



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103897066 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201410138746. 9 *A61K 47/48* (2006. 01)
(22) 申请日 2005. 02. 11 *A61P 9/12* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 3/06* (2006. 01)
60/543407 2004. 02. 11 US *A61P 9/00* (2006. 01)
(62) 分案原申请数据 *A61P 3/04* (2006. 01)
200580012009. 3 2005. 02. 11 *A61P 3/10* (2006. 01)
(71) 申请人 安米林药品有限责任公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 美商阿斯特捷利康有限责任公司
(72) 发明人 O. E. 莱维 M. R. 汉利 C. M. 乔德卡
D. Y. 路易斯 C. J. 索尔雷斯
S. S. 高希 L. J. 德索扎
D. G. 帕克斯 C. M. 麦克
(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公
司 72001
代理人 林毅斌 万雪松
(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006. 01)
A61K 38/26 (2006. 01)
A61K 38/22 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书61页 附图5页

(54) 发明名称

具有可选择特性的杂合多肽

(57) 摘要

本发明大体涉及用作代谢疾病和障碍治疗和预防物的新型可选择杂合多肽,所述代谢疾病和障碍可通过控制血糖水平、胰岛素水平和/或胰岛素分泌减轻,例如糖尿病和糖尿病相关疾病。这样的疾病和障碍包括但不限于高血压、血脂异常、心血管疾病、摄食障碍、胰岛素抵抗、肥胖和任何种类的糖尿病,包括1型、2型和妊娠期糖尿病。

1. 一种具有至少一种激素活性的杂合多肽,所述杂合多肽包含与肽 YY (PYY)、PYY 类似物、PYY 衍生物或其片段共价连接的胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、GLP-1 类似物、GLP-1 衍生物或其片段。

2. 权利要求 1 的杂合多肽,其中 GLP-1、GLP-1 类似物或其片段具有至少一种激素活性,或者 PYY、PYY 类似物或其片段具有至少一种激素活性。

3. 权利要求 1 的杂合多肽,其中 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 衍生物或其片段具有至少一种激素活性,或者 PYY、PYY 类似物、PYY 衍生物或其片段具有至少一种激素活性。

4. 权利要求 3 的杂合多肽,其中显示至少一种激素活性的 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 衍生物或其片段位于杂合多肽的 N- 端部分。

5. 权利要求 1 的杂合多肽,其中杂合多肽的 N- 末端酰胺化。

6. 权利要求 1 的杂合多肽,其中 PYY、PYY 类似物、PYY 衍生物或其片段位于杂合多肽的 C- 端部分。

7. 权利要求 6 的杂合多肽,其中杂合多肽的 C- 末端酰胺化。

8. 权利要求 1 的杂合多肽,其中 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 衍生物或其片段的 C- 末端直接连接至 PYY、PYY 类似物、PYY 衍生物或其片段的 N- 末端,以形成共价连接。

9. 权利要求 1 的杂合多肽,其中 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 衍生物或其片段与 PYY、PYY 类似物、PYY 衍生物或其片段使用一个或多个独立选自以下的连接基团共价连接: 烷基、二羧酸 PEG、氨基酸、聚氨基酸、双功能接头、氨基己酰基 (Aca)、 β - 丙氨酰、8- 氨基-3, 6- 二氧杂辛酰基和 Gly-Lys-Arg (GKR)。

10. 权利要求 1 的杂合多肽,其包含具有至少一种激素活性的 PYY 类似物、PYY 衍生物或其片段。

11. 权利要求 10 的杂合多肽,其中 PYY 类似物或其片段选自:PYY(1-35)、PYY(1-30)、PYY(1-25)、PYY(1-15)、PYY(1-10)、PYY(2-36)、PYY(3-36)、PYY(4-36)、PYY(5-36)、PYY(18-36)、PYY(22-36)、PYY(25-36)、³Leu-PYY、³Val-PYY、⁴Arg-PYY、⁴Gln-PYY、⁴Asn-PYY、²⁵Lys-PYY、³⁴Pro-PYY、³⁴His-PYY、^{1, 36}Tyr-PYY、¹³Pro¹⁴Ala-PYY、³¹Leu³⁴Pro-PYY、和脱-AA-4-PYY。

12. 权利要求 1 的杂合多肽,其中 GLP-1 类似物或其片段具有至少一种 GLP-1 激素活性,并且与 GLP-1 具有至少 50% 氨基酸序列同一性。

13. 权利要求 12 的杂合多肽,其中 GLP-1 类似物或其片段具有至少一种 GLP-1 激素活性,并且与 GLP-1 具有至少 80% 氨基酸序列同一性。

14. 药物组合物,包含权利要求 1-13 中任一项的杂合多肽和药物可接受的载体。

15. 权利要求 1-13 中任一项的杂合多肽在制备用于治疗或预防有需要的患者中代谢疾病或障碍的药物中的用途。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述药物用于治疗高血压、血脂异常、心血管疾病、摄食障碍、胰岛素抵抗、肥胖、1 型糖尿病、2 型糖尿病和妊娠期糖尿病。

17. 权利要求 1 的杂合多肽,其为基本上如说明书实施例且连同或不连同附图所述的杂合多肽。

18. 权利要求 14 的药物组合物,其为基本上如说明书实施例且连同或不连同附图所述的药物组合物。

-
19. 权利要求 15 的用途,其为基本上如说明书实施例且连同或不连同附图所述的用途。
 20. 说明书中描述或要求保护的任何发明。

具有可选择特性的杂合多肽

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 2 月 11 日,申请号为 201110061194.2,发明名称为“具有可选择特性的杂合多肽”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2004 年 2 月 11 日提交的美国临时申请第 60/543,407 号的优先权,该临时申请通过引用整体结合到本文中。

发明领域

[0004] 本发明涉及肽化学,更具体地说涉及具有可选择特性的杂合多肽。

[0005] 发明背景

[0006] 许多代谢疾病和障碍的核心是胰岛素水平和血糖水平的调节。胰岛素分泌部分受肠内分泌细胞产生的、称为肠降血糖素的促分泌素激素调节。肠降血糖素激素胰高血糖素样肽-1 (“GLP-1”) 是肠细胞分泌的肽激素,其已在多个研究中显示出产生增强胰岛素分泌的作用。GLP-1 由胰高血糖素原在消化道中加工而来,增强营养物诱导的胰岛素释放 (Krcymann B 等, Lancet, 2 :1300-1303(1987))。已知各种截短形式的 GLP-1 刺激胰岛素分泌 (促胰岛素作用) 和 cAMP 形成 [参见例如 Mojsov, S., Int. J. Pep. Pro. Res., 40 : 333-343(1992)]。业已确立了各种体外实验室实验和哺乳动物 (尤其是人) 对外源给予 GLP-1、GLP-1 (7-36) 酰胺和 GLP-1 (7-37) 酸的促胰岛素反应之间的关系 (参见例如 Nauck, M. A. 等, Diabetologia, 36 :741-744(1993) ;Gutniak, M. 等, New Eng. J. of Med., 326(20) : 1316-1322(1992) ;Nauck, M. A. 等, J. Clin. Invest., 91 :301-307(1993) ; 和 Thorens, B. 等, Diabetes, 42 :1219-1225(1993))。

[0007] GLP-1 (7-36) 酰胺通过在生理浓度刺激胰岛素敏感性和增强葡萄糖诱导的胰岛素释放,在胰岛素依赖性糖尿病患者中发挥着显著的抗糖尿病发生作用 (Gutniak M. 等, New Eng J. Med., 326 :1316-1322(1992))。当给予非胰岛素依赖性糖尿病患者 GLP-1 (7-36) 酰胺时,其刺激胰岛素释放、降低胰高血糖素分泌、抑制胃排空和增强葡萄糖利用 (Nauck, 1993 ;Gutniak, 1992 ;Nauck, 1993)。但是, GLP-1 型分子用于长效治疗糖尿病已复杂化,因为这种肽的血清半衰期相当短。

[0008] 更具体地说, GLP-1 是一种源自胰高血糖素原 (160 个氨基酸的激素原) 的 30 个氨基酸的肽。在胰腺和肠中的不同激素原转化酶作用导致产生胰高血糖素和其它不明肽,而胰高血糖素原切割导致产生 GLP-1 和 GLP-2 以及两种其它肽。GLP-1 氨基酸序列在迄今为止研究的所有哺乳动物中都 100% 同源,意味其关键生理作用。GLP-1 (7-37) 酸被 C-端截短和酰胺化,形成 GLP-1 (7-36)NH₂。游离酸 GLP-1 (7-37)OH 和酰胺 GLP-1 (7-36)NH₂ 的生物学作用和代谢更新难以区分。依照惯例,氨基酸编号基于从胰高血糖素原加工得到的 GLP-1 (1-37)OH。生物学活性 GLP-1 是 GLP-1 (7-36)NH₂ 进一步加工的结果。因此, GLP-1 (7-37)OH 或 GLP-1 (7-36)NH₂ 的第一个氨基酸是 ⁷His。

[0009] 在胃肠道中, GLP-1 由肠、结肠和直肠粘膜的 L 细胞在腔内葡萄糖刺激作用下产生。活性 GLP-1 的血浆半衰期 < 5 分钟,其代谢清除率在 12-13 分钟左右 (Holst, 1994)。参

与 GLP-1 代谢的主要蛋白酶是二肽基肽酶 (DPP) IV (CD26), 其切割 N-端 His-Ala 二肽, 因此产生代谢物 GLP-1 (9-37) OH 或 GLP-1 (9-36) NH₂, 这些代谢物被以不同的名称描述为 GLP-1 受体的失活、弱激动剂或拮抗剂。GLP-1 受体 (GLP-1R) 是 463 个氨基酸的 G 蛋白偶联受体, 位于胰腺 β 细胞中、肺中, 以及较低程度地位于脑、脂肪组织和肾脏中。以 GLP-1 (7-37) OH 或 GLP-1 (7-36) NH₂ 刺激 GLP-1R 导致腺苷酸环化酶活化、cAMP 合成、膜去极化、胞内钙升高和葡萄糖诱导的胰岛素分泌增加 (Holz 等, 1995)。

[0010] GLP-1 是在食物摄取作用下由肠粘膜分泌的有效胰岛素促分泌素。GLP-1R 敲除小鼠为葡萄糖不耐受的事实着重说明了 GLP-1 的意義重大的肠降血糖素作用。静脉输注 GLP-1 的肠降血糖素反应在糖尿病受试者中得以保持, 尽管在这些患者中对口服葡萄糖没有肠降血糖素反应。通过输注或皮下注射给予 GLP-1 控制糖尿病患者的禁食葡萄糖水平, 并保持胰岛素分泌的葡萄糖域值 (Gutniak 等, 1992; Nauck 等, 1986; Nauck 等, 1993)。GLP-1 已显示出作为治疗剂的极大潜力, 其能够以生理方式增强胰岛素分泌, 同时避免磺酰脲药物相关的低血糖。

