



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101878036 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 14

(21) 申请号 200880118353. 4
 (22) 申请日 2008. 11. 28
 (30) 优先权数据
 11/947, 697 2007. 11. 29 US
 10-2008-0083194 2008. 08. 26 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2010. 05. 28
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2008/007074 2008. 11. 28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02009/069983 EN 2009. 06. 04
 (73) 专利权人 韩美科学株式会社
 地址 韩国京畿道
 (72) 发明人 宋大海 金玫永 朴永振 姜殷姬
 郑圣烨 权世昌 李宽淳
 (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
 72002
 代理人 康健 林晓红

(51) Int. Cl.
A61K 38/16 (2006. 01)
A61P 3/04 (2006. 01)
A61K 39/395 (2006. 01)
 (56) 对比文件
 WO 2006/107124 A1, 2006. 10. 12, 全文.
 WO 2007/049940 A1, 2007. 05. 03, 全文.
 US 2006/0275254 A1, 2006. 12. 07, 全文.
 US 2007/0041967 A1, 2007. 02. 22, 全文.
 审查员 刘俊

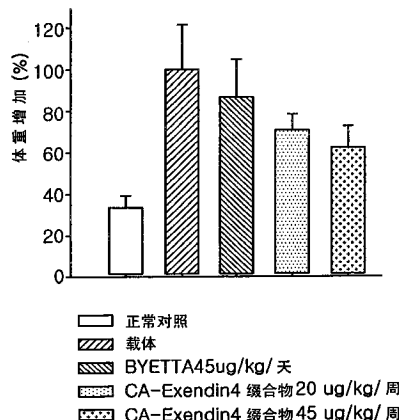
权利要求书2页 说明书10页
 序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

包含促胰岛素释放肽缀合物的治疗肥胖相关疾病的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含促胰岛素释放肽缀合物的治疗肥胖相关疾病的组合物, 特别涉及包含通过非肽接头共价连接促胰岛素释放肽与载体物质制备的缀合物的治疗肥胖相关疾病的组合物, 本发明还涉及通过使用所述组合物治疗肥胖相关疾病的方法。特别地, 本发明治疗肥胖相关疾病的组合物显著改良抑制食物摄取及在此期间减轻体重和体脂的效力, 从而可用于治疗肥胖相关疾病。



1. 包含促胰岛素释放肽缀合物的治疗肥胖相关疾病的组合物,所述促胰岛素释放肽缀合物通过经由非肽基接头连接促胰岛素释放肽与免疫球蛋白 Fc 区域而制备,

其中所述非肽基接头选自:SMCC(琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺-甲基)环己烷-1-羧酸酯)、SFB(琥珀酰亚胺 4-甲酰基苯甲酸)、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇与丙二醇的共聚物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯醚、可生物降解的聚合物、脂质聚合物、壳多糖、透明质酸,及其组合;和

其中所述促胰岛素释放肽是 N-末端组氨酸残基的 α 碳原子被除去的咪唑并-乙酰-exendin-4。

2. 权利要求 1 的治疗肥胖相关疾病的组合物,其中所述促胰岛素释放肽缀合物由下式 1 表示:

$$R_1-X-R_2-L-F \text{ (式 1)}$$

其中 R_1 是 4-咪唑并乙酰,

R_2 选自 $-NH_2$ 、 $-OH$ 和 $-Lys$ 组成的组,

X 是 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser 或

Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly,

L 是非肽基接头,

F 是免疫球蛋白 Fc。

3. 权利要求 1 的治疗肥胖相关疾病的组合物,其中所述非肽基接头是聚乙二醇。

4. 权利要求 1 的治疗肥胖相关疾病的组合物,其中所述肥胖相关疾病选自肥胖症、高脂血症、胰岛素抗性综合征、肥胖相关的胃食管返流症、脂肪性肝炎、心血管疾病和代谢综合征组成的组。

5. 包含促胰岛素释放肽缀合物的抑制食物摄取的组合物,所述促胰岛素释放肽缀合物通过经由非肽基接头连接促胰岛素释放肽与免疫球蛋白 Fc 区域而制备,

其中所述非肽基接头选自:SMCC(琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺-甲基)环己烷-1-羧酸酯)、SFB(琥珀酰亚胺 4-甲酰基苯甲酸)、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇与丙二醇的共聚物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯醚、可生物降解的聚合物、脂质聚合物、壳多糖、透明质酸,及其组合;和

其中所述促胰岛素释放肽是 N-末端组氨酸残基的 α 碳原子被除去的咪唑并-乙酰-exendin-4。

6. 权利要求 5 的抑制食物摄取的组合物,其中所述促胰岛素释放肽缀合物由下式 1 表示:

$$R_1-X-R_2-L-F \text{ (式 1)}$$

其中 R_1 、X、 R_2 、L 和 F 与权利要求 2 所述相同。

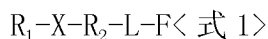
7. 包含促胰岛素释放肽缀合物的减少体脂或者血浆胆固醇的组合物,所述促胰岛素释放肽缀合物通过非肽基接头连接促胰岛素释放肽与免疫球蛋白 Fc 区域而制备,

其中所述非肽基接头选自:SMCC(琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺-甲基)环己烷-1-羧

酸酯)、SFB(琥珀酰亚胺 4-甲酰基苯甲酸)、聚乙二醇、聚丙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇与丙二醇的共聚物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯醚、可生物降解的聚合物、脂质聚合物、壳多糖、透明质酸,及其组合;和

其中所述促胰岛素释放肽是 N-末端组氨酸残基的 α 碳原子被除去的咪唑并-乙酰胺-exendin-4。

8. 权利要求 7 的用于降低体脂或者血浆胆固醇的组合物,其中所述促胰岛素释放肽缀合物由下式 1 表示:



其中 R_1 , X, R_2 , L 和 F 与权利要求 2 中的定义相同。

9. 权利要求 1 的治疗肥胖相关疾病的组合物,其还包括选自下组的一种物质:示出抑制食欲或者增加能量代谢活性、脂质降解抑制活性、延迟胃排空活性、蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTP) 1b-抑制活性和 DPPIV-抑制活性的物质,包括 GLP-1,糊精、PYY(肽 YY)、瘦素(leptin)、缩胆促胰素(CCK)、胃泌酸调节素(oxyntomodulin)、ghrelin 拮抗剂, NPY 拮抗剂,利莫那班,西布曲明以及奥利司他。

10. 权利要求 1 的组合物在制备用于治疗肥胖相关疾病的药物中的用途。

11. 权利要求 10 的用途,其中所述肥胖相关疾病选自肥胖症、高脂血症、胰岛素抗性综合征、肥胖相关的胃食管返流症、脂肪性肝炎、心血管疾病和代谢综合征。

12. 权利要求 5 的组合物在制备用于抑制食物摄取的药物中的用途。

13. 权利要求 7 的组合物在制备用于减少体脂或者血浆胆固醇的药物中的用途。

包含促胰岛素释放肽缀合物的治疗肥胖相关疾病的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含促胰岛素释放肽缀合物的治疗肥胖相关疾病的组合物,特别涉及包含通过非肽基接头共价连接促胰岛素释放肽与载体物质制备的缀合物的治疗肥胖相关疾病的组合物,以及使用所述组合物治疗肥胖相关疾病的方法。

