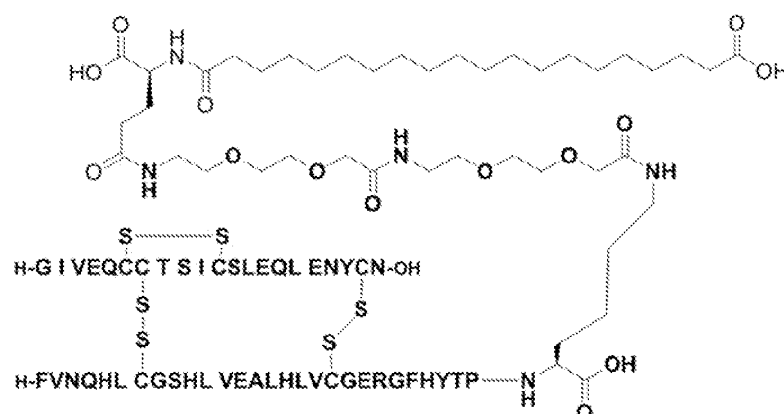
2mg/ml 化合物 10 14mg/ml 丙二醇 pH 7.3	25℃ 第 14 天 相对于第 0 天时有关物 质的增加 (%)	25℃ 第 21 天 相对于第 0 天有关物 质的增加 (%)	37℃ 第 14 天 相对于第 0 天 时有关物质 的增加 (%)	37℃ 第 35 天 相对于第 0 天 时有关物质 的增加 (%)
5.5 mg/ml 苯酚+ 1.42mg/ml	0.64	1.04	2.06	4.00

无水磷酸氢二钠				
5.65mg/ml 苯酚+ 1.42mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.50	1.15	2.15	4.08
6.2mg/ml 苯酚+ 1.42mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.94	1.16	1.73	4.07
5.5mg/ml 苯酚+ 1.133mg/ml 无水磷酸氢二钠	0.71	1.15	1.90	4.27

由上表可知, 本发明的上述 GLP-1 衍生物制剂中 HMWP 的量和有关物质的量随着时间的变化增加非常缓慢, 表明上述 GLP-1 衍生物制剂均具有优异的化学稳定性。

对照例 5

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素(对照化合物 5)



1、A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-2xOEG), desB30 人胰岛素的制备

通过常规的制备胰岛素类似物的方法制备 A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素 (具体方法参见 Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α-Helix for Receptor Binding; Biochemistry 2008 47 4743-4751)。将 A14E, B16H, B25H, desB30 人胰岛素(5g, 0.888mmol)溶解于 100mM Na₂HPO₄ 水溶液(150mL)中, 并且加入乙腈(100mL), 并用 1N NaOH 将 pH 调整至 pH 10-12.5。使叔丁基二十烷二酰-γGlu-(2xOEG-OSu)-OtBu(0.948g, 0.976mmol)溶解于乙腈(50mL)中, 并且缓慢加入胰岛素溶液中。使 pH 维持在 10-12.5。在 120 分钟后, 将反

应混合物加入水(150mL)中,并且用 1N HCl 水溶液将 pH 调整至 5.0。通过离心分离沉淀,并冻干。将冻干的粗产物加入三氟乙酸(60mL)与二氯甲烷(60ml)混合溶液中,并在室温下搅拌 30 分钟。将混合物浓缩至约 30ml,倾注到冰冷的正庚烷(300mL)中,并且通过过滤分离沉淀的产物,并且用正庚烷洗涤 2 次。真空干燥后,通过离子交换层析((Ressource Q, 在 42.5%乙醇中的 0.25%-1.25%乙酸铵梯度, pH7.5)、反相层析(乙腈, 水, TFA)纯化,将纯化的级分合并,用 1N HCl 将 pH 调整至 5.2,并分离沉淀物,冻干、得到对照化合物 5。