[0011] GLP-1 对葡萄糖稳态的其它重要作用是抑制胰高血糖素分泌和抑制胃动力。GLP-1 对胰腺 α 细胞分泌胰高血糖素的抑制作用通过降低糖原异生和糖原分解, 导致肝脏葡萄糖产量下降。GLP-1 的这种抗胰高血糖素作用在糖尿病患者中被保持。

[0012] 利用迷走神经传出受体或通过直接作用于肠平滑肌, 实现其中胃动力和胃分泌被抑制的所谓 GLP-1 回肠制动作用。GLP-1 降低胃酸分泌有助于营养物利用度的迟滞期, 因此避免了对快速胰岛素响应的需要。总之, GLP-1 的胃肠作用明显有助于延迟葡萄糖和脂肪酸吸收, 并调节胰岛素分泌和葡萄糖稳态。

[0013] 还已经表明, GLP-1 诱导 β 细胞特异性基因, 例如 GLUT-1 转运蛋白、胰岛素 (利用 PDX-1 与胰岛素基因启动子的相互作用) 和己糖激酶 -1。因此, 据啮齿动物实验证实, GLP-1 可潜在地逆转一般与衰老相关的葡萄糖不耐受。另外, GLP-1 除了在 β 细胞机能不全之际恢复 β 细胞功能之外, 还可能有助于 β 细胞再生和增加 β 细胞量。

[0014] GLP-1 的中枢作用包括增加饱感, 并伴有利用下丘脑 GLP-1R 作用实现的食物摄取下降。在 II 型糖尿病受试者中 48 小时持续皮下灌输 GLP-1 降低了饥饿感和食物摄取, 增加了饱感。这些食欲减退作用在 GLP-1R 敲除小鼠中不存在。

[0015] Exendin 是另一个涉及胰岛素分泌的肽家族。Exendin 存在于希拉毒蜥 (Gila-monster) (亚利桑那州的一种内生蜥蜴) 和墨西哥串珠蜥 (Mexican Beaded Lizard) 的唾液中。Exendin-3 存在于墨西哥串珠蜥 (*Heloderma horridum*) 唾液中, Exendin-4 存在于希拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 唾液中 (Eng, J. 等, *J Biol. Chem.*, 265 : 20259-62, 1990; Eng, J. 等, *J. Biol. Chem.*, 267 : 7402-05 (1992))。Exendin 与胰高血糖素样肽家族的几个成员具有某些序列相似性, 与 GLP-1 具有 53% 的最高同源性 (Goke 等., *J. Biol. Chem.*, 268 : 19650-55 (1993))。

[0016] Exendin-4 结合胰岛素分泌性 TC1 细胞上、豚鼠胰腺的分散性腺泡细胞处和胃壁细胞处的 GLP-1 受体; 该肽还在离体胃中刺激促生长素抑制素释放和抑制胃泌素释放 (Goke 等, *J. Biol. Chem.*, 268 : 19650-55 (1993); Schepp 等, *Eur. J. Pharmacol.*, 69 : 183-91 (1994); Eissele 等, *Life Sci.*, 55 : 629-34 (1994))。已发现 Exendin-3 和 Exendin-4 结合胰腺腺泡细胞上的 GLP-1 受体、刺激胰腺腺泡细胞中的 cAMP 产生和胰腺腺泡细胞的淀

粉酶释放 (Malhotra, R 等, *Regulatory Peptides*, 41 :149-56 (1992) ;Raufman 等., *J. Biol. Chem.*, 267 :21432-37 (1992) ;Singh 等., *Regul. Pept.*, 53 :47-59 (1994))。业已计划使用 Exendin-3 和 Exendin-4 的促胰岛素活性治疗糖尿病和预防高血糖症 (Eng, 美国专利第 5, 424, 286 号)。

[0017] 业已报导截短的 Exendin 肽 (例如羧基酰胺化分子 Exendin[9-39] 和 9-39 到 3-39 的片段) 为 GLP-1 的有效的选择性拮抗剂 (Goke 等, *J. Biol. Chem.*, 268 :19650-55 (1993) ; Raufman, J. P. 等, *J. Biol. Chem.*, 266 :2897-902 (1991) ;Schepp, W. 等, *Eur. J. Pharm.*, 269 :183-91 (1994) ;Montrose-Rafizadeh 等, *Diabetes*, 45 (附 录 2) :152A (1996))。Exendin[9-39] 在体内阻断内源 GLP-1, 导致降低胰岛素分泌 (Wang 等, *J. Clin. Invest.*, 95 :417-21 (1995) ;D' Alessio 等, *J. Clin. Invest.*, 97 :133-38 (1996))。已由大鼠胰腺胰岛细胞克隆了显然负责 GLP-1 的促胰岛素作用的受体 (Thorens, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :8641-8645 (1992))。Exendin 和 Exendin[9-39] 结合克隆的 GLP-1 受体 (大鼠胰腺细胞 GLP-1 受体 :Fehmann HC 等, *Peptides*, 15 (3) :453-6 (1994) ;人 GLP-1 受体 :Thorens B 等, *Diabetes*, 42 (11) :1678-82 (1993))。在用克隆的 GLP-1 受体转染的细胞中, Exendin-4 是激动剂, 即其增加 CAMP, 而 Exendin[9-39] 是拮抗剂, 即其封闭 Exendin-4 和 GLP-1 的刺激作用。出处同上。

[0018] 更具体地说, Exendin-4 是发现于希拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*) 唾液中的 39 个氨基酸的 C 端酰胺化肽, 与 GLP-1 肽序列的氨基酸序列同源为 53%。参见例如 Eng, J. 等, "Isolation and Characterization of Exendin-4, and Exendin-3 Analogue from *Heloderma suspectum* Venom," *J. Bio. Chem.*, 267 :11, 7402-7405 页 (1992), Young, A. A. 等, "Glucose-Lowering and Insulin-Sensitizing Actions of Exendin-4," *Diabetes*, 48 卷, 1026-1034 页, 1999 年 5 月。按照其活性, Exendin-4 是 GLP-1 受体的高度特异性激动剂, 同 GLP-1 一样, 其能够刺激胰岛素分泌。因此, 同 GLP-1 一样, Exendin-4 被看作是促胰岛素肽。

[0019] 但是, 与 GLP-1 不同, Exendin-4 在人中具有相对较长的半衰期, 因为其抵抗在体内快速降解 GLP-1 序列的二肽基肽酶 IV。而且, 已经表明, 和 GLP-1 相比, Exendin-4 具有较强的刺激胰岛素分泌的能力, 可使用较低浓度的 Exendin-4 来获得这样的刺激活性。参见例如美国专利第 5, 424, 286 号, 该专利通过引用结合到本文中。因此, 对于治疗涉及胰岛素水平失调的病症 (例如糖尿病之类的病症), Exendin-4 肽或其衍生物 (例如, 参见例如美国专利第 6, 528, 486 号 (该专利通过引用结合到本文中) 及其对应的国际申请 W001/04156 描述的那些衍生物) 具有比胰岛素或 GLP-1 高的潜在有用性。

[0020] 涉及代谢疾病和障碍的另一个肽激素家族是肽激素的胰淀素 (amylin) 家族, 包括胰淀素、降钙素、降钙素基因相关肽、肾上腺髓质素和垂体中间叶激素 (也称为 "AFP-6")。胰淀素是一种 37 个氨基酸的蛋白激素。其被分离、纯化, 并化学表征为人 2 型糖尿病胰腺胰岛中淀粉样沉积物的主要组分 (Cooper 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84 : 8628-8632 (1987))。胰淀素分子具有两种翻译后修饰 :C 端酰胺化, 以及 2 位和 7 位的半胱氨酸交联形成 N-端环。人胰淀素基因可读框序列表明, 在 N 端 Lys 密码子之前存在 Lys-Arg 双碱性氨基酸蛋白水解切割信号, 以及在 CLAIMS 末端位处的 Lys-Arg 蛋白水解信号之前存在 Gly, 这是蛋白酰胺化酶 PAM 酰胺化的典型序列 (Cooper 等, *Biochem. Biophys. Acta*,

1014 :247-258(1989))。

[0021] 一般认为,胰淀素调节胃排空,抑制胰高血糖素分泌和食物摄取,因此调节循环中的葡萄糖生成速率。其似乎补充胰岛素作用,胰岛素调节循环中的葡萄糖清除速率及外周组织对葡萄糖的吸收。这些作用得到在啮齿动物和人中的实验结果的支持,实验结果表明胰淀素以至少三种独立机制补充胰岛素在餐后葡萄糖控制中的作用,所有这些作用都影响葡萄糖生成速率。首先,胰淀素抑制餐后胰高血糖素分泌。和健康成人相比,1型糖尿病患者不具有循环胰淀素,2型糖尿病患者餐后胰淀素浓度降低。而且,输注结合循环胰淀素的胰淀素特异性单克隆抗体又导致胰高血糖素浓度相对于对照极大提升。这两个结果都指出了内源胰淀素在餐后胰高血糖素分泌调节中的生理作用。其次,胰淀素减慢胃肠动力和胃排空。最后,下丘脑内注射大鼠胰淀素显示出降低大鼠取食,改变下丘脑中的神经递质代谢。在某些研究中,在下丘脑内注射大鼠胰淀素和大鼠CGRP后,在长达8小时内,食物摄取显著降低。在人体实验中,胰淀素类似物普兰林肽已表现出减轻体重或体重的增加。胰淀素可能有益于治疗代谢病症,例如糖尿病和肥胖。胰淀素还可用于治疗疼痛、骨疾病、胃炎,用于调节脂质(具体地说是甘油三酯),或用于影响机体组成,例如脂肪优先减少和节余瘦组织。

