(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118742317 A
(43)申请公布日 2024.10.01

(21)申请号 202280092331.5
(22)申请日 2022.12.22
(30)优先权数据
10-2021-0185351 2021.12.22 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2022/021129 2022.12.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/121370 KO 2023.06.29
(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 崔宰赫 李钟旻 金尚允
(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 董志勇
(51)Int.Cl.
A61K 38/16(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61K 47/60(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书32页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

肝靶向物质及其用途

(57)摘要

本发明涉及一种肝靶向药物,及其对需要肝中的药物作用的疾病的治疗用途。此外,本发明还涉及一种其中使用对胰高血糖素具有活性的物质,以便在体内施用后诱导靶向肝组织或增加在肝组织中的分布的方法。

CN 118742317 A

1.一种药物组合物,其包含肝靶向药物,并且在施用所述药物的受试者的体内器官中的肝中具有高分布,其中所述肝靶向药物是包括以下通式2的氨基酸序列的肽:

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(通式2,SEQ ID NO:47),

其中在以上所述通式2中,

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);

X15是天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C);

X16是谷氨酸(E)或丝氨酸(S);

X17是赖氨酸(K)或精氨酸(R);

X20是谷氨酰胺(Q)或赖氨酸(K);

X21是天冬氨酸(D)或谷氨酸(E);

X24是缬氨酸(V)或谷氨酰胺(Q);以及

X30是半胱氨酸(C)或不存在

(条件是不包括与SEQ ID NO:12相同的通式2的氨基酸序列)。

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

[化学式1]

X-L-F

其中,

X表示包括通式2的氨基酸序列的肽;

L表示含有乙二醇重复单元的接头;

F表示免疫球蛋白Fc区;以及

“-”符号分别表示X和L之间以及L和F之间的共价连接。

3.根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述体内器官为肝、心脏、肺、大肠、脾脏、胰腺、脂肪组织、小肠、胃、肌肉、肾脏和脑,其中所述药物的分布在肝中最高。

4.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于预防或治疗需要肝中的药物作用的疾病。

5.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中施用后肝中所述肝靶向药物的组织与血清比(T/S比)是选自以下中的至少一种:

(a)施用后40-50小时,T/S比为20-40%;以及

(b)施用后160-180小时,T/S比为25-40%。

6.根据权利要求5所述的药物组合物,其中施用后所述肝靶向药物在肝中的所述T/S比是选自以下中的至少一种:

(a)施用后2天,T/S比为25-35%;以及

(b)施用后7天,T/S比为27-37%。

7.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中施用后所述肝靶向药物表现出肝与肺组织中1:2-4的分布比。

8.根据权利要求7所述的药物组合物,其中施用后所述肝靶向药物表现出肝与肺组织中1:2.2-3.2的分布比。

9.根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述分布比是施用后施用后40-180小时的分布比。

10.根据权利要求8所述的药物组合物、

其中所述分布比是施用后2天至7天的分布比。

11.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肝靶向药物表现出:

(a)施用后40-50小时,肝与心脏中的分布比为1:1.6-3.0;以及

(b)施用后160-180小时,肝与心脏中的分布比为1:2.8-7.0。

12.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肝靶向药物对肝疾病、低血糖症或先天性高胰岛素血症具有治疗活性。

13.根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述需要肝中药物作用的疾病是肝病、低血糖症或先天性高胰岛素血症。

14.根据根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述低血糖症是急性低血糖症或慢性低血糖症。

15.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中在通式2中的X16和X20的氨基酸之间形成环。

16.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肽包括选自SEQ ID SEQ ID NO:13、15、19、33和36-45的氨基酸序列。

17.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肽包括选自SEQ ID NO:33和36-44的氨基酸序列。

18.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肽的C-末端被酰胺化或具有游离羧基(-COOH)。

19.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肽的C-末端被酰胺化。

20.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肽的C-末端未被修饰。

21.根据权利要求2所述的药物组合物,其中L是聚乙二醇。

22.根据权利要求2所述的药物组合物,其中L中乙二醇重复单元的化学式重量为在1至100kDa的范围内。

23.根据权利要求2所述的药物组合物,其中F是IgG Fc区。

24.一种通过向需要其的受试者施用权利要求1至23中任一项所述的药物组合物来诱导肝靶向药物靶向肝的方法。

25.一种通过向需要其的受试者施用权利要求1至23中任一项所述的药物组合物来诱导肝靶向药物在肝组织中分布增加的方法。

肝靶向物质及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肝靶向物质及其对需要药物在肝中作用的疾病的治疗用途。本发明还涉及一种用于在体内施用后诱导肝靶向物质靶向肝组织或诱导肝靶向物质在肝组织中分布增加的方法。

背景技术

[0002] 肝是人体最大的器官之一,并且在各种新陈代谢和整体新陈代谢中起着关键作用。在我们摄取的植物或动物物质以及由生物学功能性能所产生的代谢物中,有些对人体有益,有些则有害。肝所进行的化学过程有助于对有益物质进行适当的生物利用,同时通过化学代谢过程帮助有害物质通过尿液或粪便安全排泄。肝通过合成和分泌人体所需的各种蛋白质、脂肪和碳水化合物,在生物学功能中发挥着重要作用。因此,肝功能衰退会导致多种功能异常。参与血液凝固的凝血因子产生不足,造成容易出血,导致由于牙龈无力而频繁出血等症状;以及在肝硬化患者中,由于胰岛素分解不良和肝糖原储存不足而节食,通常会造成低血糖。肝在抵御细菌入侵方面也发挥着核心作用。特别是肝细胞中的Kupffer细胞,主要通过吞噬作用吞噬外来物质或细菌,并通过将进入体内的病毒暴露给免疫系统,诱导体内的天然免疫作用。此外,胆汁是肝细胞中合成和分泌的主要物质,每天大约形成800-1000cc,由水、电解质、胆汁酸、胆固醇、磷脂和胆红素组成。至于胆汁的主要功能,胆汁中的胆汁酸对小肠消化吸收脂肪和脂溶性维生素起着重要作用,胆汁本身用于通过粪便排泄体内产生的许多废物。存在由多种原因引起并且需要药物在肝中发挥作用的诸如肝病、低血糖或先天性高胰岛素血症等的各种疾病。

[0003] 同时,为了治疗以上提及的肝病,允许药物到达肝并在其中以高浓度分布是重要的技术挑战之一(韩国专利公开号:KR 10-2013-0131227)。

[0004] 肝靶向药物可以通过最小化现有药品的副作用且最大化其功效和有效性来优化药物治疗,从而能够有效地递送所需药量。这增加了到达靶向位点的药物量,提高生物利用度,从而能够更有效地治疗。这还防止药物被递送到预期位点以外的位点,从而减少副作用,并改善患者对药物的反应,大大有助于提高患者依从性。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 为了提高对需要肝中的药物作用的疾病的治疗效果,需要开发一种肝靶向药物,这种药物在施用其的受试者体内的器官中,在肝中具有优异的分布,并且具有治疗效果。

[0007] 技术方案

[0008] 本发明的一个方面是提供一种含有肝靶向药物的药物组合物,具体而言,一种药物组合物,其含有肝靶向药物,并且在施用其的受试者体内的器官中,在肝中具有高分布。

[0009] 本发明的另一方面是提供一种含有肝靶向药物的药物组合物,具体而言,一种含有肝靶向药物的药物组合物,该肝靶向药物用于预防或治疗需要药物在肝中作用的疾病。

[0010] 本发明的另一方面是提供一种用于预防或治疗需要药物在肝中作用的疾病的方法,该方法包括向需要其的受试者施用靶向肝组织的药物组合物或生物活性物质。

[0011] 本发明的另一方面是提供肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质在制备用于预防或治疗需要药物在肝中作用的疾病的药物中的用途。

[0012] 本发明的另一方面是提供一种通过向需要其的受试者施用肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质,用于诱导靶向肝的方法需要其的受试者。

[0013] 本发明的另一方面是提供一种通过向需要其的受试者施用肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质,用于诱导生物活性物质在肝组织中的分布增加的方法。

[0014] 有益效果

[0015] 含有与肝细胞受体结合的物质的本发明的药物(例如,生物活性蛋白质或肽衍生物),被更有效地从血管递送到肝组织,以提供作为体内施用后,在体内各器官中在肝中分布相对丰富的生物活性物质,具体而言,一种生物活性物质,其通过具有与胰高血糖素受体的结合亲和力而在肝组织中分布相对丰富并且甚至在7天内就能在肝中显示出高分布,并因此可被应用于包括肝病、低血糖症和先天性高胰岛素血症的需要药物在肝中作用的疾病等,同时减少患者在药物施用中的不适。

具体实施方式

[0016] 根据本发明的方面,提供了一种含有肝靶向药物的药物组合物,具体而言,一种在施用其的受试者体内器官中的肝中具有高分布的药物的药物组合物。在一个实施方式中,肝靶向药物可以是包括以下通式1的氨基酸序列的肽的形式或包括其的长效缀合物的形式。在另一个实施方式中,肝靶向药物可以是包括以下通式2的氨基酸序列的肽的形式或包括其的长效缀合物的形式。

[0017] 在一个实施方式中,肝靶向药物可以是包括以下通式1的氨基酸序列的肽的形式:

[0018] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30(通式1,SEQ ID NO:46)

[0019] 其中,

[0020] X1是组氨酸(H)、脱氨基-组氨酰、N-二甲基-组氨酰、β-羟基咪唑丙酰基、4-咪唑乙酰基、β-羧基咪唑丙酰基、色氨酸(W)或酪氨酸(Y)或不存在;

[0021] X2是α-甲基-谷氨酸、氨基异丁酸(Aib)、D-丙氨酸、甘氨酸(G)、N-甲基甘氨酸(Sar)、丝氨酸(S)、或D-丝氨酸;

[0022] X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)或半胱氨酸(C);

[0023] X10是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

[0024] X12是赖氨酸(K)或半胱氨酸(C);

[0025] X13是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

[0026] X14是赖氨酸(K)或半胱氨酸(C);

[0027] X15是天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)或半胱氨酸(C);

[0028] 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)或不存在;

[0029] 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)或不存在;

[0030] X18是丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、精氨酸(R)、缬氨酸(V)或半胱氨酸(C)或不存在;

[0031] X19是丙氨酸(A)、精氨酸(R)、丝氨酸(S)、缬氨酸(V)或半胱氨酸(C)或不存在;

[0032] X20是赖氨酸(K)、组氨酸(H)、谷氨酸(E)、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)或不存在;

[0033] 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)或不存在;

[0034] X23是异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)或精氨酸(R)或不存在;

[0035] 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)或不存在;

[0036] 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)或不存在;

[0037] X28是谷氨酰胺(Q)、赖氨酸(K)、天冬酰胺(N)或精氨酸(R)或不存在;

[0038] X29是赖氨酸(K)、丙氨酸(A)、甘氨酸(G)或苏氨酸(T)或不存在;和

[0039] X30是半胱氨酸(C)或不存在。

[0040] 根据本发明的一个方面,提供了一种药物组合物,其含有肝靶向药物,并且在施用其的受试者体内的器官中的肝中具有高分布的药物。在一个实施方式中,肝靶向药物可以是包括以下通式2的氨基酸序列的肽的形式:

[0041] 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(通式2,SEQ ID NO:47)

[0042] 其中在以上通式2中,

[0043] X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)或半胱氨酸(C);

[0044] X10是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C);

[0045] X12是赖氨酸(K)或半胱氨酸(C);

[0046] X15是天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C);

[0047] X16是谷氨酸(E)或丝氨酸(S);

[0048] X17是赖氨酸(K)或精氨酸(R);

[0049] X20是谷氨酰胺(Q)或赖氨酸(K);

[0050] X21是天冬氨酸(D)或谷氨酸(E);

[0051] X24是缬氨酸(V)或谷氨酰胺(Q);和

[0052] X30是半胱氨酸(C)或不存在

[0053] (条件是不包括与SEQ ID NO:12相同的通式2的氨基酸序列)。

[0054] 在另一个实施方式中,肽可以是长效缀合物的形式,其中长效缀合物由以下化学式1表示:

[0055] [化学式1]

[0056] X-L-F

[0057] 其中,

[0058] X表示表示包括以下通式2的氨基酸序列的肽:

[0059] L表示表示含有乙二醇重复单元的接头;

[0060] F表示表示免疫球蛋白Fc区;和

[0061] “-”符号分别表示表示X和L之间以及L和F之间的共价连接。

[0062] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,体内器官是肝、心脏、肺、大肠、脾脏、胰腺、脂肪组织、小肠、胃、肌肉、肾脏和大脑,其中药物在肝的分布最高。

[0063] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,组合物可用于预防或治疗需要在肝中的药物作用的疾病。

[0064] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,施用后肝中肝靶向药物的组织与血清比(T/S比)可以是选自以下中的至少一个:(a)在施用后的40-50小时,T/S比为20-40%;和(b)在施用后的160-180小时,T/S比为25-40%。

