



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109306015 B

(45) 授权公告日 2022.04.26

(21) 申请号 201810801214.7
 (22) 申请日 2012.06.15
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109306015 A
 (43) 申请公布日 2019.02.05
 (30) 优先权数据
 10-2011-0058852 2011.06.17 KR
 (62) 分案原申请数据
 201280039781.4 2012.06.15
 (73) 专利权人 韩美科学株式会社
 地址 韩国京畿道
 (72) 发明人 郑圣烨 金大振 朴晟喜 禹铃银
 崔仁荣 权世昌
 (74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
 代理人 王永伟 颜芳

(51) Int.Cl.
 C07K 19/00 (2006.01)
 A61K 38/26 (2006.01)
 A61K 47/60 (2017.01)
 A61K 47/68 (2017.01)
 A61P 3/04 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2010190701 A1, 2010.07.29
 US 2006269553 A1, 2006.11.30
 US 2004115165 A1, 2004.06.17
 Jonathan W Day等. A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity. 《nature chemical biology》. 2009, 第5卷 (第10期),
 审查员 夏颖

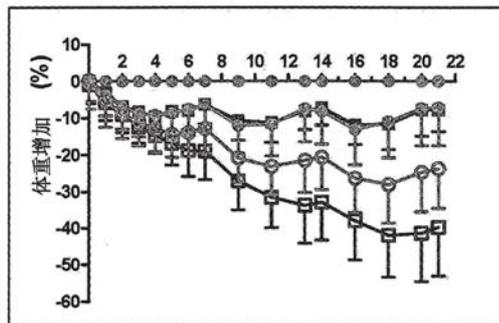
权利要求书2页 说明书24页
 序列表19页 附图33页

(54) 发明名称

包括泌酸调节肽和免疫球蛋白片段的结合物以及其应用

(57) 摘要

本发明涉及包括泌酸调节肽、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物的结合物,其中结合物通过非肽基聚合物共价连接泌酸调节肽与免疫球蛋白Fc区而获得,和用于预防或治疗肥胖的包括该结合物的药物组合物。本发明的包括泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc的结合物减少食物摄入,抑制胃排空和促进脂解作用而没有副作用,与天然泌酸调节肽不同,并且与天然泌酸调节肽相比还显示优异的受体活化作用和长期可持续性。因此,它可广泛用于肥胖的治疗,具有安全性和有效性。



● 载体
 ■ 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物23结合物 (0.03mg/kg)
 □ 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物23结合物 (0.06mg/kg)
 ○ 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物24结合物 (0.03mg/kg)
 ⊖ 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物24结合物 (0.06mg/kg)

1. 包括泌酸调节肽衍生物、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物的结合物,其中所述结合物通过非肽基聚合物共价连接所述泌酸调节肽衍生物与免疫球蛋白Fc区而获得,

其中所述泌酸调节肽衍生物选自SEQ ID NO.32、33和34的肽,

其中所述非肽基聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、聚乙烯醚、聚乳酸、聚乳酸-乙醇酸、脂质聚合物和其组合。

2. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述泌酸调节肽衍生物能活化GLP-1受体和胰高血糖素受体。

3. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述结合物具有抗肥胖作用。

4. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述泌酸调节肽衍生物的氨基酸序列的位置16和20的氨基酸对形成环。

5. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述非肽基聚合物是聚乙二醇。

6. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区和泌酸调节肽的氨基和巯基分别连接在所述非肽基聚合物的两端。

7. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述非肽基聚合物在两端具有能结合所述免疫球蛋白Fc区和所述泌酸调节肽衍生物的反应基团。

8. 根据权利要求7所述的结合物,其中所述反应基团选自醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基团和琥珀酰亚胺衍生物。

9. 根据权利要求7所述的结合物,其中在两端的所述反应基团彼此相同或不同。

10. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是非糖基化的Fc区。

11. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区选自CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域;CH1结构域和CH2结构域;CH1结构域和CH3结构域;CH2结构域和CH3结构域;一种或多种结构域和免疫球蛋白铰链区或部分铰链区的组合;以及重链恒定区和轻链恒定区的每个结构域的二聚体。

12. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是这样的衍生物,其中能形成二硫键的区域被删除,某些氨基酸残基在天然Fc形式的N-末端被除去,甲硫氨酸残基被添加到天然Fc形式的N-末端,互补-结合位点被删除,或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性位点被删除。

13. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是衍生自选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的免疫球蛋白的Fc区。

14. 根据权利要求13所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是IgG4 Fc区。

15. 根据权利要求1所述的结合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是人IgG4衍生的非糖基化的Fc区。

16. 用于肥胖预防或治疗的药物组合物,包括结合物,

所述结合物包括泌酸调节肽衍生物、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物,其中所述结合物通过非肽基聚合物共价连接所述泌酸调节肽衍生物与免疫球蛋白Fc区而获得,

其中所述泌酸调节肽衍生物选自SEQ ID NO.32、33和34的肽,

其中所述非肽基聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、聚乙烯醚、聚乳酸、聚乳酸-乙醇酸、脂质聚合物和其组合。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,进一步包括药学上可接受的载体。

18. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述组合物单独或与显示肥胖预防或治疗效果的其它药物制剂组合施用。

19. 根据权利要求18所述的药物组合物,其中所述药物制剂选自GLP-1受体激动剂、瘦蛋白受体激动剂、DPP-IV抑制剂、Y5受体拮抗剂、黑素-集中激素受体拮抗剂、Y2/3受体激动剂、MC3/4受体激动剂、胃/胰脂肪酶抑制剂、5HT_{2c}激动剂、 β 3A受体激动剂、糊精受体激动剂、生长素释放肽拮抗剂和生长素释放肽受体拮抗剂。

20. 权利要求1所述的结合物或权利要求17至19中任一项所述的组合物在制备用于肥胖预防或治疗的药物中的应用。

包括泌酸调节肽和免疫球蛋白片段的结合物以及其应用

[0001] 本申请是分案申请,原申请的申请日为2012年6月15日,中国申请号为201280039781.4,国际申请号为PCT/KR2012/004722,发明名称为“包括泌酸调节肽和免疫球蛋白片段的结合物以及其应用”。

技术领域

[0002] 本发明涉及包括泌酸调节肽和免疫球蛋白片段的结合物以及其应用。更具体地,本发明涉及包括泌酸调节肽、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物的结合物,其中结合物可通过非肽基聚合物共价连接泌酸调节肽与免疫球蛋白Fc区而获得,和用于预防或治疗肥胖的包括该结合物的药物组合物。

背景技术

[0003] 近来,经济的增长和生活方式的变化导致饮食习惯改变。当代人超重和肥胖率升高的主要原因是食用高卡路里食品如快餐食品和缺乏锻炼。世界卫生组织(WHO)估测,世界上10亿以上人超重,并且其中至少3亿是临床上的肥胖。具体地,在欧洲每年250,000人并且在世界上每年250万以上人因超重而死亡(世界卫生组织,Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health,2004)。

[0004] 超重和肥胖使血压和胆固醇水平升高,从而引起多种疾病如心血管疾病、糖尿病和关节炎发生或恶化,并且也是儿童或青少年以及成年人动脉硬化、高血压、高脂血或心血管疾病发病率升高的主要原因。

[0005] 肥胖是引起世界上多种疾病的严重病症。据认为其通过个人努力克服,并且还认为肥胖患者缺乏自制。但是,肥胖难以治疗,因为肥胖是涉及食欲调节和能量代谢的复杂病症。就肥胖治疗而言,应当结合肥胖患者的努力治疗与食欲调节和能量代谢有关的异常表现。已经做出多种尝试以开发能够治疗异常表现的药物。基于这些努力,药物如利莫那班(Rimonabant,Sanofi-Aventis)、西布曲明(Sibutramin,Abbott)、Contrave(Takeda)和奥利司他(Orlistat,Roche)已被开发,但其具有严重副作用或极微弱抗肥胖效果的缺陷。例如,据报告,利莫那班(Sanofi-Aventis)显示中枢神经病症的副作用,西布曲明(Abbott)和Contrave(Takeda)显示心血管副作用,和奥利司他(Roche)显示服用1年仅减重4kg。不幸地,没有可为肥胖患者安全配药的肥胖治疗剂。

[0006] 已进行多项研究以开发不具有常规抗肥胖药物问题的肥胖治疗剂。近来,胰高血糖素衍生物已经受到大量关注。当血液中的葡萄糖水平由于其他药物或疾病、激素或酶缺乏而下降时,胰腺产生胰高血糖素。胰高血糖素刺激糖原在肝脏中分解,并且促进葡萄糖释放,以使血糖水平升高至正常范围。除增加血糖水平的作用以外,胰高血糖素还抑制食欲和激活脂肪细胞的激素敏感性脂酶(HSL),以促进脂解,从而显示抗肥胖作用。胰高血糖素衍生物之一,类胰高血糖素肽-1(GLP-1),正被开发为糖尿病患者的高血糖治疗剂,并且其发挥作用以刺激胰岛素合成和分泌,抑制胰高血糖素分泌,减缓胃排空,增加葡萄糖利用率,和抑制食物摄入。艾塞那肽-4(Exendin-4)从蜥蜴的毒素中分离,其与GLP-1共有约50%的

氨基酸同源性,并且也被报告为激活GLP-1受体,从而缓解糖尿病患者的高血糖。但是,据报告包括GLP-1的抗肥胖药物显示副作用,如呕吐和恶心。

[0007] 因此,作为GLP-1的替代选择,大量关注已集中于泌酸调节肽——衍生自胰高血糖素前体即前胰高血糖素的肽,其与两种肽——GLP-1和胰高血糖素的受体——结合。泌酸调节肽是有效的抗肥胖治疗手段,因为其如同GLP-1抑制食物摄入,促进饱足感,并且如同胰高血糖素具有脂解活性。

[0008] 基于泌酸调节肽的双功能,其已被积极地研究作为治疗肥胖的药物。例如,韩国专利号925017公开了包括泌酸调节肽作为治疗超重人的活性成分的药物组合物,其通过口服、胃肠外、粘膜、直肠、皮下或经皮途径给予。但是,已经报告,包括泌酸调节肽的这种抗肥胖药物的体内半衰期短并且治疗效力微弱——即使以高剂量一日三次给予。因此,已经做出多种努力以通过对其修饰提高泌酸调节肽的体内半衰期或对肥胖的治疗作用。

[0009] 例如,双重激动剂泌酸调节肽 (Merck) 通过如下制备:用D-丝氨酸替代泌酸调节肽位置2的L-丝氨酸,以增加对二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 的耐受性;同时在C端连接胆固醇部分,以增加血液半衰期。ZP2929 (Zealand) 通过如下制备:用D-丝氨酸替代位置2的L-丝氨酸,以增强对DPP-IV的耐受性;用丙氨酸替代位置17的精氨酸,以增强对蛋白酶的耐受性;用赖氨酸替代位置27的蛋氨酸,以增强氧化稳定性;和用天冬氨酸和丙氨酸替代位置20和24的谷氨酰胺并且用丝氨酸替代位置28的天冬酰胺,以增强脱酰胺稳定性。但是,即使增加双重激动剂泌酸调节肽 (Merck) 的半衰期至显示半衰期比天然泌酸调节肽长8~12分钟,其仍具有很短的体内半衰期1.7hr,并且其给予剂量还高达若干mg/kg。不幸地,由于半衰期短和效力低,泌酸调节肽或其衍生物具有每日高剂量给予的缺陷。

发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 相应地,本发明人已进行了许多努力来发展增加泌酸调节肽的血液半衰期同时保持其体内活性的方法。因此,发明人发现通过利用非肽基聚合物连接载体与泌酸调节肽而制备的结合物显示提高的血液半衰期同时保持体内活性从而显示极好的抗肥胖作用,由此完成本发明。

[0012] 技术方案

[0013] 本发明的目的是提供包括泌酸调节肽、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物的结合物,其中结合物可通过非肽基聚合物共价连接泌酸调节肽与免疫球蛋白Fc区而获得。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于肥胖的预防或治疗的包括结合物的药物组合物。

[0015] 本发明的另一个目的是提供预防或治疗肥胖的方法,包括将结合物或组合物施用给对象的步骤。

[0016] 本发明的另一个目的是提供结合物或组合物在制备用于肥胖预防或治疗的药物中的应用。

[0017] 有益效果

[0018] 本发明的包括泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc的结合物减少食物摄入,抑制胃排空和促进脂解作用而没有副作用,与天然泌酸调节肽不同,并且与泌酸调节肽相比还显示极好的受体活化作用和长期可持续性。因此,它可广泛用于肥胖的治疗,具有安全性和有效性。

与天然泌酸调节肽不同,本发明的新的肽减少食物摄入,抑制胃排空和促进脂解作用而没有副作用,并且还显示极好的受体活化作用。因此,它可广泛用于肥胖的治疗,具有安全性和有效性。

附图说明

[0019] 图1是显示根据泌酸调节肽或泌酸调节肽衍生物的施用剂量的食物摄入变化的图。

[0020] 图2a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽的结果的图。

[0021] 图2b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽的肽作图结果的图。

[0022] 图2c是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0023] 图3a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.29) 的结果的图。

[0024] 图3b是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.29) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0025] 图4a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.30) 的结果的图。

[0026] 图4b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.30) 的肽作图结果的图。

[0027] 图4c是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.30) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0028] 图5a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.31) 的结果的图。

[0029] 图5b是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.31) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0030] 图6a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.2) 的结果的图。

[0031] 图6b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.2) 的肽作图结果的图。

[0032] 图6c是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.2) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0033] 图6d是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.2) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0034] 图7a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.3) 的结果的图。

[0035] 图7b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.3) 的肽作图结果的图。

[0036] 图7c是显示通过Butyl FF纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.3) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0037] 图7d是显示通过Source 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0038] 图8a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)的结果的图；

[0039] 图8b是显示通过Source 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0040] 图8c是显示通过SOURCE IS0纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0041] 图9a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)的结果的图；

[0042] 图9b是显示通过Source 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0043] 图9c是显示通过SOURCE IS0纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0044] 图10a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)的结果的图；

[0045] 图10b是显示通过Source 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0046] 图10c是显示通过SOURCE IS0纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0047] 图11a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.28)的结果的图；

[0048] 图11b是显示通过Source 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.28)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0049] 图11c是显示通过SOURCE IS0纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.28)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图；

[0050] 图12是显示根据泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的类型和施用剂量的小鼠体重变化的图。

[0051] 图13是显示根据泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的类型和施用剂量的小鼠体重变化的图。

具体实施方式

[0052] 一方面,为了达到以上目的,本发明提供包括泌酸调节肽、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物的结合物,其中结合物可通过非肽基聚合物共价连接泌酸调节肽与免疫球蛋白Fc区而获得。

[0053] 如本文所用,术语“结合物”指包括泌酸调节肽和其它因子的结合物。其它因子可以是可引起血液中增加的稳定性、推迟通过肾的排出或其它有用效果的任何物质。在本发明中,因子可以是免疫球蛋白Fc区。优选,结合物可由通过非肽基聚合物连接的泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc区组成。非肽基聚合物可通过共价键连接泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc区。

非肽基聚合物的两个末端可分别连接到免疫球蛋白Fc区的氨基或巯基和泌酸调节肽衍生物。

[0054] 本发明的结合物指与天然泌酸调节肽相比具有提高的体内效力持续时间,并且长效结合物可包括通过天然泌酸调节肽氨基酸序列的修饰、置换、添加或缺失而制备的泌酸调节肽、结合到可生物降解的聚合物如聚乙二醇(PEG)的泌酸调节肽、结合到长效蛋白如白蛋白或免疫球蛋白的泌酸调节肽、结合到具有结合身体中白蛋白能力的脂肪酸的泌酸调节肽、或包封在可生物降解的纳米颗粒中的泌酸调节肽,但是长效结合物的类型不限于此。

[0055] 如本文所用,术语“泌酸调节肽”指衍生自胰高血糖素前体、前胰高血糖素的肽,并包括天然泌酸调节肽、前体、衍生物、其片段和其变体。优选,它可具有SEQ ID NO.1的氨基酸序列(HSQGTFTSDYSKYLDLRRRAQDFVQWLMNTRNRNIA)。

[0056] 术语“泌酸调节肽变体”是具有一种或多种不同于天然泌酸调节肽序列的氨基酸序列的肽,和指保持活化GLP-1和胰高血糖素受体功能的肽,并且它可通过天然泌酸调节肽部分氨基酸序列中的置换、添加、缺失和修饰中任何一种或通过其组合而制备。

[0057] 术语“泌酸调节肽衍生物”包括肽、肽衍生物或肽模拟物,其通过泌酸调节肽氨基酸的添加、缺失或置换而制备,与天然泌酸调节肽相比,以高水平活化GLP-1受体和胰高血糖素受体。

[0058] 术语“泌酸调节肽片段”指在天然泌酸调节肽的N端或C端添加或缺失一个或多个氨基酸的片段,其中非天然存在的氨基酸(例如,D-型氨基酸)可被添加,并且具有活化GLP-1受体和胰高血糖素受体的功能。

[0059] 泌酸调节肽变体、衍生物和片段的制备方法中的每个可单独或组合使用。例如,本发明包括这样的肽,其具有与天然肽不同的一个或多个氨基酸和N-端氨基酸残基的脱氨基,并且具有活化GLP-1受体和胰高血糖素受体的功能。

[0060] 本文提到的氨基酸根据IUPAC-IUB的命名规则被如下缩写:

[0061]	丙氨酸	A	精氨酸	R
[0062]	天冬酰胺	N	天冬氨酸	D
[0063]	半胱氨酸	C	谷氨酸	E
[0064]	谷氨酰胺	Q	甘氨酸	G
[0065]	组氨酸	H	异亮氨酸	I
[0066]	亮氨酸	L	赖氨酸	K
[0067]	甲硫氨酸	M	苯丙氨酸	F
[0068]	脯氨酸	P	丝氨酸	S
[0069]	苏氨酸	T	色氨酸	W
[0070]	酪氨酸	Y	缬氨酸	V

[0071] 在本发明中,泌酸调节肽衍生物包括任何肽——其通过在泌酸调节肽氨基酸序列(HSQGTFTSDYSKYLDLRRRAQDFVQWLMNTRNRNIA,SEQ ID NO.1)中置换、添加、缺失或翻译后修饰(例如,甲基化、酰化、泛素化、分子内共价结合)而制备以同时活化胰高血糖素和GLP-1受体。氨基酸的置换或添加之后,可使用人类蛋白中通常发现的20种氨基酸中任何一种,以及非典型的或非天然存在的氨基酸。商业上可获得的非典型的氨基酸的来源包括Sigma-Aldrich、ChemPep Inc.和Genzyme Pharmaceuticals。包括这些氨基酸的肽和非典型的肽

序列可被合成和购自商业供应者,例如,American Peptide Company或Bachem(USA)或Anygen(韩国)。

[0072] 在一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是包括以下式1的氨基酸的新的肽。

[0073] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2(式1)

[0074] 其中R1是组氨酸、脱氨基-组氨酰、二甲基-组氨酰(N-二甲基-组氨酰)、 β -羟基咪唑丙酰基(hydroxyimidazopropionyl)、4-咪唑乙酰基、 β -羧基咪唑丙酰基或酪氨酸;

[0075] X1是Aib(氨基异丁酸)、d-丙氨酸、甘氨酸、Sar(N-甲基甘氨酸)、丝氨酸或d-丝氨酸;

[0076] X2是谷氨酸或谷氨酰胺;

[0077] X3是亮氨酸或酪氨酸;

[0078] X4是丝氨酸或丙氨酸;

[0079] X5是赖氨酸或精氨酸;

[0080] X6是谷氨酰胺或酪氨酸;

[0081] X7是亮氨酸或甲硫氨酸;

[0082] X8是天冬氨酸或谷氨酸;

[0083] X9是谷氨酸、丝氨酸、 α -甲基-谷氨酸或被删除;

[0084] X10是谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸或被删除;

[0085] X11是丙氨酸、精氨酸、缬氨酸或被删除;

[0086] X12是丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸或被删除;

[0087] X13是赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、 α -甲基-谷氨酸或被删除;

[0088] X14是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸或被删除;

[0089] X15是苯丙氨酸或被删除;

[0090] X16是异亮氨酸、缬氨酸或被删除;

[0091] X17是丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、 α -甲基-谷氨酸或被删除;

[0092] X18是色氨酸或被删除;

[0093] X19是丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丝氨酸、缬氨酸或被删除;

[0094] X20是丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、精氨酸或被删除;

[0095] X21是天冬酰胺或被删除;

[0096] X22是丙氨酸、甘氨酸、苏氨酸或被删除;

[0097] X23是半胱氨酸、赖氨酸或被删除;

[0098] X24是具有2至10个氨基酸——由丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的组合组成——的肽,或被删除;和

[0099] R2是KRNRNIA(SEQ ID NO.35)、GPSSGAPPPS(SEQ ID NO.36)、GPSSGAPPPSK(SEQ ID NO.37)、HSQGTFTSDYSKYLD(SEQ ID NO.38)、HSQGTFTSDYSRYLDK(SEQ ID NO.39)、HGEFTFTSDLSKQMEEEAVK(SEQ ID NO.40)或被删除(如果式1的氨基酸序列与SEQ ID NO.1相同就排除)。

[0100] 为了提高野生型泌酸调节肽对胰高血糖素受体和GLP-1受体的活性,本发明的肽

可用以下置换:4-咪唑乙酰基——其中在SEQ ID NO.1表示的氨基酸序列位置1的组氨酸的 α 碳被删除;脱氨基-组氨酰——其中N-端氨基被删除;二甲基-组氨酰(N-二甲基-组氨酰)——其中N-端氨基用两个甲基修饰; β -羟基咪唑丙酰基——其中N-端氨基用羟基置换;或 β -羧基咪唑丙酰基——其中N-端氨基用羧基置换。此外,GLP-1受体-结合区可用提高疏水和离子键或其组合的氨基酸置换。部分泌酸调节肽序列可用GLP-1或艾塞那肽-4的氨基酸序列置换以提高对GLP-1受体的活性。

[0101] 进一步,部分泌酸调节肽序列可用稳定 α 螺旋的序列置换。优选,在式1的氨基酸序列的位置10、14、16、20、24和28的氨基酸可用氨基酸或氨基酸衍生物——由已知稳定 α 螺旋的Tyr(4-Me)、Phe、Phe(4-Me)、Phe(4-Cl)、Phe(4-CN)、Phe(4-NO₂)、Phe(4-NH₂)、Phg、Pal、NaI、Ala(2-噻吩基)和Ala(苯并噻吩基)组成——置换,并且对将被插入的稳定 α 螺旋的氨基酸或氨基酸衍生物的类型和数目没有限制。优选,在位置10和14、12和16、16和20、20和24以及24和28的氨基酸可分别用谷氨酸或赖氨酸置换以形成环,并且对将被插入的数目没有限制。最优选,肽可以是具有选自以下式1至6的氨基酸序列的肽。

[0102] 在一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是包括以下式2的氨基酸序列的新的肽,其中泌酸调节肽的氨基酸序列用艾塞那肽或GLP-1的氨基酸序列置换。

[0103] R1-A-R3(式2)

[0104] 在另一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是包括以下式3的氨基酸序列的新的肽,其通过适当的氨基酸连接体连接泌酸调节肽的部分氨基酸序列和艾塞那肽或GLP-1的部分氨基酸序列而制备。

[0105] R1-B-C-R4(式3)

[0106] 仍在另一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是包括以下式4的氨基酸序列的新的肽,其中泌酸调节肽的部分氨基酸序列用能提高与GLP-1受体的结合亲和性的氨基酸置换,例如,在位置26的Leu——其通过疏水相互作用与GLP-1受体结合——用疏水残基,Ile或Val置换。

[0107] R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3(式4)

[0108] 仍在另一个具体实施方式中,本发明的泌酸调节肽衍生物是包括以下式5的新的肽,其中部分氨基酸序列被删除、添加或用其它氨基酸置换以提高天然泌酸调节肽对GLP-1受体和胰高血糖素受体的活性。

[0109] R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5(式5)

[0110] 在式2至5中,R1与式1的描述中相同;

[0111] A选自SQGTFTSDYSKYLD-SRRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO.41)、SQGTFTSDYSKYLD-EEAVRLFIEWLMNT(SEQ ID NO.42)、SQGTFTSDYSKYLD-ERRAQDFVAWLKNT(SEQ ID NO.43)、GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO.44)、GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO.45)、GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(SEQ ID NO.46)和SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG(SEQ ID NO.47);

[0112] B选自SQGTFTSDYSKYLD-SRRAQDFVQWLMNT(SEQ ID NO.41)、SQGTFTSDYSKYLD-EEAVRLFIEWLMNT(SEQ ID NO.42)、SQGTFTSDYSKYLD-ERRAQDFVAWLKNT(SEQ ID NO.43)、GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO.44)、GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG(SEQ ID NO.45)、GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA(SEQ ID

NO.46)、SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO.47)、GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO.48) 和 SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO.49) ;

[0113] C是具有2至10个氨基酸——由丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸的组合组成——的肽;

[0114] D1是丝氨酸、谷氨酸或精氨酸;

[0115] D2是精氨酸、谷氨酸或丝氨酸;

[0116] D3是精氨酸、丙氨酸或缬氨酸;

