



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118955732 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202410964216.3

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2018.09.21

C07K 19/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/26 (2006.01)

62/562,283 2017.09.22 US

A61K 47/68 (2017.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 3/10 (2006.01)

201880061327.6 2018.09.21

A61P 3/04 (2006.01)

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国

(72) 发明人 魏阳 冈本悠 杰斯珀·格罗马达

塞缪尔·戴维斯

安德鲁·J·墨菲

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理人 张福誉 韩晓帆

权利要求书1页 说明书24页

序列表 (电子公布)

(54) 发明名称

胰高血糖素样肽1受体激动剂及其用途

(57) 摘要

本发明涉及胰高血糖素样肽1受体激动剂及其用途,特别是提供了经修饰胰高血糖素样肽1(GLP1)多肽、包含经修饰GLP1多肽的融合蛋白、及其使用方法。在本发明的多个实施方案中,所述融合蛋白是GLP1受体激动剂,其包含与稳定化结构域融合的经修饰GLP1。在一些实施方案中,包含经修饰GLP1的融合蛋白可用于治疗或改善例如肥胖和糖尿病之疾病的症状或适应证。

1. 融合蛋白,其由SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列组成。
2. 药物组合物,其包含权利要求1所述的融合蛋白和可药用载体或稀释剂。
3. 针和注射器,其包含权利要求1所述的融合蛋白或权利要求2所述的药物组合物。
4. 笔式递送装置,其包含权利要求1所述的融合蛋白或权利要求2所述的药物组合物。
5. 自动注射器,其包含权利要求1所述的融合蛋白或权利要求2所述的药物组合物。
6. 权利要求2所述的药物组合物,其中所述药物组合物是无菌且水性的。
7. 权利要求2所述的药物组合物,其中所述药物组合物是等张溶液。
8. 权利要求7所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含葡萄糖。
9. 权利要求8所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含一种或更多种选自醇、多元醇和非离子表面活性剂的药剂。
10. 权利要求9所述的药物组合物,其中所述非离子表面活性剂是聚山梨酯80。

## 胰高血糖素样肽1受体激动剂及其用途

[0001] 本申请是申请号为201880061327.6的发明名称为“胰高血糖素样肽1受体激动剂及其用途”的中国专利申请的分案申请,原申请是2018年09月21日提交的PCT国际申请PCT/US2018/052110于2020年03月20日进入中国国家阶段的申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及人胰高血糖素样肽1受体激动剂,以及使用所述激动剂的治疗方法。

### 背景技术

[0003] 肥胖已经成为美国的主要健康问题,三分之二的美国人被认为超重或肥胖。肥胖是发生其他疾病(例如心脏病、卒中和糖尿病)的重要潜在风险因素。即使体重略微(modest)下降(初始体重的5%至10%)也降低发生肥胖相关疾病(例如心脏病和糖尿病)的风险。

[0004] 糖尿病是一种慢性病症,其特征在于高血糖水平和胰岛素抵抗。如果不治疗的话,高血糖水平可导致长期并发症,包括心脏病、卒中、糖尿病性视网膜病和下肢截肢。糖尿病的治疗涉及控制和降低血糖水平,并且包括运动和饮食调整以及例如胰岛素和二甲双胍的药物。

[0005] 用于治疗肥胖和用于血糖控制的方法之一涉及靶向肠降血糖素(incretin)途径的胰高血糖素样肽(glucagon-like peptide, GLP)-1受体激动剂。胰高血糖素样肽(GLP)-1是由肠内分泌细胞分泌的肽激素。在经口葡萄糖施用之后,GLP1与其受体结合,导致胰岛素分泌和血糖水平降低(肠降血糖素效应)。然而,酶二肽基肽酶4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)使GLP1迅速失活并降解,并且GLP1具有1.5分钟的非常短的半衰期。因此,已经研究了GLP1的更长效衍生物以及GLP1受体激动剂(包括包含GLP1的融合蛋白)用于糖尿病控制。GLP1类似物、融合蛋白和GLP1受体激动剂公开于例如US7452966、US8389689、US8497240、US8557769、US8883447、US8895694、US9409966、US20160194371、US20140024586、US20140073563、US20120148586、US20170114115、US20170112904、US20160361390、US20150313908、US20150259416、W02017074715、W02016127887、W02015021871、W02014113357、EP3034514、EP2470198和EP2373681中。

[0006] 然而,需要对通过DPP4的降解具有抗性、具有改善的药代动力学特性并且在血糖控制中具有提高的效力和持续体内活性的新的GLP1肽变体和GLP1受体激动剂。这样的GLP1变体和GLP1受体激动剂可用于治疗肥胖和糖尿病。

### 发明内容

[0007] 根据一个方面,本发明提供了来自成熟GLP1(7-37) (SEQ ID NO:4)的包含至少一个氨基酸修饰的胰高血糖素样肽1(GLP1)变体,所述氨基酸修饰选自:(i)向N端添加氨基酸;以及(ii)从肽序列中缺失氨基酸。在某些实施方案中,所述修饰包括向N端添加丙氨酸或谷氨酰胺。

[0008] 根据一个方面,本发明提供了GLP1受体激动剂,其中所述GLP1受体激动剂包含含有GLP1或其变体的融合蛋白。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂包含与稳定化结构域(stabilizing domain)融合的GLP1肽或GLP1肽变体。在一个实施方案中,稳定化结构域是与GLP1受体结合的抗体或其抗原结合片段。

[0009] 本发明的GLP1受体激动剂尤其可用于提高GLP1的结合和/或活性。在一些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂通过激活GLP1并降低血糖水平来发挥作用。在一些实施方案中,本发明的GLP1肽变体和/或GLP1受体激动剂对通过二肽基肽酶4(DPP4)的失活具有更大的抗性,并且显示出改善的体内半衰期。本发明的改进的GLP1激动剂导致血糖水平显著降低,这即使利用单剂量也维持超过10天。在一些实施方案中,GLP1受体激动剂通过增强葡萄糖诱导的从胰岛β细胞的胰岛素分泌、提高胰岛素表达、抑制β细胞凋亡、促进β细胞新生、降低胰高血糖素分泌、延迟胃排空、促进饱腹感和提高外周葡萄糖处置来发挥作用。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂可用于在对象中预防、治疗或改善高血糖相关疾病或病症(例如,糖尿病)的至少一种症状。在某些实施方案中,可向患有或有风险患有糖尿病的对象预防性地或治疗性地施用GLP1受体激动剂。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂可用于在对象中预防、治疗或改善肥胖的至少一种症状或适应证,例如体重减轻(weight loss)。

[0010] 在某些实施方案中,GLP1受体激动剂是包含GLP1变体和稳定化结构域的融合蛋白,其中稳定化结构域包含免疫球蛋白或其片段。在一个具体的实施方案中,免疫球蛋白包含重链可变区和轻链可变区,并且与GLP1受体特异性结合。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂与GLP1受体结合,从而导致GLP1受体活化。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂通过激活GLP1受体从而导致血糖控制(即降低血糖水平)来发挥作用。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供了具有以下一个或更多个特征的融合蛋白:(a)包含GLP1变体结构域和稳定化结构域;(b)是GLP1受体激动剂;(c)GLP1变体结构域包含SEQ ID No:5、6、7或8的氨基酸序列;(d)与GLP1受体结合;(e)稳定化结构域包含免疫球蛋白或其片段;(f)稳定化结构域包含免疫球蛋白Fc片段;(g)稳定化结构域包含抗GLP1受体抗体或其抗原结合片段;(h)抵抗通过血清蛋白酶的降解至少72小时;以及(i)显著降低血清葡萄糖水平,这在单剂量施用下持续超过10天。

[0012] 在一方面,本发明提供了编码GLP1变体或其部分的核酸分子。例如,本发明提供了核酸分子,所述核酸分子编码选自SEQ ID No:5、6、7、8、9、10、11、12和13的任何氨基酸序列,或其与其具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的基本上相似的序列。

[0013] 本发明还提供了编码包含GLP1变体的任何融合蛋白的核酸分子。

[0014] 在一个相关方面,本发明提供了重组表达载体,其能够表达如本文所述的包含GLP1变体的多肽或包含GLP1变体的融合蛋白。例如,本发明包括含有上述任何核酸分子(即编码任何GLP1变体或包含GLP1变体的融合蛋白的核酸分子)的重组表达载体。在本发明的范围内还包括已经引入了这样的载体的宿主细胞,以及产生蛋白质或其片段的方法,其通过在允许产生蛋白质或其片段的条件下培养宿主细胞并回收如此产生的蛋白质和片段来进行。

[0015] 在一方面,本发明提供了药物组合物,其包含治疗有效量的至少一种特异性结合GLP1受体的重组蛋白或其片段和可药用载体。在一个相关方面,本发明的特征在于组合物,

所述组合物是GLP1受体激动剂蛋白和第二治疗剂的组合。在一个实施方案中，第二治疗剂是有利地与GLP1受体激动剂组合的任何药剂。可有利地与GLP1受体激动剂组合的示例性药剂包括但不限于激活GLP1受体活性的其他药剂(包括其他蛋白质或代谢物等)和/或不直接结合GLP1受体但仍减轻或改善或治疗GLP1受体相关疾病或病症(例如，糖尿病)的药剂。本文中其他地方公开了涉及本发明的GLP1受体激动剂蛋白的另一些组合治疗和共制剂(co-formulation)。