[0065] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,施用后肝中肝靶向药物的T/S比可以是选自以下中的至少一个:(a)在施用后的2天,T/S比为25-35%;和(c)施用后的7天,T/S比为27-35%。

[0066] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,肝靶向药物在施用后可表现出在肝与肺组织中的分布比1:约2至约4。

[0067] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,肝靶向药物在施用后可表现出在肝与肺组织中的分布比为1:约2至约3.2。

[0068] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,施用后在肝与肺组织中的分布比可以是施用后约40小时至约180小时的分布比。

[0069] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,施用后在肝与肺组织中的分布比可以是施用后约2天至约7天的分布比。

[0070] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,肝靶向药物显示出(a)在施用后40-50小时,在肝与心脏中的分布比为1:1.6-3.0;以及在施用后160-180小时,在肝与心脏中的分布比为1:2.8-7。

[0071] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,肝靶向药物可以是肽或包括其的长效缀合物的形式,其施用后在体内器官中的肝中的分布相对丰富。

[0072] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,肝靶向药物可以对需要肝中的药物作用的疾病具有治疗活性。

[0073] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,需要肝中的药物作用的疾病可以是肝病、低血糖症或先天性高胰岛素血症。

[0074] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,低血糖症可以是急性低血糖症或慢性低血糖症。

[0075] 在根据先前实施方式的任一个的药物组合物中,肝靶向药物可以是包括对胰高血糖素受体具有结合亲和力的肽序列的蛋白质或肽。

[0076] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,通式2中X16和X20的氨基酸之间可形成环。

[0077] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,包括通式2的氨基酸序列的肽可以包括选自SEQ ID NO:13、15、19、33和36至45的氨基酸序列。

[0078] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,包括通式2的氨基酸序列的肽可以包括选自SEQ ID NO:33和36至44的氨基酸序列。

[0079] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,包括通式1的氨基酸序列的肽可以包括SEQ ID NO:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42和44的任一个的氨基酸序列。

[0080] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,包括通式1的氨基酸序列的肽可以包括SEQ ID NO:20、22、23、27、33、37、38和44的任一个的氨基酸序列。

[0081] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,通式1中X10和X14、X12和X16、X16和X20、X17和X21、X20和X24以及X24和X28的氨基酸对中至少一个氨基酸对的每个氨基酸都可以被能够形成环的谷氨酸或赖氨酸取代。

[0082] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,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都可以被能够形成环的谷氨酸或赖氨酸取代。

[0083] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,可以在通式1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的两个氨基酸之间形成环。

[0084] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,肽可以包括选自SEQ ID NO:1至44的氨基酸序列。

[0085] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,肽的C-端可以被酰胺化,或具有游离羧基(-COOH)。

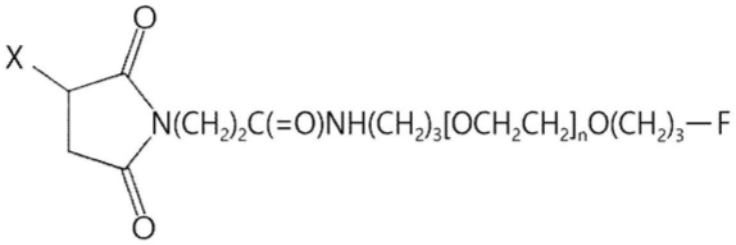
[0086] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,肽的C-端可以被酰胺化。

[0087] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,肽的C-端可以是未被修饰的。

[0088] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,L中乙二醇重复单元区的化学式重量可以在1至100kDa的范围内。

[0089] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,化学式1的结构可以是以下化学式3的结构:

[0090] [化学式3]

[0091] 

[0092] 其中,X和F是如化学式1中所定义的。

[0093] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,乙二醇重复单元可以是$[OCH_2CH_2]_n$,其中n是自然数,其中n被确定为使得肽缀合物中$[OCH_2CH_2]_n$区的平均分子量(例如,数平均分子量)为1至100kDa。

[0094] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,n的值可被确定为使得肽缀合物中$[OCH_2CH_2]_n$区的平均分子量(例如,数平均分子量)为10kDa。

[0095] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,L可以是聚乙二醇。

[0096] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,X可以通过肽中半胱氨酸的硫原子连接。

[0097] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,F可以是IgG Fc区。

[0098] 在根据先前实施方式中的任一个的药物组合物中,免疫球蛋白Fc区可以源自IgG4。

[0099] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,F可以具有其中两条多肽链通过二硫键连接在一起的结构,其中连接可以只通过两条链中一条链上的一个氮原子进行。

[0100] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,F可以包括为SEQ ID NO:70的氨基酸序列的单体。

[0101] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,F可以是单体的同源二聚体,其中每个单体都是SEQ ID NO:70的氨基酸序列。

[0102] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,F可以是包括SEQ ID NO:71的氨基酸序列的同源二聚体。

[0103] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,F可以通过其N-端脯氨酸的氮原子连接。

[0104] 在根据先前实施方式中的任一个的组合物中,F是免疫球蛋白Fc区,并且X可以被糖基化。

[0105] 根据本发明的另一个方面,提供了一种靶向肝组织的生物活性物质,具体而言,一种靶向肝组织且含有与肝中存在的受体具有结合亲和力的的生物活性物质。

[0106] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于预防或治疗需要肝中的药物作用的疾病的方法,该方法包括向需要其的受试者施用靶向肝组织的药物组合物或生物活性物质。

[0107] 根据本发明的另一个方面,提供了肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质,在制备用于预防或治疗需要肝中的药物作用的疾病的药物中的用途。

[0108] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于通过向需要其的受试者施用肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质,来诱导对肝的靶向的方法该。

[0109] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于通过向需要其的受试者施用肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质,来诱导生物活性物质在肝组织中的分布增加的方法。

[0110] 发明的详细描述

[0111] 此后,以下将描述用于实施本发明的详细内容。本申请中公开的各项描述和实施方式也可以被应用于其他描述和实施方式。也就是说,本申请中公开的各种元素的所有组合都落入本公开内容的范围内。此外,本发明的范围不受以下具体描述的限制。

[0112] 此外,本领域技术人员将认识到或者只需通过常规实验就能够确定本文所述本发明的具体实施方式的许多等效物。此外,这些等效物旨在包括在本发明中。本说明书中所有文件的内容均通过引用并入本文。此外,在整个说明书中,引用了许多论文和专利文件,并提供了它们的引用。所引用的论文和专利文件的公开内容完全通过引用并入本文中,并且本发明所属技术领域的水平和本发明的细节得到了更清楚的解释。

[0113] 在本文的描述中,不仅使用了天然存在的氨基酸的常规单字母和三字母代码,还使用了其他氨基酸通常允许的那些三字母代码,诸如α-氨基丁酸(Aib)、N-甲基甘氨酸(Sar)和α-甲基谷氨酸。本文缩写中提到的氨基酸是根据IUPAC-IUB规则描述的:

[0114] 丙氨酸(Ala,A), 精氨酸(Arg,R)

[0115] 天冬酰胺(Asn,N)，天冬氨酸(Asp,D)

[0116] 半胱氨酸(Cys,C)，谷氨酸(Glu,E)

[0117] 谷氨酰胺(Gln,Q)，甘氨酸(Gly,G)

[0118] 组氨酸(His,H)，异亮氨酸(Ile,I)

[0119] 亮氨酸(Leu,L)，赖氨酸(Lys,K)

[0120] 甲硫氨酸(Met,M)，苯丙氨酸(Phe,F)

[0121] 脯氨酸(Pro,P) 丝氨酸(Ser,S)

[0122] 苏氨酸(Thr,T)，色氨酸(Trp,W)

[0123] 酪氨酸(Tyr,Y) 缬氨酸(Val,V)

[0124] 在本文中,“Aib”可以与“2-氨基异丁酸”或“氨基异丁酸”互换使用,并且2-氨基异丁酸和氨基异丁酸也可以彼此互换使用。

[0125] 本发明的一个方面提供了一种组合物,例如,一种含有肝靶向药物的药物组合物。具体而言,本发明的一个方面涉及一种含有肝靶向药物并且在施用其的受试者体内各器官中的肝中具有高分布的药物组合物。

[0126] 药物在体内各器官中的肝中的高分布可以指,在将肝靶向药物施用到人体后肝靶向药物的分布在包括肝、心脏、肺、大肠、脾脏、胰腺、脂肪组织、小肠、胃、肌肉、肾脏和大脑但不限于其的体内各器官中在肝中最高。

[0127] 药物组合物可用于预防或治疗需要肝中的药物作用的疾病。

[0128] 如本文所使用的术语“肝靶向药物”是指可以靶向肝组织的药物。靶向肝组织的含义可以是,与其他器官相比,施用后药物在肝的分布高,但不限于此。肝靶向药物可以对需要肝中药物作用的疾病保持治疗活性。

[0129] 施用后肝中肝靶向药物的组织与血清比(T/S比)可以为选自以下中的至少一种,但不限于此:(a)在施用后约40小时至约50小时,T/S比为约20％至约40％、约24％至约40％、约25％至约40％、约25％至约38％、约25％至约35％、约25％至约34％、约25％至约33％、约26％至约33％、约26％至约32％、约27％至约32％、约28％至约32％、约29％至约31％、或29.5％至约30.5％;和(b)在施用后约160小时至约180小时,T/S比为约25％至约40％、约26％至约38％、约27％至约35％、约27％至约34％、约27％至约33％、约28％至约33％、约29％至约33％、约29％至约32％、约30％至约32％,或约30.5％至约31.5％。以上特征可以是选自(a)或(b)的两者中的至少一个或两个,但不限于此。

[0130] 施用后肝靶向药物在肝中的T/S比可具有选自以下中的至少一种,但不限于此:(a)在施用后约2天,T/S比为约25％至约35％、约26％至约34％、约27％至约33％、约28％至约32％、约29％至约31％、约29.5％至约30.5％,以及约29.8％;和(c)在施用后约7天,T/S比为约27％至约35％、约27％至约34％、约28％至约33％、约29％至约32％、约30％至约31.5％,以及约31％。以上特征可以是选自(a)或(b)的两者中的至少一个或两个,但不限于此。

[0131] 组织与血清比(T/S比),是组织与血清中浓度的比率,被转换成百分比,并可以使用已知方法进行测量。例如,组织与血清比(T/S比)的计算为组织浓度/血清浓度X100。关于浓度测量,可在器官提取后使用ELISA法等测量物质的浓度。

[0132] 更高的T/S比意味着与具有更低T/S比的组织相比,向组织施用的物质显示出更高

的分布。一般来说,施用到体内的药物在肺和心脏中显示出其高分布。因此,当通过将肺组织和心脏组织中的分布与肝组织中的分布进行比较确定肝组织中的分布比肺组织和心脏组织中的分布更高时,这可能意味着本发明的肝靶向药物有效地靶向于肝组织。除了肺组织和心脏组织之外,可以包括其中通过测量T/S比可以将T/S比与肝组织中的T/S比进行比较,从而能够确认肝靶向药物有效地靶向肝组织的任何组织,而不受限制。

[0133] 施用后肝靶向药物在肝与肺组织中的分布比可以是1:约2至约4.0、1:约2至约3.5、1:约2.1至约3.4、1:约2.2至约3.2、1:约2.2至约3.3、1:约2.3至约3.2、1:约2.4至约3.2、1:约2.4至约3.1、1:约2.4至约3.0、1:约2.5至约2.95、1:约2.5至2.9、1:约2.55至约2.87、1:约2.6至2.9、或1:约2.5至3.9,但不限于此。

[0134] 可以基于T/S(%)来测量分布比,并且当肺中的T/S(%)被设定为1作为参考值时,就可以确定肝中T/S(%)的大小。

[0135] 施用后在肝与肺组织中的分布比可以是施用后约40小时至约180小时、约45小时至约170小时,或约2天至约7天的分布比,但不限于此。

[0136] 施用后在肝与肺组织中的分布比可以是在施用后约2天时,1:约2.4至约2.7、1:约2.4至约2.7、1:约2.5至约2.6或1:约2.5至3.7的分布比,或是在施用后约7天时,约1:约2.5至3、1:约2.7至约3、1:约2.8至约3.0、1:约2.8至约2.9或1:约2.8至约3.9的分布比,但不限于此。

[0137] 关于施用后肝与心脏的分布比,(a)施用后约40小时至约50小时肝与心脏中的分布比可以是1:约1.6至约3.0;和(b)施用后约160小时至约180小时肝与心脏中的分布比可以是1:约2.8至约7.0,但不限于此。

