



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107106660 B

(45) 授权公告日 2021.10.22

(21) 申请号 201580061525.9

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2015.09.16

A61K 38/26 (2006.01)

(续)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107106660 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2017.08.29

TW 201340981 A, 2013.10.16

(30) 优先权数据

KR 20140018462 A, 2014.01.30

10-2014-0122862 2014.09.16 KR

WO 2014017843 A1, 2014.01.30

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 103596595 A, 2014.02.19

2017.05.12

CN 102056606 A, 2011.05.11

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 103906528 A, 2014.07.02

PCT/KR2015/009753 2015.09.16

CN 102459325 A, 2012.05.16

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 103402536 A, 2013.11.20

W02016/043533 EN 2016.03.24

CN 103338760 A, 2013.10.02

(73) 专利权人 韩美药品株式会社

CN 102123723 A, 2011.07.13

地址 韩国京畿道

CN 102781458 A, 2012.11.14

(72) 发明人 黄祥渊 金真荣 金承洙 崔仁荣

Alessandro Pocai et al. Glucagon-like

郑圣烨 权世昌

peptide 1/glucagon receptor dual agonism

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

reverses obesity in mice. 《Diabetes》

公司 11245

. 2009, 第58卷(第10期), 第2260页右栏第1段-

代理人 王永伟 颜芳

2261页右栏第1段, 图2-3, 表1.

(续)

审查员 白婧

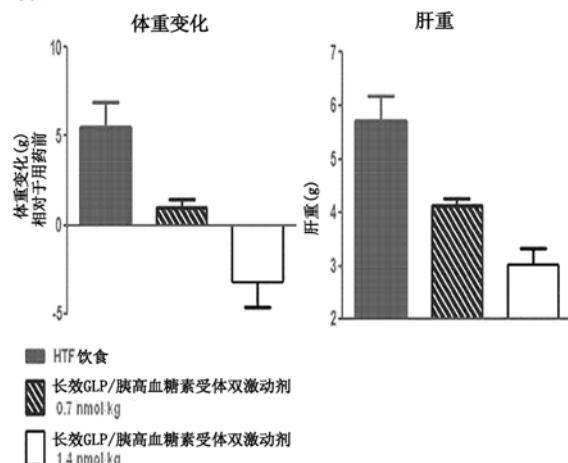
权利要求书2页 说明书11页

序列表16页 附图3页

## (54) 发明名称

长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对于治疗非酒精性脂肪肝疾病的应用

[图1]



CN 107106660 B

[转续页]

[接上页]

(51) Int.CI.

A61K 47/59 (2017.01)

A61K 47/60 (2017.01)

A61K 47/61 (2017.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(56) 对比文件

Nirav Dhanesha et al.Treatment with exendin-4 improves the antidiabetic efficacy and reverses hepatic steatosis in glucokinase activator treated db/db mice..《European Journal of Pharmacology》.2013,第714卷(第1期),第188-192页.

Shani Ben-Shlomo et al.Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein

kinase..《Journal of Hepatology》.2010,第54卷(第6期),第1214-1223页.

Chao-lin LI et al.Review on the effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease..《J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci》.2015,第35卷(第3期),第333-336页.

Seok Kim1 et al..Exendin-4 Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Glucose Transporter 4 Expression in ob/ob Mice..《Korean J Physiol Pharmacol》.2014,第18卷(第4期),第333-339页.

1. 用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的药物组合物,所述预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病通过减少胶原蛋白-1a、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和甾醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 中的至少一种的表达或活性而进行,

所述药物组合物包括缀合物,所述缀合物包含长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂,其中所述胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂由选自 SEQ ID NO: 2-34 的氨基酸序列组成;

免疫球蛋白Fc区;和

非肽基聚合物,

其中所述非肽基聚合物将所述长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂与所述免疫球蛋白Fc区共价连接。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物的特征在于不具有增重副作用或减少增重副作用。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物展现至少一项以下特征:

a) 减少肝脏甘油三酯;和

b) 减少血液胆固醇。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述非酒精性脂肪肝疾病是由选自非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化和肝癌的至少一种疾病引起的。

5. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂同时激活GLP-1受体和胰高血糖素受体。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂由SEQ ID NO: 24、25或26的氨基酸序列组成。

7. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂是缀合物形式,其中能够增加所述双激动剂的活性持续时间的生物相容性物质或载体通过共价键或连接体连接至所述激动剂。

8. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述非肽基聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、聚乙烯乙醚、可生物降解聚合物、脂质聚合物及其组合。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述多糖是葡聚糖、几丁质或透明质酸。

10. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是非糖基化的。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区包括选自CH1、CH2、CH3和CH4结构域的1至4个结构域。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区进一步包括铰链区。

13. 根据权利要求8所述的药物组合物,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所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区上的各结构域是具有选自 IgG、IgA、IgD、IgE 和 IgM 的不同来源的结构域混杂体。

15. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述免疫球蛋白Fc区是由单链免疫球蛋白组成的二聚体或多聚体,所述单链免疫球蛋白由具有相同来源的结构域组成。

16. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括药学上可接受的载

体。

17. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述长效胰高血糖素样肽-1(GLP-1)/胰高血糖素受体双激动剂是其中GLP-1/胰高血糖素双激动剂由SEQ ID NO: 25表示的缀合物。

18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中由SEQ ID NO: 25表示的长效胰高血糖素样肽-1(GLP-1)/胰高血糖素受体双激动剂的第16位和第20位氨基酸成环。

19. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中所述非肽基聚合物连接体是PEG。

20. 包含长效胰高血糖素样肽-1(GLP-1)/胰高血糖素受体双激动剂、免疫球蛋白Fc区和非肽基聚合物的缀合物在制备用于治疗非酒精性脂肪肝疾病的药物中的用途,

其中所述胰高血糖素样肽-1(GLP-1)/胰高血糖素受体双激动剂由选自SEQ ID NO: 2-34的氨基酸序列组成;

其中所述非肽基聚合物将所述长效胰高血糖素样肽-1(GLP-1)/胰高血糖素受体双激动剂与所述免疫球蛋白Fc区共价连接。

## 长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对于治疗非酒精性脂肪肝疾病的的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的药物组合物,其包括长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂;以及用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的方法,所述方法包括给予该组合物。

### 背景技术

[0002] 非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD) 是虽与饮酒无关,但显示与酒精性肝病相似的组织学架构 (histological organization) 的一种疾病类型,并且是一种与非酒精性脂肪肝 (NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬化和肝细胞癌相关的代谢综合征。非酒精性脂肪肝疾病的发生随着肥胖症和糖尿病群体的增加而增加。在韩国,年发病率已达到约16%。

