



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103338790 B

(45)授权公告日 2018.01.23

(21)申请号 201280003243.X

(22)申请日 2012.06.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103338790 A

(43)申请公布日 2013.10.02

(30)优先权数据

10-2011-0062858 2011.06.28 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2012/005137 2012.06.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/002580 KO 2013.01.03

(73)专利权人 THERALY 制药公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 李圣权 金源培 李瑟琪 金泰亨

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 谢顺星 刘成春

(51)Int.Cl.

A61K 47/60(2017.01)

A61K 47/30(2006.01)

A61K 38/22(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

(56)对比文件

W0 2010121559 A1, 2010.10.28, 权利要求, 图18-20.

W0 2008130066 A1, 2008.10.30, 说明书52-54段, 图1.

Tae Hyung Kim.《Mono-PEGylated Dimeric Exendin-4 as High Receptor Binding and Long-Acting Conjugates for Type 2 Anti-Diabetes Therapeutics》.《Bioconjugate Chemistry》.2011,第22卷

审查员 吴铁生

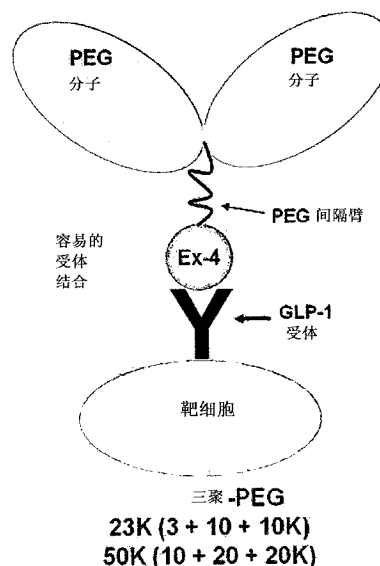
权利要求书1页 说明书9页 附图9页

(54)发明名称

用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物、其制备方法以及含有其作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物、其制备方法和含有所述类似物作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病的药物组合物。根据本发明,通过利用在C末端的位置40引入了半胱氨酸(Cys)的唾液素-4进行所述半胱氨酸的选择性聚乙二醇化,可以提高聚乙二醇化的唾液素-4类似物的产率,并增强药物的治疗效果,从而完全可以将所述类似物用于预防或治疗胰岛素分泌过多所引起的疾病的组合物中。



1. 唾液素-4类似物,其中半胱氨酸(Cys)被引入至与唾液素-4的C末端的#40氨基酸相邻的唾液素的区域,并被线性的或分支的聚乙二醇(PEG)或PEG衍生物聚乙二醇化,

其中所述PEG与半胱氨酸通过为PEG的间隔子连接,

其中所述PEG衍生物选自下组:甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺基丙酸酯、甲氧基聚乙二醇N-羟基琥珀酰亚胺、甲氧基聚乙二醇丙醛和甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺,且

其中所述间隔子与PEG或其衍生物形成二聚或三聚PEG或其衍生物,其分子量为5-60kDa。

2. 如权利要求1所述的唾液素-4类似物,其中所述间隔子的分子量为3kDa或10kDa。

3. 如权利要求2所述的唾液素-4类似物,其中所述聚乙二醇或其衍生物的分子量为20-50kDa。

4. 如权利要求1所述的唾液素-4类似物,其中所述聚乙二醇衍生物是甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺基丙酸酯、甲氧基聚乙二醇N-羟基琥珀酰亚胺、甲氧基聚乙二醇丙醛、甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺的分支类型的衍生物。

5. 如权利要求1所述的唾液素-4类似物,其中所述分支类型的聚乙二醇衍生物是二聚或三聚甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺。

6. 制备权利要求1所述的唾液素-4类似物的方法,所述方法包括使在所述唾液素-4中引入的半胱氨酸与所述间隔子反应,其中所述间隔子结合到所述聚乙二醇或其衍生物分子上。

7. 如权利要求6所述的方法,其中具有引入的半胱氨酸的唾液素-4与聚乙二醇或其衍生物的反应摩尔比是1:1-3。

8. 如权利要求6所述的方法,进一步包括将其中半胱氨酸被引入至C末端的唾液素-4和所述聚乙二醇或其衍生物溶解在磷酸盐缓冲液中;并使溶解的成分在室温下反应。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述磷酸盐缓冲液的pH范围为7.2-7.8。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述聚乙二醇或其衍生物的分子量为20-50kDa。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述聚乙二醇衍生物是二聚或三聚甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述聚乙二醇衍生物是三聚甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺。

13. 用于预防或治疗1型或2型糖尿病的一种或多种症状的药物组合物,其含有权利要求1所述的唾液素-4类似物作为活性成分。

14. 如权利要求13所述的药物组合物,其用于注射或口服给药,选自下组:粉剂、片剂、丸剂、硬/软胶囊、悬浮剂、乳剂、糖浆剂、颗粒剂和酏剂。

用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物、其制备方法以及含有其作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病的药物组合物

技术领域

[0001] 本公开的内容涉及用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4 (exendin-4) 类似物、其制备方法,以及含有其作为活性成分的用于预防和治疗糖尿病的药物组合物。

背景技术

[0002] 在制药技术中,出于治疗目的,肽和蛋白的聚乙二醇化是最有效的技术。肽和蛋白的聚乙二醇化增加其分子量、蛋白质降解位点防御和免疫原性位点防御,这随后增加体内药物的半衰期并降低肽和蛋白的免疫原性。因此,聚乙二醇化技术通过解决最初药物的问题而具有增强治疗效果的作用,并且由于这种优点,在增强聚乙二醇化肽和蛋白药物递送系统的效果方面发挥重要作用。

[0003] 同时,肽和蛋白通过与聚乙二醇 (PEG) 共价结合增强治疗效果。这类技术增加分子量、代谢位点防御和免疫原性位点的抑制,从而增加体内半衰期和稳定性并降低免疫原性。此外,由于肽和蛋白通过PEG而分子量增加,致使与PEG结合的肽和蛋白的肾排泄降低,从而使得聚乙二醇化具有增强药代动力学和药效作用的优势。

[0004] 肽和蛋白的聚乙二醇化反应位点通常随机散布,并且偶尔接近生物活性位点。然而,传统的聚乙二醇化使用不考虑PEG反应位点、PEG键的数量以及生物活性的非特异性聚乙二醇化方法。然而,这种非特异性聚乙二醇化方法通过产生各种分支类型的PEG结合的异构体导致不充分的构象而降低治疗效果,所述异构体具有不同的生理化学、生物学以及药代动力学特征。已经研发了解决这类问题的特异性聚乙二醇化方法,并且由于基因工程技术和选择性官能团引入技术的迅速发展,最近特异性聚乙二醇化方法正快速发展为使药物治疗效果最大化的方法。在相关的技术领域,此前已研究了利用基因工程方法,针对粒细胞刺激因子 (G-CSF) 和肿瘤坏死因子受体,用不同的氨基酸取代伯胺位点后,将PEG选择性结合于N末端位点。

[0005] 还研究了这样的技术,即利用基因工程方法和取代技术,针对诸如葡萄球菌激酶、干扰素 α -2、抗体单链片段可变区 (ScFv) 等药物,引入特定取代基后选择性聚乙二醇化取代基。

[0006] 唾液素-4是多肽,并且是第一肠降血糖素类似物,即通过合成唾液素-4而制备的糖尿病药物,唾液素-4是吉拉毒蜥 (Gila monster) 的唾液物。唾液素-4与唾液素-3的不同仅在于#2和#3位点,已知其比胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的半衰期更长,胰高血糖素样肽-1是糖尿病药物,其半衰期比对直接降解肠降血糖素酶有抗性的DPP-IV短2分钟,肠降血糖素酶是在DPP-IV (二肽基肽酶-4) 消化后在哺乳动物的胃中产生的,以发挥促进胰岛素分泌并降低血糖水平的有益作用,并且唾液素-4还在体内实验中表现出2-4小时的半衰期,且已经证实通过每天2-3次腹膜内注射可以达到足够的血液浓度。

[0007] 还已知唾液素-4控制胃肠道的运动,降低食物摄取,并抑制血浆胰高血糖素,并且

最近美国食品药品监督管理局 (US FDA) 已经批准了PLGA微球型合成唾液素-4 (产品名称: Byetta), 且其即将上市。然而, 由于这种Byetta LAR产品具有复杂的制备过程, 其对于唾液素-4的体内半衰期短, 为约4-6小时, 因此需要频繁施用高剂量的唾液素-4, 且基于因小于4200的低分子量而快速排泄的药物释放控制问题和诸如免疫原性的问题仍然存在。

