



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114786706 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 22

(21) 申请号 202080083888.3

(22) 申请日 2020.10.05

(30) 优先权数据

10-2019-0123250 2019.10.04 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2020/013467 2020.10.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/066600 KO 2021.04.08

(71) 申请人 韩美药品株式会社

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 金正国 李钟锡 李雅揽 董主荣

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 丁秀云

(51) Int.Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

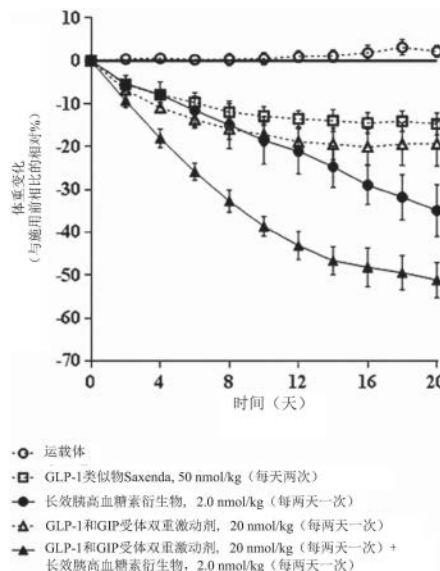
权利要求书3页 说明书37页
序列表30页 附图5页

(54) 发明名称

胰高血糖素、包含GLP-1受体和GIP受体双重激动剂的组合物、及其治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及：胰高血糖素衍生物；包含GLP-1受体和GIP受体双重激动剂的组合物；及其用途。



1. 用于预防或治疗代谢综合征的药物组合物,所述药物组合物包含(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂,其中

对所述胰高血糖素受体表现出活性的所述物质是肽,所述肽包括由以下式1代表的氨基酸序列:

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-WL-X27-X28-X29-X30(式1,SEQ ID NO:46)

其中X1是酪氨酸(Y);

X2是 α -甲基谷氨酸(α -甲基谷氨酸)、Aib(氨基异丁酸)、D-丙氨酸、甘氨酸(G)、Sar(N-甲基甘氨酸)、丝氨酸(S)、或D-丝氨酸;

X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C);

X10是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

X12是赖氨酸(K)或半胱氨酸(C);

X13是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

X14是亮氨酸(L)或半胱氨酸(C);

X15是天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、或半胱氨酸(C);

X16是谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、丝氨酸(S)、 α -甲基谷氨酸、或半胱氨酸(C)、或是不存在的;

X17是天冬氨酸(D)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、半胱氨酸(C)、或缬氨酸(V)、或是不存在的;

X18是丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、精氨酸(R)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)、或是不存在的;

X19是丙氨酸(A)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)、或是不存在的;

X20是赖氨酸(K)、组氨酸(H)、谷氨酰胺(Q)、天冬氨酸(D)、精氨酸(R)、 α -甲基谷氨酸、或半胱氨酸(C)、或是不存在的;

X21是天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)、或是不存在的;

X23是异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、或精氨酸(R)、或是不存在的;

X24是缬氨酸(V)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、半胱氨酸(C)、谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、 α -甲基谷氨酸、或亮氨酸(L)、或是不存在的;

X27是异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、丙氨酸(A)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、谷氨酰胺(Q)、或精氨酸(R)、或是不存在的;

X28是谷氨酰胺(Q)、赖氨酸(K)、天冬酰胺(N)、或精氨酸(R)、或是不存在的;

X29是苏氨酸(T);和

X30是半胱氨酸(C)、或是不存在的(条件是,当式1代表的氨基酸序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:12相同时,不包括在内)。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述肽是长效缀合物的形式,所述长效缀合物由以下化学式1代表:

[化学式1]

X-L-F

其中X是包括式1代表的所述氨基酸序列的肽；
L是含有乙二醇重复单元的连接体；
F是免疫球蛋白Fc区；并且
-代表X和L之间以及L和F之间通过共价键的连接。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物，其中
在式1中，

X2是Aib(氨基异丁酸)；
X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)；
X10是酪氨酸(Y)；
X12是赖氨酸(K)；
X13是酪氨酸(Y)；
X14是亮氨酸(L)或半胱氨酸(C)；
X15是天冬氨酸(D)；
X16是谷氨酸(E)或丝氨酸(S)；
X17是赖氨酸(K)、精氨酸(R)、或半胱氨酸(C)；
X18是精氨酸(R)；
X19是丙氨酸(A)或半胱氨酸(C)；
X20是谷氨酰胺(Q)或赖氨酸(K)；
X21是天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)；
X23是缬氨酸(V)；
X24是谷氨酰胺(Q)；
X27是甲硫氨酸(M)；
X28是天冬酰胺(N)；
X29是苏氨酸(T)；和
X30是半胱氨酸(C)。

4. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述肽包括选自SEQ ID NOs:7至11、13至25、27、29、31、33、和35至45的氨基酸序列。

5. 根据权利要求3所述的组合物，其中所述肽包括选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42、和44的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的组合物，其中每个氨基酸在式1中X10和X14、X12和X16、X16和X20、X17和X21、X20和X24、以及X24和X28中的至少一个氨基酸对中形成环。

7. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述肽的C-末端被酰胺化。

8. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述GLP-1和GIP受体双重激动剂是对GLP-1(胰高血糖素样肽-1)受体和GIP(葡萄糖依赖性促胰岛素多肽)受体表现出活性的肽。

9. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述GLP-1和GIP受体双重激动剂是选自泰瑞帕肽、NN9709、和SAR-438335中的一种或多种。

10. 根据权利要求2所述的组合物，其中L中乙二醇重复单元部分的化学式重量在1kDa至100kDa的范围内。

11. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述代谢综合征选自葡萄糖耐受不良、高胆固

醇血症、血脂障碍、肥胖症、糖尿病、高血压、肝病、血脂障碍引起的动脉硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、冠状动脉心脏病(冠心病)、和中风。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述肝病是选自单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪肝、肝脏炎症、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、胆汁淤积性肝病、肝纤维化、肝硬化、肝代偿失调、和肝细胞癌的至少一种疾病。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述胆汁淤积性肝病是选自原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、及其组合的任何一种。

14. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述肝病是由非酒精性脂肪性肝炎引起或伴有非酒精性脂肪性肝炎。

15. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物执行以下特性中的一个或多个:

- (a) 体重和脂肪重量减轻;
- (b) 改善血脂水平;
- (c) 改善胰岛素敏感性;
- (d) 降低UCP-1和PGC-1 α 基因表达;
- (e) 减少NAS (NAFLD活动评分);和
- (f) 减少肝组织中的胶原蛋白表达。

胰高血糖素、包含GLP-1受体和GIP受体双重激动剂的组合物、及其治疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包含表现胰高血糖素 (glucagon) 活性的化合物或物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物及其治疗用途。

背景技术

[0002] 近年来,随着经济发展和饮食习惯的改变,代谢综合征相关疾病包括诸如肥胖症、高脂血症、高血压、动脉硬化、高胰岛素血症、糖尿病或肝病的各种疾病发病率迅速增加。这些疾病可能单独发生,但通常彼此密切相关,并且在大多数情况下与各种症状一起发生。

[0003] 超重和肥胖症增加血压和胆固醇水平,这是诸如心脏病、糖尿病和关节炎的各种疾病发病或恶化的原因。此外,超重和肥胖症是儿童、青少年和成人动脉硬化、高血压、高脂血症或心脏病的发病率增加的主要因素。

[0004] 肥胖症是复杂的疾病,涉及食欲控制和能量代谢的作用机制,因此与食欲控制和能量代谢有关的异常作用机制的治疗方法需要同时进行,并且开发能够治疗异常作用机制的药物的努力仍在继续。通过这些努力,已经开发出了诸如利莫那班 (rimonabant) (赛诺菲-安万特)、西布曲明 (sibutramine) (雅培)、盐酸纳曲酮与盐酸安非他酮复方缓释片 (contrave) (武田)、奥利司他 (罗氏) 的抗肥胖症药物,但这些药物的缺点是显示出致命的副作用或对肥胖症的治疗效果不足。例如,据报道,利莫那班显示了中枢神经系统副作用,西布曲明和盐酸纳曲酮与盐酸安非他酮复方缓释片显示了心血管副作用,施用奥利司他一年时体重减轻作用仅约4kg。

[0005] 同时,包括肥胖症的代谢综合征增加了导致肝脏疾病的可能性。其实例包括代谢性肝病、脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、脂肪性肝炎和肝纤维化。这些肝病随着肥胖症和糖尿病人口的增加而增加,并且韩国的年发病率为约16%。肝病在早期阶段没有症状,并且只有在相当晚期才被发现,因此不仅在韩国,而且在全世界都是主要的死亡原因,因此迫切需要开发治疗肝病的药物。

[0006] 同时,当血糖由于药物治疗或疾病、激素或酶缺乏等原因开始下降时,胰高血糖素在胰腺中产生。胰高血糖素负责向肝脏发出信号,分解糖原以释放葡萄糖,并且将血糖水平提高到正常水平。然而,由于胰高血糖素在中性pH下的低溶解性和沉淀性,其作为治疗剂的使用已经受到限制。

[0007] 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) ——胰高血糖素衍生物——是在食物摄入刺激下从小肠分泌的激素,以血糖浓度依赖的方式促进从胰腺分泌胰岛素,并且抑制胰高血糖素分泌以帮助降低血糖水平。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 充当饱腹因子 (satiety factor) 以减缓胃肠道消化并且延迟消化食物的胃肠道穿过时间,以减少食物摄入。

[0008] 与GLP-1一样,GIP是因食物摄入而发生刺激时分泌的胃肠激素中的一种,是由小肠中K细胞分泌的42种氨基酸组成的激素并且起到以血糖浓度依赖的方式促进从胰腺分泌胰岛素,因而帮助降低血糖水平。已经报道了GIP的GLP-1活性增加作用、抗炎作用、改善脂

质代谢作用等。

[0009] 因此,正在积极进行通过利用GLP-1的血糖控制和体重减轻作用来开发糖尿病和肥胖症治疗剂的研究。然而,单独GLP-1显示HbA1c仅降低0.5%至1.8%,因此被认为适用于HbA1c为9%或更低的患者(Ther Adv Endocrinol Metab.2015Feb;6(1):3-18)。换句话说,由于单独施用GLP-1,可预期的血糖控制能力是有限的。

[0010] 因此,已经对能够同时激活GLP-1和GIP受体的双重激动剂进行了研究,并且此类双重激动剂的实例在WO 2013164483、WO 201611971、WO 2014192284等中描述。

[0011] 胰高血糖素、GLP-1和GIP受体双重激动剂通常已知具有相反的作用,并且已被用作对疾病的不同症状的治疗药物。换句话说,胰高血糖素、GLP-1和GIP受体双重激动剂在体内起着相反的作用,并且尚未报道同时施用这些药物的药物治疗。同时,当对患者施用与代谢综合征相关的各种治疗药物时,存在副作用如体重增加、服药过量和低血糖的风险。

发明内容

[0012] [技术问题]

[0013] 本发明的目的涉及用于预防或治疗代谢综合征的药物组合物,其包含对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。

[0014] 本发明的另一个目的是提供预防或治疗代谢综合征的方法,其包括向有需要的个体施用对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。

[0015] 本发明的又一个目的是提供对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂在预防或治疗代谢综合征中的用途。

[0016] [技术方案]

[0017] 体现本发明的一个方面是对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合的治疗用途。

[0018] 在一个实施方式中,本发明涉及组合物,其包含对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。

[0019] 在前述实施方式中,本发明涉及用于预防或治疗代谢综合征的药物组合物,其包含对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。

[0020] 在前述实施方式(一个或多个)中,对胰高血糖素受体表现出活性的物质是包括由以下式1表示的氨基酸序列的肽:

[0021] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-WL-X27-X28-X29-X30(式1,SEQ ID NO:46)

[0022] 其中X1是酪氨酸(Y);

[0023] X2是 α -甲基谷氨酸(α -甲基谷氨酸)、Aib(氨基异丁酸)、D-丙氨酸、甘氨酸(G)、Sar(N-甲基甘氨酸)、丝氨酸(S)、或D-丝氨酸;

[0024] X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C);

[0025] X10是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

[0026] X12是赖氨酸(K)或半胱氨酸(C);

[0027] X13是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

[0028] X14是亮氨酸(L)或半胱氨酸(C);

- [0029] X15是天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、或半胱氨酸(C)；
- [0030] X16是谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、丝氨酸(S)、 α -甲基谷氨酸或半胱氨酸(C)、或是不存在的；
- [0031] X17是天冬氨酸(D)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、半胱氨酸(C)、或缬氨酸(V)、或是不存在的；
- [0032] X18是丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、精氨酸(R)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)、或是不存在的；
- [0033] X19是丙氨酸(A)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)、或是不存在的；
- [0034] X20是赖氨酸(K)、组氨酸(H)、谷氨酰胺(Q)、天冬氨酸(D)、精氨酸(R)、 α -甲基谷氨酸、或半胱氨酸(C)、或是不存在的；
- [0035] X21是天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C)、或是不存在的；
- [0036] X23是异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、或精氨酸(R)、或是不存在的；
- [0037] X24是缬氨酸(V)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、半胱氨酸(C)、谷氨酸(E)、赖氨酸(K)、谷氨酰胺(Q)、 α -甲基谷氨酸、或亮氨酸(L)、或是不存在的；
- [0038] X27是异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、丙氨酸(A)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、谷氨酰胺(Q)、或精氨酸(R)、或是不存在的；
- [0039] X28是谷氨酰胺(Q)、赖氨酸(K)、天冬酰胺(N)、或精氨酸(R)、或是不存在的；
- [0040] X29是苏氨酸(T)；和
- [0041] X30是半胱氨酸(C)、或是不存在的(条件是,当式1表示的氨基酸序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:12相同时,不包括在内)。
- [0042] 在前述实施方式(一个或多个)中,肽是长效缀合物的形式,并且长效缀合物由以下化学式1表示:
- [0043] [化学式1]
- [0044] X-L-F
- [0045] 其中X是包括式1表示的氨基酸序列的肽;
- [0046] L是含有乙二醇重复单元的连接体;
- [0047] F是免疫球蛋白Fc区;并且
- [0048] -代表X和L之间以及L和F之间通过共价键的连接。
- [0049] 在前述实施方式(一个或多个)中,在式1中,
- [0050] X2是Aib(氨基异丁酸);
- [0051] X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)、或半胱氨酸(C);
- [0052] X10是酪氨酸(Y);
- [0053] X12是赖氨酸(K);
- [0054] X13是酪氨酸(Y);
- [0055] X14是亮氨酸(L)或半胱氨酸(C);
- [0056] X15是天冬氨酸(D);
- [0057] X16是谷氨酸(E)或丝氨酸(S);

- [0058] X17是赖氨酸(K)、精氨酸(R)、或半胱氨酸(C)；
- [0059] X18是精氨酸(R)；
- [0060] X19是丙氨酸(A)或半胱氨酸(C)；
- [0061] X20是谷氨酰胺(Q)或赖氨酸(K)；
- [0062] X21是天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)；
- [0063] X23是缬氨酸(V)；
- [0064] X24是谷氨酰胺(Q)；
- [0065] X27是甲硫氨酸(M)；
- [0066] X28是天冬酰胺(N)；
- [0067] X29是苏氨酸(T)；和
- [0068] X30是半胱氨酸(C)。
- [0069] 在前述实施方式(一个或多个)中,肽包括选自SEQ ID NOs:2至45的氨基酸序列。
- [0070] 在前述实施方式(一个或多个)中,肽包括选自SEQ ID NOs:7至11、13至25、27、29、31、33、和35至45的氨基酸序列。
- [0071] 在前述实施方式(一个或多个)中,肽包括选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42、和44的氨基酸序列。
- [0072] 在前述实施方式(一个或多个)中,每个氨基酸在式1中X10和X14、X12和X16、X16和X20、X17和X21、X20和X24、以及X24和X28的至少一个氨基酸对中形成环。
- [0073] 在前述实施方式(一个或多个)中,肽的C-末端被酰胺化。
- [0074] 在前述实施方式(一个或多个)中,GLP-1和GIP受体双重激动剂是对GLP-1(胰高血糖素样肽-1)受体和GIP(葡萄糖依赖性促胰岛素多肽)受体表现出活性的物质。
- [0075] 在前述实施方式(一个或多个)中,GLP-1和GIP受体双重激动剂是选自泰瑞帕肽(tirzepatide)、NN9709、和SAR-438335的一种或多种。
- [0076] 在前述实施方式(一个或多个)中,L中乙二醇重复单元部分的化学式重量在1kDa到100kDa的范围内。
- [0077] 在前述实施方式(一个或多个)中,代谢综合征选自葡萄糖耐受不良、高胆固醇血症、血脂障碍、肥胖症、糖尿病、高血压、肝病、血脂障碍引起的动脉硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、冠状动脉心脏病(冠心病)、和中风。
- [0078] 在前述实施方式(一个或多个)中,肝病是选自单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪肝、肝脏炎症、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、胆汁淤积性肝病、肝纤维化、肝硬化、肝代偿失调、和肝细胞癌的至少一种疾病。
- [0079] 在前述实施方式(一个或多个)中,胆汁淤积性肝病是选自原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、及其组合的任何一种。
- [0080] 在前述实施方式(一个或多个)中,肝病是由非酒精性脂肪性肝炎引起或伴有非酒精性脂肪性肝炎。
- [0081] 在前述实施方式(一个或多个)中,组合物执行以下特性中的一个或多个：
- [0082] (a) 体重和脂肪重量减轻；
- [0083] (b) 改善血脂水平；
- [0084] (c) 改善胰岛素敏感性；

[0085] (d) 降低UCP-1和PGC-1 α 基因表达;

[0086] (e) 减少NAS (NAFLD活动评分); 和

[0087] (f) 减少肝组织中胶原蛋白的表达。

[0088] 体现本发明的另一方面是用于预防或治疗代谢综合征的药物试剂盒(药盒, pharmaceutical kit), 其包括对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂; 或包含这些的组合物。

[0089] 体现本发明的又一方面是用于预防或治疗代谢综合征的方法, 其包括给需要其的个体施用对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1及GIP受体双重激动剂; 或包含这些物质的组合物施用。

[0090] 体现本发明的又一方面是对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂; 或包含这些的组合物用于预防或治疗代谢综合征的用途。