[0117] D4是精氨酸、缬氨酸或丝氨酸;

[0118] D5是谷氨酰胺、精氨酸或赖氨酸;

[0119] D6是异亮氨酸、缬氨酸或丝氨酸;

[0120] D7是甲硫氨酸、精氨酸或谷氨酰胺;

[0121] D8是苏氨酸、甘氨酸或丙氨酸;

[0122] E1是丝氨酸、Aib、Sar、d-丙氨酸或d-丝氨酸;

[0123] E2是丝氨酸或谷氨酸;

[0124] E3是精氨酸或赖氨酸;

[0125] E4是谷氨酰胺或赖氨酸;

[0126] E5是天冬氨酸或谷氨酸;

[0127] E6是谷氨酰胺、半胱氨酸或赖氨酸;

[0128] E7是半胱氨酸、赖氨酸或被删除;

[0129] R3是KRNRNNIA (SEQ ID NO.35)、GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.36) 或 GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.37) ;

[0130] R4是HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.38)、HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.39) 或 HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO.40) ;和,

[0131] R5是KRNRNNIA (SEQ ID NO.35)、GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.36)、GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.37) 或被删除 (如果式2至5的氨基酸序列与SEQ ID NO.1的氨基酸序列相同则排除)。

[0132] 优选,本发明的泌酸调节肽衍生物可以是以下式6的新的肽。

[0133] R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (式6)

[0134] 其中R1是组氨酸、脱氨基-组氨酰、4-咪唑乙酰基或酪氨酸;

[0135] X1是Aib (氨基异丁酸)、甘氨酸或丝氨酸;

[0136] X2是谷氨酸或谷氨酰胺;

[0137] X3是亮氨酸或酪氨酸;

[0138] X4是丝氨酸或丙氨酸;

[0139] X5是赖氨酸或精氨酸;

[0140] X6是谷氨酰胺或酪氨酸;

[0141] X7是亮氨酸或甲硫氨酸;

[0142] X8是天冬氨酸或谷氨酸;

[0143] X9是谷氨酸、 α -甲基-谷氨酸或被删除;

[0144] X10是谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸或被删除;

[0145] X11是丙氨酸、精氨酸或被删除;

- [0146] X12是丙氨酸、缬氨酸或被删除；
- [0147] X13是赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、 α -甲基-谷氨酸或被删除；
- [0148] X14是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸或被删除；
- [0149] X15是苯丙氨酸或被删除；
- [0150] X16是异亮氨酸、缬氨酸或被删除；
- [0151] X17是丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、 α -甲基-谷氨酸或被删除；
- [0152] X18是色氨酸或被删除；
- [0153] X19是丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸或被删除；
- [0154] X20是丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、精氨酸或被删除；
- [0155] X21是天冬酰胺或被删除；
- [0156] X22是苏氨酸或被删除；
- [0157] X23是半胱氨酸、赖氨酸或被删除；
- [0158] X24是具有2至10个氨基酸——由甘氨酸组成——的肽，或被删除；和
- [0159] R2是KRNRNNIA (SEQ ID NO.35)、GPSSGAPPPS (SEQ ID NO.36)、GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO.37)、HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO.38)、HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO.39)、HGEFTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO.40) 或被删除 (如果式6的氨基酸序列与SEQ ID NO.1的氨基酸序列相同就排除)。

[0160] 更优选，本发明的泌酸调节肽衍生物可以选自SEQ ID NOs.2至34的肽。更优选，本发明的泌酸调节肽衍生物可以是实施例2-1的表1中描述的泌酸调节肽衍生物。

[0161] 泌酸调节肽具有两种肽——GLP-1和胰高血糖素——的活性。GLP-1降低血糖，减少食物摄入和抑制胃排空，胰高血糖素增加血糖，促进脂解作用和通过增加能量代谢而降低体重。两种肽的不同生物学效应可引起不希望有的效应，例如，在胰高血糖素显示较GLP-1更占优势的效应的情况下，增加血糖，或者在GLP-1显示较胰高血糖素更占优势的效应的情况下，引起恶心和呕吐。例如，下面的实施例10中产生的结合物较实施例12中产生的结合物对GLP-1受体显示更大的亲和性，但是前者的效力较后者低，如实施例18中体内试验中所显示的。这可能由于与实施例12中胰高血糖素受体有关的结合物的增加的效力，尽管其低的效力与GLP-1受体有关。因此，本发明的泌酸调节肽衍生物和它们的结合物不限于显示活性无条件增加的那些衍生物。例如，氨基酸可在泌酸调节肽的位置1和11被修饰，已知其抑制胰高血糖素的活性，以控制胰高血糖素和GLP-1之间的活性比。

[0162] 本发明的结合物可引起血液中增加的稳定性，推迟通过肾的排出，并通过共价键连接载体与泌酸调节肽或形成微球而改变对受体的亲和性。可形成含有泌酸调节肽的结合物的载体可选自白蛋白、转铁蛋白、抗体、抗体片段、弹性蛋白、肝素、多糖如壳多糖、纤连蛋白和最有利地免疫球蛋白Fc区，当结合泌酸调节肽时，所有这些可增加结合物的血液半衰期。

[0163] 术语“免疫球蛋白Fc区”如本文所用，指含有免疫球蛋白的重链恒定区2 (CH2) 和重链恒定区3 (CH3) 的蛋白，排除免疫球蛋白的重链和轻链可变区、重链恒定区1 (CH1) 和轻链恒定区1 (CL1)。它可进一步包括在重链恒定区的铰链区。并且，本发明的免疫球蛋白Fc区可含有部分或全部Fc区——包括重链恒定区1 (CH1) 和/或轻链恒定区1 (CL1)，除重链和轻链可变区外，只要它具有与天然蛋白基本相似或比天然蛋白更好的生理功能。并且，免疫球蛋

白Fc区可以是在CH2和/或CH3氨基酸序列的相对长的部分具有缺失的片段。即,本发明的免疫球蛋白Fc区可包括1) CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域;2) CH1结构域和CH2结构域;3) CH1结构域和CH3结构域;4) CH2结构域和CH3结构域;5) 一个或多个结构域和免疫球蛋白铰链区(或部分铰链区)的组合;和6) 重链恒定区与轻链恒定区中的每个结构域的二聚体。

[0164] 本发明的免疫球蛋白Fc区包括天然氨基酸序列和其序列衍生物(突变体)。氨基酸序列衍生物是由于一个或多个氨基酸残基的缺失、插入、非保守的或保守的置换或其组合而不同于天然氨基酸序列的序列。例如,在IgG Fc中,已知在结合中重要的在位置214至238、297至299、318至322或327至331的氨基酸残基可用作合适的修饰靶标。

[0165] 并且,其它多种衍生物是可能的,包括一种衍生物,其中能形成二硫键的区域被缺失,或某些氨基酸残基在天然Fc形式的N-末端被除去或甲硫氨酸残基被添加到那里。进一步,为了去除效应子作用,缺失可发生在互补-结合位点,如C1q-结合位点和ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)位点。制备这样的免疫球蛋白Fc区的序列衍生物的技术在WO 97/34631和WO 96/32478中被公开。

[0166] 蛋白和肽中氨基酸交换——这通常不改变蛋白或肽的活性——在现有技术中已知(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最通常发生的交换是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu和Asp/Gly,以双方向进行。此外,Fc区,如果期望,可通过磷酸化、硫酸化、丙烯酰化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等而被修饰。

[0167] 前面提到的Fc衍生物是这样的衍生物,其具有与本发明的Fc区相同的生物学活性或提高的结构稳定性,例如,抵抗热、pH等。

[0168] 此外,这些Fc区可获自从人和其它动物包括母牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠分离的天然形式,或可以是其重组体或衍生物,获自转化的动物细胞或微生物。这里,它们可通过从人或动物机体分离所有的免疫球蛋白和用蛋白水解酶处理它们而从天然的免疫球蛋白获得。木瓜蛋白酶将天然的免疫球蛋白消化成Fab和Fc区,胃蛋白酶处理导致pF'c和F(ab)2片段的产生。可将这些片段进行,例如,尺寸排阻层析以分离Fc或pF'c。优选,人来源的Fc区是获自微生物的重组免疫球蛋白Fc区。

[0169] 此外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是具有天然糖链、与天然形式相比增加的糖链或与天然形式相比减少的糖链的形式,或可以是去糖基化形式。免疫球蛋白Fc糖链的增加、减少或去除可通过本领域通常的方法获得,如化学方法、酶法和利用微生物的基因工程方法。糖链从Fc区的去除导致对第一补体成分C1的C1q部分的结合亲和性急剧降低以及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或补体依赖性细胞毒性的降低或丧失,由此不引起体内不必要的免疫应答。从这一点上,去糖基化或无糖基化形式的免疫球蛋白Fc区作为药物载体可更适合本发明的目的。

[0170] 如本文所用,术语“去糖基化”指从Fc区酶促去除糖部分,术语“无糖基化”指Fc区通过原核生物,优选大肠杆菌(E.coli)以未糖基化的形式产生。

[0171] 同时,免疫球蛋白Fc区可源自人或其它动物——包括母牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠,优选源自人。

[0172] 此外,免疫球蛋白Fc区可以是衍生自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc区,或由其组合或其杂合物制成的Fc区。优选,它衍生自IgG或IgM,其在人血液中最丰富的蛋白之中,并且最优选衍生自IgG,已知其提高配体-结合蛋白的半衰期。

[0173] 另一方面,术语“组合”,如本文所用,指将编码相同起源的单链免疫球蛋白Fc区的多肽与不同起源的单链多肽连接以形成二聚体或多聚体。即,二聚体或多聚体可以从选自IgG Fc、IgAFc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc片段的两个或多个片段形成。

[0174] 术语“非肽基聚合物”指包括两个或多个重复单位的生物相容性聚合物,该重复单位通过除肽键外的任何共价键彼此连接。在本发明中,非肽基聚合物可以与非肽基连接体可互换地使用。

[0175] 用于本发明的非肽基聚合物可以选自可生物降解的聚合物、脂质聚合物、壳多糖、透明质酸和其组合,优选,可生物降解的聚合物可以是聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙烯多化元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯醚、聚乳酸(PLA)或聚乳酸乙醇酸(PLGA),更优选,是聚乙二醇(PEG)。此外,本领域已知的其衍生物和容易通过本领域已知的方法制备的衍生物可包括在本发明的范围内。

[0176] 用于通过常规的框内融合方法获得的融合蛋白的肽连接体具有这样的缺点:它容易在体内被蛋白水解酶切割,并因此不能如期望的获得通过载体增加活性药物血清半衰期的充分作用。然而,在本发明中,对蛋白水解酶具有抵抗的聚合物可用于保持与载体相似的肽的血清半衰期。因此,任何非肽基聚合物可以没有限制地使用,只要它是具有前面提到的功能的聚合物,即,对体内蛋白水解酶具有抵抗的聚合物。非肽基聚合物具有1至100kDa和优选1至20kDa的分子量。本发明的非肽基聚合物——与免疫球蛋白Fc区连接——可以是一种聚合物或不同类型聚合物的组合。

[0177] 用于本发明的非肽基聚合物具有能结合免疫球蛋白Fc区和蛋白质药物的反应基团。非肽基聚合物在两端都具有反应基团,其优选选自反应性醛、丙醛、丁醛、马来酰亚胺和琥珀酰亚胺衍生物。琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺丙酸盐、羟基琥珀酰亚胺、琥珀酰亚胺羧甲基或琥珀酰亚胺碳酸盐。特别地,当非肽基聚合物在其两端都具有反应性醛基时,它有效地在两端用最小非特异性反应连接生理学上有活性的多肽和免疫球蛋白。由通过醛键的还原烷基化产生的最终产物较通过酰胺键连接的产物稳定的多。醛反应基团选择性地低pH结合N端和在高pH,如pH 9.0结合赖氨酸残基以形成共价键。在非肽基聚合物两端的反应基团可以相同或不同。例如,非肽基聚合物可以在一端具有马来酰亚胺基团和在另外一端具有醛基、丙醛基或丁醛基。当在其两端都具有反应性羟基的聚乙二醇用作非肽基聚合物时,羟基可通过已知的化学反应被活化成多种反应基团,或具有商业上可获得的修饰的反应基团的聚乙二醇可被利用以制备本发明的长效结合物。

[0178] 本发明的结合物可以是这样的,其具有两个反应性端基的非肽基聚合物的两端分别与免疫球蛋白Fc区和泌酸调节肽衍生物的胺基或巯基连接。

[0179] 非肽基聚合物在两端具有反应基团,其优选选自反应性醛基、丙醛基、丁醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物。琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺丙酸盐、羟基琥珀酰亚胺、琥珀酰亚胺羧甲基或琥珀酰亚胺碳酸盐。

[0180] 非肽基聚合物的两个反应性端基可以彼此相同或不同。例如,非肽基聚合物可在一端具有马来酰亚胺基,在另外一端具有醛基、丙醛基或丁醛基。例如,当非肽基聚合物在一

个端基具有反应性醛基和在另一个端基具有马来酰亚胺基时,它有效地在两端以最小非特异性反应连接生理学上有活性的多肽和免疫球蛋白。根据本发明的实施例,结合物通过利用 PEG 通过共价键连接泌酸调节肽或其衍生物和免疫球蛋白 Fc 区而制备,PEG 是非肽基聚合物,包括单独的丙醛基或马来酰亚胺基和醛基。

[0181] 本发明的结合物与天然泌酸调节肽相比对 GLP-1 受体和胰高血糖素受体显示优异的活性,并且血液半衰期由于与 Fc 区连接而增加,从而长时期保持体内活性。

[0182] 仍在另一方面,本发明提供用于肥胖的预防或治疗的包括肽的药物组合物。

[0183] 如本文所用,术语“预防”指疾病出现被抑制或阻止的所有作用。在本发明中,“预防”指来自体重或体脂增加这样的因素的肥胖出现通过本发明的结合物的施用被抑制或阻止。

[0184] 如本文所用,术语“治疗”指疾病症状已被缓和、改善或减轻的所有作用。在本发明中,“治疗”指肥胖症状通过本发明的结合物的施用而被缓和、改善或减轻,导致体重或体脂的减少。

[0185] 如本文所用,术语“肥胖”意味着过量脂肪组织在身体中积累,并且身体质量指数(体重(kg)除以身高的平方(m))在 25 以上被认为是肥胖。肥胖通常由能量失衡引起——当饮食摄入量长期超过能量消耗量时。肥胖是影响全身的代谢疾病,并且增加糖尿病、高脂血、性功能障碍、关节炎和心血管疾病的风险,而且在一些情况下与癌症发生有关。

[0186] 本发明的结合物——其通过将泌酸调节肽或其衍生物与免疫球蛋白 Fc 区连接而制备——显示对胰高血糖素和 GLP-1 受体的优异的结合亲和性(表 3)和对体内蛋白水解酶的优异的抵抗从而展示了长期的体内活性,由此显示优异的抗肥胖作用如体重减少(图 12)。

[0187] 本发明的药物组合物可进一步包括药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。如本文所用,术语“药学上可接受的”意为组合物足以实现治疗作用,而无有害副作用,并且可容易根据以下确定:疾病类型、患者年龄,体重、健康状况、性别和药物敏感性、给予途径、给予模式、给予频率、治疗持续时间、与本发明组合物组合或同时服用的药物以及药物已知的其他因素。

[0188] 包括本发明的衍生物的药物组合物可进一步包括药学上可接受的载体。对于口服给予而言,载体可包括,但不限于、粘合剂、润滑剂、崩解剂、赋形剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂和调味剂。对于注射制剂而言,载体可包括缓冲剂、防腐剂、止痛剂、增溶剂、等渗剂和稳定剂。对于局部给予制剂而言,载体可包括基质、赋形剂、润滑剂和防腐剂。

[0189] 本发明的组合物可与上述药学上可接受的载体组合配制成多种剂型。例如,对于口服给予而言,药物组合物可被配制成片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮剂、糖浆或糯米纸囊剂。对于注射制剂而言,药物组合物可被配制在安瓿瓶中作为单剂型或被配制在多剂量容器中。药物组合物还可被配制成溶液、悬浮剂、片剂、丸剂、胶囊和长效制剂。

[0190] 另一方面,适于药物制剂的载体、赋形剂和稀释剂的实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶橡胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、甲基羟基苯甲酸酯、丙基羟基苯甲酸酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。此外,药物制剂可进一步包括填充剂、抗凝剂、润滑剂、湿润剂、调味剂和抗菌剂。

[0191] 进一步,本发明的药物组合物可以具有选自下列的任何制剂:片剂、丸剂、粉末、颗粒、胶囊、悬浮剂、内用液体(liquids for internal use)、乳剂、糖浆、无菌水溶液、非水性溶剂、冻干制剂和栓剂。

[0192] 进一步,组合物可被配制成适于患者身体的单剂型,并且优选被配制成根据制药领域的一般方法可用于肽药物的制剂,从而通过口服或胃肠外途径给予,如通过皮肤、静脉内、肌内、动脉内、髓内、髓内、心室内、肺部、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、结肠内、局部、舌下、阴道或直肠给予,但不限于此。

[0193] 组合物可通过与多种药学上可接受的载体如生理盐水或有机溶剂混合被应用。为增加稳定性或吸收性,可应用碳水化合物如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖、抗氧化剂如抗坏血酸或谷胱甘肽、螯合剂、低分子量蛋白质、或其他稳定剂。

[0194] 本发明药物组合物的给予剂量和频率由活性成分类型连同各种因素如所治疗疾病、给予途径、患者年龄、性别和体重以及疾病严重程度确定。

[0195] 根据分级治疗方案,有效总剂量的本发明组合物可被以单剂量给予至患者,或可被以多剂量长期给予。在本发明的药物组合物中,活性成分的含量可根据疾病严重程度而不同。优选地,本发明的肽的总日剂量可以为每1kg患者体重约0.0001 μ g至500mg。但是,除药物组合物的给予途径和治疗频率以外,肽的有效剂量还考虑多种因素而确定:包括患者年龄、体重、健康状况、性别、疾病严重程度、饮食和分泌速率。鉴于此,本领域技术人员可容易确定适于本发明药物组合物的具体应用的有效剂量。根据本发明的药物组合物不具体地限于该制剂和给予途径和模式,只要其显示本发明的作用。

[0196] 本发明的药物组合物显示优异的体内效力持续时间和滴度,从而显著减少其给予数量和频率。

[0197] 此外,药物组合物可被单独或与对肥胖显示预防或治疗作用的其他药物制剂组合或同时给予。对肥胖显示预防或治疗作用的药物制剂不被具体限制,并且可包括GLP-1受体激动剂、瘦蛋白受体激动剂、DPP-IV抑制剂、Y5受体拮抗剂、黑素集中激素(MCH)受体拮抗剂、Y2/3受体激动剂、MC3/4受体激动剂、胃/胰脂酶抑制剂、5HT_{2c}激动剂、B3A受体激动剂、支链淀粉受体激动剂、生长素释放肽拮抗剂和/或生长素释放肽受体拮抗剂。

[0198] 再一方面,本发明提供预防或治疗肥胖的方法,包括步骤:给予对象所述结合物或包括所述结合物的药物组合物。

[0199] 如本文所用,术语“施用”指通过某个合适的方法将预定量的物质引入患者。本发明的组合物可通过任何通常的途径施用,只要它能到达期望的组织,例如,但不限于,腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下、真皮内、经口、局部、鼻内、肺内或直肠内施用。然而,由于肽在口服给药之后被消化,用于口服给药的组合物的活性成份应被包被或配制,以抵抗在胃中分解。

[0200] 在本发明中,术语“对象”是疑患肥胖的对象,意为患有肥胖或有肥胖可能性的哺乳动物,包括人、鼠和家畜。但是,任何用本发明的肽或药物组合物治疗的对象被无限制地包括在内。包括本发明的肽的药物组合物被给予疑患肥胖的对象,从而有效地治疗对象。肥胖如上所述。

[0201] 本发明的治疗方法可包括步骤:以药学上有效的量给予包括所述肽的组合物。总日剂量应当通过医师做出的适当医学判断被确定,并且被给予一次或数次。在本发明的目

标方面,针对任何具体患者的具体治疗有效剂量水平可取决于医药领域公知的各种因素而不同,包括所要实现的响应种类和程度、具体组合物——根据是否有其他试剂与之一起被应用、患者年龄、体重、健康状况、性别和饮食、给予次数和途径、组合物的分泌速率、治疗时间段、与本发明的组合物组合或同时应用的其他药物等本领域公知的类似因素。

[0202] 再一方面,本发明提供所述结合物或包括所述结合物的药物组合物在制备用于预防或治疗肥胖的药物中的应用。

[0203] 发明实施方式

[0204] 在下文中,将参考下列实施例更详细地描述本发明。但是,这些实施例仅以示例为目的,本发明不意图被这些实施例限制。

[0205] 实施例1. 体外激活的细胞系的制备

[0206] 实施例1-1:对GLP-1显示cAMP响应的细胞系的制备

[0207] 利用相应于人GLP-1受体基因的cDNA (OriGene Technologies, Inc. USA) 的ORF (开放阅读框) 的区域作为模板,和下列包括各HindIII和EcoRI限制性位点的正向和反向引物,进行PCR,从而获得PCR产物。

[0208] 正向引物:5'-CCCGGCCCGCGGCCGCTATTTCGAAATAC-3' (SEQ ID NO.47)

[0209] 反向引物:5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3' (SEQ ID NO.48)

[0210] 将PCR产物克隆到已知的动物细胞表达载体x0GC/dhfr中,以制备重组载体x0GC/GLP1R。

[0211] 利用Lipofectamine (Invitrogen, USA),将在DMEM/F12 (10%FBS) 培养基中培养的CHO DG44细胞系用重组载体x0GC/GLP1R转染,并在包含1mg/mL G418和10nM氨甲蝶呤的选择培养基中培养。通过限制稀释技术从中选择单克隆细胞系,并且最终从中选择以浓度依赖性方式对GLP-1显示优异cAMP响应的细胞系。

[0212] 实施例1-2:对胰高血糖素显示cAMP响应的细胞系的制备

[0213] 利用相应于人胰高血糖素受体基因的cDNA (OriGene Technologies, Inc. USA) 的ORF的区域作为模板,和下列包括各EcoRI和XhoI限制性位点的正向和反向引物,进行PCR,从而获得PCR产物。

[0214] 正向引物:5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO.49)

[0215] 反向引物:5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (SEQ ID NO.50)

[0216] 将PCR产物克隆到已知的动物细胞表达载体x0GC/dhfr中,以制备重组载体x0GC/GCGR。

[0217] 利用Lipofectamine,将在DMEM/F12 (10%FBS) 培养基中培养的CHO DG44细胞系用重组载体x0GC/GCGR转染,并在包含1mg/mL G418和10nM氨甲蝶呤的选择培养基中培养。通过限制稀释技术从中选择单克隆细胞系,并且最终从中选择以浓度依赖性方式对胰高血糖素显示优异的cAMP响应的细胞系。

[0218] 实施例2. 泌酸调节肽衍生物的体外活性的测试

[0219] 实施例2-1:泌酸调节肽衍生物的合成

[0220] 为测量泌酸调节肽衍生物的体外活性,合成具有下列氨基酸序列的泌酸调节肽衍生物(表1)。

[0221] 表1

[0222] 泌酸调节肽和泌酸调节肽衍生物

SEQ ID NO.	氨基酸序列
SEQ ID NO.1	HSQGTFTSDYSKYLD SRRA QDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.2	CA-SQGTFTSDYSKYLD EAVRLFIE WLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.3	CA-SQGTFTSDYSKYLD ERRA QDFVAWLKNTGPSSGAPPPS
SEQ ID NO.4	CA-GQGTFTSDYSRYL EEEEAVRLFIE WLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO.5	CA-GQGTFTSDYSRQ MEEEEAVRLFIE WLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO.6	CA-GEGTFTSDLSRQ MEEEEAVRLFIE WAAHSQGTFTSDYSKYLD
SEQ ID NO.7	CA-SQGTFTSDYSRYL EAVRLFIE WLMNTK
SEQ ID NO.8	CA-SQGTFTSDLSRQ LEEEAVRLFIE WLMNK
SEQ ID NO.9	CA-GQGTFTSDYSRYL EAVXL FIEWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.10	CA-SQGTFTSDYSRQ MEEEEAVRLFIE WLMNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO.11	CA-GEGTFTSDLSRQ MEEEEAVRLFIE WAAHSQGTFTSDYSRYL DK
SEQ ID NO.12	CA-SQGTFTSDYSRYL DGGHGEGTFTSD LSKQ MEEEEAVK
SEQ ID NO.13	CA-SQGTFTSDYSRYL DXEAVXL FIEWLMNTK
SEQ ID NO.14	CA-GQGTFTSDYSRYL EAVXL FIXWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.15	CA-GQGTFTSDYSRYL EAVRLF IXWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.16	CA-SQGTFTSDLSRQ LEGGHSQGTFTSD LSRQ LEK
SEQ ID NO.17	CA-SQGTFTSDYSRYL EAVRLFIE WIRNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.18	CA-SQGTFTSDYSRYL EAVRLFIE WIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO.19	CA-SQGTFTSDYSRYL EAV <u>K</u> L FIE WIRNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.20	CA-SQGTFTSDYSRYL EAV <u>K</u> L FIE WIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO.21	CA-SQGTFTSDYSRQ LEEEAVRLFIE WVRNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.22	DA-SQGTFTSDYSKYL DEKRA <u>K</u> EFVQWLMNTK
SEQ ID NO.23	HAibQGTFTSDYSKYL DEKRA KEFVCWLMNT
SEQ ID NO.24	HAibQGTFTSDYSKYL DEKRA KEFVQWLMNTC
SEQ ID NO.25	HAibQGTFTSDYSKYL DEKRA <u>K</u> EFVQWLMNTC
SEQ ID NO.26	HAibQGTFTSDYS <u>K</u> YL DEKRA KEFVQWLMNTC
SEQ ID NO.27	HAibQGTFTSDYSKYL DEQA <u>A</u> <u>K</u> EFICWLMNT
SEQ ID NO.28	HAibQGTFTSDYSKYL DEKRA KEFVQWLMNT
SEQ ID NO.29	H(d)SQGTFTSDYSKYLD SRRA QDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.30	CA-SQGTFTSDYSKYLD SRRA QDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLD SRRA QDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO.32	CA-AibQGTFTSDYSKYL DEKRA KEFVQWLMNTC
SEQ ID NO.33	HAibQGTFTSDYAKYL DEKRA KEFVQWLMNTC