[0008] 因此, 尽管研究了降低唾液素-4给药频率和解决唾液素-4低分子量问题的方法, 本发明人在证实以下事实后完成了本发明, 即通过将半胱氨酸 (Cys) 氨基酸插入至唾液素-4的C末端#39位点之后的位点 (#40位点), 可以提高聚乙二醇化唾液素-4的产率和药物治疗效果。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的一个目的是提供唾液素-4类似物, 其中半胱氨酸 (Cys) 被引入至C末端的#40位点, 并用聚乙二醇 (PEG) 或其衍生物聚乙二醇化。

[0011] 本发明的另一目的是提供制备唾液素-4类似物的方法。

[0012] 本发明的还一目的是提供含有唾液素-4类似物作为活性成分的、用于预防或治疗胰岛素分泌过多引起的疾病的药物组合物。

[0013] 技术方案

[0014] 为了实现所述目的, 本发明提供了具有引入至C末端#40位点的半胱氨酸 (Cys) 的、用聚乙二醇 (PEG) 或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物。

[0015] 本发明还提供了制备唾液素-4类似物的方法。

[0016] 此外, 本发明提供了含有唾液素-4类似物作为活性成分的、用于预防或治疗胰岛素分泌过多所引起的疾病的药物组合物。

[0017] 有益效果

[0018] 根据本发明, 通过进行选择性的聚乙二醇化, 可以提高唾液素-4类似物的产率, 并且可以提高药物的治疗效果, 在所述唾液素-4类似物中, 半胱氨酸 (Cys) 被引入至C末端的#40位点且被聚乙二醇 (PEG) 或其衍生物聚乙二醇化, 并因此唾液素-4类似物可以有利地用于预防或治疗胰岛素分泌过多所引起的疾病的组合物。

附图说明

[0019] 图1是说明唾液素-4的聚乙二醇化的示意图, 其中将半胱氨酸 (Cys 40) 引入至本发明实施例1的C末端。

[0020] 图2是说明本发明比较例1中唾液素-4的甜菜碱胺的聚乙二醇化的示意图。

[0021] 图3是说明本发明比较例2中唾液素-4的N末端的聚乙二醇化的示意图。

[0022] 图4是说明本发明实施例1的吸光度的示意图。

[0023] 图5是说明本发明比较例1a-1c的吸光度的视图。

[0024] 图6是说明本发明比较例2的吸光度的视图。

[0025] 图7是说明本发明实施例1的产率的视图。

[0026] 图8是说明本发明比较例1a-1c的产率的图。

[0027] 图9是说明本发明比较例2的产率的视图。

[0028] 图10是说明,根据本发明的实施例,结合了PEG的唾液素-4类似物对于GLP-1受体的亲和性的视图。

[0029] 图11是说明本发明实施例4和5的结合了PEG的唾液素-4类似物的示意图。

[0030] 图12是说明,根据本发明的实施例,施用PEG结合的唾液素-4类似物的糖尿病小鼠的血糖水平示意图。

[0031] 发明详述

[0032] 下文将详细描述本发明。

[0033] 本发明提供了唾液素-4类似物,在所述唾液素-4类似物中,半胱氨酸(Cys)被引入至C末端的#40位点,并且被聚乙二醇(PEG)或其衍生物聚乙二醇化。

[0034] 根据本发明,聚乙二醇或其衍生物的分子量为5-60kDa,并且优选为20-50kDa,但不限于此。

[0035] 同时,根据本发明,聚乙二醇或其衍生物是线性类型或分支类型,并且对于分支类型而言,优选可使用二聚类型或三聚类型,并且更优选可使用三聚类型。

[0036] 具体而言,聚乙二醇为,例如,甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺基丙酸酯、甲氧基聚乙二醇N-羟基琥珀酰亚胺、甲氧基聚乙二醇丙醛、甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺或这些衍生物的多分支类型。优选,聚乙二醇衍生物是线性甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺、分支类型的甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺或三聚的甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺,并且更优选是三聚的甲氧基聚乙二醇马来酰亚胺。

[0037] 本发明还提供了制备用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物的方法,其包括将在C末端的#40位点引入了半胱氨酸的唾液素-4和聚乙二醇或其衍生物溶解于磷酸盐缓冲液中,并使它们在室温下反应的过程。

[0038] 具体而言,可以通过以下方式制备用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物:将在C末端的#40位点引入了半胱氨酸的唾液素-4和聚乙二醇或其衍生物在pH 7.2-7.8、优选7.5的磷酸盐缓冲液中以1:1-3的摩尔比添加于磷酸盐缓冲液中,溶解这些组分,并在室温下将反应进行1-3小时(尽管对反应温度并没有特别限制),并在反应完成后进行柱层析。

[0039] 当磷酸盐缓冲液不在上述pH范围内时,产率可能降低。

[0040] 在本发明中,在制备用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物后,可通过质谱、液相色谱、X射线衍射分析、偏振测定以及构成唾液素-4类似物代表元素的计算值和测量值之间的比较,证实唾液素-4类似物的分子结构。

[0041] 本发明还提供了含有唾液素-4类似物作为活性成分的用于预防或治疗胰岛素分泌过多所引起的疾病的药物组合物。

[0042] 此外,本发明提供了治疗方法,其特征是将用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物施用于需要治疗因胰岛素分泌过多引起的疾病的患者。

[0043] 胰岛素分泌过多引起的疾病可以包括1型糖尿病、2型糖尿病以及糖尿病并发症。

[0044] 根据本发明,由于具有用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物对于GLP-1受体的测量的亲和性,IC₅₀值为1.04nM,并且证实这所表现出的活性比实施例1的化合物(Nter-PEG-Ex4)(IC₅₀=121.78nM)(参阅实验例1,表3和FIG 10)的活性大120倍。

[0045] 为了更好的理解,图11还显示了在C40位点结合了三聚PEG的本发明唾液素-4的示

意图。

[0046] 当结合的PEG的分子量为23K时,用3KD的PEG作为PEG间隔子,并且将分子量为10KD的PEG结合于3KD的末端(实施例4)。同时,与此相似,当结合的PEG的分子量为50时,用10KD的PEG作为PEG间隔子,并且将分子量为20KD的PEG结合于10KD的末端(实施例5)。同时,由于测量了在注射实施例4(C40-PEG23K-Ex4)和实施例5(C40-PEG50K-Ex4)的唾液素-4后血糖水平升回8.35mmol/L缩写的时间,在施用药物后,低血糖水平维持45.5-56.1小时(参阅实验例2,表4和图12),经证实,这超过C40-PEG20K-Ex4(23.2小时)和对照组(7.3小时)的2倍,从而能够稳定维持血糖水平7-8倍以上。

[0047] 因此,本发明的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4化合物能够解决由于现有唾液素-4的低分子量所导致的药物快速排泄缺陷,其对于GLP-1受体具有优越的亲合性,并且在施用所述药物后具有能将血糖水平维持3-4天的强低血糖维持能力,因此,其可以有利地用于预防或治疗与胰岛素分泌过多相关的1型糖尿病、2型糖尿病以及与糖尿病并发症相关的疾病。

[0048] 当用本发明的组合物作为药物时,在临床给药情况下配制成下述形式的各种口服或非口服给药形式(但不限于此)后,施用含有用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物的药物组合物。

[0049] 对于口服给药的制剂,例如,有片剂、丸剂(pellet)、硬/软胶囊、液体、悬浮剂、乳剂、糖浆剂、颗粒剂、酏剂、锭剂等,并且除了活性成分之外这些制剂还包括稀释剂(实例:乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露糖、山梨醇、纤维素和/或甘氨酸)、助滑改性剂(slip modifier)(实例:硅石、滑石、硬脂酸和其镁或钙盐和/或聚乙二醇)。片剂还可以包括粘合剂如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、甲基纤维素、羧基纤维素钠和/或聚乙烯基吡咯烷,并且如果需要可以包括崩解剂如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐或沸腾混合物和/或吸收剂、着色剂、增味剂和甜味剂。

[0050] 含有用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物的药物组合物可以非口服给药,并且通过皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射或胸腔内注射进行给药。