[0022] 激素降钙素(CT)因其在诱导的高血钙下分泌及其快速的降低血钙作用而得名。其在以前已命名为C细胞的甲状腺神经内分泌细胞中产生,并由该细胞分泌。研究得最多的CT(1-32)作用是其对破骨细胞的作用。CT的体外作用包括皱褶缘快速消失和溶菌酶释放下降。最后,CT对破骨细胞功能的抑制导致骨再吸收下降。但是,甲状腺切除术情况下的血清CT慢性减少和髓质性甲状腺癌中存在的血清CT增加,看起来均与血钙或骨质的变化无关。因此,最有可能的是,CT(1-32)的主要功能是在紧急情况下对抗急性血钙过多和/或在“钙应激”期(例如生长期、妊娠期和哺乳期)保护骨骼。(综述于Becker, JCEM, 89(4): 1512-1525(2004)和Sexton, Current Medicinal Chemistry 6:1067-1093(1999))。与此相一致的是近期由同时去除了降钙素和CGRP-I肽的降钙素基因敲除小鼠获得的数据,数据揭示小鼠具有正常水平的基础钙相关值,但血钙反应增加(Kurihara H等, Hypertens Res. 2003年2月;26附录:S105-8)。

[0023] CT对血浆钙水平有作用,抑制破骨细胞功能,广泛用于治疗骨质疏松。从治疗上讲,鲑鱼CT(sCT)似乎增加骨密度,降低骨折率,副作用最小。在过去的25年中,CT还已成功地用于治疗骨Paget病,骨Paget病是一种慢性骨骼疾病,可导致一个或多个骨骼区域中的骨变大或变形。CT还由于其对在骨质疏松过程中经历的骨痛的止痛作用而被广泛使用,尽管还不清楚了解这种作用的机制。

[0024] 降钙素基因相关肽(CGRP)是一种其受体广泛分布于体内(包括神经系统和心血管系统)的神经肽。这种肽似乎调节感觉神经递质,是迄今为止发现的最有效的内源性血管舒张肽之一。已报道的CGRP生物学作用包括:调节炎症中P物质、调节神经肌肉接头处的烟碱受体活性、刺激胰酶分泌、减少胃酸分泌、外围血管舒张、心跳加速、神经调节、调节钙代谢、调节成骨刺激、调节胰岛素分泌、增加体温和降低食物摄取。(Wimalawansa, Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin and ADM: a peptide superfamily. Crit Rev Neurobiol. 1997;11(2-3):167-239)。CGRP的一个重要作用是利用其有效的血管舒张作用控制血液流向各个器官,以静脉给予 α -CGRP后平均动脉压下降为证。血管舒张作

用还得到纯合 CGRP 敲除小鼠新近分析的支持,该分析表明增加周围交感活性引起外周血管阻力提高和高血压 (Kurihara H 等, Targeted disruption of ADM and α CGRP genes reveals their distinct biological roles. Hypertens Res. 2003 年 2 月 ;26 附录 :S105-8)。因此,除了其它作用以外, CGRP 似乎还激发血管舒张作用、降血压作用和增加心率。

[0025] 对充血性心力衰竭患者持续输注 CGRP 已表现出对血液动力学功能的持续有益作用,没有副作用,提示 CGRP 可用于心力衰竭。CGRP 应用的其它适应症包括肾衰竭、急性和慢性冠状动脉缺血、治疗心率失常、其它外周血管疾病,例如 Raynaud 现象、蛛网膜下腔出血、高血压和肺高压。还潜在地可治疗妊娠和早产的子痫前毒血症。(Wimalawansa, 1997)。近期的治疗应用包括使用 CGRP 拮抗剂治疗偏头痛。

[0026] 肾上腺髓质素 (ADM) 几乎遍在表达,含该肽的组织比不含该肽的组织多得多。ADM 的公开综述 (Hinson, J. P. 等, Endocrine Reviews (2000) 21 (2) :138-167) 详述了其对心血管系统、细胞生长、中枢神经系统和内分泌系统的作用,生物学作用的范围包括血管舒张、细胞生长、调节激素分泌和尿钠排泄。在大鼠、猫、绵羊和人中的研究证实,静脉输注 ADM 产生有效和持续的低血压,和 CGRP 的作用相当。但是, ADM 在麻醉大鼠中对平均动脉压的降血压作用未受到 CGRP 拮抗剂 CGRP₈₋₃₇ 的抑制,这提示该作用不经 CGRP 受体介导。在麻醉、清醒或高血压大鼠中急性或慢性给予人 ADM 导致总外周阻力显著降低,并伴有血压下降,同时伴有心律、心输出量和每搏输出量升高。

[0027] ADM 还被提议作为胚胎发生和分化的重要因子以及作为大鼠内皮细胞的凋亡存活因子。这得到最近的小鼠 ADM 敲除研究的支持,其中 ADM 基因缺失的纯合型小鼠在胚胎发生过程中表现出缺陷性血管形成,因此在妊娠中期死亡。有报道指 ADM^{+/+} 杂合型小鼠具有高血压以及对组织损伤敏感 (Kurihara H 等, Hypertens Res. 2003 年 2 月 ;26 附录 :S105-8)。

[0028] ADM 影响诸如垂体、肾上腺、生殖器官和胰脏之类的内分泌器官。该肽似乎具有抑制垂体释放 ACTH 的作用。在肾上腺中,该肽似乎影响大鼠和人二者中的肾上腺皮质分泌活性,增加肾上腺血流,在完整大鼠的肾上腺血管床中起血管舒张剂的作用。业已表明, ADM 存在于整个雌性生殖道中,血浆水平在正常妊娠期中升高。在先兆子痫大鼠模型中的研究表明,在晚期妊娠过程中给予大鼠时, ADM 可逆转高血压,降低幼畜死亡率。因为 ADM 在先兆子痫模型的早期妊娠动物或未妊娠大鼠中不具有相似的作用,所以这提示 ADM 可能在子宫-胎盘心血管系统中起重要调节作用。在胰腺中, ADM 最有可能起抑制作用,因为其减弱和延迟了对口服葡萄糖的胰岛素应答,导致首先升高葡萄糖水平。ADM 还可影响肾脏功能。外周大剂量给予可显著降低平均动脉压,提升肾脏血流、肾小球滤过率和尿流。在某些情况下, Na⁺ 排泄也增加。

[0029] ADM 还对骨和肺具有其它外部影响。对于骨,研究支持在心血管系统和体液稳态之外的作用,表明 ADM 作用于幼年和成年啮齿动物成骨细胞,以将细胞生长增加至和已知成骨细胞生长因子 (例如转化生长因子- β) 的作用相当的程度。这在临床上很重要,因为在骨质疏松研究中的一个重要挑战是开发一种利用成骨细胞刺激增加骨质的疗法。在肺中, ADM 不仅引起肺部血管舒张,而且抑制组胺或乙酰胆碱诱导的支气管收缩。最近在大鼠模型中使用雾化 ADM 治疗肺高血压的研究表明,吸入治疗这种病症是有效的,由以下事实为证:用 ADM 治疗的大鼠中平均肺动脉压和总肺阻力比给予盐水的大鼠显著下降。此

结果在没有改变全身动脉压或心律的情况下获得 (Nagaya N 等, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 ;285 :H2125-31)。

[0030] 业已表明,在健康志愿者中,静脉输注 ADM 降低动脉压和刺激心律、心输出量,刺激 cAMP、促乳素、去甲肾上腺素和凝乳酶的血浆水平。在这些患者中,观察到尿量或钠排泄几乎没有或没有增加。在心力衰竭或慢性肾衰竭患者中,静脉输注 ADM 的作用与在正常受试者中观察到的作用相似,还根据给予剂量诱发多尿和尿钠排泄 (Nicholls, MG 等, *Peptides*. 2001 ;22 :1745-1752)。还已经表明,实验性 ADM 治疗对动脉和肺高血压、脓毒性休克和缺血 / 再灌注损伤有益 (Beltowski J., Poi *J Pharmacol*. 2004 ;56 :5-27)。ADM 治疗的其它适应症包括:外周血管病、蛛网膜下腔出血、高血压、妊娠和早产的子痫前毒血症和骨质疏松。

[0031] AFP-6 (即垂体中间叶激素)主要在垂体和胃肠道中表达。还没有报道 AFP-6 的特异性受体;但结合研究指出,AFP-6 结合胰淀素家族所有已知的受体。已经表明,AFP-6 在表达内源 CGRP 受体的 SK-N-MC 和 L6 细胞中增加 cAMP 产量,并在这些细胞中与标记的 CGRP 竞争结合其受体。在公开的体内研究中,给予 AFP-6 最有可能通过与 CRLR/RAMP 受体相互作用而导致正常和自发性高血压大鼠二者中的血压降低。在小鼠中体内给予导致胃排空和食物摄取受抑制。(Roh 等, *J Biol Chem*. 2004 年 2 月,20 ;279 (8) :7264-74)。

[0032] 业已报道,一般借助于结合两个密切相关的 II 型 G 蛋白偶联受体 (GPCR) - 降钙素受体 (CTR) 和降钙素受体样受体 (CRLR),介导胰淀素家族肽激素的生物学作用。克隆和功能研究表明,CGRP、ADM 和胰淀素与不同组合的 CTR 或 CRLR 和受体活性修饰蛋白 (RAMP) 相互作用。许多细胞表达多种 RAMP。一般认为,RAMP 和 CTR 或 CRLR 的共表达是产生降钙素、CGRP、ADM 和胰淀素的功能受体所必需的。RAMP 家族包含 3 个成员 (RAMP-1、-2 和 -3),其共有的序列同一性低于 30%,但具有共同的拓扑组织。CRLR 和 RAMP1 共表达导致形成 CGRP 受体。CRLR 和 RAMP2 共表达导致形成 ADM 受体。CRLR 和 RAMP3 共表达导致形成 ADM 和 CGRP 受体。hCTR2 和 RAMP1 共表达导致形成胰淀素和 CGRP 受体。hCTR2 和 RAMP3 共表达导致形成胰淀素受体。

[0033] 再另一个涉及代谢疾病和障碍的肽激素家族是瘦蛋白家族。成熟形式的循环瘦蛋白是一种 146 个氨基酸的蛋白,一般被血脑屏障 (BBB) 和血 -CSF 屏障排斥在 CNS 之外。参见例如 Weigle 等,1995. *J Clin Invest* 96 :2065-2070。瘦蛋白在调节食物摄取和体重的负反馈回路中是传入信号。瘦蛋白受体是细胞因子受体家族的一员。瘦蛋白的食欲减退作用取决于与该受体的 Ob-Rb 同种型同二聚体的结合,其中所述受体编码含几个蛋白 - 蛋白相互作用基序的长胞质内结构域。Ob-Rb 在下丘脑中高度表达,这提示该脑区域是瘦蛋白作用的重要部位。业已表明,小鼠 ob 基因突变引起具有病理生理表现的综合症,其包括:肥胖、机体脂肪沉积增加、高血糖、高胰岛素血症、体温过低,以及雄性和雌性纯合 ob/ob 肥胖小鼠中的甲状腺和生殖功能均受损 (参见例如 Ingalis 等,1990. *J Hered* 41 :317-318)。瘦蛋白或瘦蛋白受体的治疗用途包括:(i) 糖尿病 (参见例如 PCT 专利申请 W098/55139、W098/12224 和 W097/02004);(ii) 红细胞生成作用 (参见例如 PCT 专利申请 W097/27286 和 W098/18486);(iii) 不育 (参见例如 PCT 专利申请 W097/15322 和 W098/36763);和 (iv) 肿瘤抑制 (参见例如专利申请 W098/48831),这些专利申请每个均通过引用整体结合到本文中。