[0016] 在另一方面，本发明提供了用于用本发明的GLP1受体激动剂在对象中治疗与GLP1相关的疾病或病症(例如糖尿病)的治疗方法，其中所述治疗方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的包含本发明的GLP1受体激动剂的药物组合物。在某些实施方案中，GLP1受体激动剂包含GLP1变体或含有GLP1变体的融合蛋白。所治疗的疾病是通过激活GLP1受体活性而得以改善、减轻、抑制或预防的任何疾病或病症。在某些实施方案中，本发明提供了预防、治疗或改善GLP1受体相关疾病或病症的至少一种症状的方法，所述方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明的GLP1受体激动剂。在一些实施方案中，本发明提供了通过施用治疗有效量的本发明的GLP1受体激动剂蛋白来在对象中改善或减轻GLP1受体相关疾病或病症的至少一种症状或适应证的严重程度的方法，其中所述至少一种症状或适应证选自：高血糖水平、过度口渴(excessive thirst)、多尿(increased urination)、尿中存在酮体(presence of ketones in urine)、疲劳、体重波动(weight fluctuation)、视力模糊(blurred vision)、疮愈缓慢(slow healing sores)、频繁感染、牙龈肿胀或疼痛(swollen or tender gum)、肥胖、心脏病、卒中(stroke)、肾病、眼病、神经损伤和高血压。在某些实施方案中，本发明提供了在超重或肥胖对象中减轻体重的方法，所述方法包括向对象施用治疗有效量的本发明的GLP1受体激动剂，所述GLP1受体激动剂结合GLP1受体并激活GLP1受体活性。在某些实施方案中，本发明提供了在对象中降低血糖水平的方法，所述方法包括向对象施用治疗有效量的本发明的GLP1受体激动剂，所述GLP1受体激动剂结合GLP1受体并激活GLP1受体活性。在一些实施方案中，可预防性地或治疗性地将GLP1受体激动剂施用于患有或有风险患有高血糖的对象。处于风险之中的对象包括但不限于高龄对象、孕妇、具有高HbA1c水平的对象以及具有一种或更多种风险因素(包括肥胖、高血胆固醇、吸烟、过量饮酒和/或缺乏运动)的对象。在某些实施方案中，本发明提供了治疗通过用胰岛素和/或二甲双胍治疗无法控制的2型糖尿病的方法，所述方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明的GLP1受体激动剂。在某些实施方案中，将本发明的GLP1受体激动剂与第二治疗剂组合施用于有此需要的对象。第二治疗剂可选自：胰岛素或胰岛素类似物、双胍类(例如，二甲双胍)、噻唑烷二酮类(thiazolidinedione)、磺酰脲类(sulfonylurea)(例如，氯磺丙脲(chlorpropamide))、格列奈类(glinide)(例如，那格列奈(nateglinide))、 $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂、DPP4抑制剂(例如，西他列汀(sitagliptin))、普兰林肽(pramlintide)、溴隐亭(bromocriptine)、SGLT2抑制剂(例如，卡格列净(canagliflozin))、抗高血压药、他汀类(statin)、阿司匹林、饮食调整(dietary modification)、运动和膳食补充剂(dietary supplement)。在本文中别处描述了可与本发明的GLP1受体激动剂融合蛋白组合使用的另外治疗剂。在某些实施方案中，第二治疗剂可以是有助于抵消或降低与本发明的GLP1受体激动剂相关的任何可能副作用的药剂(如果这样的副作用发生的话)。GLP1受体激动剂可皮下、静脉内、皮内、腹膜内、经口、肌内或颅内施用。可以以约0.1mg/kg对象体重至约100mg/

kg对象体重的剂量施用GLP1受体激动剂。在某些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可以包含0.1mg至600mg的一个或多个剂量施用。

[0017] 本发明还包括本发明的GLP1受体激动剂在制备用于治疗将受益于刺激GLP1受体结合和/或活性的疾病或病症(例如,糖尿病,包括2型糖尿病)的药物中的用途。

[0018] 通过阅读下面的详细描述,另一些实施方案将变得明显。

## 具体实施方式

[0019] 在描述本发明方法之前,应理解,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这样的方法和条件可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述一些特定实施方案的目的,而并不旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0020] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管类似于或等同于本文中描述的那些方法和材料的任何方法和材料都可用于本发明的实践或测试,但是现在描述一些优选的方法和材料。本文中提及的所有出版物均通过引用整体并入本文。

[0021] 定义

[0022] 术语“GLP1”,也称为“胰高血糖素样肽1”,是指在食用营养物之后由肠L细胞释放的31-氨基酸肽激素。GLP1与GLP1受体结合并增强葡萄糖诱导的从胰岛β细胞的胰岛素分泌、提高胰岛素表达、抑制β细胞凋亡、促进β细胞新生、降低胰高血糖素分泌、延迟胃排空、促进饱腹感和提高外周葡萄糖处置。在某些实施方案中,术语“GLP1”是指成熟的31-氨基酸肽激素(SEQ ID N0:4),其包含全长GLP1肽(SEQ ID N0:3)的第7至37位氨基酸。该术语还包括GLP1的变体,其中变体包含1、2、3、4、5或6个氨基酸替换、添加或缺失。例如,该术语包括包含SEQ ID N0:5、6、7或8的氨基酸序列的变体。

[0023] 本文中使用的“稳定化结构域”是当与肽融合时提高肽的体内活性和/或稳定性的任何大分子。例如,稳定化结构域可以是包含免疫球蛋白C<sub>H</sub>3结构域的多肽。在某些实施方案中,稳定化结构域提高肽的血清半衰期。在某些实施方案中,稳定化肽(stabilizing peptide)提高肽的体内效力。稳定化结构域的一个非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分,例如IgG的Fc结构域,所述IgG选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及在每个同种型组内的任何同种异型。在某些实施方案中,稳定化结构域是包含至少一个半胱氨酸残基的长度为1至约200个氨基酸的氨基酸序列或Fc片段。作为另一个实例,稳定化结构域可以是免疫球蛋白或其抗原结合片段。在某些实施方案中,稳定化结构域是包含重链可变区和轻链可变区的免疫球蛋白,其中所述免疫球蛋白与特定抗原结合。在某些实施方案中,稳定化结构域包含抗原结合结构域和Fc结构域(例如,IgG1或IgG4抗体的)或者可仅包含抗原结合部分(例如,Fab、F(ab')<sub>2</sub>或scFv片段),并且可以对其进行修饰以影响功能。在一个具体的实施方案中,稳定化结构域是包含重链可变区和轻链可变区的免疫球蛋白,其中所述免疫球蛋白与GLP1受体结合。在另一些实施方案中,稳定化结构域是半胱氨酸残基或短的含半胱氨酸肽。另一些稳定化结构域包括包含亮氨酸拉链、螺旋-环基序或卷曲-螺旋(coiled coil)基序或者由其组成的肽或多肽。

[0024] 本文中使用的术语“GLP1受体激动剂”是指与GLP1受体结合的蛋白质。在本发明的上下文中,该术语是指包含与稳定化结构域融合的GLP1或GLP1变体的融合蛋白。在某些实

施方案中,该术语包括融合蛋白,所述融合蛋白包含与免疫球蛋白或其片段融合的GLP1变体。在一个具体的实施方案中,该术语包括融合蛋白,所述融合蛋白包含与免疫球蛋白的轻链可变区(VL)的N端融合的GLP1或GLP1变体。在一个具体的实施方案中,该术语包括与结合GLP1受体的抗体或其抗原结合片段的VL的N端融合的GLP1或GLP1变体。

[0025] 本文中使用的术语“抗体”旨在指包含通过二硫键相互连接的四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)及其多聚体(例如IgM)的免疫球蛋白分子或其抗原结合片段。每条重链包含重链恒定区(其包含结构域C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3)和Ig可变区,该Ig可变区可以是重链可变区(heavy chain variable region,“HCVR”或“V<sub>H</sub>”)或轻链可变区(light chain variable region,“LCVR或“V<sub>L</sub>” )。每条轻链包含轻链可变区(“LCVR或”V<sub>L</sub>”)和轻链恒定区(C<sub>L</sub>)。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区域,称为框架区(FR)。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>各自包含三个CDR和四个FR,其从氨基端至羧基端按以下顺序布置:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的某些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)的FR可以与人种系序列相同,或者可以是天然或人工修饰的。可基于两个或更多个CDR的并行分析来限定氨基酸共有序列。本文中使用的术语“抗原结合蛋白”也包括抗体。

[0026] 一个或更多个CDR残基的替换或者一个或更多个CDR的省略也是可能的。在科学文献中已经描述了以下抗体,其中一个或两个CDR可免于进行结合。Padlan等(1995FASEB J.9:133-139)基于公开的晶体结构分析了抗体与其抗原之间的接触区域,并且得出结论:只有约五分之一至三分之一的CDR残基实际上与抗原接触。Padlan还发现了许多以下抗体,其中一个或两个CDR的氨基酸不与抗原接触(另参见Vajdos et al.2002J Mol Biol 320:415-428)。

[0027] 用于鉴定VR氨基酸序列中CDR的方法和技术是本领域中公知的,并且可用于鉴定本文中公开的特定VR氨基酸序列中的CDR。可用于鉴定CDR的边界的示例性惯例包括例如Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般而言,Kabat定义基于序列变异性,Chothia定义基于结构环区域的位置,而AbM定义是Kabat方法和Chothia方法之间的折衷方案。参见例如Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest,"National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 以及Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)。公共数据库也可用于鉴定抗原结合蛋白或抗体的抗原结合域中的CDR序列。

[0028] 不接触抗原的CDR残基可基于先前的研究(例如,CDRH2中的残基H60-H65通常是不需要的)、从Kabat CDR的区域中排除Chothia CDR、通过分子建模和/或凭经验鉴定。如果省略了CDR或其残基,则通常将其用另一人抗体序列或这样的序列的共有序列中占据相应位置的氨基酸替换。待替换CDR和氨基酸中的替换位置也可以凭经验选择。经验替换可以是保守替换或非保守替换。

[0029] 本文中使用的术语“抗原结合蛋白的抗原结合部分”、“抗原结合蛋白的抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或遗传改造的多肽或糖蛋白。本文中使用的术语“抗原结合蛋白的抗原结合片段”或“抗原结合蛋白片段”是指抗原结合蛋白的保留了与GLP1受体特异性结合的能力的一个或更多个片段。抗原结合蛋白片段可包括Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv片段、dAb片段、含有CDR的片段或分离的CDR。在某些实施方案中,术语“抗原结合片段”是指多特异性抗原结合分子的多肽片

段。抗原结合蛋白或抗体的抗原结合片段可使用任何合适的标准技术例如蛋白水解消化或重组遗传改造技术例如从全蛋白分子得到,所述重组遗传改造技术涉及编码抗原结合蛋白可变结构域和(任选地)恒定结构域的DNA的操作和表达。这样的DNA是已知的和/或可容易从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体抗体文库)获得,或可以合成。可对DNA进行测序并化学地或通过使用分子生物学技术对其进行操作,例如以将一个或更多个可变结构域和/或恒定结构域布置成合适的配置,或以引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等等。