LC-MS(电喷雾): $m/z=1063.6852[M+6H]^{6+}$

2、中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu 的制备: 与实施例 1 第 3 部分类似的步骤进行。

2.1 叔丁基二十烷二酰-OSu

氮气保护条件下,将二十烷二酸单叔丁酯(20g, 50.17mmol)和 NHS(5.77g, 50.17mmol)在二氯甲烷中混合,加入三乙胺(13.95mL),使得到的浑浊混合物在室温下搅拌,然后加入 DCC(11.39g, 55.19mmol),并进一步搅拌过夜。过滤,将得到的滤液浓缩至几乎干燥,将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合,搅拌 20 分钟,分液,上层有机相加入饱和食盐水洗涤,分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜,得到 24.12g(收率 97%)的叔丁基二十烷二酰-OSu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=496.36(M+1)^+$

2.2 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu

将叔丁基二十烷二酰-OSu(24.12g, 48.66mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌,依次加入 H-Glu-OtBu(10.88g, 53.53mmol),三乙胺(12.49mL),水,将其加热得到澄清溶液,将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL),分液,下层有机相加入饱和盐水洗,分液后下层有机相用无水硫酸钠干燥,过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥,真空干燥过夜。得到 27.27g(收率 96%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=584.44(M+1)^+$

2.3 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

氮气保护条件下,将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-OtBu(27.27g, 46.71mmol)溶于二氯甲烷(300mL),加入三乙胺(11.99mL)搅拌 10min,再加入 NHS(5.38g, 50.17mmol),接着加入 DCC(10.60g, 51.38mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤,将得到的滤液浓缩至几乎干燥,将残

余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，加入甲基叔丁基醚，搅拌 30min，抽滤，滤饼真空干燥过夜，得到 25.76g(收率 81%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=681.46(M+1)^+$

2.4 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu

将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(OSu)-OtBu (25.76g, 37.83mmol)溶于二氯甲烷(250mL)搅拌，依次加入 2xAEEA (11.66g, 37.83mmol)，三乙胺 (9.71mL)，水 (25mL)，将其加热得到澄清溶液，将该溶液在室温下搅拌 4 小时。然后加入 10%柠檬酸水溶液(200mL),分液，下层有机相加入饱和盐水洗，分液后下层层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜。得到 30.75g(收率 93%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=874.59(M+1)^+$

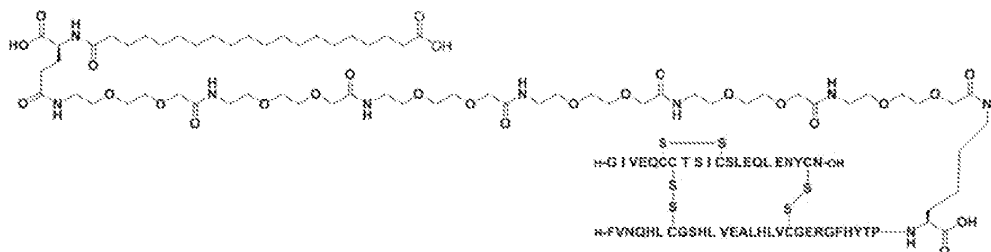
2.5 叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

氮气保护条件下，将叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30.75g, 35.18mmol)溶于二氯甲烷(300mL)，加入三乙胺(9.03mL)搅拌 10 分钟，再加入 NHS(4.05g, 35.18mmol)，接着加入 DCC(7.98g, 38.70mmol)。在室温下搅拌混合物过夜。过滤，将得到的滤液浓缩至几乎干燥，将残余物与冷的水和乙酸乙酯混合，搅拌 20 分钟，分液，上层有机相加入饱和食盐水洗，分液后上层有机相用无水硫酸钠干燥，过滤后将滤液减压浓缩至几乎干燥，真空干燥过夜，得到 31.09g(收率 91%)的叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=971.61(M+1)^+$