[0051] 这时,通过将用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物与稳定剂或缓冲液在水中混合以制备成液体或悬浮液,从而将其配制成非口服给药的制剂,并且这可以制备成安剂或小瓶单位给药形式。组合物可以进行灭菌和/或可以包括佐剂如防腐剂、稳定剂、水合剂或乳化刺激剂、渗透压控制目的的盐和/或缓冲液,以及其他有利于治疗的物质,并且可以根据传统的混合、颗粒化或涂覆方法配制。

[0052] 根据本发明,含有用聚乙二醇或其衍生物聚乙二醇化的唾液素-4类似物的药物组合物的人体剂量可以根据患者的年龄、体重、性别、给药形式、健康状况以及疾病水平而改变,并且可以遵循医师或药剂师的决定通过口服或非口服途径给药,优选的剂量为0.01-200mg/kg/天。

具体实施方式

[0053] 下文将通过实施例和实验例详细解释本发明。

[0054] 所述实施例和实验例仅用于说明本发明,本发明的内容并不受其限制。

[0055] <实施例1-5>制备C40位点特异性PEG结合的唾液素-4

[0056] 为了制备C40位点特异性PEG结合的唾液素-4,使用在C末端位点(#40位点)引入了

半胱氨酸的唾液素-4-Cys (唾液素-Cys, 分子量: 4290.7, 序列: HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSC), 并且使用购

自东京日本油脂NOF (Nippon Oil and Fats, NOF, Tokyo) 的马来酰亚胺激活的单甲氧基PEG (mPEG-MAL, MW: 5, 20kDa (线性类型), 20kDa (分支类型), 23, 50kDa (三聚类型))。

[0057] 为了制备C-末端#40位点特异性PEG结合的唾液素-4, 将唾液素-4-Cys和mPEG-MAL (MW: 5, 20 (线性类型), 20 (分支类型), 23, 50kDa) 按1:2的摩尔比完全溶解于20mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.5), 并使它们在室温下反应2小时 (参见图1)。在反应后, 用Capcell-pak RP-18柱 (250×10mm, 5μm, 日本资生堂) 以5.0ml/min的流速, 通过反相层析分离反应的溶液。以215nm波长的紫外光监测分离。对于0.1% TFA蒸馏水 (流动相A) 和0.1% TFA乙腈 (流动相B), 利用线性浓度梯度方法 (在30min内36-42%B) 分离流动相 (参见图4)。

[0058] 单独收集通过所述方法分离的峰, 利用氮气除去乙腈, 并且利用Centricon-10 (Mw截止值3000, 美国马塞诸塞州比勒利卡的密理博公司 (Millipore Corp., Billerica, MA)) 浓缩除去的溶液。将制备的物质储存于4℃, 并通过将1μl样品-基质样品溶液与2μl基质溶液混合来制备, 并且通过用含有0.1% (v/v) TFA的水/CAN (50:50) 溶液溶解α-氰基羟基肉桂酸 (α-CHCA) 来制备基质溶液。将制备的1μl样品基质溶液置于平板上、在真空状态下干燥并用尺寸排阻层析 (SEC) 和MALDI-TOF质谱仪进行分析, 在0、20、40、60以及80分钟分析C40位点特异性PEG结合反应 (C40-PEG-Ex4), 并用与唾液素-4和C40-PEG-Ex4的初始状态相比的色谱面积比表示。结果在表1和图7中进行了说明。

[0059] [表1]

		反应时间	产率 (%)
[0060]	实施例 1 C40-PEG _{5K} -Ex4 (线性)	80 min.	93%
	实施例 2 C40-PEG _{20K} -Ex4 (线性)	80 min.	89%
[0061]	实施例 3 C40-PEG _{20K} -Ex4 (分支)	80 min.	91%
	实施例 4 C40-PEG _{23K} -Ex4 (三聚体)	80 min.	90%
	实施例 5 C40-PEG _{50K} -Ex4 (三聚体)	80 min.	85%

[0062] 如表1所示, 反应时间平均为80分钟, 所进行生产的产率平均超过90% (参见图7)。

[0063] <比较例1>制备非特异性PEG结合的唾液素-4

[0064] 进行与实施例1相同的方法来制备非特异性PEG结合的唾液素-4 (参见图2和图5), 不同之处在于: 使用唾液素-4 (分子量: 4186.6, 序列: HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSGAPPPS) 和琥珀酰亚胺激活的单甲氧基PEG (mPEG-SPA, MW: 5, 20kDa (线性类型)), 而非使用

引入半胱氨酸的唾液素-4-Cys和马来酰亚胺激活的单甲氧基PEG。

[0065] 所用的琥珀酰亚胺激活的单甲氧基PEG (mPEG-SPA) 购自东京日本油脂NOF (Nippon Oil and Fats, NOF, Tokyo)。

[0066] [表2]

[0067]	比较例 1	反应时间	产率(%)
	比较例 1a Lys ¹² -PEG _{20K} -Ex4	80 min.	20%
	比较例 1b Lys ²⁷ -PEG _{20K} -Ex4	80 min.	31%
	比较例 1c Lys ^{12,27} -PEG _{20K} -Ex4	80 min.	25%

[0068] 如表2所示,非特异性伯胺PEG结合反应的反应时间平均为80分钟,比较例1a (Lys¹²-PEG_{20K}-Ex4) 的平均产率为20%,比较例1b (Lys²⁷-PEG_{20K}-Ex4) 的平均产率为31% (参见图8)。

[0069] <比较例2>制备N末端特异性PEG结合的唾液素-4

[0070] 进行与实施例1相同的方法来制备非特异性PEG结合的唾液素-4 (参见图3和图6), 不同之处在于:使用唾液素-4 (分子量:4186.6,序列:HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPS SGAPPPS) 和单甲氧基PEG-醛 (mPEG-ALD, MW:5kDa (线性)), 而非使用引入半胱氨酸的唾液素-4-Cys和马来酰亚胺激活的单甲氧基PEG。

[0071] 使用购买自东京日本油脂NOF公司的单甲氧基PEG-醛。

[0072] 结果, N末端特异性PEG结合反应 (N_{ter}-PEG_{5K}-Ex4) 的反应时间为720分钟, 平均产率为72% (参见图9)。

[0073] <实验例1>PEG结合的唾液素-4类似物的RIN-m5F细胞受体结合亲和性分析

[0074] 进行下述实验,以实施在实施例1、比较例1和2中制备的实施例1 (C40-PEG_{5K}-Ex4)、比较例1a (Lys¹²-PEG_{5K}-Ex4)、比较例1b (Lys²⁷-PEG_{5K}-Ex4) 以及比较例2 (N_{ter}-PEG_{5K}-Ex4) 的PEG结合的唾液素-4类似物的GLP-1受体 (GLP-1R) 亲和性。

[0075] 将表达大量GLP-1受体 (GLP-1R) 的胰岛细胞 (RIN-m5F, 弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)) 接种于12孔板。48小时后,将其用结合缓冲液 (120mM NaCl, 1.2mM MgSO₄, 13mM 乙酸钠, 5mM KCl, 1.2g/l Tris, 2g/l 牛血清白蛋白, 1.8g/l 葡萄糖, pH 7.6) 洗涤两次,并同时处理未标记的PEG结合的唾液素-4类似物 (终浓度范围: 0.001-1000nM) 和用30pM浓度的I-125 (9-39, 马萨诸塞州波士顿的铂金艾尔默公司 (PerkinElmer, Boston, MA)) 标记的唾液素-4。2个小时后,用包括1mg/ml牛血清白蛋白的PBS进行充分洗涤。最后,用细胞裂解缓冲液 (具有1% SDS的0.5N NaOH) 将细胞充分降解15分钟,并且使用γ射线计数器 (明尼苏达州拉姆齐的GMI公司 (GMI, Inc., Ramsey, MN)) 测量I-125的辐射水平。结果在表3和图10中做了说明。

[0076] [表3]

[0077]		IC ₅₀ (nM)
	实施例 1 (C40-PEG _{5K} -Ex4)	1.04 nM
	比较例 1a (Lys ¹² -PEG _{5K} -Ex4)	6.45 nM
	比较例 1b (Lys ²⁷ -PEG _{5K} -Ex4)	2.42 nM
	比较例 2 (N _{ter} -PEG _{5K} -Ex4)	121.78 nM
	对照组(唾液素-4)	0.23 nM