[0223] SEQ ID NO.34 YAibQGTFTSDYSKYL~~DEKRA~~KEFVQWLMNTC

[0225] 在表1中,粗体和下划线的氨基酸表示环形成,X表示的氨基酸意为非天然氨基酸, α -甲基-谷氨酸。此外,CA表示4-咪唑基乙酰基,和DA表示脱氨基-组氨酰基。

[0226] 实施例2-2:体泌酸调节肽衍生物的外活性测试

[0227] 为测量实施例2-1中合成的泌酸调节肽衍生物的抗肥胖效力,利用实施例1-1和1-2中制备的细胞系体外测量细胞活性。

[0228] 该细胞系是通过转染CHO(中国仓鼠卵巢)以分别表达人GLP-1受体基因和胰高血

糖素受体基因而制备的细胞系。因此,其适于测量GLP-1和胰高血糖素活性。因此,各泌酸调节肽衍生物的活性利用各转化细胞系测量。

[0229] 具体地,各细胞系一周传代培养两次或三次,并且以 1×10^5 的密度等分在96孔板的各孔中,然后培养24小时。

[0230] 将培养的细胞用KRB缓冲液洗涤,并悬浮在包含1mM IBMX的40ml KRB缓冲液中,在室温下留置5分钟。通过5倍连续稀释将泌酸调节肽 (SEQ ID NO.1) 和泌酸调节肽衍生物 (由SEQ ID NOs.2-6、8、10-13、17、18、23-25、27、28和32-34表示) 从1000nM稀释至0.02nM,并将其每种40mL加入细胞,在37°C下、CO₂培育箱中培养1小时。然后,添加20mL细胞裂解缓冲液以进行细胞裂解,并将细胞裂解物用于cAMP分析试剂盒 (Molecular Device, USA) 以测量cAMP浓度。由此计算EC₅₀值,并相互比较。EC₅₀值显示在下表2中。

[0231] 表2

[0232] 泌酸调节肽和泌酸调节肽衍生物之间的对GLP-1受体和胰高血糖素受体的体外活性的比较

SEQ ID NO.	EC ₅₀ (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
SEQ ID NO.1	50 - 210	10 - 43
SEQ ID NO.2	51.8	12.8
SEQ ID NO.3	>1,000	637.7
SEQ ID NO.4	5.5	>1,000
SEQ ID NO.5	5.9	>1,000
SEQ ID NO.6	500.1	>1,000
SEQ ID NO.8	419.6	>1,000
SEQ ID NO.10	>1,000	>1,000
SEQ ID NO.11	>1,000	>1,000
SEQ ID NO.12	>1,000	>1,000
SEQ ID NO.13	>1,000	>1,000
SEQ ID NO.17	97.9	>1,000
SEQ ID NO.18	96.3	>1,000
SEQ ID NO.23	2.46	5.8
SEQ ID NO.24	1.43	6.95
SEQ ID NO.25	1.9	1.3
SEQ ID NO.27	2.8-5.5	3.1-5.6
SEQ ID NO.28	3.1	0.3
SEQ ID NO.32	14.25	17.3
SEQ ID NO.33	2.20	80.2
SEQ ID NO.34	12.5	1.0

[0235] 如表2所示,与SEQ ID NO.1的天然泌酸调节肽相比,泌酸调节肽衍生物显示优异

的体外活性和对GLP-1受体和胰高血糖素受体不同的活性比。

[0236] 已知泌酸调节肽激活GLP-1受体和胰高血糖素受体以抑制食欲,促进脂解,和促进饱足感,从而显示抗肥胖作用。根据本发明的泌酸调节肽衍生物显示对GLP-1受体和胰高血糖素受体的体外活性均高于野生型泌酸调节肽,因此可用作肥胖治疗剂,并且效力高于已知泌酸调节肽。

[0237] 实施例3. 泌酸调节肽衍生物的体内活性测试

[0238] 为测量泌酸调节肽衍生物的体内治疗活性,考察通过给予泌酸调节肽衍生物的ob/ob小鼠食物摄入的变化——利用天然泌酸调节肽作为对照。

[0239] 具体地,肥胖型糖尿病ob/ob小鼠——常用于测试治疗剂对于肥胖和糖尿病的效力,被禁食16小时,并被给予1或10mg/kg泌酸调节肽或0.02、0.1、1或10mg/kg SEQ ID NO.2的泌酸调节肽衍生物。然后,观察食物摄入2小时(图1)。图1是显示根据泌酸调节肽或泌酸调节肽衍生物给予剂量的食物摄入变化的图。如图1所示,给予1mg/kg泌酸调节肽衍生物对食物摄入显示出比给予10mg/kg泌酸调节肽更优异的抑制作用。

[0240] 总之,本发明的泌酸调节肽衍生物具有远高于野生型泌酸调节肽的抗肥胖作用——即使以较低剂量被给予,这表明野生型泌酸调节肽显示较低抗肥胖作用并且应当被一日三次以高剂量给予的问题得到改善。

[0241] 实施例4:包括泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0242] 首先,为了用3.4K PropionALD(2) PEG(具有两个丙醛基团的PEG,NOF,日本)进行泌酸调节肽(SEQ ID NO.1)氨基酸序列位置30的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽和3.4K PropionALD(2) PEG以1:12的摩尔比、5mg/ml的蛋白浓度在4℃反应4.5小时。这时,反应在100mM硼酸钠缓冲剂(pH 9.0)和45%异丙醇的溶剂混合物中进行,并向其中加入20mM氰基硼氢钠(氰基硼氢化物(SCB,NaCNBH₃),NaCNBH₃)作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S(XK16,Amersham Biosciences)以纯化具有单聚乙二醇化赖氨酸的泌酸调节肽(柱:SOURCES(XK16,Amersham Biosciences),流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%222min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图2a)。图2a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽的结果的图。洗脱峰的单聚乙二醇化通过SDS-PAGE检测,赖氨酸选择性通过利用Asp-N蛋白酶的肽作图检测(图2b)。图2b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽的肽作图结果的图。

[0243] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc以1:10的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱以纯化包括泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc的结合物(柱:SOURCE 15Q(XK16,Amersham Biosciences),流速:2.0ml/min,梯度:A0→20%100min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图2c)。图2c是显示纯化包括泌酸调节肽和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0244] 实施例5:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.29)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0245] 首先,为了用3.4K PropionALD(2) PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.29)氨基酸序列位置30的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.29)和3.4K PropionALD(2) PEG以1:12的摩尔比、5mg/ml的蛋白浓度在4℃反应4.5小时。这时,反应在

100mM硼酸钠缓冲剂(pH 9.0)和45%异丙醇的溶剂混合物中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCES以纯化具有单聚乙二醇化赖氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S(XK16,Amersham Biosciences),流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%222min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl))(图3a)。图3a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.29)的结果的图。

[0246] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.29)和免疫球蛋白Fc以1:10的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.29)和免疫球蛋白Fc的结合物(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→20%100min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl))(图3b)。图3b是显示纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.29)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0247] 实施例6:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0248] 首先,为了用3.4K PropionALD(2) PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)氨基酸序列位置30的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.30)和3.4K PropionALD(2) PEG以1:15的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在4℃反应4.5小时。这时,反应在100mM HEPES缓冲剂(pH 7.5)和45%异丙醇的溶剂混合物中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCES纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化赖氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%222min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl))(图4a)。图4a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)的结果的图。洗脱峰的单聚乙二醇化通过SDS-PAGE检测,赖氨酸选择性通过利用Asp-N蛋白酶的肽作图检测(图4b)。图4b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)的肽作图结果的图。

[0249] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)和免疫球蛋白Fc以1:10的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)和免疫球蛋白Fc的结合物(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→20%100min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl))(图4c)。图4c是显示纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.30)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0250] 实施例7:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.31)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0251] 首先,为了用3.4K PropionALD(2) PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.31)氨基酸序列位置30的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.31)和3.4K PropionALD(2) PEG以1:15的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在4℃反应4.5小时。这时,反应在100mM HEPES缓冲剂(pH 7.5)和45%异丙醇的溶剂混合物中进行,并向其中加入20mM SCB

作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化赖氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%222min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图5a)。图5a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.31)的结果的图。

[0252] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.31)和免疫球蛋白Fc以1:10的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.31)和免疫球蛋白Fc的结合物(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→20%100min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图5b)。图5b是显示纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.31)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0253] 实施例8:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0254] 首先,为了用3.4K PropionALD(2) PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)氨基酸序列位置30的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.2)和3.4KPropionALD(2) PEG以1:10的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在4℃反应4小时。这时,反应在100mM HEPES缓冲剂(pH 7.5)和45%异丙醇的溶剂混合物中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化赖氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%222min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图6a)。图6a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)的结果的图。洗脱峰的单聚乙二醇化通过SDS-PAGE检测,赖氨酸选择性通过利用Asp-N蛋白酶的肽作图检测(图6b)。图6b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)的肽作图结果的图。

[0255] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)和免疫球蛋白Fc以1:8的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图6c)和Source ISO纯化柱(柱:SOURCE ISO(XK16,Amersham Biosciences),流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%100min B,(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.3MAS)) (图6d),以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)和免疫球蛋白Fc的结合物。图6c是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图,图6d是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.2)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0256] 实施例9:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0257] 首先,为了用3.4K PropionALD(2) PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)氨基酸序列位置27的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.3)和3.4KPropionALD(2) PEG以1:10的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在4℃反应4小时。这时,反应在100mM HEPES缓冲剂(pH 7.5)和45%异丙醇的溶剂混合物中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇

化赖氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%22min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图7a)。图7a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)的结果的图。洗脱峰的单聚乙二醇化通过SDS-PAGE检测,赖氨酸选择性通过利用Asp-N蛋白酶的肽作图检测(图7b)。图7b是显示纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)的肽作图结果的图。

[0258] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)和免疫球蛋白Fc以1:8的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于Butyl FF纯化柱(柱:Butyl FF(XK16,Amersham Biosciences),流速:2.0ml/min,梯度:B 0→100%5min A(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.5M NaCl)) (图7c)和SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图7d)以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)和免疫球蛋白Fc的结合物。图7c是显示通过Butyl FF纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图,图7d是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.3)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0259] 实施例10:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0260] 首先,为了用MAL-10K-ALD PEG(NOF.,日本)进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)氨基酸序列位置24的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.3)和MAL-10K-ALD PEG以1:3的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在室温反应3小时。这时,反应在50mM Tris缓冲剂(pH 8.0)和45%异丙醇中进行,并向其中加入1M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化半胱氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%50min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图8a)。图8a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)的结果的图。

[0261] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc以1:5的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图8b)和Source ISO纯化柱(柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B 0→100%100min A,(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS)) (图8c)以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc的结合物。图8b是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图,图8c是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0262] 实施例11:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0263] 首先,为了用MAL-10K-ALD PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)氨基酸序

列位置30的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.24)和MAL-10K-ALD PEG以1:3的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在室温反应3小时。这时,反应在50mM Tris缓冲剂(pH 8.0)和45%异丙醇中进行,并向其中加入1M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化半胱氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%50min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图9a)。图9a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)的结果的图。

[0264] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc以1:5的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于和SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图9b)和Source ISO纯化柱(柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B 0→100%100min A,(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS)) (图9c)以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc的结合物。图9b是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图,图9c是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.24)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0265] 实施例12:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0266] 首先,为了用MAL-10K-ALD PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)氨基酸序列位置30的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.25)和MAL-10K-ALD PEG以1:3的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在室温反应3小时。这时,反应在50mM Tris缓冲剂(pH 8.0)中进行,并向其中加入1M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化半胱氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%50min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图10a)。图10a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)的结果的图。

[0267] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc以1:5的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图10b)和Source ISO纯化柱(柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B 0→100%100min A,(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS)) (图10c)以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc的结合物。图10b是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图,图10c是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.25)和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0268] 实施例13:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.28)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0269] 首先,为了用3.4K PropionALD (2) PEG进行泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.28) 氨基酸序列位置20的赖氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽 (SEQ ID NO.28) 和MAL-10K-ALD PEG以1:5的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在4℃反应3小时。这时,反应在50mM硼酸钠缓冲剂 (pH 9.0) 中进行,并向其中加入2M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化赖氨酸的泌酸调节肽衍生物 (柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→3%1min B→40%222min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl)) (图11a)。图11a是显示通过SOURCE S纯化柱纯化单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.28) 的结果的图。

[0270] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.28) 和免疫球蛋白Fc以1:10的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂 (pH 6.0) 中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱 (柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) (图11b) 和Source ISO纯化柱 (柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B 0→100%100min A, (A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS)) (图11c) 以纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.28) 和免疫球蛋白Fc的结合物。图11b是显示通过SOURCE 15Q纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.28) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图,图11c是显示通过Source ISO纯化柱纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.28) 和免疫球蛋白Fc的结合物的结果的图。

[0271] 实施例14:包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.32) 和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0272] 首先,为了用MAL-10K-ALD PEG进行泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.32) 氨基酸序列位置30的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽 (SEQ ID NO.32) 和MAL-10K-ALD PEG以1:3的摩尔比、1mg/ml的蛋白浓度在室温反应3小时。这时,反应在50mM Tris缓冲剂 (pH 8.0) 中进行,并向其中加入2M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化半胱氨酸的泌酸调节肽衍生物 (柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%50min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl))。

[0273] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.32) 和免疫球蛋白Fc以1:8的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂 (pH 6.0) 中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于和SOURCE 15Q纯化柱 (柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl)) 和Source ISO纯化柱 (柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B0→100%100min A, (A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS)) 以纯化包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.32) 和免疫球蛋白Fc的结合物。

[0274] 实施例15:包括泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.33) 和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0275] 首先,为了用MAL-10K-ALD PEG进行泌酸调节肽衍生物 (SEQ ID NO.33) 氨基酸序列位置30的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽 (SEQ ID NO.33) 和MAL-10K-ALD PEG以1:1的摩尔比、1mg/ml的蛋白浓度在室温反应3小时。这时,反应在50mM Tris缓冲剂 (pH 8.0) 中进行,并向其中加入2M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱

以纯化具有单聚乙二醇化半胱氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%50min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl))。

[0276] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.33)和免疫球蛋白Fc以1:5的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl))和Source ISO纯化柱(柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B0→100%100min A,(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS))以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.33)和免疫球蛋白Fc的结合物。

[0277] 实施例16:包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.34)和免疫球蛋白Fc的结合物的制备

[0278] 首先,为了用MAL-10K-ALD PEG进行泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.34)氨基酸序列位置30的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,将泌酸调节肽(SEQ ID NO.34)和MAL-10K-ALD PEG以1:1的摩尔比、3mg/ml的蛋白浓度在室温反应3小时。这时,反应在50mM Tris缓冲剂(pH 8.0)中进行,并向其中加入1M胍。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE S纯化柱以纯化具有单聚乙二醇化半胱氨酸的泌酸调节肽衍生物(柱:SOURCE S,流速:2.0ml/min,梯度:A0→100%50min B(A:20mM柠檬酸钠,pH 3.0+45%乙醇,B:A+1M KCl))。

[0279] 接下来,将纯化的单聚乙二醇化泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.34)和免疫球蛋白Fc以1:5的摩尔比、20mg/ml的蛋白浓度在4℃反应16小时。这时,将反应在100mM磷酸钾缓冲剂(pH 6.0)中进行,并向其中加入20mM SCB作为还原剂。反应完成之后,将反应混合物应用于SOURCE 15Q纯化柱(柱:SOURCE 15Q,流速:2.0ml/min,梯度:A0→4%1min B→20%80min B(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1M NaCl))和Source ISO纯化柱(柱:SOURCE ISO,流速:2.0ml/min,梯度:B0→100%100min A,(A:20mM Tris-HCl,pH 7.5,B:A+1.1M AS))以纯化包括泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.34)和免疫球蛋白Fc的结合物。

[0280] 实施例17:泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的体外活性

[0281] 为了测量上面实施例中制备的包括泌酸调节肽或泌酸调节肽衍生物和免疫球蛋白Fc的结合物的抗肥胖效力,以与实施例2-2相同的方式进行实验。

[0282] 具体地,将实施例1-1和1-2中制备的每种转化体一周亚培养两次或三次,并在96孔板的每孔中以 1×10^5 的密度进行等分,之后培养24小时。将培养的每个转化体用KRB缓冲剂洗并悬浮在40ml含有1mM IBMX的KRB缓冲剂中,并留在室温5分钟。通过5倍连续稀释将GLP-1、胰高血糖素和泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23、24、25、32、33或34)-免疫球蛋白Fc结合物从1000nM稀释到0.02nM,并将其每种40mL加到各转化体中,并在CO₂温育箱中在37℃培养1小时。然后,加入20mL细胞裂解缓冲剂用于细胞裂解,并将细胞裂解物应用到cAMP测定试剂盒(MolecularDevice,USA)以利用Victor(Perkin Elmer,USA)测量cAMP浓度。从中计算EC₅₀值,并且互相比对(表3)。

[0283] 表3

[0284] 泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的体外活性

SEQ ID NO.	EC ₅₀ (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
GLP-1	1.7±0.82	> 1,000
胰高血糖素	>1,000	1.7 ±1.69
[0285] SEQ ID NO.23 - Fc 结合物	5.4	15.8
SEQ ID NO.24 - Fc 结合物	8.4	76.8
SEQ ID NO.25 - Fc 结合物	5.5	9.4
SEQ ID NO.32 - Fc 结合物	68.7	11.9
SEQ ID NO.33 - Fc 结合物	11.7	85.9
SEQ ID NO.34 - Fc 结合物	168.0	8.0

[0286] 如表3所示,发现泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物显示对GLP-1和胰高血糖素受体的体外活性。

[0287] 实施例18:泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白结合物的体内活性

[0288] 检测泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物是否显示优异的体内体重减轻作用。

[0289] 具体地,喂给6周龄的正常C57BL/6小鼠以60kcal的高脂肪饮食24周以增加它们的体重平均大约50g,并以0.03或0.06mg/kg/周的剂量皮下施用泌酸调节肽衍生物(SEQ ID NO.23、24或25)-免疫球蛋白Fc结合物3周。此后,测量小鼠体重的变化(图12和图13)。图12和图13是显示根据泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的种类和施用剂量小鼠体重变化的图。如图12和图13所示,当泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的施用剂量增加时,体重以正比减少,即使泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物的种类之间存在差异,这表示泌酸调节肽衍生物-免疫球蛋白Fc结合物以剂量依赖性方式减轻体重。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 韩美科学株式会社
- [0003] <120> 包括泌酸调节肽和免疫球蛋白片段的结合物以及其应用
- [0004] <130> OPA12063/CN-DIV1
- [0005] <150> KR 10-2011-0058852
- [0006] <151> 2011-06-17
- [0007] <160> 53
- [0008] <170> KopatentIn 2.0
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 37
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 泌酸调节肽
- [0013] <400> 1
- [0014] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
- [0015] 1 5 10 15
- [0016] Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
- [0017] 20 25 30
- [0018] Arg Asn Asn Ile Ala
- [0019] 35
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 37
- [0022] <212> PRT
- [0023] <213> 泌酸调节肽衍生物
- [0024] <220>
- [0025] <221> 变体
- [0026] <222> (1)
- [0027] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0028] <400> 2
- [0029] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
- [0030] 1 5 10 15
- [0031] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
- [0032] 20 25 30
- [0033] Arg Asn Asn Ile Ala
- [0034] 35
- [0035] <210> 3
- [0036] <211> 39
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 泌酸调节肽衍生物

[0039] <220>
 [0040] <221> 变体
 [0041] <222> (1)
 [0042] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0043] <400> 3
 [0044] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 [0045] 1 5 10 15
 [0046] Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
 [0047] 20 25 30
 [0048] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 [0049] 35
 [0050] <210> 4
 [0051] <211> 39
 [0052] <212> PRT
 [0053] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0054] <220>
 [0055] <221> 变体
 [0056] <222> (1)
 [0057] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0058] <400> 4
 [0059] His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu
 [0060] 1 5 10 15
 [0061] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 [0062] 20 25 30
 [0063] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 [0064] 35
 [0065] <210> 5
 [0066] <211> 39
 [0067] <212> PRT
 [0068] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0069] <220>
 [0070] <221> 变体
 [0071] <222> (1)
 [0072] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0073] <400> 5
 [0074] His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
 [0075] 1 5 10 15
 [0076] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 [0077] 20 25 30

[0078] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 [0079] 35
 [0080] <210> 6
 [0081] <211> 42
 [0082] <212> PRT
 [0083] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0084] <220>
 [0085] <221> 变体
 [0086] <222> (1)
 [0087] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0088] <400> 6
 [0089] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
 [0090] 1 5 10 15
 [0091] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
 [0092] 20 25 30
 [0093] Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
 [0094] 35 40
 [0095] <210> 7
 [0096] <211> 30
 [0097] <212> PRT
 [0098] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0099] <220>
 [0100] <221> 变体
 [0101] <222> (1)
 [0102] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0103] <400> 7
 [0104] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 [0105] 1 5 10 15
 [0106] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
 [0107] 20 25 30
 [0108] <210> 8
 [0109] <211> 29
 [0110] <212> PRT
 [0111] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0112] <220>
 [0113] <221> 变体
 [0114] <222> (1)
 [0115] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0116] <400> 8

- [0156] <211> 43
 [0157] <212> PRT
 [0158] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0159] <220>
 [0160] <221> 变体
 [0161] <222> (1)
 [0162] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0163] <400> 11
 [0164] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
 [0165] 1 5 10 15
 [0166] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
 [0167] 20 25 30
 [0168] Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
 [0169] 35 40
 [0170] <210> 12
 [0171] <211> 38
 [0172] <212> PRT
 [0173] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0174] <220>
 [0175] <221> 变体
 [0176] <222> (1)
 [0177] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0178] <400> 12
 [0179] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Gly
 [0180] 1 5 10 15
 [0181] Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met
 [0182] 20 25 30
 [0183] Glu Glu Glu Ala Val Lys
 [0184] 35
 [0185] <210> 13
 [0186] <211> 30
 [0187] <212> PRT
 [0188] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0189] <220>
 [0190] <221> 变体
 [0191] <222> (1)
 [0192] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
 [0193] <220>
 [0194] <221> 变体

- [0234] <221> 变体
- [0235] <222> (1)
- [0236] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0237] <220>
- [0238] <221> 变体
- [0239] <222> (24)
- [0240] <223> Xaa = 氨基异丁酸
- [0241] <400> 15
- [0242] His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
- [0243] 1 5 10 15
- [0244] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
- [0245] 20 25 30
- [0246] Arg Asn Asn Ile Ala
- [0247] 35
- [0248] <210> 16
- [0249] <211> 34
- [0250] <212> PRT
- [0251] <213> 泌酸调节肽衍生物
- [0252] <220>
- [0253] <221> 变体
- [0254] <222> (1)
- [0255] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0256] <400> 16
- [0257] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly
- [0258] 1 5 10 15
- [0259] Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu
- [0260] 20 25 30
- [0261] Glu Lys
- [0262] <210> 17
- [0263] <211> 37
- [0264] <212> PRT
- [0265] <213> 泌酸调节肽衍生物
- [0266] <220>
- [0267] <221> 变体
- [0268] <222> (1)
- [0269] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0270] <400> 17
- [0271] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
- [0272] 1 5 10 15

[0273]	Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
[0274]	20 25 30
[0275]	Arg Asn Asn Ile Ala
[0276]	35
[0277]	<210> 18
[0278]	<211> 40
[0279]	<212> PRT
[0280]	<213> 泌酸调节肽衍生物
[0281]	<220>
[0282]	<221> 变体
[0283]	<222> (1)
[0284]	<223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
[0285]	<400> 18
[0286]	His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
[0287]	1 5 10 15
[0288]	Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
[0289]	20 25 30
[0290]	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
[0291]	35 40
[0292]	<210> 19
[0293]	<211> 37
[0294]	<212> PRT
[0295]	<213> 泌酸调节肽衍生物
[0296]	<220>
[0297]	<221> 变体
[0298]	<222> (1)
[0299]	<223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
[0300]	<400> 19
[0301]	His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
[0302]	1 5 10 15
[0303]	Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
[0304]	20 25 30
[0305]	Arg Asn Asn Ile Ala
[0306]	35
[0307]	<210> 20
[0308]	<211> 40
[0309]	<212> PRT
[0310]	<213> 泌酸调节肽衍生物
[0311]	<220>