实施例 21

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十烷二酰基- γ Glu-6xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 11)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素

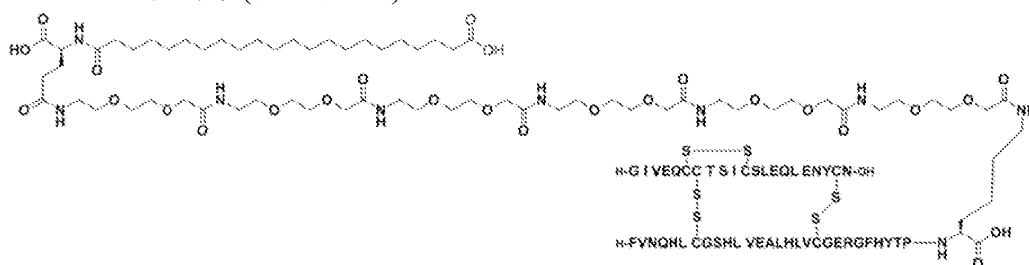
LC-MS(电喷雾): $m/z=1160.3997[M+6H]^{6+}$

中间体叔丁基二十烷二酰-γGlu-(6xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=1551.90(M+1)^+$

实施例 22

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 12)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-6xOEG), desB30 人胰岛素

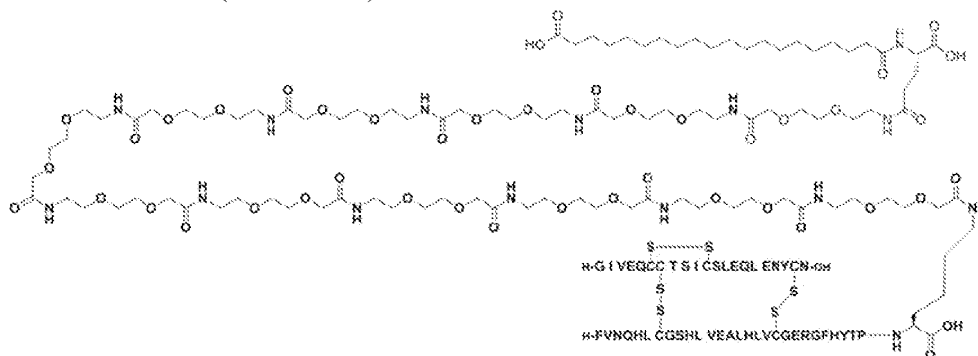
LC-MS(电喷雾): $m/z=1165.0674[M+6H]^{6+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰-γGlu-(6xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie×100API): $m/z=1579.94(M+1)^+$

实施例 23

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-12xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 13)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十烷二酰基-γGlu-12xOEG), desB30 人胰岛素

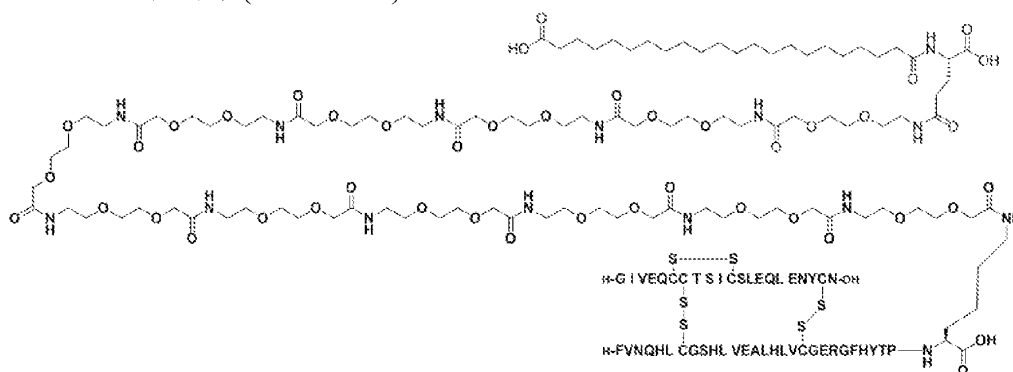
LC-MS(电喷雾): $m/z=1305.4716[M+6H]^{6+}$

中间体叔丁基二十烷二酰- γ Glu-(12xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=2423.35(M+1)^+$