背景技术

[0002] 肥胖症是与高发病率和死亡率相关的慢性疾病,是由于能量平衡失调或者营养过度引起的脂肪组织积聚所致。在美国和全世界,肥胖和肥胖相关疾病是非常严重的健康问题。在过去的7年里,在美国的一般人群中,肥胖的流行从22.9%增加至30.6%。根据美国疾病控制和预防中心进行的1999-2002全国健康和营养调查(NHANES)的结果,29.8%的20岁以上的成年人超重,其中30.4%肥胖。在成年人中极度肥胖的流行性为4.9%(Hedley et al., JAMA 2004 ;291 :2847-50)。肥胖不仅在美国显著增加,而且在采用西方饮食和文化习惯的每一国家中均如此。目前世界上有250百万肥胖人口,据估计到2025年世界范围有大约300百万人肥胖。肥胖具有其自身健康问题,且与许多其它并发症如高血压、高脂血症、心血管疾病以及糖尿病相关。大约80%的肥胖患者具有一或多种上述疾病(Mantzoros et al., J Clin Endocrinol Metab 2000 ;85 :4000-2),每天有大约300,000人死于肥胖并发症(Allison et al., JAMA 1999 ;282 :1530-8)。已经揭示了体重仅增加1kg,则心血管疾病危险增加3.1%以及糖尿病危险增加4.5-9%;且已经揭示体重减轻大约11%则发病率降低25%。因此,急迫需要开发肥胖的治疗策略(Arbeenyet al., Obes Res 2004 ;12 :1191-6)。在1893,为了治疗肥胖,甲状腺激素药物用于通过去甲肾上腺素和肾上腺素促进生热作用。然而,这些药物加速瘦组织量(lean tissue mass)减少,导致负氮平衡,诱导心脏毒性副作用而不是呈现出希望的减少脂肪组织的作用。因此,目前其有限地用于甲状腺功能低下患者中。在二十世纪三十年代,苯丙胺用作食欲抑制剂,但是由于药物依赖性而禁止长期使用。芬特明、安非拉酮和芬氟拉明不诱导药物依赖性,已经用于治疗肥胖症。然而,由于大多数这些药物可导致心血管疾病、高血压、心律失常、肺动脉高压和精神障碍如记忆力下降等疾病,因此也禁止使用。目前肥胖的治疗策略包括刺激中枢肾上腺素能受体或者阻止5-羟色胺再吸收的食欲抑制剂、生热的 β 3-肾上腺素能激动剂、消化性脂肪酶抑制剂以及激素调节剂如瘦素(leptin)和PYY(Dunstan et al., Nature reviews drug discovery 2006 ;5 :919-931)。在这些药物中,仅阻止5-羟色胺再吸收的脂肪酶抑制剂、奥利司他(orlistat)和西布曲明(sibutramine)是FDA许可的药物,但是也导致包括脂肪泻、头痛以及血压升高等副作用。因此,在开发即安全又有效的药物中仍存在许多困难。

[0003] GLP-1,由小肠分泌的一种激素,通常促进胰岛素的生物合成与分泌,以及抑制胰高血糖素分泌,从而调节血糖浓度。据报道在将GLP-1给予小鼠时,其具有抑制食物摄取和降低体重的作用(Meeran et al, Endocrinology 1999 ;140 :244-50),而且在正常和肥胖小鼠中均呈现这些作用,表明其作为抗肥胖制剂的潜力。然而,GLP-1由二肽酶IV(DPPIV)快

速降解,因此其作为药物的潜力非常有限。另一方面,exendin 是在亚利桑那州和墨西哥常见的大毒蜥蜴 (Gila-monster) 的毒液中发现的一种肽。其具有与 GLP-1 相似的生理学活性,但是对 DPP IV 具有抗性,示出其作为糖尿病和肥胖症的治疗剂的可能性。Exendin 是商业化糖尿病的治疗剂,一天注射两次。在美国专利 US6956026、US6989366 和 US7115569 中,揭示了使用 exendin 及其衍生物抑制食物摄取的方法,其中证实了抑制食物摄取的效力,但是在最大量给予之后,该效力维持 6 小时。对于治疗慢性疾病如肥胖症,患者需要一天注射多次该药物,这对于患者而言仍有困难。此外,所述专利中描述的 exendin 衍生物在个体中呈现不同的效力、剂量依赖性以及持续时间,在抑制食物摄取方面未示出优于天然 exendin 的效力。

发明内容

[0004] 技术问题

[0005] 因此,本发明人使用一种制备方法,其中免疫球蛋白 Fc 区域、非肽基接头和促胰岛素释放肽彼此共价连接,以最大化延长促胰岛素释放肽的血液半衰期的作用以及维持体内活性。他们发现缀合物,具体是 exendin-4、除去 N-末端胺基团的脱-氨基-组氨酰-exendin-4、通过用羟基基团取代 N-末端胺基团制备的 β -羟基-咪唑并-丙酰-exendin-4、通过用两个甲基基团修饰 N-末端胺基团制备的二甲基-组氨酰-exendin-4,以及除去第一个氨基酸组氨酸的 α 碳原子制备的咪唑并-乙酰-exendin-4,具有显著增强的抑制食物摄取和延长效力体内持续时间的作用,从而实现本发明。

[0006] 技术解决方案

[0007] 本发明的目的是提供治疗肥胖相关疾病、抑制食物摄取和减少体脂的组合物,所述组合物包含通过非肽基接头共价连接促胰岛素释放肽与载体物质制备的缀合物。

[0008] 本发明的另一目的是提供通过使用包含所述缀合物的组合物治疗肥胖相关疾病、抑制食物摄取以及减少体脂的方法。

[0009] 优势效应

[0010] 本发明提供的包含促胰岛素释放肽缀合物的组合物在抑制食物摄取以减少体脂以及治疗肥胖相关疾病方面呈现出优于天然促胰岛素释放肽的作用。因此,所述组合物可用于最大化肥胖相关疾病的治疗作用。

[0011] 附图描述

[0012] 图 1 示出在 ob/ob 小鼠中减轻体重的效力;

[0013] 图 2 示出 ob/ob 小鼠体脂的变化;

[0014] 图 3 示出在 DIO 动物模型中减轻体重的效力;

[0015] 图 4 示出在 ZDF 大鼠中减少体脂的效力;以及

[0016] 图 5 示出在 ZDF 大鼠中减少食物摄取的效力。

[0017] 最佳实施方式

[0018] 一方面,本发明涉及治疗肥胖相关疾病、抑制食物摄取或者减少体脂的组合物,所述组合物包含通过非肽基接头共价连接促胰岛素释放肽与载体物质制备的缀合物。

[0019] 如本文所用,术语“肥胖相关疾病”可选自如下疾病:过食症 (overeating)、暴食

症 (binge eating)、易饥症、高血压、糖尿病、血浆胰岛素浓度升高、胰岛素抗性、高脂血症、代谢综合征、胰岛素抗性综合征、肥胖相关的胃食管返流症、动脉硬化症、高胆固醇血症、高尿酸血症、下背痛、心脏肥大和左心室肥大、脂肪代谢障碍、非酒精性脂肪性肝炎、心血管疾病,和多囊性卵巢综合征,以及具有这些肥胖相关疾病包括希望减轻体重的那些对象。