[0138] 关于施用后在肝与心脏中的分布比,(a)施用后约40小时至约50小时、约45小时至约50小时或约2天时,在肝与心脏中的分布比可以是1:约1.6至3.0、1:约1.6至2.5、1:约1.6至约2.2、1:约1.7至约2.1、1:约1.7至约2.0、1:约1.8至2.0、1:约1.8至2.0、1:约1.89至2.0、1:约1.8至2.0、或1:约1.8至2.9;和(b)施用后约160小时至约180小时、约160小时至约180小时或约7天时,肝与心脏中的分布比可以是1:约2.8至约4、1:约2.9至约3.8、1:约3.0至约3.8、1:约3.0至约3.6、1:约3.0至约3.5、1:约3.0至约3.4、1:约3.1至约3.4、1:约3.2至约3.4、1:约3.2至约3.3、1:约2.8至约7.0或1:约3.3至约6.6,但不限于此。

[0139] 可以基于T/S(%)来测量分布比,当心脏中的T/S(%)设定为1作为参考值时,就可以确定肝中T/S(%)的大小。

[0140] 如本文中所使用的术语“约”是指包括±0.5、±0.4、±0.3、±0.2、±0.1、±0.05等的范围,并包括与该术语后所述值相当或相似的范围内的所有值,但不限于此。

[0141] 肝靶向药物可包括能够靶向肝组织的物质。

[0142] 具体而言,肝靶向药物可以是含有能够诱导对肝靶向的胰高血糖素或其衍生物的肽或蛋白质,其中肽或蛋白质包括对胰高血糖素受体具有活性的肽序列。例如,肽或蛋白质可以是包括通式1的氨基酸序列的肽或包括其的长效缀合物的形式,或包括通式2的氨基酸序列的肽或包括其的长效缀合物的形式,但不限于此。肽可以对胰高血糖素受体具有活性,具体而言可以是胰高血糖素衍生物,但不限于此。

[0143] 在本发明中,作为肝靶向药物的胰高血糖素或其衍生物,表示相应的药物保持对胰高血糖素受体结合亲和力足以在递送到动物血液中时从血液靶向肝。更具体而言,在将

相应药物递送到动物血液中至少6小时、至少30小时、至少48小时或至少168小时后,研究相应药物在器官中的分布比时,药物在肝中的分布比比至少一种其他器官(诸如心脏、肺、大肠、脾脏、胰腺、脂肪组织、小肠、胃、肌肉、肾脏或脑)中的药物分布比高至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约30%或至少约40%,但药物分布比没有特别限制,只比比较器官中的药物分布比高即可。

[0144] 对胰高血糖素受体具有活性的物质包括各种对胰高血糖素受体有显著活性水平的物质,例如,以化合物或肽的形式的物质。

[0145] 尽管没有特别限制,但对胰高血糖素受体具有显著活性水平的物质不仅可以是天然胰高血糖素,而且可以是与相应受体的天然配体(天然胰高血糖素)相比,对胰高血糖素受体的体外活性表现出0.1%或更高、1%或更高、2%或更高、3%或更高、4%或更高、5%或更高、6%或更高、7%或更高、8%或更高、9%或更高、10%或更高、20%或更高、30%或更高、40%或更高、50%或更高、60%或更高、70%或更高、80%或更高、90%或更高、100%或更高的物质。

[0146] 关于用于测量胰高血糖素或胰高血糖素衍生物的这种体外活性的方法,可以参考本说明书的实验实施例1,但该方法并不特别限于此。

[0147] 对胰高血糖素受体具有活性的物质的实例可以是天然胰高血糖素、其激动剂或其衍生物,但不特别限于此。

[0148] 根据本发明的胰高血糖素衍生物的实例包括与天然胰高血糖素相比具有氨基酸序列中至少一个差异的肽、通过修饰使天然胰高血糖素序列改变的肽、和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。能够在施用的受试者体内器官中的肝中显示出高分布的任何肽都落在本发明的范围内。

[0149] 胰高血糖素衍生物可包括WO 2016/108586和WO 2017/003191中公开的那些,其全部描述通过引用并入本文。此外,WO 2017/003191中公开了一种用于制备胰高血糖素衍生物肽的长效缀合物的方法,其全部描述通过引用并入本文。

[0150] 与天然胰高血糖素相比,这种胰高血糖素衍生物通过具有改变的pI而可以表现出改进的性质。此外,胰高血糖素衍生物可能具有改进的溶解性,同时保持激活胰高血糖素受体的活性,但不限于此。

[0151] 胰高血糖素衍生物可以是非天然存在的。

[0152] 同时,天然胰高血糖素可包括以下氨基酸序列:

[0153] 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)。

[0154] 如本文所使用的术语“等电点”或“pI”是指分子(诸如多肽或肽)不带净电荷(0)的pH值。在具有各种带电官能团的多肽中,电荷总和在pI值处为零。当pH值高于pI值时,多肽的总净电荷为负,而当pH值低于pI值时,多肽的总净电荷为正。

[0155] pI值可以在由聚丙烯酰胺、淀粉或琼脂糖组成的固定pH梯度凝胶上通过等电电泳来确定,或者可以,例如使用ExPASy服务器中的pI/MW工具(http://expasy.org/tools/pi_tool.html;Gasteiger et al.,2003)根据氨基酸序列估算。

[0156] 如本文所使用的术语“改变的pI”是指由于用带负电荷或正电荷的氨基酸残基取代了天然胰高血糖素的部分氨基酸序列,从而使其pI不同于天然胰高血糖素,即与天然胰

高血糖素相比降低或升高。具有这种改变的pI的肽是胰高血糖素衍生物并且在中性pH下可表现出改进的溶解性和/或高稳定性。然而,改变的pI并不特别限于此。

[0157] 例如,胰高血糖素衍生物可以具有不同于天然胰高血糖素的pI值(6.8)的改变的pI值,,并且pI值可以低于6.8、6.7或更低、或6.5或更低,以及高于6.8、7或更高、或7.5或更高,但不限于此,并且任何不同于天然胰高血糖素的pI值都落入本发明的范围内。特别是,任何胰高血糖素衍生物都落入本发明的范围内容,只要胰高血糖素衍生物的聚集水平低于天然胰高血糖素即可,这是由于pI值不同于天然胰高血糖素的pI值,从而改善了在中性pH值下的溶解性。

[0158] 例如,胰高血糖素衍生物的pI值可以是4至6.5和/或7至9.5、7.5至9.5或8.0至9.3,但不限于此。在这种情况下,胰高血糖素衍生物的pI值高于或低于天然胰高血糖素,因此与天然胰高血糖素相比,在中性pH值下表现出改善的溶解性和更高的稳定性。然而,本发明不限于此。

[0159] 具体而言,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某些氨基酸进行取代、添加、缺失和修饰中的任一种方法或其任意组合进行改变而获得。

[0160] 通过上述方法的组合制备的胰高血糖素衍生物的实例包括与天然胰高血糖素相比在氨基酸序列中包括至少一个不同的氨基酸残基以及在N-末端缺失的氨基酸残基并具有激活胰高血糖素受体功能的肽,但不限于此。根据本发明的天然胰高血糖素的衍生物可以通过各种用于制备衍生物的方法的组合来制备。

[0161] 此外,用于制备天然胰高血糖素衍生物的这种改变包括以下所有方面:使用L-型或D-型氨基酸和/或非天然氨基酸进行的改变;和/或通过修饰天然序列进行的改变,例如侧链官能团的改变、分子内共价连接(诸如侧链之间的环形成)、甲基化、酰化、泛素化、磷酸化、氨基己烷化或生物素化。改变还包括用非天然化合物替代。

[0162] 这种改变还包括所有在天然胰高血糖素的氨基和/或羧基末端添加一个或多个氨基酸。

[0163] 取代或添加的氨基酸不仅可以是人类蛋白质中常见的20种氨基酸,也可以是非典型或非天然存在的氨基酸。非典型氨基酸的商业来源可以包括Sigma-Aldrich、ChemPep和Genzyme Pharmaceuticals。包括这些氨基酸和典型肽序列的肽可以从专门从事商业肽合成的公司合成和购买,例如美国的American Peptide Company和Bachem,或韩国的Anygen。

[0164] 氨基酸衍生物也可以通过类似的方式获得,并且可以使用,例如4-咪唑乙酸等。

[0165] 胰高血糖素的pI值为约7,因此在生理pH值(pH值为4-8)的溶液中是不可溶的,并且在中性pH时容易沉淀。在pH为3或更低的水溶液中,胰高血糖素在初始阶段是溶解的,但由于胶凝作用,会在一小时内沉淀。胶凝化的胰高血糖素主要由β片状纤维组成,通过注射针或静脉注射施用所得的沉淀胰高血糖素会堵塞血管,因此胰高血糖激素不适合用作注射剂。为了延缓沉淀过程,通常使用酸性(pH值为2-4)制剂,在这种情况下,胰高血糖素可以在较短时间段内保持相对不聚集的状态。然而,胰高血糖素的原纤维形成在低pH时非常快,使得这种酸性制剂在制备时需要被注射。

[0166] 本发明的胰高血糖素衍生物包括通过取代带负电和带正电的氨基酸残基来改变天然胰高血糖素的pI值,从而开发出具有扩展作用曲线的衍生物。与天然胰高血糖素相比,这些胰高血糖素衍生物具有改变的pI,因此与天然胰高血糖素相比,在中性pH值下表现出

改善的溶解性和/或高稳定性。

[0167] 在一个具体方面,胰高血糖素或胰高血糖素衍生物可以是包括以下通式1的氨基酸序列的肽:

[0168] X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-X29-X30(通式1,SEQ ID NO:46)

[0169] 其中,

[0170] X1是组氨酸、脱氨基-组氨酰、N-二甲基-组氨酰、β-羟基咪唑丙酰基、4-咪唑乙酰基、β-羧基咪唑丙酰基、色氨酸或酪氨酸或不存在;

[0171] X2是α-甲基-谷氨酸、氨基异丁酸(Aib)、D-丙氨酸、甘氨酸、N-甲基甘氨酸(Sar)、丝氨酸或D-丝氨酸;

[0172] X7是苏氨酸、缬氨酸或半胱氨酸;

[0173] X10是酪氨酸或半胱氨酸;

[0174] X12是赖氨酸或半胱氨酸;

[0175] X13是酪氨酸或半胱氨酸;

[0176] X14是亮氨酸或半胱氨酸;

[0177] X15是天冬氨酸、谷氨酸或半胱氨酸;

[0178] X16是谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、α-甲基-谷氨酸或半胱氨酸或不存在;

[0179] X17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不存在;

[0180] X18是丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、精氨酸、缬氨酸或半胱氨酸或不存在;

[0181] X19是丙氨酸、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸或半胱氨酸或不存在;

[0182] X20是赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸、α-甲基-谷氨酸或半胱氨酸或不存在;

[0183] X21是天冬氨酸、谷氨酰胺、亮氨酸、缬氨酸或半胱氨酸或不存在;

[0184] X23是异亮氨酸、缬氨酸、精氨酸或不存在;

[0185] X24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-谷氨酸或亮氨酸或不存在;

[0186] X27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不存在;

[0187] X28是谷氨酰胺、赖氨酸、天冬酰胺或精氨酸或不存在;

[0188] X29是赖氨酸、丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸或不存在;和

[0189] X30是半胱氨酸或不存在。

[0190] 更具体而言,

[0191] 在通式1中,

[0192] X1是组氨酸、色氨酸或酪氨酸或不存在;

[0193] X2是丝氨酸或氨基异丁酸(Aib);

[0194] X7是苏氨酸、缬氨酸或半胱氨酸;

[0195] X10是酪氨酸或半胱氨酸;

[0196] X12是赖氨酸或半胱氨酸;

[0197] X13是酪氨酸或半胱氨酸;

[0198] X14是亮氨酸或半胱氨酸;

[0199] X15是天冬氨酸或半胱氨酸;

[0200] X16是谷氨酸、丝氨酸或半胱氨酸;

[0201] X17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;

[0202] X18是天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸或半胱氨酸;

[0203] X19是丙氨酸或半胱氨酸;

[0204] X20是谷氨酰胺、天冬氨酸、赖氨酸或半胱氨酸;

[0205] X21是天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸或半胱氨酸;

[0206] X23是异亮氨酸、缬氨酸或精氨酸;

[0207] X24是缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺或亮氨酸;

[0208] X27是异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺或精氨酸;

[0209] X28是谷氨酰胺、赖氨酸、天冬酰胺或精氨酸;

[0210] X29是苏氨酸;

[0211] X30是半胱氨酸或不存在。

[0212] 例如,肽可包括选自SEQ ID NO:1至44的氨基酸序列,具体而言,可以(基本上)由选自SEQ ID NO:1至44的氨基酸序列组成。在另一个实施方式中,本发明的肽可以包括选自SEQ ID NO:2至45的氨基酸序列,具体而言,可以(基本上)由选自SEQ ID NO:2至45的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0213] 虽然本文中将其描述为“由特定的SEQ ID NO组成的肽”,但这种表述并不排除在相应的SEQ ID NO的氨基酸序列的上游或下游添加任何无意义序列或自然发生的突变,或其沉默突变,只要该类似物具有与由相应的SEQ ID NO的氨基酸序列组成的类似物或胰岛素类似物相同或等效的活性即可,并且显而易见的是,这种序列添加或突变也落入本发明的范围内。也就是说,只要肽尽管在序列上存在一些差异但至少显示出预定水平的同源性或同一性,并且在施用受试者的人体器官中的肝具有高分布,这种肽就可以落在本发明的范围内。