[0030] 抗原结合片段的一些非限制性实例包括: (i) Fab片段; (ii) F(ab')2片段; (iii) Fd片段; (iv) Fv片段; (v) 单链Fv(scFv)分子; (vi) dAb片段; 以及 (vii) 由模拟抗体的高变区的氨基酸残基组成的最小识别单元(例如,分离的互补决定区(CDR),例如CDR3肽),或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。在本文中使用的表述“抗原结合片段”内还涵盖其他改造分子,例如结构域特异性抗体、单域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、双抗体(diabody)、三抗体(triabody)、四抗体(tetrabody)、微抗体(minibody)、纳米抗体(nanobody)(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小型模块化免疫药物(small modular immunopharmaceutical, SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域。

[0031] 本发明的抗原结合蛋白或抗体的抗原结合片段通常包含至少一个免疫球蛋白(Ig)可变结构域。可变结构域可具有任何尺寸或氨基酸组成,并且通常包含至少一个CDR,其与一个或更多个框架序列相邻或与之共框。在具有与V<sub>L</sub>结构域缔合的V<sub>H</sub>结构域的抗原结合片段中,V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域可以以任何合适的布置相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体是并且包含V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>二聚体。或者,抗原结合蛋白的抗原结合片段可以包含单体V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域。

[0032] 在某些实施方案中,抗原结合片段可包含与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可存在于本发明抗体的抗原结合片段中的可变结构域和恒定结构域的一些非限制性示例性配置包括: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; 以及 (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>。在可变结构域和恒定结构域的任何配置(包括上面列出的任何示例性配置)中,可变结构域和恒定结构域可彼此直接连接,或者可通过完整或部分铰链区或接头区连接。铰链区可以由至少2个(例如5、10、15、20、40、60或更多个)氨基酸组成,其导致在单个多肽分子中的相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明抗原结合蛋白的抗原结合片段可包含彼此和/或与一个或更多个单体V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域非共价缔合(例如,通过二硫键)的以上列出的任何可变和恒定结构域配置的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。

[0033] 与完整蛋白质分子一样,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性的(例如,双特异性的)。抗原结合蛋白的多特异性抗原结合片段通常包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够特异性结合单独的抗原或在同一抗原上的不同表位。可使用本领域中可获得的常规技术使任何多特异性抗原结合蛋白形式(包括本文中公开的示例性双特异性抗原结合蛋白形式)适用于本发明的抗原结合蛋白的抗原结合片段的情况。

[0034] 本文中使用的术语“完全人抗体”、“人抗体”、“完全人抗原结合蛋白”或“人抗原结合蛋白”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗原结合蛋白。

本发明的人抗原结合蛋白可例如在CDR中并且特别是CDR3中包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,本文中使用的术语“人抗原结合蛋白”并不意图包括其中已将源自另一哺乳动物物种(例如,小鼠)种系的CDR序列接枝到人FR序列上的抗原结合蛋白。该术语包括在非人哺乳动物中或在非人哺乳动物的细胞中重组产生的抗原结合蛋白或抗体。该术语不意图包括从人对象中分离或在人对象中产生的抗原结合蛋白或抗体。

[0035] 本文中使用的术语“重组”是指通过本领域已知为重组DNA技术(其包括例如DNA剪接和转基因表达)的技术或方法产生、表达、分离或获得的本发明的融合蛋白或其片段。该术语是指在非人哺乳动物(包括转基因非人哺乳动物,例如转基因小鼠)或细胞(例如,CHO细胞)表达系统中表达或从重组组合人抗体文库中分离的融合蛋白。

[0036] 术语“特异性结合”或“与…特异性结合”等意指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征在于:平衡解离常数为至少约 $1 \times 10^{-8}$  M或更小(例如, $K_D$ 越小表示结合越紧密)。用于确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域中公知的,并且包括例如平衡透析、表面等离子体共振、等温滴定量热法等。

[0037] 本文中使用的术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括与抗原特异性结合形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或遗传改造的多肽或糖蛋白。本文中使用的术语抗原结合蛋白或抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”是指免疫球蛋白蛋白质的保留与GLP1受体结合的能力的一个或更多个片段。

[0038] 本文中使用的术语“ $K_D$ ”意指特定蛋白质-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0039] 当涉及核酸或其片段时,术语“显著同一性”或“基本上相同”表示,当利用适当核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳比对时,在至少约90%,更优选至少约95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基中核苷酸序列相同,例如通过任何公知的序列同一性算法,例如如下所述的FASTA、BLAST或GAP测得的。在某些情况下,与参考核酸分子具有显著同一性的核酸分子可编码与由参考核酸分子编码的多肽具有相同或基本上相似氨基酸序列的多肽。

[0040] 当应用于多肽时,术语“显著相似性”或“基本上相似”是指两个肽序列当例如通过使用默认缺口权重的GAP或BESTFIT程序最佳比对之后共有至少90%的序列同一性,甚至更优选至少95%、98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置通过保守氨基酸替换而不同。“保守氨基酸替换”是其中一个氨基酸残基被侧链(R基团)具有类似化学性质(例如,电荷或疏水性)的另一个氨基酸残基替换的氨基酸替换。通常来说,保守氨基酸替换基本上不改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列通过保守替换而彼此不同的情况下,可上调相似性的百分比或程度以校正替换的保守性质。进行这样的调整的手段是本领域技术人员公知的。参见例如Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331,其通过引用并入本文。侧链具有类似化学性质的氨基酸组的一些实例包括:1) 脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2) 脂族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3) 含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4) 芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6) 酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,以及7) 含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。一些优选的保守氨基酸替换组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守替代是在Gonnet et al.

(1992) *Science* 256:1443-45 (通过引用并入本文) 中公开的在PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何改变。“中度保守”替代是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何改变。

[0041] 通常使用序列分析软件来测量多肽的序列相似性。蛋白质分析软件使用分配给多种替换、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸替换)的相似性量度来匹配相似序列。例如, GCG 软件包含程序如GAP和BESTFIT,这些程序可与默认参数一起使用,以确定密切相关的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽)之间或野生型蛋白与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如GCG版本6.1。也可使用FASTA (GCG版本6.1中的程序) 利用默认或推荐参数比较多肽序列。FASTA (例如FASTA2和FASTA3) 提供查询序列和检索序列之间的比对和最佳重叠区域的百分比序列同一性 (Pearson (2000), 同上)。当将本发明的序列与包含来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一优选算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见,例如,Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410和(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402,其各自通过引用并入本文。

[0042] 短语“治疗有效量”意指对其施用对象产生期望效果的量。确切的量将取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见,例如,Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*)。

[0043] 本文中使用的术语“对象”是指需要改善、预防和/或治疗与GLP1相关的疾病或病症的动物,优选哺乳动物,更优选人。该术语包括患有与GLP1相关的疾病或病症或处于患与GLP1相关的疾病或病症风险之中的人对象。例如,该术语包括患有或有风险发生糖尿病(例如,2型糖尿病)的对象。在某些实施方案中,该术语包括患有或有风险发生肥胖、卒中或心肌梗死的对象。该术语还包括具有高血糖水平和/或一种或更多种糖尿病生物标志物(例如,HbA1c)的水平提高的对象。该术语还包括对于其来说标准治疗(例如,二甲双胍)是禁忌的或不耐受或者尽管进行了治疗(例如,利用二甲双胍)但仍无法控制疾病的对象。

[0044] 本文中使用的术语“治疗”是指由于向有此需要的对象施用治疗剂(例如本发明的GLP1受体激动剂)而减轻或改善与GLP1相关的疾病或病症的至少一种症状或适应证的严重程度。该术语包括抑制疾病的进展或症状的恶化。该术语还包括疾病的积极预后(positive prognosis),即,对象在施用治疗剂(例如本发明的GLP1受体激动剂蛋白)之后可没有症状或适应证或者可以具有降低的症状或适应证强度。例如,患有糖尿病的对象可在施用本发明的GLP1受体激动剂之后血糖水平降低。可以以治疗量向对象施用治疗剂。

[0045] 术语“预防”是指在施用本发明的GLP1受体激动剂之后抑制与高血糖相关的疾病或病症的任何症状或适应证显现。该术语包括在处于发生GLP1受体相关疾病或病症风险之中的对象中抑制这样的疾病或病症的症状或适应证显现。

[0046] GLP1 (7-37) (SEQ ID NO:4) 由于因酶二肽基肽酶4 (DPP4) 迅速失活而在循环中具有非常短的半衰期(1-2分钟)。先前的研究表明, GLP1 (7-37) 的第8位的多种氨基酸替换使其针对DPP4的抗性更高,由此赋予更长的半衰期。然而,这些分子对DPP4切割具有残留的敏感性(Deacon et al 1998, *Diabetologia* 41:271-278)。因此,需要开发针对通过DPP4的降解的抗性提高的新分子。

[0047] 本发明人假设,为了赋予更佳的针对DPP4的抗性,第一步是通过向N端添加氨基酸(即Ala、Gln)或使肽序列中His或Ala缺失来引入延长或缩短GLP1氨基端的突变,以提供更佳的针对DPP4切割的抗性。本发明人在本文中已经表明,这些新的GLP1变体确实对通过

DPP4的降解具有高抗性。第二步是通过将GLP1与抗GLP1受体抗体融合来补偿任何减弱或降低的GLP1活性,所述抗体将弱化的GLP1与GLP1受体连接,并因而提高其效力。此外,本发明人发现,这些融合蛋白可能是因为其包含Fc结构域而具有延长的血清半衰期并且导致增强的血糖水平降低持续超过10天。如本文中所示,本文中公开的新的GLP1变体和融合蛋白在体外和体内具有显著改善的针对通过DPP4的降解的抗性,并且在血糖控制中显示出极大改善的效力。在针对通过DPP4的降解的抗性的情况下,本文中使用的术语“显著改善”或“增强”或“提高”是指在与DPP4孵育之后提高的降解抗性持续超过4小时、超过8小时、超过16小时、超过24小时、超过36小时或超过70小时,例如通过本文所述的测定所测量的。在血糖水平降低的情况下,本文中使用的术语“显著改善”或“增强”或“提高”是指在施用本发明的GLP1受体激动剂之后在对象中持续的血糖水平降低持续超过1天、超过2天、超过3天、超过4天、超过5天、超过6天、超过7天、超过8天、超过9天或超过10天。