- [0312] <221> 变体
- [0313] <222> (1)
- [0314] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0315] <400> 20
- [0316] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
- [0317] 1 5 10 15
- [0318] Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
- [0319] 20 25 30
- [0320] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
- [0321] 35 40
- [0322] <210> 21
- [0323] <211> 37
- [0324] <212> PRT
- [0325] <213> 泌酸调节肽衍生物
- [0326] <220>
- [0327] <221> 变体
- [0328] <222> (1)
- [0329] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0330] <400> 21
- [0331] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu
- [0332] 1 5 10 15
- [0333] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn
- [0334] 20 25 30
- [0335] Arg Asn Asn Ile Ala
- [0336] 35
- [0337] <210> 22
- [0338] <211> 30
- [0339] <212> PRT
- [0340] <213> 泌酸调节肽衍生物
- [0341] <220>
- [0342] <221> 变体
- [0343] <222> (1)
- [0344] <223> 该“H”指组氨酸,脱氨基-组氨酰基的衍生物。
- [0345] <400> 22
- [0346] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
- [0347] 1 5 10 15
- [0348] Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys
- [0349] 20 25 30
- [0350] <210> 23

[0351]	<211>	29
[0352]	<212>	PRT
[0353]	<213>	泌酸调节肽衍生物
[0354]	<220>	
[0355]	<221>	变体
[0356]	<222>	(2)
[0357]	<223>	Xaa = 氨基异丁酸
[0358]	<400>	23
[0359]	His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu	
[0360]	1	5 10 15
[0361]	Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr	
[0362]		20 25
[0363]	<210>	24
[0364]	<211>	30
[0365]	<212>	PRT
[0366]	<213>	泌酸调节肽衍生物
[0367]	<220>	
[0368]	<221>	变体
[0369]	<222>	(2)
[0370]	<223>	Xaa = 氨基异丁酸
[0371]	<400>	24
[0372]	His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu	
[0373]	1	5 10 15
[0374]	Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys	
[0375]		20 25 30
[0376]	<210>	25
[0377]	<211>	30
[0378]	<212>	PRT
[0379]	<213>	泌酸调节肽衍生物
[0380]	<220>	
[0381]	<221>	变体
[0382]	<222>	(2)
[0383]	<223>	Xaa = 氨基异丁酸
[0384]	<400>	25
[0385]	His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu	
[0386]	1	5 10 15
[0387]	Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys	
[0388]		20 25 30
[0389]	<210>	26

[0390] <211> 30
 [0391] <212> PRT
 [0392] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0393] <220>
 [0394] <221> 变体
 [0395] <222> (2)
 [0396] <223> Xaa = 氨基异丁酸
 [0397] <400> 26
 [0398] His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 [0399] 1 5 10 15
 [0400] Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 [0401] 20 25 30
 [0402] <210> 27
 [0403] <211> 29
 [0404] <212> PRT
 [0405] <213> 泌酸调节肽衍生物'
 [0406] <220>
 [0407] <221> 变体
 [0408] <222> (2)
 [0409] <223> Xaa = 氨基异丁酸
 [0410] <400> 27
 [0411] His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 [0412] 1 5 10 15
 [0413] Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
 [0414] 20 25
 [0415] <210> 28
 [0416] <211> 29
 [0417] <212> PRT
 [0418] <213> 泌酸调节肽衍生物
 [0419] <220>
 [0420] <221> 变体
 [0421] <222> (2)
 [0422] <223> Xaa = 氨基异丁酸
 [0423] <400> 28
 [0424] His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 [0425] 1 5 10 15
 [0426] Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 [0427] 20 25
 [0428] <210> 29

- [0468] <222> (2)
- [0469] <223> 该“S”指丝氨酸,d-丝氨酸的变体。
- [0470] <400> 31
- [0471] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
- [0472] 1 5 10 15
- [0473] Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
- [0474] 20 25 30
- [0475] Arg Asn Asn Ile Ala
- [0476] 35
- [0477] <210> 32
- [0478] <211> 30
- [0479] <212> PRT
- [0480] <213> 人工序列
- [0481] <220>
- [0482] <223> 泌酸调节肽衍生物
- [0483] <220>
- [0484] <221> 变体
- [0485] <222> (1)
- [0486] <223> 该“H”指组氨酸,4-咪唑基乙酰基的衍生物。
- [0487] <220>
- [0488] <221> 变体
- [0489] <222> (2)
- [0490] <223> Xaa = 氨基异丁酸
- [0491] <400> 32
- [0492] His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
- [0493] 1 5 10 15
- [0494] Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
- [0495] 20 25 30
- [0496] <210> 33
- [0497] <211> 30
- [0498] <212> PRT
- [0499] <213> 人工序列
- [0500] <220>
- [0501] <223> 泌酸调节肽衍生物
- [0502] <220>
- [0503] <221> 变体
- [0504] <222> (2)
- [0505] <223> Xaa = 氨基异丁酸
- [0506] <400> 33

[0585]	<213>	人工序列
[0586]	<220>	
[0587]	<223>	基团 A 或 B
[0588]	<400>	41
[0589]	Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg	
[0590]	1	5 10 15
[0591]	Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr	
[0592]		20 25
[0593]	<210>	42
[0594]	<211>	28
[0595]	<212>	PRT
[0596]	<213>	人工序列
[0597]	<220>	
[0598]	<223>	基团 A 或 B
[0599]	<400>	42
[0600]	Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu	
[0601]	1	5 10 15
[0602]	Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr	
[0603]		20 25
[0604]	<210>	43
[0605]	<211>	28
[0606]	<212>	PRT
[0607]	<213>	人工序列
[0608]	<220>	
[0609]	<223>	基团 A 或 B
[0610]	<400>	43
[0611]	Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg	
[0612]	1	5 10 15
[0613]	Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr	
[0614]		20 25
[0615]	<210>	44
[0616]	<211>	28
[0617]	<212>	PRT
[0618]	<213>	人工序列
[0619]	<220>	
[0620]	<223>	基团 A 或 B
[0621]	<400>	44
[0622]	Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu Glu	
[0623]	1	5 10 15

-
- [0702] cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34
[0703] <210> 53
[0704] <211> 32
[0705] <212> DNA
[0706] <213> 人工序列
[0707] <220>
[0708] <223> 引物
[0709] <400> 53
[0710] ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