[0214] 例如,由特定SEQ ID NO组成的肽或与由特定SEQ ID NO组成的肽具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%或至少95%序列同一性的肽、或包括特定SEQ ID NO的肽也可包括在本发明中,并且如果肽在施用的受试者体内器官中的肝中具有高分布,则这种肽不限于特定序列。

[0215] 如本文所使用的术语“同源性”或“同一性”是指两个给定氨基酸序列或核苷酸序列之间的相关程度,并且该术语可以以百分比表示。术语同源性和同一性通常可以彼此互换使用。

[0216] 任何两个肽序列是否具有同源性、相似性或同一性,可使用本领域已知的任何计算机算法来确定,诸如“FASTA”程序,使用诸如Pearson et al(1988)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85]:2444中公开的默认参数。可选地,可以使用Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)来确定,该算法在欧洲分子生物学开放软件套件(EMBOSS)包的Needleman程序中执行(Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277)(版本5.0.0或其后版本)(包括GCG程序包(Devereux,J.,et al,Nucleic Acids Research 12:387(1984)),BLASTP,BLASTN,FASTA(Atschul,[S.][F.,]

[ET AL,J MOLEC BIOL 215]:403(1990);Guide to Huge Computers,Martin J.Bishop,[ED.,]Academic Press,San Diego,1994,and[CARILLO ETA/.](1988)SIAM J Applied Math 48:1073)。例如,可以使用美国国家生物技术信息中心数据库的BLAST或ClustalW来确定同源性、相似性或同一性。

[0217] 可以通过使用GAP计算机程序(例如,Needleman et al.,(1970),J Mol Biol.48:443,如Smith and Waterman,Adv.Appl.Math(1981)2:482中所知)比较序列信息确定肽之间的同源性、相似性或同一性。简而言之,GAP程序将同源性、相似性或同一性定义为通过将相似排列的符号(即,氨基酸)的数量除以两个序列中较短序列的符号的总数所得的值。GAP程序的默认参数可包括:(1)一元比较矩阵(包含1表示同一性,0表示非同一性的值)和Gribskov et al.(1986),Nucl.Acids Res.14:6745的加权比较矩阵,如Schwartz and Dayhoff,eds.,Atlas of Protein Sequence and Structure,National Biomedical Research Foundation,pp.353-358,1979(或EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)取代矩阵)中所公开;(2)每个空位的罚分为3.0,每个空位中的每个符号的额外罚分为0.10(或空位开放罚分为10,空位延伸罚分为0.5);(3)端部空位无罚分。因此,如本文中所使用的术语“同源性”或“同一性”表示序列之间的相关性。

[0218] 以上描述可应用于本发明的其他实施方式或方面,但不限于此。

[0219] 作为仍另一个实例,肽可包括选自SEQ ID NO:3、11至17、19至27、29、31、33和35至44的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:3、11至17、19至27、29、31、33和35至44的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0220] 作为仍另一个实例,肽可包括选自SEQ ID NO:12、14至17、19至25、27、29、33、35至38、40至42和44的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:12、14、17、19至25、27、29、33、35至38、40至42和44的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0221] 作为仍另一个实例,肽可包括选自SEQ ID NO:2至13、15、17、20至24、26至30和32至44的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:2至13、15、17、20至24、26至30和32至44的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0222] 作为仍另一个实例,肽可包括选自SEQ ID NO:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42和44的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:20、22、23、27、33、35、37、38、40、41、42和44的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0223] 作为仍另一个实例,肽可包括选自SEQ ID NO:20、22、23、27、33、37、38和44的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:20、22、23、27、33、37、38和44的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0224] 作为仍另一个实例,肽可包括选自SEQ ID NO:14、16、18、19、25和31的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:14、16、18、19、25和31的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0225] 在一个实施方式中,在含有肝靶向药物并且在施用的受试者体内器官中的肝中具有高分布的药物组合物中,肝靶向药物可以是包括以下通式2的氨基酸序列的肽:

[0226] 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(通式2,SEQ ID NO:47)

[0227] 其中,在上述通式2中,

[0228] X7是苏氨酸(T)、缬氨酸(V)或半胱氨酸(C)；

[0229] X10是酪氨酸(Y)或半胱氨酸(C)；

[0230] X12是赖氨酸(K)或半胱氨酸(C)；

[0231] X15是天冬氨酸(D)或半胱氨酸(C)；

[0232] X16是谷氨酸(E)或丝氨酸(S)；

[0233] X17是赖氨酸(K)或精氨酸(R)；

[0234] X20是谷氨酰胺(Q)或赖氨酸(K)；

[0235] X21是天冬氨酸(D)或谷氨酸(E)；

[0236] X24是缬氨酸(V)或谷氨酰胺(Q)；和

[0237] X30为半胱氨酸(C)或不存在

[0238] (条件是不包括与SEQ ID NO:12相同的通式2的氨基酸序列)。

[0239] 例如,肽可包括选自SEQ ID NO:13、15、19、33和36至45的氨基酸序列,并且,具体而言,可(基本上)由SEQ ID NO:13、15、19、33和36至45的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0240] 具体而言,在上述通式2中,

[0241] X7是苏氨酸、缬氨酸或半胱氨酸;

[0242] X10是酪氨酸或半胱氨酸;

[0243] X12是赖氨酸;

[0244] X15是天冬氨酸;

[0245] X16是谷氨酸或半胱氨酸;

[0246] X17是赖氨酸或精氨酸;

[0247] X20是谷氨酰胺或赖氨酸;

[0248] X21是天冬氨酸或谷氨酸;

[0249] X24是谷氨酰胺;

[0250] X30可以是半胱氨酸,或者可以不存在,但肽不特别限于此。

[0251] 例如,肽可包括选自SEQ ID NO:33和36至44的氨基酸序列,并且具体而言,可(基本上)由选自SEQ ID NO:33和36至44的氨基酸序列组成,但不限于此。

[0252] 上述胰高血糖素可包括分子内桥(例如,共价交联或非共价交联),并且具体而言,可以是包括环的形式。例如,分子内桥可以是其中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。

[0253] 环的非限制性实例可包括内酰胺桥(或内酰胺环)。

[0254] 此外,胰高血糖素衍生物的实例包括所有经过修饰以包括能够在所需位点形成环从而包括环的氨基酸。

[0255] 这种环可以在胰高血糖素衍生物中的氨基酸侧链之间形成,其实例可以是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。

[0256] 例如,包括通式1或2的氨基酸序列的肽可以是其中通式1或2中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中的每个氨基酸都被谷氨酸或赖氨酸取代的肽,但不限于此。在Xn中(n为自然数),n表示从氨基酸序列的N-末端开始的氨基酸位置。

[0257] 包括通式1或2的氨基酸序列的肽可以是其中X12和X16、X16和X20或X17和X21的氨

基酸对中的每个氨基酸都被谷氨酸或赖氨酸取代的肽,但不限于此。

[0258] 而且,在上述通式1或2中,可在X10和X14、X12和X16、X16和X20、X17和X21、X20和X24以及X24和X28的一个或多个氨基酸对中的每个氨基酸对的氨基酸之间形成环(例如,内酰胺环),但不限于此。

[0259] 而且,在上述通式1或2中,X16可以是谷氨酸,X20可以是赖氨酸,并且X16和X20的侧链可以形成内酰胺环,但不限于此。

[0260] 与天然胰高血糖素相比,肽可能具有增加的体内半衰期,但不特别限于此。

[0261] 此外,根据本发明的肽可以是其中N-末端和/或C-末端未被修饰的形式,但其中肽的N-末端和/或C-末端被化学修饰或被有机基团保护,或在肽的末端添加氨基酸以保护其免受体内蛋白酶的侵害同时增加其稳定性的形式,也可以落在本发明的肽的范围内。当C-末端未被修饰时,根据本发明的肽的末端可以有羧基,但不特别限于此。

[0262] 可选地,化学合成的肽具有带电的N-末端和C-末端,因此为了消除这些电荷,可以对N-末端进行乙酰化和/或对C-末端进行酰胺化,但不特别限于此。

[0263] 除非本文另有说明,详细描述或权利要求中关于根据本发明的“肽”或“缀合物”(其中这种肽与生物相容性材料共价连接)的陈述可适用于不仅包括相应的肽或缀合物,而且包括相应的肽或缀合物的盐(例如,肽的药学上可接受的盐)或其溶剂化物的所有范围。因此,尽管本文中仅描述为“肽”或“缀合物”,但相应的描述同样适用于其特定的盐、其特定的溶剂化物以及其特定盐的特定溶剂化物。这些盐可以是,例如,使用任何药学上可接受的盐的形式。

[0264] 盐的种类没有特别限制。然而,盐优选地是对受试者,例如哺乳动物,安全且有效的形式,但不特别限于此。

[0265] 术语“药学上可接受的”是指在医学和药学决定的范围内,可有效用于所需目的而不会引起过度毒性、刺激性、过敏反应等的物质。

[0266] 如本文所使用的术语“药学上可接受的盐”是指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、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、对甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。

[0267] 衍生自合适的碱的盐可包括碱金属(诸如钠和钾)、碱土金属(如镁、铵)等。

[0268] 如本文所使用的术语“溶剂化物”是指根据本发明的肽、缀合物或其盐与溶剂分子形成的复合物。

[0269] 根据本发明的肽可包括其C-末端被酰胺化或具有游离羧基(-COOH)的肽,或其C-末端未被修饰的肽,但不限于此。

[0270] 在一个实施方式中,肽的C-末端可以被酰胺化,但不限于此。

[0271] 在一个实施方式中,肽可以被糖基化,但不限于此。

[0272] 本发明的肽可以通过固相合成法合成,也可以通过重组法生产,或通过商业订单制备,但不限于此。

[0273] 此外,本发明的肽可以根据其长度,通过本领域众所周知的方法(例如,自动肽合成器)合成,或者可以通过基因工程技术生产。

[0274] 具体而言,本发明的肽可以通过标准合成方法、重组表达系统或本领域中已知的

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,例如,以下方法:

[0275] (a)通过固相或液相工艺逐步或通过片段组装合成肽,并分离和纯化最终肽产品的方法;

[0276] (b)在宿主细胞中表达编码肽的核酸构建体,并从宿主细胞培养物中收集表达产物的方法;

[0277] (c)对编码肽的核酸构建体进行体外无细胞表达并从中收集表达产物的方法;或

[0278] 其中通过(a)、(b)和(c)的任意组合获得肽片段,将片段连接以获得肽,并且然后收集相应肽的方法。

[0279] 此外,包括通式1或2的氨基酸序列的肽或胰高血糖素衍生物可以是长效缀合物的形式,其中肽或胰高血糖素衍生物与能够增加肽或胰高血糖素衍生物体内半衰期的生物相容性物质部分连接,但不限于此。在本文中,生物相容性物质部分可与载体互换使用。

[0280] 包括通式1或2的氨基酸序列的长效缀合物形式的肽(缀合物形式)或包括通式1或2的氨基酸序列的肽本身,,是肝靶向药物,并且是在施用其的受试者体内器官中的肝中具有药物高分布的药物组合物的活性成分。

[0281] 如本文所使用的术语“长效缀合物”是指其中生物相容性材料部分或载体与生物活性物质(例如,胰高血糖素衍生物)连接的形式,并且具体而言,缀合物包括肽部分和与该肽部分共价连接的生物相容性材料部分,其中肽部分可包括通式1或2的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2至11和13至45相同或包括其的序列。在长效缀合物中,生物相容性材料部分或载体可与生物活性物质共价连接,但不特别限于此。

[0282] 在本发明中,与未连接载体的肽相比,肽的缀合物可表现出更长的药效持续时间和/或更长的血液半衰期,并且在本发明中,这种缀合物被称为“长效缀合物”。

[0283] 这种缀合物可以是非天然存在的缀合物。

[0284] 在本发明的具体实施方式中,长效缀合物是指其中免疫球蛋白Fc区与胰高血糖素衍生物连接的形式。具体而言,缀合物可以是其中免疫球蛋白Fc区通过接头与胰高血糖素衍生物共价连接的缀合物,但不特别限于此。

[0285] 在实施方式中,免疫球蛋白Fc区和X可以不被糖基化,但不限于此。

[0286] 在本发明的实施方式中,长效缀合物由化学式1表示:

[0287] [化学式1]

[0288] X-L-F

[0289] 其中,

[0290] X表示肽;

[0291] L表示含有乙二醇重复单元的接头;