[0078] 如表3所示,在测量了GLP-1受体亲和性之后,本发明的实施例1 (C40-PEG_{5K}-Ex4) 的IC₅₀经证实为1.04nM。经证实,其所表现出的活性比较例1b (Lys²⁷-PEG_{5K}-Ex4) (IC₅₀值=2.42nM) 好2倍,且比较例1a (Lys¹²-PEG_{5K}-Ex4) (IC₅₀值=6.45nM) 好6倍。同时,经证实,本发明的实施例1 (C40-PEG_{5K}-Ex4) 所表现出的活性比较例2 (N_{ter}-PEG_{5K}-Ex4) (IC₅₀value=121.78nM) 好120倍。

[0079] 因此,本发明的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4组合物不仅可以解决由于唾液素-4的低分子量所导致的药物快速排泄的缺点,并且还可以有利地用作糖尿病药物,因为GLP-1受体亲和性表明了与唾液素-4相似的生物活性(参见图10)。

[0080] <实验例2>在非禁食2型糖尿病小鼠中评估低血糖维持性

[0081] 进行下述实验,来评估本发明的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4组合物在2型糖尿病小鼠中的低血糖维持性。

[0082] 使用2型糖尿病C57BL/6db/db小鼠(雄性,4-5周龄,Central Lab. Animal Inc.),在允许自由摄取食物和水而稳定2周,将动物以12小时的周期暴露于光下,并使之生长。遵照国立卫生研究院(NIH)的指导管理动物,并获得成均馆大学实验动物看护和使用委员会的批准(Institutional Animal Care and Use Committee of Sungkyunkwan University),并且以人道主义方式进行实验。

[0083] 将由实施例1-5制备的C40-PEG_{5K}-Ex4(线性)、C40-PEG_{20K}-Ex4(线性)、C40-PEG_{20K}-Ex4(分支)、C40-PEG_{23K}-Ex4(三聚体)和C40-PEG_{50K}-Ex4(三聚体)和在比较例1b中制备的Lys²⁷-PEG_{20K}-Ex4,以25nmol/kg剂量腹膜内注射于雄性db/db小鼠(6-7周龄),并在0、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48、60、72、96小时的不同时间后,从小鼠尾静脉收集血液,用ACCU-CHEK传感器(美国罗氏诊断设备公司(Roche Diagnostics Corp.,USA))测量血糖浓度。然后,再次测量低血糖维持时间(血糖水平<8.35mmol/l(150mg/dL)),并将其显示于表4和图12。在本实验中,将唾液素-4用作对照组。

[0084] [表4]

[0085]

时 间 (h)	血糖水平(mmol/l) (平均)							
	C40-PEG-Ex4					比较例 1b (Lys ²⁷ - PEG _{20K} -Ex4)	对照组 (Ex-4)	未处理 组
	实施例 1 (PEG _{5K})	实施例 2 (PEG _{20K})	实施例 3 (PEG _{20K})	实施例 4 (PEG _{23K})	实施例 5 (PEG _{50K})			
0	23.38	24.28	24.44	24.22	24.56	24.13	22.61	24.23
0.5	7.62	7.96	7.86	7.97	7.63	7.97	6.95	24.21
1	7.36	6.13	6.89	6.99	6.25	6.56	6.41	23.44
2	5.09	5.29	5.04	4.96	5.45	5.24	5.80	24.58
3	4.46	4.18	4.15	4.11	4.64	4.22	5.85	22.96
4	4.93	4.34	4.66	4.54	4.23	4.29	8.02	24.54
6	5.73	4.9	4.67	4.87	4.26	4.85	10.69	23.43
8	9.04	4.57	5.11	4.66	4.69	5.13	16.01	24.94
12	16.2	5.86	7.89	4.9	4.87	5.40	23.89	22.47
24	21.1	8.54	15.09	5.52	5.11	12.98	-	24.42
36	-	11.47	20.14	8.08	6.31	17.34	-	23.92
48	-	15.34	24.21	8.66	7.26	20.45	-	22.66

[0086]

60	-	20.45	23.76	11.34	8.87	23.02	-	23.41
72	-	23.02	-	14.12	13.49	-	-	22.26
96	-	-	-	18.79	17.07	-	-	24.51
120	-	-	-	24.53	23.02	-	-	23.75

[0087] 如表4所示,本发明实施例1-5的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4的血糖水平提高到8.35mmol/l所需的时间,经证实比唾液素-4(7.3小时)长,特别是对于引入三聚PEG的实施例4(C40-PEG_{23K}-Ex4)和实施例5(C40-PEG_{50K}-Ex4)而言,低血糖水平分别维持了45.5小时和56.1小时(参见图12)。

[0088] 因此,通过解决由于唾液素-4低分子量导致的药物快速排泄的缺点,并因此维持血糖水平的稳定比较例高7-8倍,本发明的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4组合物可以有利地用作糖尿病药物。

[0089] 同时,按照下述目的,可以将本发明的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4类似物

配制成各种形式。以下是包括本发明的C40位点特异性PEG结合的唾液素-4类似物作为活性成分的几种制备方法的说明,并且本发明并不受其限制。

[0090] <配制例1>制备粉剂

[0091] C40位点特异性PEG结合的唾液素-4类似物 2g

[0092] 乳糖 1g

[0093] 将所述组分混合,并填充于密封包装内来制备粉剂。

[0094] <配制例2>制备片剂

[0095] C40位点特异性PEG结合的唾液素-4类似物 100mg

[0096] 玉米淀粉 100mg

[0097] 乳糖 100mg

[0098] 硬脂酸镁 2mg

[0099] 将所述组分混合,并根据通用的片剂制备方法来压缩制备片剂。

[0100] <配制例3>制备胶囊

[0101] C40位点特异性PEG结合的唾液素-4类似物 100mg

[0102] 玉米淀粉 100mg

[0103] 乳糖 100mg

[0104] 硬脂酸镁 2mg

[0105] 将所述组分混合,并根据通用的胶囊制备方法填充于明胶胶囊来制备胶囊。

[0106] <配制例4>制备注射剂

[0107] C40位点特异性PEG结合的唾液素-4类似物 100mg

[0108] 甘露醇 180mg

[0109] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26mg

[0110] 蒸馏水 2974mg

[0111] 根据通用的注射剂制备方法,将给定量的所述组分包括于其中来制备注射剂。

[0112] 实用性

[0113] 根据本发明,通过进行选择性的聚乙二醇化,能够提高唾液素-4类似物的产率,并且可以提高药物的治疗效果,在所述唾液素-4类似物中,半胱氨酸(Cys)被引入至C末端的#40位点,且被聚乙二醇(PEG)或其衍生物聚乙二醇化,因此唾液素-4类似物可以有利地用于预防或治疗胰岛素分泌过多所引起的疾病的组合物。