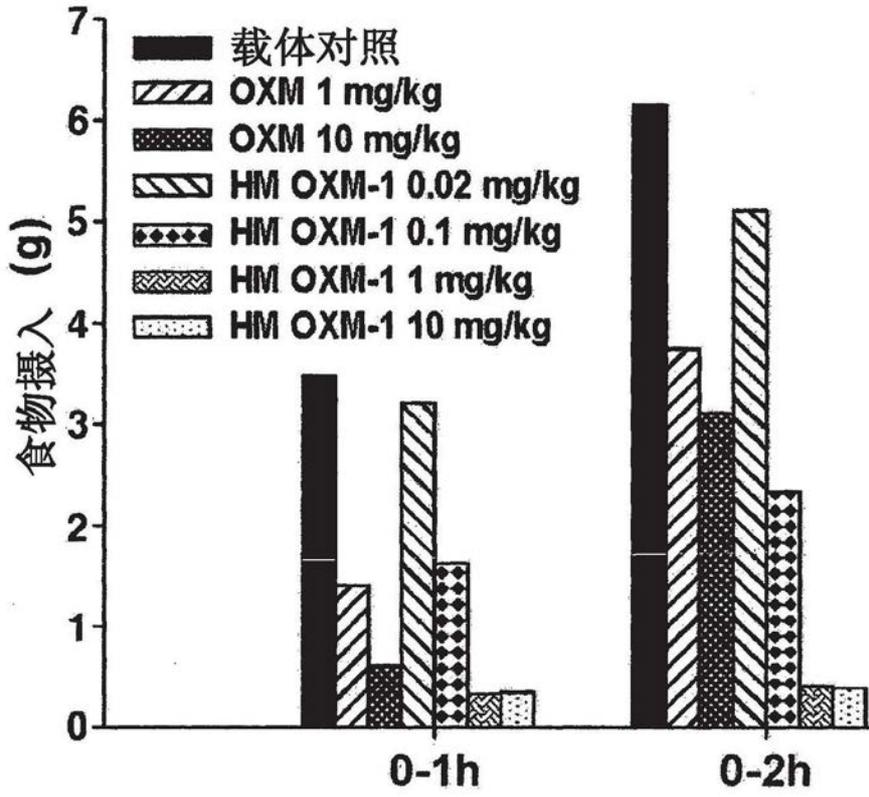


图1

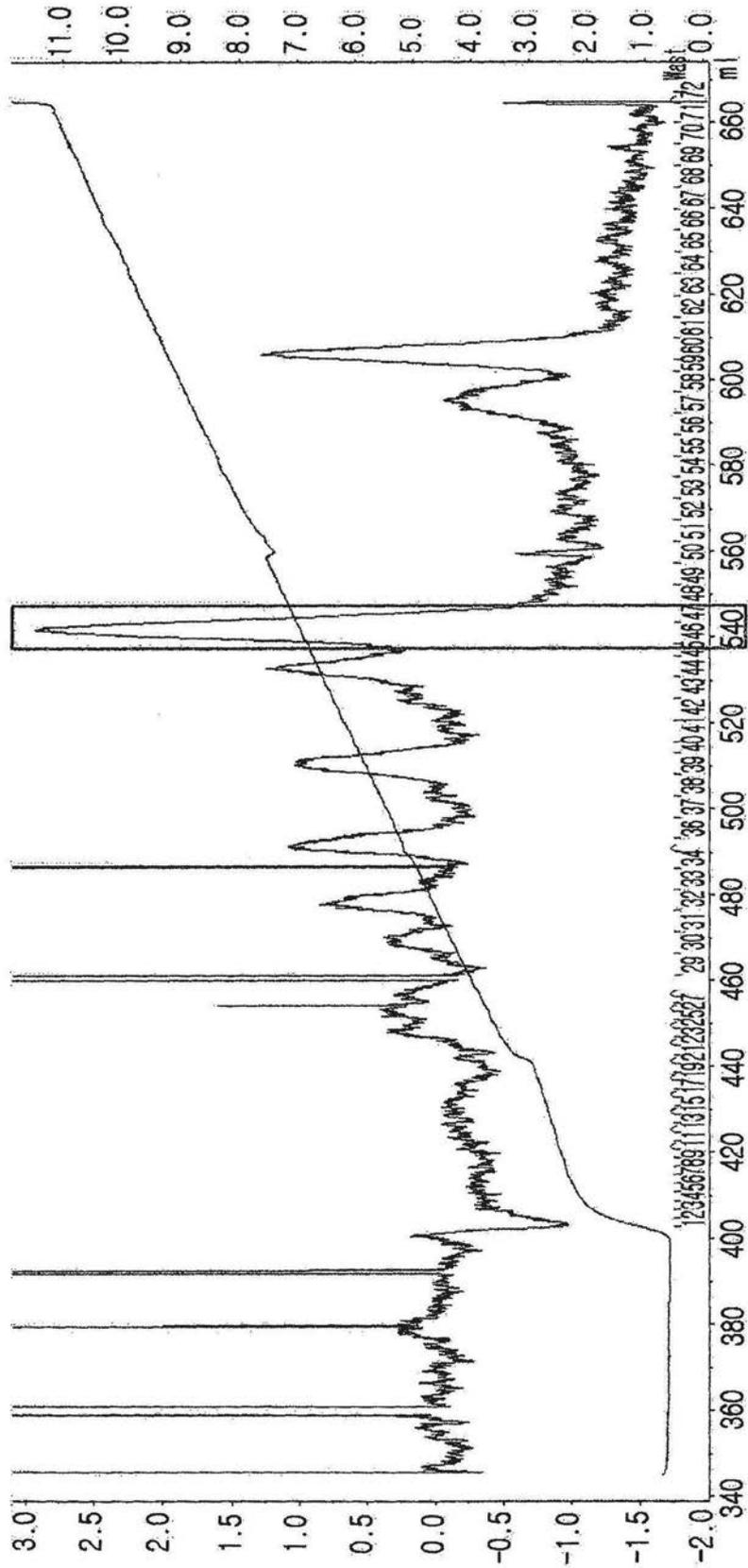


图2a

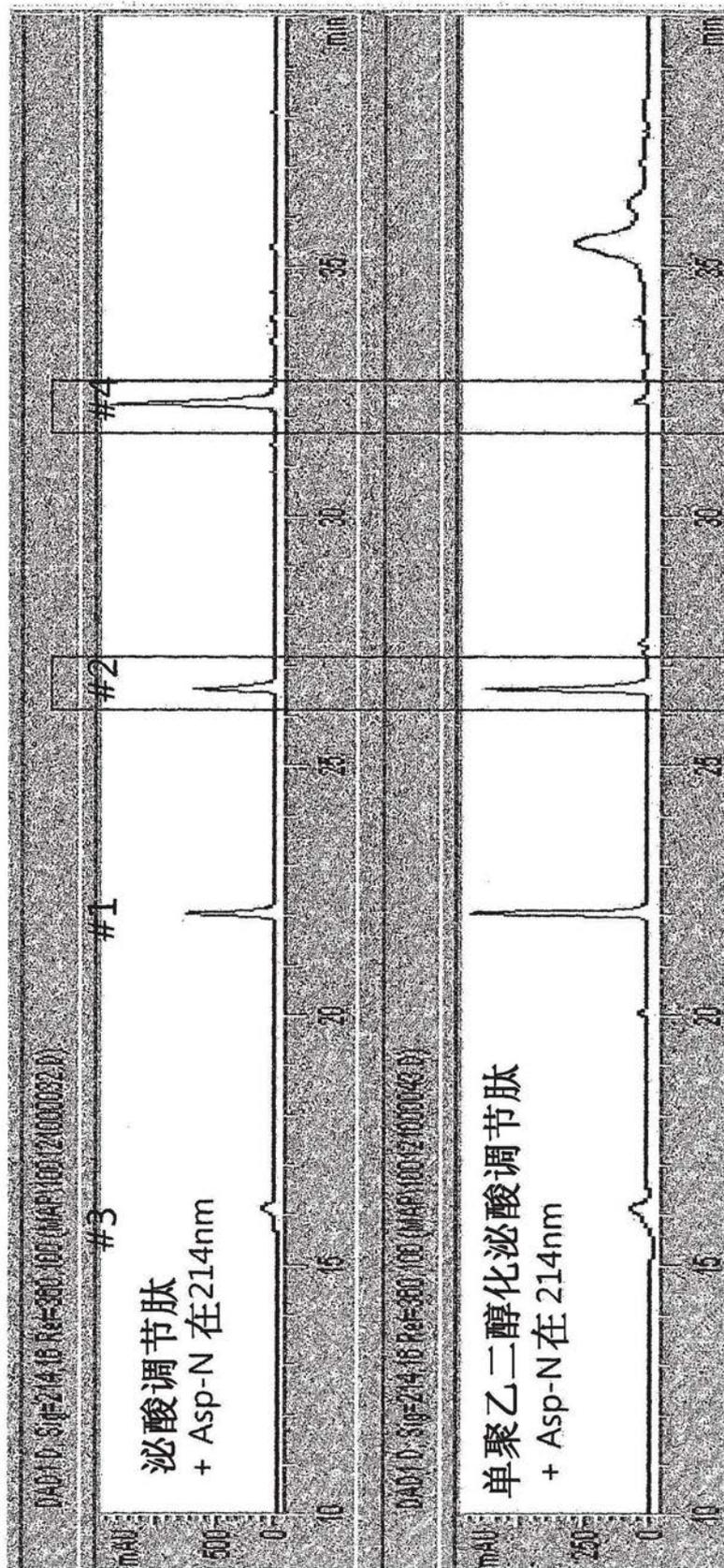


图2b

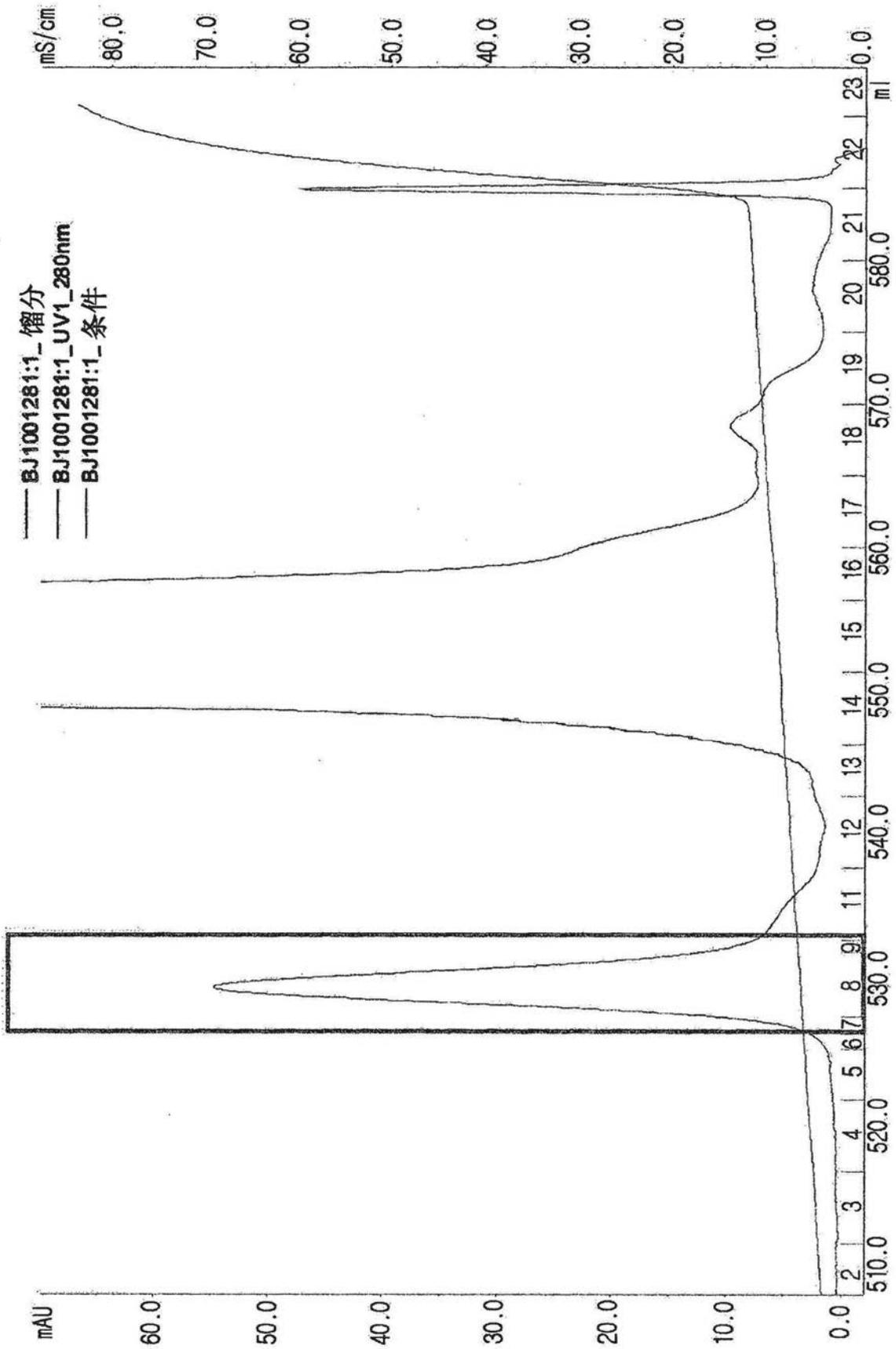


图2c

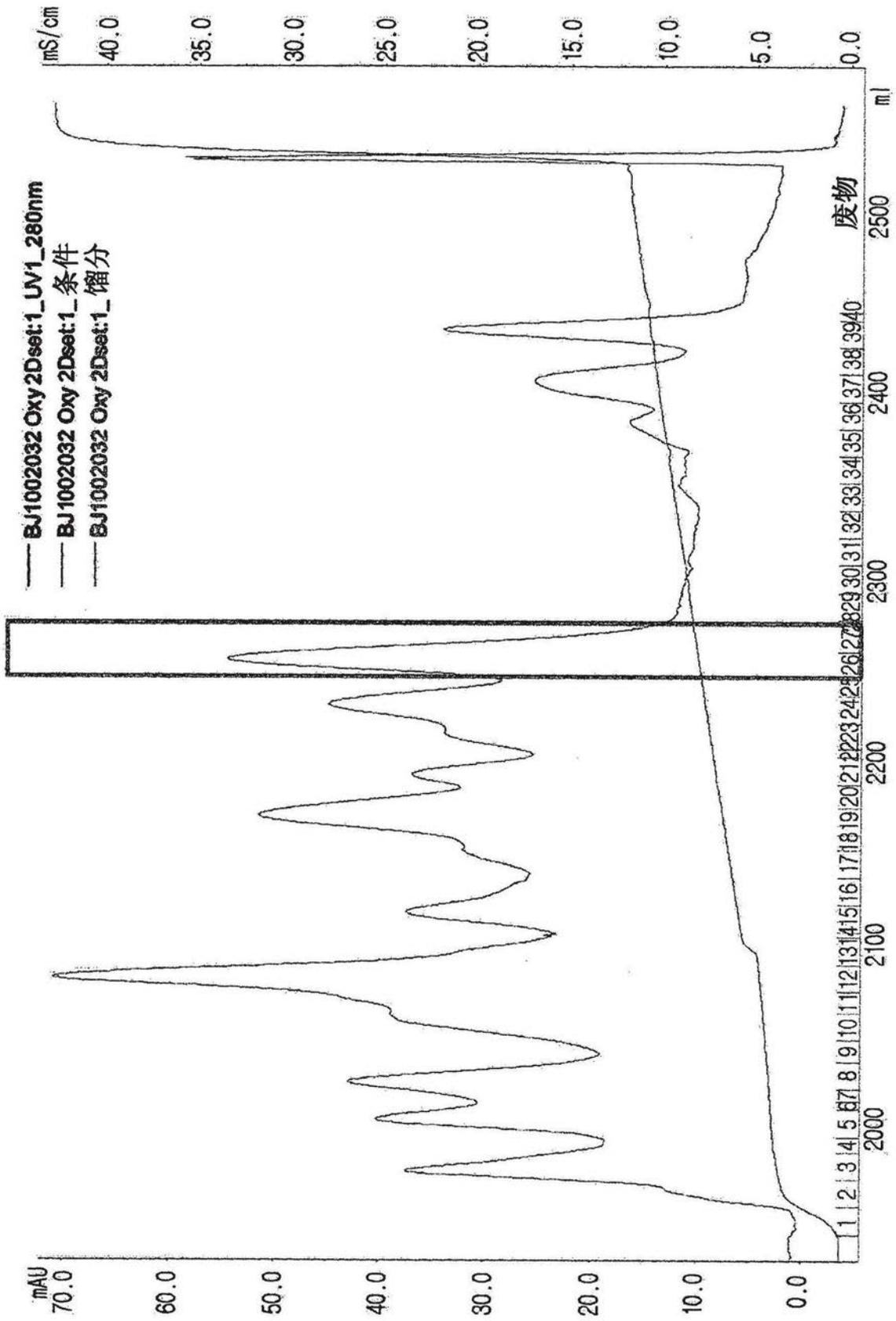


图3a

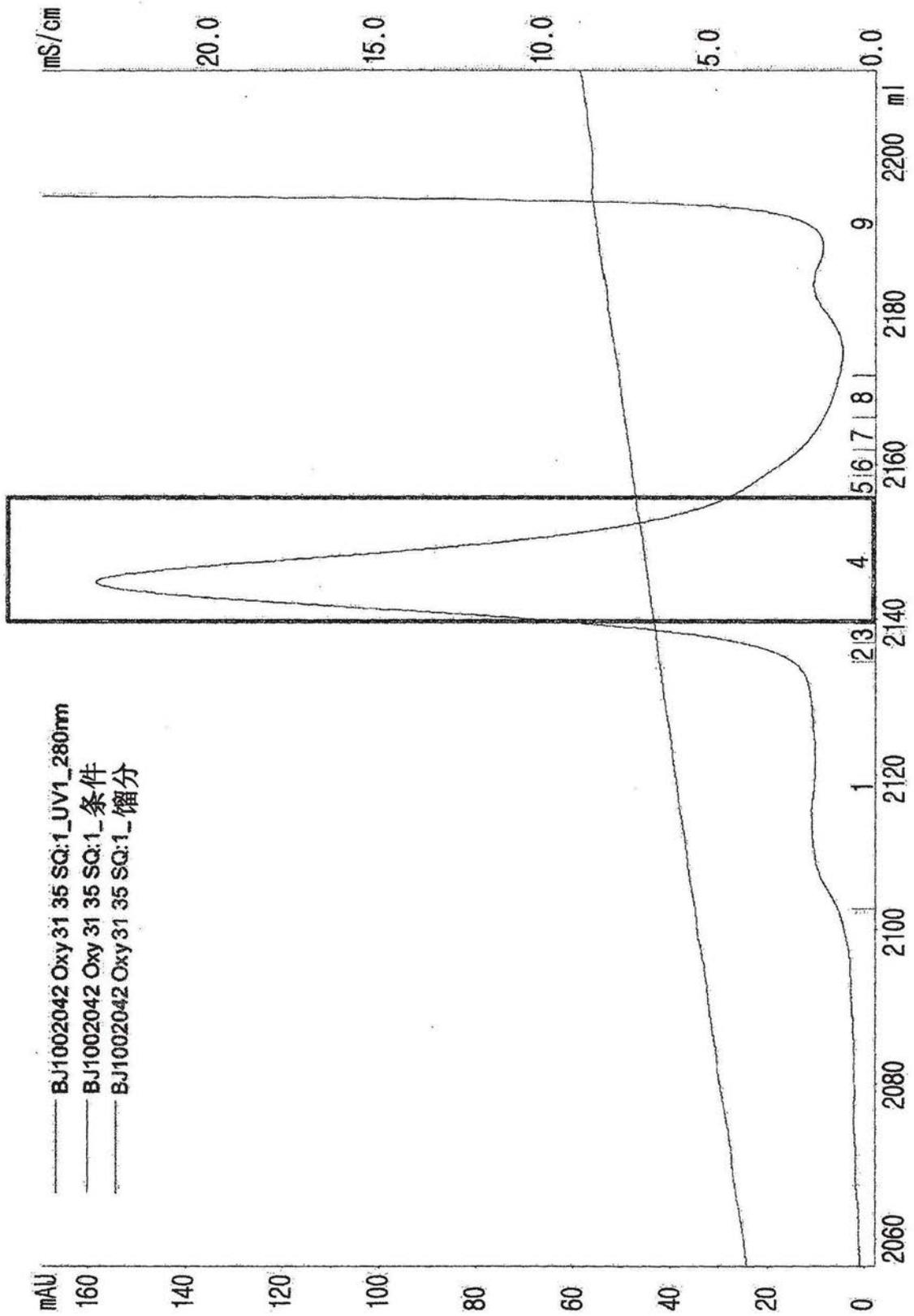


图3b

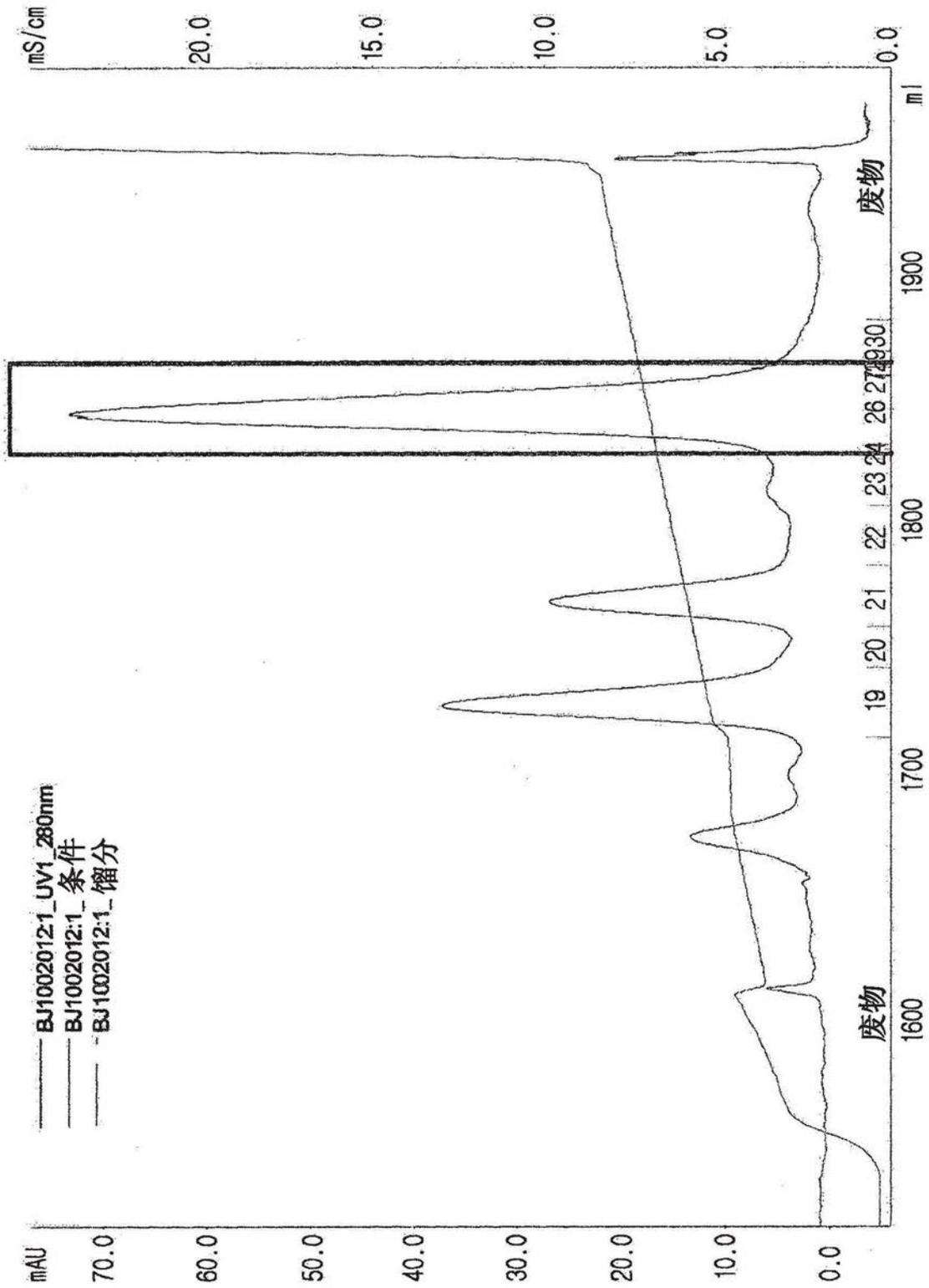


图4a

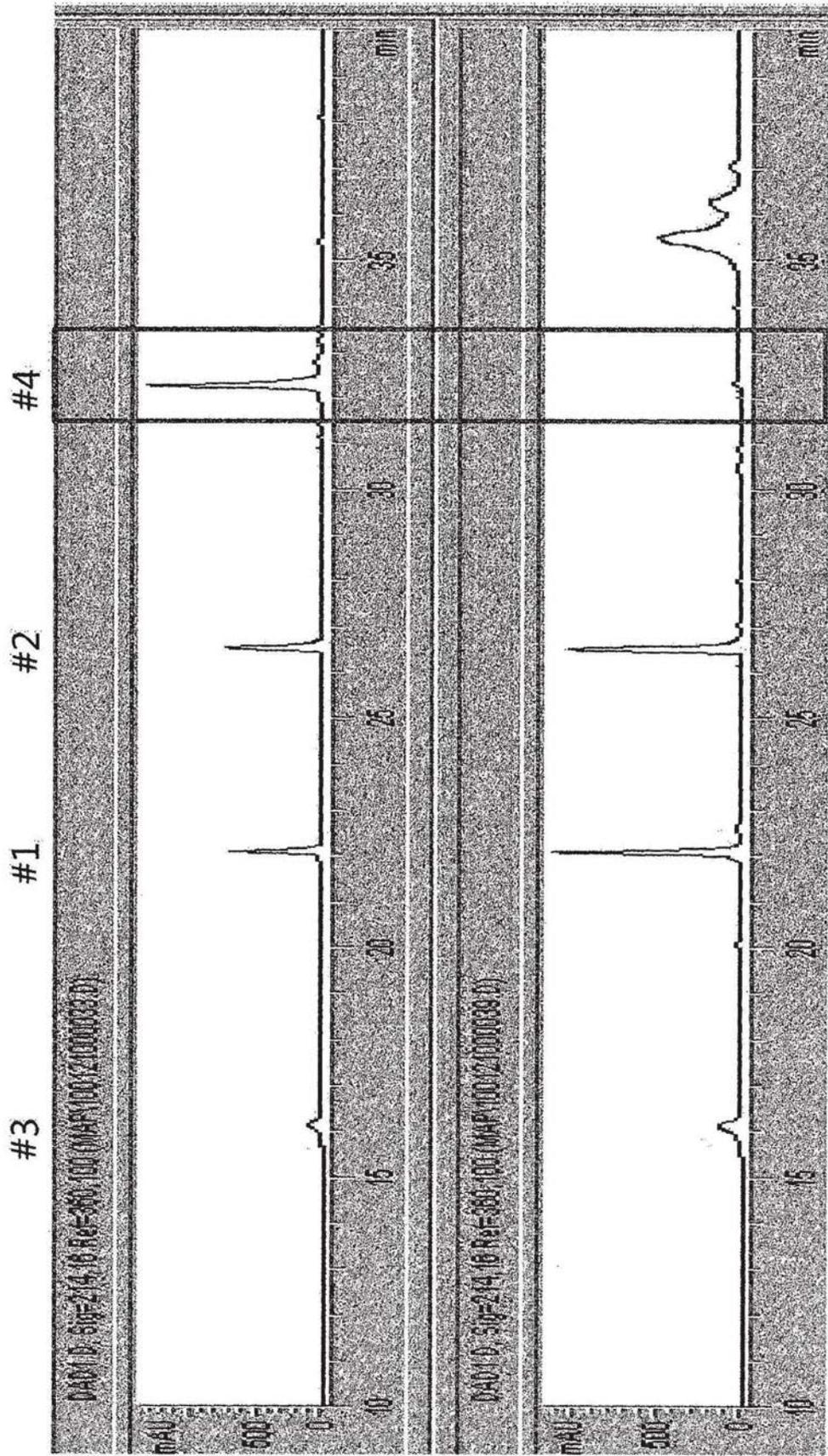


图4b

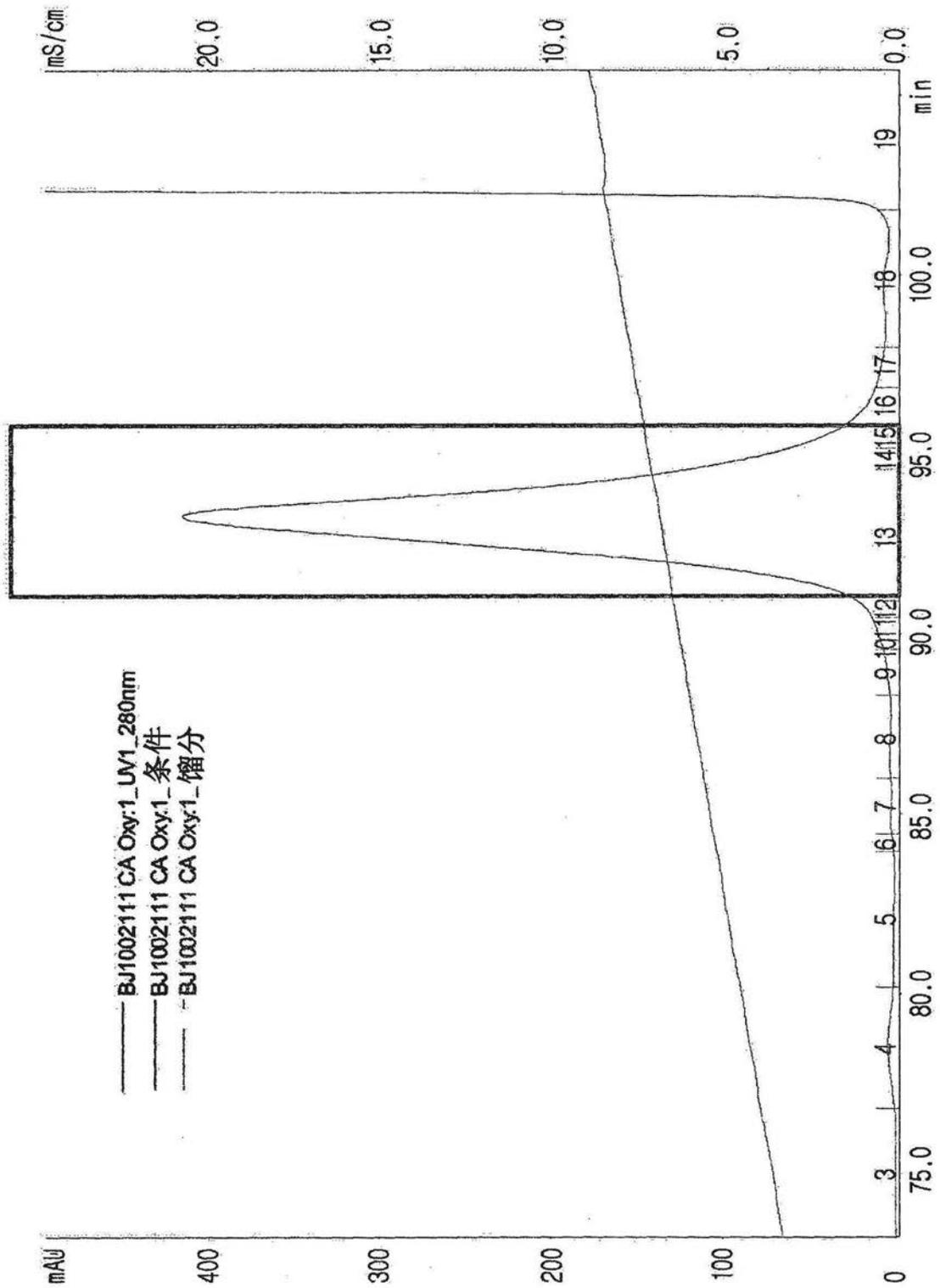


图4c

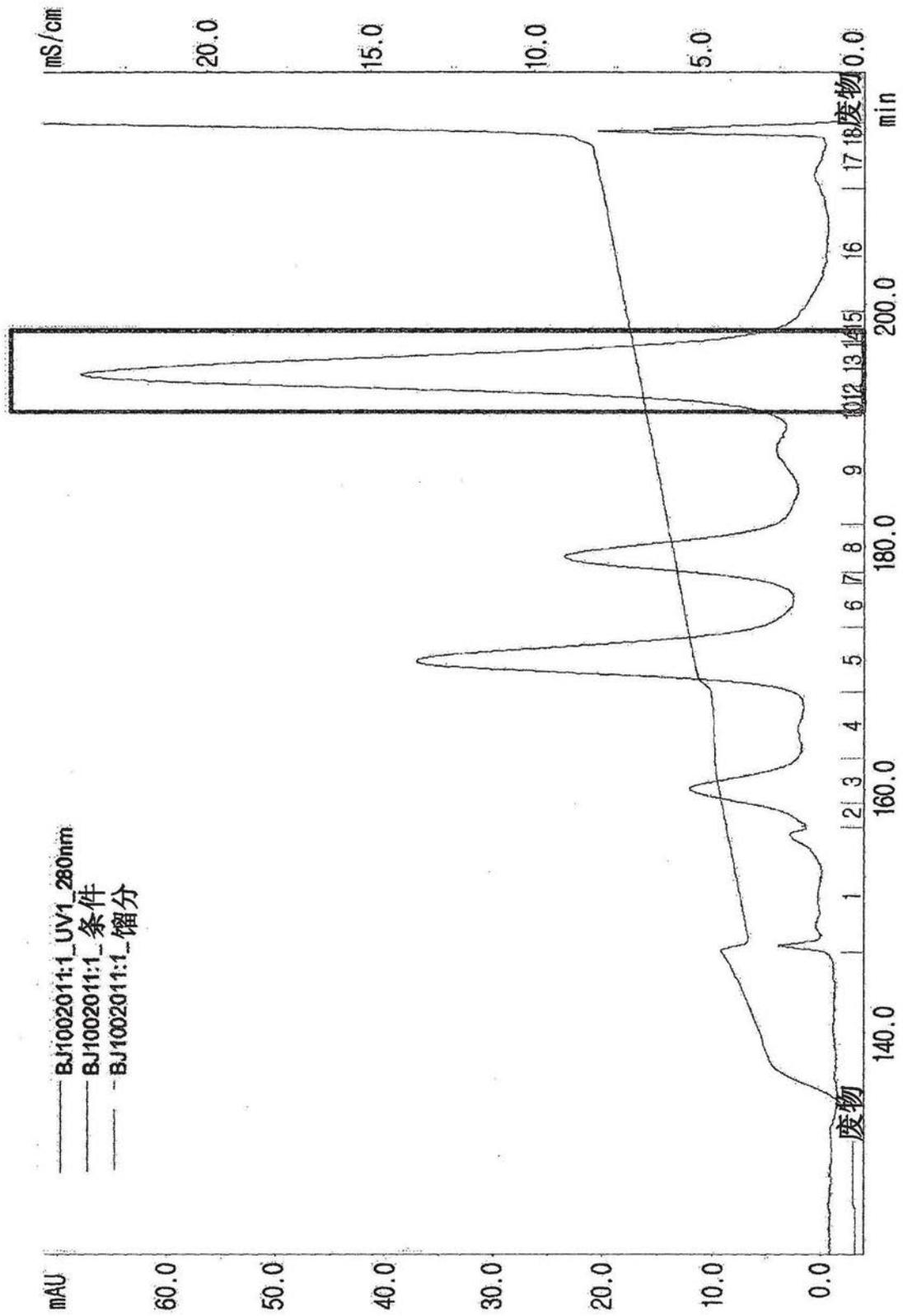