实施例 24

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素(化合物 14)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-12xOEG), desB30 人胰岛素

LC-MS(电喷雾): $m/z=1310.1425[M+6H]^{6+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(12xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie $\times$ 100API): $m/z=2451.38(M+1)^+$

实施例 25 GLP-1 受体结合

本实施例的目的是测试本发明的 GLP-1 衍生物的体外受体结合亲和力, 以及白蛋白的存在如何潜在地影响结合。受体结合是 GLP-1 衍生物对人 GLP-1 受体的亲和力的量度。

本发明的 GLP-1 衍生物及对照化合物与人 GLP-1 受体的结合亲和力测定如下: 即通过测定它们从受体中取代 ^{125} I-GLP-1 的能力。为了测定 GLP-1 衍生物与白蛋白(HSA)的结合, 用低浓度白蛋白(0.005%(w/v))、以及用高浓度白蛋白(2%(w/v))进行测定。结合亲和力 IC_{50} 的变化表明 GLP-1 衍生物与白蛋白结合, 由此在动物模型中预测 GLP-1 衍生物的潜在延长的药物动力学特征。

对于存在低 HSA(0.005%(w/v))的受体结合试验, 向测定板的每个孔中添加 50 μ l 的测定缓冲液。对于存在高 HSA(2%(w/v))的受体结合试验,

向测定板的每个孔中添加 50 μ l 的 8%(w/v)白蛋白储备液。用 pH7.3 的 10 mM Na₂HPO₄ 配制测试化合物，参考对照品 GLP-1 (7-37)，用超纯水配制成 1mM 储备液。0.005%HSA 条件下，将所有测试化合物和参考对照品用测定缓冲液稀释至 2 μ M，然后进行 4 倍连续梯度稀释，共 10 个浓度梯度。2%HSA 条件下，将参考对照品 GLP-1 (7-37) 稀释至 2 μ M，利拉鲁肽稀释至 20 μ M，化合物 10 和索玛鲁肽稀释至 800 μ M，然后所有样品进行 4 倍连续梯度稀释，共 10 个浓度梯度。将 25 μ l 不同浓度测试化合物或参考对照品分别添加至测定板的适当孔中。将细胞膜蛋白等份解冻并稀释至其工作浓度 (40 μ g/mL)，向测定板的每个孔中添加 50 μ l 含细胞膜的溶液。通过向测定板的每个孔中添加 25 μ l 的 [¹²⁵I]-GLP-1 的 600 pM 溶液来开始孵育。将测定板在室温下孵育 1h。孵育完毕后，用细胞收集器将反应液收集到 GF/C 过滤板上，用洗板缓冲液洗 6 次，50℃ 干燥箱干燥 1h。加入 50 μ l 闪烁液，并封闭，使用 Microbeta2 读数。利用 GraphPad Prism 中的非线性回归分析，用该软件计算 IC₅₀ 值并以 nM 为单位报告。对每个测试化合物最少重复三次。所报告的值每种测试化合物的所有测量值的平均值。

表 8： GLP-1 受体结合亲和力

实验对象	0.005% HSA IC ₅₀ (nM)(SD)	2% HSA IC ₅₀ (nM)(SD)	比率
化合物 10	3.67 (1.95)	5552.33 (378.83)	1513
利拉鲁肽	0.52 (0.34)	29.44 (13.01)	57
索马鲁肽	0.75 (0.29)	609.57 (51.33)	813
GLP-1(7-37)	2.82 (1.07)	1.50 (0.24)	0.53

“比率”是指[(IC₅₀/nM)高 HSA]/ [(IC₅₀/nM)低 HSA]