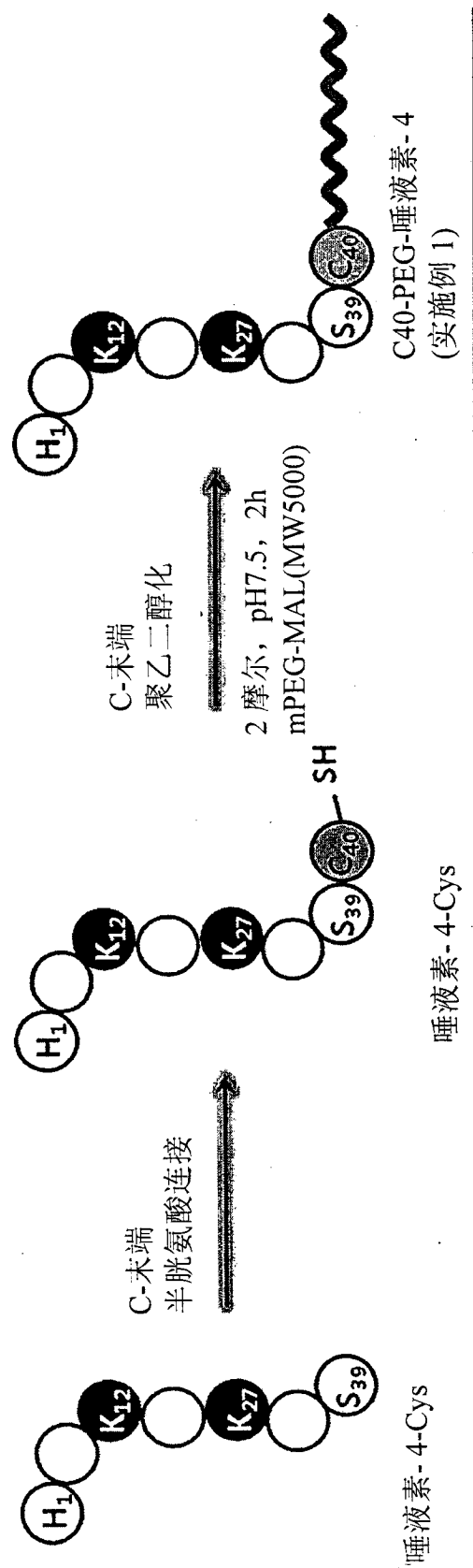


图1

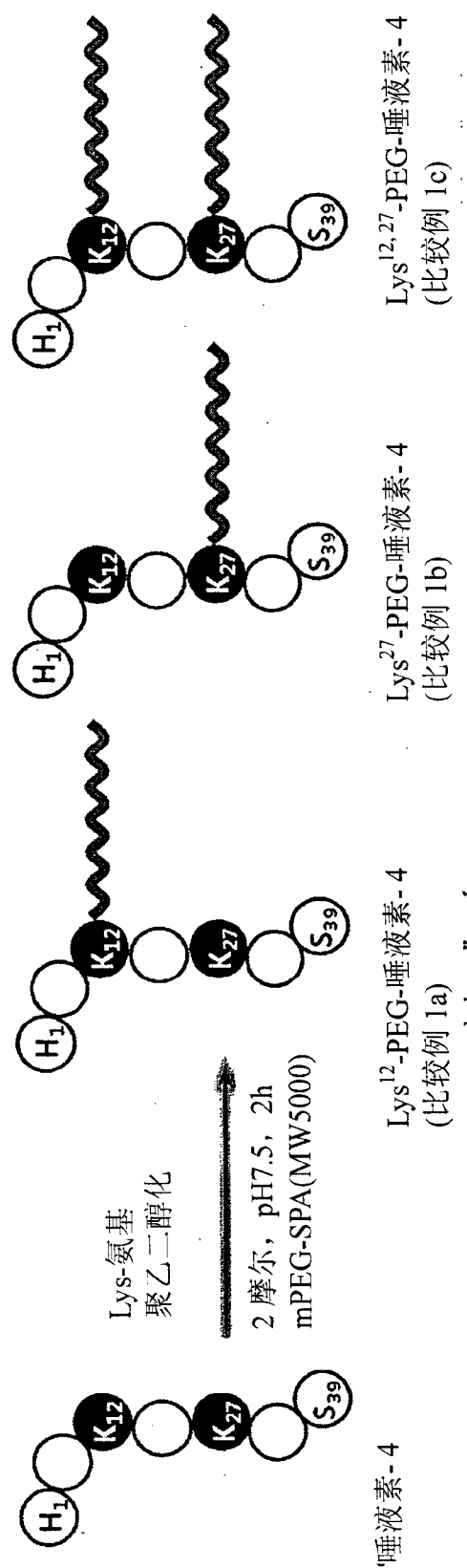


图2

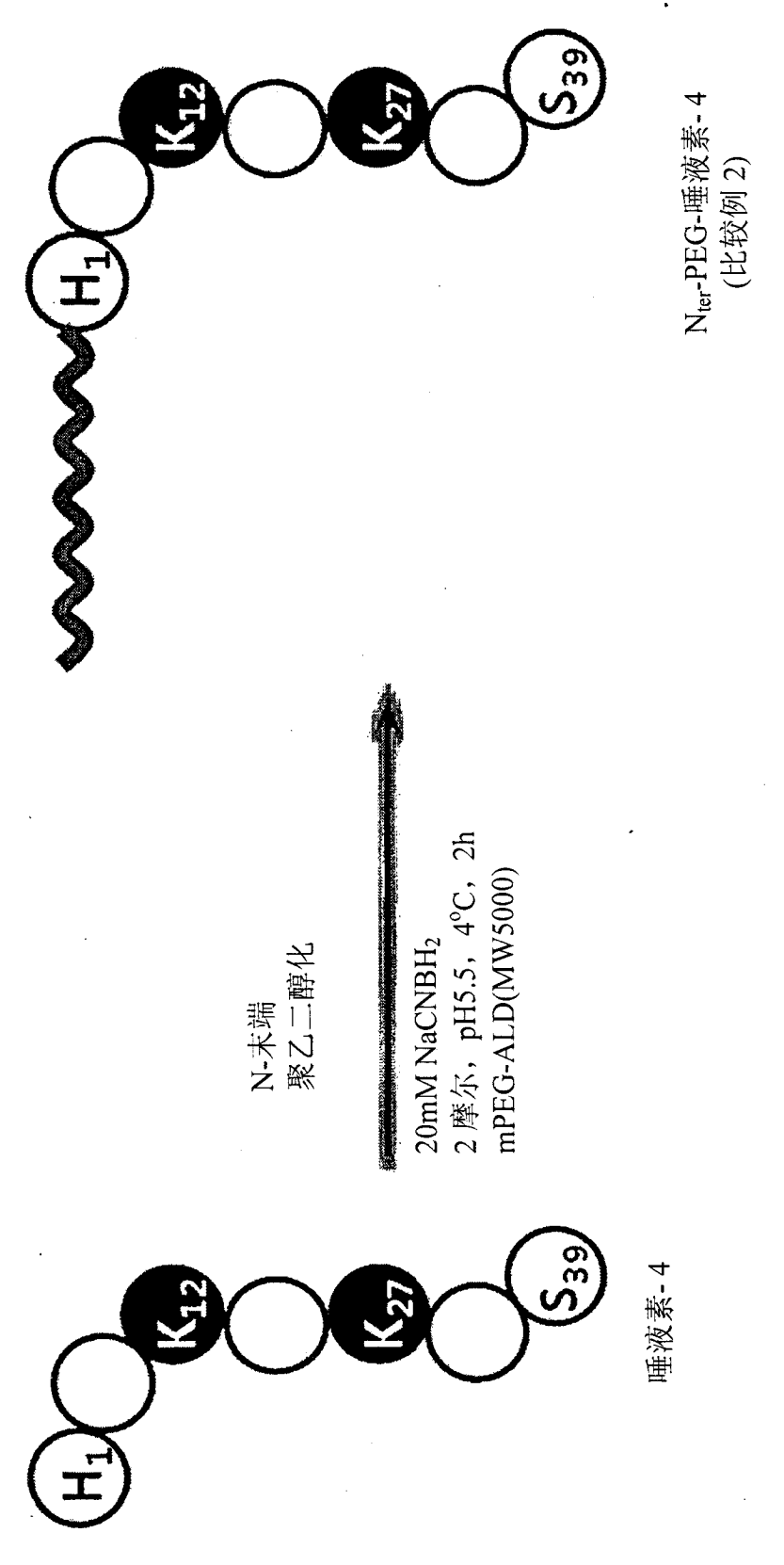


图3