[0034] 瘦蛋白受体 (OB-R) 基因 (GenBank 登录号 AF098792) 已被克隆, 并基因定位至 db 基因座 (参见例如 Tartaglia 等, 1995. *Cell* 83 :1263-1271)。还已经鉴别了由可变剪接产生的若干 OB-R 转录物。OB-R 缺陷在与 ob/ob 小鼠表型相同的突变糖尿病 ob/ob 小鼠中产生综合症 (参见例如 Ghilardi 等, 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 :6231-6235)。但是, 与 ob/ob 小鼠相反, 将重组瘦蛋白给予 C57BLKS/J-m ob/ob 小鼠未导致食物摄取和体重下降 (参见例如 Roberts 和 Greengerg, 1996. *Nutrition Rev.* 54 :41-49)。

[0035] 大部分能够由给予重组瘦蛋白、瘦蛋白片段和 / 或瘦蛋白受体变体报告体重下降活性的瘦蛋白相关研究都将所述构建物直接给予入脑中。参见例如 Weigle 等, 1995. *J Clin Invest* 96 :2065-2070 ;Barash 等, 1996. *Endocrinology* 137 :3144-3147。

[0036] 其它研究显示显著的体重下降活性, 原因是通过腹膜内 (i. p.) 给予测试者给予瘦蛋白肽。参见 Grasso 等, 1997. *Endocrinology* 138 :1413-1418。此外, 业已报道, 瘦蛋白片段, 最具体地说是含取自全长人瘦蛋白残基的 18 个氨基酸的片段, 起体重下降的作用, 但仅在通过植入套管直接给予大鼠侧脑室时。参见例如 PCT 专利申请 W097/46585, 其通过引用整体结合到本文中。

[0037] 另一个涉及代谢疾病和障碍的肽激素是胆囊收缩素 (CCK)。据报道, CCK 由于其刺激胆囊收缩的能力而在 1928 年由肠提取物制品中鉴别出来。之后报道了 CCK 的其它生物学作用, 包括刺激胰腺分泌、延迟胃排空、刺激肠活动和刺激胰岛素分泌。参见 Lieveverse 等, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 713 :268-272 (1994)。据报道, CCK 的作用还包括对心血管功能、呼吸功能、神经毒性和癫痫发作、癌细胞增殖、痛觉缺失、睡眠、性和生殖行为、记忆、焦虑和多巴胺介导行为的作用。Crawley 和 Corwin, *Peptides* 15 :731-755 (1994)。其它报道的 CCK 作用包括刺激胰腺生长、刺激胆囊收缩、抑制胃酸分泌、胰腺多肽释放和肠蠕动收缩组分。另外报道的 CCK 作用包括血管舒张。Walsh, "Gastrointestinal Hormones," 载于 *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (第 3 版, 1994 ;Raven Press, New York)。

[0038] 业已报导, 相比于用单个化合物观察到的抑制, 在不缺少食物的大鼠中注射胰高血糖素、CCK 和铃蟾肽的组合增强了对炼乳试餐摄取的抑制。Hinton 等, *Brain Res. Bull.* 17 :615-619 (1986)。还有报道指胰高血糖素和 CCK 在大鼠中协同抑制假饲。LeSauter 和 Geary, *Am. J. Physiol.* 253 :R217-225 (1987) ;Smith 和 Gibbs, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 713 :236-241 (1994)。还已经提示, 雌二醇和 CCK 对饱感可具有协同作用。Dulawa 等, *Peptides* 15 :913-918 (1994) ;Smith 和 Gibbs, 出处同上。还已经提议, 在其中的营养物作用下由小肠产生的信号可与 CCK 协同地相互作用, 以减少食物摄取。Cox, *Behav. Brain Res.* 38 :35-44 (1990)。另外, 已经报道 CCK 在某些物种中诱生饱感。例如, 已经报道在大鼠中腹膜内注射 CCK、在猪中动脉内注射 CCK、在猫和猪中静脉内注射 CCK、将 CCK 注射入猴、大鼠、犬和绵羊的脑中以及在肥胖和不肥胖人中静脉注射 CCK 引起摄食不振。参见 Lieveverse 等, 出处同上。据报道, 几个实验室的研究通过在猴和大鼠中比较对食物的反应和对非食物强化剂的反应, 以及通过表明 CCK 激发一般在食物消化后观察到的行为序列 (即餐后饱感次序), 证实了低剂量 CCK 对摄食抑制的行为特异性。另外, 据报道, CCK 后的行为和单独或与 CCK 组合的食物消化后的行为对比揭示了 CCK 和食物消化之间的行为相似性。Crawley 和 Corwin, 出处同上。还已经报道, 生理血浆浓度的 CCK 在瘦人和胖人中均抑制食物摄取, 增加饱感。参见 Lieveverse 等, 出处同上。

[0039] 1966 年, CCK 被表征为一种 33 个氨基酸的肽。Crawley 和 Corwin, 出处同上。已鉴别了 CCK 氨基酸序列的种特异性分子变体。据报道, 已在猪、大鼠、鸡、毛丝鼠、犬和人中鉴别出 33 个氨基酸的序列和截短肽 – 其 8 个氨基酸的 C- 端序列 (CCK-8)。据报道, 在猪、犬和豚鼠中存在 39 个氨基酸的序列。据报道, 在猫、犬和人中存在 58 个氨基酸的序列。据报道, 蛙和海龟显示出与 CCK 和胃泌素同源的 47 个氨基酸的序列。业已报道非常新鲜的人肠含少量的、甚至更大的、称为 CCK-83 的分子。据报道已在大鼠中鉴别出主要的中间体形式, 称为 CCK-22。Walsh, “Gastrointestinal Hormones,” 载于 *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (第 3 版, 1994 ; Raven Press, New York)。已报道在大鼠脑中有非硫酸盐化 CCK-8 和四肽 (称为 CCK-4 (CCK(30-33)))。C- 端五肽 (称为 CCK-4 (CCK(29-33))) 保留了与 CCK 的结构同源性, 还与神经肽胃泌素同源。据报道, C- 端硫酸化八肽序列 CCK-8 在种间相对保守。据报道, 编码大鼠甲状腺癌、猪脑和猪肠的前缩胆囊素原的 cDNA 的克隆和序列分析揭示, 345 个核苷酸编码 CCK 前体, 其为 115 个氨基酸, 含先前报道已分离的所有 CCK 序列。Crawley 和 Corwin, 出处同上。

[0040] CCK 据说分布于整个中枢神经系统中, 以及分布在内分泌细胞中和上小肠的肠神经中。CCK 激动剂包括 CCK 自身 (也称为 CCK-33)、CCK-8 (CCK(26-33))、非硫酸化 CCK-8、五肽胃泌素 (CCK-5 或 CCK(29-33)) 和四肽 CCK-4 (CCK(30-33))。在胰腺 CCK 受体中, 据报道 CCK-8 以比未硫酸化 CCK-8 或 CCK-4 高 1000–5000 倍的效力取代结合, 并已报道 CCK-8 刺激胰腺淀粉酶分泌的效力是未硫酸化 CCK-8 或 CCK-4 的约 1000 倍。Crawley 和 Corwin, 出处同上。在大脑皮质匀浆中, CCK 受体结合据说被和硫酸化 CCK-8 等摩尔浓度、10 倍高或 100 倍高浓度的未硫酸化 CCK-8 和 CCK-4 取代。出处同上。

[0041] 据报道, 已在各种组织中鉴别出 CCK 受体, 并已描述了两种主要的亚型 : A 型受体和 B 型受体。业已报道 A 型受体存在于外周组织 (包括胰腺、胆囊、幽门括约肌和传入迷走神经纤维) 和分散的脑区域中。已报道 A 型受体亚型 (CCK_A) 是硫酸化八肽选择性的。已在整个脑中和胃中鉴别出 B 型受体亚型 (CCK_B), 据报道其不需要硫酸化或全部 8 个氨基酸。参见 Reidelberger, J. *Nutr.* 124 (8 附录) 1327S–1333S (1994) ; Crawley 和 Corwin, 出处同上。

[0042] 涉及代谢疾病和障碍的再另一个肽激素家族是胰多肽家族 (“PPF”)。胰多肽 (“PP”) 被发现为胰岛素提取物的杂质, 由其来源器官而不是功能重要性命名 (Kimmel 等, *Endocrinology* 83 : 1323–30 (1968))。PP 是含不同结构基序的 36 个氨基酸的肽。后来在肠提取物中发现了相关肽, 由于 N- 端和 C- 端酪氨酸而命名为肽 YY (“PYY”) (Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 2514–8 (1982))。后来在脑提取物中发现了第三种相关肽, 命名为神经肽 Y (“NPY”) (Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 5485–9 (1982) ; Tatemoto 等, *Nature* 296 : 659–60 (1982))。

[0043] 业已报道, 这三种相关肽发挥着不同的生物学作用。PP 的作用包括抑制胰腺分泌和松弛胆囊。中枢给予 PP 使摄食产生轻微增加, 这可由位于下丘脑和脑干中的受体介导 (综述于 Gehlert, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218 : 7–22 (1998))。

[0044] PYY 的释放发生在餐后。PYY 的替代分子形式是 PYY(3–36) (Eberlein 等, *Peptides* 10 : 797–803 (1989) ; Grandt 等, *Regul. Pept.* 51 : 151–9 (1994))。该片段占人和犬小肠提取物中总 PYY 样免疫反应性的约 40%, 占禁食状态总血浆 PYY 免疫反应性的约