图5a

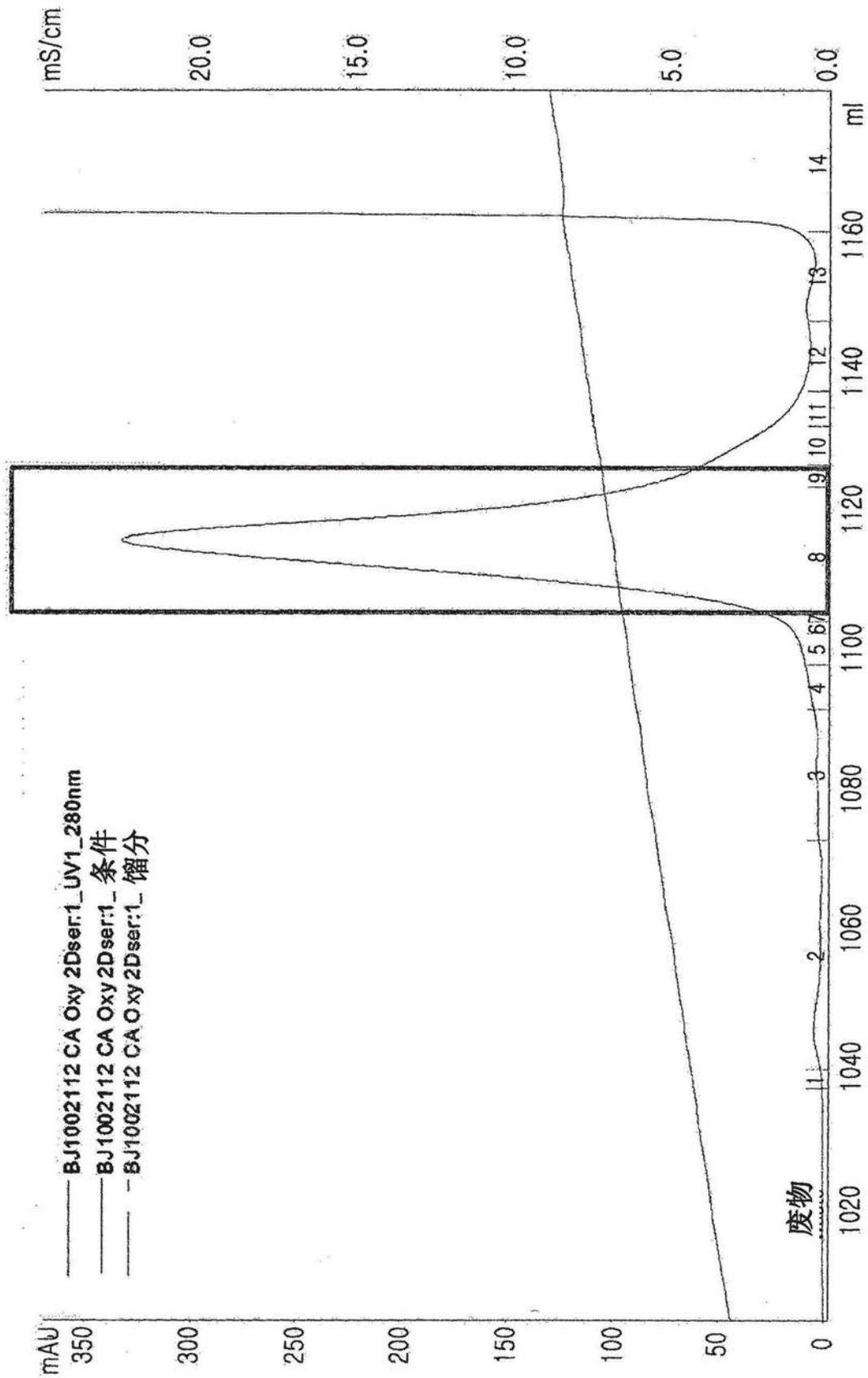


图5b

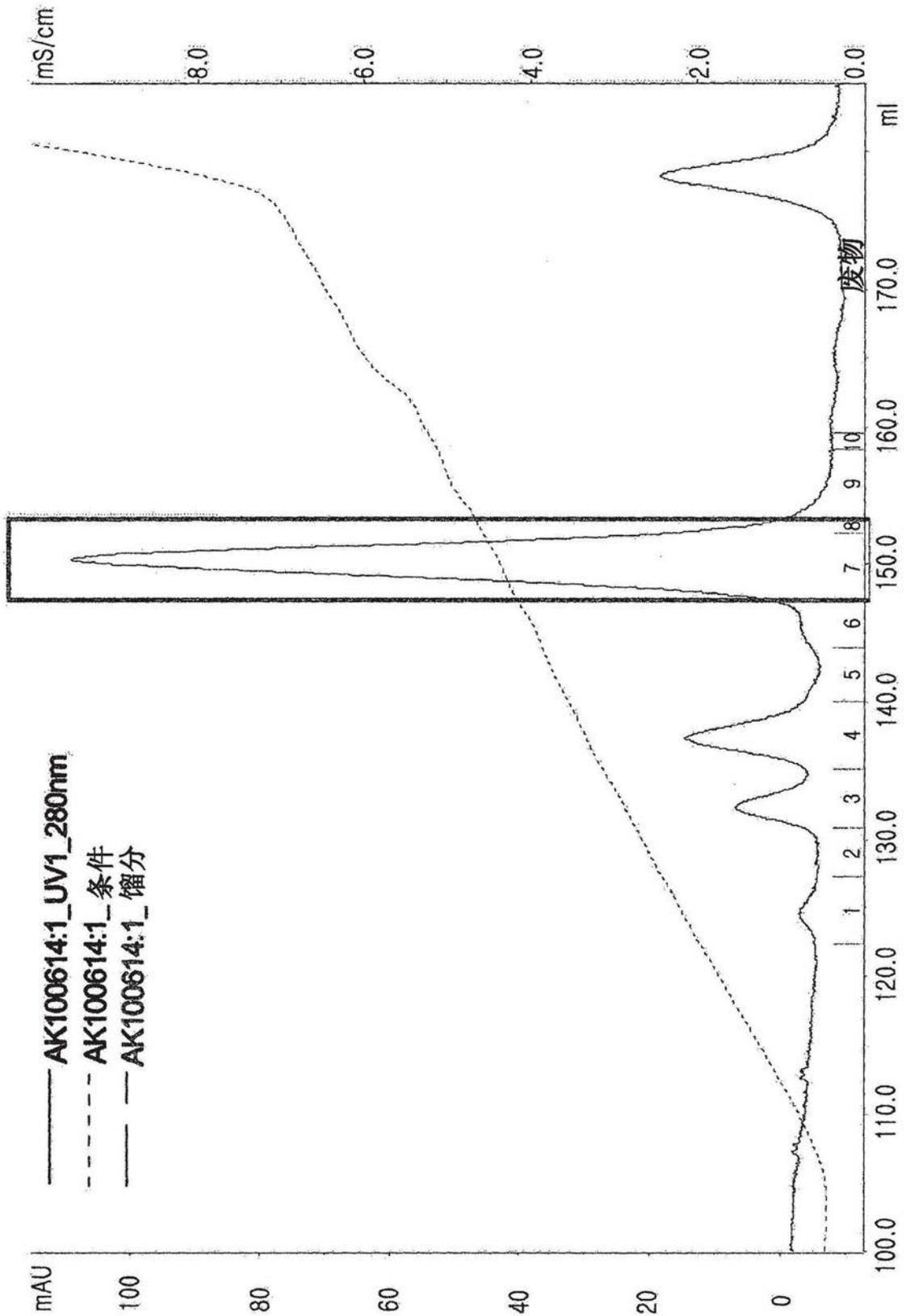


图6a

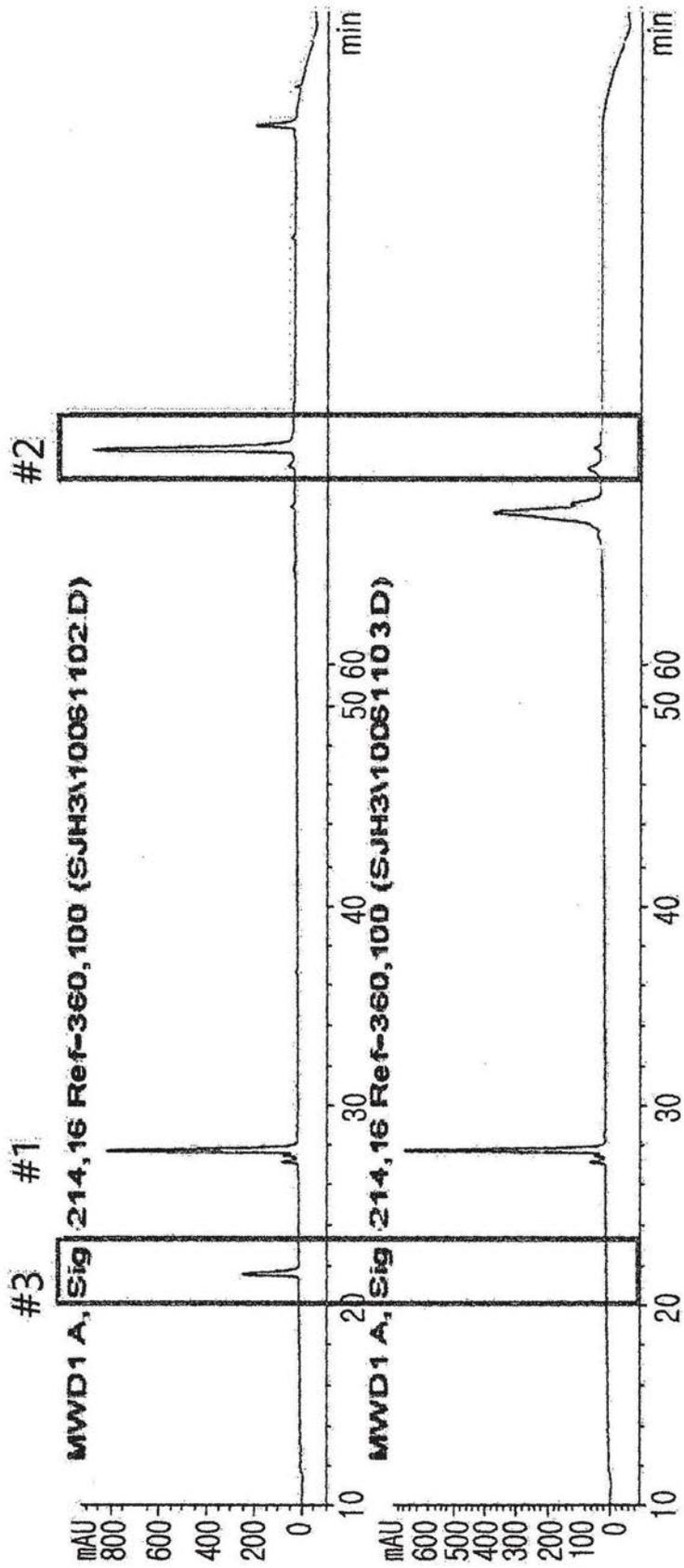


图6b

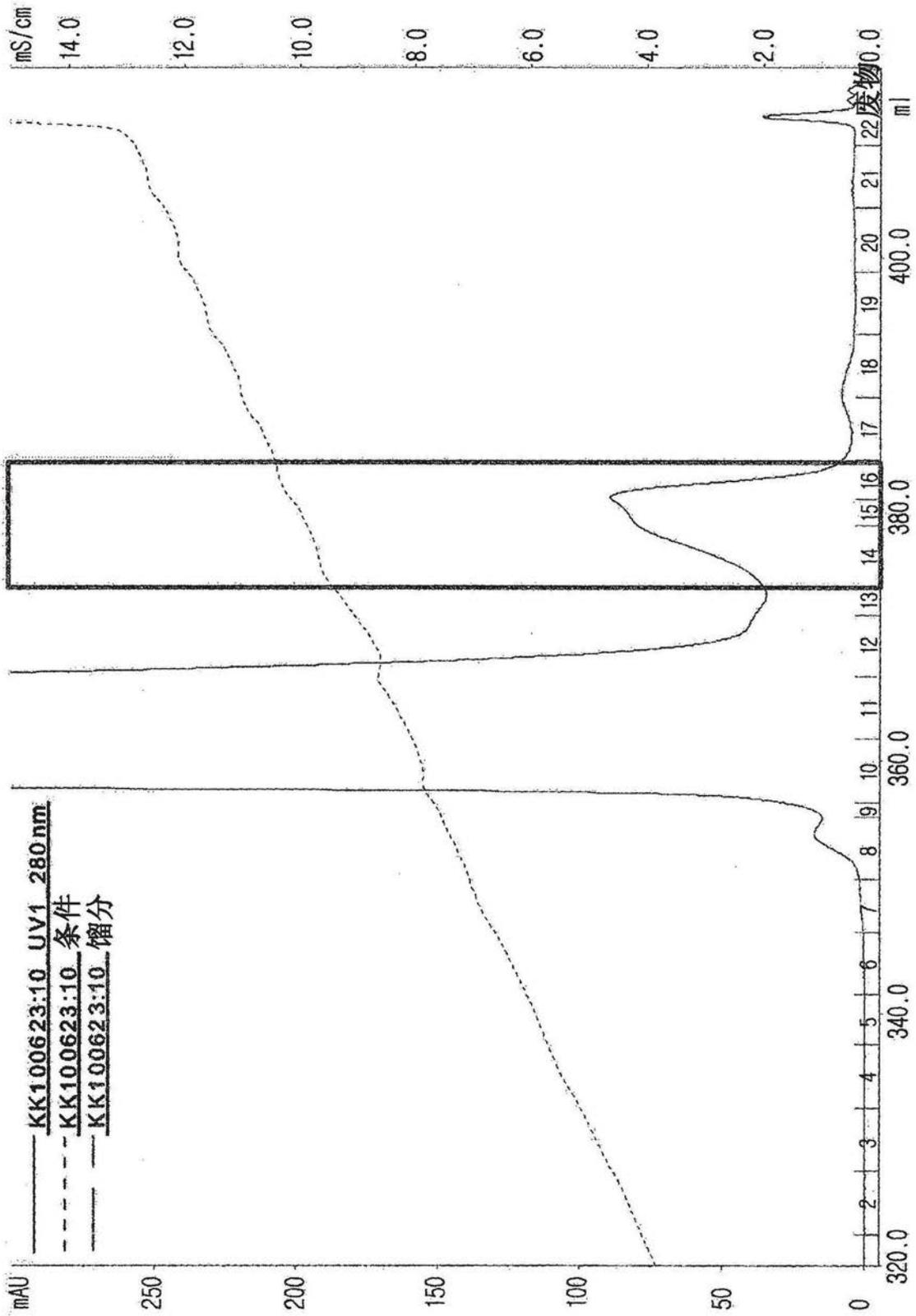


图6c

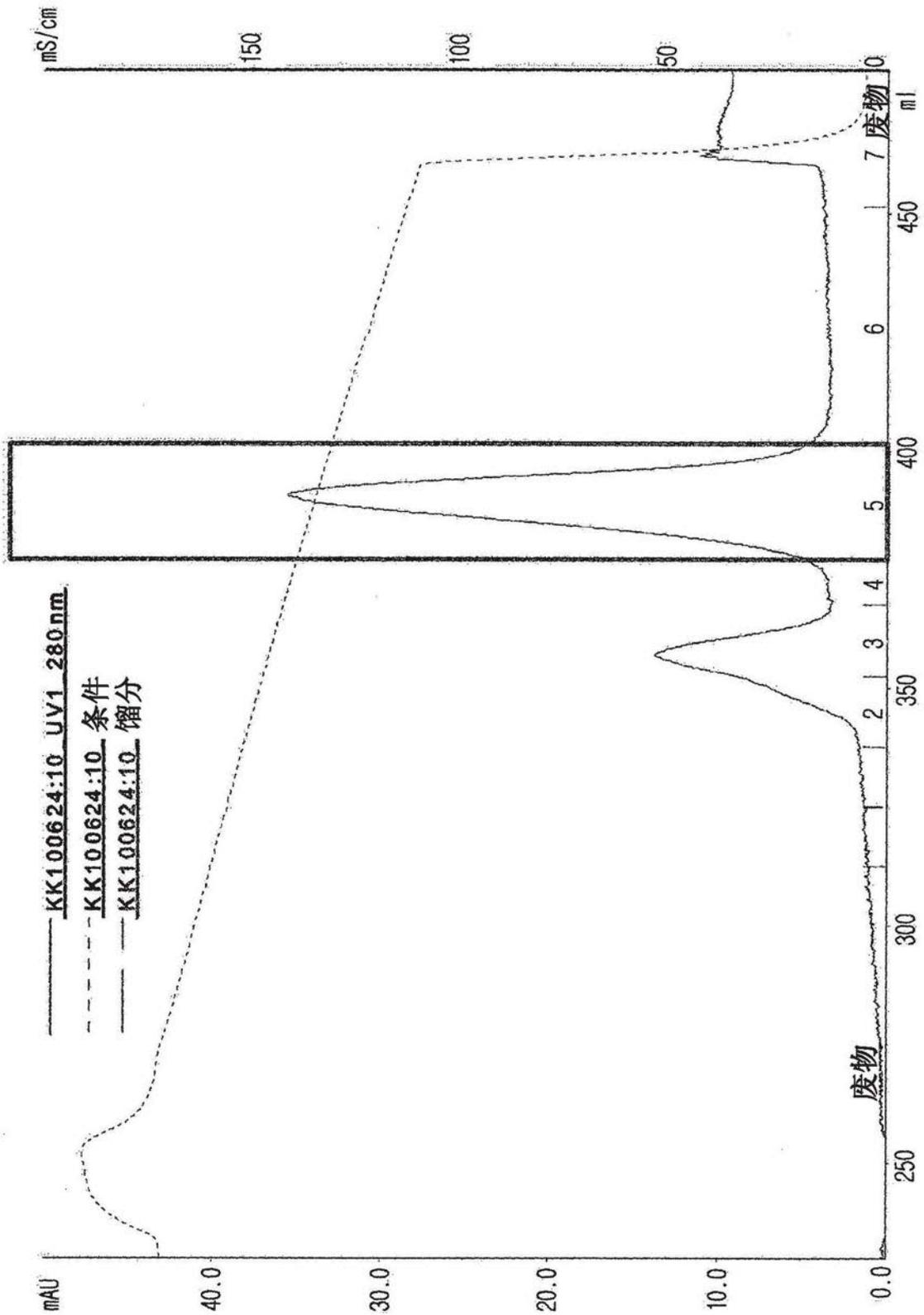


图6d

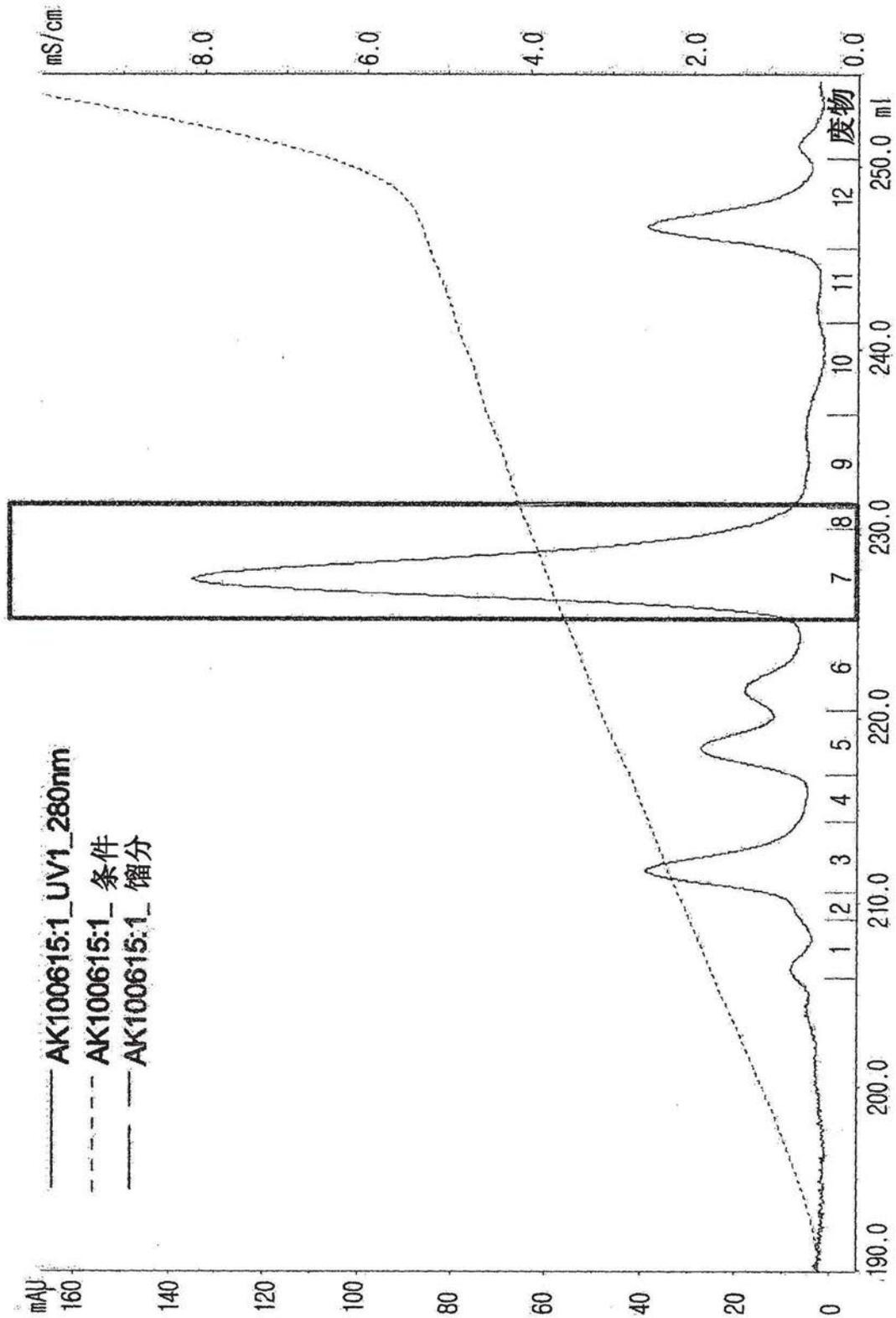


图7a

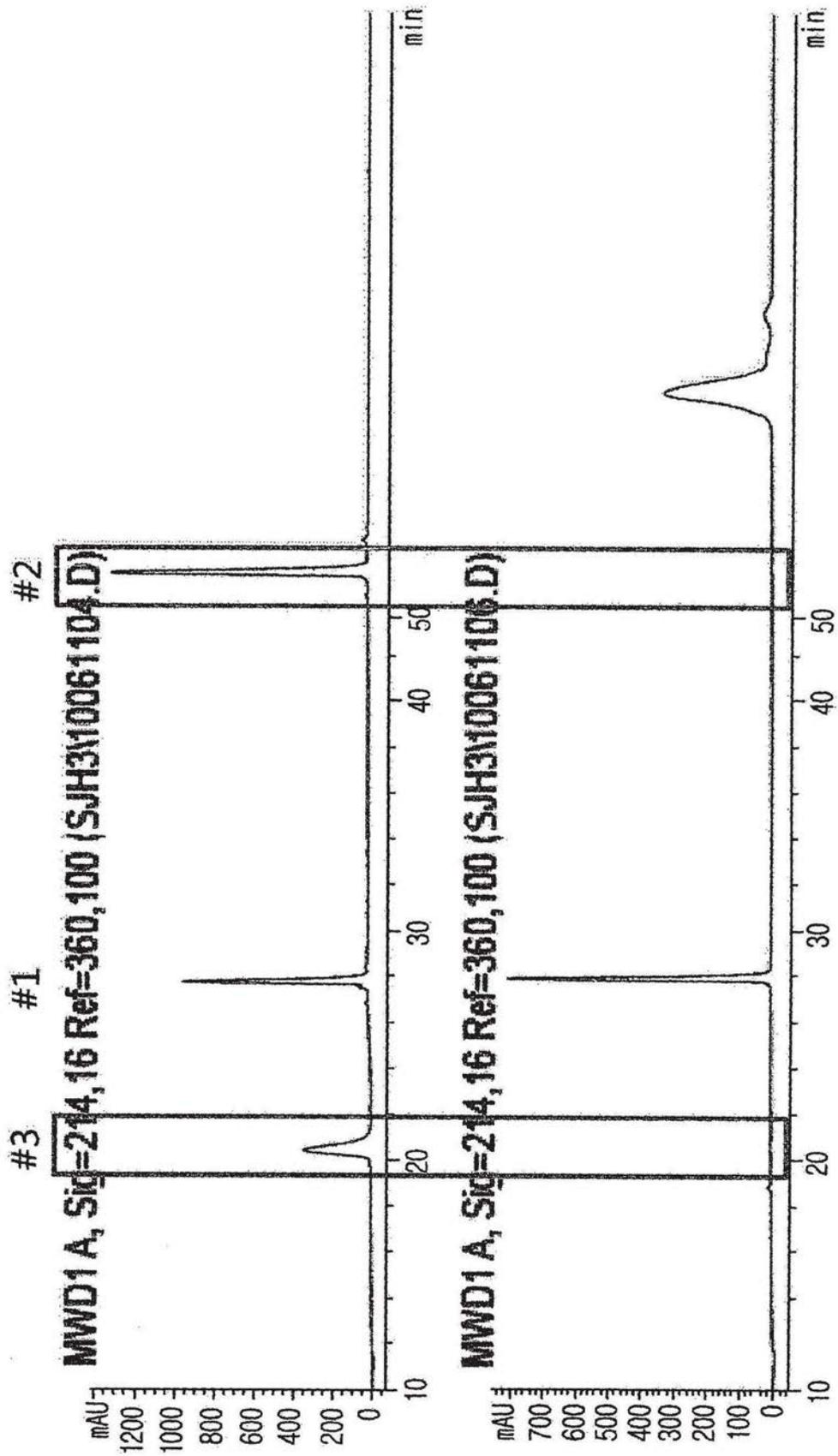


图7b

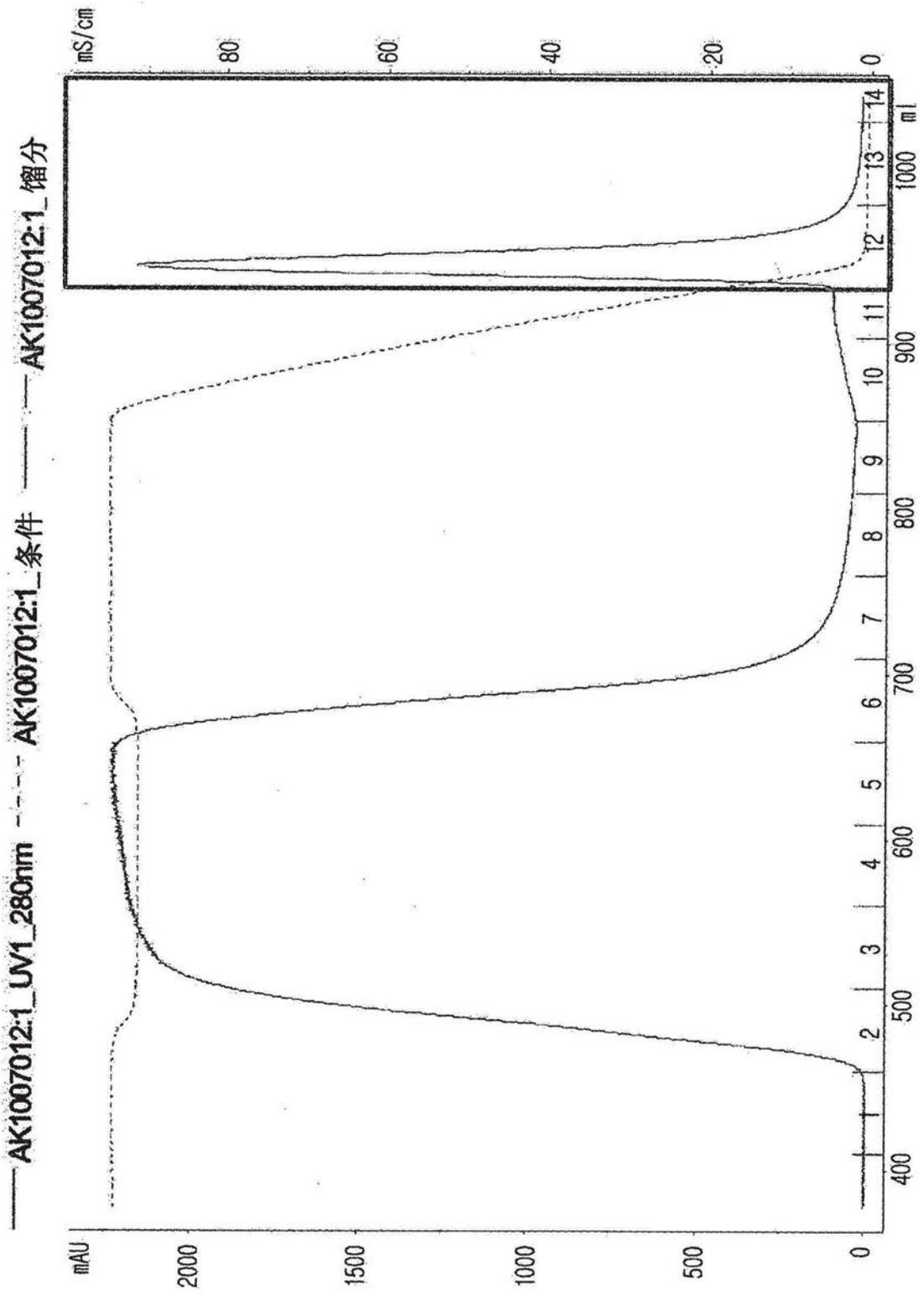


图7c

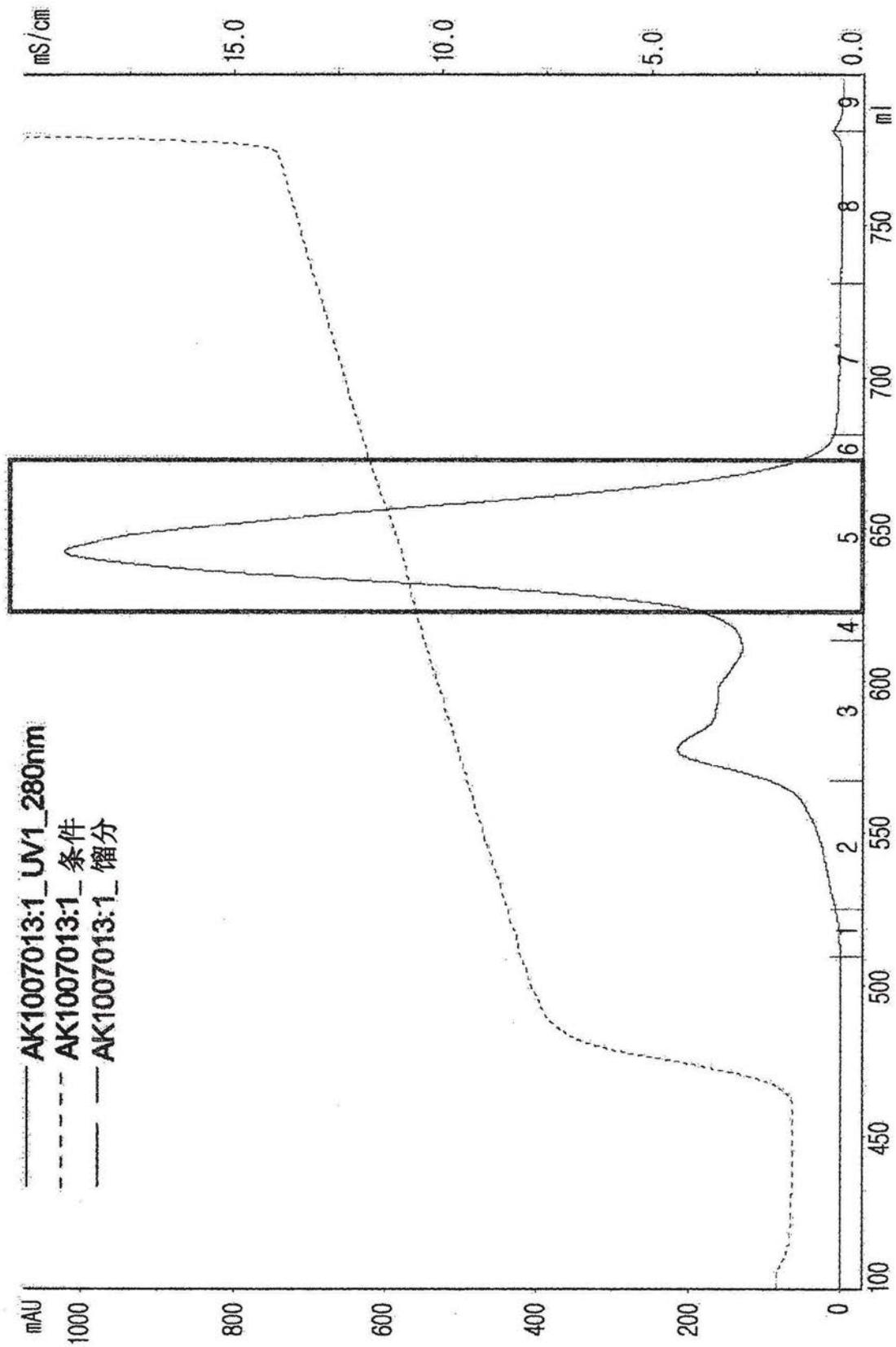


图7d