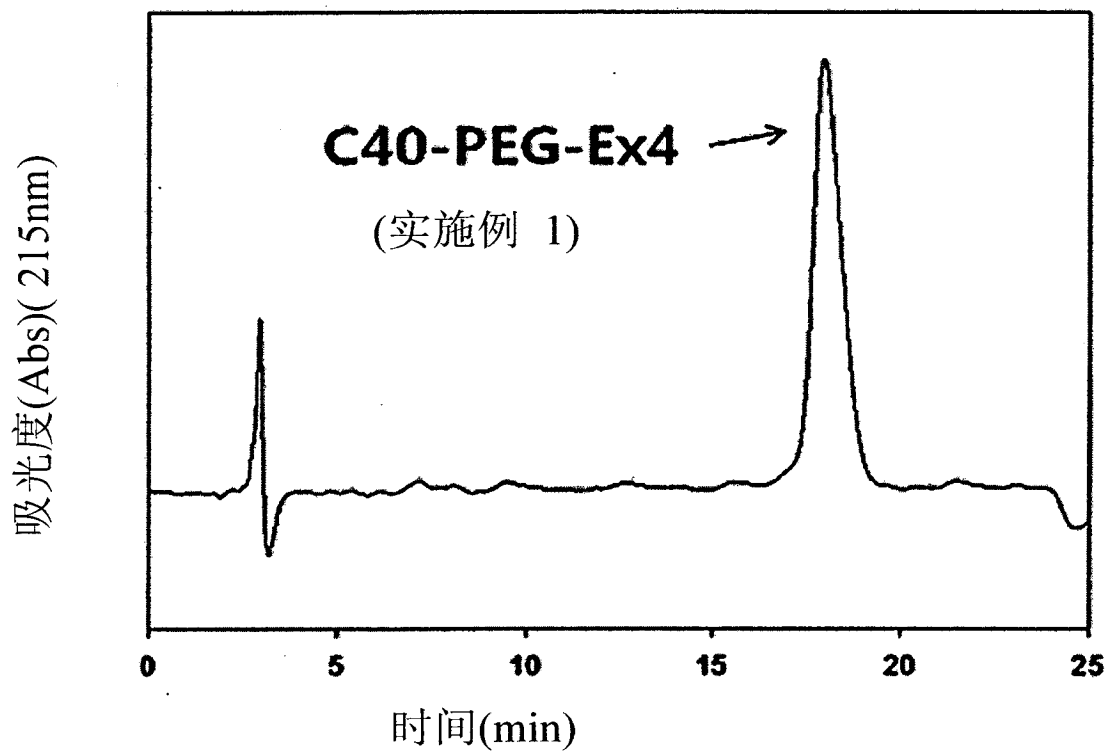


图4

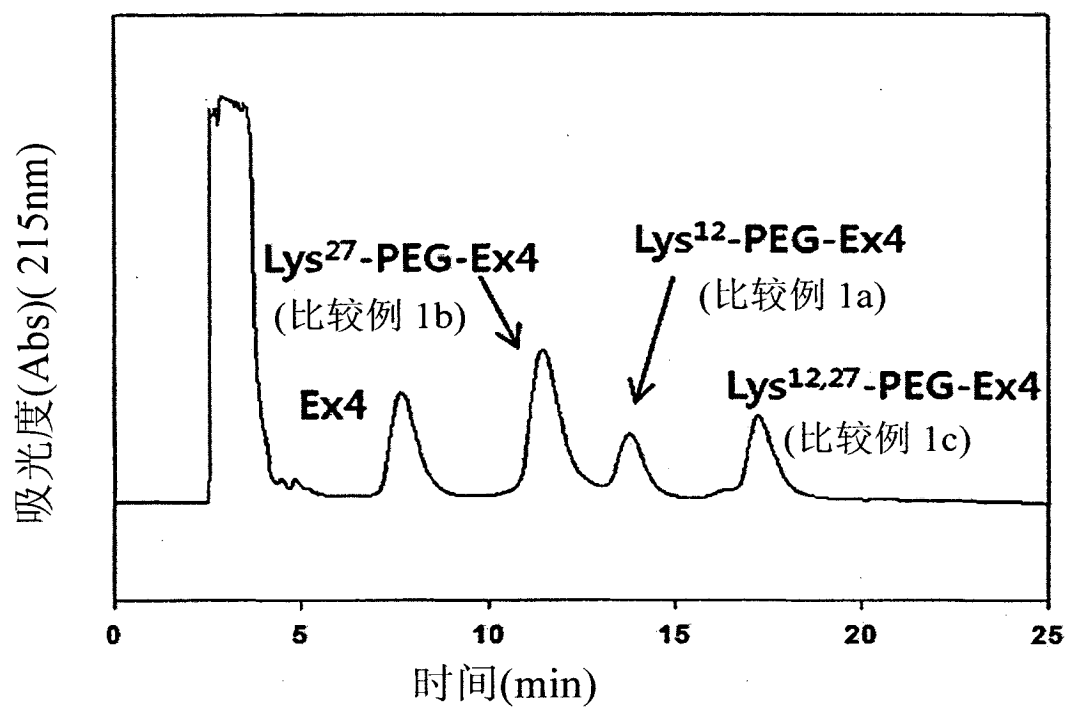


图5

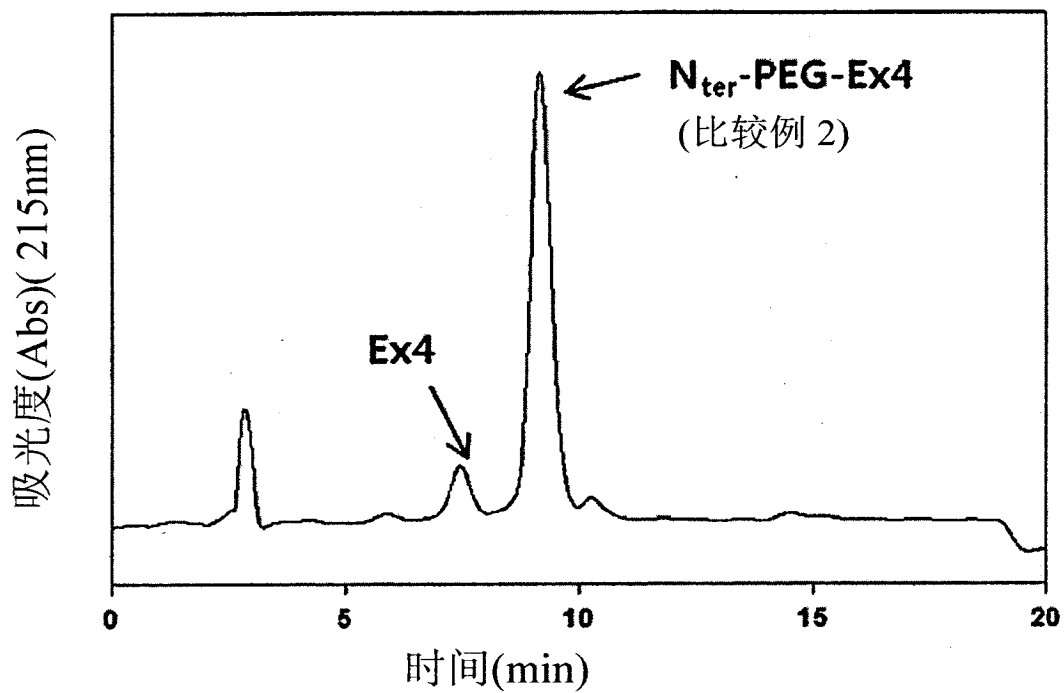


图6