[0091] 体现本发明的又一方面是对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂; 或包含这些的组合物, 用于制备用于预防或治疗代谢综合征的药物的用途。

[0092] [有益效果]

[0093] 根据本发明的对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合施用可有效地用于预防或治疗代谢综合征, 包括肥胖症、糖尿病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、以及与其相关的肝病。

附图说明

[0094] 图1是通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和泰瑞帕肽(GLP-1和GIP受体双重激动剂), 确认体重变化的结果;

[0095] 图2(A)和图2(B)分别是通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和泰瑞帕肽(GLP-1和GIP受体双重激动剂), 确认脂肪重量和血脂降低的结果;

[0096] 图3(A)和图3(B)分别是通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和泰瑞帕肽(GLP-1和GIP受体双重激动剂), 确认胰岛素敏感性以及UCP-1和PGC-1 α 基因表达增加的结果;

[0097] 图4是通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和泰瑞帕肽(GLP-1和GIP受体双重激动剂), 确认NAS (NAFLD活动评分) 变化的结果; 和

[0098] 图5是通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和泰瑞帕肽(GLP-1和GIP受体双重激动剂), 确认肝组织中胶原表达减少的结果。

[0099] 下面将描述用于实施本发明的具体细节。本公开中公开的每个描述和实施方式也可以应用于其他描述和实施方式。也就是说, 本公开中公开的各种元素的所有组合都落入本发明的范围。进一步, 本发明的范围不受以下具体描述的限制。

[0100] 进一步, 本领域技术人员将认识到本文所述本发明具体方面的许多等效物, 或仅使用常规实验就能够确定其。进一步, 这些等同物应被解释为属于本发明的范围。

[0101] 贯穿这个说明书, 不仅使用用于自然存在的氨基酸的常规的单字母和三字母代码, 而且使用通常接受的用于其它氨基酸(如Aib(α -氨基异丁酸)和Sar(N-甲基甘氨酸))的三字母代码。根据IUPAC-IUB命名法本文通过缩写提到的氨基酸也被描述。

[0102] 丙氨酸A 精氨酸R

- [0103] 天冬酰胺N 天冬氨酸D
[0104] 半胱氨酸C 谷氨酸E
[0105] 谷氨酰胺Q 甘氨酸G
[0106] 组氨酸H 异亮氨酸I
[0107] 亮氨酸L 赖氨酸K
[0108] 甲硫氨酸M 苯丙氨酸F
[0109] 脯氨酸P 丝氨酸S
[0110] 苏氨酸T 色氨酸W
[0111] 酪氨酸Y 缬氨酸V

[0112] 体现本发明的一个方面提供了对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合的治疗用途。

[0113] 具体地,本发明的一个方面提供了一种组合物,其包含对胰高血糖素受体表现出活性的物质;以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。在一个实施方式中,提供了用于预防或治疗代谢综合征的药物组合物。

[0114] 包含(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质,和(ii)本发明的GLP-1和GIP受体双重激动剂的药物组合物可以是形式a),其中(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质;和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂可作为混合物施用;或

[0115] 形式b),其中(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质;和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂可以单独形式施用,但不限于此。

[0116] 例如,对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂可配制为一种制剂,或单独配制。当对胰高血糖素受体表现出活性的物质;以及GLP-1和GIP受体双重激动剂为单独的形式时,对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂可配制为单独的制剂,并且同时、单独、顺序或以相反顺序施用。

[0117] 在本发明中,组合施用不仅意味着同时施用,而且还被理解为一种剂型,其中对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂共同作用于个体,从而这些中的每种都可以以等于或高于其预期功能的水平发挥功能。因此,如本文所用,术语“组合施用”被理解为指对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的同时、单独、顺序或反向施用。当施用顺序为连续、反向施用或单独施用时,施用顺序不受特别限制,但要求第二组分的施用间隔使得不失去组合施用的有益效果。

[0118] 对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂,或包含本发明的这些的组合物可以试剂盒的形式提供,但不限于此。如本文所用,术语“试剂盒”可包括根据本发明的组合物,用于组合施用对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。具体地,根据本发明的试剂盒可包含配制为一种制剂的对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂,或对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的单独制剂,并且可另外包含两种物质组合施用所需的物质,但不限于此。

[0119] 对胰高血糖素受体表现出活性的物质包括对胰高血糖素受体表现出显著活性水平的各种物质,例如化合物或肽形式的物质。

[0120] 尽管不特别限于此,然而对胰高血糖素受体表现出显著活性水平的物质不仅是天

然胰高血糖素,还可以是表现出对胰高血糖素受体的体外活性为相应受体的天然配体(天然胰高血糖素)的体外活性的0.1%或更多、1%或更多、2%或更多、3%或更多、4%或更多、5%或更多、6%或更多、7%或更多、8%或更多、9%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、或100%或更多的物质。

[0121] 对胰高血糖素受体表现出活性的物质的实例包括天然胰高血糖素、其激动剂或其衍生物,但不特别限于此。

[0122] 根据本发明的胰高血糖素衍生物包括与天然胰高血糖素相比在氨基酸序列上具有一个或多个差异的肽、其中天然胰高血糖素序列通过修饰被修饰的肽、能够像天然胰高血糖素一样激活胰高血糖素受体的天然胰高血糖素模拟物。例如,天然胰高血糖素的衍生物是其中一个或多个氨基酸从天然胰高血糖素突变的衍生物,并且突变可以选自取代、添加、缺失、修饰及其任何组合的突变,但不特别限于此。

[0123] 这种胰高血糖素衍生物可相对于天然胰高血糖素具有改变的pI,以表现出改善的物理特性。胰高血糖素衍生物可表现出改善的溶解性,同时保持激活胰高血糖素受体的活性,但不限于此。

[0124] 胰高血糖素衍生物可以是非自然存在的胰高血糖素衍生物。

[0125] 天然胰高血糖素可能具有以下氨基酸序列:

[0126] His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO:1)。

[0127] 如本文所用,术语“等电点”或“pI”指某一分子(如多肽或肽)中没有净电荷(0)时的pH值。对于存在各种带电官能团的多肽,这些电荷在pI处的总和为零。当pH高于pI时,多肽的总净电荷将为负,并且当pH值低于pI时,多肽的总净电荷将为正。

[0128] 可通过在由聚丙烯酰胺、淀粉或琼脂糖组成的固定pH梯度凝胶上进行的等电电泳,或通过例如在ExPASy服务器上使用pI/MW工具(http://expasy.org/tools/pi_tool.html;Gasteiger et al.,2003)从氨基酸序列估计pI来确定pI。

[0129] 如本文所用,术语“改变的pI”意指天然胰高血糖素的氨基酸序列中的一些序列被带负电荷和带正电荷的氨基酸残基取代,以具有不同于天然胰高血糖素pI的pI,即,比天然胰高血糖素的pI减少或增加的pI。具有这种改变的pI的肽可以作为胰高血糖素衍生物在中性pH下表现出改善的溶解性和/或高稳定性。然而,肽并不特别限于此。

[0130] 更具体地,胰高血糖素衍生物可以具有改变的pI值而不是天然胰高血糖素的pI值(6.8),更具体地,pI值小于6.8,具体地是6.7或更小,更具体地是6.5或更小,以及pI值具体地大于6.8、7或更大,更具体地7.5或更大,但不限于此。只要胰高血糖素衍生物具有不同于天然胰高血糖素的pI值,它就包括在本发明的范围内。具体地,只要胰高血糖素衍生物具有不同于天然胰高血糖素的pI值,它就特别地包括在本发明的范围内,因此在中性pH下与天然胰高血糖素相比表现出改善的溶解性,并且因此其聚集度低。

[0131] 更具体地,胰高血糖素衍生物的pI值可以是4到6.5、和/或7到9.5,更具体地7.5到9.5,更具体地8.0到9.3,但不限于此。在这种情况下,胰高血糖素衍生物的pI高于或低于天然胰高血糖素的pI,并且因此在中性pH下与天然胰高血糖素相比,胰高血糖素衍生物可能表现出改善的溶解性和更高的稳定性。然而,胰高血糖素衍生物不限于此。

[0132] 具体地,天然胰高血糖素的衍生物可以通过对天然胰高血糖素中的一些氨基酸的取代、添加、缺失或修饰中的任何一种方法或这些方法的任何组合进行修饰。

[0133] 通过这些方法的组合制备的胰高血糖素衍生物的实例包括具有不同于天然胰高血糖素的氨基酸序列的一个或多个氨基酸序列、N-末端氨基酸残基处的脱氨基、和激活胰高血糖素受体的功能的肽,但不限于此。应用于本发明的天然胰高血糖素衍生物可通过组合各种制备衍生物的方法来制备。

[0134] 用于制备天然胰高血糖素衍生物的此类修饰包括使用L-氨基酸或D-氨基酸、和/或非自然氨基酸的所有修饰;和/或天然序列的修饰,例如,侧链官能团的修饰和分子内共价键的修饰(如链间环形成)、甲基化、酰化、泛素化、磷酸化、氨基己基化(aminohexylation)和生物素化。这些修饰包括用非自然化合物的所有取代。

[0135] 修饰包括其中将一个或多个氨基酸添加到天然胰高血糖素的氨基和/或羧基末端的所有修饰。

[0136] 作为取代或添加的氨基酸,不仅可以使人类蛋白质中常见的20种氨基酸,还可以使用非典型氨基酸或非自然发生的氨基酸。非典型氨基酸的商业来源包括Sigma-Aldrich、ChemPep和Genzyme Pharmaceuticals。包括这些氨基酸和典型肽序列的肽可由商业肽合成公司例如美国的美国肽公司或Bachem或韩国的Anygen合成并且从其购买。

[0137] 也可以以相同的方式产生氨基酸衍生物,并且仅举几个实例,可以使用4-咪唑乙酸和类似物。

[0138] 胰高血糖素的pI为约7,因此不溶于生理pH(pH 4至pH 8)下的溶液,并且倾向于在中性pH下沉淀。在pH 3或更低的水溶液中,胰高血糖素最初溶解,但由于凝胶形成,在1小时内沉淀。凝胶化胰高血糖素主要由 β -片状原纤维组成,并且因此沉淀的胰高血糖素不适合用作注射剂,因为在静脉施用或通过针头施用时,凝胶堵塞血管。为了延迟沉淀过程,通常使用酸性(pH 2至pH 4)配方,这可以使胰高血糖素在短时间内保持相对非聚集状态。然而,由于胰高血糖素的原纤维形成在低pH值下发生非常迅速,因此需要在制备后立即注射这种酸性制剂。

[0139] 对本发明的胰高血糖素受体表现出活性的物质是胰高血糖素衍生物,并且包括通过取代带负电荷和带正电荷的氨基酸残基来改变天然胰高血糖素的pI,从而开发出具有扩展作用谱(extended action profile)的胰高血糖素衍生物。与中性pH下的天然胰高血糖素相比,这些衍生物具有改变的pI,并且因此可能表现出改善的溶解性和/或更高的稳定性。

[0140] 作为一个具体方面,胰高血糖素衍生物,其为对本发明的胰高血糖素受体表现出活性的物质,可以是包括下式1表示的氨基酸序列的肽。

[0141] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-WL-X27-X28-X29-X30(式1,SEQ ID NO:46)

[0142] 在式1中,

[0143] X1可以是酪氨酸;

[0144] X2可以是 α -甲基谷氨酸、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;

[0145] X7可以是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸;

- [0146] X10可以是酪氨酸、或半胱氨酸；
- [0147] X12可以是赖氨酸、或半胱氨酸；
- [0148] X13可以是酪氨酸、或半胱氨酸；
- [0149] X14可以是亮氨酸、或半胱氨酸；
- [0150] X15可以是天冬氨酸、谷氨酸、或半胱氨酸；
- [0151] X16可以是谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、 α -甲基谷氨酸、半胱氨酸、或是不存在的；
- [0152] X17可以是天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸、或是不存在的；
- [0153] X18可以是丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的；
- [0154] X19可以是丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的；
- [0155] X20可以是赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸、 α -甲基谷氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的；
- [0156] X21可以是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的；
- [0157] X23可以是异亮氨酸、缬氨酸、或精氨酸、或是不存在的；
- [0158] X24可以是缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、 α -甲基谷氨酸、或亮氨酸、或是不存在的；
- [0159] X27可以是异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、或精氨酸、或是不存在的；
- [0160] X28可以是谷氨酰胺、赖氨酸、天冬酰胺、或精氨酸、或是不存在的；
- [0161] X29可以是苏氨酸；和
- [0162] X30可以是半胱氨酸、或是不存在的（条件是，当式1代表的氨基酸序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:12相同时，不包括在内）。
- [0163] 在式1中，
- [0164] X1可以是酪氨酸；
- [0165] X2可以是丝氨酸、或Aib(氨基异丁酸)；
- [0166] X7可以是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸；
- [0167] X10可以是酪氨酸、或半胱氨酸；
- [0168] X12可以是赖氨酸、或半胱氨酸；
- [0169] X13可以是酪氨酸、或半胱氨酸；
- [0170] X14可以是亮氨酸、或半胱氨酸；
- [0171] X15可以是天冬氨酸、或半胱氨酸；
- [0172] X16可以是谷氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；
- [0173] X17可以是天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸；
- [0174] X18可以是天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、或半胱氨酸；
- [0175] X19可以是丙氨酸、或半胱氨酸；
- [0176] X20可以是谷氨酰胺、天冬氨酸、赖氨酸、或半胱氨酸；
- [0177] X21可以是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸；
- [0178] X23可以是异亮氨酸、缬氨酸、或精氨酸；

- [0179] X24可以是缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、或亮氨酸；
- [0180] X27可以是异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、或精氨酸；
- [0181] X28可以是谷氨酰胺、赖氨酸、天冬酰胺、或精氨酸；
- [0182] X29可以是苏氨酸；和
- [0183] X30可以是半胱氨酸或是不存在的，但胰高血糖素衍生物不限于此（条件是，当式1代表的氨基酸序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:12相同时，不包括在内）。
- [0184] 例如，肽可包括选自SEQ ID NOs:7至11、SEQ ID NOs:13至25、SEQ ID NOs:27、29、31、33、和SEQ ID NOs:35至45的氨基酸序列，并且具体地（实质上）可以由选自SEQ ID NOs:7至11、SEQ ID NOs:13至25、SEQ ID NOs:27、29、31、33、和SEQ ID NOs:35至45的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0185] 在式1中，
- [0186] X2可以是Aib（氨基异丁酸）；
- [0187] X7可以是苏氨酸（T）、缬氨酸（V）、或半胱氨酸（C）；
- [0188] X10可以是酪氨酸（Y）；
- [0189] X12可以是赖氨酸（K）；
- [0190] X13可以是酪氨酸（Y）；
- [0191] X14可以是亮氨酸（L）或半胱氨酸（C）；
- [0192] X15可以是天冬氨酸（D）；
- [0193] X16可以是谷氨酸（E）或丝氨酸（S）；
- [0194] X17可以是赖氨酸（K）、精氨酸（R）、或半胱氨酸（C）；
- [0195] X18可以是精氨酸（R）；
- [0196] X19可以是丙氨酸（A）或半胱氨酸（C）；
- [0197] X20可以是谷氨酰胺（Q）或赖氨酸（K）；
- [0198] X21可以是天冬氨酸（D）或谷氨酸（E）；
- [0199] X23可以是缬氨酸（V）；
- [0200] X24可以是谷氨酰胺（Q）；
- [0201] X27可以是甲硫氨酸（M）；
- [0202] X28可以是天冬酰胺（N）；
- [0203] X29可以是苏氨酸（T）；和
- [0204] X30可以是半胱氨酸（C），但胰高血糖素衍生物不限于此。
- [0205] 例如，肽可包括选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42和44的氨基酸序列，并且具体地可以（主要）由选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、35、38、40、41、42和44的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0206] 具体地，肽可包括选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、37、38和44的氨基酸序列，并且具体地可以（主要）由选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、37、38和44的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0207] 在式1中，
- [0208] X1可以是酪氨酸；
- [0209] X2可以是丝氨酸或Aib（氨基异丁酸）；

- [0210] X7可以是半胱氨酸、苏氨酸、或缬氨酸；
- [0211] X10可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0212] X12可以是赖氨酸或半胱氨酸；
- [0213] X13可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0214] X14可以是亮氨酸或半胱氨酸；
- [0215] X15可以是天冬氨酸或半胱氨酸；
- [0216] X16可以是谷氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；
- [0217] X17可以是谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸；
- [0218] X18可以是精氨酸或半胱氨酸；
- [0219] X19可以是丙氨酸或半胱氨酸；
- [0220] X20可以是谷氨酰胺或赖氨酸；
- [0221] X21可以是天冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸；
- [0222] X23可以是缬氨酸；
- [0223] X24可以是缬氨酸或谷氨酰胺；
- [0224] X27可以是甲硫氨酸；
- [0225] X28可以是天冬酰胺或精氨酸；
- [0226] X29可以是苏氨酸；和
- [0227] X30可以是半胱氨酸、或是不存在的，但胰高血糖素衍生物不限于此。
- [0228] 例如，肽可包括选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NOs:13至17、SEQ ID NOs:19至27、SEQ ID NOs:29、31、33、和SEQ ID NOs:35至45的氨基酸序列，并且具体地可以（主要）由选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NOs:13至17、SEQ ID NOs:19至27、SEQ ID NOs:29、31、33、和SEQ ID NOs:35至45的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0229] 在式1中，
- [0230] X1可以是酪氨酸；
- [0231] X2可以是Aib(氨基异丁酸)；
- [0232] X7可以是半胱氨酸、苏氨酸、或缬氨酸；
- [0233] X10可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0234] X12可以是赖氨酸；
- [0235] X13可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0236] X14可以是亮氨酸或半胱氨酸；
- [0237] X15可以是天冬氨酸或半胱氨酸；
- [0238] X16可以是谷氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；
- [0239] X17可以是赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸；
- [0240] X18可以是精氨酸或半胱氨酸；
- [0241] X19可以是丙氨酸或半胱氨酸；
- [0242] X20可以是谷氨酰胺或赖氨酸；
- [0243] X21可以是天冬氨酸、谷氨酸、或半胱氨酸；
- [0244] X23可以是缬氨酸；
- [0245] X24可以是谷氨酰胺；