36%，餐后稍微高于 50%。其显然是 PYY 的二肽基肽酶-IV (DPP4) 切割产物。据报道，PYY(3-36) 是 Y2 和 Y5 受体的选择性配体，在优选的 N- 末端截短的 NPY 类似物（即其 C 端片段）中，Y2 和 Y5 受体在药理学上似乎是独特的。据报道，外周给予 PYY 降低胃酸分泌、胃动力、外分泌性胰腺分泌 (Yoshinaga 等, *Am. J. Physiol.* 263 :G695-701(1992) ;Guan 等, *Endocrinology* 128 :911-6(1991) ;Pappas 等, *Gastroenterology* 91 :1386-9(1986))、胆囊收缩和小肠动力 (Savage 等, *Gut* 28 :166-70(1987))。如在直接注射入菱脑 / 脑中或周围之后所观察到的 (Chen and Rogers, *Am. J. Physiol.* 269 :R787-92(1995) ;Chen 等, *Regul. Pept.* 61 :95-98(1996) ;Yang and Tache, *Am. J. Physiol.* 268 :G943-8(1995) ;Chen 等, *Neurogastroenterol. Motil.* 9 :109-16(1997))，中枢注射 PYY 对胃排空、胃动力和胃酸分泌的作用可能不同于外周注射后观察到的作用。例如，中枢给予 PYY 具有某些与本文描述的外周注射 PYY(3-36) 的作用相反的作用，即刺激而不抑制胃酸分泌。胃动力仅在与 TRH 刺激协同时受到抑制，但在单独给予时不受抑制，通过推定的与 PP 受体相互作用实际上在较高剂量下被刺激。已表明，PYY 在中枢给予后刺激食物和水摄取 (Morley 等, *Brain Res.* 341 :200-3(1985) ;Corp 等, *Am. J. Physiol.* 259 :R317-23(1990))。

[0045] 代谢疾病和障碍呈现出多种形式，包括肥胖、糖尿病、脂血异常、胰岛素抵抗、细胞凋亡等。肥胖及其相关病症在美国和整个世界都是常见且非常严重的公共健康问题。上身肥胖是已知最强的 2 型糖尿病风险因素，是心血管疾病的强风险因素。肥胖是高血压、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、中风、胆囊疾病、骨关节炎、睡眠呼吸暂停、生殖疾病（例如多囊卵巢综合征）、乳癌、前列腺癌和结肠癌的公认风险因素，并增加了全身麻醉并发症的发病率（参见例如 Kopelman, *Nature* 404 :635-43(2000)）。其降低寿命，具有以上共患病以及感染、静脉曲张、棘皮症、湿疹、运动失耐、胰岛素抵抗、高血压、高胆固醇血症、胆石病、矫形损伤和血栓栓塞病之类疾病的严重风险 (Rissanen 等, *Br. Med. J.* 301 :835-7(1990))。肥胖也是叫做胰岛素抵抗综合症或“综合症 X”的病症组的风险因素。近期对肥胖和相关疾病医疗成本的评估是全世界 1500 亿美元。一般认为，肥胖的发病机理是多因素的，但基础问题是肥胖者的营养利用度和能量消耗没有达到平衡，直至脂肪组织过量。肥胖目前是不好治疗的、慢性的、基本上难消除的代谢疾病。用于肥胖人士体重减轻的治疗性药物可对其健康具有意义深远的有益作用。

[0046] 糖尿病是一种糖代谢疾病，其特征在于由胰岛素生产或利用不足导致的高血糖和糖尿。糖尿病严重影响发达国家大部分人群的生活质量。胰岛素生产不足是 1 型糖尿病的特征，胰岛素利用不足是 2 型糖尿病的特征。但是，现在普遍认为，有许多不同的糖尿病相关疾病在患者被诊断为患有明显糖尿病之前很久就已开始。另外，在糖尿病患者中不能最理想地控制葡萄糖代谢的影响是引起了广泛的相关脂质和心血管失调。

[0047] 血脂异常或血浆中脂蛋白水平不正常在糖尿病患者中经常发生。血脂异常通常特征在于血液中血浆甘油三酯升高、HDL（高密度脂蛋白）胆固醇低、LDL（低密度脂蛋白）胆固醇水平正常至升高以及小密 LDL（低密度脂蛋白）颗粒水平增加。血脂异常在糖尿病患者中是冠状动脉事件和死亡发生率增加的主要影响因素。流行病学研究已证实了这一点，该研究表明，和非糖尿病受试者相比，糖尿病受试者中的冠状动脉死亡增加几倍。业已描述了在糖尿病受试者中的几种脂蛋白异常。

[0048] 胰岛素抵抗是胰岛素在广泛的浓度范围内发挥其生物学作用的能力减弱。在胰岛

素抵抗中,机体不正常地分泌大量胰岛素,以补偿这种缺失,出现葡萄糖耐受受损的状况。由于不能补偿缺失的胰岛素作用,血浆葡萄糖浓度必然升高,导致临床糖尿病状态。一般公认,胰岛素抵抗和相对血胰岛素过多在肥胖、高血压、动脉粥样硬化和 2 型糖尿病中具有促进作用。已将胰岛素抵抗与肥胖、高血压和咽峡炎的关联描述为一种以胰岛素抵抗为共同发病关联的综合征-综合征 X。

[0049] 凋亡是受正常发育过程中存在的外来或内在信号调节的细胞自杀的主动过程。许多文件证明,凋亡在胰腺内分泌 β 细胞调节中起关键作用。越来越多的证据表明,在成年哺乳动物中, β 细胞量经历动态变化,以适应在特定情况(例如妊娠和肥胖)下维持血糖恒定(euglycemia)的胰岛素产量。 β 细胞量的控制取决于细胞增殖、生长和程序化细胞死亡(凋亡)之间的微妙平衡。扰乱此平衡可导致葡萄糖稳态受损。例如,值得注意的是,当 β 细胞复制速率降低时,随着老化出现葡萄糖不耐受,人体尸检研究反复表明,非胰岛素依赖性糖尿病患者中 β 细胞量比非糖尿病受试者降低 40-60%。一般认为,胰岛素抵抗固定伴随着肥胖,但通过补偿性高胰岛素血症维持血糖量正常,直至 β 细胞变得不能满足胰岛素增加的需要,此时形成 2 型糖尿病。

[0050] 治疗与糖尿病相关的多种异常的尝试已提示给予几种抗糖尿病药物,以便解决不同患者中的这些异常。抗糖尿病药物的实例是蛋白(例如胰岛素和胰岛素类似物)和小分子(例如胰岛素增敏剂、促胰岛素分泌剂和食欲调节化合物)。

[0051] 仍需要开发用于上述代谢疾病、病症和障碍的多肽。因此,本发明的一个目标是提供杂合多肽及其生产和使用方法。

[0052] 本文引用的所有文件都通过引用结合到本申请中,如同本文完全阐述一样。

[0053] 发明概述

[0054] 一般地讲,本发明涉及用作代谢疾病和障碍治疗剂和预防剂的新型可选择杂合多肽,其中所述代谢疾病和障碍可通过控制血浆葡萄糖水平、胰岛素水平和/或胰岛素分泌来减轻,例如为糖尿病和糖尿病相关病症。这样的病症和障碍包括但不限于高血压、血脂异常、心血管疾病、摄食障碍、胰岛素抵抗、肥胖和任何种类的糖尿病,包括 1 型、2 型和妊娠期糖尿病。

[0055] 在本发明的一个方面,提供具有至少一种激素活性的杂合多肽。本发明的杂合多肽包含至少两个共价连接在一起的生物活性肽激素组件,其中至少一个生物活性肽激素组件具有组分肽激素的至少一种激素活性。生物活性肽激素组件独立选自:组分肽激素、具有组分肽激素的至少一种激素活性的组分肽激素片段、具有组分肽激素的至少一种激素活性的组分肽激素类似物和衍生物、具有组分肽激素的至少一种激素活性的组分肽激素类似物和衍生物的片段,以及肽强化物。

[0056] 本发明的组分肽激素包括:胰淀素、肾上腺髓质素(ADM)、降钙素(CT)、降钙素基因相关肽(CGRP)、垂体中间叶激素、缩胆囊素(“CCK”)、瘦蛋白、肽 YY(PYY)、胰高血糖素样肽 1(GLP-1)、胰高血糖素样肽 2(GLP-2)、泌酸调节肽(OXM)和 Exendin-4;本发明的肽强化物包括:赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制或其它药代动力学特征的组分肽激素结构基序,以及赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制或其它药代动力学特征的组分肽激素类似物或衍生物的结构基序。

[0057] 在本发明的另一方面,提供治疗或预防肥胖的方法,其中该方法包括将治疗或预防有效量的本发明杂合多肽给予需要其的受试者。在优选实施方案中,受试者为肥胖或超重受试者。尽管“肥胖”一般定义为身体质量指数超过 30,但对本公开来说,需要或希望减轻体重的任何受试者,包括身体质量指数低于 30 的受试者,都包括在“肥胖”范围内。为胰岛素抵抗、葡萄糖不耐受或具有任何形式的糖尿病(例如 1 型、2 型或妊娠期糖尿病)的受试者均可由该方法获益。

[0058] 在本发明的再另一方面,提供减少食物摄取、降低营养物利用度、引起体重下降、治疗糖尿病或糖尿病相关病症以及改善脂质谱(包括降低 LDL 胆固醇和甘油三酯水平和/或改变 HDL 胆固醇水平)的方法,其中该方法包括给予受试者有效量的本发明杂合多肽。在一个优选实施方案中,本发明的方法用于治疗或预防在有需要受试者中可通过降低营养物利用度减轻的病症或障碍,包括给予所述受试者治疗或预防有效量的本发明杂合多肽。在另一个实施方案中,本发明的方法用于治疗或预防可通过控制血浆葡萄糖水平、胰岛素水平和/或胰岛素分泌减轻的病症或障碍。在再另一个实施方案中,本发明的方法用于治疗糖尿病和/或糖尿病相关病症。这样的病症和障碍包括但不限于高血压、血脂异常、心血管疾病、摄食障碍、胰岛素抵抗、肥胖和任何种类的糖尿病(包括 I 型、II 型和妊娠期糖尿病)、糖尿病并发症(神经病(基于例如 Exendin-4 的神经营养作用)、神经性疼痛(基于例如胰淀素作用)、视网膜病、肾病、胰腺 β 细胞量不足的病症(基于例如 Exendin-4 和 GLP-1 的胰岛再生作用))。

[0059] 本发明还涉及药物组合物,其包含治疗或预防有效量的至少一种本发明杂合多肽或其药物可接受盐,以及药物可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或用于传递杂合多肽的载体。

[0060] 参照以下的优选实施方案和详述,可更清楚地理解本发明的这些方面和其它方面。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1 显示了本发明的示例性化合物在 DIO 小鼠实验中的作用。具体而言,图 1 显示了 Exendin/PYY 杂合体在 DIO 小鼠中的作用,在催肥 C57BL/6 小鼠中治疗对体重的作用。