[0003] 已知非酒精性脂肪肝疾病由诸如胰岛素抵抗、脂毒性和炎性反应的各种病因引起。其中,最常见的病因是胰岛素抵抗。

[0004] 已经进行了很多工作来改善胰岛素抵抗以预防/治疗非酒精性脂肪肝疾病。例如,目前已经积极进行了噻唑烷酮 (TZD) 或二甲双胍 (一种胰岛素增敏剂) 的临床试验 (参见, Hepatology (2003) 38:1008-17, J Clin Invest (2001) 108:1167-74)。

[0005] 然而,在用TZD系药物治疗的情况下,存在大幅增重和流体流动缓慢的缺点,因此已知这种治疗的应用不能用于心脏病患者。除TZD系药物之外,还已经积极进行了诸如Victoza或Byetta的GLP-1受体激动剂用于非酒精性脂肪肝疾病的临床试验。然而,在这些情况下,体内半衰期非常短,因此同其他多肽激素类一样,每天必须进行一次或至少两次重复给药。因此,因给患者造成不便而存在缺点。这种频繁给药对患者造成大量疼痛和不适。也就是说,通过改善胰岛素抵抗机制而只是使用糖尿病的一般治疗剂作为非酒精性脂肪肝疾病的治疗剂具有诸如各种副作用或患者不便的缺点。基于这些因素,直接使用已知有效治疗糖尿病的药物 (如改善胰岛素抵抗的药物) 作为非酒精性脂肪肝疾病的治疗剂时,可导致诸如副作用的问题的各种因素在本领域是已知的。因此,已知有效治疗糖尿病的药物 (如改善胰岛素抵抗的药物) 是否一定可以用作非酒精性脂肪肝疾病的治疗剂是有争议的。因此,仍需要开发能够治疗非酒精性脂肪肝疾病,同时确保患者便利而无副作用的药物。

### 发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明人已做出很多工作来开发在增加半衰期的同时最大化患者的依从性并且没有诸如体重增加的副作用的用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的药物。结果是,发明人已经发现,与Fc片段连接的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的体内半衰期大幅提高,并且还具有减重的有效结果,以及进一步减少肝脏甘油三酯和血液胆固醇。本发明已经在这种发现的基础上完成。

[0008] 问题的解决方案

[0009] 本发明的一个目的是提供用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的药物组合物,其包括长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂。

[0010] 本发明的另一目的是提供用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的方法,所述方法包括向疑患或患有非酒精性肝病的对象给予该组合物。

[0011] 发明的有利效果

[0012] 根据本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可通过扩大目前为止适用于非酒精性脂肪肝疾病的药物类别来拓宽患者的选择,和通过显著增加血液半衰期而增加患者的便利。此外,本发明提供一种新的替代方案,其可以通过减少诸如增重的副作用而无危险地施用于患有非酒精性脂肪肝疾病之外的疾病的患者。

[0013] 附图简述

[0014] 图1是显示在含高脂肪、果糖和胆固醇的高反式脂肪饲料摄入ob/ob小鼠模型中长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的体重和肝重变化的图。

[0015] 图2是显示在含高脂肪、果糖和胆固醇的高反式脂肪饲料摄入ob/ob小鼠模型中长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的胶原蛋白-1a、TNF- $\alpha$ 、SREBP-1c mRNA的测量结果的图。

[0016] 图3是显示在高反式脂肪饲料摄入DI0小鼠模型中长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的肝脏甘油三酯和血清胆固醇含量减少的图。

[0017] 实施发明的最佳方式

[0018] 为了实现目的,本发明一方面提供用于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的药物组合物,其包括长效胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) /胰高血糖素受体双激动剂。

[0019] 长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可以是缀合物形式的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂,其中能够增加该双激动剂的活性持续时间的生物相容性物质或载体通过共价键或连接体连接至该激动剂。

[0020] 在用TZD系药物(其是改善胰岛素响应(作为改善胰岛素抵抗的机制)的药物,并且是非酒精性脂肪肝疾病的常规治疗剂)治疗的情况下,存在该治疗由于诸如大幅增重和流体流动缓慢的副作用而不能施用于心脏病患者的缺点。在诸如肽激素的蛋白质药物的情况下,存在体内半衰期短并因此需要重复给药的缺点。本发明人已经发现,长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂在非酒精性肝病的各种动物模型中不具有增重副作用或减少增重副作用,并且长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可以血液中的持续性显著增加的形式治疗非酒精性脂肪肝疾病。因此,本发明已经完成,以提供长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对于预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病的的应用。

[0021] 本发明的组合物的特征在于不具有增重副作用或减少增重副作用。

[0022] 此外,本发明的组合物可以通过执行至少一项以下功能来预防或治疗非酒精性脂肪肝疾病: (a) 减少作为纤维化标记的胶原蛋白-1a的表达或活性; (b) 减少作为促炎性标记的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达或活性; (c) 减少作为脂肪生成标记的甾醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 的表达或活性; (d) 减少肝脏甘油三酯; 和 (e) 减少血液胆固醇。

[0023] 在本发明的一个实施方式中,本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂被给予非酒精性脂肪肝疾病的各种动物模型。结果证实,体重和肝重与未处理组相比显著减少(图1),并且不具有如常规治疗剂应用中诸如增重的副作用。另外,证实胶原蛋白-1a、TNF-

$\alpha$ 、SREBP-1c的表达与未处理组相比显著减少,因而预防纤维化,即肝纤维化,抑制炎症,和抑制脂肪积累抑制(图2)。因此,证实本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可用作预防和治疗各种非酒精性肝病的药物。此外,证实肝脏甘油三酯和血液胆固醇与未处理组相比显著减少,并且其显著减少至正常动物水平(图3)。因此,证实本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可用作预防和治疗各种非酒精性肝病的杰出药物。

[0024] 如本文所用,术语“GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂”可以与“GLP-1/胰高血糖素双激动剂”互换使用。GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂包括所有具有GLP-1/胰高血糖素双重活性的肽或其片段、前体、衍生物或变体,如胃泌酸调节素、天然GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂、以及可以同时激活GLP-1和胰高血糖素受体的物质,但不限于此。在本发明中,GLP-1/胰高血糖素受体激动剂可以是利用长效技术来克服短暂半衰期的受体双-双(dual-dual)激动剂,并且优选是可以一周一次给予的长效受体双激动剂,但不限于此。根据本发明的GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的具体实例部分可包括,例如,韩国专利申请公开号10-2012-0137271和10-2012-0139579(其全部内容通过引用并入本文)中描述的GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂、其衍生物和其长效型。

[0025] 在本发明的一个实施方式中,长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可以是缀合物形式,其中生物相容性物质或载体通过共价键或连接体与该激动剂连接。在另一个实施方式中,这种长效型可以是这样的形式:其中生物相容性物质或载体可以通过已知的基因重组技术、通过共价键直接连接至GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂。相比于其中GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的序列不是长效型但其他都相同的形式,所述GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的长效型可以提高半衰期或生物利用度。根据本发明的一个实施方式,作为长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的一个实例,可以使用其中免疫球蛋白Fc区通过非肽聚合物连接体(优选PEG)连接至GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的第30位氨基酸的组合物,但不限于此。