[0048] 本发明的GLP1受体激动剂以高亲和力与GLP1受体结合并且导致GLP1受体活化。在一些实施方案中,所述蛋白质可用于治疗患有糖尿病的对象。所述蛋白质当施用于有此需要的对象时可降低对象中的血糖水平。其可单独使用或作为辅助治疗与本领域已知用于治疗高血糖的其他治疗部分或方式一起使用。

[0049] 本发明的某些GLP1受体激动剂蛋白能够与GLP1受体结合并刺激其活性,如通过体外或体内测定所确定的。可以使用本领域技术人员已知的任何标准方法(包括本文所述的结合测定或活性测定)来测量本发明的蛋白质与GLP1受体结合并增强其活性的能力。

[0050] 对GLP1受体具有特异性的抗原结合蛋白可不包含另外的标记或部分,或者其可包含N端或C端标记或部分。在一个实施方案中,所述标记或部分是生物素。在结合测定中,标记(如果有的话)的位置可决定肽相对于结合该肽的表面的取向。例如,如果表面用抗生物素蛋白包被,则含有N端生物素的肽将被取向为使得该肽的C端部分在该表面的远端。在一个实施方案中,标记可以是放射性核素、荧光染料或MRI可检测的标记。在某些实施方案中,这样的经标记抗原结合蛋白可用于诊断测定,包括成像测定。

[0051] 生物等效物

[0052] 本发明的GLP1受体激动剂涵盖具有不同于所述GLP1受体激动剂的氨基酸序列但保留与GLP1受体结合的能力的氨基酸序列的蛋白质。当与亲本序列相比时,这样的变体GLP1受体激动剂包含一个或更多个氨基酸添加、缺失或替换,但是表现出与所述GLP1受体激动剂的生物学活性基本上等同的生物学活性。同样地,本发明的编码GLP1受体激动剂的DNA序列涵盖与所公开的序列相比包含一个或更多个核苷酸添加、缺失或替换但是编码与本发明的GLP1受体激动剂基本上生物等效的GLP1受体激动剂的序列。

[0053] 如果例如两种蛋白质是在类似的实验条件下以相同的摩尔剂量作为单剂量或多剂量施用时吸收速率和吸收程度未显示出显著差异的药物等同物或药物替代物,则他们被认为是生物等效的。如果一些蛋白质在其吸收程度上是等同的但在其吸收速率上不是,其将被认为是等同物或药物替代物,并且仍可认为是生物等效物,因为吸收速率的这种差异是有意的并且反映在标签上,对于例如在长期使用中达到有效体内药物浓度不是必不可少的,并且对于所研究的特定药物产品被认为在医学上无意义。

[0054] 在一个实施方案中,两种GLP1受体激动剂蛋白如果在其安全性、纯度或效力方面没有临床上有意义的差异则是生物等效的。

[0055] 在一个实施方案中,如果患者可以在参考产品和生物产品之间转换一次或更多次并且与没有这样的转换的持续治疗相比没有预期的不良作用(包括免疫原性在临幊上显著改变,或者有效性降低)风险提高,则两种GLP1受体激动剂蛋白是生物等效的。

[0056] 在一个实施方案中,如果两种GLP1受体激动剂蛋白根据一种或更多种使用条件通过一种或更多种共同的作用机制在这样的机制已知的程度上发挥作用,则它们是生物等效的。

[0057] 可通过体内和/或体外方法证明生物等效性。生物等效性测量包括例如:(a)在人或其他哺乳动物中进行体内测试,其中作为时间的函数在血液、血浆、血清或其他生物流体中测量蛋白质或其代谢物的浓度;(b)与人体内生物利用度数据相关并且对其进行合理预测的体外测试;(c)在人或其他哺乳动物中进行体内测试,其中作为时间的函数测量蛋白质(或其靶标)的合适的急性药理作用;以及(d)在建立了抗原结合蛋白的安全性、效力、或生物利用度或生物等效性的良好对照临床试验中。

[0058] 本发明的GLP1受体激动剂蛋白的生物等效变体可通过例如对残基或序列进行多种替换或使对于生物学活性不需要的末端或内部残基或序列缺失来构建。例如,对于生物学活性不需要的半胱氨酸残基可缺失或被其他氨基酸替代,以防止在复性时形成不必要或不正确的分子内二硫桥。在另一些情况下,生物等效蛋白质可包括包含氨基酸变化的变体,所述氨基酸变化改变蛋白质的糖基化特征,例如消除或去除糖基化的突变。

[0059] GLP1受体激动剂的生物学特性

[0060] 总体来说,本发明的GLP1受体激动剂通过与GLP1受体结合并在结合之后促进GLP1受体的活化来发挥作用。在某些实施方案中,本发明的蛋白质以高亲和力与GLP1受体结合。例如,本发明包括导致GLP1受体活化(例如,在25°C或在37°C下)的GLP1受体激动剂,如通过萤光素酶测定、例如使用本文实施例2中限定的测定形式所测量的。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂以小于10nM、小于500pM或小于250pM的EC50激活GLP1受体,如通过萤光素酶测定、例如使用本文实施例2中限定的测定形式或基本上类似的测定所测量的。

[0061] 本发明还包括在施用于有此需要的对象之后在体内降低血糖水平的GLP1受体激动剂,例如如实施例3或基本上类似的测定中所示。GLP1受体激动剂在施用之后实现增强的血糖控制,从而导致血糖水平降低。在某些实施方案中,甚至是单治疗有效剂量的本发明的GLP1受体激动剂也导致持续超过10天的显著血糖降低。

[0062] 本发明还包括显示针对通过血清蛋白酶/肽酶的降解的抗性增强的GLP1受体激动剂,如通过质谱(例如如本文实施例4中所示)或基本上类似的方法测量的。在某些实施方案中,GLP1受体激动剂抵抗通过二肽基肽酶4(DPP4)的降解持续超过4小时、超过6小时、超过12小时、超过24小时、超过48小时或超过70小时,如通过本文实施例4中所述的测定所测量的。

[0063] 本发明的GLP1受体激动剂可具有一种或更多种上述生物学特性,或其任意组合。通过回顾本公开内容(包括本文中的工作实施例),本发明蛋白质的其他生物学特性对于本领域普通技术人员将是明显的。

[0064] 治疗性施用和制剂

[0065] 本发明提供了包含本发明的GLP1受体激动剂的治疗性组合物。根据本发明的治疗性组合物与被引入制剂中以改善转移、递送、耐受等的合适载体、赋形剂和其他试剂一起施

用。大量合适的制剂可见于所有药物化学家都知道的处方集中: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括例如散剂、糊剂、软膏剂、胶冻剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子的)囊泡(例如 LIPOFECTIN<sup>TM</sup>)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(emulsion carbowax)(不同分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶剂和含有碳蜡的半固体混合物。还参见 Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0066] GLP1受体激动剂的剂量可根据待施用的对象的年龄和身高、目标疾病、状况、施用途径等而变化。当本发明的抗原结合蛋白用于治疗成年患者的疾病或病症,或用于预防这样的疾病时,有利的是通常以约0.001至约100mg/kg体重、更优选约0.001至约60、约0.01至约10、或约0.01至约1mg/kg体重的单剂量施用本发明的抗原结合蛋白。根据病症的严重程度,可调整治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,本发明的抗原结合蛋白或其抗原结合片段可以以至少约0.001mg至约100mg、约0.001至约50mg、约0.005至约50mg、约0.01至约40mg、至约30mg或至约10mg的初始剂量施用。在某些实施方案中,可在初始剂量之后施用第二或多个后续剂量的GLP1受体激动剂,其量可大致等于或小于初始剂量的量,其中后续剂量可间隔至少1天至3天;至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少7周、至少8周、至少9周、至少10周、至少12周或至少14周。

[0067] 多种递送系统是已知的,并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如,包封在脂质体、微粒、微胶囊中,能够表达突变病毒的重组细胞,受体介导的内吞作用(参见,例如, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括但不限于皮内、经皮、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和经口途径。组合物可通过任何方便的途径施用,例如通过输注或团注、通过经由上皮或黏膜皮肤衬里(例如,口腔黏膜、直肠和肠黏膜等)吸收来施用,并且可与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。药物组合物也可以在囊泡,特别是在脂质体中递送(参见,例如Langer (1990) Science 249:1527-1533)。

[0068] 本文还考虑了使用纳米粒来递送本发明的GLP1受体激动剂。蛋白质缀合的纳米粒可用于治疗和诊断应用二者。可开发纳米粒并将其与药物组合物中所含的抗原结合蛋白缀合以靶向细胞。在例如US 8257740或US 8246995中也描述了用于药物递送的纳米粒,其各自整体并入本文。

[0069] 在某些情况下,药物组合物可在控释系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵。在另一个实施方案中,可使用聚合物材料。在另一个实施方案中,可将控释系统放置在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分。

[0070] 可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内、颅内、腹膜内和肌内注射、滴注等的剂型。这些可注射制剂可通过公知的方法制备。例如,可通过例如将上述抗原结合蛋白或其盐溶解、悬浮或乳化在常规用于注射剂的无菌水性介质或油性介质中来制备可注射制剂。作为用于注射剂的水性介质,有例如生理盐水、含有葡萄糖和其他辅助剂的等张溶液等,其可与合适的增溶剂例如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50摩尔)加合物)]等组合使用。作为油性介质,使用例如芝麻油、大豆油等,其可与增溶剂(例如苯甲酸苄酯、苯甲醇等)组合使用。由此制备的注射剂优选填充在合适的安瓿中。

[0071] 本发明的药物组合物可以用标准针和注射器皮下或静脉内递送。另外,关于皮下递送,笔式递送装置容易应用于递送本发明的药物组合物。这样的笔式递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常使用包含药物组合物的可更换笔芯。一旦已经施用了在笔芯内的所有药物组合物并且笔芯是空的,则可以容易地丢弃空的笔芯并用包含药物组合物的新笔芯替换。然后可重复使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的笔芯。相反地,一次性笔式递送装置预先填充有容纳在装置内的储存器中的药物组合物。一旦储存器没有药物组合物,则丢弃整个装置。