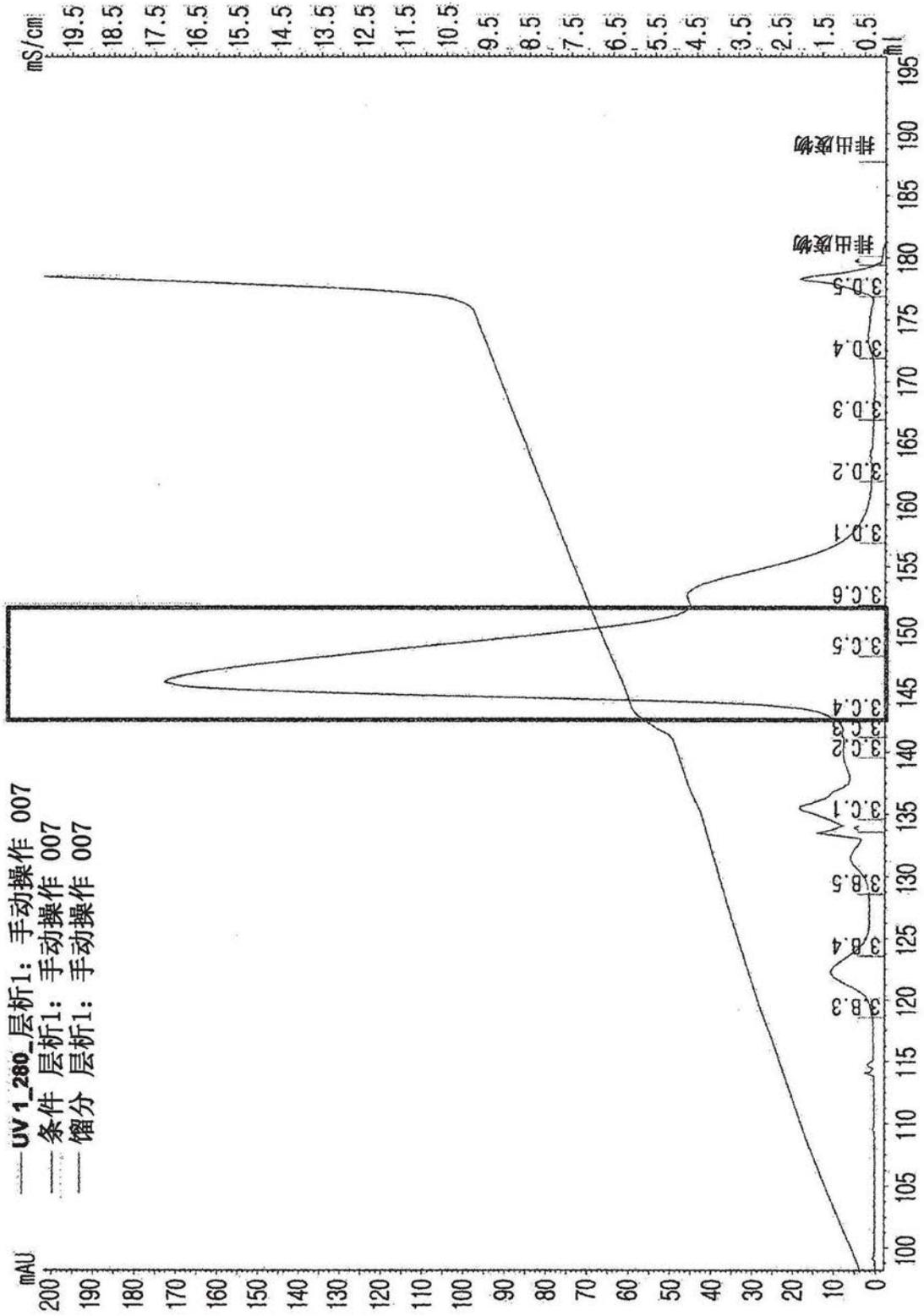


图8a

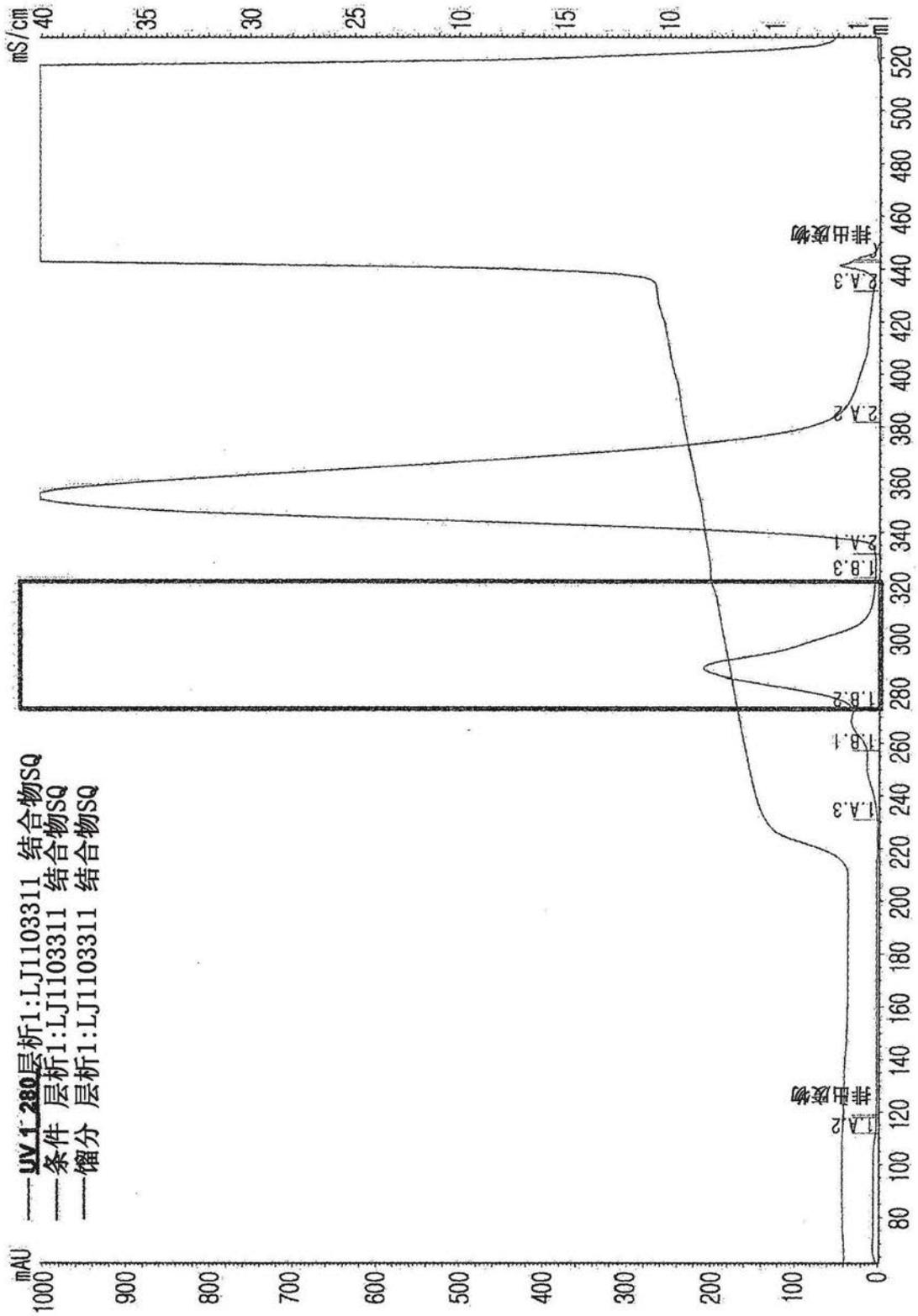


图8b

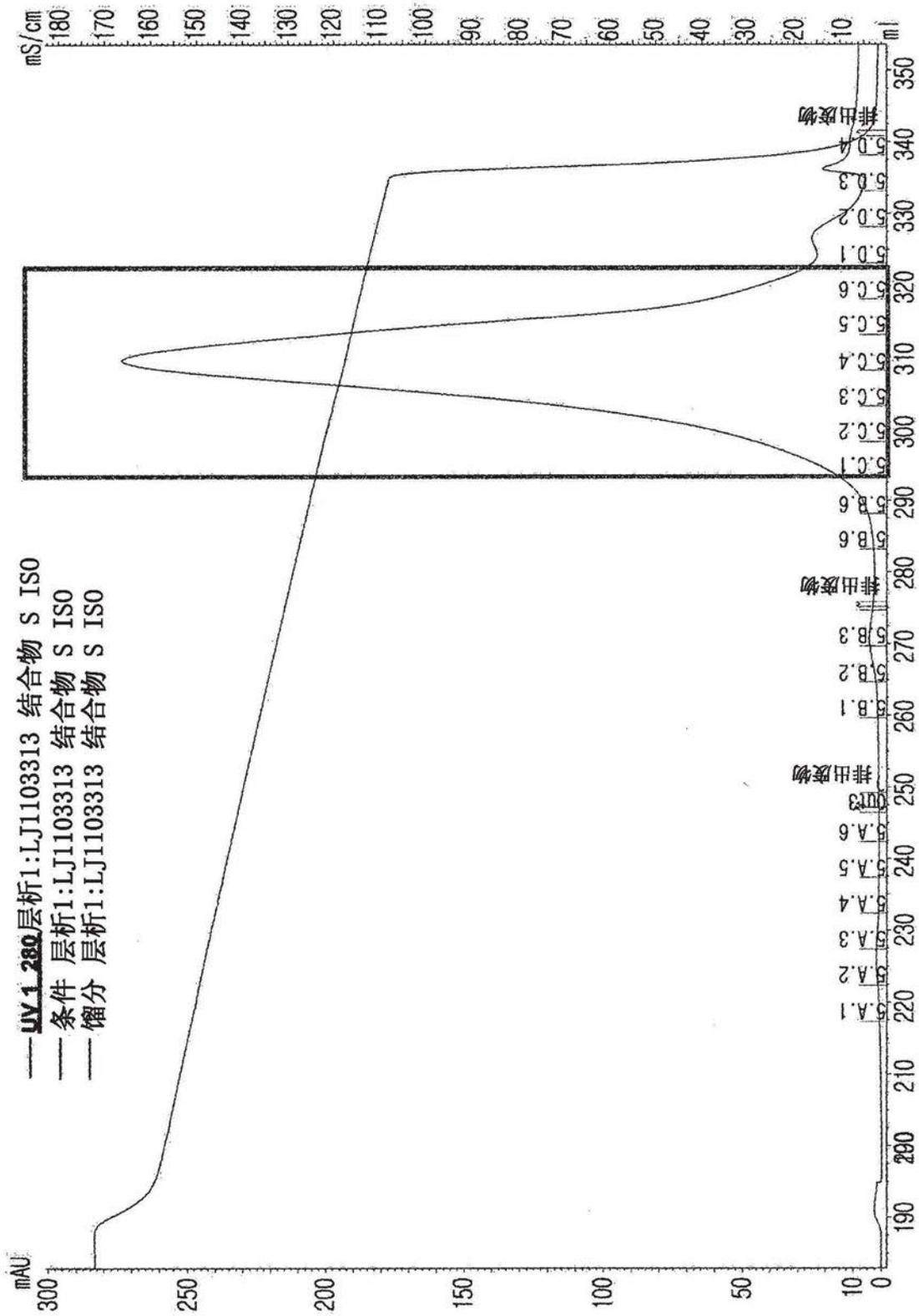


图8c

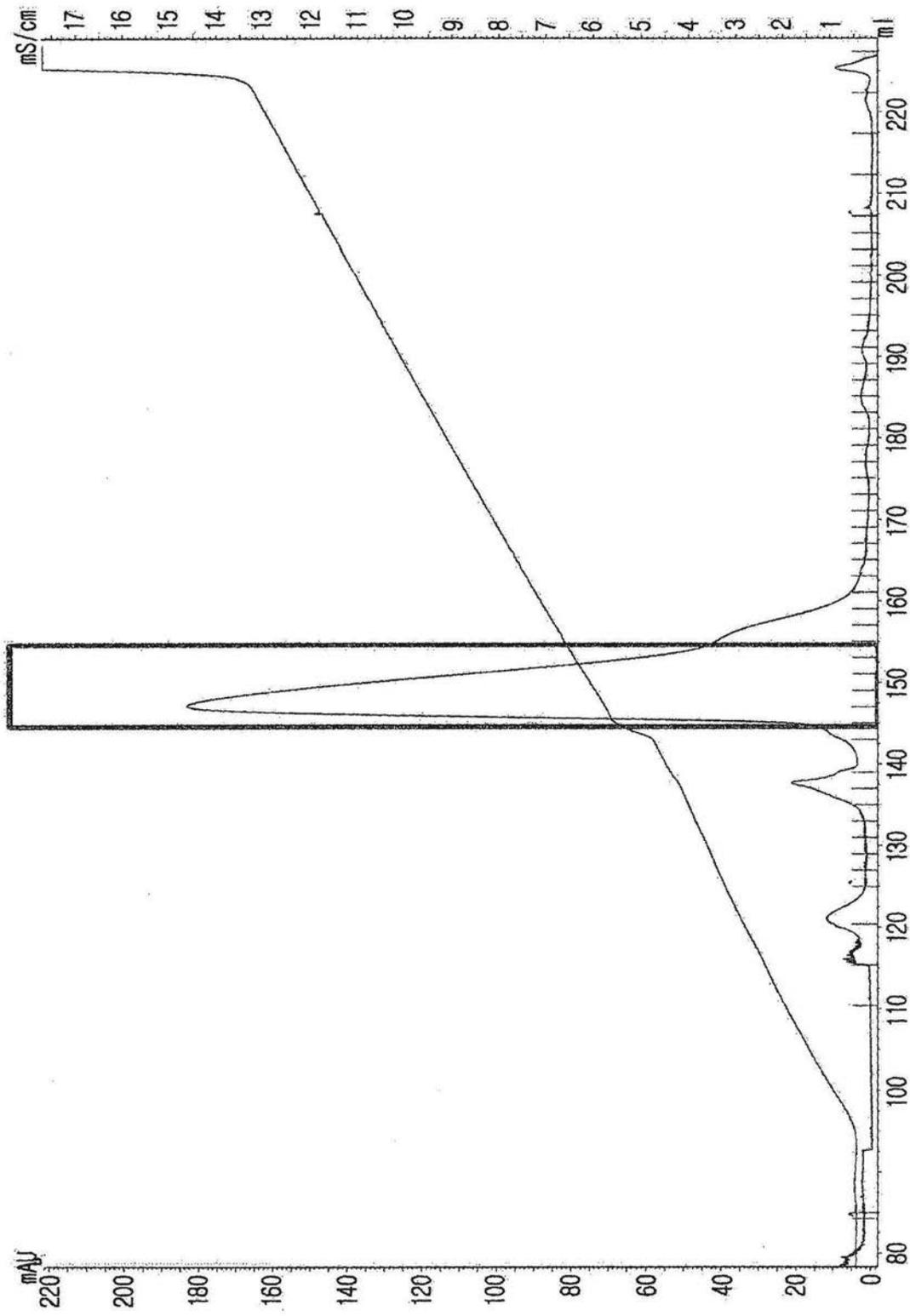


图9a

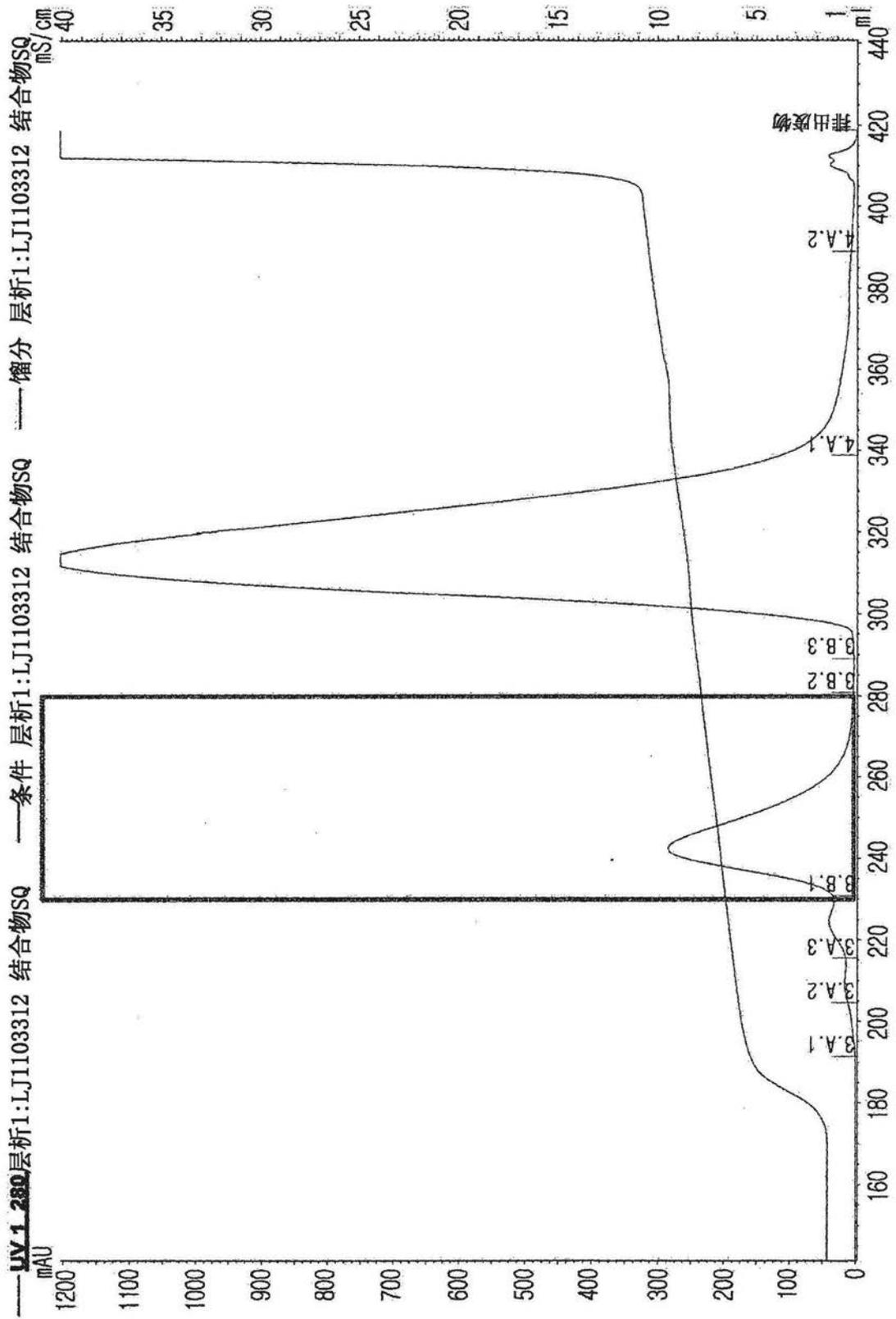


图9b

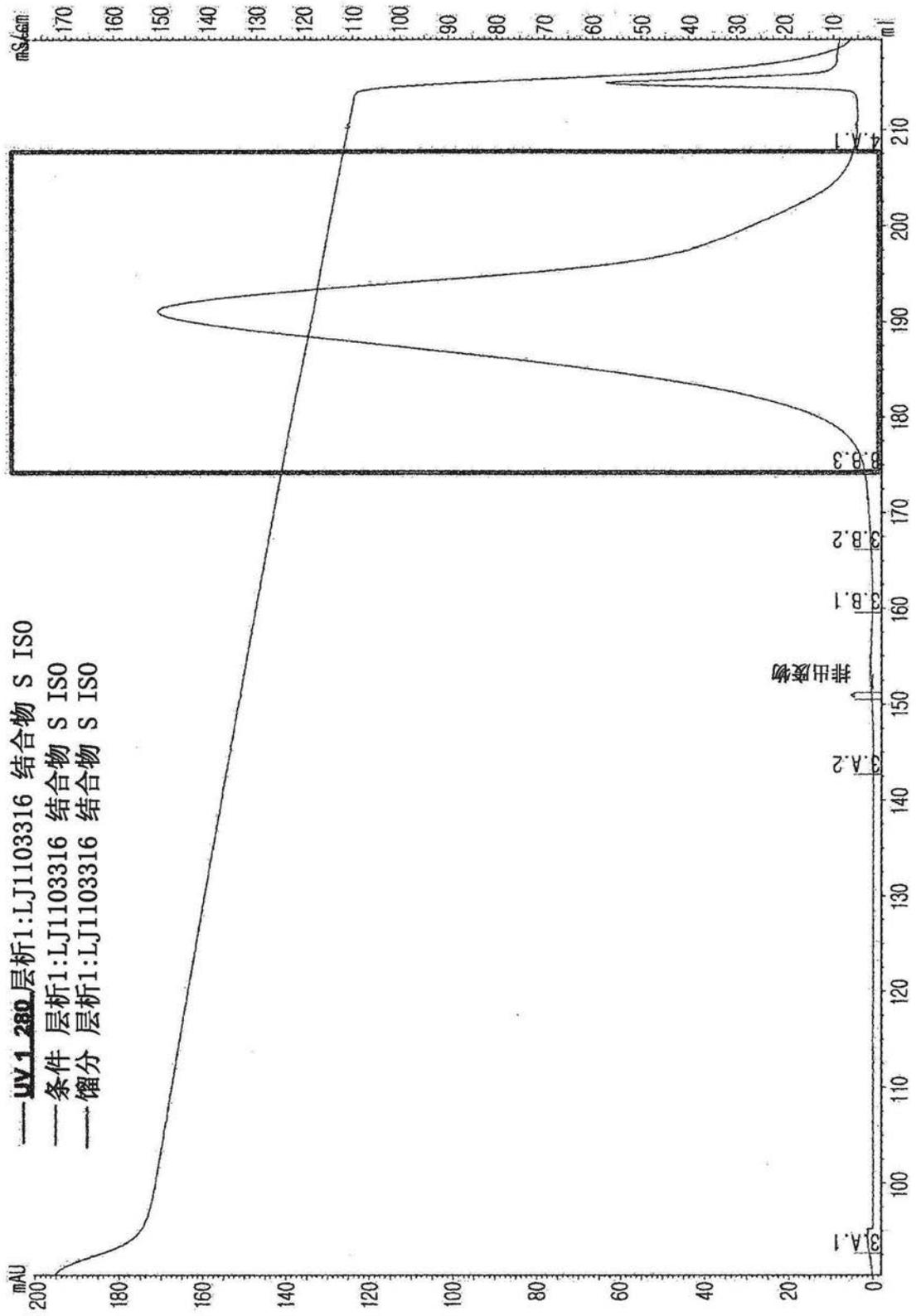


图9c

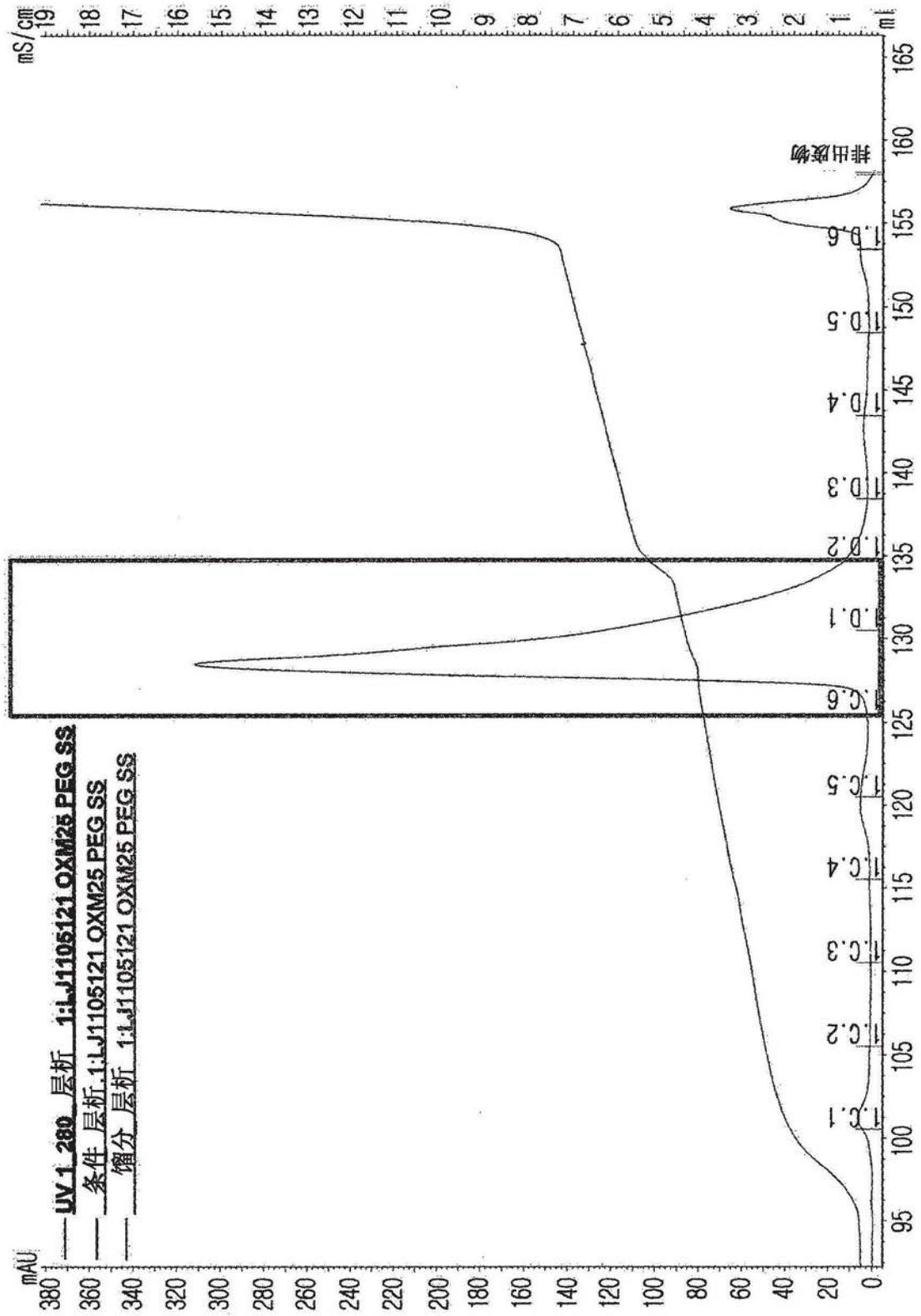


图10a

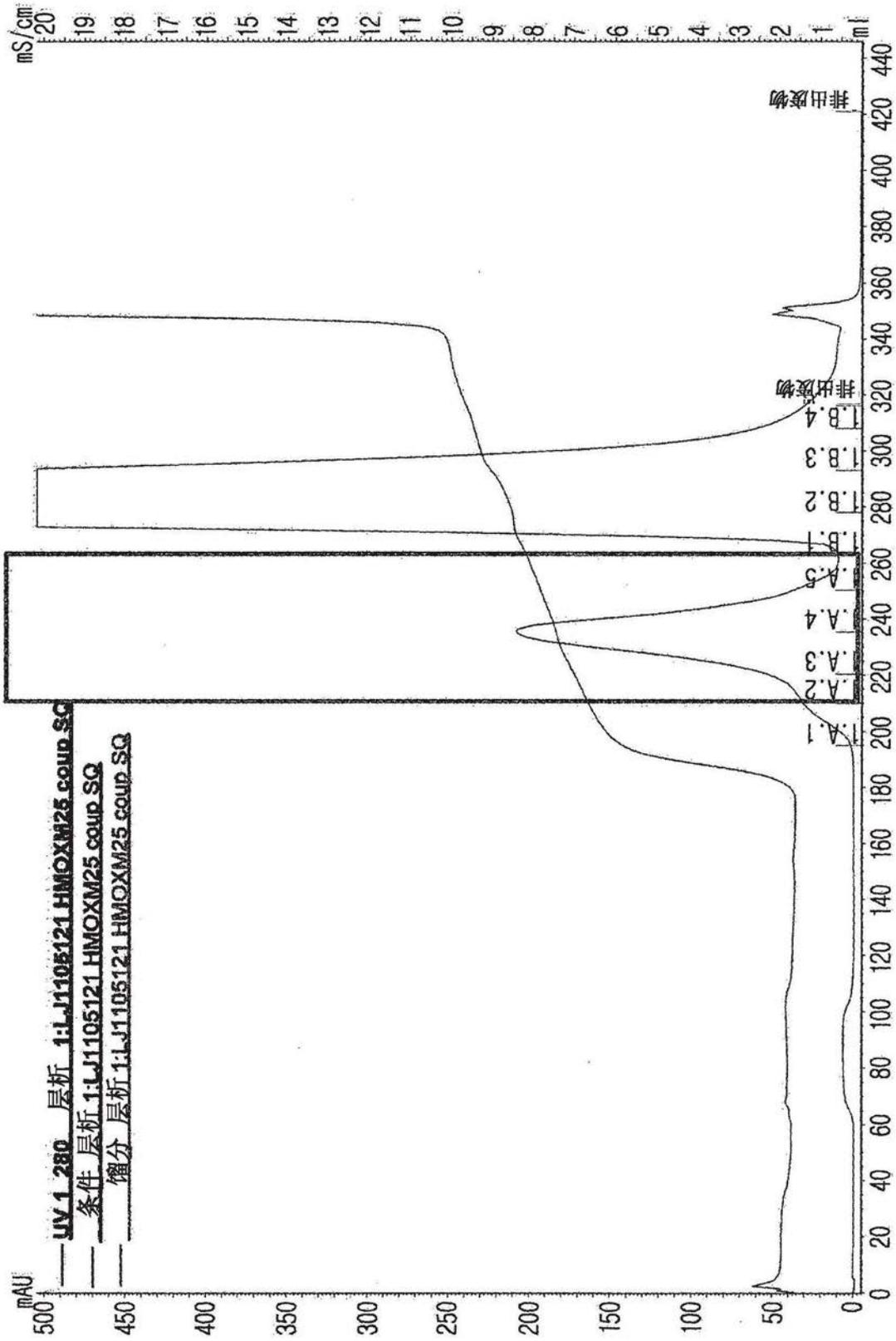


图10b

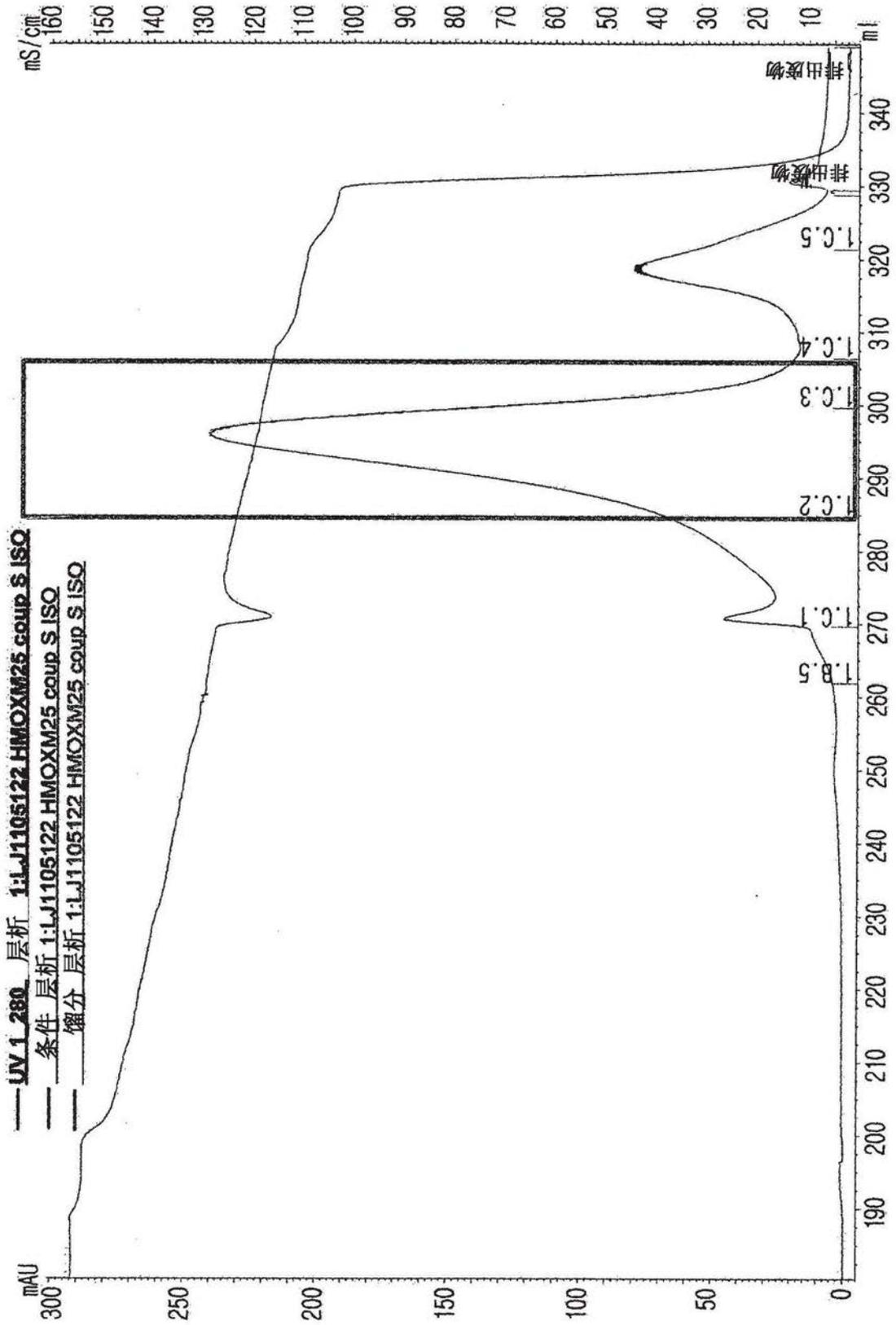


图10c

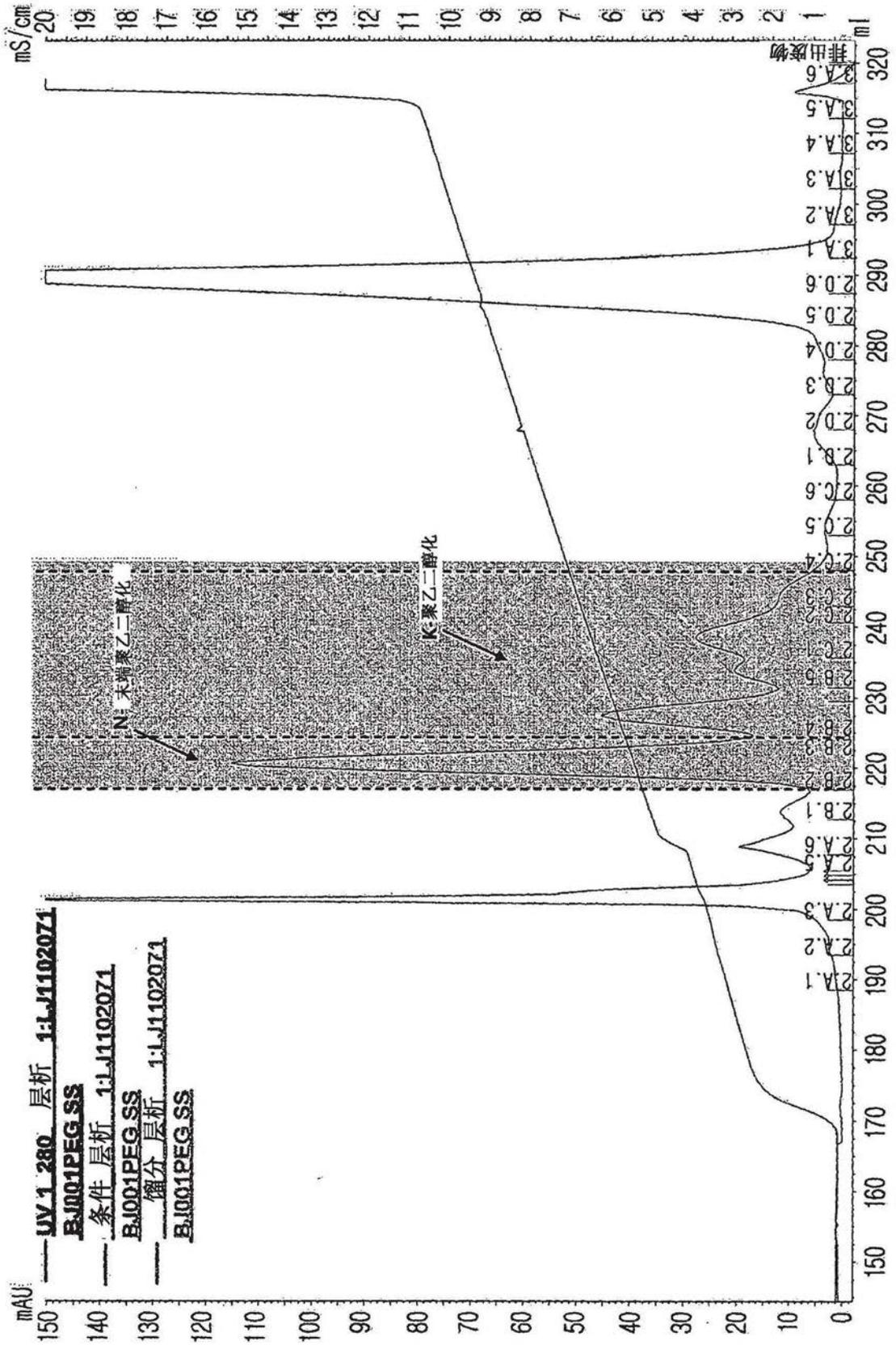