[0063] 图 2 显示了本发明的示例性化合物在 DIO 小鼠实验中的作用。具体而言,图 2 显示了 Exendin/胰淀素杂合体在 DIO 小鼠中的作用,在催肥 C57BL/6 小鼠中治疗对体重的作用。

[0064] 图 3A-3B 显示了本发明的示例性化合物在 DIO 小鼠实验中的作用。具体而言,图 3A-3B 显示了 Exendin/CCK-8 杂合体在 DIO 小鼠中的作用,在催肥 C57BL/6 小鼠中治疗对体重的作用。

[0065] 图 4A-4B 显示了本发明的示例性化合物与亲代肽化合物相比在食物摄取实验中的作用。具体而言,图 4A-4B 显示了本发明化合物对比亲代化合物在食物摄取实验中的作用。

[0066] 发明详述

[0067] 一般地讲,本发明涉及用作代谢疾病和障碍治疗剂和预防剂的新型可选择杂合多肽,其中所述代谢疾病和障碍可通过控制血浆葡萄糖水平、胰岛素水平和/或胰岛素分泌来减轻,例如为糖尿病和糖尿病相关病症。这样的病症和障碍包括但不限于高血压、血脂异

常、心血管疾病、摄食障碍、胰岛素抵抗、肥胖和任何种类的糖尿病，包括 1 型、2 型和妊娠期糖尿病。

[0068] 在一个方面，本发明涉及可基于其“生物活性”（例如治疗效力、功能范围、作用时程、物理化学特性和 / 或其它药代动力学特性）选择的生理学、代谢学和 / 或药代动力学活性肽组件的模块化组装。

[0069] 非为理论所囿，本发明至少部分涉及“工具箱”方法，其中生物活性肽激素组件以二元、三元或更多元组合连接，以产生具有可选择特性的新型有效治疗剂。“生物活性肽激素组件”可为肽激素、具有激素活性的肽片段，或赋予化学、代谢和 / 或其它药代动力学稳定性的肽激素结构基序。肽激素可包括本领域已知和本文描述的天然肽激素以及肽激素类似物和衍生物。

[0070] 在本发明的一个方面，业已发现两个或多个肽激素的某些物理化学特征组合成单一形态可利于在功能障碍性代谢循环中的几个位置进行干扰。因此，在本发明的一个方面，提供合理设计的杂合多肽，其将可选择生物活性整合入单个多肽物质中。在一个实施方案中，本发明的可选择杂合多肽可包括使用化学稳定接头，以共价连接生物活性组件。在另一个实施方案中，本发明的可选择杂合多肽可包括使用可切割的接头，其自身可为或构成生物活性组件的一部分。

[0071] 此外，非为理论所囿，本发明的杂合多肽设计一般可包括：(1) 鉴别、选择和配对用于需要效力和治疗用途的生物活性肽激素组件，和 (2) 直接或利用接头共价连接生物活性组件（例如天然肽激素、具有激素活性的肽激素类似物或衍生物、具有激素活性的肽激素片段、稳定基序等），而不损失组成组件的生物活性。在某些实施方案中，组件选择标准可包括但不限于：(a) 用于所需治疗或预防适应症的所需体内效力；(b) 用于多种治疗或预防适应症的连接组件的任选协同或双重作用；和 / 或 (c) 所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征。

[0072] 本文使用的章节标题仅用于编排目的，不能被解读为以任何方式限于所述主题。

[0073] 本发明的杂合多肽

[0074] 如上所述，本发明部分涉及杂合多肽，其含至少两个选自本文所述组分肽激素的生物活性肽激素组件。本发明的杂合多肽一般用于治疗 and 预防代谢疾病和障碍。本发明的杂合多肽具有组分肽激素的至少一种激素活性，优选可包括第二种组分肽激素的至少一种另外的生物活性。

[0075] 在一个实施方案中，本发明的杂合多肽可包含至少两个生物活性肽激素组件，其中所述至少两个生物活性肽激素组件的每一个都具有组分肽激素的至少一种激素活性。在另一个实施方案中，本发明的杂合多肽可包含至少两个生物活性肽激素组件，其中至少一个所述生物活性肽激素组件具有组分肽激素的至少一种生物活性，至少一个所述生物活性肽激素组件赋予杂合多肽所需的化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征。

[0076] 在一个优选实施方案中，本发明的杂合多肽和组分肽激素相比在代谢疾病和障碍的治疗和 / 或预防中可具有相当或更高的效力。在另一个实施方案中，本发明的杂合多肽和组分肽激素相比在糖尿病和 / 或糖尿病相关疾病的治疗和 / 或预防中可具有相当或更高的效力。或者，本发明的优选杂合多肽与组分肽激素相比可具有改良的生产简便性、稳定性

和 / 或配制简便性。

[0077] 更具体地讲,本发明的杂合多肽一般包含第一生物活性肽激素组件,其共价连接至至少一个另外的生物活性肽激素组件。生物活性肽激素组件可以本领域已知的任何方式共价连接在一起,包括但不限于直接酰胺键或化学接头基团,如下文进一步详述。在一个实施方案中,化学接头基团可包括诱导或稳定多肽构象的肽模拟物。

[0078] 第一生物活性肽激素组件可选自第一组分肽激素,可为肽激素(包括天然肽激素及其类似物和衍生物)、具有激素活性的肽片段(包括天然肽激素片段及其类似物和衍生物),或赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征的肽激素(包括天然肽激素及其类似物和衍生物)结构基序。同样,另外的生物活性肽组件可选自组分肽激素,可为肽激素(包括天然肽激素及其类似物和衍生物)、具有激素活性的肽片段(包括天然肽激素片段及其类似物和衍生物),或赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征的肽激素(包括天然肽激素及其类似物和衍生物)结构基序。第一肽激素和另外的肽激素可为相同的肽激素,可来自相同的肽激素家族,或者可为不同的肽激素,这取决于生物活性肽激素组件的需要特征。

[0079] 本文使用的术语“生物活性”指(1)在至少一个体内激素通路中的生物活性,或(2)此生物活性的治疗效力、功能范围、作用时程、物理化学特性和 / 或其它药代动力学特性的调节。可通过本领域已知或本文描述的靶激素受体结合实验或通过监测生理指标的代谢研究评价生物活性。可通过改变例如化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征,变更对此生物活性的治疗效力、功能范围、作用时程、物理化学特性和 / 或其它药代动力学特性的调节。

[0080] 在一个实施方案中,本发明的杂合多肽保留组分肽激素生物活性的至少约 25%,优选约 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99%。优选的杂合多肽是在本领域已知或本文描述的一种代谢相关实验(例如受体结合、食物摄取、胃排空、胰腺分泌、胰岛素分泌、血糖降低、体重减轻等)中所具有的效力等于或高于组分肽激素在相同实验中效力的杂合多肽。或者,本发明的优选杂合多肽与组分肽激素相比可具有改良的生产简便性、稳定性和 / 或配制简便性。

[0081] 在另一个实施方案中,就降低营养物利用度、减少食物摄取、体重增加作用和 / 或治疗和预防代谢疾病和障碍而言,本发明的杂合多肽保留天然组分肽激素生物活性的至少约 25%,优选约 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99%。在再另一个实施方案中,就降低营养物利用度、减少食物摄取、体重增加作用和 / 或治疗和预防代谢疾病和障碍而言,本发明的杂合多肽具有天然肽激素生物活性的至少约 110%、125%、130%、140%、150%、200% 或更高。在另一个实施方案中,本发明的杂合多肽具有改良的组分肽激素受体激动剂活性。

[0082] 组分肽激素、类似物和衍生物

[0083] 组分肽激素一般包括用于治疗或预防代谢疾病和障碍的肽激素,包括:(a) 胰淀素家族,包括胰淀素、肾上腺髓质素(“ADM”)、降钙素(“CT”)、降钙素基因相关肽(“CGRP”)、垂体中间叶激素(也称为“AFP-6”)和相关肽;(b) 缩胆囊素(“CCK”);(c) 瘦蛋白家族,包括瘦蛋白和瘦蛋白样肽;(d) 胰多肽家族,包括胰多肽(“PP”)和肽 YY(“PYY”);和(e)

肠降血糖素和肠降血糖素模拟物,包括:来源于胰高血糖素原基因的肽激素,例如胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(“GLP-1”)、胰高血糖素样肽-2(“GLP-2”)和泌酸调节肽(“OXM”);和 Exendin,例如 Exendin-3 和 Exendin-4。如上所述,本发明的组分肽激素还包括保留这些天然肽激素的激素活性的类似物和衍生物。在一个实施方案中,这样的类似物和衍生物是靶激素受体的激动剂。

[0084] 所述“胰淀素”指分泌自胰腺 B 细胞、称为胰淀素的人肽激素及其种变体,如 1993 年 8 月 10 日授权的美国专利第 5,234,906 号关于“Hyperglycemic Compositions,”的描述,其内容通过引用结合到本文中。更具体地说,胰淀素是一种 37 个氨基酸的多肽激素,一般与胰岛素一起由胰腺 β 细胞共分泌,作为对营养物摄取的响应(参见例如 Koda 等, Lancet 339:1179-1180,1992)。就此意义来说,“胰淀素”、“野生型胰淀素”和“天然胰淀素”(即未修饰的胰淀素)可互换使用。

[0085] 所述“肾上腺髓质素”或“ADM”指人肽激素及其种变体。更具体地说,ADM 由 185 个氨基酸的前激素原通过连续酶切割和酰胺化产生。该过程以释放 52 个氨基酸的生物活性肽而告终。

[0086] 所述“降钙素”或“CT”指人肽激素及其种变体,包括鲑鱼降钙素(“sCT”)。更具体地说,CT 是由较大的激素原切割的 32 个氨基酸的肽。其含有一个二硫键,使得氨基末端呈现环形。降钙素前 mRNA 的可变剪接产生编码降钙素基因相关肽的 mRNA;该肽似乎在神经和血管系统中起作用。已克隆了降钙素受体,表明其为七跨膜 G 蛋白偶联受体家族的一员。