[0072] 许多可重复使用的笔式递送装置和自动注射器式递送装置可用于皮下递送本发明的药物组合物。实例包括但当然不限于AUTOPEN<sup>TM</sup> (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC<sup>TM</sup>笔 (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25<sup>TM</sup>笔、HUMALOG<sup>TM</sup>笔、HUMALIN 70/30<sup>TM</sup>笔 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN<sup>TM</sup> I、II和III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR<sup>TM</sup> (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD<sup>TM</sup>笔 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN<sup>TM</sup>、OPTIPEN PRO<sup>TM</sup>、OPTIPEN STARLET<sup>TM</sup>和OPTICLIK<sup>TM</sup> (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) 等。可用于皮下递送本发明药物组合物的一次性笔式递送装置的实例包括但当然不限于SOLOSTAR<sup>TM</sup>笔 (Sanofi-Aventis)、FLEXPEN<sup>TM</sup> (Novo Nordisk) 和KLIK<sup>TM</sup> (Eli Lilly)、SURECLICK<sup>TM</sup>自动注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET<sup>TM</sup> (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L.P.) 和HUMIRA<sup>TM</sup>笔 (Abbott Labs, Abbott Park, IL) 等。

[0073] 有利地,将上述用于经口或肠胃外使用的药物组合物制成适合于配合一定剂量的活性成分的单位剂量的剂型。这样的单位剂量剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿剂)、栓剂等。每单位剂量剂型所含的GLP1受体激动剂的量通常为约0.001至约100mg;尤其是以注射剂形式,优选地,GLP1受体激动剂以约0.001至约100mg和以约0.01至约100mg(对于其他剂型)包含在内。

[0074] GLP1受体激动剂的治疗用途

[0075] 本发明的GLP1受体激动剂可用于治疗和/或预防与高血糖相关的疾病或紊乱或病症例如糖尿病,和/或用于改善与这样的疾病、紊乱或病症相关的至少一种症状。在一个实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可以以治疗剂量施用于患有糖尿病(例如,2型糖尿病)的患者。

[0076] 在某些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可用于治疗患有选自以下的疾病或病症的对象:糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗、高血压、血脂异常、2型糖尿病、1型糖尿病、前驱糖尿病、心血管疾病、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、冠心病、动脉硬化、外周动脉疾病、卒中、呼吸功能障碍、肾病、脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 和代谢综合征。

[0077] 在某些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可用于治疗超重或肥胖的对象和/或预防或治疗一种或更多种肥胖相关疾病,例如心脏病、卒中和糖尿病。

[0078] 在某些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可用于治疗患有糖尿病的对象和/或预防糖尿病的一种或更多种并发症,例如心脏病、卒中、肾病、视网膜病、失明和神经损伤。

[0079] 在本文中还预期预防性地将本发明的一种或更多种GLP1受体激动剂蛋白用于处

于发生糖尿病(例如2型糖尿病)风险之中的对象。处于风险之中的对象包括但不限于高龄对象、孕妇以及具有一种或更多种风险因素(包括肥胖家族史、高血胆固醇、吸烟、过量饮酒和/或缺乏运动)的对象。

[0080] 在另一个实施方案中,本发明的蛋白质用于制备药物组合物或药物,所述药物组合物或药物用于治疗患有疾病或病症例如糖尿病和肥胖的患者。在本发明的另一个实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂作为辅助治疗与本领域技术人员已知可用于治疗或改善与高血糖相关的疾病或病症例如糖尿病(例如,2型糖尿病)的任何其他药剂或任何其他治疗一起使用。

[0081] 组合治疗

[0082] 组合治疗可包含本发明的GLP1受体激动剂和可有利地与本发明的GLP1受体激动剂或与本发明的其生物活性片段组合的任何另外治疗剂。本发明的GLP1受体激动剂可与一种或更多种用于治疗与高血糖相关的任何疾病或病症(例如,糖尿病)的药物或治疗协同组合。在一些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可与第二治疗剂组合以降低对象中的血糖水平,或以改善糖尿病的一种或更多种症状。

[0083] 本发明的GLP1受体激动剂可与以下组合使用以治疗或管理糖尿病:胰岛素(胰岛素或胰岛素类似物)、胰岛素增敏剂例如双胍类(例如二甲双胍)和噻唑烷二酮类(例如罗格列酮(rosiglitazone))、胰岛素促分泌剂例如磺脲类(例如氯磺丙脲)和格列奈类(例如那格列奈)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖(acarbose))、二肽基肽酶4(DPP4)抑制剂(例如西他列汀)、普兰林肽、溴隐亭、钠葡萄糖共转运蛋白2(sodium glucose cotransporter 2, SGLT-2)抑制剂(例如卡格列净)、抗高血压药(例如血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻滞剂、利尿剂、钙通道阻滞剂、 $\alpha$ -肾上腺素受体阻滞剂、内皮素-1受体阻滞剂、有机硝酸盐类和蛋白激酶C抑制剂)、他汀类、阿司匹林、不同的GLP1受体激动剂、膳食补充剂或任何其他治疗(例如运动)。在某些实施方案中,本发明的GLP1受体激动剂可与选自以下的第二治疗剂或治疗组合施用:胰岛素、胰岛素类似物、二甲双胍、罗格列酮、吡格列酮(pioglitazone)、氯磺丙脲、格列苯脲(glibenclamide)、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide)、妥拉磺脲(tolazamide)、甲磺丁脲(tolbutamide)、那格列奈、瑞格列奈(repaglinide)、阿卡波糖、米格列醇(miglitol)、艾塞那肽(exenatide)、利拉鲁肽(liraglutide)、阿比鲁肽(albiglutide)、杜拉鲁肽(dulaglutide)、西他列汀、沙格列汀(saxagliptin)、利拉利汀(linagliptin)、阿格列汀(alogliptin)、普兰林肽、速释溴隐亭(bromocriptine quick-release)、卡格列净、达格列净(dapagliflozin)、恩格列净(empagliflozin)、饮食调整和运动。

[0084] 本文中使用的术语“与...组合”是指可在施用本发明的GLP1受体激动剂之前、同时或之后施用另外的治疗活性组分。术语“与...组合”还包括GLP1受体激动剂和第二治疗剂的先后或同时施用。

[0085] 可在施用本发明的GLP1受体激动剂之前向对象施用另外的治疗活性组分。例如,如果在第二组分的施用之前1周、之前72小时、之前60小时、之前48小时、之前36小时、之前24小时、之前12小时、之前6小时、之前5小时、之前4小时、之前3小时、之前2小时、之前1小时、之前30分钟、之前15分钟、之前10分钟、之前5分钟或之前小于1分钟施用第一组分,则可认为第一组分在第二组分“之前”施用。在另一些实施方案中,可以在施用本发明的GLP1受

体激动剂之后向对象施用另外的治疗活性组分。例如,如果在第二组分的施用之后1分钟、之后5分钟、之后10分钟、之后15分钟、之后30分钟、之后1小时、之后2小时、之后3小时、之后4小时、之后5小时、之后6小时、之后12小时、之后24小时、之后36小时、之后48小时、之后60小时、之后72小时施用第一组分,则可认为第一组分在第二组分“之后”施用。在另一些实施方案中,可以在施用本发明的GLP1受体激动剂的同时向对象施用另外的治疗活性组分。出于本发明的目的,“同时”施用包括例如将GLP1受体激动剂和另外的治疗活性组分以单一剂型施用于对象,或者以分开的剂型在彼此的约30分钟或更短时间内施用于对象。如果以分开的剂型施用,则每个剂型可通过相同的途径施用(例如,GLP1受体激动剂和另外的治疗活性组分两者都可静脉内施用,等等);或者,每个剂型可通过不同途径施用(例如,GLP1受体激动剂可静脉内施用,并且另外的治疗活性组分可经口施用)。在任何情况下,出于本公开内容的目的,以单一剂型、以通过相同途径的分开的剂型或以通过不同途径的分开的剂型施用组分全部均被认为是“同时施用”。出于本公开内容的目的,在另外的治疗活性组分的施用“之前”、“同时”或“之后”(如这些术语在上文进行定义)施用GLP1受体激动剂被认为GLP1受体激动剂与另外的治疗活性组分“组合”施用。

[0086] 本发明包括其中本发明的GLP1受体激动剂与如本文中别处所述的一种或更多种另外的治疗活性组分共配制的药物组合物。

#### [0087] 施用方案

[0088] 根据某些实施方案,可将单剂量的本发明的GLP1受体激动剂(或包含GLP1受体激动剂和本文中提及的任何另外治疗活性剂的组合的药物组合物)施用于有此需要的对象。根据本发明的某些实施方案,可以在限定的时间过程内向对象施用多个剂量的GLP1受体激动剂(或包含GLP1受体激动剂和本文中提及的任何另外治疗活性剂的组合的药物组合物)。根据本发明这个方面的方法包括向对象先后施用多个剂量的本发明的GLP1受体激动剂。本文中使用的“先后施用”是指在相隔预定间隔(例如,数小时、数天、数周或数月)的不同时点例如在不同天向对象施用GLP1受体激动剂的每个剂量。本发明包括这样的方法,其包括向患者先后施用单初始剂量的GLP1受体激动剂,然后是一个或更多个第二剂量的GLP1受体激动剂,并且任选地然后是一个或更多个第三剂量的GLP1受体激动剂。

[0089] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指施用本发明的GLP1受体激动剂的时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量可全部包含相同量的GLP1受体激动剂,但通常在施用频率上可彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程期间,初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中所含GLP1受体激动剂的量彼此不同(例如,适当地向上或向下调整)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时以“负荷剂量”施用一个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量,随后以较低频率施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0090] 在本发明的某些示例性实施方案中,每个第二和/或第三剂量在紧接之前的剂量之后1至48小时(例如,1、 $1\frac{1}{2}$ 、2、 $2\frac{1}{2}$ 、3、 $3\frac{1}{2}$ 、4、 $4\frac{1}{2}$ 、5、 $5\frac{1}{2}$ 、6、 $6\frac{1}{2}$ 、7、 $7\frac{1}{2}$ 、8、 $8\frac{1}{2}$ 、9、 $9\frac{1}{2}$ 、10、 $10\frac{1}{2}$ 、11、 $11\frac{1}{2}$ 、12、 $12\frac{1}{2}$ 、13、 $13\frac{1}{2}$ 、14、 $14\frac{1}{2}$ 、15、 $15\frac{1}{2}$ 、16、 $16\frac{1}{2}$ 、17、 $17\frac{1}{2}$ 、18、 $18\frac{1}{2}$ 、19、 $19\frac{1}{2}$ 、20、 $20\frac{1}{2}$ 、21、 $21\frac{1}{2}$ 、22、 $22\frac{1}{2}$ 、23、 $23\frac{1}{2}$ 、24、 $24\frac{1}{2}$ 、25、 $25\frac{1}{2}$ 、26、 $26\frac{1}{2}$ 或更多)施用。本文中使用的短语“紧接之前的剂量”是指在多次施用的顺序中,在没有间插剂量的情