[0026] 如本文所用,术语“生物相容性物质”或“载体”是指可以增加GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的活性持续时间的物质——在该生物相容性物质和载体直接或间接地、共价或非共价地连接至本发明的GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂以形成缀合物时。例如,在形成缀合物时,可以增加GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的体内半衰期的物质可以是根据本发明的生物相容性物质或载体。可用于增加半衰期的生物相容性物质或载体的类型不一,其实例可包括聚乙二醇、脂肪酸、胆固醇、白蛋白及其片段、白蛋白结合物质、具体氨基酸序列重复单元的聚合物、抗体、抗体片段、Fc新生儿受体(FcRn)结合物质、体内结缔组织、核苷酸、纤连蛋白、转铁蛋白、糖、聚合物等。当然,载体或生物相容性物质其至少两种可以组合使用。生物相容性物质或载体包括通过共价或非共价键延长体内半衰期的生物相容性物质。

[0027] 在本发明中,将生物相容性物质或载体与GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂连接的方法包括基因重组方法和利用聚合物或低分子化学晶体外连接,但不限于此。FcRn结合物质可以是免疫球蛋白Fc区。例如,当使用聚乙二醇作为载体时,可包括Ambrx Inc.的Recode技术,其可以位置特异性地连接至聚乙二醇。方法可包括Neose公司的糖聚乙二醇化(glycopeylation)技术,其可以特异性地连接至糖基化部分。另外,方法可包括可释PEG技术——其中聚乙二醇被去除,但不限于此。方法可包括可利用PEG增加生物利用度的技术。

此外,可包括聚合物,如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯乙醚、可生物降解聚合物、脂质聚合物、几丁质或透明质酸。

[0028] 当使用白蛋白作为载体时,方法可包括其中可将白蛋白或白蛋白片段直接共价连接至GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的肽以增加体内稳定性。即使不直接连接白蛋白,也可包括其中使白蛋白结合物质(例如,白蛋白特异性结合抗体或抗体片段)结合该肽以结合白蛋白的技术,以及其中使对白蛋白具有结合亲和力的某种肽/蛋白质结合至该肽的技术。此外,方法可包括其中使对白蛋白具有结合亲和力的脂肪酸等结合至该肽的技术,但不限于此。在此可包括任何可以利用白蛋白增加体内稳定性技术或结合方法。

[0029] 通过使用抗体或抗体片段作为载体与肽结合以增加体内半衰期的技术也可以被包括在本发明内。可以使用具有FcRn结合位点的抗体或抗体片段,并且可以使用不含FcRn结合位点的任何抗体片段,如Fab。在此可包括利用催化抗体的CovX公司的CovX体(CovX-body)技术,并且本发明可包括利用Fc片段增加体内半衰期的技术。当利用Fc片段时,与Fc片段和肽结合的连接体及其结合方法可包括肽键或聚乙二醇或类似物,但不限于此,并且任何化学结合方法均可适用。此外,本发明的GLP-1/胰高血糖素受体激动剂双激动剂的结合比例可以是1:1或1:2,但不限于此,并且可以无限制地包括可增加体内半衰期的任何比例。

[0030] 另外,用于增加体内半衰期的载体可以是非肽基物质,如多糖或脂肪酸。

[0031] 与用于增加体内半衰期的载体结合的连接体可包括肽、聚乙二醇、脂肪酸、糖、聚合物、低分子化合物、核苷酸及其组合,并且可以无限制地是任何化学键,如非共价化学键、共价化学键等。

[0032] 可以增加生物利用度或持续维持活性的制剂可包括利用PLGA、透明质酸、几丁质等、通过微粒、纳米颗粒及类似物而成的缓释制剂。

[0033] 另外,可以增加生物利用度或持续维持活性的不同方面的制剂可以是诸如植入物、吸入剂、经鼻制剂或贴剂的制剂。

[0034] 在本发明的一个示例性实施方式中,GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的实例可以包括天然GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂,如胃泌酸调节素和其衍生物,也可以包括其长效制剂和类似物。

[0035] 如本文所用,术语“胃泌酸调节素”意指衍生自胰高血糖素前体、前胰高血糖素(pre-glucagon)的肽,并且包括天然胃泌酸调节素、其前体、衍生物、片段及其变体。优选地,其可以具有SEQ ID NO.1 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA)的氨基酸序列。

[0036] 术语“胃泌酸调节素变体”是具有与天然胃泌酸调节素不同的一个或多个氨基酸序列的肽,并且意指保留激活GLP-1和胰高血糖素受体的功能的肽,并且其可以通过在天然胃泌酸调节素的部分氨基酸序列中进行取代、添加、删除和修饰中的任一种或其组合来制备。

[0037] 术语“胃泌酸调节素衍生物”包括通过胃泌酸调节素的氨基酸添加、删除或取代而制备以相比于天然胃泌酸调节素高水平激活GLP-1受体和胰高血糖素受体的肽、肽衍生物或肽模拟物。优选地,胃泌酸调节素衍生物具有SEQ ID NO.25的氨基酸序列,并且更优选地,其第16位和第20位氨基酸成环。

[0038] 术语“胃泌酸调节素片段”意指天然胃泌酸调节素的N端或C端有一个或多个氨基

酸添加或删除的片段,其中非天然存在的氨基酸(例如,D型氨基酸)可以被添加,并且具有激活GLP-1受体和胰高血糖素受体的功能。

[0039] 胃泌酸调节素的变体、衍生物和片段的各制备方法可单独或组合使用。例如,本发明包括具有与天然肽不同的一个或多个氨基酸以及N端氨基酸残基去氨基化,并且具有激活GLP-1受体和胰高血糖素受体的功能的肽。

[0040] 本发明的胃泌酸调节素的变体、衍生物和片段的C端可酰胺化。

[0041] 可用于本发明的载体材料可选自抗体、免疫球蛋白Fc区、白蛋白、脂肪酸、碳水化合物、具有肽重复单元的聚合物、转铁蛋白和PEG,并且优选免疫球蛋白Fc区。在本发明的一个示例性实施方式中,长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂通过非肽基聚合物作为连接体连接至载体。在又一个示例性实施方式中,连接至非肽基聚合物的载体是免疫球蛋白Fc片段。

[0042] 在本发明中,长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂是其中GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂各自连接至免疫球蛋白Fc区的形式,并显示持续性和安全性。免疫球蛋白Fc区和GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的结合可以是没有连接体的框内融合(*inframe fusion*),或者可以利用非肽聚合物连接体来连接。在本发明中,免疫球蛋白Fc可与免疫球蛋白片段互换使用。