[0087] 所述“降钙素基因相关肽”或“CGRP”指任何生理形式的人肽激素及其种变体。

[0088] 所述“垂体中间叶激素”或“AFP-6”指任何生理形式的人肽激素及其种变体。

[0089] 所述“缩胆囊素”或“CCK”指人肽激素及其种变体。更具体地说,CCK 是首先在人中鉴别出的 33 个氨基酸的序列,包括据报导已在猪、大鼠、鸡、毛丝鼠、犬和人中证实的 8 个氨基酸的体内 C 端片段(“CCK-8”)。因此,术语 CCK-33 一般指人 CCK(1-33),而 CCK-8(CCK(26-33))指 C 端 8 肽,其一般既可硫酸化,也可未硫酸化,除非另有说明。此外,五肽胃泌素或 CCK-5 指 C 端肽 CCK(29-33),CCK-4 指 C 端四肽 CCK(30-33)。但是,本文使用的 CCK 一般指硫酸化和未硫酸化形式(除非另有说明)的激素的所有天然变体,包括 CCK-33、CCK-8、CCK-5 和 CCK-4。

[0090] 所述“瘦蛋白”指任意种的天然瘦蛋白,以及生物活性 D- 同种型,或天然瘦蛋白及其变体的片段,以及前述的组合。瘦蛋白是 β 基因的多肽产物,如国际专利公开 W096/05309 所述,该专利通过引用整体结合到本文中。瘦蛋白的推定类似物和片段报告于美国专利 5,521,283、美国专利 5,532,336、PCT/US96/22308 和 PCT/US96/01471,其各自都通过引用整体结合到本文中。

[0091] 所述“PP”指任意生理形式的人胰肽多肽或其种变体。因此,术语“PP”既包括 SEQ ID NO:1 列出的 36 个氨基酸的人全长肽,也包括 PP 的种变体,包括例如鼠、仓鼠、鸡、牛、大鼠和犬 PP。就此意义而言,“PP”、“野生型 PP”和“天然 PP”(即未修饰的 PP)可互换使用。

[0092] 所述“PYY”指任意生理形式的人肽 YY 多肽或其种变体。因此,术语“PYY”既包括 36 个氨基酸的人全长肽,也包括 PP 的种变体,包括例如鼠、仓鼠、鸡、牛、大鼠和犬 PYY。就此意义而言,“PYY”、“野生型 PYY”和“天然 PYY”(即未修饰的 PYY)可互换使用。在本发明

背景下,就本发明的 PYY 类似物多肽所讨论的所有修饰都基于天然人 PYY 的 36 个氨基酸序列。

[0093] 所述“GLP-1”指任意生理形式的人胰高血糖素样肽 -1 或其种变体。术语“GLP-1”包括人 GLP-1 (1-37)、GLP-1 (7-37) 和 GLP-1 (7-36) 酰胺,至于全长人 GLP-1 (1-37) 及 GLP-1 的种变体,包括例如鼠、仓鼠、鸡、牛、大鼠和犬 GLP-1。就此意义而言,“GLP-1”、“野生型 GLP-1”和“天然 GLP-1”(即未修饰的 GLP-1)可互换使用。

[0094] 所述“GLP-2”指任意生理形式的人胰高血糖素样肽 -2 或其种变体。更具体地说, GLP-2 是一种 33 个氨基酸的肽,与 GLP-1 一起由小肠和大肠中的肠内分泌细胞共分泌。

[0095] 所述“OXM”指任意生理形式的人泌酸调节肽或其种变体。更具体地说, OXM 是一种 37 个氨基酸的肽,其含 29 个氨基酸的胰高血糖素序列,后接 8 个氨基酸的羧基末端延伸。

[0096] 所述“Exendin”指发现于希拉毒蜥(亚利桑那州的一种内生蜥蜴)和墨西哥串珠蜥的唾液中的一种肽激素及其种变体。更具体地说, Exendin-3 存在于墨西哥串珠蜥(*Heloderma horridum*)唾液中, Exendin-4 存在于希拉毒蜥(*Heloderma suspectum*)唾液中(Eng, J. 等, *J Biol. Chem.*, 265:20259-62, 1990; Eng, J. 等, *J. Biol. Chem.*, 267: 7402-05(1992))。Exendin 与胰高血糖素样肽家族的几个成员具有某些序列相似性,与 GLP-1 具有 53% 的最高同一性(Goke 等., *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55(1993))。就此意义而言,“Exendin”、“野生型 Exendin”和“天然 Exendin”(即未修饰的 Exendin)可互换使用。

[0097] 本文使用的“类似物”指其序列来源于基础参比肽(例如 PP、PYY、胰淀素、GLP-1、Exendin 等)序列的肽,包括参比氨基酸序列的插入、置换、延伸和/或缺失,优选与基础肽具有至少 50% 或 55% 的氨基酸序列同一性,更优选与基础肽具有至少 70%、80%、90% 或 95% 的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,这样的类似物可包含保守或非保守氨基酸置换(包括非天然氨基酸以及 L 和 D 形式)。

[0098] “衍生物”被定义为这样的分子,其具有天然参比肽或类似物的氨基酸序列,但一个或多个氨基酸侧基、 α -碳原子、末端氨基或末端羧基另外具有化学修饰。化学修饰包括但不限于加入化学部分、创建新键和去除化学部分。氨基酸侧基修饰包括但不限于赖氨酸 ϵ -氨基酰化;精氨酸、组氨酸或赖氨酸 N-烷基化;谷氨酸或天冬氨酸羧基团烷基化;以及谷氨酰胺或天冬酰胺脱酰胺化。末端氨基修饰包括但不限于脱氨基、N-低级烷基、N-二-低级烷基、约束烷基(例如分支、环状、融合、金刚烷基)和 N-酰基修饰。末端羧基修饰包括但不限于酰胺、低级烷基酰胺、约束烷基(例如分支、环状、融合、金刚烷基)烷基、二烷基酰胺和低级烷基酯修饰。低级烷基是 C1-C4 烷基。而且,可利用肽化学一般技术人员已知的保护基保护一个或多个侧基或末端基团。氨基酸的 α -碳可一甲基化或二甲基化。

[0099] 所述“激动剂”指激发天然人参比肽的生物活性的化合物,当用本领域已知的检测(例如受体结合/竞争研究)评价时,所述化合物具有的效力优选好于参比肽,或和参比肽相比在 5 个数量级(增加或减少)效力之内,更优选为 4、3、2 或 1 个数量级。在一个实施方案中,该术语指激发的生物学作用类似于天然人参比肽的化合物,例如(1)在食物摄取、胃排空、胰腺分泌或体重下降检测中所具有的活性类似于天然人参比肽的化合物,或(2)在参比受体实验或竞争结合实验中与标记的参比肽特异性结合的化合物。优选地,激动剂在这样的实验中以高于 1 μ M 的亲合性结合,更优选以高于 1-5nM 的亲合性结合。在另一个

实施方案中,该术语指在糖尿病或糖尿病相关疾病或障碍的治疗中激发生物学作用的化合物。这样的激动剂可包括含参比肽活性片段的多肽或小化学分子。

[0100] 所述“氨基酸”和“氨基酸残基”指天然氨基酸、非天然氨基酸和修饰的氨基酸。除非与此相反地规定,否则一般性或以名称具体指出的任何氨基酸都包括 D 和 L 立体异构体,如果其结构允许这样的立体异构体形式。天然氨基酸包括丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、天冬酰胺 (Asn)、天冬氨酸 (Asp)、半胱氨酸 (Cys)、谷氨酰胺 (Gln)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、赖氨酸 (Lys)、甲硫氨酸 (Met)、苯丙氨酸 (Phe)、脯氨酸 (Pro)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和缬氨酸 (Val)。非天然氨基酸包括但不限于高赖氨酸、高精氨酸、氮杂环丁烷甲酸、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、叔丁基甘氨酸、2,4-二氨基异丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、高脯氨酸、羟赖氨酸、别羟赖氨酸、3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、N-甲基丙氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基戊基甘氨酸、N-甲基缬氨酸、萘丙氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、戊基甘氨酸、2-吡啶酸和硫代脯氨酸。其它的非天然氨基酸包括修饰的氨基酸残基,其可逆或不可逆地被化学封闭,或在其 N-端氨基或其侧链基团上被化学修饰,例如其中侧链官能团被化学修饰为另一个官能团的 N-甲基化 D 和 L 氨基酸或残基。例如,修饰的氨基酸包括甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷、天冬氨酸的一种修饰氨基酸-天冬氨酸-(β -甲酯)、甘氨酸的一种修饰氨基酸-N-乙基甘氨酸或丙氨酸的一种修饰氨基酸-丙氨酸甲酰氨。另外的可加入的残基描述于 Sandberg 等, J. Med. Chem. 41 :2481-91, 1998。

[0101] 本文使用的“5Apa”指 5 氨基-戊酰基,“12Ado”指 12-氨基十二烷酰基,“PEG (8)”指 3,6,--二氧基辛酰基,而“PEG (13)”指 1-氨基-4,7,10-三氧杂-13-十三烷胺琥珀酰基 (succinimoyl)。

[0102] 如上所述,本领域已知天然组分肽激素,也已知其类似物和衍生物。下表 1 提供了几个天然组分肽激素的序列,仅供参考。

[0103] 表 1:示例性组分肽激素

[0104]

序列 ID	描述	序列
44	大鼠胰淀素:	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY
45	h-胰淀素:	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
46	h-ADM:	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNV APRSKISPQGY
47	s-CT:	CSNLSTCVLGKLSEELHKLQTYPRINTGSGTR
48	h-CT:	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTEPQTAIGVGAP
49	h-CGRP α :	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGSKAF
50	h-CGRP β :	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKSNFVPTNVGSKAF
51	h-AFP-6(1-47):	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVD PSSPHSY
52	h-AFP-6(8-47):	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
53	小鼠 AFP-6(1-47):	PHAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLVRPAGRRDSAPVDP SSPHSY
54	小鼠 AFP-6(8-47):	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQLVRPAGRRDSAPVDPSSPHSY
55	CCK-8-硫酸化:	DY(SO ₃)MGWMDF
56	h-瘦蛋白:	MHWGTLGFLWLWPYLFYVQAVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRI NDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQI LTSMPSRNVIIQISNDLENLRDLLHVLAFSKKSCHLPWASGLETL

[0105]

		DSLGGVLEASGYSTEVALSRLQGSQDMLWQLDLSPGC
57	hPYY:	YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
58	hPYY(3-36):	IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
59	hGLP-1(1-37):	HDEFERHAEGTFTSDVSSTLEGQAALFEIAWLKGRG
60	蛙 GLP-1:	HAEGTYTNDVTEYLEEKAAKEFIEWLIKGPCKIRYS-OH; HAEGTFTSDVTQQLDEKAAKEFIDWLINGGPSKEIIS-OH
61	h-GLP-1(7-36):	HAEGTFTSDVSSYLEGQAALFEIAWLKGR
62	h-GLP-2:	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIETKITD
63	蛙 GLP-2:	HAEGTFTNDMTNYLEEKAAKEFVGWLIKGRP-OH
64	OXM:	HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA
65	Exendin-3:	HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
66	Exendin-4:	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