图11a

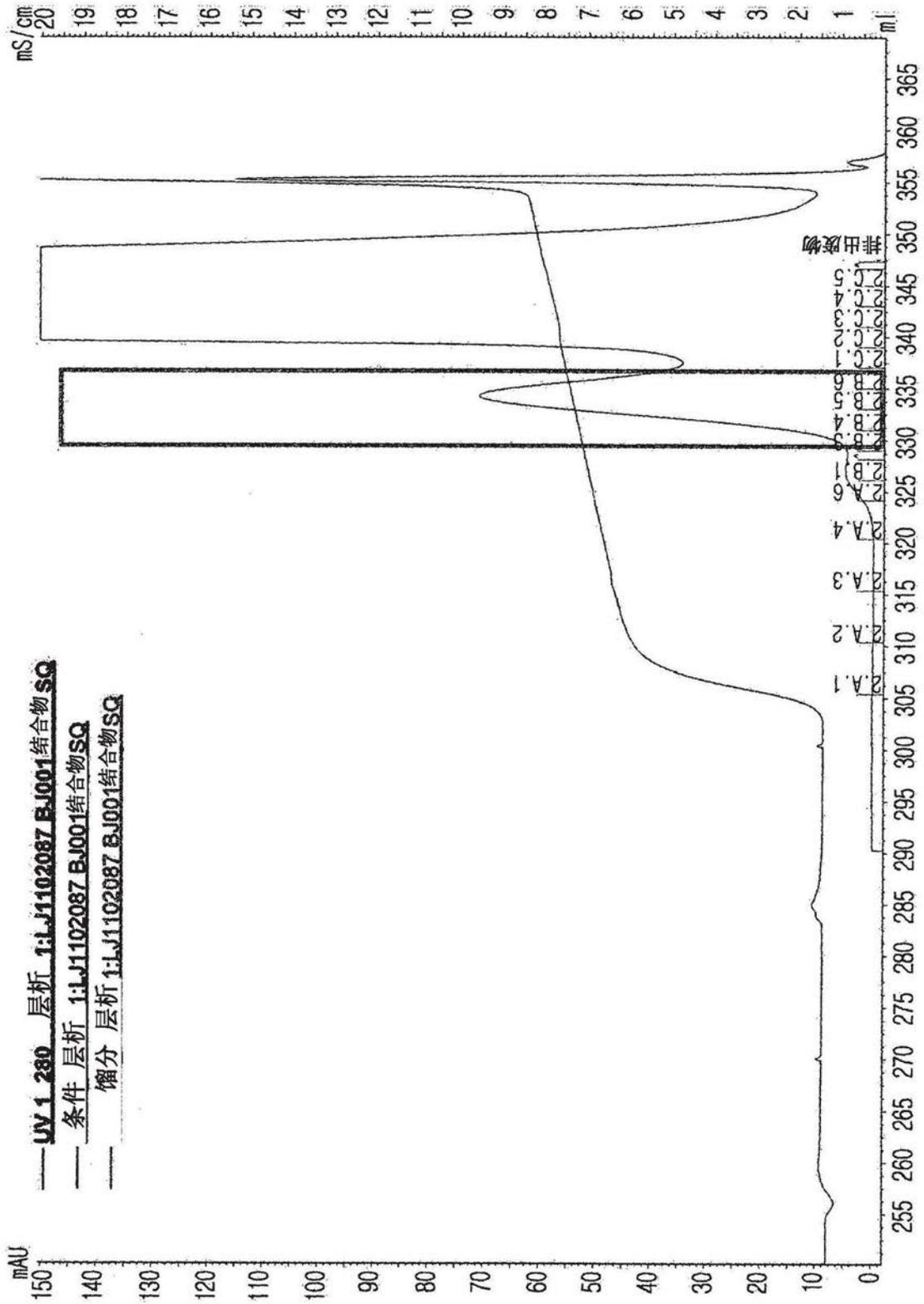


图11b

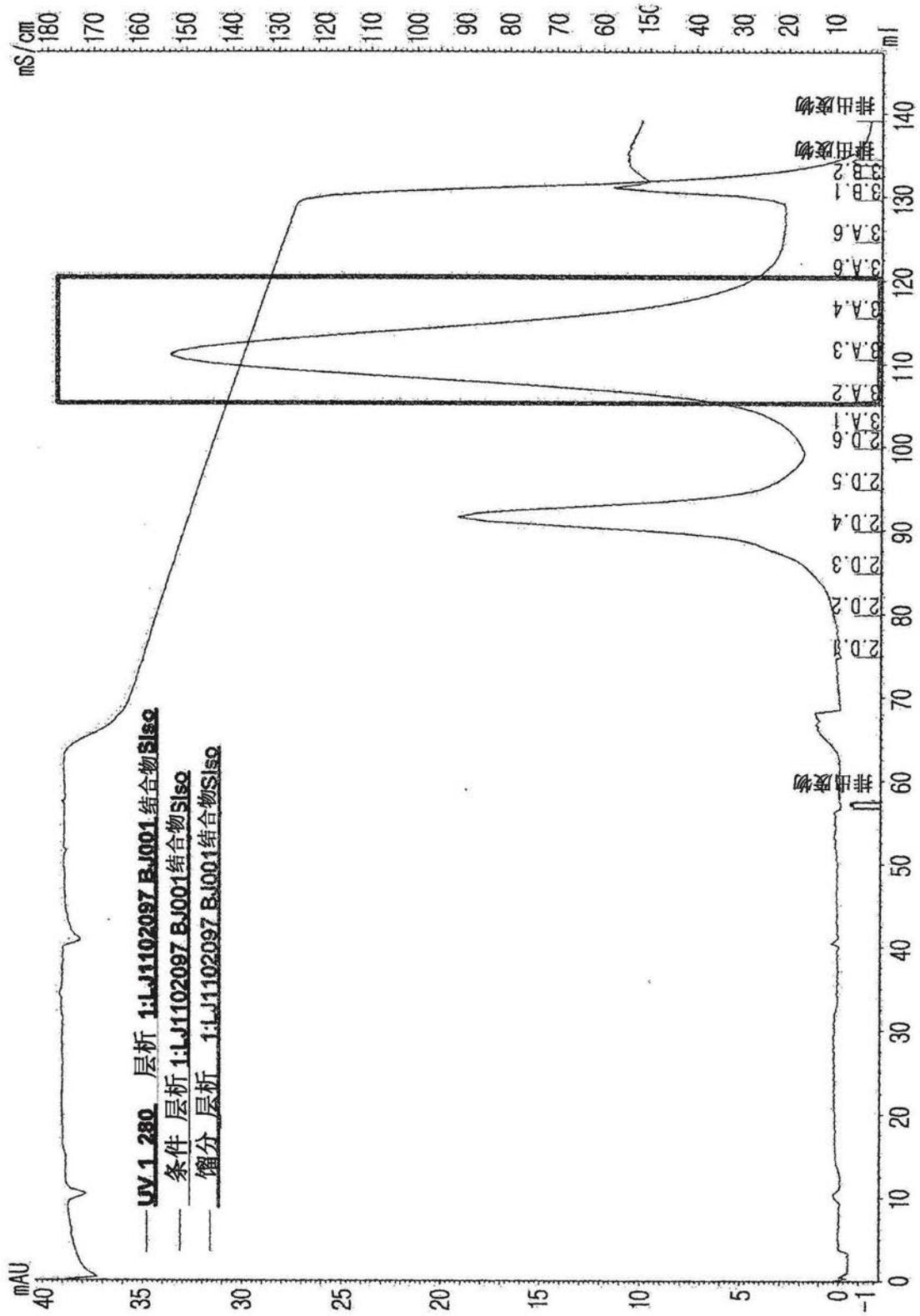
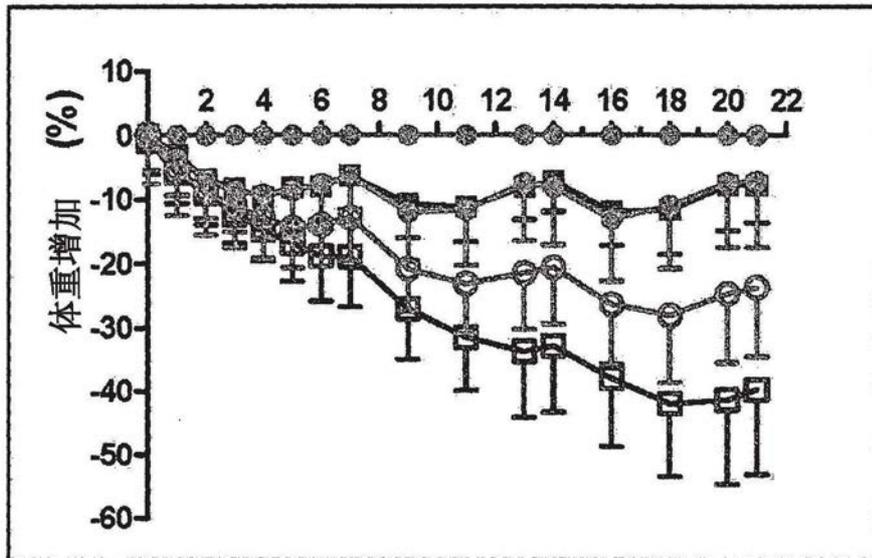


图11c



- 载体
- 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物23结合物 (0.03mg/kg)
- 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物23结合物 (0.06mg/kg)
- 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物24结合物 (0.03mg/kg)
- 免疫球蛋白Fc-泌酸调节肽衍生物24结合物 (0.06mg/kg)

图12

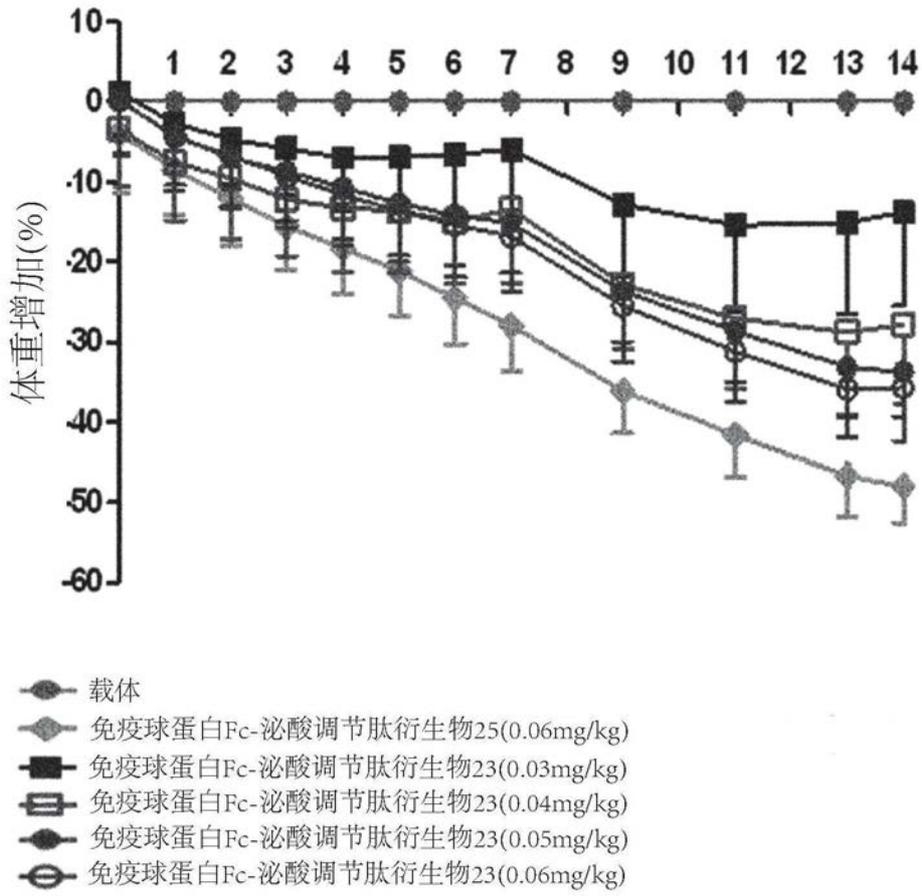


图13