[0043] 如本文所用,术语“非肽基聚合物”是指包括通过不包括肽键在内的任何共价键彼此连接的至少两个重复单元的生物相容性聚合物。在本发明中,非肽基聚合物可与非肽基连接体互换使用。

[0044] 可用于本发明的非肽基聚合物可选自可生物降解聚合物,如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯乙醚、聚乳酸(PLA)或聚乳酸-乙醇酸(PLGA)、脂质聚合物、几丁质、透明质酸及其组合,并且优选地,可生物降解聚合物是聚乙二醇。此外,本领域已知的其衍生物和通过本领域已知的方法容易制备的衍生物均可包括在本发明的范围内。

[0045] 在通过常规框内融合方法获得的融合蛋白中使用的肽连接体具有容易在体内被蛋白酶裂解的缺点,因此无法如预期得到通过载体增加活性药物的血清半衰期的充分效果。然而,在本发明中,可使用对蛋白酶具有抗性的聚合物,类似于载体来保持肽的血清半衰期。因此,可无限制地使用任何非肽基聚合物,只要其是具有上述功能的聚合物,即,具有对体内蛋白酶具有抗性的聚合物。非肽基聚合物具有1至100kDa,优选1至20kDa范围内的分子量。此外,连接至免疫球蛋白Fc区的本发明的非肽基聚合物可以是一种聚合物或不同类型聚合物的组合。

[0046] 在本发明中使用的非肽基聚合物具有能够结合免疫球蛋白Fc区和蛋白质药物的反应性基团。处于非肽基聚合物两端的反应性基团优选选自反应性醛基、丙醛、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酯、羟基琥珀酰亚胺基、琥珀酰亚胺羧甲基或琥珀酰亚胺碳酸酯。具体地,当非肽基聚合物其两端具有反应性醛基团的反应性基团时,其有效最小化非特异性反应并在非肽基聚合物的两端连接生理活性多肽和免疫球蛋白。通过醛键、通过还原性烷基化生成的最终产物比通过酰胺键连接的产物远更稳定。反应性醛基选择性地在低pH下结合至N端,并且在高pH(如pH9.0)下结合至赖氨酸残基以形成共价键。非肽基聚合物两端的反应性基团可彼此相同或不同。例

如,非肽基聚合物可在一端具有马来酰亚胺基团,而在另一端具有醛基、丙醛基或丁醛基。当使用两端均具有反应性羟基的聚乙二醇作为非肽基聚合物时,可通过已知的化学反应将羟基活化成各种反应性基团,或者可以使用市售的具有经修饰的反应性基团的聚乙二醇来制备本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂缀合物。

[0047] 此外,免疫球蛋白Fc区在缀合物的制备、纯化和产率方面是有利的,因为不仅分子量与整个分子相比相对较小,而且材料同质性也大幅增加,并且诱导血液中抗原性的可能性下降,因为各抗体中的氨基酸序列不同,因此去除了显示高度非同质性的Fab部分。

[0048] 如本文所用,术语“免疫球蛋白Fc区”是指免疫球蛋白的重链恒定区2 (CH2) 和重链恒定区3 (CH3) ——不包括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)。其可进一步包括处于重链恒定区的铰链区。而且,本发明的免疫球蛋白Fc区可含有除免疫球蛋白的重链和轻链可变区之外、包括重链恒定区1 (CH1) 和/或轻链恒定区1 (CL1) 在内的Fc区的部分或全部,只要其具有基本上等同或优于天然蛋白质的效果。此外,免疫球蛋白Fc区可以是删除了相应于CH2和/或CH3的相对长部分的氨基酸序列的片段。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) 重链恒定区和轻链恒定区的各结构域的二聚体。

[0049] 此外,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(突变体)。氨基酸序列衍生物由于天然氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的删除、插入、非保守或保守性取代或其组合而具有不同序列。例如,在IgG Fc中,已知在结合中重要的第214至238、297至299、318至322、或327至331位的氨基酸残基可用作适当的修饰目标。

[0050] 此外,各种衍生物是可能的,包括如下衍生物:其中能够形成二硫键的区域被删除、天然Fc的N端的某些氨基酸残基被消除、甲硫氨酸残基被添加至天然Fc的N端等。此外,为了去除效应子功能,可以删除补体结合位点如C1q结合位点和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)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公开号WO 97/34631、WO 96/32478等中被公开。蛋白质和肽中不整体改变分子活性的氨基酸交换在本领域已知(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,纽约,1979)。最常发生的交换是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双向。此外,如需,可通过磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化及类似方式对Fc区进行修饰。

[0051] Fc衍生物是具有与本发明的Fc区相同的生物活性,并且Fc区结构稳定性提高(例如,针对热、pH或类似情况)的衍生物。

[0052] 此外,这些Fc区可从分离自人和其他动物(包括乳牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠、豚鼠等)的天然形式获得,或者可以是其重组体或衍生物——从转化的动物细胞或微生物获得。在此,其可获自天然形式——通过从人或动物生物体分离完整免疫球蛋白,然后将其用蛋白酶处理。当木瓜蛋白酶处理时,木瓜蛋白酶将天然免疫球蛋白消化成Fab和Fc区,并且当胃蛋白酶处理时,天然免疫球蛋白被分割成pF'c和F(ab)2。Fc或pF'c可通过尺寸排阻色谱法等分离。优选地,人源Fc区是从微生物获得的重组免疫球蛋白Fc区。

[0053] 此外,免疫球蛋白Fc区可以是具有天然糖链,或相比于天然形式糖链增加或减少的形式,或者可以是去糖基化形式。免疫球蛋白Fc糖链的增加、减少或去除可利用微生物通过本领域常用的方法如化学法、酶法和基因工程法来实现。从Fc区去除糖链导致对C1q部分的结合亲和力显著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损失,从而不诱导不必要的体内免疫应答。在这方面,去糖基化或非糖基化形式的免疫球蛋白Fc区可更适于本发明的目的来作为药物载体。

[0054] 如本文所用,术语“去糖基化”是指从Fc区酶促去除糖部分,术语“非糖基化”是指原核生物(优选大肠杆菌(E.coli))中产生的并且未糖基化的Fc区。

[0055] 同时,免疫球蛋白Fc区可源自人或包括乳牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠、豚鼠等在内的其他动物,并且优选源自人。

[0056] 而且,免疫球蛋白Fc区可以是衍生自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc区、其组合或其混杂体。优选地,其衍生自人血液中最丰富的IgG或IgM,并且最优选衍生自IgG——已知IgG增强配体结合蛋白的半衰期,但不限于此。

[0057] 如本文所用,术语“组合”是指编码相同来源的单链免疫球蛋白Fc区的多肽连接至不同来源的单链多肽,以形成二聚体或多聚体。即,二聚体或多聚体可由选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc片段的两个或更多个片段形成。