通常，在低白蛋白浓度时与 GLP-1 受体的结合应当尽可能好，这对应于低 IC₅₀ 值。在高白蛋白浓度时 IC₅₀ 值是白蛋白对 GLP-1 衍生物与 GLP-1 受体结合的影响的度量。正如所知，GLP-1 衍生物也与白蛋白结合，这通常是所需的效应，这种效应将延长它们的血浆寿命。因此，在高白蛋白时 IC₅₀ 值通常高于在低白蛋白时的 IC₅₀ 值，对应于与 GLP-1 受体的结合降低，这是由与 GLP-1 受体结合竞争的白蛋白结合所致。因此，可采用高比率(IC₅₀ 值(高白蛋白)/IC₅₀ 值(低白蛋白))，作为目标衍生物与白蛋白结合良好(由此可确定具有长的半衰期)、并且自身与 GLP-1 受体也结合良好(IC₅₀ 值(高白蛋白)高，IC₅₀ 值(低白蛋白)低)的指

示。

由上表可以看出本发明的 GLP-1 衍生物的比率高于对照化合物索玛鲁肽、利拉鲁肽及 GLP-1(7-37)，预示着本发明的化合物具有更长的半衰期、并且自身与 GLP-1 受体也结合良好。

实施例 26 在 II 型糖尿病 db/db 小鼠中的长期药效学研究

参照实施例 16 的类似的实验步骤，在 II 型糖尿病 db/db 小鼠中进行长期药效学研究，不同之处在于所用的对照化合物为度拉糖肽，度拉糖肽的给药剂量为 300 μ g/kg。采用皮下给药方式（50 μ l/10g 体重），颈背部皮下注射给药，在大约上午 10:00（时间 0）给予 GLP-1 衍生物，分别于第 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 天给药。在首次给药后 3、6、9、12、24、48 和 72 小时评估小鼠血糖，并计算血糖-时间曲线下面积的变化（ Δ AUC）。给药前、第 3、5、11 次给药后 48h 禁食 6h 监测空腹血糖。首次给药后 48h 进行腹腔糖耐量试验（ipGTT）实验，步骤如下：于指定时间点尾尖采血测定空腹血糖（0min），之后腹腔给予葡萄糖溶液（200mg/ml，10ml/kg），然后于糖负荷后 30min、60min 和 120min 测定血糖。用酒精棉球清洁鼠尾部，使用一次性采血针从尾巴采集血滴，用血糖仪（罗氏）及配套试纸进行测定，绘制时间血糖曲线，并计算时间-血糖曲线下面积（AUC）。

图 10a-10e 显示了本发明的 GLP-1 衍生物在长期给药后仍具有预料不到的增加的降糖药效。如图 10a 和 10b 显示，相比于度拉糖肽，实施例 11 的化合物 10 在给药后对 db/db 小鼠具有更优的降糖效果。如图 10c 显示，相比于度拉糖肽，化合物 10 在长期给药后对 db/db 小鼠具有更优的降糖效果。如图 10d-10e 显示，相比于度拉糖肽，本发明的 GLP-1 衍生物对血糖具有更明显的抑制作用，优于度拉糖肽的降糖效果。