[0292] F表示免疫球蛋白Fc区;和

[0293] “-”符号分别表示X和L之间以及L和F之间的共价连接。

[0294] 化学式1的长效缀合物中的X可以是如上所述的胰高血糖素衍生物,但不限于此。

[0295] 在一个实施方式中,化学式1的长效缀合物中的X可以是包括上述通式2的氨基酸序列的肽。

[0296] 具体而言,X可以是包括选自SEQ ID NO:13、15、19、33和36至45中的任一个的氨基酸序列的肽,或包括选自SEQ ID NO:33和36至44中任一个的氨基酸序列的肽,但不限于此。

[0297] 作为另一个实例,X可以是包括通式1的氨基酸序列的肽,或者X可以是包括SEQ ID NO:2至45中任一个的氨基酸序列的肽,或者X可以是包括SEQ ID NO:2至11和13至45中任一个的氨基酸序列的肽,或者X可以是包括选自SEQ ID NO: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。

[0298] 缀合物中的F是X,即,肝靶向药物,具体而言,对胰高血糖素受体具有活性的肽,与构成缀合物的部分中的一个元素相对应。所有以上描述均适用于肝靶向药物。F可以通过共价化学连接或非共价化学连接与X连接,或者F和X可以通过共价化学连接、非共价化学连接或其组合通过L相互连接。

[0299] 如本文中所使用的术语“化学式1的长效缀合物”是指其中胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc区通过接头相互连接的一种形式,与未连接免疫球蛋白Fc区的胰高血糖素衍生物相比,该缀合物可表现出更长的药效持续时间。

[0300] 在长效缀合物中,F是一种能够延长X的半衰期的物质,即,一种胰高血糖素衍生物,并且与构成本发明缀合物的部分的一个元素相对应。

[0301] 在化学式1的长效缀合物中,X、肽(其为胰高血糖素衍生物)和免疫球蛋白Fc区之间的连接可以是物理或化学连接,或非共价或共价连接,并且具体地是共价连接,但不限于此。

[0302] 此外,连接X(其为胰高血糖素衍生物)和化学式1的长效缀合物的免疫球蛋白Fc区的方法没有特别限制,但胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc区可以通过接头相互连接。

[0303] 在上述化学式1中,X和F可以通过共价连接经由L相互连接。

[0304] 更具体而言,X和L以及L和F可以通过共价连接相互连接,并且特别是,缀合物可以是其中X、L和F按化学式1的顺序通过共价连接而连接的缀合物。

[0305] 此外,X可以通过接头(L)与F连接。

[0306] 同时,L可以是非肽接头,例如,含有乙二醇重复单元的接头。

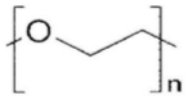
[0307] 在本发明中,“非肽接头”包括具有两个或多个相互连接的重复单元的生物相容性聚合物。重复单元通过任何共价连接而非肽连接相互连接。非肽接头可以是构成本发明缀合物的部分的一个元素,与式1中的L相对应。作为可用于本发明的非肽接头,可使用任何对体内蛋白酶具有抗性的聚合物,没有限制。在本发明中,非肽接头可与非肽聚合物互换使用。

[0308] 虽然没有特别限制,但非肽接头可以是含有乙二醇重复单元的接头,例如,可以是聚乙二醇,并且本领域已知的其衍生物和在本领域技术水平内可以容易制备的衍生物也落在本发明的范围内。

[0309] 非肽接头的重复单元可以是乙二醇重复单元,并且具体而言,非肽接头可以在其末端包括,用于在配置到缀合物中之前制备缀合物,同时包括乙二醇重复单元的官能团。根据本发明的长效缀合物可以是其中X和F通过官能团连接的形式,但不限于此。在本发明中,非肽接头可以包括两个或三个或三个以上的官能团,并且各个官能团可以彼此相同或不同,但不限于此。

[0310] 具体而言,接头可以是由以下化学式2表示的聚乙二醇(PEG),但不限于此:

[0311] [化学式2]

[0312] 

[0313] 其中,n表示10至2,400,n表示10至480,或n表示50至250,但不限于此。

[0314] 在长效缀合物中,PEG部分不仅可以包括-$(CH_2CH_2O)_n$-结构,还可以包括连接元素与-$(CH_2CH_2O)_n$-之间插入的氧原子,但不限于此。

[0315] 在一个实施方式中,乙二醇重复单元可以用例如$[OCH_2CH_2]_n$表示,其中,n的值是自然数,并且肽缀合物中$[OCH_2CH_2]_n$区的平均分子量,例如,数平均分子量,可以确定为大于0kDa至高达约100kDa,但不限于此。作为另一个实例,n的值是自然数,并且多肽缀合物中$[OCH_2CH_2]_n$区的平均分子量,例如,数平均分子量可以是约1至约100kDa、约1至约80kDa、约1至约50kDa、约1至约30kDa、约1至约25kDa、约1至约20kDa、约1至约15kDa、约1至约13kDa、约1至约11kDa、约1至约10kDa、约1至约8kDa、约1至约5kDa、约1至约3.4kDa、约3至约30kDa、约3至约27kDa、约3至约25kDa、约3至约22kDa、约3至约20kDa、约3至约18kDa、约3至约16kDa、约3至约15kDa、约3至约13kDa、约3至约11kDa、约3至约10kDa、约3至约8kDa、约3至约5kDa、约3至约3.4kDa、约8至约30kDa、约8至约27kDa、约8至约25kDa、约8至约22kDa、约8至约20kDa、约8至约18kDa、约8至约16kDa、约8至约15kDa、约8至约13kDa、约8至约11kDa、约8至约10kDa、约9至约15kDa、约9至约14kDa、约9至约13kDa、约9至约12kDa、约9至约11kDa、约9.5至约10.5kDa或约10kDa,但不限于此。

[0316] 在一个具体实施方式中,化学式2的缀合物可以具有其中免疫球蛋白区(F)经由含有乙二醇重复单元的接头通过共价连接与包括通式1的氨基酸序列的肽(X)连接的结构,但不限于此。

[0317] 聚乙二醇是一个通用术语,其包括所有形式的乙二醇均聚物、PEG共聚物或单甲基取代的PEG聚合物(mPEG),但不特别限于此。

[0318] 非肽聚合物的分子量可在1kDa至100kDa的范围,具体为1kDa至20kDa或1kDa至10kDa,但不限于此。此外,本发明的与F相对应的多肽连接的非肽接头不仅可以采用单一种类的聚合物,而且也可以采用不同种类聚合物的组合。

[0319] 在一个具体实施方式中,非肽接头的两端可分别与免疫球蛋白Fc区的硫醇基、氨基或羟基以及肽(X)的硫醇基、氨基、叠氮基或羟基连接,但不限于此。

[0320] 具体而言,接头可在其两端包括能够分别与免疫球蛋白Fc区和肽(X)结合的反应性基团。具体而言,反应性基团能够与以下基团结合:半胱氨酸的硫醇基团;位于N-末端、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和/或组氨酸的氨基;和/或位于免疫球蛋白Fc区中C-末端的羟基以及半胱氨酸的硫醇基;赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和/或组氨酸的氨基;叠氮-赖氨酸的叠氮基团;和/或肽(X)中的羟基,但不限于此。

[0321] 更具体而言,接头的反应性基团可以是选自醛基、马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物的一个或多个,但不限于此。

[0322] 在上文中,醛基的实例可以是丙醛基或丁醛基,但不限于此。

[0323] 在上文中,琥珀酰亚胺衍生物的实例可以是戊酸琥珀酰亚胺酯、甲基丁酸琥珀酰亚胺酯、甲基丙酸琥珀酰亚胺酯、丁酸琥珀酰亚胺酯、丙酸琥珀酰亚胺酯、N-羟基琥珀酰亚胺、羟基琥珀酰亚胺、羧甲基琥珀酰亚胺或碳酸琥珀酰亚胺酯,但不限于此。

[0324] 接头可通过反应性基团与F(免疫球蛋白Fc区)和X,(肽(胰高血糖素衍生物))连

接,从而转化为接头部分。

[0325] 此外,通过醛连接进行还原性胺化(或还原性烷基化)生产的最终产物比通过酰胺连接生产的最终产物更稳定。在低pH值时,醛反应性基团选择性地在N-末端发生反应,而在高pH值(例如pH值为9.0)时,醛反应性基团可与赖氨酸残基形成共价连接,但不限于此。

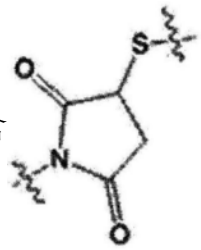
[0326] 本发明接头两端的反应性基团可以彼此相同或不同。接头可以在两端具有醛反应性基团。可选地,接头可以在末端具有醛基和马来酰亚胺基,或者可以在末端具有醛基和琥珀酰亚胺反应性基团。然而,只要F(特别是免疫球蛋白Fc区)和X可以连接到接头的任一端,那么接头就没有限制。

[0327] 例如,接头可以在一端具有马来酰亚胺基,并且可以在另一端具有醛基、丙醛基或丁醛基。作为另一个实例,接头可以在一端具有琥珀酰亚胺基,并且可以在另一端具有丙醛基或丁醛基。

[0328] 当使用在丙醛末端具有羟基反应性基团的聚乙二醇作为接头时,可通过由已知的化学反应将羟基激活为各种反应性基团,或通过使用市售的具有修饰的反应性基团的聚乙二醇来制备本发明的缀合物。

[0329] 在一个具体的实施方式中,接头的反应性基团可与肽(X)的半胱氨酸残基连接,更具体而言,与半胱氨酸的-SH基连接,但接头不限于此。

[0330] 当使用马来酰亚胺-PEG-醛时,马来酰亚胺基可通过硫醚连接与肽的-SH基连接,并且醛基可通过还原性烷基化与免疫球蛋白Fc区的-NH_2基连接,但不限于此,并且这种情况只对应于一个实例。

[0331] 通过这种还原性烷基化反应,可通过具有-$CH_2CH_2CH_2$-结构的接头反应性基团,将免疫球蛋白Fc区的N-末端的氨基与位于PEG的一端的氧原子连接,形成例如-PEG-O-$CH_2CH_2CH_2$NH-免疫球蛋白Fc的结构,并且可以形成其中PEG的一端通过硫醚连接与位于肽的半胱氨酸上的硫原子连接的结构。上述硫醚连接可包含  的结构。

[0332] 然而,接头并不特别限于以上实例,这种情况只对应于一个实例。

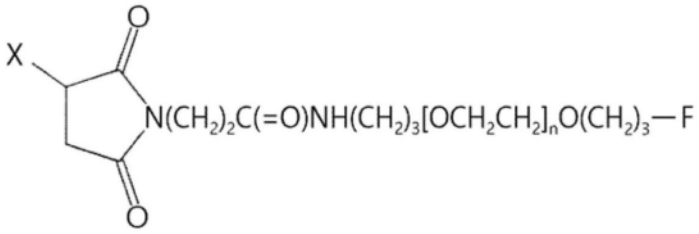
[0333] 在缀合物中,接头的反应性基团可与位于免疫球蛋白Fc区的N-末端的-NH_2连接,但这种情况只对应于一个实例。

[0334] 在缀合物中,根据本发明的肽可以通过其C-末端与具有反应性基团的接头连接,但这种情况只对应于一个实例。

[0335] 在本发明中,术语“C-末端”是指肽的羧基末端,并且就本发明目的而言,该术语是指肽可与接头连接的位置。例如,C-末端可包括C-末端的最末端处的氨基酸残基以及C-末端附近的周围氨基酸残基,特别是可包括从最末端开始的第1至第20个氨基酸残基,但C-末端不限于此。

[0336] 在一个实施方式中,化学式1的缀合物可具有以下化学式3的结构:

[0337] [化学式3]

[0338] 

[0339] 其中,在化学式3中,X表示上述肽(胰高血糖素衍生物);

[0340] F表示人免疫球蛋白Fc区;以及

[0341] n表示自然数。特别是,n如上所述。

[0342] 在一个实施方式中,化学式3的长效缀合物具有其中肽X和免疫球蛋白Fc区F通过插入其间的乙二醇重复单元区域共价连接的结构,其中X可以与化学式3中的琥珀酰亚胺环连接,并且F可以与化学式3中的氧丙烯基连接。

[0343] 在上述化学式3中,n值可被确定为使得肽缀合物中$[OCH_2CH_2]_n$区的平均分子量(例如,数平均分子量)为1至100kDa或1至20kDa或10kDa,但不限于此。

[0344] 在一个实施方式中,X所连接的化学式3的琥珀酰亚胺环的位点可以是X的C-末端半胱氨酸的硫原子。

[0345] 与氧丙烯基连接的F的位点没有具体限制。在本发明的一个实施方式中,与氧丙烯基相连的F的位点可以是F内残基的N-末端氮或氮原子(例如,赖氨酸的ε氮)。在本发明的一个具体实施方式中,与氧丙烯基连接的F的位点可以是F的N-末端脯氨酸,但不限于此。