- [0246] X27可以是甲硫氨酸；
- [0247] X28可以是天冬酰胺或精氨酸；
- [0248] X29可以是苏氨酸；和
- [0249] X30可以是半胱氨酸、或是不存在的，但胰高血糖素衍生物不限于此。
- [0250] 例如，肽可包括选自SEQ ID NOs:11、14、17、SEQ ID NOs:19至25、SEQ ID NOs:27、29、31、33、和SEQ ID NOs:35至44的氨基酸序列，并且具体地可以(主要)由选自SEQ ID NOs:11、14、17、SEQ ID NOs:19至25、SEQ ID NOs:27、29、31、33、和SEQ ID NOs:35至44的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0251] 在式1中，
- [0252] X1可能是酪氨酸；
- [0253] X2可以是丝氨酸或Aib(氨基异丁酸)；
- [0254] X7可能是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸；
- [0255] X10可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0256] X12可以是赖氨酸或半胱氨酸；
- [0257] X13可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0258] X14可以是亮氨酸或半胱氨酸；
- [0259] X15可以是天冬氨酸或半胱氨酸；
- [0260] X16可以是谷氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；
- [0261] X17可以是天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸；
- [0262] X18可以是天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、或半胱氨酸；
- [0263] X19可以是丙氨酸或半胱氨酸；
- [0264] X20可以是谷氨酰胺、天冬氨酸、或赖氨酸；
- [0265] X21可以是天冬氨酸或谷氨酸；
- [0266] X23可能是缬氨酸；
- [0267] X24可以是缬氨酸或谷氨酰胺；
- [0268] X27可以是异亮氨酸或甲硫氨酸；
- [0269] X28可以是天冬酰胺或精氨酸；
- [0270] X29可能是苏氨酸；和
- [0271] X30可以是半胱氨酸、或是不存在的，但胰高血糖素衍生物不限于此。
- [0272] 例如，肽可包括选自SEQ ID NOs:7至11、SEQ ID NOs:13至15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NOs:19至24、SEQ ID NOs:27、29、31、33、和SEQ ID NOs:35至45的氨基酸序列，并且具体地可以(主要)由选自SEQ ID NOs:7至11、SEQ ID NOs:13至15、SEQ ID NO:17、SEQ ID NOs:19至24、SEQ ID NOs:27、29、31、33、和SEQ ID NOs:35至45的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0273] 在式1中，
- [0274] X1可以是酪氨酸；
- [0275] X2可以是Aib(氨基异丁酸)；
- [0276] X7可以是苏氨酸；
- [0277] X10可以是酪氨酸；
- [0278] X12可以是赖氨酸；

- [0279] X13可以是酪氨酸；
- [0280] X14可以是亮氨酸；
- [0281] X15可以是天冬氨酸或半胱氨酸；
- [0282] X16可以是谷氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸；
- [0283] X17可以是赖氨酸或精氨酸；
- [0284] X18可以是精氨酸；
- [0285] X19可以是丙氨酸；
- [0286] X20可以是谷氨酰胺、半胱氨酸、或赖氨酸；
- [0287] X21可以是天冬氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、或谷氨酸；
- [0288] X23可以是缬氨酸或精氨酸；
- [0289] X24可以是谷氨酰胺或亮氨酸；
- [0290] X27可以是甲硫氨酸；
- [0291] X28可以是天冬酰胺或精氨酸；
- [0292] X29可以是苏氨酸；和
- [0293] X30可以不存在的，但胰高血糖素衍生物不限于此。
- [0294] 例如，肽可包括选自SEQ ID NOs:14、16、18、19、25、31、33、37和44的氨基酸序列，并且具体地可以(主要)由选自SEQ ID NOs:14、16、18、19、25、31、33、37和44的氨基酸序列组成，但不限于此。
- [0295] 更具体地，肽可以是包括由下式2表示的氨基酸序列的肽：
- [0296] Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X30(式2, SEQ ID NO:47)
- [0297] 在式2中，
- [0298] X7可以是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸；
- [0299] X10可以是酪氨酸或半胱氨酸；
- [0300] X12可以是赖氨酸或半胱氨酸；
- [0301] X15可以是天冬氨酸或半胱氨酸；
- [0302] X16可以是谷氨酸或丝氨酸；
- [0303] X17可以是赖氨酸或精氨酸；
- [0304] X20可以是谷氨酰胺或赖氨酸；
- [0305] X21可以是天冬氨酸或谷氨酸；
- [0306] X24可以是缬氨酸或谷氨酰胺；和
- [0307] X30可以是半胱氨酸、或是不存在的。
- [0308] 例如，肽可包括选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、和SEQ ID NOs:36至45的氨基酸序列，并且具体地可以由选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、和SEQ ID NOs:36至45的氨基酸序列组成，但不限于此。又更具体地，肽包括SEQ ID NO:20或37的氨基酸序列，或(主要)由相应的氨基酸序列组成。然而，肽不限于此。
- [0309] 具体地，在式2中，
- [0310] X7可以是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸；
- [0311] X10可以是酪氨酸或半胱氨酸；

[0312] X12可以是赖氨酸；

[0313] X15可以是天冬氨酸；

[0314] X16可以是谷氨酸或丝氨酸；

[0315] X17可以是赖氨酸或精氨酸；

[0316] X20可以是谷氨酰胺或赖氨酸；

[0317] X21可以是天冬氨酸或谷氨酸；

[0318] X24可以是谷氨酰胺；和

[0319] X30可以是半胱氨酸、或是不存在的，但肽并不特别限于此。

[0320] 例如，肽可包括选自SEQ ID NOs:36至38、SEQ ID NOs:40至42、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45的氨基酸序列，并且具体地可以(主要)由选自SEQ ID NOs:36至38、SEQ ID NOs:40至42、SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成，但不限于此。

[0321] 作为肽的另一个实例，肽可以是包括选自SEQ ID NOs:2至11、和SEQ ID NOs:13至45的氨基酸序列的肽，并且具体地可以(主要)由选自SEQ ID NOs:2至11、和SEQ ID NOs:13至45的氨基酸序列组成，但不限于此。

[0322] 然而，肽可以排除在上述类别之外的组合存在，但不特别限于此，并且除非权利要求书中另有说明，否则权利要求书中描述的所有肽都包括在本发明的范围内。

[0323] 此外，即使本文将其描述为“由特定SEQ ID NO组成的肽”，当活性与由相应的SEQ ID NO的氨基酸序列组成的肽的活性相同或相应时，肽不排除在相应的SEQ ID NO的氨基酸序列之前或之后添加无意义的序列、或可能自然发生的突变、或其沉默突变，并且当具有这种序列添加或突变时，显然肽也落入本申请的范围内。

[0324] 上述内容可应用于本发明的其他实施方式或其他方面，但本发明不限于此。

[0325] 在本发明中，肽可具有与天然胰高血糖素至少60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、91%或更多、92%或更多、93%或更多、94%或更多、或95%或更多的序列同一性，但序列同一性不特别限于此，并且本领域技术人员可以通过肽和天然胰高血糖素之间的序列比对容易地确定。

[0326] 如本文所使用的，术语“同源性”是指与野生型蛋白质的氨基酸序列或编码其的核苷酸序列的相似程度，并且包括与本发明的氨基酸序列或碱基序列具有上述百分比或更多的相同序列的序列。这种同源性也可以通过目视比较两个序列来确定，然而也可以使用通过并排比对待比较的序列来分析同源性程度的生物信息学算法来确定。两个氨基酸序列之间的同源性可以用百分比表示。Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) 的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA计算机软件模块中提供了有用的自动化算法。模块中的自动比对算法包括Needleman&Wunsch和Pearson&Lipman和Smith&Waterman比对算法。在软件中自动操作用于其他有用序列的算法和同源性测定，包括FASTP、BLAST、BLAST2、PSIBLAST、和CLUSTAL W。

[0327] 在本发明中，肽可以是对胰高血糖素受体表现出活性的肽或胰高血糖素衍生物，但不限于此。

[0328] 尽管不特别限于此，然而对胰高血糖素受体表现出显著活性水平的肽可对胰高血糖素受体表现出的体外活性为天然配体(天然胰高血糖素)体外活性的约0.001%或更多、约0.01%或更多、约0.1%或更多、约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、

约5%或更多、约6%或更多、约7%或更多、约8%或更高、约9%或更多、约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多,但包括但不限于显示出的显著活性的范围。作为测量肽的这种体外活性的方法,可参考本说明书的实例4,但方法不特别限于此。

[0329] 如本文所用,术语“约”是指包括 ± 0.5 、 ± 0.4 、 ± 0.3 、 ± 0.2 、 ± 0.1 等中的所有的范围,并且包括与在术语“约”之后的值相等或类似范围内的所有值,但不限于此。

[0330] 尽管不特别限于此,然而肽可以是非天然产生的肽。

[0331] 上述胰高血糖素衍生物可以包括分子内桥(例如,共价桥或非共价桥),并且具体地可以是包括环的形式。例如,胰高血糖素衍生物可以是在胰高血糖素衍生物的第16个和第20个氨基酸之间形成环的形式,但不特别限于此。

[0332] 环的非限制性实例可包括内酰胺桥(或内酰胺环)。

[0333] 胰高血糖素衍生物包括经修饰以包括能够在目标位置形成环以便包括环的氨基酸的所有胰高血糖素衍生物。

[0334] 这种环可以在胰高血糖素衍生物的氨基酸侧链之间形成,并且可以是例如在赖氨酸侧链和谷氨酸侧链之间形成内酰胺环的形式,但不特别限于此。

[0335] 例如,包括由式1或式2代表的氨基酸序列的肽可以是其中式1或式2中的X10和X14、X12和X16、X16和X20、X17和X21、X20和X24、以及X24和X28的氨基酸对中的每个氨基酸对的氨基酸均被谷氨酸或赖氨酸取代的肽,但不限于此。在 X_n (n 是自然数)中, n 代表距所呈现氨基酸序列的N-末端的氨基酸位置。

[0336] 包括由式1或式2代表的氨基酸序列的肽可以是其中X12和X16的氨基酸对、X16和X20的氨基酸对、或X17和X21的氨基酸对中的每个氨基酸被能够形成环的谷氨酸或赖氨酸取代的肽,但不限于此。

[0337] 肽可以是其中在式1或式2中的X10和X14、X12和X16、X16和X20、X17和X21、X20和X24、以及X24和X28的氨基酸对中的至少一个氨基酸对中的每个氨基酸对的各自氨基酸之间形成环(例如,内酰胺环)的肽,但不限于此。

[0338] 肽可以是其中在式1或式2中X16是谷氨酸、X20是赖氨酸、并且X16和X20的侧链形成内酰胺环的肽,但不限于此。

[0339] 根据本发明的肽可具有未经修饰的N-末端和/或C-末端,但为了保护肽免受体内蛋白酶的影响并且增加稳定性,其中N-末端、C-末端和/或类似物被化学修饰或由有机基团保护,或氨基酸可以被添加到肽的末端和类似物的修饰形式也包括在根据本发明的肽的范围内。当C-末端未修饰时,根据本发明的肽的末端具有羧基,但不特别限于此。

[0340] 具体地,在化学合成肽的情况下,由于N-末端和C-末端是带电荷的,因此N-末端可以被乙酰化和/或C-末端可以被酰胺化以移除电荷,但N-末端和C-末端并不特别限于此。

[0341] 除非本说明书中另有说明,关于其中肽共价连接到根据本发明的生物相容性物质的“肽”或“缀合物”的说明书的详细描述或权利要求书的描述不仅适用于相应的肽或缀合物,还适用于包括相应肽或缀合物的所有形式的盐(例如,肽的药学上可接受的盐)或其溶剂化物的范围。因此,即使说明书中仅描述了“肽”或“缀合物”,描述也适用于其特定盐、其特定溶剂化物、和特定盐的特定溶剂化物。例如,这种盐形式可以是其中使用任何药学上可接受的盐的形式。盐的种类不特别地限制。然而,盐优选为对个体(例如,哺乳动物)安全且

有效的形式,但不特别限于此。

[0342] 术语“药学上可接受的”是指在药物医学判断范围内,在不引起过度毒性、刺激性、过敏反应等的情况下,可以有效地用于期望目的的物质。

[0343] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”包括衍生自药学上可接受的无机酸、有机酸或碱的盐。合适的酸的实例可以包括盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、甲苯-对-磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、和苯磺酸。衍生自合适碱的盐的可包括碱金属(如钠、钾)的盐、碱土金属(如,镁)的盐、铵盐和类似物。

[0344] 如本文所用,术语“溶剂化物”是指其中根据本发明的肽或缀合物或其盐与溶剂分子形成复合物的溶剂化物。

[0345] 本发明的胰高血糖素衍生物肽可以通过本领域公知的方法,例如,根据其长度使用自动肽合成仪合成,或者也可以通过基因工程技术生产。

[0346] 具体地,本发明的胰高血糖素衍生物肽可通过标准合成方法、重组表达系统、或本领域的任何其他方法制备。因此,根据本发明的胰高血糖素衍生物可通过包括例如以下方法的多种方法合成:

[0347] (a) 通过固相或液相法逐步或通过片段装配合成肽,并且分离和纯化最终肽产物的方法;或

[0348] (b) 在宿主细胞中表达编码肽的核酸构建体并且从宿主细胞培养物中回收表达产物的方法;或

[0349] (c) 进行编码肽的核酸构建体的体外无细胞表达并且回收表达产物的方法;或

[0350] 通过方法(a)、(b)和(c)的任意组合获得肽的片段,然后连接肽片段以获得肽,并且回收肽的方法。

[0351] 作为更具体的实例,通过基因操纵制备编码包括融合配偶体和胰高血糖素衍生物的融合蛋白的融合基因,将其转化到宿主细胞中,然后以融合蛋白的形式表达,并且使用蛋白水解酶或化合物将胰高血糖素衍生物从融合蛋白中切割和分离,由此可以产生期望的胰高血糖素衍生物。为此,例如,编码能够被诸如因子Xa或肠激酶、CNBr的蛋白水解酶或诸如羟胺的化合物切割的氨基酸残基的DNA序列可插入到融合配偶体和编码胰高血糖素衍生物的多核苷酸之间。

[0352] 作为更具体的方面,根据本发明的肽或胰高血糖素衍生物,例如包括由式1代表的氨基酸序列的肽可以是与增加其体内半衰期的生物相容性物质部分结合的长效缀合物的形式,但不限于此。生物相容性物质部分可与载体互换使用。

[0353] 具体地,缀合物包括肽部分和共价连接到肽部分的生物相容性物质部分,并且肽部分可以是与式1代表的氨基酸序列相同的序列,或者包括其的序列。

[0354] 在本发明中,与未结合载体的肽相比,肽的缀合物可表现出增加的长效持久性。在本发明中,这种缀合物被称为“长效缀合物”。

[0355] 这种缀合物可以是非自然发生的缀合物。

[0356] 如本文所用,术语“长效缀合物”是指处于生物相容性物质部分或载体与生理活性物质(例如胰高血糖素衍生物)结合的形式的缀合物,并且与未结合生物相容性物质部分或载体的生理活性物质相比,表现出增加的长效持久性(例如,增加的体内半衰期)。在长效缀

合物中,生物相容性物质部分或载体可共价连接到生理活性物质,但不特别限于此。

[0357] 在本发明的特定实施方式中,与未结合载体的天然胰高血糖素或胰高血糖素衍生物相比,胰高血糖素衍生物的长效缀合物可表现出增加的效力持久性。

[0358] 在本发明的一个实施方式中,长效缀合物可以是由以下化学式1代表的缀合物,但不限于此:

[0359] [化学式1]

[0360] X-L-F

[0361] 其中X是上述肽;

[0362] L是含有乙二醇重复单元的连接体;

[0363] F是免疫球蛋白Fc区;并且

[0364] -代表X和L之间以及L和F之间通过共价键的连接。

[0365] 在长效缀合物中,X可以是根据本发明的肽(胰高血糖素衍生物)。具体地,X可以是包括由式1代表的氨基酸序列的肽,或者X可以是包括SEQ ID NOs:2至11和SEQ ID NOs:13至45中任何一个的氨基酸序列的肽,或者X可以是包括选自SEQ ID NOs:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42和44的氨基酸序列的肽,但不限于此。

[0366] 在长效缀合物中,F是X,即能够增加胰高血糖素衍生物的半衰期的物质,并且对应于构成本发明缀合物的部分的一个组分。

[0367] F可以通过共价化学键或非共价化学键与X结合,具体地经由L通过共价化学键与X结合。

[0368] 作为具体实例,F可以是免疫球蛋白Fc区,并且更具体地,免疫球蛋白Fc区可衍生自IgG,但F不特别限于此。

[0369] 如本文所用,术语“免疫球蛋白Fc区”指包括重链恒定区2(CH2)和/或重链恒定区3(CH3)的位点,免疫球蛋白的重链和轻链可变区除外。免疫球蛋白Fc区可以是构成本发明蛋白质缀合物的部分的一种成分。

[0370] 如本文所用,术语Fc片段不仅包括木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白获得的天然序列,还包括其衍生物,例如,其中天然序列中的一个或多个氨基酸残基通过缺失、插入、非保守或保守取代、或其组合改变以不同于天然序列的序列。

[0371] F是其中两个多肽链通过二硫键连接的结构、并且可以是其中两个链中仅一个通过氮原子连接的结构,但不限于此。通过氮原子的连接可以通过赖氨酸的 ϵ 氨基原子或N-末端氨基的还原胺化实现。

[0372] 还原胺化反应是指其中反应物的胺基或氨基与另一反应物的醛(即,能进行还原胺化的官能团)反应以产生胺,且然后通过还原反应形成胺键的反应,并且还原胺化反应是本领域中众所周知的有机合成反应。

[0373] 作为实施方式,F可通过N-末端脯氨酸的氮原子连接,但不限于此。

[0374] 这种免疫球蛋白Fc片段可以包括重链恒定区中的铰链区,但不限于此。

[0375] 在本发明中,免疫球蛋白Fc片段可以在N-末端包括特异性铰链序列。

[0376] 如本文所用,术语“铰链序列”是指位于重链上并通过间二硫键(inter-disulfide bond)形成免疫球蛋白Fc片段的二聚体的位点。

[0377] 在本发明中,铰链序列可以通过缺失具有以下氨基酸序列的铰链序列中的一部分

被突变,以仅具有一个半胱氨酸残基,但不限于于此:

[0378] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:51)。

[0379] 通过缺失SEQ ID NO:51的铰链序列中的第8个或第11个半胱氨酸残基,铰链序列可仅包括一个半胱氨酸残基。本发明的铰链序列可由仅包括一个半胱氨酸残基的3至12个氨基酸组成,但不限于此。更具体地,本发明的铰链序列可以具有以下序列:

[0380] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:52)、

[0381] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO:53)、

[0382] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (SEQ ID NO:54)、

[0383] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro (SEQ ID NO:55)、

[0384] Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (SEQ ID NO:56)、

[0385] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO:57)、

[0386] Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO:58)、

[0387] Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:59)、

[0388] Glu-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:60)、

[0389] Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:61)、

[0390] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:62)、

[0391] Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:63)、

[0392] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:64)、

[0393] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO:65)、

[0394] Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro (SEQ ID NO:66)、

[0395] Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:67)、

[0396] Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:68)、

[0397] Glu-Pro-Ser-Cys (SEQ ID NO:69)、或

[0398] Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO:70)。

[0399] 更具体地,铰链序列可包括SEQ ID NO:61 (Pro-Ser-Cys-Pro) 或SEQ ID NO:70 (Ser-Cys-Pro) 的氨基酸序列,但不限于此。

[0400] 由于铰链序列的存在,本发明的免疫球蛋白Fc片段可以是免疫球蛋白Fc链的两个分子形成二聚体的形式,并且由本发明化学式1代表的缀合物可以是连接体的一个末端连接到二聚体免疫球蛋白Fc片段的一条链的形式,但不限于此。

[0401] 如本文所用,术语“N-末端”是指蛋白质或多肽的氨基末端,并且可以包括氨基末端的最末端或从最末端起的1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个或更多个氨基酸。本发明的免疫球蛋白Fc片段可以在N-末端包括铰链序列,但不限于此。

[0402] 本发明的免疫球蛋白Fc片段可以是延伸的Fc片段,其包括重链恒定区1 (CH1) 和/或轻链恒定区1 (CL1) 的部分或全部,但仅免疫球蛋白的重链和轻链可变区除外,只要其效果实质上等同于或增强于天然类型的效果。免疫球蛋白Fc片段可以是其中对应于CH2和/或CH3的一些相当长的氨基酸序列被移除的片段。

[0403] 例如,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是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) CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域或CH4结构域中的一个或两个或更多个结构域与免疫

球蛋白铰链区(或铰链区的部分)的组合;或6)重链恒定区的每个结构域与轻链恒定区的二聚体。然而,免疫球蛋白Fc区不限于此。

[0404] 在一个实施方式中,免疫球蛋白Fc区可以是二聚体形式,并且胰高血糖素衍生物的一个分子可以共价连接到二聚体形式的一个Fc区。在这种情况下,免疫球蛋白Fc和胰高血糖素衍生物可通过非肽基聚合物彼此连接。胰高血糖素衍生物的两个分子也可能对称地结合到二聚体形式的一个Fc区。在这种情况下,免疫球蛋白Fc和胰高血糖素衍生物或胰岛素分泌肽可通过非肽基连接体彼此连接。然而,免疫球蛋白Fc区不限于上述实例。

[0405] 本发明的免疫球蛋白Fc区包括天然氨基酸序列及其序列衍生物。氨基酸序列衍生物意指天然氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基通过缺失、插入、非保守或保守取代、或其组合而具有不同的序列。

[0406] 例如,在IgG Fc的情况下,已知对结合重要的第214至238位、第297至299位、第318至322位、或第327至331位的氨基酸残基可用作用于修饰的合适位点。

[0407] 各种类型的衍生物——其中能够形成间二硫键的位点被移除,从天然Fc中移除N-末端的一些氨基酸,或在天然Fc的N-末端添加甲硫氨酸残基——是可能的。为了清除效应物功能,可移除补体结合位点(例如,C1q结合位点)或可移除ADCC(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性)位点。制备免疫球蛋白Fc区的这种序列衍生物的技术在国际专利公开号W0 97/34631和国际专利公开号W0 96/32478中公开。

[0408] 不整体改变分子活性的蛋白质或肽中的氨基酸交换在本领域中是已知的(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最通常发生的交换是在氨基酸残基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之间的交换。在一些情况下,可通过磷酸化、硫酸化、丙烯酰化(acrylation)、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等进行修饰。

[0409] 上述Fc衍生物可表现出与本发明的Fc区相等的生物学活性,以及Fc区对热、pH等增强的结构稳定性。

[0410] 这种Fc区可从诸如人类、牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、或豚鼠的动物体内分离的天然类型获得,或者可以从转化的动物细胞或微生物获得的重组体或其衍生物。在这里,从天然类型获得Fc区的方法可以是其中从人或动物体内分离整个免疫球蛋白,然后用蛋白酶处理的方法。当用木瓜蛋白酶处理时整个免疫球蛋白被切割成Fab和Fc,而当用胃蛋白酶处理时被切割成pF' c和F(ab)₂。可通过尺寸排阻层析或类似方法分离Fc和pF' c。在更具体的实施方式中,Fc区是获自微生物人源Fc区的重组免疫球蛋白Fc区。

[0411] 免疫球蛋白Fc区可以具有天然糖链、相比于天然类型增加的糖链、相比于天然类型减少的糖链、或去糖基化的形式。对于这种免疫球蛋白Fc糖链的增加、减少或移除,可使用诸如化学方法、酶促方法和使用微生物的基因工程方法的常规方法。在这里,从Fc移除糖链的免疫球蛋白Fc区在体内不诱导不必要的免疫应答,因为其与补体(c1q)的结合亲和力显著降低,并且抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性被降低或清除。在这点上,去糖基化的或非糖基化(aglycosylated)的免疫球蛋白Fc区作为药物载体的形式更适合预期目的。

[0412] 在本发明中,“去糖基化”指用酶移除糖的Fc区,并且“非糖基化”指从原核生物,在

更具体实施方式中,大肠杆菌(E.coli.)中产生的未被糖基化的Fc区。

[0413] 免疫球蛋白Fc区可以是人类或动物(如,牛、山羊、猪、小鼠、兔子、仓鼠、大鼠、或豚鼠)来源的,并且在更具体的实施方式中,是人类来源的。

[0414] 免疫球蛋白Fc区可以是衍生自IgG、IgA、IgD、IgE、或IgM、或其组合或其杂化物的Fc区。在更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是衍生自人类血液中最丰富的IgG或IgM,并且在又一更具体的实施方式中,衍生自已知增强配体结合蛋白质的半衰期的IgG。在再一更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是IgG4 Fc区。在最具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是衍生自人类IgG4的非糖基化的Fc区,但不限于此。

[0415] 在具体实施方式中,免疫球蛋白Fc片段作为人IgG4 Fc的片段,可以是同源二聚体的形式,其中两个单体通过半胱氨酸之间的二硫键(链间形式)相连,半胱氨酸是每个单体的第3个氨基酸。在这种情况下,同源二聚体的每个单体独立地具有/或可以具有在第35和95位的半胱氨酸之间的内部二硫键和在第141和199位的半胱氨酸之间的内部二硫键(即,两个二硫键(链内形式))。每个单体的氨基酸的数目可以是221个,并且形成同源二聚体的氨基酸可以由总共442个氨基酸组成,但氨基酸的数目不限于此。具体地,在免疫球蛋白Fc片段中,两个具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列(由221个氨基酸组成)的单体通过半胱氨酸之间的二硫键形成同源二聚体,半胱氨酸是每个单体的第3个氨基酸,并且同源二聚体的单体可每个独立地形成第35和95位半胱氨酸之间的二硫键以及第141和199位半胱氨酸之间的二硫键,但免疫球蛋白Fc片段不限于此。

[0416] 在本发明中,“组合”意指当形成二聚体或多聚体时,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形成键。换句话说,可以由选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc片段的两个或更多个片段制备二聚体或多聚体。

[0417] L可以是非肽基连接体,例如,含有乙二醇重复单元的连接体。

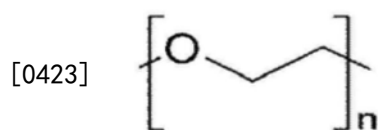
[0418] 在本发明中,“非肽基连接体”包括其中结合两个或更多个重复单元的生物相容性聚合物。重复单元通过肽键以外的任何共价键彼此结合。非肽基连接体可以是构成本发明缀合物部分的一种组分,并且对应于化学式1中的L。作为可在本发明中使用的非肽基连接体,可不受限地使用对体内蛋白水解酶具有抗性的任何聚合物。在本发明中,非肽基连接体可与非肽基聚合物互换使用。

[0419] 尽管不特别限于此,但非肽基连接体可以是含有乙二醇重复单元(例如,聚乙二醇)的连接体,和本领域已知的其衍生物以及可在本领域技术水平上易于制备的衍生物也包括在本发明的范围内。

[0420] 非肽基连接体的重复单元可以是乙二醇重复单元。具体地,非肽基连接体可包括乙二醇重复单元和在末端用于制备缀合物的官能团。根据本发明的长效缀合物可以其中是X和F通过官能团连接的形式,但不限于此。在本发明中,非肽基连接体可包括两个或三个或更多个官能团,并且各自的官能团可彼此相同或不同,但非肽基连接体不限于此。

[0421] 具体地,连接体可以通过以下化学式2代表的聚乙二醇(PEG),但不限于此:

[0422] [化学式2]



[0424] 其中, $n=10$ 至 2400 , $n=10$ 至 480 , 或 $n=50$ 至 250 , 但不限于此。

[0425] 长效缀合物中的PEG部分不仅可以包括 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 结构, 还可以包括插入在连接元件和 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 之间的氧原子, 但不限于此。

[0426] 在具体实施方式中, 缀合物可具有其中胰高血糖素衍生物肽或包括由式1代表的氨基酸序列的肽(X)通过含有乙二醇重复单元的连接体与免疫球蛋白片段(F)共价连接的结构, 但不限于此。聚乙二醇是这样的术语, 其涵盖所有形式的乙二醇均聚物、PEG共聚物和单甲基取代的PEG聚合物(mPEG), 但不特别限于此。具体地, L中乙二醇重复单元部分的化学式重量可在 1kDa 到 100kDa 的范围内, 但不限于此。

[0427] 非肽基聚合物的分子量在 1kDa 到 100kDa 的范围内, 具体地在 1kDa 到 20kDa 的范围内, 或在 1kDa 到 10kDa 的范围内, 但不限于此。作为与对应于F的多肽结合的本发明的非肽基连接体, 不仅可以是一种聚合物, 还可以使用不同种类聚合物的组合。

[0428] 在特定实施方式中, 非肽基连接体的两个末端可分别结合到F的胺或硫醇基, 例如免疫球蛋白Fc片段和X的胺或硫醇基。

[0429] 具体地, 非肽基聚合物可包括能够结合到F(例如, 免疫球蛋白Fc片段)和X的反应性基团, 具体地, 包括能够结合到位于N-末端或赖氨酸的胺基、或位于X或F两个末端的半胱氨酸的硫醇基的反应性基团, 但不限于此。

[0430] 可结合到F(例如, 免疫球蛋白Fc片段和X)的非肽基聚合物的反应性基团可选自醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物, 但不限于此。

[0431] 在上文中, 醛基的实例包括丙醛基或丁醛基, 但醛基不限于此。

[0432] 在上文中, 作为琥珀酰亚胺衍生物, 可使用琥珀酰亚胺基戊酸酯、琥珀酰亚胺基甲基丁酸酯、琥珀酰亚胺基甲基丙酸酯、琥珀酰亚胺基丁酸酯、琥珀酰亚胺基丙酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺基、琥珀酰亚胺基羧基甲基或琥珀酰亚胺基碳酸酯, 但琥珀酰亚胺衍生物不限制于此。

[0433] 非肽基连接体可通过这种反应性基团连接到X和F, 但不特别限于此。

[0434] 通过醛键还原胺化生成的最终产物比通过酰胺键连接的最终产物更稳定得多。醛反应性基团在低pH值下选择性地与N-末端反应, 并且在高pH值(例如, $\text{pH } 9.0$)下可与赖氨酸残基形成共价键。

[0435] 在非肽基连接体两端的反应基团可以彼此相同或不同。例如, 非肽基连接体在一端可以具有马来酰亚胺基团, 而在另一端可以具有醛基、丙醛基、或丁醛基。然而, 非肽基连接体不特别限于此, 只要F(具体地, 免疫球蛋白Fc片段)和X可以结合到非肽基连接体的每个末端。

[0436] 例如, 非肽基连接体的一个末端可包括作为反应性基团的马来酰亚胺基团, 而另一末端可包括醛基、丙醛基、或丁醛基。

[0437] 在使用两端都具有羟基反应性基团的聚乙二醇作为非肽基聚合物的情况下, 本发明的长效蛋白质缀合物可通过使用已知化学反应将羟基激活为各种反应性基团, 或使用具有修饰的反应性基团的商业可得的聚乙二醇来制备。

[0438] 在具体实施方式中, 非肽基聚合物可连接到X的半胱氨酸残基, 更具体地半胱氨酸的-SH基团, 但不限于此。

[0439] 具体地, 非肽基聚合物的反应性基团可连接至半胱氨酸残基的-SH基团, 且上述所

有描述均适用于反应性基团。当使用马来酰亚胺-PEG-醛时，马来酰亚胺基可通过硫醚键连接到X的-SH基团，并且醛基可通过还原性胺化反应连接到F（具体地，免疫球蛋白Fc的-NH₂基团），但缀合物不限于此，并且这对应于一个实例。

[0440] 在缀合物中，非肽基聚合物的反应基团可连接到位于免疫球蛋白Fc片段N-末端的-NH₂，然而这对应于一个实例。

[0441] 与天然胰高血糖素相比或与未经F修饰的X相比，上述缀合物可表现出增强的功效持久性，并且此类缀合物不仅包括上述形式，而且还包括包封在可生物降解纳米颗粒中的形式。

[0442] 本发明的GLP-1和GIP受体双重激动剂包括对GLP-1受体和GIP受体表现出显著活性水平的各种物质，例如化合物或肽形式的物质。本文中的GLP-1和GIP受体双重激动剂可与“GLP-1/GIP双重激动剂”或“双重激动剂”互换使用。

[0443] 具体地，双重激动剂具有以下活性i)至ii)中的一种或多种，特别是显著活性：

[0444] i) GLP-1受体的激活；并且ii) GIP受体的激活。

[0445] 尽管不特别限于此，然而GLP-1（胰高血糖素样肽-1）和GIP（葡萄糖依赖性促胰岛素多肽）受体双重激动剂是对受体表现出显著活性水平的物质，并且可以对天然GLP-1和GIP以及GLP-1受体和GIP受体表现出的体外活性为对应受体的天然配体（天然GLP-1和GIP）的0.1%或更多、1%或更多、2%或更多、3%或更多、4%或更多、5%或更多、6%或更多、7%或更多、8%或更多、9%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、100%或更多，但包括但不限于显著增加的范围。

[0446] 可以通过本领域已知的各种体外活性测量来实现测量这种双重激动剂的体外活性的方法，并且本说明书的实例2可以被称为实例，但方法并不特别限于此。

[0447] 尽管不特别限于此，然而双重激动剂可以是非自然发生的双重激动剂。

[0448] 对GLP-1受体和GIP受体表现出活性的物质的实例包括天然GLP-1和GIP、其激动剂或其衍生物，但不特别限于此。“衍生物”如上所述。

[0449] 尽管不特别限于此，然而GLP-1和GIP受体双重激动剂可以是对GLP-1受体和GIP受体表现出活性的肽。

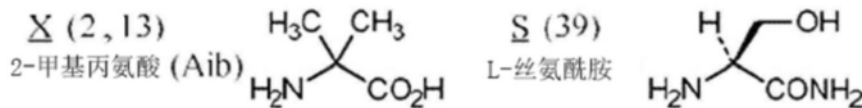
[0450] 具体地，本发明的GLP-1和GIP受体双重激动剂是GLP-1或GIP的衍生物，其对GLP-1受体和GIP受体表现出活性，并且本领域已知的任何GLP-1和GIP受体双重激动剂可不受限制地包括在本发明的范围内。只要根据本发明的GLP-1和GIP受体双重激动剂能够对GLP-1受体和GIP受体表现出活性，则其可以是商业可获得的双重激动剂或通过本领域已知的方法制备。GLP-1和GIP受体双重激动剂的实例包括但不限于泰瑞帕肽、NN9709和SAR-438335。

[0451] 根据本发明的GLP-1和GIP受体双重激动剂的实例泰瑞帕肽已知为L-酪氨酰-2-甲基丙氨酰-L-α-谷氨酰甘氨酰-L-苏氨酰-L-苯丙氨酰-L-苏氨酰-L-丝氨酰-L-α-天冬氨酰-L-酪氨酰-L-丝氨酰-L-异亮氨酰-2-甲基丙氨酰-L-亮氨酰-L-α-天冬氨酰-L-赖氨酰-L-异亮氨酰-L-谷氨酰胺-N⁶-[(22S)-22,42-二羧基-10,19,24-三氧基-3,6,12,15-四氧基-9,18,23-三2-氮杂金刚烷-N-氧自由基四十烷-1-酰基(triazadotetracontan-1-oyl)]-L-赖氨酰-L-丙氨酰-L-苯丙氨酰-L-缬氨酰-L-谷氨酰胺-L-色氨酰-L-亮氨酰-L-异亮氨酰-L-丙氨酰甘氨酰甘氨酰-L-脯氨酰-L-丝氨酰-L-丝氨酰甘氨酰-L-丙氨酰-L-脯氨酰-L-脯氨

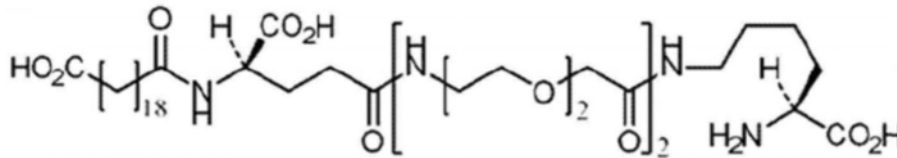
酰-L-脯氨酸-L-丝氨酸酰胺 (CAS#2023788-19-2) (L-tyrosyl-2-methylalanyl-L- α -glutamylglycyl-L-threonyl-L-phenylalanyl-L-threonyl-L-seryl-L- α -aspartyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-isoleucyl-2-methylalanyl-L-leucyl-L- α -aspartyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-alanyl-L-glutamyl-N⁶-[(22S)-22,42-dicarboxy-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazadotetracontan-1-oyl]-L-lysyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-glutamyl-L-tryptophyl-L-leucyl-L-isoleucyl-L-alanylglycylglycyl-L-prolyl-L-seryl-L-serylglycyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-prolyl-L-serinamide), 并且是具有以下序列的物质:

[0452] YXEGTFTSDY SIXLDKIAQK AFVQWLIAGG PSSGAPPPS (SEQ ID NO:50)

[0453] 其中, X、K和S每个是如下修饰的残基



[0454] K (20) N⁶-[N-(氢二十碳烷二酰)- γ -Glu-双[亚氨基双(乙烯氧基)乙酰基]-赖氨酸



[0455] 尽管不特别限于此,但本发明的GLP-1和GIP受体双重激动剂可以是末端被修饰的形式,具体地是其中双重激动剂的一个末端被酰化或酰胺化的形式,但不限于此。

[0456] 本发明的肽可以通过本领域公知的方法合成,例如,根据其长度使用自动肽合成仪,或者也可以通过基因工程技术生产。

[0457] 具体地,本发明的肽可通过标准合成方法、重组表达系统、或本领域的任何其他方法制备。因此,根据本发明的肽可以通过多种方法合成,包括例如以下方法:

[0458] (a) 通过固相或液相法逐步或通过片段装配合成肽,并且分离和纯化最终肽产物的方法;或

[0459] (b) 在宿主细胞中表达编码肽的核酸构建体并且从宿主细胞培养物中回收表达产物的方法;或

[0460] (c) 进行编码肽的核酸构建体的体外无细胞表达并且回收表达产物;或

[0461] 通过方法(a)、(b)和(c)的任意组合获得肽的片段,然后连接肽片段以获得肽,并且回收肽的方法。

[0462] 作为更具体的实例,通过遗传操作制备编码肽的多核苷酸,并且将其转化到宿主细胞中,然后可以产生期望的肽。

[0463] 尽管不特别限于此,然而在本发明的组合物中,与胰高血糖素受体的天然配体活性相比,胰高血糖素的体外活性可为约0.1%或更多、约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约6%或更多、约7%或更多、约8%或更多、约9%或更多、约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多;并且在GLP-1和GIP受体双重激动剂的情况下,与GLP-1受体的天然配体活性相比,GLP-1的体外活性可为约0.1%

或更多、约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约6%或更多、约7%或更多、约8%或更多、约9%或更多、约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多；并且与GIP受体的天然配体活性相比，GIP的体外活性可为约0.1%或更多、约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约6%或更多、约7%或更多、约8%或更多、约9%或更多、约10%或更多、约20%或更多、约30%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、或约100%或更多，但体外活性不限于此。尽管不特别限于此，但在本发明的组合物中，与胰高血糖素受体的天然配体活性相比，胰高血糖素的体外活性可为约0.1%或更多并且约300%或更少、约2%或更多并且约300%或更少、约3%或更多并且约300%或更少、约4%或更多并且约300%或更少、约5%或更多并且约300%或更少、约6%或更多并且约300%或更少、约7%或更多并且约300%或更少、约8%或更多并且约300%或更少、约9%或更多并且约300%或更少、约10%或更多并且约300%或更少、约20%或更多并且约300%或更少、约30%或更多并且约300%或更少、约40%或更多并且约300%或更少、约50%或更多并且约300%或更少、约60%或更多并且约300%或更少、约70%或更多并且约300%或更少、约80%或更多并且约300%或更少、约90%或更多并且约300%或更少、或约100%或更多并且约300%或更少；并且在GLP-1和GIP受体双重激动剂的情况下，与GLP-1受体的天然配体活性相比，GLP-1的体外活性可为约0.1%或更多并且约200%或更少、约2%或更多并且约200%或更少、约3%或更多并且约200%或更少、约4%或更多并且约200%或更少、约5%或更多并且约200%或更少、约6%或更多并且约200%或更少、约7%或更多并且约200%或更少、约8%或更多并且约200%或更少、约9%或更多并且约200%或更少、约10%或更多并且约200%或更少、约20%或更多并且约200%或更少、约30%或更多并且约200%或更少、约40%或更多并且约200%或更少、约50%或更多并且约200%或更少、约60%或更多并且约200%或更少、约70%或更多并且约200%或更少、约80%或更多并且约200%或更少、约90%或更多并且约200%或更少、或约100%或更多并且约200%或更少；并且与GIP受体的天然配体活性相比，GIP的体外活性可为约0.1%或更多并且约300%或更少、约2%或更多并且约300%或更少、约3%或更多并且约300%或更少、约4%或更多并且约300%或更少、约5%或更多并且约300%或更少、约6%或更多并且约300%或更少、约7%或更多并且约300%或更少、约8%或更多并且约300%或更少、约9%或更多并且约300%或更少、约10%或更多并且约300%或更少、约20%或更多并且约300%或更少、约30%或更多并且约300%或更少、约40%或更多并且约300%或更少、约50%或更多并且约300%或更少、约60%或更多并且约300%或更少、约70%或更多并且约300%或更少、约80%或更多并且约300%或更少、约90%或更多并且约300%或更少、或约100%或更多并且约300%或更少，但体外活性不限于此。

[0464] 本发明的组合物可用于预防或治疗代谢综合征。

[0465] 如本文所用，术语“预防”指通过施用 (i) 表现出胰高血糖素活性的物质、和 (ii) GLP-1和GIP受体双重激动剂；或包含这些的组合物，来抑制或延迟目标疾病（例如，代谢综合征）的发病的任何行为；并且术语“治疗”指通过施用 (i) 表现出胰高血糖素活性的物质、和 (ii) GLP-1和GIP受体双重激动剂；或包含这些的组合物，来改善或有益于目标疾病（例

如,代谢综合征)的症状的任何行为。

[0466] 如本文所用,术语“施用”意指通过任何合适的方法将预定物质引入患者,并且组合物的施用途径并不特别限于此,而组合物可以通过组合物能够达到体内靶标的任何一般途径施用,并且施用可以是,例如腹膜内施用、静脉内施用、肌肉施用、皮下施用、皮内施用、口服施用、局部施用、鼻内施用、肺内施用和直肠内施用。

[0467] 表现出胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂可用于预防或治疗代谢综合征。

[0468] 本发明的(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合施用不仅防止体重增加、促进体重减轻、减少多余体重、或对肥胖症包括病理性肥胖症显示作用(例如,通过调节食欲、进食、食物摄入、热量摄入和/或能量消耗),而且对包括肥胖症相关炎症、肥胖症相关胆囊疾病、和肥胖症诱导的睡眠呼吸暂停的疾病也有效。本发明的(i)表现出胰高血糖素活性的物质、和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合施用也可以对代谢综合征或肥胖症相关肝病有效,而且表现出胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂可被用作治疗不限于此的相关疾病和健康状况的药物。本发明的显示胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂也可用于治疗除肥胖症以外的代谢综合征,即相关疾病,如葡萄糖耐受不良、高胆固醇血症、血脂障碍、肥胖症、糖尿病、高血压、肝病、血脂障碍引起的动脉硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、冠状动脉心脏病(冠心病)、和中风。然而,根据本发明的表现出胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂对这些状况的作用可以全部或部分地通过前述体重相关作用来介导,或者可独立于此。

[0469] 如本文所用,术语“代谢综合征”指其中由慢性代谢障碍引起的各种疾病单独或以复杂方式发生的症状。具体地,与代谢综合征对应的疾病包括但不限于葡萄糖耐受不良、高胆固醇血症、血脂障碍、肥胖症、糖尿病、高血压、肝病、血脂障碍引起的动脉硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、冠状动脉心脏病(冠心病)、和中风。

[0470] 在本发明中,术语“肥胖症”是指体内脂肪组织过多的状态,并且当体重指数(体重(kg)除以身高(m)的平方)为25或更多时,将其定义为肥胖症。肥胖症通常是由能量失衡引起的,这是由于相比能量消耗,营养素长期摄入过多。肥胖症是影响全身的代谢性疾病,增加糖尿病和高脂血症、性功能障碍、关节炎、和心血管疾病的风险,并且在某些情况下还与癌症有关。肥胖症的治疗可以通过减轻体重和体脂来实现,但不限于此。

[0471] 如本文所用,术语“高脂血症”是指其中血液中诸如游离胆固醇、胆固醇酯、磷脂和甘油三酯的脂质异常增加的状态。高脂血症本身通常不显示特定的症状,但血液中过多的脂质粘附到血管壁,缩小血管的大小,并且通过炎症反应导致动脉粥样硬化。这可能导致冠心病、脑血管疾病和外周血管阻塞。血液中的过多脂质在肝组织中积聚,因而这可能导致脂肪肝。在上述情况下,脂肪肝指的是其中脂肪在肝脏重量中的比例超过5%的状态,并且可能是由酒精摄入和过多脂肪摄入引起的。高脂血症的治疗可通过改善血脂水平来实现,但不限于此。

[0472] 如本文所用,术语“糖尿病”是指一种代谢性疾病如胰岛素分泌不足或不能正常起作用,并且特征是血糖浓度增加的高血糖。最近,由于肥胖症率的增加,特别是腹部肥胖症,糖尿病的发病率已爆炸式增长。如果慢性高血糖状况得不到适当治疗,其导致身体中的各种病理状况。典型地,它增加视网膜病、肾功能不全、神经病、血管障碍引起的中风、肾脏或

心脏病、糖尿病足溃疡、和心血管疾病的风险。糖尿病的治疗可以通过改善胰岛素敏感性来改善血糖,但不限于此。

[0473] 上述代谢综合征与肝病包括脂肪在肝组织中的积聚以及由此产生的炎症和纤维化密切相关,并且代谢综合征的实例可能包括各种肝病。

[0474] 因此,本发明的组合物可具有对肝病的预防或治疗用途。具体地,根据本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物可通过表现出抑制和改善肝组织中的炎症和/或纤维化的作用而具有对肝病的预防或治疗用途,但不限于此。

[0475] 如本文所用,术语“肝病”指发生在肝脏中的疾病,并且可包括代谢性肝病,但不限于此。肝病的代表性实例包括单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪肝、肝脏炎症、非酒精性脂肪性肝炎、胆汁淤积性肝病、肝纤维化、肝硬化、肝代偿失调、和肝细胞癌,并且只要肝脏的组织 and 功能中发生异常,它就可以是根据本发明的肝病。除饮酒、药物和病毒感染外,肥胖症、代谢障碍等可导致肝脏炎症,并且已知根据肝脏炎症的进展和长期性,诸如肝硬化和肝细胞癌的疾病发生。

[0476] 具体地,根据本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质、和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物可对与代谢综合征相关或由代谢综合征引起的肝病表现出预防或治疗作用。

[0477] 根据本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物对其表现出治疗作用的肝病可以是代谢性肝病,但不限于此。代谢性肝病是由体内异常化学反应引起的疾病,异常化学反应干扰身体的代谢,并且包括单纯性脂肪变性、脂肪肝、脂肪性肝炎、和非酒精性脂肪肝。

[0478] 在本发明中,“非酒精性脂肪肝(NAFLD)”是指没有饮酒史或与饮酒无关但伴有脂肪肝的情况。脂肪肝是指与正常情况不同,甘油三酯异常沉积在肝细胞中的现象。正常肝脏由约5%的脂肪组织组成,并且甘油三酯、脂肪酸、磷脂、胆固醇、和胆固醇酯是脂肪的主要成分。一旦发生脂肪肝,大多数成分被甘油三酯取代,并且当甘油三酯的量为肝脏重量的5%或更多时,被诊断为脂肪肝。脂肪肝是由肝细胞中脂肪代谢障碍或转运过多脂肪过程中的缺陷引起的,并且主要由肝脏中脂肪代谢障碍引起。脂肪肝中积累的大部分脂肪可以是甘油三酯。

[0479] 非酒精性脂肪肝疾病是指包括仅在肝细胞内脂肪过度积聚的单纯性脂肪变性,非酒精性脂肪肝,和伴有肝细胞坏死、炎症和纤维化的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的一组疾病,但不限于此,只要它用本发明的组合物治疗。根据本发明的非酒精性脂肪肝疾病可伴有非酒精性脂肪性肝炎,但不限于此。

[0480] 根据本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物对其表现出治疗作用的肝病可以是肝脏炎症,但不限于此。在本发明中,“肝脏炎症”是指作为肝脏疾病的最大病因导致肝脏的炎症的疾病,并且根据病因和症状分为急性肝炎和慢性肝炎。肝脏炎症主要由病毒、酒精、药物、免疫异常、和代谢疾病引起。

[0481] 根据本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物不仅具有减轻肝脏自身炎症的作用,而且还可以表现出对伴有肝脏的炎症或由肝脏的炎症引起的疾病(例如,肝炎、非酒精性脂肪性肝炎和肝纤维化)的作用。

[0482] 在本发明中，“非酒精性脂肪性肝炎”是非酒精性脂肪性肝病中的一种，并且是伴有肝细胞坏死、炎症和纤维化的肝病的代表性实例。根据本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物可通过抑制肝脏炎症和纤维化表现出对非酒精性脂肪性肝炎的作用，具体地可表现出对伴有脂肪肝、肝纤维化或肝硬化的非酒精性脂肪性肝炎；或由非酒精性脂肪性肝炎引起的肝细胞癌的作用，但不限于此。

[0483] 具体地，本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物表现出降低NAS (NAFLD活性评分)的作用，并且这意味着对非酒精性脂肪性肝炎具有治疗效果。

[0484] 在本发明中，“肝纤维化”是指由于反复肝损伤的创伤愈合过程，在修复或反应过程中，器官或组织中形成过多的纤维结缔组织。已知肝脏炎症的慢性化和加重是原因中的一个。已知与肝硬化不同，肝纤维化是可逆的，由薄纤维组成，并且没有结节形成，而且当肝损伤的原因消除后，肝脏可恢复到正常状态。然而，当这种肝纤维化过程反复进行时，细胞外基质(ECM)之间的交联增加，并且肝纤维化发展为不可逆的具有结节的肝硬化。根据本发明的组合物可对肝纤维化，具体是伴有非酒精性脂肪性肝炎的肝纤维化表现出预防或治疗作用，但不限于此。

[0485] 具体地，本发明的包含(i)表现出胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物可表现出对肝纤维化的作用，具体地可通过降低肝组织中的胶原表达来预防或治疗肝纤维化。

[0486] 在本发明中，“胆汁淤积(cholestasis)”是其中胆汁从肝脏向十二指肠的流动减慢或受阻的状况，“胆汁淤积性肝病(cholestasis liver disease)”意指肝脏内胆汁的形成受到诸如各种疾病、扩张的颈静脉营养、或某些药物(例如，一些抗生素)的副作用的状况的干扰。胆汁淤积的常见体征包括疲劳、瘙痒(发痒)、黄疸、和黄瘤(富含胆固醇的物质沉积在皮肤下)。胆汁淤积的影响是严重和广泛的，导致肝脏疾病加剧为全身性疾病，肝代偿失调，并且需要肝移植。胆汁淤积性肝病的病因包括急性肝炎和胆管炎症。

[0487] 胆汁淤积性肝病可包括原发性胆汁性胆管炎(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)、进行性家族性肝内胆汁淤积(PFIC)、和阿拉日耶(Alagille)综合征(AS)，但不限于此。

[0488] 原发性胆汁性肝硬化，也称为原发性胆汁性胆管炎(PBC)，是病因不明的慢性胆汁淤积性肝病。由于门脉(portal)和门静脉周(periportal)炎症导致的进行性胆管损害可导致进行性纤维化并且最终导致肝硬化。到目前为止，免疫、遗传和环境因素被认为是疾病的潜在原因。原发性胆汁性肝硬化主要见于中年女性，并且早期原发性胆汁性肝硬化的症状也可能是疲劳、发痒或不明原因的高脂血症。

[0489] 已知PBC是免疫介导的原发性胆汁硬化症。具体地，门脉和门静脉周区域中T淋巴细胞的免疫组化染色显示CD4阳性和CD8阴性的T细胞。在受影响个体的无症状一级亲属中报告了异常的抑制性T细胞活性。据报道，白细胞介素可能通过有助于改变免疫功能和纤维化在PBC的发病机制中发挥作用(G.J.Webb et al., J.Autoimmunity, 2015Nov; 64:42-52)。

[0490] PBC的治疗方法是使用熊去氧胆酸(UDCA)和奥贝胆酸(obeticholic acid, OCA)进行胆汁酸治疗。两种药物在PBC中的作用机制与它们激活FXR和TGR5以发挥抗炎作用的能力相关。然而，在用UDCA治疗的患者中，约40%的患者尚未获得足够的生化应答。

[0491] 原发性硬化性胆管炎(PSC)是由病因不明的肝内/肝外胆道炎症和纤维化引起的

慢性进行性胆汁淤积性肝病。具体地，PSC是胆管和胆道的炎症性疾病，并且随着疾病的进展，纤维化发生并且胆管壁变厚和变窄，导致胆道狭窄。虽然PSC的病因尚不知晓，但据估计，诸如遗传因素、环境因素和与之相关的免疫应答的各种因素是复杂的原因。

[0492] 当在使用血液进行的肝功能检测中观察到碱性磷酸酶水平升高、转氨酶水平升高和 γ 球蛋白血时，诊断为原发性硬化性胆管炎。

[0493] PSC的治疗方法尚未明确报道，而肝移植是唯一能从根本上治疗PSC的治疗方法。

[0494] 因此，仍然需要开发能够治疗PBS和PSC而无副作用，同时确保患者方便的药物。

[0495] 本发明的“肝硬化”是慢性疾病，其在肝细胞再生和纤维组织增加反复发生时发生，在病理上伴有坏死、炎症和纤维化，并且最终导致肝硬化并发症(如肝代偿失调)和疾病(如肝细胞癌)，导致死亡。肝硬化特别是在早期阶段是无症状的，并且因此只能在相当晚期被诊断。需要快速治疗肝纤维化，肝纤维化是在演变为肝硬化等之前的状况。根据本发明的组合物可对肝硬化，具体地伴有非酒精性脂肪性肝炎的肝硬化表现出预防或治疗作用，但不限于此。