[0058] 如本文所用,术语“混杂体”是指相应于不同来源的至少两个Fc片段的序列存在于单链免疫球蛋白Fc区中。在本发明中,不同类型的混杂体是可能的。即,由选自IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc和IgD Fc的CH1、CH2、CH3和CH4的1至4个结构域组成的混杂体是可能的,并且可包括铰链。

[0059] 另一方面,IgG还可以分为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4子类,并且在本发明中,其组合或杂交是可能的。优选IgG2和IgG4子类,并且最优选IgG4的Fc区,其基本上不具有诸如补体依赖性细胞毒性(CDC)的效应子功能。

[0060] 也就是说,用于本发明的药物的载体的免疫球蛋白Fc区可以是例如人IgG4衍生的非糖基化Fc区,但不限于此。人源Fc区比非人源Fc区更优选,非人源Fc区可引起不期望的免疫应答,例如,其可在人体内充当抗原从而产生新抗体。

[0061] 制备本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的方法没有具体限制。例如,韩国专利申请公开号10-2012-0139579中描述了制备方法的细节及其效果。

[0062] 使用长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂具有巨大优势,其在于由于血液半衰期和体内持续性增加,对需要每日给药的慢性患者的给药次数可以显著减少,从而提高患者的生活质量。因此,这在非酒精性脂肪肝疾病的治疗中非常有帮助。

[0063] 如本文所用,术语“非酒精性脂肪肝疾病”是指没有饮酒史或饮酒与发病无关的脂肪肝病例。脂肪肝是指相比于正常的甘油三酯水平,肝细胞中的甘油三酯异常积累的现象。正常肝脏大约5%由脂肪组织组成,并且脂肪的主要成分是甘油三酯、脂肪酸、磷脂、胆固醇和胆固醇酯。然而,一旦脂肪肝发生,大多数组分被甘油三酯代替。如果甘油三酯量高于肝重的5%,则其被诊断为脂肪肝。脂肪肝由脂质代谢障碍或肝细胞中携载过多脂肪过程中的缺陷引起,且主要是由肝脏的脂质代谢障碍引起。在脂肪肝中积累的大部分脂肪可以是甘油三酯。非酒精性脂肪肝疾病包括非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化、肝癌及类似疾病,但将要利用本发明的组合物预防或治疗的脂肪肝疾病被无限制地包括在内。

[0064] 如本文所用,术语“预防”是指通过给予本发明的组合物来预防或延迟非酒精性脂肪肝疾病的所有行为。“治疗”是指使非酒精性脂肪性肝病的症状减轻或发生积极改变的所有行为。非酒精性脂肪肝疾病的治疗适用于任何可经历非酒精性脂肪肝疾病的哺乳动物,并且其实例不仅包括人和灵长类动物,而且无限制地包括牛(如乳牛)、猪、绵羊、马、狗和猫,但优选是人。

[0065] 如本文所用,术语“给药/给予”是指通过适当的方法给患者引入一定量的预定物质。本发明的组合物可经由任何常见途径被给予,只要其能够到达期望的组织。例如,其可以是腹膜内、静脉内、肌内、皮下、皮内、口服、局部、鼻内、肺内或直肠内给予,但不限于此。然而,由于肽在口服给予时被消化,口服给予的组合物的活性成分应被包衣或配制以防止在胃内降解。优选地,组合物可以以注射剂形式被给予。此外,长效制剂可以通过可将活性物质输送到目标细胞中的任何装置来给予。

[0066] 本发明的药物组合物的给药剂量和频率由活性成分的类型以及各种因素如待治疗的疾病、给药途径、患者年龄、性别和体重和疾病严重程度决定。

[0067] 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“药学上可接受的载体”是指不刺激生物体和抑制被给予化合物的生物活性或特性的载体或稀释剂。就口服给药而言,载体可包括粘合剂、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。就可注射制剂而言,载体可包括缓冲剂、防腐剂、止痛剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等。就局部给药制剂而言,载体可包括碱(base)、赋形剂、润滑剂、防腐剂等。

[0068] 本发明的组合物可以与上述药学上可接受的载体组合配制成多种剂型。例如,就口服给药而言,药物组合物可以被配制成片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆或糯米纸囊剂(wafer)。就可注射制剂而言,药物组合物可被配制在作为单一剂型或多剂量容器的安瓿瓶中。药物组合物还可以被配制成溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊和长效制剂。

[0069] 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、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、金合欢橡胶(acacia rubber)、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、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、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、调味剂和杀菌剂。

[0070] 另一方面中,本发明提供预防或治疗非酒精性肝病的方法,包括以下步骤:向不包括人类的非酒精性肝病高风险或罹患对象给予包含长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的组合物。

[0071] 组合物和非酒精性脂肪肝疾病的描述同上。

[0072] 发明方式

[0073] 下文将通过实施例更加详细地描述本发明。这些实施例仅意图示例本发明,并且本发明的范围不被解释为受限于这些实施例。

[0074] 实施例1:胃泌酸调节素衍生物的合成

[0075] 在实施例中,合成了具有以下氨基酸序列的胃泌酸调节素衍生物(表1)。

[0076] [表1]

[0077]

SEQ ID NO	序列	备注
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLDDEAVRLFIEWLMTKRNRRNNIA	
SEQ ID NO: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNTGPSSGAP PPS	
SEQ ID NO: 4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPP PS	
SEQ ID NO: 5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPP PS	
SEQ ID NO: 6	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAHSQGTFTSDY SKYLD	
SEQ ID NO: 7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMTK	
SEQ ID NO: 8	CA-SQGTFTSDLSRQLEEEAVRLFIEWLMTK	
SEQ ID NO: 9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMTKRNRRNNI A	
SEQ ID NO: 10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMTNGGPSSGAPP PSK	
SEQ ID NO: 11	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAHSQGTFTSDY SRYLDK	
SEQ ID NO: 12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGHGEGTFTSDLSKQMEEE VK	
SEQ ID NO: 13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMTK	
SEQ ID NO: 14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMTKRNRRNNI A	
SEQ ID NO: 15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMTKRNRRNNI A	