[0346] 在缀合物中,非肽聚合物的反应性基团可与位于免疫球蛋白Fc区的N-末端的$-NH_2$连接,但这种情况只对应于一个实例。

[0347] 作为一个具体实例,化学式1中的F是免疫球蛋白Fc区。例如,免疫球蛋白Fc区可以源自IgG,但不特别限于此。

[0348] 如本文所使用的术语“免疫球蛋白Fc区”是指包括重链恒定区2(CH2)和/或重链恒定区3(CH3)的区域,不包括免疫球蛋白的重链和轻链可变区。免疫球蛋白Fc区可以是构成本发明的长效缀合物的部分的一个元素。免疫球蛋白Fc区可与“免疫球蛋白Fc片段”互换使用。

[0349] 在本文中,Fc区不仅包括通过木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白而获得的天然序列,而且还包括其衍生物,例如,通过缺失、插入、非保守或保守取代或其组合转换天然序列中的一个或多个氨基酸残基的序列与天然序列不同的变体,是。衍生物、取代物和变体被假定具有与FcRn结合的能力。在本发明中,F可以是人免疫球蛋白区,但不限于此。F可具有其中两条多肽链通过二硫键连接的结构,或其中两条多肽链仅通过两条链中的一条链上的氮原子连接的结构,但不限于此。通过氮原子的连接可在赖氨酸的ε氨基上或N-末端氨基上通过还原性胺化实现。

[0350] 还原性胺化是指其中一种反应物中的胺基或氨基与另一种反应物中的醛(即,能够进行还原性胺化的官能团)反应形成胺,然后通过还原反应形成胺连接的反应,并且这是一种在本领域广为人知的有机合成反应。

[0351] 在一个实施方式中,F可以通过其N-末端脯氨酸的氮原子连接,但不限于此。

[0352] 这种免疫球蛋白Fc区可包括重链恒定区中的铰链区,但不限于此。

[0353] 在本发明中,免疫球蛋白Fc区可包括N-末端的特定铰链序列。

[0354] 如本文中所使用的术语“铰链序列”是指位于重链中并通过间二硫键(inter-disulfide bond)形成免疫球蛋白Fc区的二聚体的区域。

[0355] 在本发明中,铰链序列可以被修饰使得具有以下氨基酸序列的铰链序列的部分缺失,使其仅具有一个半胱氨酸残基,但不限于此。

[0356] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:50)。

[0357] 通过SEQ ID NO:50的铰链序列中的第8个或第11个半胱氨酸残基的缺失,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3至12个氨基酸组成,其仅包括一个半胱氨酸残基,但不限于此。更具体而言,本发明的铰链序列可具有以下序列:Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:51)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(SEQ ID NO:52)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(SEQ ID NO:53)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(SEQ ID NO:54)、Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(SEQ ID NO:55)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(SEQ ID NO:56)、Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(SEQ ID NO:57)、Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:58)、Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:59)、Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:60)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:61)、Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:62)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:63)、Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(SEQ ID NO:64)、Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(SEQ ID NO:65)、Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:66)、Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:67)、Glu-Pro-Ser-Cys(SEQ ID NO:68)和Ser-Cys-Pro(SEQ ID NO:69)。

[0358] 更具体而言,铰链序列可包括SEQ ID NO:60(Pro-Ser-Cys-Pro)或SEQ ID NO:69(Ser-Cys-Pro)的氨基酸序列,但不限于此。

[0359] 本发明的免疫球蛋白Fc区可以是其中两个分子的免疫球蛋白Fc链因铰链序列的存在而形成二聚体的形式,并且本发明化学式1的缀合物可以是其中接头的一端与二聚体免疫球蛋白Fc区的一条链连接的形式,但不限于此。

[0360] 如本文所使用的术语“N-末端”是指蛋白质或多肽的氨基末端,并且N-末端可包括氨基末端的最末端,或距氨基端最末端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区可包括N-末端中的铰链序列,但不限于此。

[0361] 此外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是扩展的Fc区,其包括重链恒定区1(CH1)和/或轻链恒定区1(CL1)的一部分或全部,仅不包括免疫球蛋白的重链和轻链可变区,只要它与其天然形式相比具有基本相同或改进的效果即可。此外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是去除了与CH2和/或CH3相对应的明显长的氨基酸序列部分的区域。

[0362] 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结构域和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(或铰链区的一部分)的组合,(例如,CH2和CH3结构域和高位区或其一部分的组合,以及具有上述组合的两个多肽的二聚体形式);以及6)重链恒定区和轻链恒定区的每个结构域的二聚体,但免疫球蛋白Fc区不限于此。

[0363] 在本发明中,免疫球蛋白Fc区可以是由同源结构域组成的单链免疫球蛋白组成的二聚体或多聚体形式,但不限于此。

[0364] 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X的一个分子可以与二聚体形式的一个Fc区共价连接,特别是,免疫球蛋白Fc和X可以通过非肽聚合物相互共价连接。同时,X的两个分子也可以对称地缀合到二聚体的一个Fc区。免疫球蛋白Fc和X可通过非肽接头相互连接。然而,本发明并不限于上述实施方式。

[0365] 本发明的免疫球蛋白Fc区不仅包括天然氨基酸序列,还包括其衍生物。氨基酸序列衍生物是指通过在天然氨基酸序列中缺失、插入或非保守或保守取代至少一个氨基酸残基或其组合而与天然氨基酸序列不同的氨基酸序列。

[0366] 例如,IgG Fc中位于214至238、297至299、318至322或327至331位的氨基酸残基(已知其对连接很重要)可用作适合改变的位点。

[0367] 此外,还可以通过,例如,去除能够形成二硫键的位点、缺失天然Fc的N-末端的某些氨基酸残基或在天然Fc的N-末端添加甲硫氨酸残基,产生各种类型的衍生物。此外,还可去除补体结合位点,例如,C1q-结合位点,并且可以去除抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)位点,以去除效应器功能。WO 97/34631和WO 96/32478等公开了用于制备这种免疫球蛋白Fc区序列衍生物的技术。

[0368] 蛋白质和肽中的氨基酸交换不会改变分子的全部活性,这在本领域是众所周知的(H.Neurath,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最常见的交换是氨基酸残基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。在某些情况下,氨基酸可通过磷酸化、硫化、丙烯化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等方式进行修饰。

[0369] 上述Fc衍生物表现出与本发明Fc区等效的生物活性,而且Fc区的结构稳定性在耐热、耐pH值等方面被提高。

[0370] 这种Fc区可以从人或动物(诸如牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠和豚鼠)的活体中分离出来的天然形式获得,或者可以是从转化动物细胞或微生物中获得的重组形式或其衍生物。特别是,可以通过从活的人体或动物体内分离出整个免疫球蛋白,然后用蛋白酶处理分离出的免疫球蛋白由天然形式获得Fc区。分离出的整个免疫球蛋白在用木瓜蛋白酶处理时被消化成Fab和Fc,以及在用胃蛋白酶处理时被消化成pF'c和$F(ab)_2$。可对其进行尺寸排阻色谱法等处理,以从中分离出Fc或pF'c。在一个更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是重组免疫球蛋白Fc区,其中人源Fc区是从微生物中获得的。

[0371] 可选地,免疫球蛋白Fc区可以是天然聚糖形式、与天然形式相比增加的聚糖形式、或与天然形式相比减少的聚糖形式,或者可以是去糖基化形式。免疫球蛋白Fc聚糖的增加、减少或去除可通过使用常规方法实现,诸如化学法、酶法和使用微生物的基因工程法。特别是,通过去除Fc上的聚糖而获得的免疫球蛋白Fc区表现出对补体c1q结合亲和力明显降低,抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性降低或丧失,因此在体内不会引起不必要的免疫反应。在这方面,去糖基化或糖基化形式的免疫球蛋白Fc区可能更适合满足本发明作为药物载体的最初目的。

[0372] 如本文中所使用的术语"去糖基化"是指其中通过酶去除聚糖的Fc区,而术语"糖基化"是指原核生物(更具体而言是大肠杆菌)产生的非糖基化Fc区。

[0373] 同时,免疫球蛋白Fc区可以来源于人类,或动物,诸如牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、

大鼠和豚鼠,并且在一个更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区来源于人类。

[0374] 此外,免疫球蛋白Fc区可以是源自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM或其组合或其杂化物的Fc区。在一个仍更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区源自在人血液中最丰富的IgG或IgM;并且在一个仍更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区源自已知能延长配体结合蛋白半衰期的IgG。在一个仍更具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是IgG4 Fc区,并且在一个最具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区是源自人IgG4的糖基化Fc区,但不限于此。

[0375] 在一个具体的实施方式中,免疫球蛋白Fc区(其为人IgG4 Fc区)可以是同源二聚体的形式,其中两个单体通过对应于每个单体中第3位的氨基酸的半胱氨酸之间的二硫键(链间形式)连接。特别是,同源二聚体的每个单体独立地具有/或可能具有位于第35和第95位的半胱氨酸之间的内部二硫键,以及位于第141和第199位的半胱氨酸之间的内部二硫键,即,两个内部二硫键(链内形式)。关于氨基酸的数量,每个单体可由221个氨基酸组成,并且而形成同源二聚体的氨基酸数量可以为总共442个,但氨基酸的数量并不限于此。具体而言,免疫球蛋白Fc区可以是同源二聚体的形式,其中各自具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列(由221个氨基酸组成)的两个单体通过半胱氨酸之间的二硫键相互连接,其中每个半胱氨酸是每个单体的第3位的氨基酸,其中同源二聚体的单体各自独立地具有在第35位和第95位的半胱氨酸之间形成内部二硫键,以及在第141位和第199位的半胱氨酸之间形成内部二硫键,但不限于此。

[0376] 化学式1中的F可包括具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的单体,其中F可以是各具有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的单体的同源二聚体,但不限于此。

[0377] 作为一个实例,免疫球蛋白Fc区可以是包括SEQ ID NO:71的氨基酸序列(由442个氨基酸组成)的同源二聚体,但不限于此。

[0378] 如本文所使用的,术语“组合”是指编码同源单链免疫球蛋白Fc区的多肽与不同源的单链多肽连接以形成二聚体或多聚体。也就是说,二聚体或多聚体可由选自IgG Fc、IgAFc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc片段的两个或更多个片段制备而成。

[0379] 与天然胰高血糖素或未用F修饰的X相比,上述缀合物可以具有延长的药效持续时间,并且这种缀合物不仅包括上述形式,还包括封装在可生物降解纳米颗粒中的形式。

[0380] 含有肝靶向药物的组合物,例如,含有肽的组合物(例如,肽本身或其中免疫球蛋白Fc区与肽相连的长效缀合物),可用于预防或治疗需要肝中的药物作用的疾病。

[0381] 如本文中所使用的术语“预防”是指通过施用含有肝靶向药物的组合物来抑制或延迟需要肝中物作用的疾病的发生的任何作用,并且如本文中所使用的术语“治疗”是指通过施用含有肝靶向药物的组合物来减轻或有利地改变需要肝中的药物作用的疾病的症状的任何作用。

[0382] 如本文中所使用的术语“施用”是指通过任何适当的方法将预定物质引入患者体内,并且组合物的施用途径可包括,但不特别限于任何典型途径,通过这些途径组合物可到达体内靶点,例如,施用途径可以是腹膜内施用、静脉内施用、肌肉内施用、皮下施用、皮内施用、口服施用、局部施用、鼻腔施用、肺内施用、直肠内施用等。

[0383] 术语“需要肝中药物作用的疾病”是指根据本发明的肝靶向药物可对其表现出治疗活性的疾病,其中药物的预防或治疗效果可表现为施用的药物到肝组织的增加的分布。例如,疾病可以是肝病、低血糖症或先天性高胰岛素血症,但不特别限于此。可通过本发明

的肝靶向药物靶向治疗的任何类型的疾病都包括在本发明的疾病中,而不受限制。

[0384] 如WO 2020/263063所公开,对胰高血糖素受体具有活性的肽或其长效缀合物对肝疾病,诸如代谢性肝病、单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪性肝病、肝炎症、非酒精性脂肪性肝炎、胆汁淤积性肝病、肝纤维化、肝硬化、肝失代偿和肝细胞癌等表现出优异的效果。因此,对胰高血糖素受体具有活性的肽或其长效缀合物,其为对肝组织具有优异的靶向性的本发明的肝靶向药物,还具有预防或治疗肝病的效果,并且可作为用于肝病的药物而有效地提供。