[0496] 本发明的“肝代偿失调”是指其中由于肝脏损害或肝病(如病毒性肝炎、肝硬化、药物、或酒精)而肝功能减弱，并且肝脏不能执行作为正常生理功能的蛋白质合成和代谢功能的状况。肝代偿失调根据进展速度分为急性肝代偿失调或慢性肝代偿失调，并且已知引起各种并发症。根据本发明的组合物表现出诸如抑制炎症和纤维化的作用，并且因此可表现出对肝代偿失调的预防或治疗作用。

[0497] 本发明的“肝细胞癌”是指起源于肝细胞的恶性肿瘤，并且可分为开始于肝细胞本身的原发性肝癌(肝细胞癌)和从开始于另一组织的癌症扩散到肝脏的转移性肝癌，并且90%或更多的肝癌是原发性肝癌。除了肝炎和慢性肝病外，已知酒精、吸烟和肥胖症也是肝癌的主要原因。根据本发明的组合物可对肝细胞癌，具体地由非酒精性脂肪性肝炎引起的肝细胞癌表现出预防或治疗作用，但不限于此。

[0498] 在本发明的实例中，使用了高脂肪饮食诱导的肥胖小鼠和CD-HFD(胆碱缺乏和高脂肪、高胆固醇饮食)诱导的小鼠模型。CD-HFD饮食诱导的模型具有高脂肪和胆固醇含量，因此长时间摄入时可能导致脂肪肝和脂肪性肝炎。已知胆碱缺乏可能加重这种脂肪性肝炎，甚至导致纤维化。

[0499] 在本发明的实例中，已在模型的每个中检查了本发明的包含(i)显示胰高血糖素活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物的作用，并且结果表明组合物可用于预防或治疗代谢综合征和肝病如肝纤维化、单纯性脂肪变性、脂肪肝、和非酒精性脂肪性肝炎。

[0500] 根据本发明的组合物可以是执行以下特性中的一种或多种的组合物，但不限于此：

[0501] (a) 体重和脂肪减轻；

[0502] (b) 改善血脂水平；

[0503] (c) 改善胰岛素敏感性；

[0504] (d) 减少UCP-1和PGC-1 α 基因表达；

[0505] (e) 减少NAS (NAFLD活动评分)；和

[0506] (f) 减少肝组织中胶原蛋白的表达。

[0507] 根据本发明的组合物可能没有或具有相对低程度的体重增加,体重增加是现有肝病治疗剂的副作用。

[0508] 本发明的药物组合物可进一步包含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”意指足以显示治疗效果但不引起副作用的量,并且可由本领域技术人员根据医学领域中公知的因素(如疾病的种类、患者的年龄、体重、健康、性别、和对药物的敏感性、施用途径、施用方法、施用次数、治疗周期、和混合或同时使用的药物)容易地确定。

[0509] 本发明的包含表现出胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。载体不特别限于此,但可在口服施用时使用粘合剂、润滑剂、崩解剂、赋形剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂、香料等;在注射的情况下,可在混合物中使用缓冲剂、保存剂、镇痛剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等;并且碱、赋形剂、润滑剂、保存剂等可用于局部施用。

[0510] 本发明组合物的配方(制剂, formulation)可通过与上述药学上可接受的载体混合以各种形式制备。例如,可在口服施用,组合物可制备为片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂(wafer)等的形式;并且在注射的情况下,组合物可制备为单位剂量安瓿或多种剂型的形式。此外,组合物可以配制成溶液、悬浮剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂等。

[0511] 适合形成制剂的载体、赋形剂和稀释剂的实例可使用乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、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、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁、或矿物油。制剂可进一步含有填充剂、抗凝剂、润滑剂、润湿剂、香料、防腐剂等。

[0512] 本发明的药物组合物可以具有选自片剂、丸剂、粉末、颗粒剂、胶囊剂、悬浮剂、口服液、乳剂、糖浆剂、无菌水溶液、非水性溶剂、冻干制剂和栓剂中的任何一种制剂。

[0513] 根据药物领域中的常规方法,组合物可被配制成适合于施用到患者身体内的单位剂型的制剂形式,具体地被配制成对肽药物施用有用的制剂形式,并且通过口服施用途径或肠胃外施用途径(包括皮肤、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、肺、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、胃肠道、局部、舌下、阴道、或直肠途径)用本领域通常使用的施用方法施用,但配制方法和施用方法不限制于此。

[0514] 表现出胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂可通过与各种药学上可接受的载体(如,生理盐水或有机溶剂)混合使用,并且为了增加稳定性或吸收,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,或其他稳定剂可用作药剂。

[0515] 本发明药物组合物的剂量和施用数量根据作为活性成分的药物种类以及若干相关因素(如待治疗的疾病、施用途径、患者的年龄、性别和体重、和疾病的严重程度)一起确定。

[0516] 尽管不特别限于此,然而本发明的药物组合物可含有重量体积比为0.01%至99%的组分(活性成分)。

[0517] 总有效量的本发明组合物可以单剂量施用给患者,并且可以通过多剂量长时间段

施用的分次治疗方案施用。根据疾病的严重程度,本发明的药物组合物可含有不同量的活性成分。具体地,本发明的显示胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂的优选总剂量可为每天每kg患者体重约0.0001 μ g至500mg。

[0518] 具体地,本发明的组合物可包含0.15nmol/kg至2.5nmol/kg、0.19nmol/kg至2.25nmol/kg、0.25nmol/kg至1.5nmol/kg、0.37nmol/kg至1.12nmol/kg的表现出胰高血糖素活性的物质,和2.0nmol/kg至35nmol/kg、2.08nmol/kg至31.16nmol/kg、10.39nmol/kg至31.16nmol/kg的GLP-1和GIP受体双重激动剂;更具体地,0.37nmol/kg、0.75nmol/kg或1.12nmol/kg的表现出胰高血糖素活性的物质,和10.39nmol/kg、20.77nmol/kg或31.16nmol/kg的GLP-1和GIP受体双重激动剂,但不限于此。本发明的组合物可包含摩尔比为1:0.1至1:500、1:0.5至1:250、1:0.9至1:167、或1:10至1:56.2的表现出胰高血糖素活性的物质与GLP-1和GIP受体双重激动剂,但不限于此。

[0519] 然而,考虑各种因素,如疾病的严重程度和患者的年龄、体重、健康状况、性别、饮食、和排泄率、以及药物组合物的施用途径和治疗次数,来确定肽的剂量作为对患者的有效剂量。考虑到这点,本领域的普通技术人员将能够根据本发明组合物的具体用途来确定适当的有效剂量。只要显示了本发明的作用,根据本发明的药物组合物在其配方、施用途径和施用方法方面不特别受限制。

[0520] 本发明的药物组合物可以具有优异的体内功效的持续时间和效价,并且与其他药物相比,可以具有较少的施用次数和较低的施用频率,但不特别限于此。

[0521] 具体地,本发明的药物组合物包含胰高血糖素衍生物作为活性成分,其与天然胰高血糖素相比具有改变的pI,因此在中性pH下表现出改善的溶解度和/或高稳定性,并且因此可有用地用于制备用于治疗包括代谢综合征的目标疾病的稳定胰高血糖素制剂。

[0522] 在用于预防或治疗代谢综合征药物组合物、预防或治疗代谢综合征的疗法等中,除了对胰高血糖素受体表现出活性的物质和/或GLP-1和GIP受体双重激动剂外,药物组合物还可包含对代谢综合征表现出治疗活性的化合物或物质,并且疗法可包括化合物或物质的进一步用途。

[0523] 体现本发明的另一方面提供了用于预防或治疗代谢综合征的方法,包括向有需要的个体施用对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂。

[0524] 对胰高血糖素受体表现出活性的物质、GLP-1和GIP受体双重激动剂、包含这些的组合物、代谢综合征、预防、和治疗如上所述。

[0525] 在本发明中,个体为疑似代谢综合征的个体,并且疑似代谢综合征的个体指诸如小鼠和家畜的哺乳动物,包括患有或可能患有疾病的人类,并且包括但不限于,可使用胰高血糖素衍生物或包含本发明胰高血糖素衍生物的组合物治疗的个体。可通过向疑似患有代谢综合征的个体施用本发明的药物组合物来有效治疗个体。代谢综合征如上所述。

[0526] 本发明的方法可包括施用包含药学上有效量的(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的药物组合物。根据本发明的方法可以是,但不限于,将(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂作为一种制剂施用;或将(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂作为单独制剂同时、单独、顺序地或以相反顺序施用。

[0527] 治疗医师可在合理的医学判断范围内确定适当的日总量,并且可施用一次或分为

几次剂量施用几次。然而,出于本发明的目的,针对具体患者的具体治疗有效量优选地根据医学领域中公知的各种因素和类似因素包括待实现的应答的种类和程度、包括是否任选使用了其他制剂的具体组合物、患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食、施用时间、施用途径、组合物的分泌率、治疗周期,以及与具体组合物一起或同时使用的药物,而不同地应用。

[0528] 具体地,对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂,可各自以每天每1kg患者体重约0.0001mg至500mg施用。当这两种物质组合使用时,其总施用量可为每天每1kg患者体重约0.0001mg至1000mg,但施用量不限于此。

[0529] 组合施用的对胰高血糖素受体表现出活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂可以1:0.01至1:100的摩尔比施用,但摩尔比不限于此。

[0530] 具体地,可以0.15nmol/kg至2.5nmol/kg、0.19nmol/kg至2.25nmol/kg、0.25nmol/kg至1.5nmol/kg、或0.37nmol/kg至1.12nmol/kg施用表现出胰高血糖素活性的物质,并且可以2.0nmol/kg至35nmol/kg、2.08nmol/kg至31.16nmol/kg、或10.39nmol/kg至31.16nmol/kg施用GLP-1和GIP受体双重激动剂;并且更具体地,可以0.37nmol/kg、0.75nmol/kg、或1.12nmol/kg施用表现出胰高血糖素活性的物质,并且可以10.39nmol/kg、20.77nmol/kg或31.16nmol/kg施用GLP-1和GIP受体双重激动剂,但施用量不限于此。可以1:0.1至1:500、1:0.5至1:250、1:0.9至1:167、或1:10至1:56.2的摩尔比施用表现出胰高血糖素活性的物质以及GLP-1和GIP受体双重激动剂,但摩尔比不限于此。

[0531] 尽管不特别限于此,用于预防或治疗代谢综合征的方法可以是组合疗法,其进一步包括除了施用(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂,还施用对一种或多种代谢综合征表现出治疗活性的化合物或物质。

[0532] 体现本发明的另一方面提供了包含(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物用于预防或治疗代谢综合征的用途。

[0533] 体现本发明的另一方面提供了包含(i)对胰高血糖素受体表现出活性的物质和(ii)GLP-1和GIP受体双重激动剂的组合物在制备用于预防或治疗代谢综合征的药物中的用途。

[0534] 在下文中,将通过实例更详细地描述本发明。然而,这些实例用于本发明的示例性目的,并且本发明的范围不限于这些实例。

[0535] 实施例1:产生对胰高血糖素显示cAMP应答的细胞系

[0536] 使用人类胰高血糖素受体基因(OriGene Technologies, Inc. USA)的cDNA中与ORF相对应的部分作为模板,和分别包括EcoRI切割位点和XhoI切割位点的SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:49的正向引物和反向引物进行了PCR。

[0537] 此时,PCR反应在95°C下变性60秒,在55°C下退火60秒,和在68°C下延伸30秒,重复30次。在1.0%琼脂糖凝胶上电泳,然后通过洗脱450bp的条带获得了由此扩增的PCR产物。

[0538] 正向引物(SEQ ID NO:48):

[0539] 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

[0540] 反向引物(SEQ ID NO:49):

[0541] 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

[0542] 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。

[0543] 使用脂质体 (lipofectamine) 将由此制备的重组载体x0GC/GCGR转化到在含有10%FBS的DMEM/F12培养基中培养的CHO DG44细胞中,并且在含有1mg/mL G418和10nM甲氨蝶呤的选择培养基中选择性培养。由此,通过限制性稀释选择了单克隆细胞系。其中,最终选择了对胰高血糖素显示出优异的浓度依赖性cAMP应答的细胞系。

[0544] 实施例2:胰高血糖素衍生物的合成

[0545] 为了开发表现出改善的物理特性的胰高血糖素衍生物,将SEQ ID NO:1的天然胰高血糖素的氨基酸序列用带负电荷和带正电荷的氨基酸残基取代,以合成下表1中表示的胰高血糖素衍生物。通过以下实施例4所述的方法测量了本文所述的相对体外活性。

[0546] [表1]

[0547] 天然胰高血糖素及胰高血糖素衍生物的氨基酸序列

[0548]

SEQ ID NO	肽序列	环形成 存在或不存在	pI	体外活性(与 SEQ ID NO: 1 的相对活 性, %)
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLD SRRA QDFVQWLMNT	-	6.8	100
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLD CDRA QDFVQWLMNT	-	4.56	0.6
SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLD CERA QDFVQWLMNT	-	4.66	6.1
SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLD SCDA QDFVQWLMNT	-	4.13	<0.1
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLD SCEA QDFVQWLMNT	-	4.22	0.3
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLD SCEADDF VQWLMNT	-	4.03	<0.1
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLD SCEADDF VQWLMNT	-	3.71	<0.1
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLD SCDA QDFVQWLINT	-	3.77	<0.1
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLD SCDA QDFV V WLINT	-	3.77	<0.1
SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLD SCDADDF VVWLINT	-	3.66	<0.1
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLD EKCAKE FVQWLMNT	-	4.78	4.6
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLD EKRAKE FVQWLMNTC	环形成	6.20	56.3
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSCYLD SRRA QDFVQWLMNT	-	4.43	5.2
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLD CKRAKE FVQWLMNT	-	8.12	18.1
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLD CEKRA QDFV V WLINT	-	6.11	1.1
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLD CRRRA QVFVQWLMRT	-	9.11	4.2
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLD CVRA QDFVQWLMRT	-	6.03	23.2
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLD SRACDF RWLWMNT	-	8.15	<0.1
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLD CEKRAKE FVQWLMNT	环形成	8.12	12.1
SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLD ECRAKE FVQWLMNT	环形成	4.78	299.7
SEQ ID NO: 21	YXQGTFTSDYSKYLD EKCAKE FVQWLMNT	环形成	4.78	57.8

SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>KRCK</u> KEFVQWLMNT	环形成	6.20	147.8
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYCDE <u>KRAK</u> KEFVQWLMNT	环形成	6.20	76.8
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>KRAK</u> KEFVQWLMNT	环形成	6.21	58.0
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>KRAK</u> CFVQWLMNT	环形成	8.12	46.9
SEQ ID NO: 26	WXQGTFTSDYSKYLDE <u>CRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	4.68	1.0
SEQ ID NO: 27	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>CRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	4.68	93.6
SEQ ID NO: 28	WXQGTFTSDYSKYLDE <u>CRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	4.68	<0.1
SEQ ID NO: 29	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>ERRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	6.15	61.3
SEQ ID NO: 30	WXQGTFTSDYSKCLDE <u>ERRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	4.44	0.3
SEQ ID NO: 31	YXQGTFTSDYSKYLDC <u>KRAK</u> EFVQWLMNT	环形成	8.12	6.3
SEQ ID NO: 32	-SQGTFTSDYSKYLDE <u>CRAK</u> EFVQWLMNT	环形成	4.78	0.7
[0549] SEQ ID NO: 33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.04	108.2
SEQ ID NO: 34	WXQGTFTSDYSKYCDE <u>ERRAK</u> KEFVQWLMNT	环形成	6.21	0.2
SEQ ID NO: 35	YXQGTFTSDYSKYCDE <u>ERRAK</u> KEFVQWLMNT	环形成	6.2	17.7
SEQ ID NO: 36	YXQGTFTSDCSKYLDE <u>ERRAK</u> KEFVQWLMNT	环形成	6.21	9.9
SEQ ID NO: 37	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>ERRAK</u> EFVQWLMNTC	环形成	6.21	225.5
SEQ ID NO: 38	YXQGTFCSDYSKYLDE <u>ERRAK</u> EFVQWLMNT	环形成	6.15	167.3
SEQ ID NO: 39	YXQGTFTSDCSKYLDE <u>ERRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	6.15	3.7
SEQ ID NO: 40	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>ERRAK</u> DFVQWLMNTC	环形成	6.15	40.8
SEQ ID NO: 41	YXQGTFCSDYSKYLDE <u>ERRAK</u> DFVQWLMNT	环形成	6.03	45.2
SEQ ID NO: 42	YXQGTFCSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.03	37.9
SEQ ID NO: 43	YXQGTFTSDCSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.03	1.6
SEQ ID NO: 44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTC	-	6.21	75.4
SEQ ID NO: 45	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>KRAK</u> EFVQWLMNT	-	4.78	5.2

[0550] 表1中表示的序列中由X指示的氨基酸代表非天然氨基酸氨基异丁酸(Aib),在氨基酸符号下加下划线指代在相应加下划线的氨基酸对的侧链之间形成内酰胺环,而“-”指代该位置没有氨基酸残基。在环形成存在或不存在的列中,“-”指代序列中未形成环。

[0551] 实施例3:胰高血糖素衍生物pI的测量

[0552] 为了验确认施例2中合成的胰高血糖素衍生物的改善物理特性,在ExPASy服务器上使用pI/Mw工具(http://expasy.org/tools/pi_tool.html;Gasteiger et al.,2003)从氨基酸序列估计pI。

[0553] 如上文表1表示的,SEQ ID NO:1的天然胰高血糖素的pI为6.8,而根据本发明的一些胰高血糖素衍生物的pI在约4到6的范围内。这些胰高血糖素衍生物的pI低于或高于天然胰高血糖素的pI,因此在中性pH和类似pH下,与天然胰高血糖素相比,可表现出改善的溶解性和更高的稳定性。

[0554] 当根据本发明的此类胰高血糖素衍生物用作目标疾病如代谢综合征的治疗剂时,可增加患者依从性,并且这些胰高血糖素衍生物适合与其他抗肥胖症或糖尿病药物组合施用,并且可有效地用作代谢综合征(包括肥胖症、糖尿病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、血脂障碍和冠心病)的治疗剂。