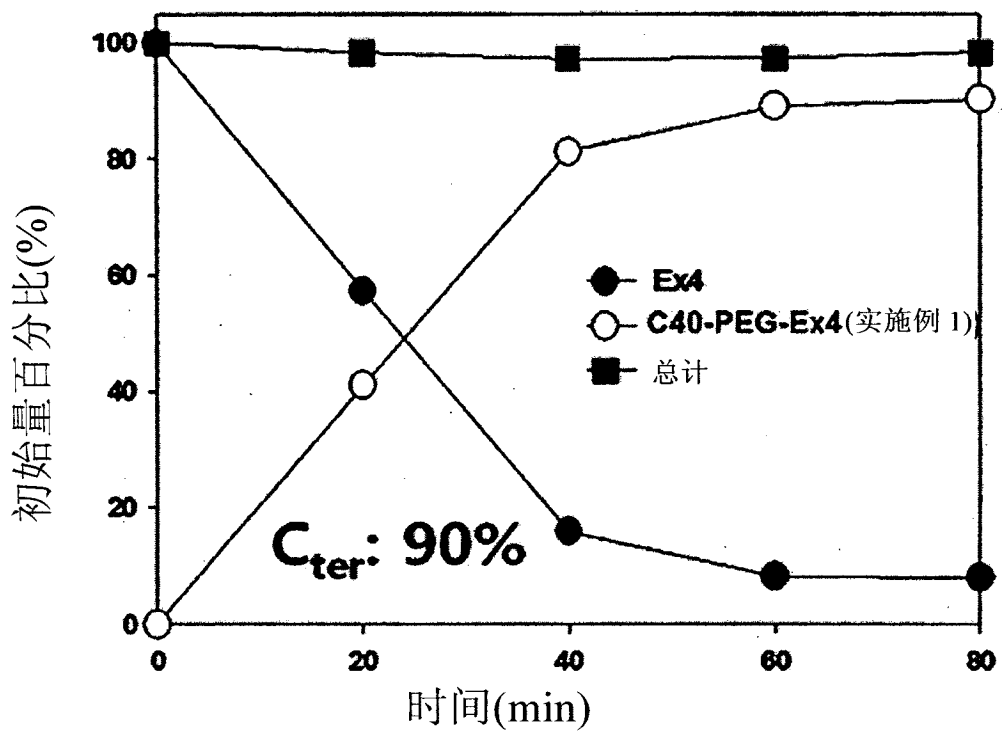


图7

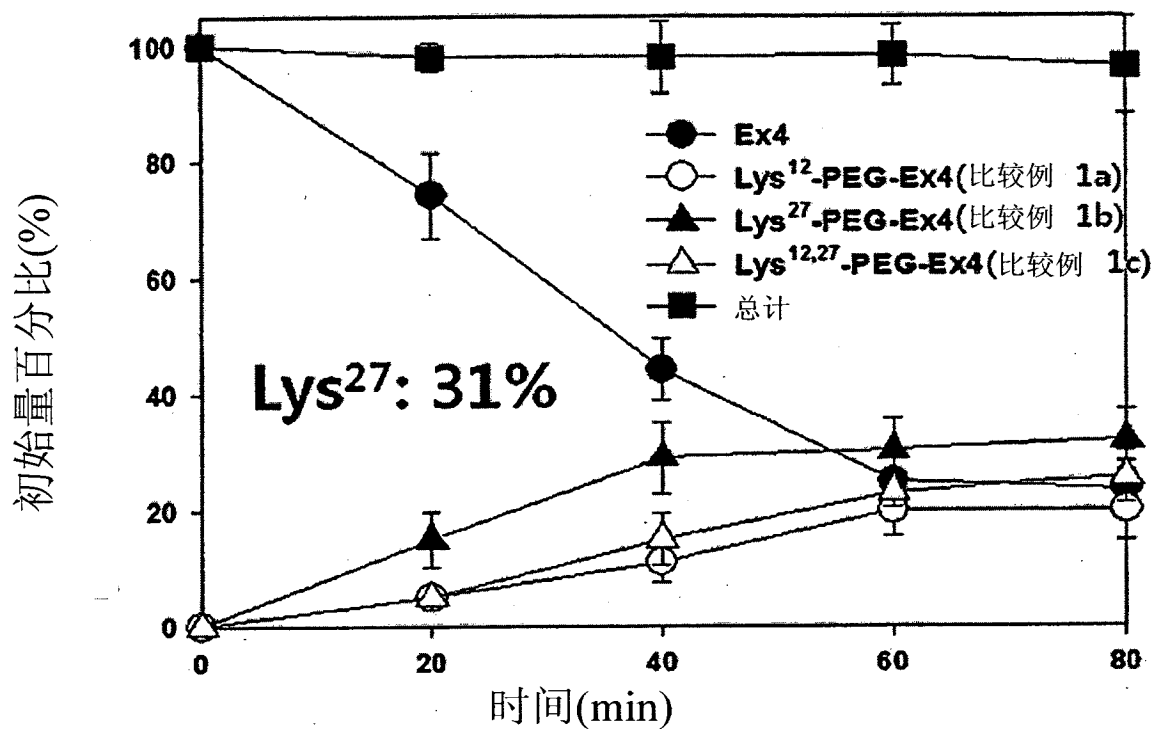


图8

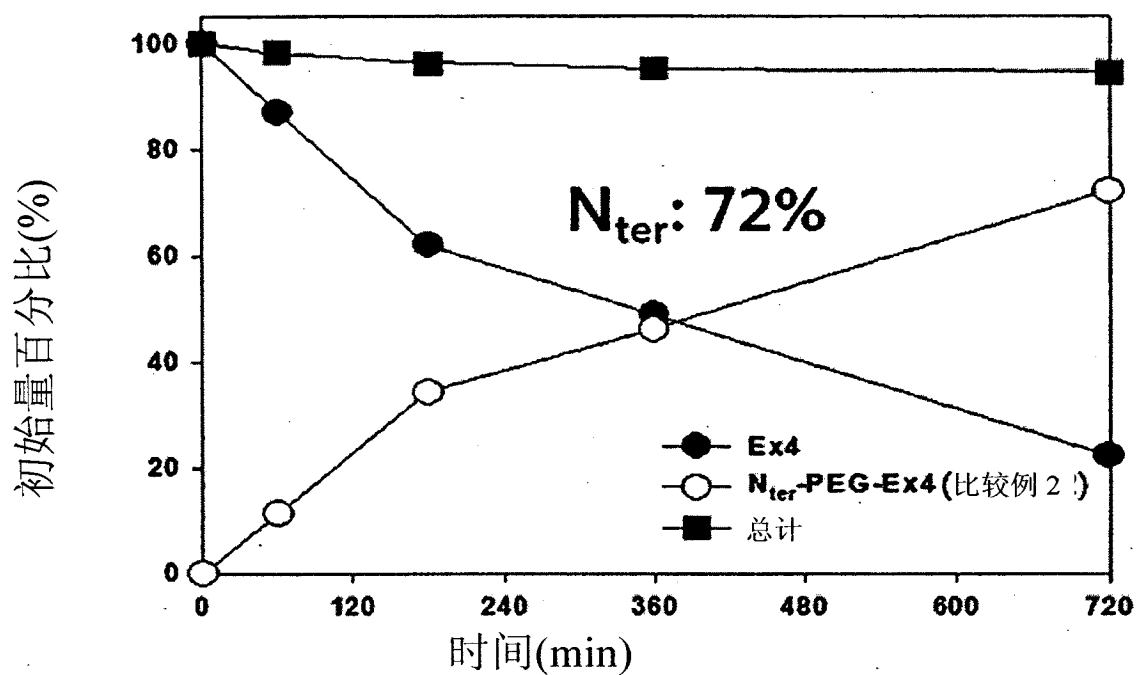


图9