[0078]	SEQ ID NO: 16	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGHHSQGTFTSDLSRQLEK	
	SEQ ID NO: 17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTKRNRRNNIA	
	SEQ ID NO: 18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPP SK	
	SEQ ID NO: 19	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAV <u>KLFIEWIRNTKRNRRNNIA</u>	成环
	SEQ ID NO: 20	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAV <u>KLFIEWIRNGGPSSGAPPP</u> SK	成环
	SEQ ID NO: 21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTKRNRRNNIA	
	SEQ ID NO: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNTK</u>	成环
	SEQ ID NO: 23	HAibQGTFTSDYSKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNT</u>	
	SEQ ID NO: 24	HAibQGTFTSDY SKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNTC</u>	
	SEQ ID NO: 25	HAibQGTFTSDYSKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNTC</u>	成环
	SEQ ID NO: 26	HAibQGTFTSDYS <u>KYLDEKRAKEFVQWLMNTC</u>	成环
	SEQ ID NO: 27	HAibQGTFTSDYSKYLD <u>EQAAKEFICWLMNT</u>	成环
	SEQ ID NO: 28	HAibQGTFTSDY SKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNT</u>	
	SEQ ID NO: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNN IA	
	SEQ ID NO: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNI A	
	SEQ ID NO: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRR NNIA	
	SEQ ID NO: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNTC</u>	成环
	SEQ ID NO: 33	HAibQGTFTSDYAKYL <u>EKRAKEFVQWLMNTC</u>	成环
	SEQ ID NO: 34	YAibQGTFTSDYSKYLD <u>EKRAKEFVQWLMNTC</u>	成环

[0079] 表1中,SEQ ID NO:19、20、22、25、26、27、32、33和34的每一个中的粗体和下划线的氨基酸一起成环,并且X表示的氨基酸意指非天然氨基酸,α-甲基谷氨酸。此外,CA表示4-咪唑乙酰基,并且DA表示去氨基组氨酰。

[0080] 下文中,代表性长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂,即通过非肽基聚合物PEG(聚乙二醇)将Fc与GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的第30位氨基酸连接的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂,被制备并用于以下实施例2至3。

[0081] 实施例2:在含高脂肪、果糖和胆固醇的高反式脂肪饲料摄入ob/ob小鼠模型中,长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对非酒精性脂肪肝疾病的效果的验证

[0082] 为了验证长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对非酒精性脂肪肝疾病的效果,采用含高脂肪(40%千卡)、果糖(22%)和胆固醇(2%)的高反式脂肪饮食(HTF饮食)给予ob/ob小鼠模型8周,以准备非酒精性脂肪肝疾病的动物模型。然后,将长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂以0.7和1.4nmol/kg每两天一次(Q2D)皮下给予小鼠,并重复该给予4周。在4周测试期间,将动物重量与媒介处理组进行比较。在4周测试完成后,测量并比较肝重。另外,在4周测试完成后,验证作为纤维化标记的胶原蛋白-1a、作为促炎性标记的TNF- $\alpha$ 和作为脂肪生成标记的SREBP-1c的mRNA。

[0083] 结果是,4周给予后的体重和肝重测量显示,在长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂中,重量与媒介处理组相比显著减少(图1)。这样的结果表明,本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可以抑制非酒精性脂肪肝疾病动物模型中发生的增重,并且其可以减少改善胰岛素抵抗的常规药物的副作用。

[0084] 另外,胶原蛋白-1a、TNF- $\alpha$ 、SREBP-1c的mRNA的比较显示,在长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂处理组中,这些mRNA显著减少(图2)。这样的结果表明,本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂减少非酒精性脂肪肝疾病动物模型中的纤维化、促炎症及类似状况,并抑制脂肪生成,因而有效用于非酒精性脂肪肝疾病的预防和治疗。

[0085] 实施例3:在高反式脂肪饲料摄入DIO小鼠模型中,长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对非酒精性脂肪肝疾病的效果的验证

[0086] 为了验证长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对非酒精性脂肪肝疾病的效果,对正常小鼠模型(C57BL/6)给予60%高反式脂肪饮食12周,以准备非酒精性脂肪肝疾病的动物模型。然后,将3nmol/kg的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂每周一次(QW)皮下给予小鼠,并重复该给予4周。在4周测试完成后,测量肝脏甘油三酯(肝脏TG)和血清胆固醇。

[0087] 结果是,4周给予后的肝脏甘油三酯和血清胆固醇测量显示,在给予长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂的情况下,其与媒介处理组相比显著减少,并且其显著减少至经历正常饮食(chow diet)的正常动物的水平(图3)。这样的结果表明,在非酒精性脂肪肝疾病的动物模型中,本发明的长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂可以使肝脏甘油三酯和血清胆固醇减少至正常动物水平,因而有效用于非酒精性脂肪肝疾病的预防和治疗。

[0088] 根据以上描述,本领域技术人员将理解,本发明可以在没有改变技术精神或基本特征的情况下以其他具体形式实施,在这方面,上述实施方式应被理解为在各方面都是示例性的而非限制性的。本发明的范围应当解释为,所附权利要求(而非详细描述)的含义和范围以及由同样的思路衍生的所有变化或变动都在本发明的范围内。

根据PCT第41条的修改替换页-序列表

<110> 韩美药品株式会社

<120> 长效GLP-1/胰高血糖素受体双激动剂对于治疗非酒精性脂肪肝疾病的应用

<130> OPA15087

<150> KR 10-2014-0122862

<151> 2014-09-16

<160> 34

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 胃泌酸调节素

<400> 1

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

1

5

10

15

[0001] Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 2

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

1

5

10

15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 3  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 3  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

[0002] <210> 4  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 4  
 Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 5  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 5  
 Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 6  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 [0003] <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 6  
 Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr  
 20 25 30  
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp  
 35 40

<210> 7  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 7

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys  
 20 25 30

<210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 8  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

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

[0004] <210> 9  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (20)  
 <223> Xaa =  $\alpha$ -甲基谷氨酸

<400> 9  
 Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

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

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

<210> 10  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 10  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

[0005] <210> 11  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 11  
 Xaa Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr  
 20 25 30  
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys  
 35 40

<210> 12  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (1)

<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 12

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

Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met  
20 25 30

Glu Glu Glu Ala Val Lys

35

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

[0006] <221> 变体

<222> (1)

<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>

<221> 变体

<222> (16)

<223> Xaa =  $\alpha$ -甲基谷氨酸

<220>

<221> 变体

<222> (20)

<223> Xaa =  $\alpha$ -甲基谷氨酸

<400> 13

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

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys

20

25

30

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>  
<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
<221> 变体  
<222> (1)  
<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>  
<221> 变体  
<222> (20)  
<223> Xaa =  $\alpha$ -甲基谷氨酸

<220>  
<221> 变体  
<222> (24)  
<223> Xaa =  $\alpha$ -甲基谷氨酸

<400> 14  
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

[0007] Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 15  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
<221> 变体  
<222> (1)  
<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>  
<221> 变体  
<222> (24)  
<223> Xaa =  $\alpha$ -甲基谷氨酸

<400> 15  
Xaa Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

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

20

25

30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 16  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
<221> 变体  
<222> (1)  
<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 16  
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu  
20 25 30

Glu Lys

[0008]

<210> 17  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
<221> 变体  
<222> (1)  
<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 17  
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 18  
<211> 40

<212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 18  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