[0555] 实施例4:胰高血糖素衍生物的cAMP活性测量

[0556] 在具有实施例1中产生的人类胰高血糖素受体的细胞系中,测量了实施例2中合成的胰高血糖素衍生物的活性。具体地,将转化的细胞系每周传代3或4次,然后将传代的细胞系以每孔 6×10^3 接种在384孔板中并且培养24小时。在含有0.5mM IBMX (3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)、0.1%BSA(牛血清白蛋白)、和5mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)的HBSS (Hanks平衡盐溶液)缓冲液中,天然胰高血糖素以200nM悬浮并且胰高血糖素衍生物以1600nM悬浮,然后连续稀释4倍10次。将其应用于cAMP测定试剂盒(LANCE cAMP 384试剂盒,Perkinlemer)并且添加到培养的细胞系,然后测量荧光值。测量后,选择最高荧光值为100%,由此计算胰高血糖素衍生物的 EC_{50} 值,并且将该值与天然胰高血糖素的 EC_{50} 值进行比较。上表1表示了结果。

[0557] 实施例5:包含胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc的缀合物(胰高血糖素衍生物-免疫球蛋白Fc区缀合物)的制备

[0558] 选择实施例2中制备的pI值为6到7并且体外活性为200%或更高的胰高血糖素衍生物作为代表性的胰高血糖素衍生物,以制备缀合物。具体地,对于在两个末端分别具有马来酰亚胺基和醛基的10kDa的PEG(即,马来酰亚胺-PEG-醛(10kDa,NOF,日本))与胰高血糖素衍生物的半胱氨酸残基的聚乙二醇化,胰高血糖素衍生物与马来酰亚胺-PEG-醛的摩尔比设置为1:1至5,并且蛋白质浓度设置为3mg/mL至10mg/mL,反应在低温下进行1至3小时。此时,在其中将20%至60%异丙醇添加到50mM Tris缓冲液(pH7.5)的环境中进行反应。反应完成后,将反应溶液应用于SP琼脂糖HP(GE Healthcare,USA),以纯化对半胱氨酸单聚乙二醇化的胰高血糖素衍生物。

[0559] 接下来,纯化的单聚乙二醇化胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc(SEQ ID NO:71的同源二聚体)通过将摩尔比设置为1:2至10和蛋白质浓度设置为10mg/mL至50mg/mL,在4℃至8℃下反应12至18小时。反应在其中将10mM至50mM氰基硼氢化钠和10%至20%异丙醇作为还原剂添加到100mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)的环境中进行。反应完成后,将反应溶液应用到丁基琼脂糖FF纯化柱(GE Healthcare,USA)和Source IS0纯化柱(GE Healthcare,USA),以纯化包含胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc的缀合物。

[0560] 在免疫球蛋白Fc中,两个具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列(由221个氨基酸组成)的单体通过半胱氨酸——半胱氨酸是每个单体的第3个氨基酸——之间的二硫键形成同源二聚体——,并且同源二聚体的每个单体中独立形成在第35和95位的半胱氨酸之间的二硫键和第141和199位的半胱氨酸之间的二硫键。

[0561] 制备后,通过反相色谱、尺寸排阻色谱和离子交换色谱分析的纯度为95%或更高。

[0562] 这里,其中胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc经由PEG连接的缀合物命名为“胰高血糖素衍生物长效缀合物”或“长效胰高血糖素衍生物”,并且这些缀合物可在本文中互换使用。

[0563] 实施例6:产生对GLP-1和GIP显示cAMP应答的细胞系

[0564] 使用表达载体X0GC/dhfr构建了重组载体以表达人类GLP-1受体和人类GIP受体,然后使用脂质体将其转化到CHO DG44细胞中,并且在含有G418和甲氨蝶呤的选择培养基中选择性培养。由此,通过限制性稀释选择单克隆细胞系。其中,最终选择了对GLP-1和GIP显示出优异的浓度依赖性cAMP应答的细胞系。

[0565] 实施例7:酰化GLP-1和GIP受体双重激动剂的制备

[0566] 合成了对GLP-1受体和GIP受体均显示活性的双重激动剂泰瑞帕肽,并且参考已知方法(WO 2016-111971 A1)执行了其制备方法。

[0567] 实施例8:酰化GLP-1和GIP受体双重激动剂的cAMP活性的测量

[0568] 在表达实施例6中产生的人类GLP-1受体和人类GIP受体的细胞系中,测量了实施例7中合成的双重激动剂的活性。

[0569] 具体地,实施例6的转化的细胞系每周传代3或4次,然后将传代细胞系以每孔 6×10^3 接种在384孔板中并且培养24小时。在含有0.5mM IBMX (3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)、0.1%BSA(牛血清白蛋白)、和5mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸)的HBSS(Hanks平衡盐溶液)缓冲液中,天然GLP-1和GIP以200nM悬浮并且双重激动剂以1600nM悬浮,然后连续稀释4倍10次。将其应用于cAMP测定试剂盒(LANCE-cAMP 384试剂盒,Perkinlemer)并且添加到培养细胞系中的每个,然后测量荧光值。此后,选择每个细胞系中使用的处于最高浓度的天然物质的荧光值为100%,由此计算双重激动剂的 EC_{50} 值,并且将该值与天然GLP-1和GIP的 EC_{50} 值进行比较。下表2表示了结果。

[0570] [表2]

[0571]	测试物质	与天然配体相比的相对体外活性(EC_{50})	
		GLP-1 受体	GIP 受体
[0572]	双重激动剂 (泰瑞帕肽)	1.3%	6.7%

[0573] 实验实例1:比较长效胰高血糖素衍生物和双重激动剂对高脂肪饮食诱导的肥胖小鼠体重和脂肪重量减轻、血脂水平改善、胰岛素敏感性改善、和能量代谢相关基因表达增加的作用,并且验证由于组合施用的其他作用

[0574] 本研究采用了被广泛用作肥胖动物模型的高脂肪饮食诱导的肥胖小鼠。施用前小鼠的体重约为50g至55g。在研究期间,7只老鼠在住所中并且可以自由获得水。从6P.M.到6A.M.,灯都关掉。

[0575] 在高脂肪饮食喂养的试验组中,第1组施用了不含长效胰高血糖素衍生物的运载体(vehicle) (5mL/kg,每两天注射一次)——对照组(运载体),第2组以50nmol/kg施用了GLP-1类似物抗肥胖症药物Saxenda®(每天注射两次),第3组以2.0nmol/kg施用了长效胰高血糖素衍生物(每两天注射一次),第4组以20nmol/kg施用了双重激动剂(泰瑞帕肽)(每两天注射一次),第5组组合施用了20nmol/kg的双重激动剂(每两天注射一次)和2.0nmol/kg的长效胰高血糖素衍生物(每两天注射一次)。所有病例均通过皮下注射执行施用。

[0576] 实验于第21天结束,实验期间每两天测量对应各个组的小鼠的体重变化。实验结束后,测量了组织中的脂肪重量、血脂水平、HOMA-IR、和能量代谢相关基因表达。

[0577] 作为测量体重的变化的结果,从图1可以看出,长效胰高血糖素衍生物(2.0nmol/kg,每两天施用一次)单独施用组以及长效胰高血糖素衍生物(2.0nmol/kg,每两天施用一次)和双重激动剂(泰瑞帕肽)(20nmol/kg,每两天注射一次)组合施用组中的体重与施用前相比分别改变了-34.92%和-51.16%。组合施用组中的体重减轻作用高于长效胰高血糖素衍生物单独施用组,且这个作用优于对照组(运载体)、GLP-1类似物抗肥胖症药物Saxenda®、和双重激动剂(泰瑞帕肽)中的2.22%、-14.73%、和-19.39%的体重减轻效果。

[0578] 从图2 (A) 和图2 (B) 中可以看出,证实了随着体重减轻,脂肪重量和血脂水平一起显著降低。如图3 (A) 示例的,从HOMA-IR测量结果确认了胰岛素敏感性也得到了改善。此外,如图3 (B) 示例的,也确认了脂肪组织中能量代谢相关基因 (UCP-1,与热能产生相关的标记物,以及PGC-1 α ,与线粒体生物合成相关的标记物) 的表达增加。

[0579] 实验实例2:长效胰高血糖素衍生物和双重激动剂对胆碱缺乏和高脂肪、高胆固醇饮食诱导的NASH和纤维化小鼠的NASH和纤维化改善的作用

[0580] 为了验证在实施例中制备的根据本发明的长效胰高血糖素衍生物和GLP-1/GIP双重激动剂(泰瑞帕肽)的组合施用对NASH和纤维化改善的功效,使用了CD-HFD(胆碱缺乏和高脂肪、高胆固醇饮食)小鼠模型。

[0581] 将8周CD-HFD诱导的小鼠分为运载体对照组、长效胰高血糖素衍生物(1.3nmol/kg,Q2D,皮下)施用组、双重激动剂(73nmol/kg,Q2D,皮下)施用组、和长效胰高血糖素衍生物和双重激动剂组合施用组,并且重复施用执行了6周。使用了施用运载体给正常饮食小鼠的组,作为阴性对照组。重复施用6周后,对每只小鼠的肝组织进行了尸检,并且通过H&E染色测量NAS (NAFLD活性评分) 并且通过定量PCR测量胶原表达,评估了对NASH和纤维化改善的功效。

[0582] 因此,确认了当长效胰高血糖素衍生物或双重激动剂重复施用6周时,与CD-HFD饮食、运载体对照组相比,NAS显著减少。

[0583] 此外,确认了当长效胰高血糖素衍生物和双重激动剂组合施用时,其他NAS减少是显著的(图4),并且由此确认了可通过组合施用进一步增强长效胰高血糖素衍生物和GLP-1/GIP双重激动剂对NASH改善的功效。

[0584] 此外,在CD-HFD饮食中,肝组织中的胶原表达增加,通过施用长效胰高血糖素衍生物或双重激动剂,运载体对照组显著减少,并且也确认了通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和双重激动剂,这种减少被进一步增强(图5)。

[0585] 确认了通过组合施用长效胰高血糖素衍生物和GLP-1/GIP双重激动剂,通过减少肝组织中的NAS和胶原表达的作用,可在CD-HFD小鼠中获得对NASH和肝纤维化改善的优异功效。

[0586] 对于所有病例的统计处理,使用单因素方差分析比较了运载体组(对照组)和试验组,并且使用了t-检验以比较组合施用组和单独施用组的其他功效(*至*** $p < 0.05$ 至 0.001 vs. 运载体对照组)。

[0587] 这些结果表明,长效胰高血糖素衍生物比作为其他抗肥胖症药物的单独GLP-1类似物和单独双重激动剂表现出更高的体重减轻作用。此外,当长效胰高血糖素衍生物与GLP-1和GIP受体双重激动剂组合施用时,已经确认了不仅可以预期通过其他体重减轻对肥胖症治疗的增强作用,还可以预期通过胰岛素敏感性改善对血糖改善的作用。已经确认了当组合施用长效胰高血糖素衍生物以及GLP-1和GIP受体双重激动剂时,除了这些改善肥胖症和血糖的作用外,通过肝组织中NAS和胶原表达的减少,可以获得对诸如非酒精性脂肪性肝炎或由其引起的肝纤维化的肝病的优异作用。

[0588] 基于上述描述,本领域技术人员将理解,在不改变其技术精神或必要特征的情况下,本发明可以不同的具体形式实施。因此,应当理解,上述实施方式不是限制性的,而在所有方面是示例性的。本公开的范围由所附权利要求书而不是其前面的说明书来限定,因此,

落入权利要求书的界限内或此界限的等同物内的所有改变和修改都意在被权利要求书所涵盖。

<110> 韩美药品株式会社
 <120> 胰高血糖素和GLP-1/GIP受体激动剂的组合物、及其治疗用途
 <130> OPA20169
 <150> KR 10-2019-0123250
 <151> 2019-10-04
 <160> 71
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <400> 2
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 3
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <400> 3
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<400> 7

Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Cys Glu Ala Asp Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 胰高血糖素衍生物
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
<400> 10
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Cys Asp Ala Asp Asp Phe Val Val Trp Leu Ile Asn Thr
 20 25
<210> 11
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 胰高血糖素衍生物
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
<400> 11
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15
Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
<210> 12
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 胰高血糖素衍生物
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 12

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

<210> 13

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 13

Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Cys	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr			
			20					25							

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 14

Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Cys
1				5					10					15	
Lys	Arg	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr			
			20					25							

<210> 15

<211> 29

<212> PRT

1	5	10	15
Val Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Arg Thr			
	20	25	
<210> 18			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 胰高血糖素衍生物			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (2)			
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)			
<400> 18			
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser			
1	5	10	15
Arg Arg Ala Cys Asp Phe Arg Leu Trp Leu Met Asn Thr			
	20	25	
<210> 19			
<211> 29			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 胰高血糖素衍生物			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (2)			
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (16) .. (20)			
<223> 第16和20位氨基酸形成环			
<400> 19			
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Cys Glu			
1	5	10	15
Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr			
	20	25	
<210> 20			
<211> 29			

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (20)
 <223> 第16和20位氨基酸形成环
 <400> 20
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Cys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 21
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (20)
 <223> 第16和20位氨基酸形成环
 <400> 21
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Cys Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 22
 <211> 29
 <212> PRT

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 24

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

 20 25

<210> 25

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 25

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

1 5 10 15

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

 20 25

<210> 26

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 26

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

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

20

25

<210> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 27

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

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

20

25

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 28

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

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

 20 25

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 29

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu

1 5 10 15

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

 20 25

<210> 30

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (20)
 <223> 第16和20位氨基酸形成环
 <400> 30
 Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 31
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17) .. (21)
 <223> 第17和21位氨基酸形成环
 <400> 31
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 32
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (15) .. (19)

<223> 第15和19位氨基酸形成环

<400> 32

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

1 5 10 15

Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 33

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 34

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 34

Trp Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu

1 5 10 15

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

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 35

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Cys Asp Glu
 1 5 10 15

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

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (20)

<223> 第16和20位氨基酸形成环

<400> 36

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

Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

	20	25	
<210>	37		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	胰高血糖素衍生物		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(2)		
<223>	Xaa是氨基异丁酸 (Aib)		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(16) .. (20)		
<223>	第16和20位氨基酸形成环		
<400>	37		
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu			
1	5	10	15
Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys			
	20	25	30
<210>	38		
<211>	29		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	胰高血糖素衍生物		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(2)		
<223>	Xaa是氨基异丁酸 (Aib)		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(16) .. (20)		
<223>	第16和20位氨基酸形成环		
<400>	38		
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu			
1	5	10	15
Arg Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr			
	20	25	

<210> 39
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (20)
 <223> 第16和20位氨基酸形成环
 <400> 39
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Cys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 40
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (20)
 <223> 第16和20位氨基酸形成环
 <400> 40
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30
 <210> 41

<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 胰高血糖素衍生物
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16) .. (20)
<223> 第16和20位氨基酸形成环
<400> 41
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15
Arg Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 42
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 胰高血糖素衍生物
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)
<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
<400> 42
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Cys Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 43
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 43

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

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 44

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

<210> 45

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胰高血糖素衍生物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)

<400> 45

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

- <210> 46
- <211> 30
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 胰高血糖素衍生物
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (2)
- <223> Xaa是 α -甲基谷氨酸、氨基异丁酸 (Aib)、D-丙氨酸、甘氨酸、Sar (N-甲基甘氨酸)、丝氨酸、或D-丝氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (7)
- <223> Xaa是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (10)
- <223> Xaa是酪氨酸或半胱氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (12)
- <223> Xaa是赖氨酸或半胱氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (13)
- <223> Xaa是酪氨酸或半胱氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (14)
- <223> Xaa是亮氨酸或半胱氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (15)
- <223> Xaa是天冬氨酸、谷氨酸、或半胱氨酸
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (16)
- <223> Xaa是谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、 α -甲基谷氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的；

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)
<223> Xaa是天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、或缬氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)
<223> Xaa是丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)
<223> Xaa是丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)
<223> Xaa是赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸、 α -甲基谷氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)
<223> Xaa是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)
<223> Xaa是异亮氨酸、缬氨酸、或精氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)
<223> Xaa是缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、 α -甲基谷氨酸、或亮氨酸、或是不存在的；
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)
<223> Xaa是异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、或精氨酸、或是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)

<223> Xaa是谷氨酰胺、赖氨酸、天冬酰胺、或精氨酸、或是不存在的
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)
 <223> Xaa是半胱氨酸、或是不存在的
 <400> 46
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Xaa Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Thr Xaa
 20 25 30
 <210> 47
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 胰高血糖素衍生物
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是氨基异丁酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)
 <223> Xaa是苏氨酸、缬氨酸、或半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)
 <223> Xaa是酪氨酸或半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)
 <223> Xaa是赖氨酸或半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)
 <223> Xaa是天冬氨酸或半胱氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)

<223> Xaa是谷氨酸或丝氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)

<223> Xaa是赖氨酸或精氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)

<223> Xaa是谷氨酰胺或赖氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)

<223> Xaa是天冬氨酸或谷氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> Xaa是缬氨酸或谷氨酰胺

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> Xaa是半胱氨酸、或是不存在的

<400> 47

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

Xaa	Arg	Ala	Xaa	Xaa	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Met	Asn	Thr	Xaa
		20						25					30

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400> 48

cagcgacacc gaccgtcccc ccgtaacttaa ggcc 34

<210> 49

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物
 <400> 49
 ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32
 <210> 50
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 泰瑞帕肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa是2-甲基丙氨酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)
 <223> Xaa是2-甲基丙氨酸 (Aib)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)
 <223> Xaa是N6- {N- (氢二十碳烷二酰) -g-Glu- 双[亚氨基双(乙烯氧基)乙酰基]}-赖
 氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (39)
 <223> Xaa是L-丝氨酰胺
 <400> 50
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15
 Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35
 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 51
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1	5	10
<210>	52	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	铰链区的变体	
<400>	52	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro		
1	5	10
<210>	53	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	铰链区的变体	
<400>	53	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Pro		
1	5	10
<210>	54	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	铰链区的变体	
<400>	54	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser		
1	5	10
<210>	55	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	铰链区的变体	
<400>	55	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		
1	5	10
<210>	56	
<211>	8	

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 56
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
1 5
<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 57
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
1 5
<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 58
Glu Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
1 5
<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 59
Glu Ser Pro Ser Cys Pro
1 5
<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 铰链区的变体
<400> 60
Glu Pro Ser Cys Pro
1 5
<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 61
Pro Ser Cys Pro
1
<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 62
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Cys Pro
1 5 10
<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 63
Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro
1 5
<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 64
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Ser Cys Pro

1 5
<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 65
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
1 5
<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 66
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
1 5
<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 67
Glu Ser Lys Pro Ser Cys Pro
1 5
<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 铰链区的变体
<400> 68
Glu Ser Pro Ser Cys Pro
1 5
<210> 69
<211> 4