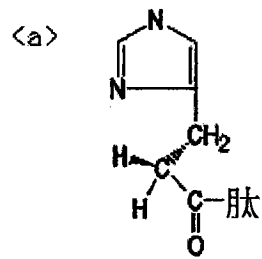
[0020] 如本文所用,术语“促胰岛素释放肽”是具有促胰岛素释放功能的肽,其促进胰腺 β 细胞中胰岛素的合成与表达。这些肽包括前体、激动剂、衍生物、片段以及变体,优选 GLP(胰高血糖素样肽)-1、exendin 3 和 exendin 4 或者其衍生物。

[0021] 本发明的促胰岛素释放肽衍生物是具有化学修饰的 N-末端组氨酸残基的衍生物,或者是具有化学修饰的 N-末端组氨酸残基的氨基基团的衍生物。此外,exendin-4 或者 exendin-3 的衍生物是指通过在天然肽中取代、缺失或者插入一或多个氨基酸制备的肽,或者通过烷化、酰化、酯化或者酰胺化天然肽中的一或多个氨基酸制备的化学修饰的肽,以及是指具有天然活性的肽。举例的 exendin-3 或者 exendin-4 衍生物包括但不限于具有部分缺失的 C-末端或者用非天然氨基酸正亮氨酸取代的 exendin 类似物,其在 W097/46584 中描述;具有非天然氨基酸如戊基甘氨酸、高脯氨酸和叔丁基甘氨酸 (tertbutylglycine) 取代的 exendin 类似物,其在 W099/07404 中描述;具有由于部分缺失 C-末端氨基酸残基而比天然 exendin 短的氨基酸序列的 exendin 类似物;以及具有其它氨基酸取代的 exendin 类似物,其在 US2008/0119390 中揭示,所述文献在此均以其全部内容并入本文作参考。更优选所述促胰岛素释放肽是 exendin-4 或者其衍生物。

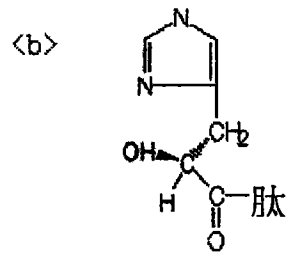
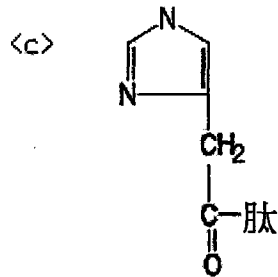
[0022] 具体地,本发明的促胰岛素释放肽衍生物可包括其除去 N-末端胺基团的衍生物(脱氨-组氨酰-衍生物)、通过用羟基基团取代氨基基团制备的衍生物(β -羟基咪唑并丙酰-衍生物)、通过用两个甲基残基修饰氨基基团制备的衍生物(二甲基-组氨酰-衍生物)、通过用羧基基团取代 N-末端氨基基团制备的衍生物(β -羧基咪唑并丙酰-衍生物),或者除去氨基基团的正电荷的衍生物,其中除去 N-末端组氨酸残基的 α 碳原子而仅剩下咪唑并乙酰基团,以及其它 N-末端氨基基团修饰的衍生物。

[0023] 在本发明中,促胰岛素释放肽衍生物更优选是具有化学修饰的 N-末端氨基基团和氨基酸残基的 exendin 4 衍生物,更优选通过除去或者取代 exendin-4 的 N-末端 His¹ 残基 α 碳原子中存在的 α 氨基基团或者通过除去或者取代 α 碳原子制备的 exendin-4 衍生物。更优选,如下文 <a> 至 <e> 所示,除去 N-末端氨基基团的脱氨-组氨酰-exendin-4 (DA-Exendin-4)、通过用羟基基团取代氨基基团制备的 β -羟基咪唑并丙基-exendin-4 (HY-exendin-4)、通过用羧基基团取代氨基基团制备的 β -羧基咪唑并丙基-exendin-4 (CX-exendin-4)、通过用两个甲基残基修饰氨基基团制备的二甲基-组氨酰-exendin-4 (DM-exendin-4) 或者除去 N-末端组氨酸残基的 α 碳原子制备的咪唑并乙酰-exendin-4 (CA-exendin-4)。

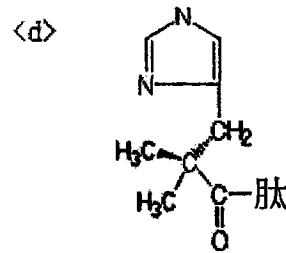
[0024]



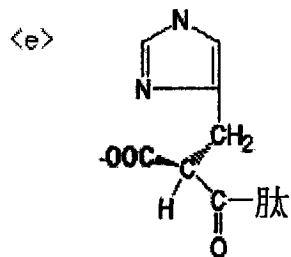
脱氨-组氨酰-exendin-4

 β -羟基咪唑并丙基-exendin-4

咪唑并乙酰-exendin-4



二甲基-组氨酰-exendin-4

 β -羧基咪唑并丙基-exendin-4

[0025] 可用于本发明中的载体物质是这样的物质,其通过非肽基接头与促胰岛素释放肽共价连接,及显著延长所述肽的血液半衰期,且可以选自免疫球蛋白Fc区域、血清白蛋白、运铁蛋白、胶原蛋白及其片段、纤连蛋白及其片段以及PEG,优选免疫球蛋白Fc区域。如本文所用,术语“免疫球蛋白Fc区域”是指这样的蛋白质,其含有免疫球蛋白的重链恒定区2(C_H2)和重链恒定区3(C_H3),排除了免疫球蛋白的重链和轻链可变区、重链恒定区1(C_H1)和轻链恒定区1(C_L1)。其在重链恒定区可进一步包含铰链区。本发明的免疫球蛋白Fc区域也可含有部分或者全部Fc区域,包括重链恒定区1(C_H1)和/或轻链恒定区1(C_L1),排除了重链和轻链的可变区,只要其具有与天然免疫球蛋白基本相似或者优于其的生理学功能即可。所述免疫球蛋白Fc区域也可以是缺失C_H2和/或C_H3的氨基酸序列的相对较长部分的片段。也就是说,本发明的免疫球蛋白Fc区域可包含:1)C_H1结构域,C_H2结构域,C_H3结构域和C_H4结构域;2)C_H1结构域和C_H2结构域;3)C_H1结构域和C_H3结构域;4)C_H2结构域和C_H3结构域;5)一或多个结构域与免疫球蛋白铰链区(或者铰链区的一部分)的组合;以及6)重链恒定区和轻链恒定区的每个结构域的二聚体。本发明的免疫球蛋白Fc区域包括天然氨基酸序列及其序列衍生物(突变体)。氨基酸序列衍生物是与天然氨基酸序列由于缺失、插入、非保守或者保守取代一或多个氨基酸残基或者这些方法的组合而不同的序列。例如,在