实施例 27 在高脂饮食诱导肥胖 C57BL 小鼠中的药效学实验

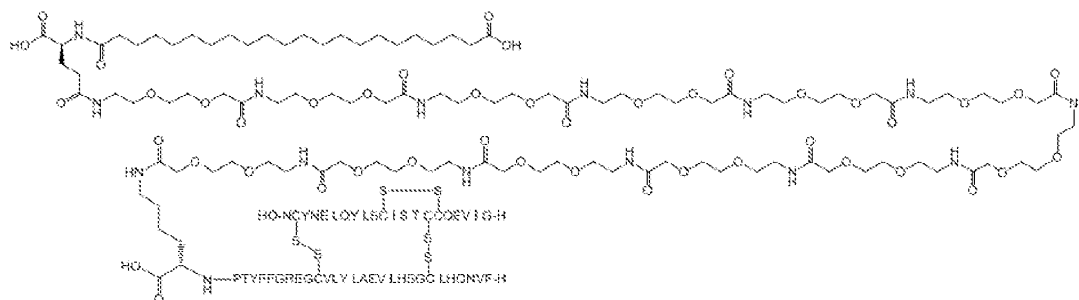
参照实施例 13 的类似的实验步骤，在高脂饮食诱导肥胖 C57BL 小鼠中进行药效学实验，不同之处在于所用的对照化合物为度拉糖肽，度拉糖肽的给药剂量为 300 μ g/kg。

采用皮下给药方式，颈背部皮下给药一次（5 μ l/g 体重），每 3 天给药一次，共 11 次。在大约上午 10:30（时间 0）给予 GLP-1 衍生物，在给药后 3、6、9、12、24、48 和 72 小时评估小鼠血糖。同时，每 3 天监测小鼠体重与摄食量。试验结束时称量皮下脂肪、肾周脂肪、生殖器周围脂肪。

图 11a-11d 显示了本发明的 GLP-1 衍生物具有预料不到的提高的体重减轻效果、控制饮食效果、及降脂效果。

实施例 28

B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 15)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xOEG), desB30 人胰岛素。

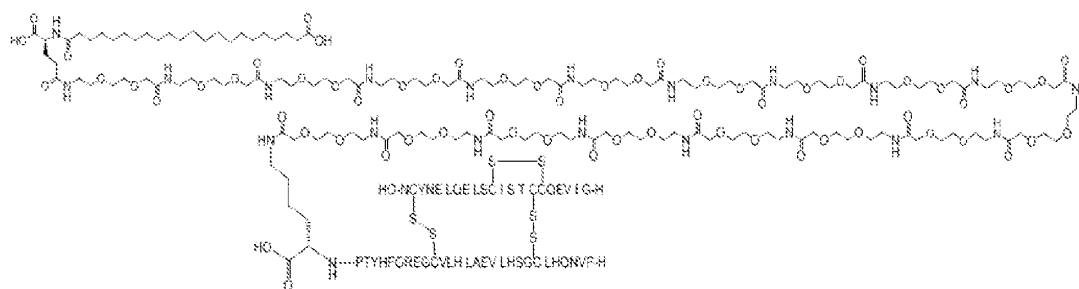
LC-MS(电喷雾): $m/z = 1585.98[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰-γGlu-(12xOEG-OSu)-OtBu 以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 2451.38(M+1)^+$

实施例 29

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-18xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 16)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-18xOEG), desB30 人胰岛素

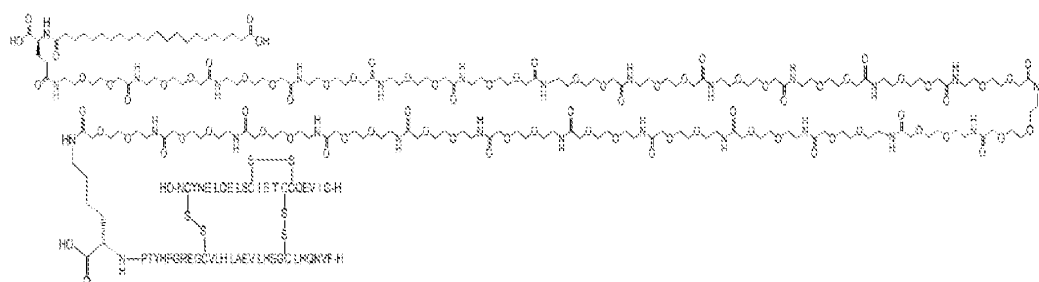
LC-MS(电喷雾): $m/z = 1247.47[M+7H]^{7+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(18xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=3320.83(M+1)^+$