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 铰链区的变体
 <400> 69
 Glu Pro Ser Cys
 1
 <210> 70
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 铰链区的变体
 <400> 70
 Ser Cys Pro
 1
 <210> 71
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 71
 Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 1 5 10 15
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 20 25 30
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 85 90 95
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 100 105 110
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 115 120 125
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 130 135 140

Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
145					150					155					160
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
					165					170					175
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			180							185					190
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			195							200					205
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
			210							215					220

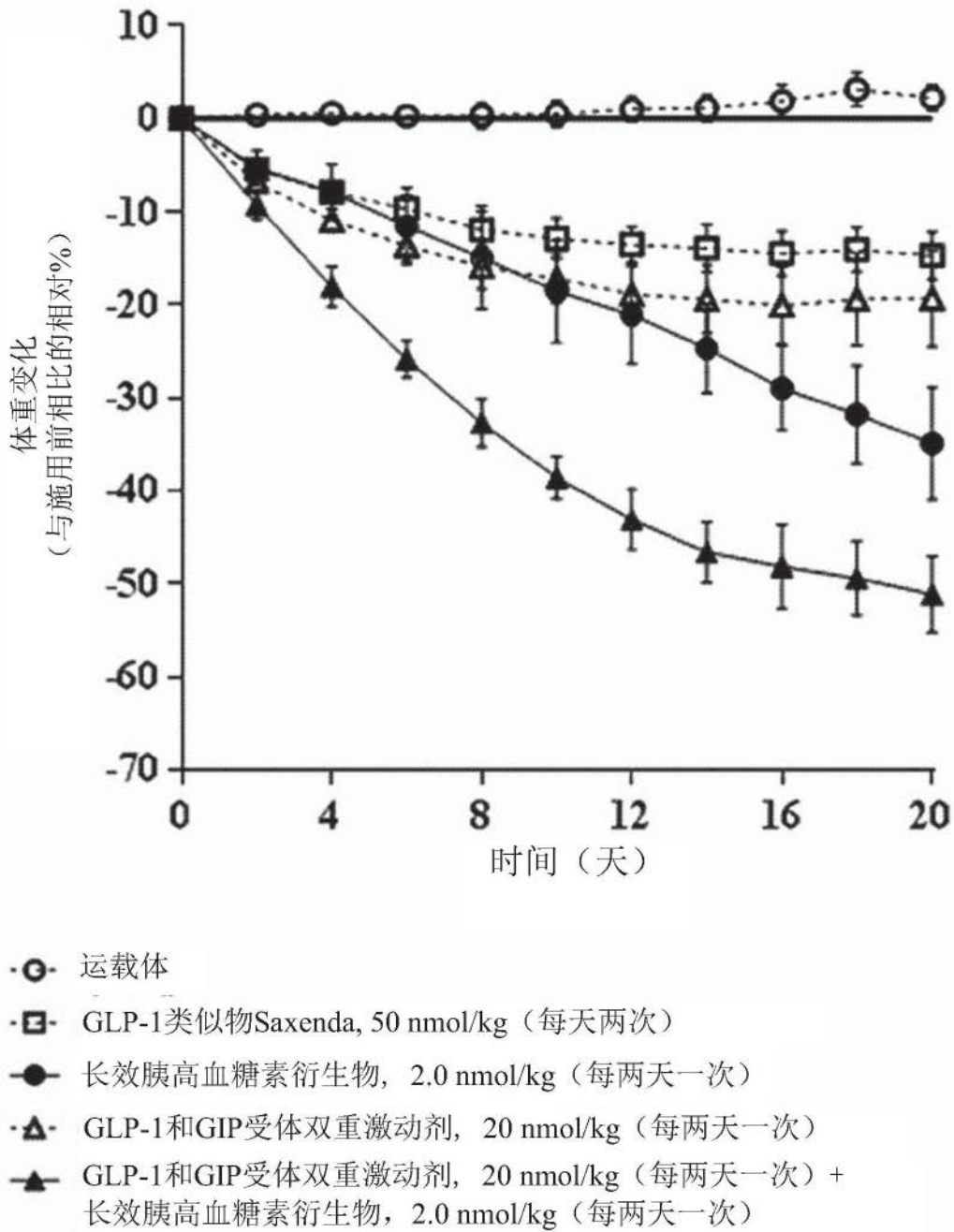


图1

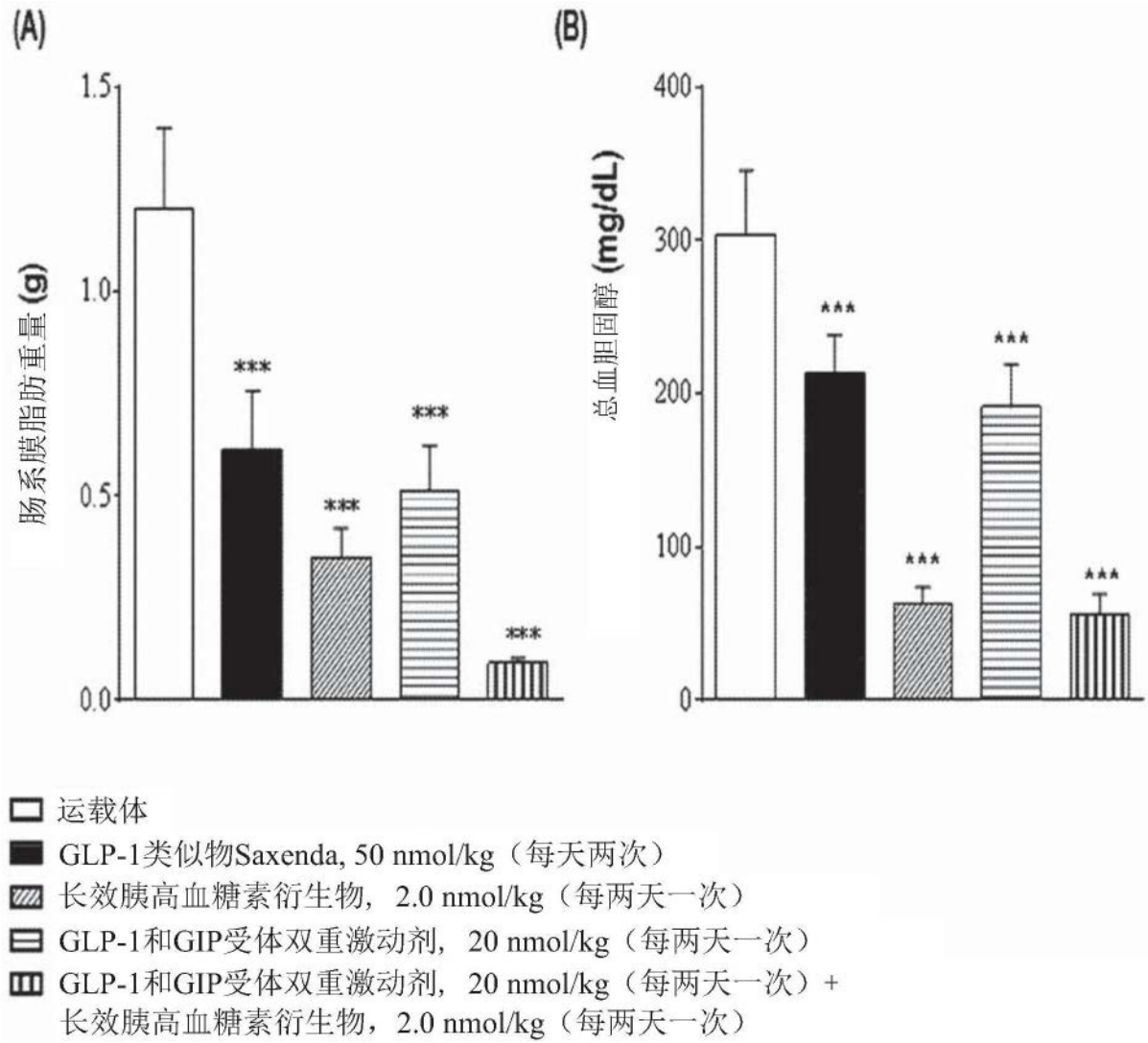


图2

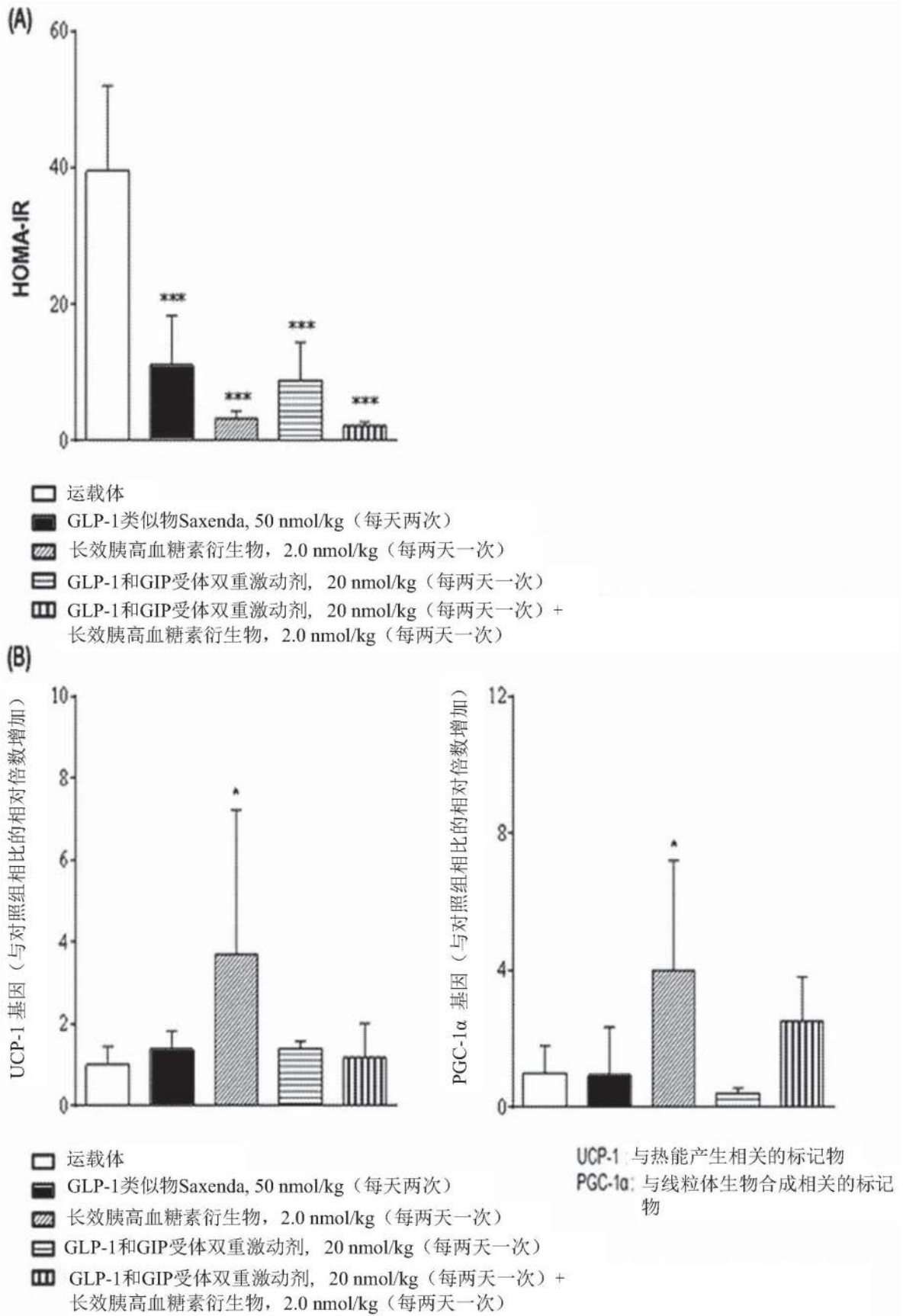


图3

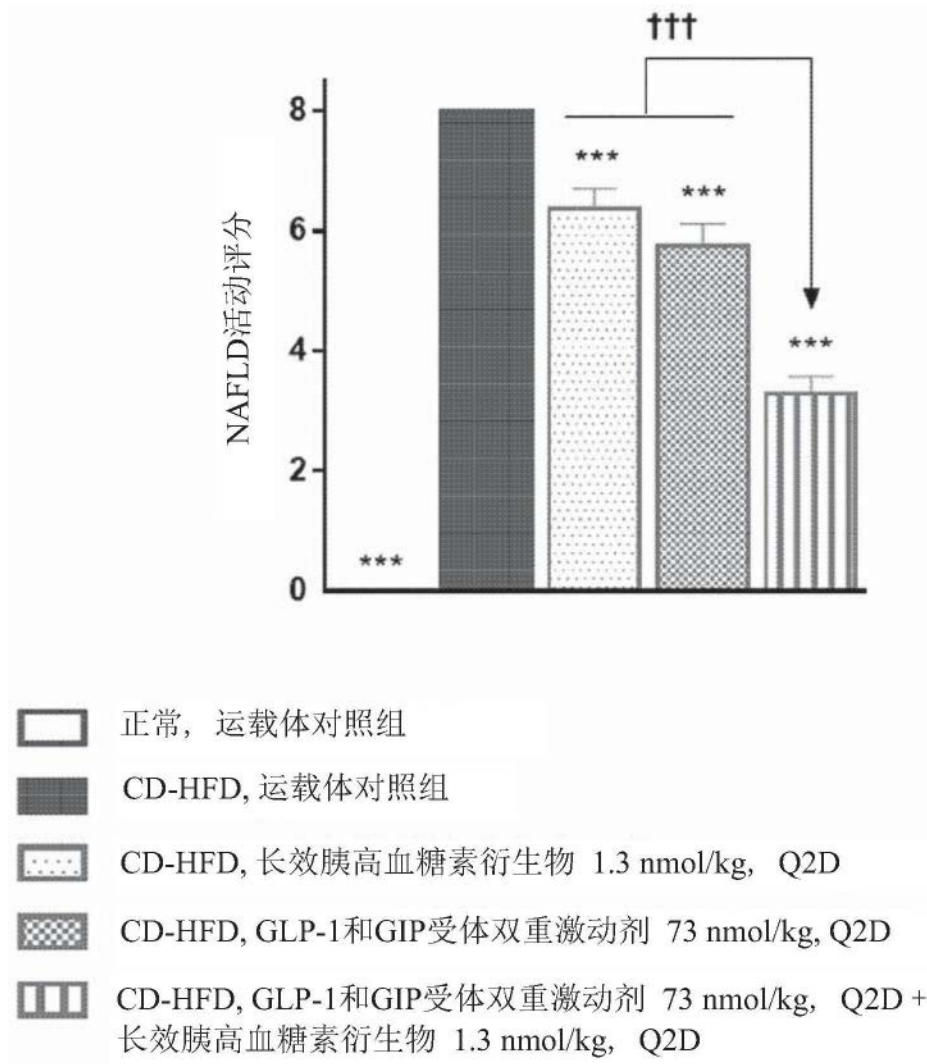


图4

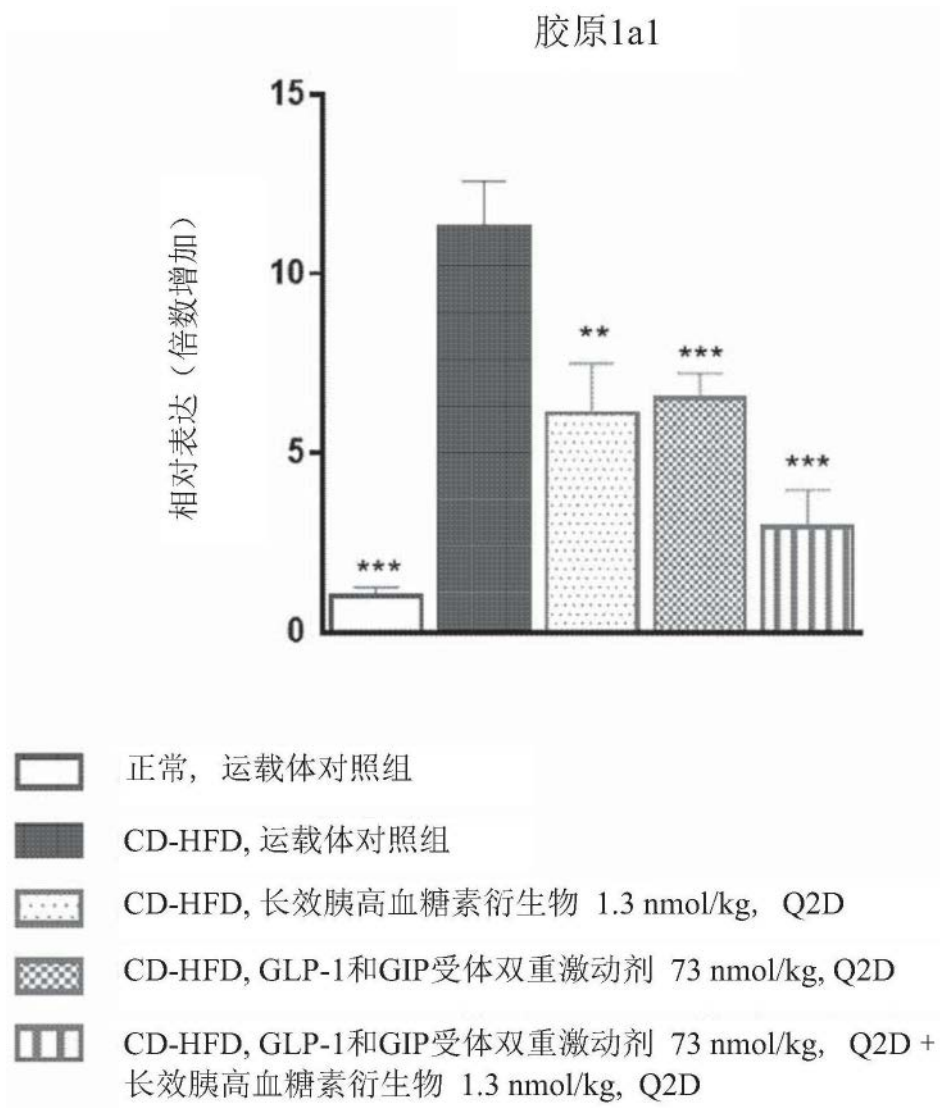


图5