IgG Fc 中,已知在结合中起重要作用的在 214-238、297-299、318-322 或者 327-331 位置的氨基酸残基,可以用作修饰的合适靶位。其它各种衍生物也是可能的,包括其中缺失能形成二硫键的区域的衍生物,或者在天然 Fc 形式的 N- 末端消除一些氨基酸残基或者在此加入甲硫氨酸残基的衍生物。此外,为了除去效应物功能,缺失可以在补体结合位点如 C1q- 结合位点和 ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性) 位点发生。制备免疫球蛋白 Fc 区域的这种序列衍生物的技术在 W097/34631 和 W0 96/32478 中揭示。本领域已知通常不改变蛋白质或者肽活性的所述蛋白质和肽中的氨基酸置换 (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最常见的置换是 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 双方置换。此外,如果需要,可以通过磷酸化、硫酸化、酰化 (acrylation)、糖基化、甲基化、法尼基化 (farnesylation)、乙酰化、酰胺化等方式修饰 Fc 区域。前述 Fc 衍生物是具有与本发明的 Fc 区域相同生物学活性或者改良的稳定性如对于热、pH 等的稳定性的衍生物。此外,这些 Fc 区域可以得自分离自人及其它动物包括牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠的天然形式,或者可以是得自转化的动物细胞或者微生物的其重组或者衍生形式。在此,其可以得自天然免疫球蛋白,通过从人或者动物生物体中分离总免疫球蛋白以及用蛋白酶解酶处理其而获得。用木瓜蛋白酶将天然免疫球蛋白消化为 Fab 和 Fc 区域以及用胃蛋白酶处理导致 pF' c 和 F(ab)₂ 片段产生。对这些片段可以进行例如大小排阻层析以分离 Fc 或者 pF' c。优选地,人衍生的 Fc 区域是得自微生物的重组免疫球蛋白 Fc 区域。此外,本发明的免疫球蛋白 Fc 区域可以是具有天然糖链形式、与天然形式相比糖链增多或者与天然形式相比糖链减少,或者可以是去糖基化形式。增多、减少或者除去免疫球蛋白 FC 糖链可以通过本领域常用方法实现,例如化学方法、酶方法以及使用微生物的遗传工程方法。从 Fc 区域中除去糖链导致与第一个补体成分 C1 的 C1q 部分的结合亲和性显著降低,以及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或者补体依赖性细胞毒性降低或丧失,从而在体内不诱导不希望的免疫应答。在这方面,去糖基化 (deglycosylated) 或者非糖基化 (aglycosylated) 形式的免疫球蛋白 Fc 区域作为药物载体可以更适于本发明目的。如本文所用,术语“去糖基化”是指通过酶从 Fc 区域中除去糖部分,术语“非糖基化”是指 Fc 区域由原核生物优选大肠杆菌以非糖基化形式产生。另一方面,免疫球蛋白 Fc 区域可以衍生自人或其它动物,包括牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠,优选人。此外,所述免疫球蛋白 Fc 区域可以是衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE 和 IgM 的 Fc 区域,或者可以由其组合或者杂交体制成。优选地,衍生自 IgG 或者 IgM,其是人血液中最丰富的蛋白质,最优选衍生自 IgG,已知其提高配体结合蛋白的半衰期。另一方面,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 区域的多肽与不同来源的单链多肽连接,形成二聚体或者多聚体。也就是说,二聚体和多聚体可以从选自 IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc 和 IgE Fc 片段的两个或多个片段中形成。如本文所用,术语“杂交体”是指编码不同来源的两个或多个免疫球蛋白 Fc 区域的序列存在于一个单链免疫球蛋白 Fc 区域中。在本发明中,各种类型的杂交体均是可能的。也就是说,结构域杂交体可以由选自 IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc 和 IgD Fc 的 C_H1、C_H2、C_H3 和 C_H4 的 1-4 个结构域组成,以及可包含铰链区。另一方面,将 IgG 分为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚类,且本发明包括其组合和杂交体。优选 IgG2 和 IgG4 亚类,最优选很少具有效应功能如 CDC(补体依赖性细胞毒性) 的 IgG4 的 Fc 区域。

也就是说,作为本发明的药物载体,最优选的免疫球蛋白 Fc 区域是人 IgG4- 衍生的非糖基化 Fc 区域。人衍生的 Fc 区域比非人衍生的 Fc 区域更优选,所述非人衍生的 Fc 区域在人体内可以作为抗原,导致不希望的免疫应答如产生所述抗原的新抗体。

[0026] 在本发明的组合物包含的缀合物中,促胰岛素释放肽通过非肽基接头与载体物质连接。如本文所用,术语“非肽基接头”是指单一 (single) 化合物或者包含彼此连接的两或多个重复单位的生物相容的聚合物。可用于本发明中的非肽基接头可具有任何化学结构,主要功能是作为接头通过共价键连接促胰岛素释放肽与载体物质。因此,非肽基接头特征在于其是在两端具有能共价结合肽 / 载体物质的反应性基团的化合物,其中在两端的末端反应性基团彼此相同或者不同。在非肽基接头两端的反应性基团可以相同或不同。例如,非肽基接头在一端可具有马来酰亚胺基团,在另一端可具有醛基团、丙醛基团或者丁醛基团。在非肽基接头两端的反应性基团优选选自反应性醛基团、丙醛基团、丁醛基团、马来酰亚胺基团和琥珀酰亚胺衍生物。所述琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺丙酯、羟基琥珀酰亚胺、琥珀酰亚胺羧基甲酯或者琥珀酰亚胺碳酸盐。特别地,当非肽基接头在其两端均具有反应性醛基团时,在这两端可以通过最小的非特异性反应有效地连接生理学活性多肽和免疫球蛋白 Fc 区域。通过醛键的还原性烷化产生的终产物与通过酰胺键连接相比更稳定。醛反应性基团在低 pH 选择性结合 N- 末端,且在高 pH 如 pH 9.0 可以结合赖氨酸残基形成共价键。当使用其两端均具有反应性羟基基团的聚乙二醇作为非肽基聚合物时,所述羟基可以通过已知的化学反应有各种反应基团激活,或者可以使用具有可商购修饰的反应基团的聚乙二醇以制备本发明的促胰岛素释放肽缀合物。可用于本发明中的非肽基聚合物可以是 SMCC (琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺-甲基)环己烷-1-羧酸酯) 或者 SFB (琥珀酰亚胺 4-甲酰基苯甲酸),其可以与肽的胺和巯基 (sulfydryl) 共价连接,但非限于此。所述非肽基聚合物可选自聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇与丙二醇的共聚物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙烯醚、可生物降解的聚合物如 PLA (聚(乳酸)) 和 PLGA (聚乳酸乙醇酸)、脂质聚合物、壳多糖、透明质酸,及这些聚合物的组合,优选聚乙二醇。本领域熟知的且本领域技术人员易于制备的其衍生物也包含在本发明范围内。