[0385] 在本发明中,术语"肝病"是指发生在肝的疾病,并且肝病可以是选自非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、肝纤维化、肝炎症、肝硬化、肝失代偿、肝细胞癌和胆汁淤积性肝病的中的任一种。例如,非酒精性脂肪性肝病可能是一系列疾病,包括仅有肝细胞脂肪过度堆积的单纯性脂肪变性、非酒精性脂肪肝、伴有肝细胞坏死、炎症和纤维化的非酒精性脂肪性肝炎(NASH),以及胆汁淤积性肝病可能是原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎或其组合,但肝病并不局限于上述疾病,只要肝组织和功能出现异常即可。

[0386] 如本文中所使用的术语"低血糖症"是指血糖水平低于正常人的情况。该术语通常指血糖水平为50mg/dL或更低的情况,但不特别限于此。当服用口服降糖药或胰岛素的人消耗得比平时少,或参加的活动或运动比平时多时,经常会引起低血糖症。此外,饮酒或使用降低血糖水平的药物、严重的身体疾病、激素缺乏例如肾上腺皮质激素和胰高血糖素、胰岛素分泌性胰腺肿瘤、针对胰岛素的自身免疫性疾病、胃切除术患者、先天性碳水化合物代谢紊乱等也可能导致低血糖。

[0387] 在本发明中,低血糖症包括急性低血糖症和慢性低血糖症。

[0388] 低血糖的症状包括没有力气、身体颤抖、面色苍白、冷汗、头晕、兴奋、焦虑、心悸、饥饿感、头痛、疲劳等。如果低血糖症持续长时间,可能会诱发抽搐或痉挛,以及造成休克,可能导致昏厥。

[0389] 更具体而言,低血糖症可能是因为遗传缺陷导致的持续性高胰岛素血症造成的。已知因为遗传缺陷导致的高胰岛素血症的已知原因的实例包括染色体11p15.1上的SUR基因或Kir6.2基因突变,或由于染色体7p15-p13上的GK基因突变导致的葡萄糖激酶(GK)活性增加,以及因为胰岛细胞中谷氨酸脱氢酶(GDH)基因突变导致GDH的激活和因此产生的ATP增加。

[0390] 同时,先天性高胰岛素血症是新生儿和儿童出现严重和持续低血糖症的致病因素之一。先天性高胰岛素血症可能是由于低出生体重婴儿或糖尿病母亲的婴儿的胰岛素分泌暂时增加、由于基因突变导致胰腺细胞功能障碍等原因造成的。

[0391] 同时,已知肝可通过糖原分解储存的糖原的和糖异生生产葡萄糖。因此,如果在发生低血糖时,将能够诱导肝中糖原分解和糖异生的药物组合物(例如,胰高血糖素和包括其的缀合物)靶向肝,则预期更有效地缓解低血糖症并使血糖水平恢复正常。

[0392] 本发明的药物组合物可进一步含有药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂可以是非天然存在的。

[0393] 如本文中所使用的术语"药学上可接受的"是指具有足够的量来表现出治疗效果且不会引起不良反应,并且本领域的技术人员可以根据医学领域众所周知的因素,诸如疾病类型、患者年龄、体重、健康状况和性别、患者对药物的敏感性、施用途径、施用方法、施用

频率、治疗持续时间、组合用药或同时用药等,容易地确定。

[0394] 含有本发明的肽的药物组合物可进一步含有药学上可接受的赋形剂。虽然载体并不特别限于这些,但粘合剂、润滑剂、崩解剂、增溶剂、分散剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂、调味剂等可用于口服施用;缓冲剂、防腐剂、镇痛剂、增溶剂、等渗剂、稳定剂等可混合用于注射;基质、赋形剂、润滑剂、防腐剂等可用于局部施用。

[0395] 本发明组合物的制剂可以通过与上述药学上可接受的载体混合,以各种方式制备。例如,用于口服施用时,本发明组合物可配制成片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮液、糖浆剂、植入剂(wafer)等形式;以及用于注射时,组合物可配制成单剂量安瓿或多剂量形式。组合物可配制成溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂等。

[0396] 同时,适用于制备的载体、赋形剂和稀释剂可包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、刺槐(acacia)、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、矿物油等。此外,组合物还可进一步含有填充剂、抗凝剂、润滑剂、保湿剂、调味剂、防腐剂等。

[0397] 此外,本发明的药物组合物还可以具有选自片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂、悬浮液、内服液体药物、乳剂、糖浆剂、无菌水溶液、非水溶剂、冻干制剂和栓剂中的任一种制剂。

[0398] 组合物可以配制成适合患者身体的单剂量形式,具体而言,可配制成用于施用蛋白质药物的制剂,并可通过口服途径或包括皮肤、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、静脉内、肺部、透皮、皮下、腹膜内、鼻腔内、胃内、局部、舌下、阴道或直肠途径在内的肠胃外途径,以本领域常用的施用方法施用,但施用途径并不限于此。

[0399] 此外,缀合物还可与诸如生理盐水或有机溶剂等各种经批准可作为药物的载体混合使用,并且为提高稳定性或吸收性,还可使用碳水化合物诸如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖,抗氧化剂诸如抗坏血酸或谷胱甘肽,螯合剂、低分子量蛋白质、其他稳定剂等作为药物使用。

[0400] 本发明药物组合物的施用剂量和频率是根据药物的类型(即,活性成分)以及各种因素(例如,需要治疗的疾病、施用途径、患者的年龄、性别和体重以及疾病的严重程度)来确定的。

[0401] 本发明组合物的总有效量可以以单剂量向患者施用,或者可以通过分次治疗方案长期以多剂量向患者施用。在本发明的药物组合物中,活性成分的含量可根据疾病的严重程度而变化。具体而言,本发明缀合物的每日总剂量可为患者每kg体重的约0.0001mg至500mg。然而,关于缀合物的剂量,其有效剂量的确定要考虑各种因素,诸如患者的年龄、体重、健康状况和性别、疾病的严重程度、饮食和排泄率,此外还要考虑药物组合物的施用途径和治疗频率,因此,考虑到这些因素,本领域技术人员可以很容易地确定适合本发明药物组合物特定用途的有效剂量。根据本发明的药物组合物对制剂、施用途径和施用方法没有特别限制,只要该药物组合物表现出本发明的效果即可。

[0402] 本发明的药物组合物可能具有极佳的体内持续时间和滴度,从而大大减少了本发明药物制剂的施用次数和频率。

[0403] 根据本发明的另一方面,提供了靶向肝组织的生物活性物质,具体而言,靶向肝组织并且含有对胰高血糖素受体具有结合亲和力的生物活性物质。

[0404] 靶向肝组织的生物活性物质、对胰高血糖素受体有结合亲和力的物质等如上所述。

[0405] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于预防或治疗需要肝中药物作用的疾病的方法,该方法包括向需要其的受试者施用靶向肝组织的药物组合物或生物活性物质。

[0406] 药物组合物、靶向肝组织的生物活性物质、需要肝中药物作用的疾病、预防和治疗如上所述。

[0407] 在本发明中,受试者是指怀疑患有需要肝中药物作用的疾病的受试者,怀疑患有需要肝中的药物作用的疾病的受试者是指患有相应疾病或有发展相应疾病的风险的哺乳动物,其包括人、大鼠、家畜等,但任何可以用含有本发明的肝靶向药物的组合物进行治疗的受试者都包括在本发明的受试者中,没有限制。

[0408] 本发明的方法可包括施用药学有效量的含有肝靶向药物的药物组合物。适当的每日总剂量可由医生在适当的医学判断内确定,并且可一次或多次分剂量施用。为了本发明的目的,针对特定患者的特定治疗有效剂量可根据医学领域众所周知的各种因素优选地不同应用,这些因素包括要达到的反应类型和程度、特定的组合物(包括是否偶尔同时使用其他药剂)、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、组合物的分泌率、治疗持续时间、与本发明组合物组合或同时使用的其他药物,以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0409] 根据本发明的另一个方面,提供了肝靶向药物,具体而言,靶向肝组织的生物活性物质,在制备用于预防或治疗需要肝中的药物作用的疾病的用途。

[0410] 需要肝中的药物作用的疾病、肝靶向药物和靶向肝组织的生物活性物质如上所述。

[0411] 根据本发明的另一个方面,提供了一种通过向需要其的受试者施用药物组合物,特别地,靶向肝组织的生物活性物质来诱导肝靶向药物靶向肝的方法。

[0412] 肝靶向药物、靶向肝组织的生物活性物质和受试者如上所述。

[0413] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于通过向需要其的受试者施用药物组合物,特别地,靶向肝组织的生物活性物质来诱导肝靶向药物在肝组织中分布增加的方法。

[0414] 肝靶向药物、靶向肝组织的生物活性物质和受试者如上所述。

[0415] 在诱导靶向肝的方法中,可以通过适当的途径,例如,皮下(s.c.)途径,施用相应的物质,以便能够靶向肝,但并不特别限于此。

[0416] 在下文中,将参照以下实施例对本发明进行详细描述。然而,以下实施例仅用于说明本发明,并不旨在限制本发明的范围。

[0417] 实施例1:制备胰高血糖素及其衍生物肽

[0418] 制备了对胰高血糖素受体表现出活性的胰高血糖素及其衍生物肽,其序列如以下表1所示。具体而言,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进行取代,来合成以下表1所示的胰高血糖素衍生物肽。然后,用以下实验实施例1中所述的方法测量其相对体外活性。

[0419] 表1

[0420]

SEQ ID NO	胰高血糖素及其衍生物的序列	形成或不形成环	pI	体外活性(与SEQ ID NO: 1相比的相对活性，%)
SEQ ID NO：1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	-	6.8	100
SEQ ID NO：2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT	-	4.56	0.6
SEQ ID NO：3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT	-	4.66	6.1
SEQ ID NO：4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT	-	4.13	< 0.1
SEQ ID NO：5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT	-	4.22	0.3
SEQ ID NO：6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-	4.03	< 0.1
SEQ ID NO：7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-	3.71	< 0.1

[0421]

SEQ ID NO：8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDA QDFVQWLINT	-	3.77	< 0.1
SEQ ID NO：9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDA QDFVVWLINT	-	3.77	< 0.1
SEQ ID NO：10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDA DDFVVWLINT	-	3.66	< 0.1
SEQ ID NO：11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCA KEFVQWLMNT	-	4.78	4.6
SEQ ID NO：12	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRA **K**EFVQWLMNTC	形成环	6.20	56.3
SEQ ID NO：13	YXQGTFTSDYSCYLDSRRA QDFVQWLMNT	-	4.43	5.2
SEQ ID NO：14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRA KEFVQWLMNT	-	8.12	18.1
SEQ ID NO：15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRA QDFVVWLMNT	-	6.11	1.1
SEQ ID NO：16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRA QVFVQWLMRT	-	9.11	4.2
SEQ ID NO：17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRA QDFVQWLMRT	-	6.03	23.2
SEQ ID NO：18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRA CDFRLWLMNT	-	8.15	< 0.1
SEQ ID NO：19	YXQGTFTSDYSKYLC**E**KRA **K**EFVQWLMNT	形成环	8.12	12.1
SEQ ID NO：20	YXQGTFTSDYSKYLD**E**CRA **K**EFVQWLMNT	形成环	4.78	299.7
SEQ ID NO：21	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KCA **K**EFVQWLMNT	形成环	4.78	57.8
SEQ ID NO：22	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRC **K**EFVQWLMNT	形成环	6.20	147.8
SEQ ID NO：23	YXQGTFTSDYSKYCD**E**KRA **K**EFVQWLMNT	形成环	6.20	76.8
SEQ ID NO：24	YXQGTFTSDYSKCLD**E**KRA **K**EFVQWLMNT	形成环	6.21	58.0
SEQ ID NO：25	YXQGTFTSDYSKYLD**E**KRA **K**CFVQWLMNT	形成环	8.12	46.9
SEQ ID NO：26	WXQGTFTSDYSKYLD**E**CRA **K**DFVQWLMNT	形成环	4.68	1.0
SEQ ID NO：27	YXQGTFVSDYSKYLD**E**CRA **K**DFVQWLMNT	形成环	4.68	93.6
SEQ ID NO：28	WXQGTFVSDYSKYLD**E**CRA **K**DFVQWLMNT	形成环	4.68	< 0.1
SEQ ID NO：29	YXQGTFTSDYSKCLD**E**RRA **K**DFVQWLMNT	形成环	6.15	61.3
SEQ ID NO：30	WXQGTFTSDYSKCLD**E**RRA **K**DFVQWLMNT	形成环	4.44	0.3

[0422]