<210> 19  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0009] <220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (16), (20)  
 <223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 19  
 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30  
 Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

<210> 20  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (1)

<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>

<221> 变体

<222> (16), (20)

<223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 20

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

1

5

10

15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys

35

40

<210> 21

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

[0010]

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (1)

<223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 21

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (1)  
 <223> Xaa = 去氨基组氨酸酰

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (16), (20)  
 <223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 22  
 Xaa Ser 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 Lys  
 20 25 30

<210> 23  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = 氨基异丁酸

[0011]

<400> 23  
 His 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 Cys Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

<210> 24  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 24  
 His 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> 25  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = 氨基异丁酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (16), (20)  
 <223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 25  
 His 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

[0012] <210> 26  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = 氨基异丁酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (12), (16)  
 <223> 第12位和第16位氨基酸成环

<400> 26  
 His 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> 27  
 <211> 29  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (2)

<223> Xaa = 氨基异丁酸

<220>

<221> 变体

<222> (16), (20)

<223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 27

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

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 28

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

[0013]

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (2)

<223> Xaa = 氨基异丁酸

<400> 28

His 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

20

25

<210> 29

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>

<221> 变体

<222> (2)

<223> Xaa = d-丝氨酸

<400> 29  
 His 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 Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

<210> 30  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<400> 30  
 [0014] Xaa 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 Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

<210> 31  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (1)  
 <223> Xaa = 4-咪唑乙酰基

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = d-丝氨酸

&lt;400&gt; 31

Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30Arg Asn Asn Ile Ala  
35

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 胃泌酸调节素衍生物

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 变体

&lt;222&gt; (1)

&lt;223&gt; Xaa = 4-咪唑乙酰基

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 变体

&lt;222&gt; (2)

[0015] &lt;223&gt; Xaa = 氨基异丁酸

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 变体

&lt;222&gt; (16), (20)

&lt;223&gt; 第16位和第20位氨基酸成环

&lt;400&gt; 32

Xaa 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

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 胃泌酸调节素衍生物

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 变体

&lt;222&gt; (2)

&lt;223&gt; Xaa = 氨基异丁酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (16), (20)  
 <223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 33  
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala 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> 34  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0016] <220>  
 <223> 胃泌酸调节素衍生物

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (2)  
 <223> Xaa = 氨基异丁酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> (16), (20)  
 <223> 第16位和第20位氨基酸成环