况下在顺序中紧接着的下一剂量施用之前向患者施用的GLP1受体激动剂的剂量。在某些实施方案中,每个第二和/或第三剂量在紧接之前的剂量之后每天、每2天、3天、4天、5天、6天或7天施用。在某些实施方案中,每个第二和/或第三剂量在紧接之前的剂量之后每0.5周、1周、2周、3周或4周施用。

[0091] 根据本发明该方面的方法可包括向患者施用任意数量的第二和/或第三剂量的GLP1受体激动剂。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第二剂量。在另一些实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8个或更多个)第二剂量。同样,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第三剂量。在另一些实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8个或更多个)第三剂量。

[0092] 在本发明的某些实施方案中,向患者施用第二和/或第三剂量的频率可在治疗方案的过程中变化。也可在治疗过程中由医师在临床检查之后根据个体患者的需求来调整施用频率。

### [0093] 剂量

[0094] 根据本发明的方法施用于对象的GLP1受体激动剂的量通常是治疗有效量。本文中使用的短语“治疗有效量”是指导致以下一种或更多种情况的GLP1受体激动剂的量:(a)将高糖水平降低至正常水平(例如,餐前血糖水平为80至130mg/dL;和/或(b)一种或更多种糖尿病症状或体征具有可检测到的改善。

[0095] 在GLP1受体激动剂的情况下,治疗有效量可以是约0.001mg至约100mg,例如约0.001mg、约0.002mg、约0.003mg、约0.004mg、约0.005mg、约0.006mg、约0.007mg、约0.008mg、约0.009mg、约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg或约100mg的GLP1受体激动剂。在某些实施方案中,将0.005mg至50mg、0.005mg至30mg、0.005mg至10mg、0.1mg至10mg或0.1mg至5mg的GLP1受体激动剂施用于有此需要的对象。

[0096] 各剂量中包含的GLP1受体激动剂的量可以以数毫克抗体/千克对象体重(即mg/kg)表示。例如,可以以约0.0001至约100mg/kg对象体重的剂量将GLP1受体激动剂施用于对象。

### [0097] 选择的实施方案

[0098] 在实施方案1中,本发明提供了胰高血糖素样肽1(GLP1)变体,其包含具有至少一个氨基酸修饰的成熟GLP1(7-37)(SEQ ID NO:4),所述氨基酸修饰选自:(i)向N端添加氨基酸;以及(ii)从肽序列中缺失氨基酸;其中所述GLP1变体具有增强的针对蛋白水解切割的抗性和/或增强的降血糖能力。

[0099] 在实施方案2中,本发明提供了实施方案1所述的GLP1变体,其中所述氨基酸修饰包括向N端添加选自丙氨酸(Ala)和谷氨酰胺(Gln)的氨基酸。

[0100] 在实施方案3中,本发明提供了实施方案1或2所述的GLP1变体,其中所述氨基酸修饰包括向N端添加Gln。

[0101] 在实施方案4中,本发明提供了实施方案1所述的GLP1变体,其中所述氨基酸修饰

包括从SEQ ID NO:4中缺失组氨酸(His1)或丙氨酸(Ala2)。

[0102] 在实施方案5中,本发明提供了实施方案1至4中任一项所述的GLP1变体,其包含选自SEQ ID NO:5、6、7和8的氨基酸序列。

[0103] 在实施方案6中,本发明提供了实施方案5所述的GLP1变体,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0104] 在实施方案7中,本发明提供了融合蛋白,其包含与稳定化结构域融合的实施方案1至6中任一项所述的GLP1变体,其中所述稳定化结构域是特异性结合GLP1受体并且包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)的抗原结合蛋白或其抗原结合片段。

[0105] 在实施方案8中,本发明提供了实施方案7所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段的HCVR的N端或C端融合。

[0106] 在实施方案9中,本发明提供了实施方案7所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段的LCVR的N端或C端融合。

[0107] 在实施方案10中,本发明提供了融合蛋白,其包含与稳定化结构域融合的实施方案1至6中任一项所述的GLP1变体,其中所述稳定化结构域是免疫球蛋白(Ig)或其片段。

[0108] 在实施方案11中,本发明提供了实施方案11所述的融合蛋白,其包含选自SEQ ID NO:9、10、11、12和13的氨基酸序列。

[0109] 在实施方案12中,本发明提供了融合蛋白,其包含与稳定化结构域融合的GLP1变体,其中所述稳定化结构域是抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其片段包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)。

[0110] 在实施方案13中,本发明提供了实施方案12所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其片段的HCVR的N端或C端融合。

[0111] 在实施方案14中,本发明提供了实施方案12所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其片段的LCVR的N端或C端融合。

[0112] 在实施方案15中,本发明提供了实施方案12至14中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗原结合蛋白或其片段与GLP1受体特异性结合。

[0113] 在实施方案16中,本发明提供了实施方案12至15中任一项所述的融合蛋白,其包含上述实施方案中任一项所述的GLP1变体。

[0114] 在实施方案17中,本发明提供了实施方案12至16中任一项所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体包含选自SEQ ID NO:5、6、7和8的氨基酸序列。

[0115] 在实施方案18中,本发明提供了实施方案16或17所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0116] 在实施方案19中,本发明提供了包含GLP1变体的GLP1受体激动剂,其中所述GLP1变体与稳定化结构域融合,其中所述稳定化结构域是抗原结合蛋白或其抗原结合片段,其中所述抗原结合蛋白或其片段包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)。

[0117] 在实施方案20中,本发明提供了实施方案19所述的GLP1受体激动剂,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其片段的HCVR的N端或C端融合。

[0118] 在实施方案21中,本发明提供了实施方案19所述的GLP1受体激动剂,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其片段的LCVR的N端或C端融合。

[0119] 在实施方案22中,本发明提供了实施方案19至21中任一项所述的GLP1受体激动

剂,其中所述抗原结合蛋白或其片段与GLP1受体特异性结合。

[0120] 在实施方案23中,本发明提供了实施方案19至22中任一项所述的GLP1受体激动剂,其包含实施方案1所述的GLP1变体。

[0121] 在实施方案24中,本发明提供了实施方案19至23中任一项所述的GLP1受体激动剂,其中所述GLP1变体包含选自SEQ ID N0:5、6、7和8的氨基酸序列。

[0122] 在实施方案25中,本发明提供了实施方案23或24所述的GLP1受体激动剂,其中所述GLP1变体包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列。

[0123] 在实施方案26中,本发明提供了包含GLP1变体的GLP1受体激动剂,其中所述GLP1变体与稳定化结构域融合,其中所述稳定化结构域是免疫球蛋白(Ig)或其片段。

[0124] 在实施方案27中,本发明提供了实施方案26所述的GLP1受体激动剂,其包含选自SEQ ID N0:9、10、11、12和13的氨基酸序列。

[0125] 在实施方案28中,本发明提供了药物组合物,其包含实施方案1至27中任一项所述的蛋白质和可药用载体或稀释剂。

[0126] 在实施方案29中,本发明提供了分离的多核苷酸分子,其包含编码如实施方案1至6中任一项所述的GLP1变体的多核苷酸序列。

[0127] 在实施方案30中,本发明提供了分离的多核苷酸分子,其包含编码如实施方案10至11中任一项所述的融合蛋白的多核苷酸序列。

[0128] 在实施方案31中,本发明提供了分离的多核苷酸分子,其包含编码如实施方案26至27中任一项所述的GLP1受体激动剂的多核苷酸序列。

[0129] 在实施方案32中,本发明提供了载体,其包含实施方案29至31中任一项所述的多核苷酸序列。

[0130] 在实施方案33中,本发明提供了细胞,其表达实施方案32所述的载体。

[0131] 在实施方案34中,本发明提供了降低血糖水平的方法,其包括向有此需要的对象施用包含治疗有效量的实施方案1至27中任一项所述蛋白质的药物组合物。

[0132] 在实施方案35中,本发明提供了实施方案34所述的方法,其中所述对象患有选自以下的疾病或病症:糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗、高血压、血脂异常、2型糖尿病、1型糖尿病、前驱糖尿病、心血管疾病、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、冠心病、动脉硬化、外周动脉疾病、卒中、呼吸功能障碍、肾病、脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和代谢综合征。

[0133] 在实施方案36中,本发明提供了预防、治疗或改善2型糖尿病的至少一种症状、适应证或并发症的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用包含治疗有效量的实施方案1至27中任一项所述蛋白质的药物组合物。

[0134] 在实施方案37中,本发明提供了实施方案36所述的方法,其中所述至少一种症状、适应证或并发症选自:高血糖水平、过度口渴、多尿、尿中存在酮体、疲劳、体重波动、视力模糊、痊愈缓慢、频繁感染、牙龈肿胀或疼痛、肥胖、心脏病、卒中、肾病、眼病、神经损伤和高血压。

[0135] 在实施方案38中,本发明提供了实施方案34至37中任一项所述的方法,其中所述药物组合物与第二治疗剂或治疗组合施用。

[0136] 在实施方案39中,本发明提供了实施方案38所述的方法,其中所述第二治疗剂或治疗选自:胰岛素或胰岛素类似物、双胍类(例如,二甲双胍)、噻唑烷二酮类、磺酰脲类(例

如,氯磺丙脲)、格列奈类(例如,那格列奈)、 $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂、DPP4抑制剂(例如,西他列汀)、普兰林肽、溴隐亭、SGLT2抑制剂(例如,卡格列净)、抗高血压药、他汀类、阿司匹林、饮食调整、运动和膳食补充剂。