SEQ ID NO：31	YXQGTFTSDYSKYLDC**K**RA K**E**FVQWLMNT	形成环	8.12	6.3
SEQ ID NO：32	-SQGTFTSDYSKYLD**E**CRA**K** EFVQWLMNT	形成环	4.78	0.7
SEQ ID NO：33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRA QDFVQWLMNT	-	6.04	108.2
SEQ ID NO：34	WXQGTFTSDYSKYCD**E**RRA **K**EFVQWLMNT	形成环	6.21	0.2
SEQ ID NO：35	YXQGTFTSDYSKYCD**E**RRA **K**EFVQWLMNT	形成环	6.2	17.7
SEQ ID NO：36	YXQGTFTSDCSKYLD**E**RRA **K**EFVQWLMNT	形成环	6.21	9.9
SEQ ID NO：37	YXQGTFTSDYSKYLD**E**RRA **K**EFVQWLMNTC	形成环	6.21	225.5
SEQ ID NO：38	YXQGTFCSDYSKYLD**E**RRA **K**EFVQWLMNT	形成环	6.15	167.3
SEQ ID NO：39	YXQGTFVSDCSKYLD**E**RRA **K**DFVQWLMNT	形成环	6.15	3.7
SEQ ID NO：40	YXQGTFVSDYSKYLD**E**RRA **K**DFVQWLMNTC	形成环	6.15	40.8
SEQ ID NO：41	YXQGTFCSDYSKYLD**E**RRA **K**DFVQWLMNT	形成环	6.03	45.2
SEQ ID NO：42	YXQGTFCSDYSKYLDSRRA QDFVQWLMNT	-	6.03	37.9
SEQ ID NO：43	YXQGTFTSDCSKYLDSRRA QDFVQWLMNT	-	6.03	1.6
SEQ ID NO：44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRA QDFVQWLMNTC	-	6.21	75.4
SEQ ID NO：45	YXQGTFTSDYSCYLDEKRA KEFVQWLMNT	-	4.78	5.2

[0423] 在表1所示的氨基酸序列中,以X标记的氨基酸表示非天然氨基酸氨基异丁酸(Aib),氨基酸符号下的下划线表示一对相应氨基酸的侧链之间形成了内酰胺环,并且符号“-”表示相应位置不存在氨基酸残基。此外,在形成环或不形成环一栏中,符号“-”表示相应序列中存在不形成环现象。

[0424] 实施例2:生产胰高血糖素衍生物肽的长效缀合物

[0425] 作为表示性的胰高血糖素衍生物肽,从实施例1中制备的表1的衍生物肽中选择SEQ ID NO:37的胰高血糖素衍生物,并按如下方法制备其缀合物。

[0426] 马来酰亚胺-PEG-醛(NOF,日本)是一种分子量为10kDa的线性修饰聚乙二醇,其中两端处的氢分别被3-(3-马来酰亚胺丙酰胺基)丙基和3-氧代丙基(丙醛基)取代,与SEQ ID NO:37保留半胱氨酸的胰高血糖素衍生物肽反应,以在马来酰亚胺-PEG-醛的马来酰亚胺末端处对胰高血糖素衍生物肽的半胱氨酸残基进行PEG化。

[0427] 具体而言,SEQ ID NO:37的胰高血糖素衍生物肽和马来酰亚胺-PEG-醛以1:1-5的摩尔比与3-10mg/mL的蛋白质浓度在低温下反应1-3小时。特别地,在其中50mM Tris缓冲液(pH 7.5)中加入20-60％异丙醇的环境下进行反应。反应完成后,将反应溶液施加到SP

sepharose HP(GE Healthcare,美国)上,以纯化半胱氨酸上单-PEG化的胰高血糖素衍生物。

[0428] 通过在国际专利公开WO 2007/021129号中公开的制备方法,使用在N-末端处具有Pro-Ser-Cys-Pro序列(SEQ ID NO:60)的铰链区的免疫球蛋白Fc片段(49.8kDa,其中SEQ ID NO:70的两条链通过二硫键连接的同源二聚体)制备免疫球蛋白Fc片段。

[0429] 然后,纯化的单-PEG化胰高血糖素衍生物肽和免疫球蛋白Fc片段以1:2-10的摩尔比,10-50mg/mL的蛋白质浓度,在4-8℃下反应12-18小时。反应在其中100mM磷酸二氢钾缓冲液(pH 6.0)中加入10-50mM氰基硼氢化钠和10-20%异丙醇作为还原剂的环境中进行。反应完成后,将反应溶液加入Butyl Sepharose FF纯化柱(GE Healthcare,美国)和Source ISO纯化柱(GE Healthcare,美国),以纯化胰高血糖素衍生物肽的长效缀合物,其中单-PEG化胰高血糖素衍生物肽的醛侧的聚乙二醇端与免疫球蛋白Fc同源二聚体的两条链中的一条的N-末端脯氨酸的氮连接。

[0430] 制备后,经反相色谱法、尺寸排阻色谱法和离子交换色谱法分析,缀合物的纯度达到95%或更高。

[0431] 特别是,胰高血糖素衍生物肽和免疫球蛋白Fc片段通过PEG连接的缀合物被命名为“胰高血糖素衍生物肽的长效缀合物”、“包括胰高血糖素衍生物和免疫球蛋白Fc的缀合物”、“胰高血糖素衍生物的长效缀合物”或“长效胰高血糖素衍生物”,其在本文中可以互换使用。

[0432] 实验实施例1:测量胰高血糖素衍生物长效缀合物的体外活性

[0433] 为了确定实施例1中制备的胰高血糖素衍生物的活性,对转化了胰高血糖素(GCG)受体的细胞系采用了一种测量体外细胞活性的方法。

[0434] 每种细胞系都被转化以表达中国仓鼠卵巢(CHO)中的人GCG受体,并且适合用于测量GCG的活性。因此,使用每种转化细胞系测量了GCG受体的活性。

[0435] 使用人胰高血糖素受体基因的cDNA(OriGene Technologies,Inc.,USA)中对应于ORF的部分作为模板,以及分别包括EcoRI和XhoI切割位点的SEQ ID NO:48和49的以下正向和反向引物进行PCR。

[0436] 特别地,PCR在95℃变性60秒、55℃退火60秒和68℃延伸30秒的30个循环中进行。扩增的PCR产物在1.0%琼脂糖凝胶上电泳,然后通过洗脱获得450bp的条带。

[0437] 正向引物(SEQ ID NO:48)

[0438] 5’-CAGCGACACCGACCGTCCCCCCGTACTTAAGGCC-3’

[0439] 反向引物(SEQ ID NO:49)

[0440] 5’-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3’

[0441] 将PCR产物克隆到已知的动物细胞表达载体x0GC/dhfr,以制备重组载体x0GC/GCGR。

[0442] 通过使用Lipofectamine将制备的重组载体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,并在含有1mg/mL G418和10nM甲氨蝶呤的选择培养基中进行选择性培养。通过极限稀释技术从中选择出单克隆细胞系,最终从中选择以浓度依赖方式对胰高血糖素显示出优异的cAMP反应的细胞系。

[0443] 在细胞系中测量实施例1中合成的胰高血糖素衍生物的活性。具体而言,将转化细

胞系每周分三次或四次培养,以每孔6×10^3个细胞的量分配到384孔板中,然后培养24小时。关于培养的细胞,将200nM的天然胰高血糖素和1600nM的胰高血糖素衍生物分别悬浮在含有0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)、0.1%的牛血清白蛋白(BSA)和5mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)的Hank平衡盐溶液(HBSS)缓冲液中,连续4倍稀释10次,应用cAMP检测试剂盒(LANCE cAMP 384kit,PerkinElmer),加入到培养的细胞中,然后测量荧光值。测量后,将最高荧光值设为100%,据此计算胰高血糖素衍生物的EC50值,然后与天然胰高血糖素的EC值进行比较。结果显示杂以上表1中。

[0444] 制备的胰高血糖素衍生物对胰高血糖素受体具有高活性,因此表现出对肝细胞的更强的靶向性,此外还可以通过激活胰高血糖肽受体作为治疗肝所需疾病的物质。

[0445] 实验实施例2:测量胰高血糖素衍生物的pI

[0446] 为了研究实施例1中合成的胰高血糖素衍生物的改进的性质,使用ExPASy服务器中的pI/Mw工具(http://expasy.org/tools/pi_tool.html;Gasteiger et al.,2003)根据氨基酸序列估算出pI值。

[0447] 如以上表1所示,SEQ ID NO:1的天然胰高血糖素的pI值为6.8,而根据本发明的一些胰高血糖素衍生物的pI值范围在约4至约6之间。这些胰高血糖素衍生物的pI值高于或低于天然胰高血糖素,因此与天然胰高血糖素相比,在中性pH条件下可表现出改善的溶解性和更高的稳定性。

[0448] 根据本发明的胰高血糖素衍生物,在用作肝靶向疾病的治疗药剂时,可以提高患者的依从性。

[0449] 实验实施例3:胰高血糖素衍生物的长效缀合物的组织分布调查

[0450] 在三只SD大鼠中,比较了SEQ ID NO:37的长效缀合物在组织和器官中的分布情况,SEQ ID NO:37被选为胰高血糖素衍生物长效缀合物中的一个代表性实例。

[0451] 具体而言,每种情况皮下注射1558μg/kg的胰高血糖素衍生物的长效缀合物,然后在第4、48和168小时提取器官,之后用ELISA法测量和比较各组织(血清、脑、胰腺、心脏、肾脏、胃、小肠、大肠、肺、肝、脾脏、脂肪组织和肌肉)中的物质浓度。T/S比(%)计算为组织浓度/血清浓度*100,例如,以下表3中的48小时数据计算为血清中15500.8±2686.9,肝中4625.4±1216.9,因此T/S比(%)计算为4625.4/15500.8*100,其为约29.8%。对于浓度测量,先提取每个器官,然后用ELISA法测量物质的浓度。

[0452] 因此,胰高血糖素衍生物的长效缀合物的组织分布在施用后48小时被最强烈地检测到,特别是在肝中表现出高分布比。组织分布更高的依次是肝、心脏、肺、大肠、脾脏、小肠、肌肉、胃、胰腺、脂肪组织和肾脏。即使在用施用后168小时,肝中检测到的该物质比仍然最高,这表明即使在施用后7天,肝中该物质仍保持在高比例。此外,施用后168小时,该物质在肝中以最高比率呈现,与施用后48小时相比,该物质在肺中的分布比高于心脏。以下表2总结了经以上实施例证实的SEQ ID NO:37的长效缀合物的组织与血清的分布比的结果。

[0453] 表2

[0454]

组织	4小时		48小时		168小时	
	浓度 (ng/ml，ng/g)	T/S (%)	浓度 (ng/ml，ng/g)	T/S (%)	浓度 (ng/ml，ng/g)	T/S (%)
血清	416.0 ± 284.2	-	15500.8± 2686.9	-	6534.2 ± 2070.3	-
肝	NA	NA	4625.4± 1216.9	29.8	2027.6 ± 444.5	31
心脏	NA	NA	2447.4± 261.9	15.8	615.9 ± 124.3	9.4
肺	NA	NA	1820.5± 258.7	11.7	703.1 ± 175.5	10.8
大肠	NA	NA	1411.9± 222.9	9.1	221.1 ± 11.0	3.4
脾脏	NA	NA	1323.7± 582.3	8.5	518.2 ± 29.5	7.9
胰腺	NA	NA	499.8± 331.7	3.2	NA	NA
脂肪组织	NA	NA	453.9± 107.9	2.9	NA	NA
小肠	NA	NA	785.5± 137.9	5.1	NA	NA
胃	NA	NA	598.1± 152.9	3.9	NA	NA
肌肉	NA	NA	735.4± 193.3	4.7	220.2±30.3	3.4
肾脏	NA	NA	284.9 ± 105.5	1.8	NA	NA
脑	NA	NA	NA	NA	NA	NA

[0455] *T/S＝组织与血清比,*NA＝不适用

[0456] *ng/ml表示血清中的浓度,ng/g表示组织中的浓度

[0457] 以上结果表明,与其他组织相比,本发明的胰高血糖素衍生物长效缀合物在肝中显示出优异的组织分布,表明胰高血糖素衍生物的长效缀合物可用作靶向疾病的治疗物质。因此,胰高血糖素衍生物的长效缀合物可通过诱导靶向肝组织,使必要量的药物有效地递送到肝组织,用于优化药物治疗的新用途。

[0458] 此外,以上结果表明,即使在施用后7天,该药物在肝中仍然保持高分布,支持该药物作为一种可每周施用一次的制剂的便利性。

[0459] 虽然本发明已参照特定的说明性实施方式进行了描述,但熟悉本发明相关技术的人员可以理解,本发明可以以其他具体形式实施,而不会违背其技术精神或基本特征。在这方面,上述实施方式应理解为在各个方面都是说明性的,而不是限制性的。本发明的范围应被理解为所附权利要求书而不是详细描述的含义和范围,以及由等效的概念衍生的所有变化或变型均落入本发明的范围。

[0460] 政府资助的研究说明

[0461] 本研究得到了韩国科学和信息通信技术部、贸易、工业和能源部以及卫生和福利部(the Ministry of Science and ICT,the Ministry of Trade,Industry and Energy, and the Ministry of Health and Welfare)资助的韩国药物开发基金(the Korea Drug Development Fund)的国家新药开发项目支持(National New Drug Development Project Support)(HN21C0601)的支持。