实施例 30

A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-24xOEG), desB30 人胰岛素 (化合物 17)



与对照例 5 第 1 部分类似的步骤制备化合物 A14E, B16H, B25H, B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-24xOEG), desB30 人胰岛素

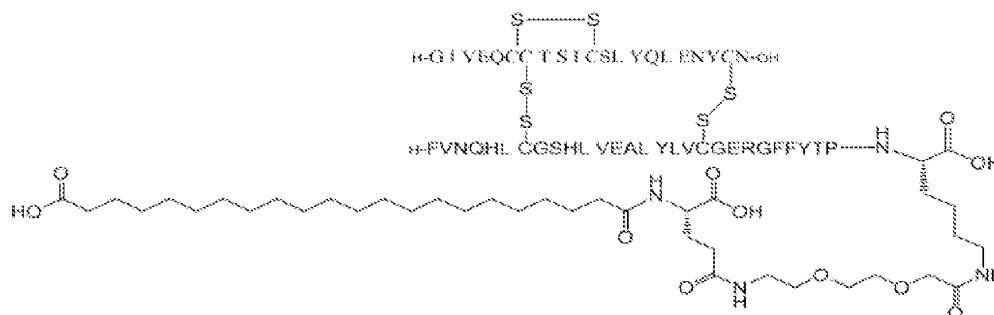
LC-MS(电喷雾): $m/z=873.35[M+11H]^{11+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(24xOEG-OSu)-OtBu 的制备以与对照例 5 第 2 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Sciex100API): $m/z=4192.27(M+1)^+$

实施例 31

B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-OEG), desB30 人胰岛素 (化合物 18)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 B29K(N(ϵ)-二十二烷二酰基- γ Glu-OEG), desB30 人胰岛素。

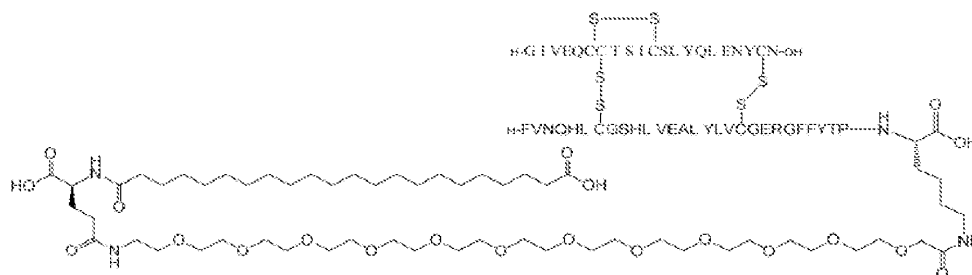
LC-MS(电喷雾): $m/z=1266.8122[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰- γ Glu-(OEG-OSu)-OtBu 以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie×100API): $m/z = 854.57(M+1)^+$

实施例 32

B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素 (化合物 19)



以与实施例 6 第 2 部分类似的步骤制备化合物 B29K(N(ε)-二十二烷二酰基-γGlu-12xPEG), desB30 人胰岛素。

LC-MS(电喷雾): $m/z = 1354.8667[M+5H]^{5+}$

中间体叔丁基二十二烷二酰-γGlu-(12xPEG-OSu)-OtBu 以与实施例 6 第 3 部分类似的步骤进行。

LC-MS(Scie×100API): $m/z = 1294.83 (M+1)^+$

本发明已经通过上述实施例进行了说明, 但应当理解的是, 上述实施例只是用于举例和说明的目的, 而非意在将本发明限制于所描述的实施例范围内。此外本领域技术人员可以理解的是, 本发明并不局限于上述实施例, 根据本发明的教导还可以做出更多种的变型和修改, 这些变型和修改均落在本发明所要求保护的范围内。本发明的保护范围由附属的权利要求书及其等效范围所界定。