[0027] 用以治疗肥胖相关疾病的本发明组合物中包含的缀合物优选通过非肽基接头共价连接促胰岛素释放肽与载体物质制备,其在 W008/082274 中揭示,如式 1 所示:

[0028] 式 1

[0029] R_1-X-R_2-L-F

[0030] 其中 R_1 选自脱 (des)-氨基-组氨酸、二甲基-组氨酸、 β -羟基咪唑并丙酰、4-咪唑并乙酰和 β -羧基咪唑并丙酰,

[0031] R_2 选自 $-NH_2$ 、 $-OH$ 和 $-Lys$,

[0032] X 选自

[0033] Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser、

[0034] Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly 和

[0035] Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Va

l-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Z-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser,

[0036] Y 选自 Lys、Ser 和 Arg,

[0037] Z 选自 Lys、Ser 和 Arg,

[0038] L 是非肽基接头,

[0039] F 是免疫球蛋白 Fc。

[0040] 此外,本发明的包含缀合物的药物组合物可包含药物可接受的载体。对于口服给予,所述药物可接受的载体可包括粘合剂、润滑剂、崩解剂、赋形剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂和香味剂。对于可注射制品,所述药物可接受的载体可包括缓冲剂、防腐剂、止痛剂、增溶剂、等渗剂和稳定剂。对于局部给予制品,所述药物可接受的载体可包括基质、赋形剂、润滑剂和防腐剂。本发明的药物组合物可以组合前述药物可接受的载体配制成各种剂量形式。例如,对于口服给予,所述药物组合物可以配制为片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆或者包药干糊片(wafer)。对于可注射制品,所述药物组合物可以配制为单位剂量形式,如以单一剂量形式置于多剂量容器或者安瓿中。所述药物组合物也可以配制为溶液、悬浮液、片剂、药丸、胶囊和长效制品形式。另一方面,举例的适于药物配制的载体、赋形剂和稀释剂包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、藻酸盐、凝胶、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(methylhydroxybenzoate)、羟基苯甲酸丙酯(propylhydroxybenzoate)、滑石、硬脂酸镁和矿物油。此外,所述药物配制物可进一步包含充填剂、抗凝剂、润滑剂、保湿剂、香味剂以及抗菌剂。本发明的药物组合物的给予剂量可以通过一些相关因素确定,包括治疗疾病的类型、给予途径、患者年龄、性别、体重和疾病严重性。由于本发明的药物组合物具有极佳的体内效力和效价持续时间,因此可以显著减少包含本发明组合物的药物的给予频率和剂量。

[0041] 本发明组合物中包含的促胰岛素释放肽缀合物以明显低于天然促胰岛素释放肽的量即可呈现出持续抑制食物摄取的作用,从而可用于治疗如肥胖症和急性冠状动脉综合征等疾病。此外,由于抑制食物摄取的作用(抑制食欲),所述促胰岛素释放肽缀合物可用于减少体脂如胆固醇和脂肪组织。为了治疗肥胖症和肥胖相关疾病,需要减少体脂,但是减轻瘦体重(leantissue)-即丧失蛋白质-是不可取的。由于瘦体重由肌肉、生命器官、骨、结缔组织及其它非脂肪组织组成,因此确信瘦体重的丧失对于人体健康有害。因此,由于本发明的组合物抑制食欲引起的体重减轻不导致瘦体重减轻,而是脂肪组织减轻,因此是治疗肥胖相关疾病的非常重要的因素。

[0042] 由于促胰岛素释放肽如 GLP-1、amylin、CCK 和 exendin 在给予后 1-6 小时的短时间内维持其抑制食欲的效力,因此必须重复给予以治疗慢性疾病如肥胖症和肥胖相关疾病。本发明的组合物中包含的促胰岛素释放肽缀合物在低剂量即可维持其效力达到一周以上的时间,从而呈现出最大治疗效力。

[0043] 再一方面,本发明提供了通过使用所述组合物治疗肥胖相关疾病的方法、抑制食物摄取的方法以及减轻体重的方法。特别地,本发明的方法可包括给予治疗可接受量的所述组合物的步骤。

[0044] 如本文所用,术语“给予”是指通过某一合适方法将预定量的物质导入患者体内。

包含所述缀合物的组合物可以通过任何常用模式给予,只要其可以到达希望的组织即可。可以通过各种给予模式给予,包括腹膜内、静脉内、肌内、皮下、皮内、口服、局部、鼻内、肺内以及直肠内给予,但是本发明不限于这些举例的给予模式。然而,由于肽在经口服给予时被消化,因此口服给予的组合物的活性成分应加以包膜或者配制为在胃中抗降解形式。优选地,本发明的组合物可以可注射形式给予。此外,本发明的药物组合物可以通过使用能将活性成分转运至靶细胞的某一装置给予。在这方面,所述组合物的治疗可接受剂量可以根据前述各个因素确定。

[0045] 根据本发明另一方面,本发明提供了单独使用促胰岛素释放肽缀合物或者与一或多种抗肥胖药物组合治疗肥胖相关疾病的药物组合物。组成本发明药物组合物的用以与所述促胰岛素释放肽缀合物组合治疗肥胖相关疾病的物质例如包括示出抑制食欲或者增强能量代谢活性的物质、抑制脂质降解活性的物质、延迟胃排空活性的物质、示出蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTP) 1b- 抑制活性及 DPPIV- 抑制活性的物质,如 GLP-1 及其衍生物 (Patricia. , Trends in endocrinology and metabolism 2007 ;18 :240-245)、糊精、PYY(肽 YY) (Lynn et al. , Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2007 ;17 :1916-1919)、瘦素、缩胆促胰素 (cholecystokinin) (CCK)、胃泌酸调节素 (oxyntomodulin)、ghrelin 拮抗剂、NPY 拮抗剂 (Elena et al. , Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease 2008 ;18 :158-168), Sarika et al. , Neuropeptides 2006 ;40 :375-401)、利莫那班 (rimonabant)、西布曲明和奥利司他 (Alan Dove. , Nature biotechnology 2001 ;19 :25-28), 但不限于这些物质。

实施例

[0046] 在下文中,通过如下实施例可以获得对于本发明更好的理解,所述实施例只是例证本发明,而无限制本发明之意。

[0047] 实施例 1 :制备促胰岛素释放肽缀合物 (CA-Exendin)

[0048] 将 3.4K PropionALD(2) PEG(具有两个丙醛基团的 PEG, IDB Inc. , Korea) 和咪唑并 - 乙酰 Exendin-4 的赖氨酸残基 (Bachem, Swiss) 进行聚乙二醇化 (pegylation), 通过将所述肽与 PEG 以 1 : 15 摩尔比率在 4°C 反应过夜, 肽浓度为 5mg/ml。在此期间, 在 pH 7.5 缓冲剂中进行反应, 向其中加入作为还原剂的 20mM SCB(NaCNBH₃) 以进行反应。在如下条件下使用 SOURCE S(XK 16ml, Amersham Biosciences) 分离单聚乙二醇化的 exendin 和异构体。