[0137] 在实施方案40中,本发明提供了实施方案34至39中任一项所述的方法,其中所述药物组合物皮下、静脉内、皮内、腹膜内、经口或肌内施用。

[0138] 实施例

[0139] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供完整公开内容和关于如何制备和使用本发明的方法和组合物的描述,并且不旨在限制发明人视为其发明的范围。已经尽力确保所使用的数字(例如,量、温度等)的精确度,但是应考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度以摄氏度计,室温是大约25°C,压力是或接近大气压。

[0140] 实施例1:包含GLP1的示例性融合蛋白

[0141] 由于因酶二肽基肽酶4(DPP4)而迅速失活,GLP1(7-37)具有非常短的循环半衰期(1至2分钟)。先前的研究表明,GLP1(7-37)的第8位的多种氨基酸替换使其针对DPP4的抗性更高,由此赋予更长的半衰期(Deacon et al 1998, Diabetologia 41:271-278)。然而,这些分子对DPP4切割具有残留的敏感性。因此,需要开发仍然对DPP4具有更高抗性的新分子。

[0142] 为了赋予更佳的针对DPP4的抗性,该技术的第一部分是通过向N端添加氨基酸(即,A1a、G1n)或使肽序列中的His7或A1a8缺失来引入延长或缩短GLP1的氨基端的突变,以提供更佳的针对DPP4切割的抗性。这些修饰也削弱了GLP1的活性,并且该技术的第二部分是通过使用GLP1R抗体将弱化的激动剂连接至受体来补偿降低的活性,其通过将肽与抗GLP1R抗体轻链序列的N端融合进行。作为概念验证,如下所述,将经修饰GLP1(7-37)配体序列与GLP1R抗体的轻链的N端融合。

[0143] 成熟GLP1是31-氨基酸肽激素,其包含全长GLP1(SEQ ID NO:3)的第7至37位氨基酸,并且具有氨基酸序列:HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(SEQ ID NO:4)。

[0144] 通过在氨基端的氨基酸缺失或添加对成熟GLP1进行修饰,以产生GLP1变体。示例性的GLP1变体如下给出:

[0145] • Des-A1a-GLP1,其包含氨基酸序列:

[0146] HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(SEQ ID NO:5)

[0147] • Q-GLP1,其包含氨基酸序列:

[0148] QHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(SEQ ID NO:6)

[0149] • A-GLP1,其包含氨基酸序列:

[0150] AHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(SEQ ID NO:7)

[0151] • desH-GLP1,其包含序列:AEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG(SEQ ID NO:8)

[0152] 为了补偿上述GLP1变体的可能的降低的活性,使用抗GLP1R抗体将其连接至GLP1受体(GLP1R)或使其与抗体Fc片段连接。通过使成熟GLP1或GLP1变体与包含SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:1的轻链可变区(LCVR)的抗GLP1受体抗体(以下称为“mAb1”;美国专利申请公开号20060275288[Abbott Laboratories])的轻链的N端融合产生包含成熟GLP1或GLP1变体的示例性融合蛋白,并且其如下列出:

[0153] • Des-A1a-GLP1-mAb1:与mAb1轻链的N端融合的Des-A1a-GLP1(SEQ ID NO:5)

- [0154] • Q-GLP1-mAb1:与mAb1轻链的N端融合的Q-GLP1 (SEQ ID NO:6)
- [0155] • A-GLP1-mAb1:与mAb1轻链的N端融合的A-GLP1 (SEQ ID NO:7)
- [0156] 还产生了包含成熟GLP1或GLP1变体和免疫球蛋白Fc片段的融合蛋白,并且其如下列出:
- [0157] • GLP1-hFc (SEQ ID NO:9)
  - [0158] • A-GLP1-hFc (SEQ ID NO:10)
  - [0159] • Q-GLP1-hFc (SEQ ID NO:11)
  - [0160] • Des-Ala-GLP1-hFc (SEQ ID NO:12)
  - [0161] • desH-GLP1-hFc (SEQ ID NO:13)
- [0162] 对照构建体比较物:在以下实施例中将Glaesner等2010 (Diabetes Metab. Res. Rev. 26:287-296)所公开的具有与hIgG4 Fc结构域融合的LY2189265的氨基酸序列特征的GLP1类似物(杜拉鲁肽; Eli Lilly)用作比较物 (SEQ ID NO:14)。
- [0163] 实施例2:萤光素酶测定
- [0164] 在报告细胞系293/FSC11/Cre-Luc中测试了GLP1融合蛋白刺激cAMP产生的能力,所述报告细胞系稳定地表达人GLP1受体以及在响应于cAMP的cre启动子的控制下的萤光素酶编码序列。
- [0165] 对于萤光素酶生物测定,将293/FSC11/Cre-Luc GLP1R稳定细胞在补充有0.1% FBS的OPTIMEM中以30,000细胞/孔接种到96孔测定板中,然后在5% CO<sub>2</sub>中在37°C下孵育过夜。第二天,为了确定受试蛋白的剂量响应,在测定中测试了人GLP1 (Phoenix#028-13)、des-Ala-GLP1-mAb1、Q-GLP1-mAb1或A-GLP1-mAb1。除了A-GLP1-mAb1以外的所有受试化合物均为纯化蛋白,A-GLP1-mAb1在用编码经修饰抗体的载体瞬时转染CHO细胞后直接从培养基中使用。培养基中的物质通过ELISA进行定量。将受试样品以0.02pM至100nM的浓度添加至细胞。
- [0166] 在5% CO<sub>2</sub>中在37°C下孵育5.5小时或过夜后,将OneGlo试剂 (Promega, #E6051) 添加到样品中,然后使用Victor X (Perkin Elmer) 读板器测量萤光素酶活性。用Prism 6软件 (GraphPad) 使用非线性回归(三个参数)分析结果,以获得EC<sub>50</sub>值。
- [0167] 如表1所示,对于GLP1R激活,Q修饰mAb1抗体融合物和A修饰mAb1抗体融合物显示EC50值分别为204pM和312pM。
- [0168] 表1:GLP1融合蛋白的EC50
- | GLP1融合蛋白          | EC50    |
|-------------------|---------|
| des-Ala-GLP1-mAb1 | 10nM    |
| Q-GLP1-mAb1       | 0.204nM |
| A-GLP1-mAb1       | 0.312nM |
| GLP1-hFc          | 0.147nM |
| A-GLP1-hFc        | 120nM   |
| Q-GLP1-hFc        | 135nM   |
| Des-Ala-GLP1-hFc  | 不可检出    |
| Des-H-GLP1-hFc    | 2560nM  |
| 比较物               | 0.059nM |

[0170] des-Ala-GLP1-mAb1的EC50为10nM。Q-和A-GLP1-hFc的EC50仅为135nM和120nM,而Des A-GLP1-hFc的EC50无法检测到。

[0171] 实施例3:与GLP1R抗体融合的Q-GLP1对GLP1R人源化小鼠中血糖和葡萄糖耐量的作用

[0172] 在表达人GLP1R蛋白的遗传改造小鼠(“GLP1R人源化小鼠”)中确定与抗GLP1R抗体的轻链的N端融合的Q-GLP1(Q-GLP1-mAb1)对血糖和葡萄糖耐量的作用。将31只GLP1R人源化小鼠分为四个具有7至8只动物的组。每组接受194nmol/kg的同种型对照、Q-GLP1-hFc、mAb1或Q-GLP1-mAb1的单次皮下注射。在第0、1、4、7、11、14、16、18和22天在进食条件下对小鼠取血以进行血糖测量。计算每个组在每个时间点的血糖水平的平均值±SEM,并且其示于表2中。

[0173] 表2:血糖水平

	时间 (天)	同种型对照	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
[0174] 血糖 (mg/dL)	0	188 ± 6	188 ± 5	188 ± 6	186 ± 8
	1	185 ± 3	184 ± 8	193 ± 8	133 ± 4
	4	182 ± 9	193 ± 9	180 ± 7	128 ± 5
	7	187 ± 6	199 ± 9	178 ± 7	132 ± 4
	11	180 ± 4	192 ± 6	183 ± 8	152 ± 4
	14	174 ± 6	185 ± 8	184 ± 7	145 ± 4
	16	179 ± 6	193 ± 7	183 ± 7	156 ± 4
	18	172 ± 7	184 ± 8	161 ± 7	154 ± 6
	22	174 ± 6	188 ± 7	181 ± 9	171 ± 7

[0175] 在第3天和第9天在禁食过夜之后进行口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test,oGTT),其中在推注葡萄糖管饲之后0、15、30、60和120分钟时进行血糖测量。计算每组在各时间点的血糖水平的平均值±SEM和血糖曲线下面积(AUC),并且其在表3和表4中示出。

[0176] 表3:在第3天的血糖水平和血糖AUC

	时间 (分钟)	同种型对照	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
[0177] 血糖 (mg/dL)	0	143 ± 6	147 ± 5	143 ± 8	111 ± 5
	15	242 ± 13	252 ± 19	233 ± 16	193 ± 11
	30	233 ± 9	235 ± 8	217 ± 8	160 ± 6
	60	187 ± 8	195 ± 7	200 ± 12	129 ± 4
	120	151 ± 7	160 ± 7	159 ± 10	115 ± 4
	血糖 AUC (mg/dL*120分钟)	22884 ± 594	23756 ± 681	23229 ± 959	16556 ± 386

[0178] 表4:在第9天的血糖水平和血糖AUC

	时间 (分钟)	同种型对照	Q-GLP1-hFc	mAb1	Q-GLP1-mAb1
[0179] 血糖 (mg/dL)	0	143 ± 4	151 ± 3	147 ± 5	116 ± 4
	15	281 ± 17	269 ± 15	253 ± 15	203 ± 13
	30	207 ± 5	228 ± 15	223 ± 14	167 ± 14
	60	200 ± 7	187 ± 5	207 ± 8	139 ± 10
	120	155 ± 5	173 ± 11	157 ± 6	131 ± 7
	血糖 AUC (mg/dL*120分钟)	23589 ± 610	23869 ± 795	23959 ± 696	17852 ± 920