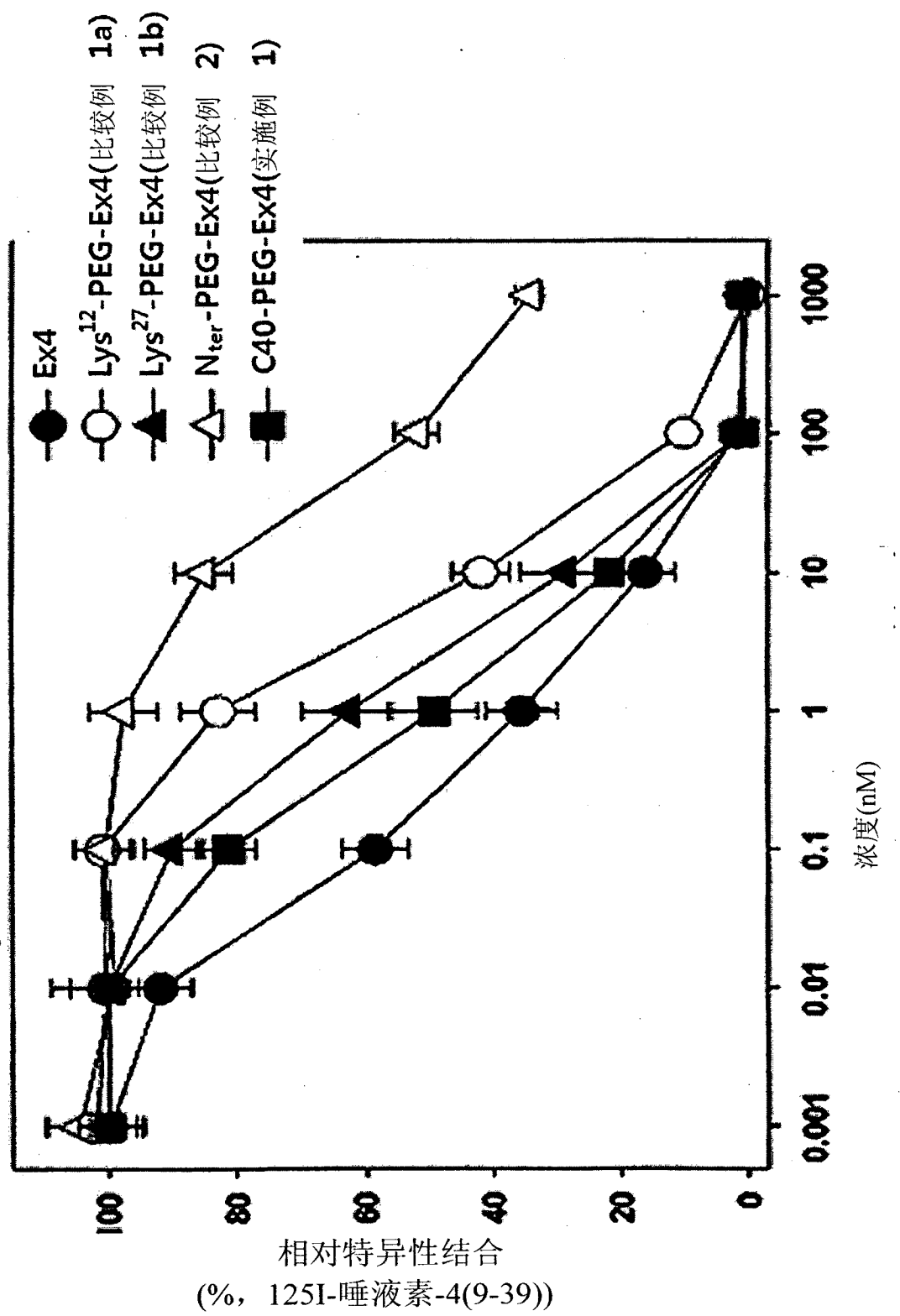


图10

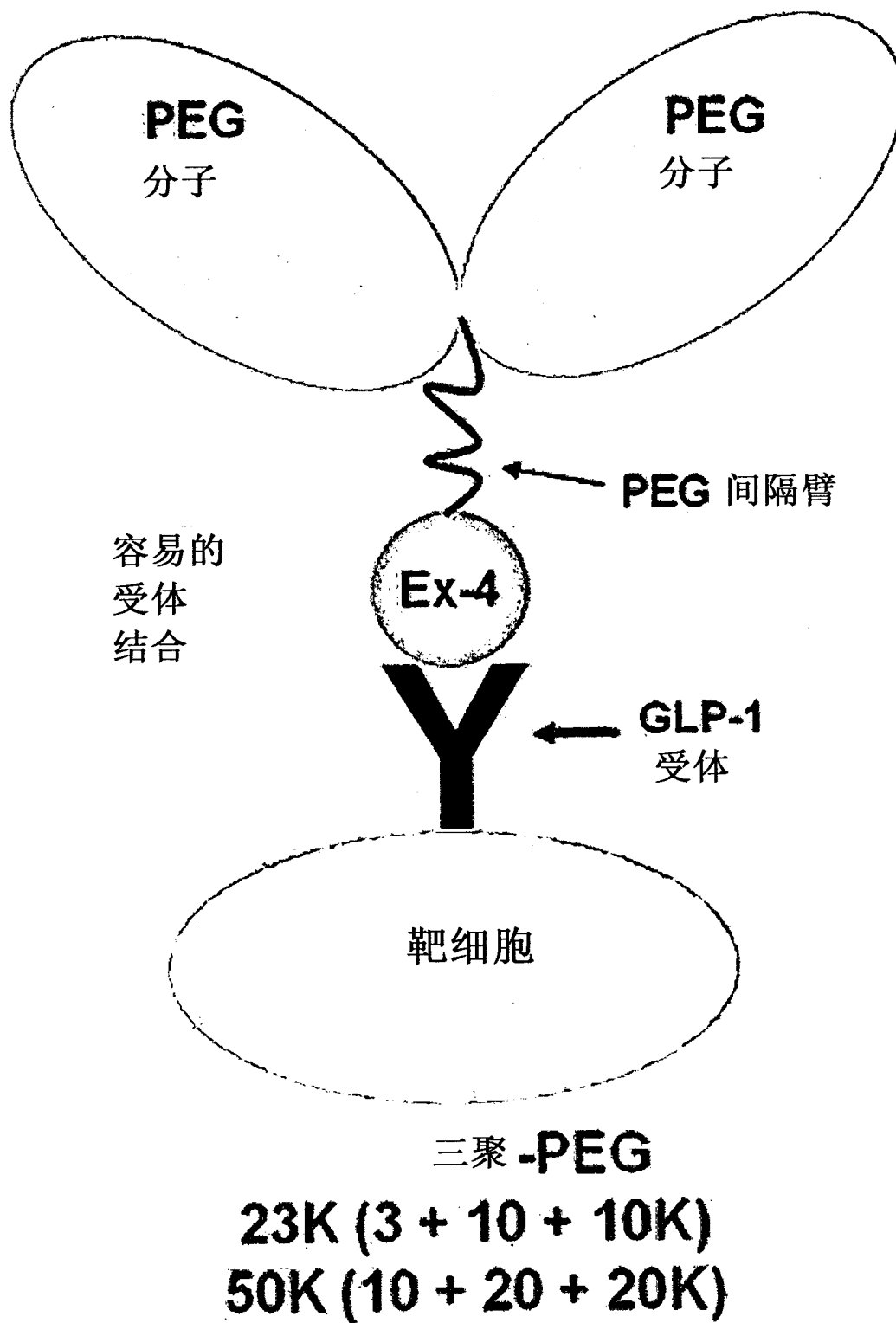


图11

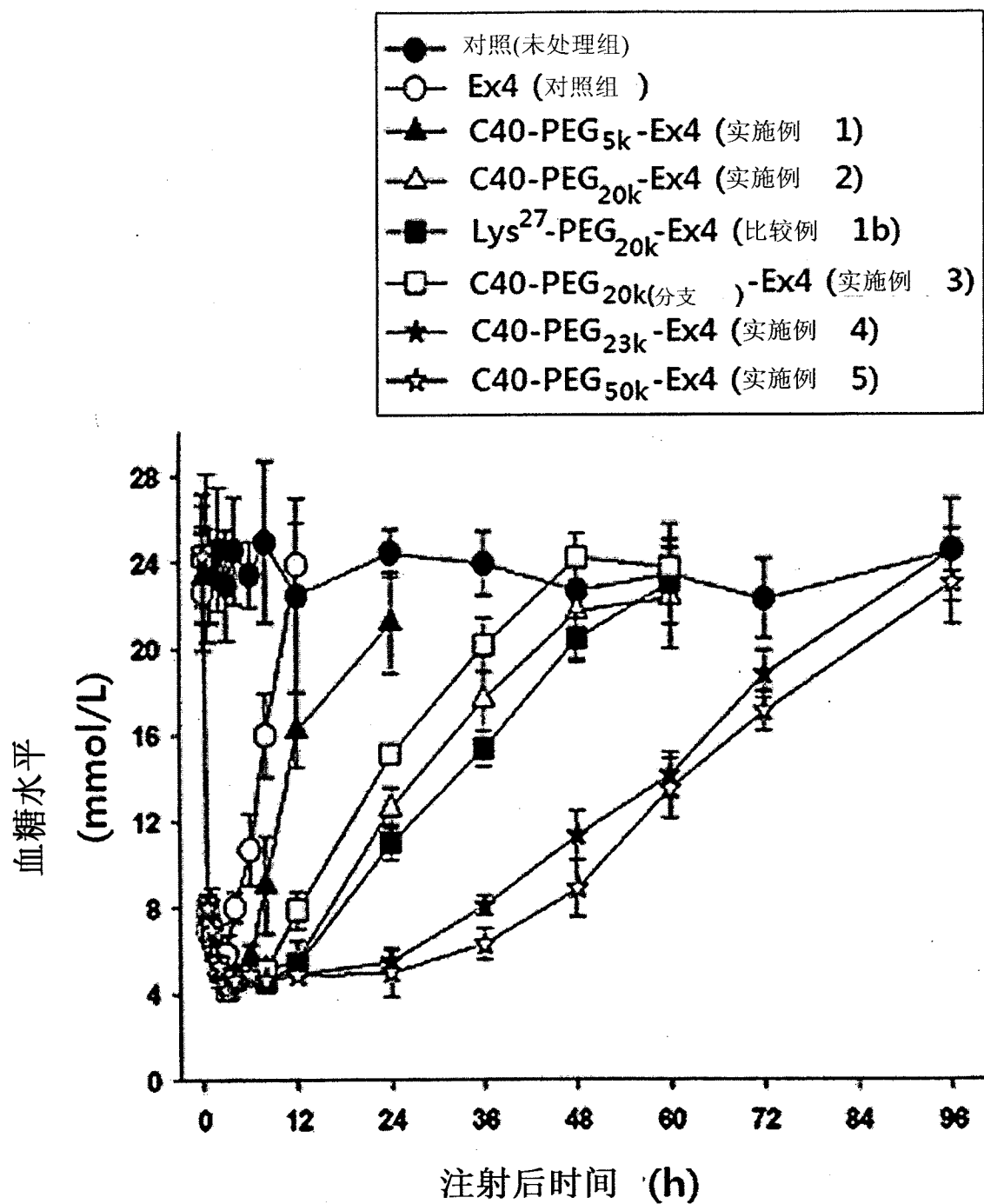


图12