[0049] 柱 :SOURCE S(XK 16ml, Amersham Biosciences)

[0050] 流速 :2.0ml/ 分钟

[0051] 梯度 :A 0 → 100% 45 分钟 B(A :20mM 柠檬酸 pH 3.0 ;B :A+0.5MKCl)

[0052] 将分离的单聚乙二醇化的 CA-Exendin-4 与免疫球蛋白 Fc 结合。反应在肽 : 免疫球蛋白 Fc = 1 : 4 的比率在 4°C 进行 16 小时, 总蛋白质浓度为 50mg/ml。反应在 100mM K-P(pH 6.0) 溶液中进行, 向其中加入作为还原剂的 20mM SCB。在结合反应之后, 使用 SOURCE Phe(16ml) 和 SOURCE Q(16ml) 进行两次纯化步骤。

[0053] 柱 :SOURCE Phe(HR16ml, Amersham Biosciences)

[0054] 流速 :2.0ml/ 分钟

[0055] 梯度 :B 100 → 0% 30 分钟 B(A :20mM Tris pH7.5 ;B :A+1.5M NaCl)

[0056] 柱 :SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences)

[0057] 流速 :2.0ml/ 分钟

[0058] 梯度 :A 0 → 25% 60 分钟 B(A :20mM Tris pH7.5 ;B :A+1M NaCl)

[0059] 实施例 2 :促胰岛素释放肽缀合物在 ob/ob 小鼠中的减轻体重作用

[0060] 将熟知的肥胖症动物模型 ob/ob 小鼠 (C57BL/6JHamSlc-ob/bo, 雌性, 8-9 周龄) 分为 4 组 (每组 5 只小鼠), 然后给予载体和 Byetta (Amylin-Lily, exendin-4, 45 μg/kg, 每天皮下注射) 以及在实施例 1 中制备的促胰岛素释放肽缀合物 (45 μg 或者 100 μg/kg, 每周皮下注射一次)。然后, 测量 28 天体重改变情况, 在完成给予后测量血液脂质代谢参数如胆固醇和游离脂肪酸水平。在完成检验后, 切离肝和脂肪组织, 并称重。促胰岛素释放肽缀合物在 ob/ob 小鼠中的减轻体重作用示于表 1。

[0061] 表 1

[0062]

检测材料	载体	Byetta (Exendin-4)	促胰岛素释放肽缀合物	
剂量(μg/kg)	-	45	45	100
总剂量(μg/kg)	-	1260	180	400
注射间隔时间(共 4 周)	-	一天	一周	一周
体重(%)	100	87.1	72.1	62.2
总胆固醇(%)	100	80.3	62.4	59.7
脂肪细胞指数(%)	100	96.4	88.9	81.2

[0063] 如表 1 和图 1 和图 2 所示, 所述促胰岛素释放肽缀合物示出在 1/7 剂量优于 Byetta 的减轻体重和降低胆固醇水平的作用, 且该作用是剂量依赖性的。此外, 每周给予一次所述促胰岛素释放肽缀合物的效力维持时间比每天给予 exendin-4 的效力维持时间长。

[0064] 实施例 3 :促胰岛素释放肽缀合物在 DIO 小鼠中的减轻体重作用

[0065] 将熟知的肥胖症动物模型 DIO (饮食诱导的肥胖症) 小鼠 mice (C57BL/6NcrjBgi, 雄性, 25 周龄) 分为 5 组 (每组 5 只小鼠), 然后给予载体和 Byetta (100 μg/kg, 每天皮下注射) 以及在实施例 1 中制备的促胰岛素释放肽缀合物 (20、50、100 μg/kg, 每周皮下注射一次)。然后, 测量 2 周体重改变情况。促胰岛素释放肽缀合物在 DIO 小鼠中的减轻体重作用示于表 2。

[0066] 表 2

[0067]

检测材料	载体	Byetta	促胰岛素释放肽缀合物		
剂量(μg/kg)	-	50	20	50	100
总剂量(μg/kg)	-	700	40	100	200
注射间隔时间(共 2 周)	-	一天	一周	一周	一周
与载体处理的体重减轻 比率(%)	0	6.2	13.4	19.1	29.0

[0068] 如表 2 和图 3 所示, 所述促胰岛素释放肽缀合物示出在 1/17.5 剂量优于 Byetta 的减轻体重的作用, 且该作用是剂量依赖性的。此外, 每周给予一次所述促胰岛素释放肽缀

合物的效力维持时间比每天给予 exendin-4 的效力维持时间长。

[0069] 实施例 4:促胰岛素释放肽缀合物在 ZDF (Zucker 糖尿病大鼠) 大鼠中的减轻体重作用

[0070] ZDF 通常用于糖尿病研究中,且具有与 ob/ob 小鼠相似的特征 (ZDF/Gmi-fa/fa, 雄性, 7 周龄), 将其分为 5 组 (每组 5 只小鼠), 然后给予载体和 Byetta (100 μ g/kg, 每天皮下注射) 以及在实施例 1 中制备的促胰岛素释放肽缀合物 (20、50、100 μ g/kg, 每周一次皮下注射)。然后, 测量 8 周的体重和食物摄取情况中的改变, 在完成给予之后测量血液脂质代谢参数如胆固醇水平。在完成检验之后, 切离脂肪组织并称重。所述促胰岛素释放肽缀合物在 ZDF 大鼠中的减轻体重作用在表 3 中示出。

[0071] 表 3

[0072]

检测材料	Byetta	促胰岛素释放肽缀合物		
剂量(μ g/kg)	100	20	50	100
总剂量(μ g/kg)	2800	80	200	400
注射间隔(共 4 周)	一天	一周	一周	一周
体重(%)	100	91.3	87.3	84.7
皮下脂肪(%)	100	78.5	76.9	61.6
脂肪细胞中脂肪(%)	100	87.1	82.3	74.6

[0073] 如表 3 和图 4 和图 5 所示, 所述促胰岛素释放肽缀合物示出在 1/35 剂量优于 Byetta 的减轻体重和体脂以及抑制食物摄取的作用, 且该作用是剂量依赖性的。此外, 每周给予一次所述促胰岛素释放肽缀合物的效力维持时间比每天给予 exendin-4 的效力维持时间长。

[0001]

序列表

- <110> 韩美药品工业株式会社
- <120> 包含促胰岛素释放肽缀合物的治疗肥胖相关疾病的药物组合物
- <130> OPA08097
- <140> PCT/KR2008/007074
- <141> 2008-11-28
- <150> US11/947,697
- <151> 2007-11-29
- <150> KR10-2008-0083194
- <151> 2008-08-26
- <160> 3
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 38
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A part X of insulinotropic peptide conjugate (Formula 1)
- <220>
- <221> PEPTIDE
- <222> (1)..(38)
- <223> Xaa in amino acid position 11 and Xaa in amino acid position 26, which may be identical or different, are each independently Lys, Ser or Arg.
- <400> 1
- Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15
- Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 20 25 30
- Gly Ala Pro Pro Ser
 35
- <210> 2
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> A part X of insulinotropic peptide conjugate (Formula 1)

[0002]

Ser or Arg.