[0180] 在血糖量正常GLP1R人源化小鼠中单次施用Q-GLP1-mAb1导致葡萄糖显著降低14

天,而Q-GLP1-hFc或mAb1不影响血糖水平(表2)。Q-GLP1-mAb1在小鼠中在第3天和第9天降低了空腹血糖水平并改善了葡萄糖耐量,而Q-GLP1-hFc和mAb1则没有。这些数据表明,单独的Q-GLP1或mAb1抗体不改变血糖控制,但是,这二者的融合分子可以发挥降糖作用,其在血糖量正常动物中在单次注射的情况下持续2周。

[0181] 实施例4:GLP1变体的稳定性

[0182] 通过将多种GLP1变体和融合蛋白与血清蛋白酶一起孵育并通过质谱分析经切割肽来测试其稳定性。

[0183] 在第一个实验中,分别将0.5 $\mu$ g的每种GLP1融合蛋白添加到50 $\mu$ L未经处理的小鼠血清中。然后将混合物在37°C下分别孵育6小时和24小时。将0分钟、6小时和24小时的1 $\mu$ L血清混合物上样到Tris-甘氨酸凝胶上。

[0184] 在第二个实验中,为了进一步区分稳定性,将2 $\mu$ g的每种GLP1融合蛋白与500ng重组人DPP4 (R&D系统) 在PBS (pH 7.4) 中于37°C下分别孵育0分钟、1小时、4小时和72小时。将上述混合物的五分之一(相当于400ng构建体)上样到Tris-甘氨酸凝胶上。

[0185] 对于每个实验,切下对应于每种构建体的分子量的凝胶部分,并进行凝胶内胰蛋白酶消化。将切下的凝胶碎片在50:50乙腈:NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50mM) 中脱色,用65mM二硫苏糖醇(Sigma)于37°C下还原30分钟,然后在室温下用135mM碘乙酰胺(Sigma)于暗处进行烷基化30分钟。随后,将蛋白质在37°C下用测序级经修饰猪胰蛋白酶(Promega)消化过夜。将肽用提取缓冲液(H<sub>2</sub>O中的50% ACN,5%甲酸)提取两次。将从每个带中提取的肽在SpeedVac中干燥至完全,并在进行nanoLC-MS/MS分析之前用0.1%的四氟乙酸(TFA)重构。

[0186] 通过在线反相(RP)纳米级毛细管液相色谱(Easy-nLC1000, Thermo Fisher Scientific)使重构的肽混合物分离,并通过电喷雾串联质谱(Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific)进行分析。将肽混合物以250nL/分钟的流速进样到内径为75 $\mu$ m的“PepMap RSLC”柱(C18, 25cm, 100 $\text{\AA}$ , 2 $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific)中,然后用在0.1%甲酸中的2%至35% ACN在60分钟梯度中洗脱。质谱仪以数据依赖性模式操作,以在MS和MS/MS采集之间自动切换。在Orbitrap中以120,000的分辨率采集测量全扫描MS谱(从m/z 350到2000)。针对以5000的目标值以35%的经归一化碰撞能量使用碰撞诱导解(collision induced dissociation, CID)在混合离子阱中片段化,先后分离出最强离子(多至十个)。将已经对于MS/MS选择的目标离子进行动态排除30秒。

[0187] 提取MS和MS/MS峰列表,并使用ProteomeDiscoverer 1.4(Thermo Fisher Scientific)针对内部蛋白质数据库进行检索。所有检索均假设采用胰蛋白酶消化,并且认为半胱氨酸的羧甲基化是固定修饰而甲硫氨酸的氧化是可变修饰。使用了10ppm的肽质量公差,0.8Da的MS/MS质量公差,并且最多1次错误切割的限额。使用Thermo Xcaliber软件(Thermo Fisher Scientific)基于提取离子色谱图(extracted ion chromatogram, XIC)计算提取离子面积。

[0188] 结果

[0189] 为了表征每种构建体对血清酶切割的敏感性,通过nanoLC-MS/MS监测每种构建体的完整肽(N端肽)、经切割肽(切割后的N端肽)和一种内部参考肽(对构建体中的任何修饰不敏感的稳定肽)。完整肽相对于参考肽的比例降低以及同时经切割肽相对于参考肽的比例提高表明随时间的酶介导的构建体切割。使用下式计算切割百分比:100 $\times$ 经切割肽面

积/(经切割肽面积+未切割肽面积)

[0190] GLP1-hFc和A-GLP1-hFc到6小时时被完全切割,而desH-GLP1-hFc到6小时时显示出明显的切割(2%)。在孵育24小时之后,Q-GLP1-hFc和比较物未显示出任何切割(表5)。

[0191] 表5:选择的GLP1受体激动剂的切割百分比

[0192]

	在6小时中的切割%	在24小时中的切割%
GLP1-hFc	100%	100%
desH-GLP1-hFc	2%	5%
Q-GLP1-hFc	0%	0%
A-GLP1-hFc	100%	100%
比较物	0%	0%

[0193] 为了进一步区分Q-GLP1-hFc和比较物的稳定性,将两种构建体与重组人DPP4混合,并且通过nanoLC-MS/MS监测任一构建体的完整肽(N端肽)、经切割肽(切割后的N端肽)和一种内部参考肽(对构建体中的任何修饰不敏感的稳定肽)。

[0194] 表6:选择的GLP1受体激动剂针对DPP4的稳定性

[0195]

	在4小时之后的切割%	在72小时之后的切割%
Q-GLP1-hFc	0%	0%
比较物	4%	41%

[0196] 比较物到4小时时显示出明显的切割(4%),并且到72小时时显示出超过40%的切割(表6)。相比之下,Q-GLP1-hFc即使在37°C下与DPP4孵育72小时之后也没有表现出任何切割。

[0197] 本发明的范围不限于本文中描述的具体实施方案。实际上,除了本文中描述的那些之外,根据前述描述,本发明的多种修改方案对于本领域技术人员也将变得明显。这样的修改方案旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0198] 本申请母案的原始权利要求作为本说明书的一部分并入此处:

[0199] 1.融合蛋白,其包含胰高血糖素样肽1(GLP1)变体,其中所述GLP1变体包含N端添加有氨基酸的成熟GLP1(7-37)(SEQ ID NO:4),其中所述融合蛋白具有增强的针对蛋白水解切割的抗性和/或增强的降血糖能力。

[0200] 2.权利要求1所述的融合蛋白,其中所述氨基酸选自丙氨酸(A1a)和谷氨酰胺(G1n)。

[0201] 3.权利要求1或2所述的融合蛋白,其中所述氨基酸包含G1n。

[0202] 4.权利要求1至3中任一项所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体包含选自SEQ ID NO:6和7的氨基酸序列。

[0203] 5.权利要求1至4中任一项所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0204] 6.权利要求1至5中任一项所述的融合蛋白,其还包含稳定化结构域,其中所述稳定化结构域是特异性结合GLP1受体并且包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)的抗原结合蛋白或其抗原结合片段。

[0205] 7.权利要求6所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段的所述HCVR的N端或C端融合。

[0206] 8. 权利要求6所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗原结合蛋白或其抗原结合片段的所述LCVR的N端或C端融合。

[0207] 9. 权利要求6至8中任一项所述的融合蛋白,其中所述稳定化结构域是抗体或其片段。

[0208] 10. 融合蛋白,其包含与稳定化结构域融合的胰高血糖素样肽1(GLP1)变体,其中:(i)所述GLP1变体包含N端添加有谷氨酰胺(Gln)的成熟GLP1(7-37) (SEQ ID N0:4);(ii)所述稳定化结构域是与GLP1受体特异性结合的抗原结合蛋白或其抗原结合片段;并且(iii)所述融合蛋白具有增强的针对蛋白水解切割的抗性和/或增强的降血糖能力。

[0209] 11. 权利要求10所述的融合蛋白,其中所述稳定化结构域是包含HCVR和LCVR的抗体或其抗原结合片段。

[0210] 12. 权利要求11所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体与所述抗体或其抗原结合片段的所述LCVR的N端融合。

[0211] 13. 权利要求10至12中任一项所述的融合蛋白,其中所述GLP1变体包含SEQ ID N0:6的氨基酸序列。

[0212] 14. 药物组合物,其包含权利要求1至13中任一项所述的融合蛋白和可药用载体或稀释剂。

[0213] 15. 分离的多核苷酸分子,其包含编码如权利要求1至13中任一项所述的融合蛋白的多核苷酸序列。

[0214] 16. 载体,其包含权利要求15所述的多核苷酸序列。

[0215] 17. 细胞,其表达权利要求16所述的载体。

[0216] 18. 降低血糖水平的方法,其包括向有此需要的对象施用包含治疗有效量的权利要求1至13中任一项所述蛋白质的药物组合物。

[0217] 19. 权利要求18所述的方法,其中所述对象患有选自以下的疾病或病症:糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗、高血压、血脂异常、2型糖尿病、1型糖尿病、前驱糖尿病、心血管疾病、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、冠心病、动脉硬化、外周动脉疾病、卒中、呼吸功能障碍、肾病、脂肪性肝病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和代谢综合征。

[0218] 20. 预防、治疗或改善2型糖尿病的至少一种症状、适应证或并发症的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用包含治疗有效量的权利要求1至13中任一项所述蛋白质的药物组合物。

[0219] 21. 权利要求20所述的方法,其中所述至少一种症状、适应证或并发症选自:高血糖水平、过度口渴、多尿、尿中存在酮体、疲劳、体重波动、视力模糊、疮愈缓慢、频繁感染、牙龈肿胀或疼痛、肥胖、心脏病、卒中、肾病、眼病、神经损伤和高血压。

[0220] 22. 权利要求18至21中任一项所述的方法,其中所述药物组合物与第二治疗剂或治疗组合施用。

[0221] 23. 权利要求22所述的方法,其中所述第二治疗剂或治疗选自:胰岛素或胰岛素类似物、二甲双胍、噻唑烷二酮类、磺酰脲类、双胍类、氯磺丙脲、格列奈类、 $\alpha$ 葡萄糖苷酶抑制剂、那格列奈、DPP4抑制剂、普兰林肽、西他列汀、溴隐亭、SGLT2抑制剂、卡格列净、抗高血压药、他汀类、阿司匹林、饮食调整、运动和膳食补充剂。

[0222] 24. 权利要求18至23中任一项所述的方法,其中所述药物组合物皮下、静脉内、皮

内、腹膜内、经口或肌内施用。