<400> 34  
 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

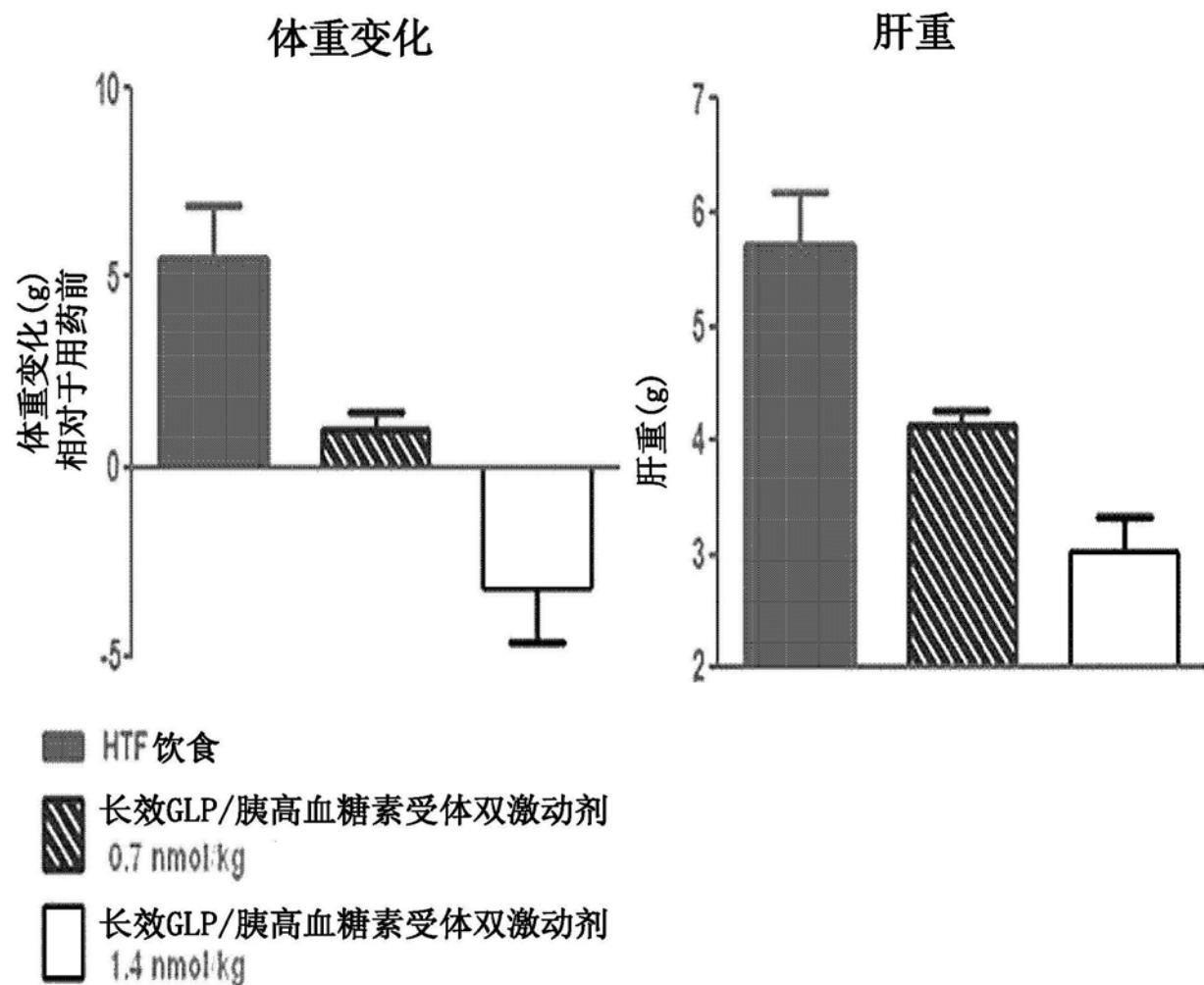


图1

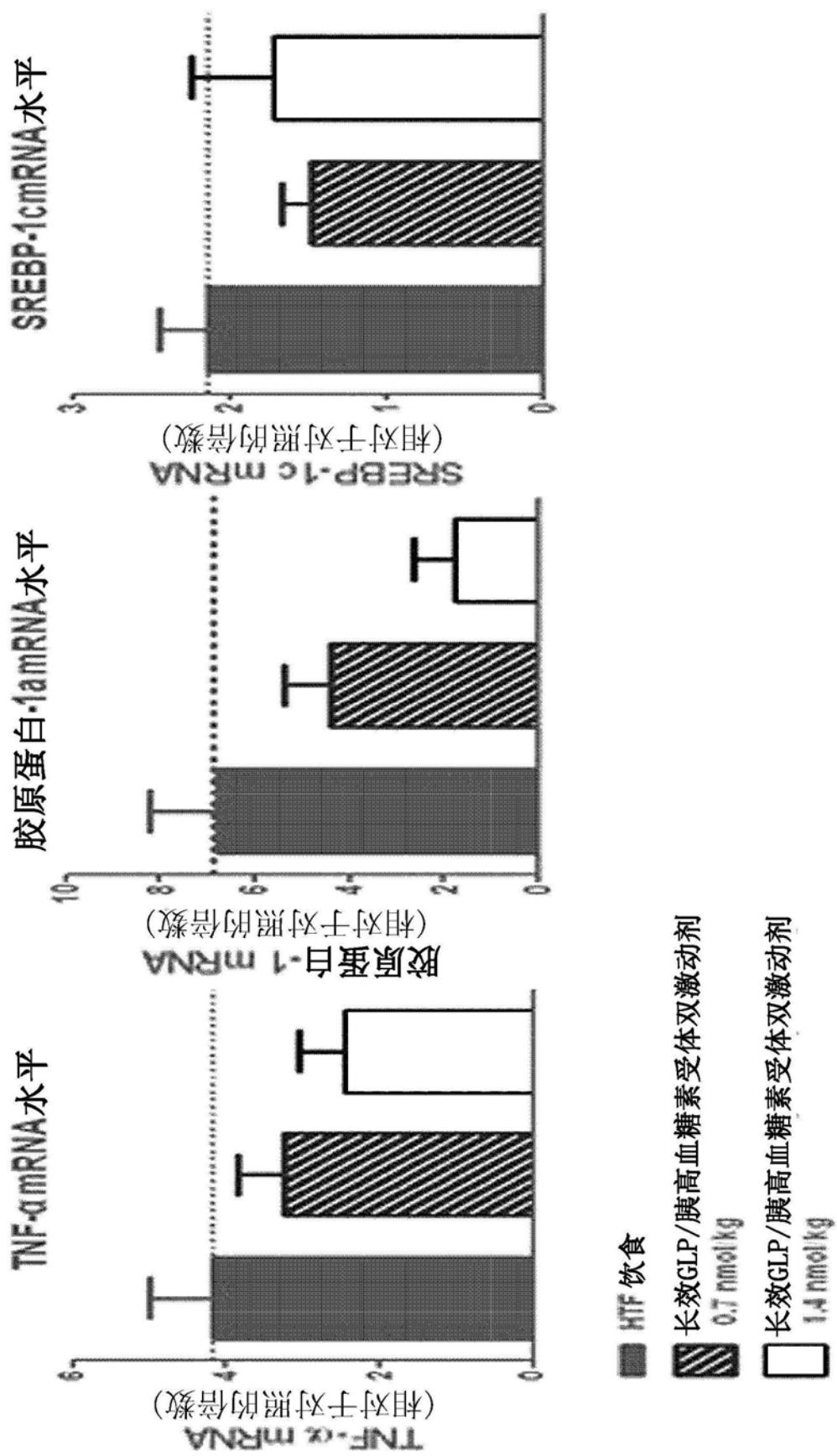


图2

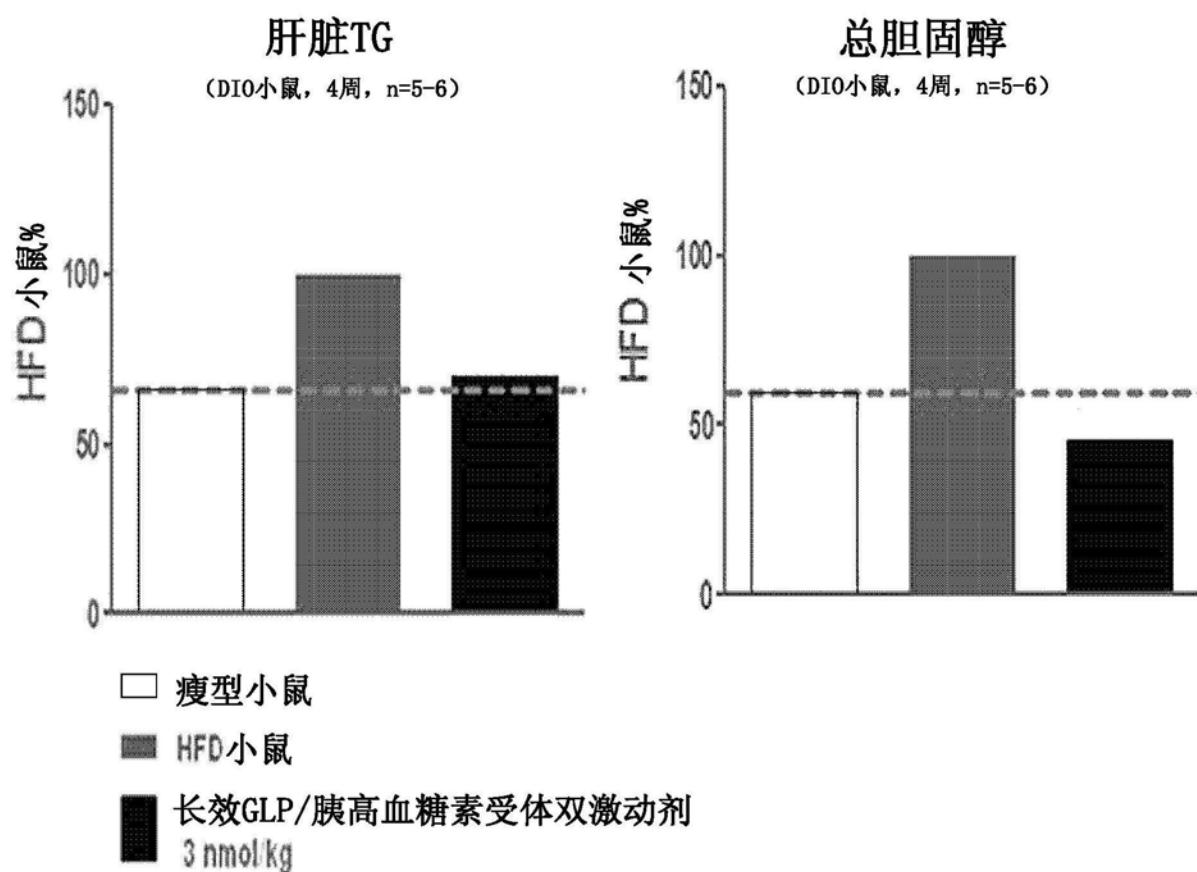


图3