<400> 2
 Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly
 20 25

<210> 3
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> A part X of insulinotropic peptide conjugate (Formula 1)

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(38)
 <223> Xaa in amino acid position 11 and Xaa in amino acid position 26,
 which may be identical or different, are each independently Lys,
 Ser or Arg.

<400> 3
 Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Xaa Gln Met Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser Ser
 20 25 30

Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

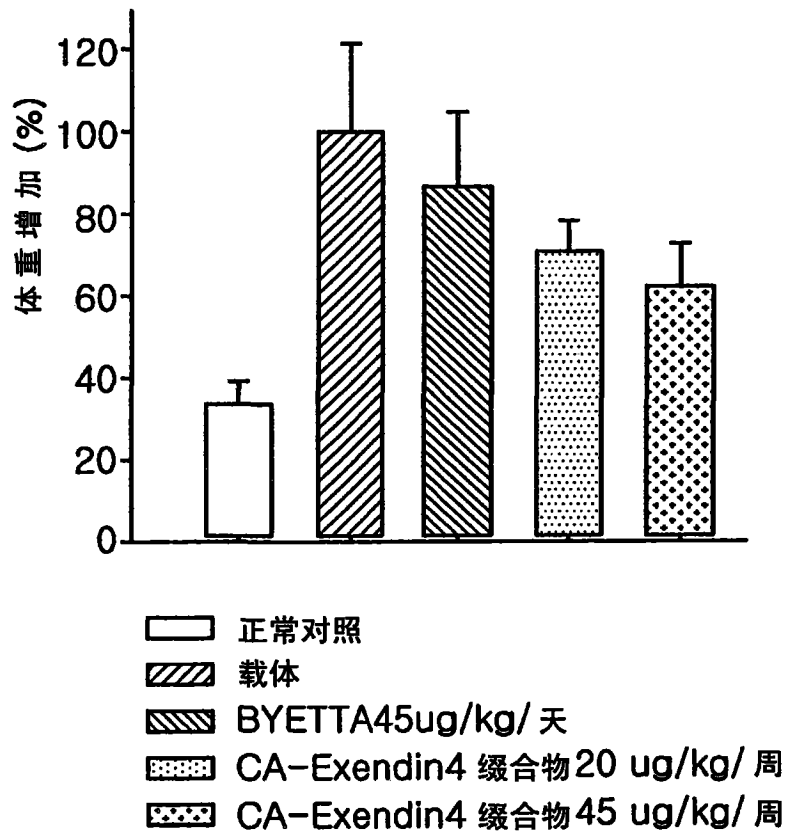


图 1

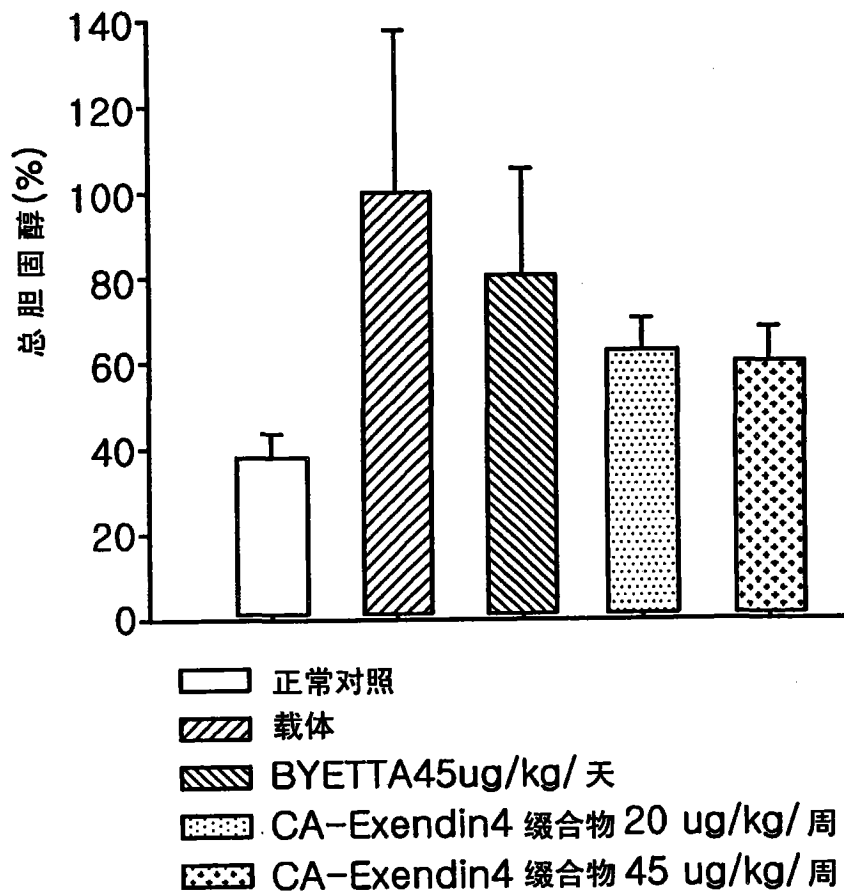


图 2

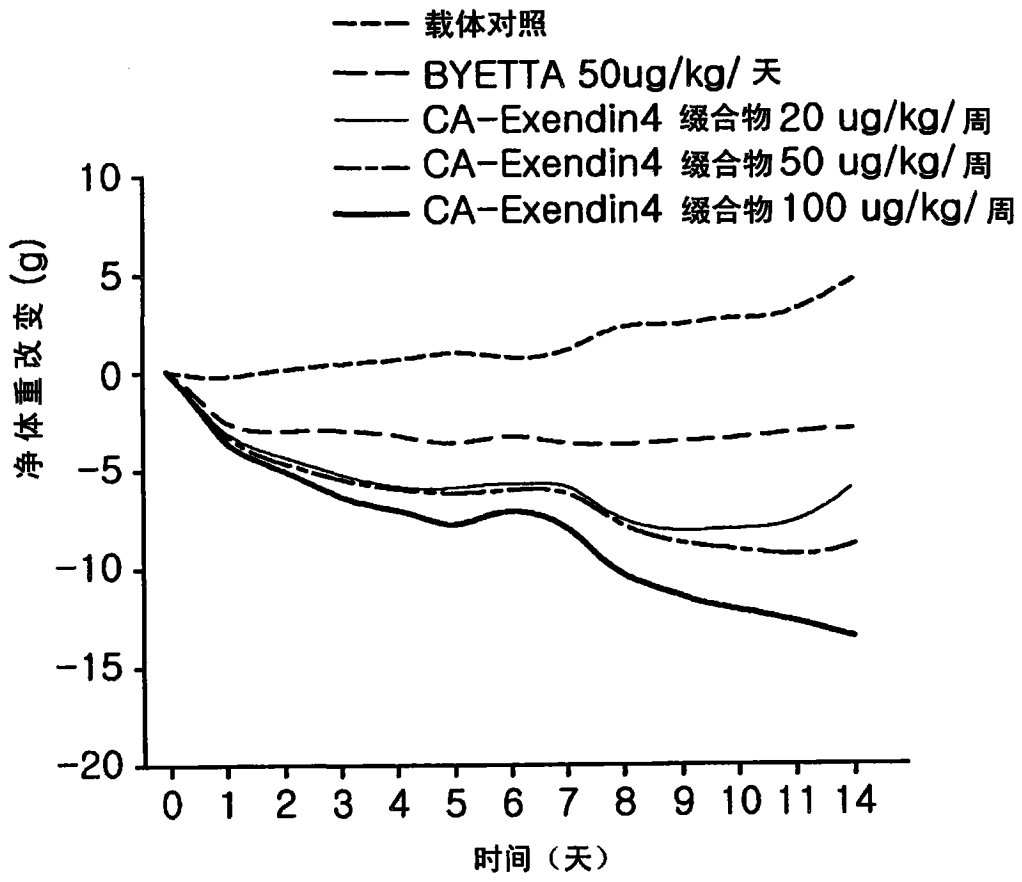


图 3

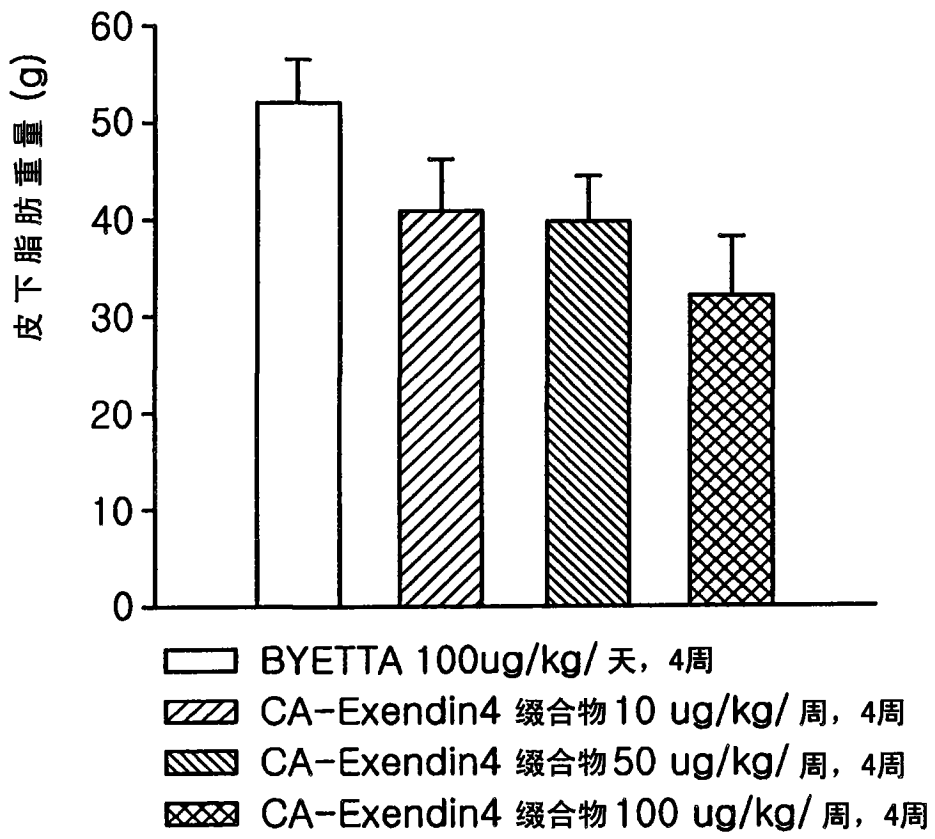


图 4

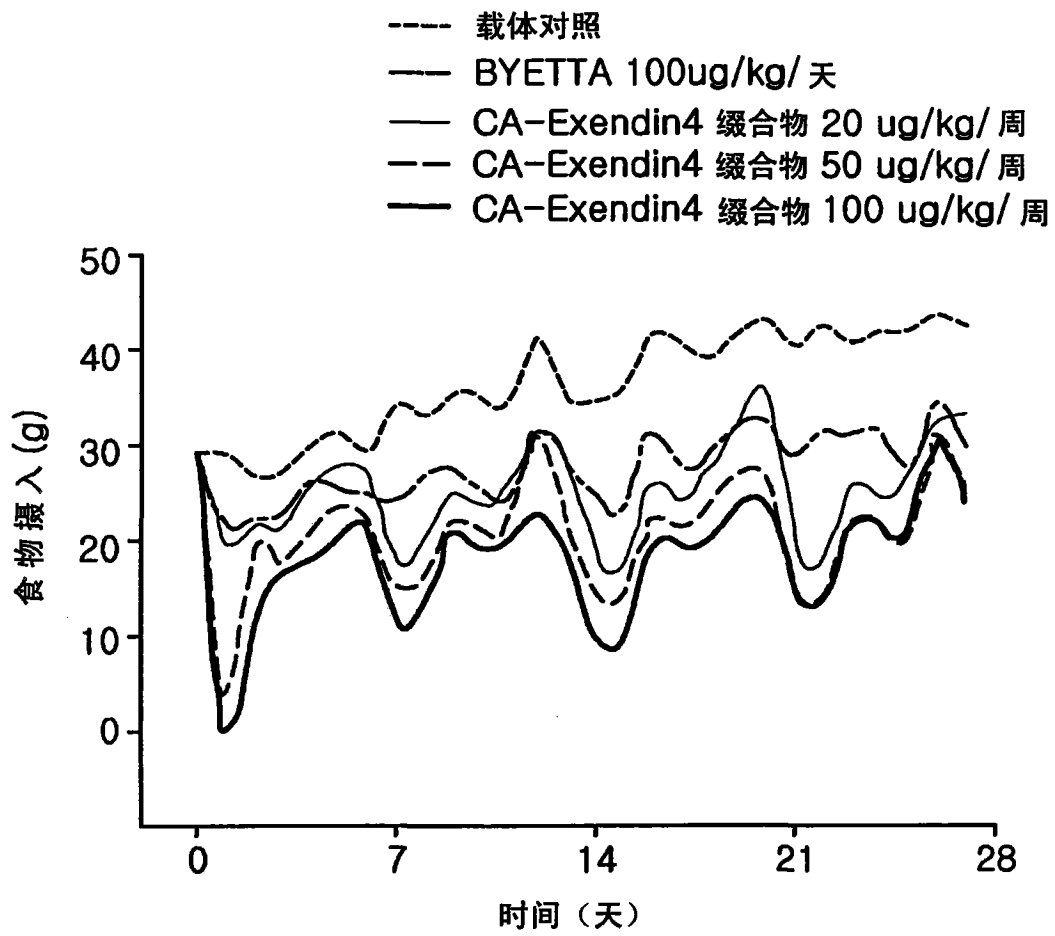


图 5