[0106] 这些肽在生理表达时一般 C 端酰胺化,但对本发明目的来说不是必须的。换句话说,这些肽以及本发明的杂合多肽的 C 端可具有游离 -OH 或 -NH₂ 基团。这些肽还可具有其它的翻译后修饰。本领域技术人员会意识到,还可构建具有 N-末端甲硫氨酸残基的本发明杂合多肽。

[0107] 以上组分肽激素的类似物是本领域已知的,但一般包含修饰,例如此组分肽激素氨基酸序列的置换、缺失和插入及其任意组合。所述置换、缺失和插入可在N-末端或C-末端,或者可在组分肽激素的内部。在一个优选方面,本发明组分肽激素的类似物包括一种或多种修饰的“非必需”氨基酸残基。在本发明背景下,“非必需”氨基酸残基为在片段(例如组分肽激素片段)的天然人氨基酸序列中可改变(即缺失或置换)而不消除或基本不降低所得类似物的组分肽激素受体激动剂活性的残基。

[0108] 优选的置换包括保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链或物理化学特征(例如静电、氢键键合、等排、疏水特征)的氨基酸残基取代的置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族是本领域已知的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0109] 本发明还涉及组分肽激素衍生物。这样的衍生物包括缀合至一个或多个水溶性聚合物分子(例如聚乙二醇(“PEG”)或各种长度的脂肪酸链(例如硬脂酰、棕榈酰、辛酰等))或加入聚氨基酸(例如聚组氨酸、聚精氨酸、聚赖氨酸和聚丙氨酸)的组分肽激素及其类似物。对组分肽激素及其类似物的修饰还可包括小分子取代基,例如短烷基和约束烷基(例如支链、环状、融合、金刚烷基)和芳基。水溶性聚合物分子优选具有约500至约20,000Da的分子量。

[0110] 这样的聚合物缀合和小分子取代基修饰可单独地发生在杂合多肽序列中的N端或C端或氨基酸残基的侧链上。或者,沿着杂合多肽可有多数个衍生化位点。用赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或半胱氨酸取代一个或多个氨基酸可提供另外的衍生化位点。参见例如美国专利第5,824,784号和5,824,778号。优选地,杂合多肽可缀合至1、2或3个聚合物分子。

[0111] 水溶性聚合物分子优选连接至氨基、羧基或巯基,可连接在N端或C端或赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或半胱氨酸的侧链上。或者,水溶性聚合物分子可与二胺基和二羧基连接。在一个优选实施方案中,本发明的杂合多肽通过赖氨酸上的 ϵ 氨基缀合1、2或3个PEG分子。

[0112] 本发明的衍生物还包括一个或多个氨基酸残基具有化学改变的组分肽激素或类似物。这样的化学改变包括酰胺化、糖基化、酰化、硫酸化、磷酸化、乙酰化和环化。化学改变可单独地发生在PPF杂合多肽序列中的N端或C端或氨基酸残基的侧链上。在一个实施方案中,这些多肽的C-端可具有游离-OH或-NH₂基团。在另一个实施方案中,N-末端可用异丁氧基羰基、异丙氧基羰基、正丁氧基羰基、乙氧基羰基、异己酰基(isocap)、辛烷基、辛基甘氨酸基(GOct)或8-氨基辛酸基加帽。在一个优选实施方案中,可通过形成二硫键环化。或者,沿着杂合多肽可有多数个化学改变位点。

[0113] 胰淀素家族

[0114] 如上所述,用于本发明的组分肽激素包括胰淀素家族肽激素,其包括胰淀素、肾上腺髓质素(“ADM”)、降钙素(“CT”)、降钙素基因相关肽(“CGRP”)、垂体中间叶激素(也称为“AFP-6”)和相关肽。天然胰淀素家族肽激素是本领域已知的,功能性肽类似物和衍生

物也是已知的。本文描述了某些优选的天然肽、肽类似物和衍生物,但是,应当认识到,具有本领域已知激素活性的任何已知胰淀素家族肽都可连同本发明一起使用。

[0115] 本领域已知的任何胰淀素类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中,胰淀素类似物和衍生物具有天然胰淀素的至少一种激素活性。在某些实施方案中,胰淀素类似物是天然胰淀素能够特异性结合的受体的激动剂。优选的胰淀素类似物和衍生物包括 US2003/0026812A1 中描述的物质,该文献通过引用结合到本文中。

[0116] 示例性胰淀素类似物包括:

[0117]

SEQ ID:	
67	^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素 (普兰林肽)
68	脱 - ¹ Lys-h- 胰淀素
69	²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h- 胰淀素
70	¹⁸ Arg, ^{25,28} Pro-h- 胰淀素
71	脱 - ¹ Lys, ¹⁸ Arg, ^{25,28} Pro-h- 胰淀素
72	¹⁸ Arg, ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
73	脱 - ¹ Lys, ¹⁸ Arg, ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
74	脱 - ¹ Lys, ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
75	²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h- 胰淀素

[0118]

76	^{28,29} Pro-h- 胰淀素, 2,7- 环 -[² Asp, ⁷ Lys]-h- 胰淀素
77	²⁻³⁷ h- 胰淀素
78	¹ Ala-h- 胰淀素
79	² Ala-h- 胰淀素
80	^{2,7} Ala-h- 胰淀素
81	¹ Ser-h- 胰淀素
82	²⁹ Pro-h- 胰淀素
83	^{25,28} Pro-h- 胰淀素

84	脱 ^{-25,28} Pro-h 胰淀素
85	²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h- 胰淀素
86	²³ Leu ²⁵ Pro ²⁶ Val ²⁸ Pro-h- 胰淀素
87	脱 ⁻¹ Lys, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ²⁸ Pro-h- 胰淀素
88	¹⁸ Arg, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ²⁸ Pro-h- 胰淀素
89	¹⁸ Arg, ²³ Leu, ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
90	¹⁸ Arg ²³ Leu ^{25,28} Pro-h- 胰淀素
91	¹⁷ Ile, ²³ Leu ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
92	¹⁷ Ile, ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
93	脱 ⁻¹ Lys, ¹⁷ Ile, ²³ Leu, ^{25,28,29} Pro-h- 胰淀素
94	¹⁷ Ile, ¹⁸ Arg, ²³ Leu-h- 胰淀素
95	¹⁷ Ile, ¹⁸ Arg, ²³ Leu, ²⁶ Val, ²⁹ Pro-h- 胰淀素
96	¹⁷ Ile, ¹⁸ Arg, ²³ Leu, ²⁵ Pro ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h- 胰淀素
97	¹³ Thr, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁸ Leu, ²⁹ Pro, ³¹ AsP-h- 胰淀素
98	¹³ Thr, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁹ Pro, ³¹ AsP-h- 胰淀素
99	脱 ⁻¹ Lys, ¹³ Thr, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁸ Pro, ³¹ AsP-h- 胰淀素
100	¹³ Thr, ¹⁸ Arg, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁹ Pro, ³¹ AsP-h- 胰淀素
101	¹³ Thr, ¹⁸ Arg, ²¹ His, ²³ Leu, ^{28,29} Pro, ³¹ AsP-h- 胰淀素
102	¹³ Thr, ¹⁸ Arg, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Ala, ^{28,29} Pro, ³¹ AsP-h- 胰淀素

[0119] 如本领域所知,这样的胰淀素类似物优选酰胺化,但在本发明背景下,任选可为酸形式,除非另有说明。

[0120] 本领域已知的任何 ADM 类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中,ADM 类似物和衍生物具有天然 ADM 的至少一种激素活性。在某些实施方案中,ADM 类似物是天然 ADM 能够特异性结合的受体的激动剂。

[0121] 本领域已知的任何 CT 类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中,CT 类似物和衍生物具有天然 CT 的至少一种激素活性。在某些实施方案中,CT 类似物是天然 CT 能够特异性结合的受体的激动剂。优选的 CT 类似物和衍生物包括描述于美国专

利 第 4,652,627、4,606,856、4,604,238、4,597,900、4,537,716、4,497,731、4,495,097、4,444,981、4,414,149、4,401,593 和 4,397,780 号的物质,这些专利通过引用结合到本文中。

[0122] 示例性的 CT 类似物包括:

[0123]

SEQ ID :	
103	⁸ Gly_CT
104	²² Leu_CT
105	² Gly, ³ Ser, ⁸ Gly, ²² 脱 -Tyr-CT
106	¹⁴ Gln-sCT
107	¹⁸ Arg-sCT
108	¹¹ , ¹⁸ Arg-sCT
109	¹⁴ Gln, ¹⁸ Arg-sCT
110	¹⁴ Gln, ¹¹ , ¹⁸ Arg-sCT

[0124] 如本领域所知,这样的 CT 类似物优选酰胺化,但在本发明背景下,任选可为酸形式,除非另有说明。

[0125] 本领域已知的任何 CGRP 类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中, CGRP 类似物和衍生物具有天然 CGRP 的至少一种激素活性。在某些实施方案中, CGRP 类似物是天然 CGRP 能够特异性结合的受体的激动剂。优选的 CGRP 类似物和衍生物包括描述于美国专利第 4,697,002 和 4,687,839 号的物质,这些专利通过引用结合到本文中。

[0126] 示例性的 CGRP 类似物包括:

[0127]

SEQ ID :	
111	³⁶ D-Ser_CGRP
112	³⁶ D-Thr-CGRP
113	³⁶ D-As-CGRP
114	³⁶ D-Asn-CGRP
115	³⁶ Ser-CGRP
116	³⁶ Hse-CGRP

117	³⁶ As-CGRP
118	³⁶ Thr-CGRP
119	³⁶ Asn-CGRP

[0128] 本领域已知的任何 AFP-6 类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中, AFP-6 类似物和衍生物具有天然 AFP-6 的至少一种激素活性。在某些实施方案中, AFP-6 类似物是天然 AFP-6 能够特异性结合的受体的激动剂。优选的 AFP-6 类似物和衍生物包括描述于 W02003/022304 的物质, 该文献通过引用结合到本文中。

[0129] 示例性的 AFP-6 类似物包括:

[0130]

SEQ ID :	
120	TQAQLLRVGCNLTSCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
121	TQAQLLRVGCDTATCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
122	TQAQLLRVGMVLGTMQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
123	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVEPSSPHSY
124	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQESAPVEPSSPHSY
125	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVDPSSPHSY
126	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQL----DSAPVDPSSPHSY
127	RVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQD SAPVDP S SPHSY
128	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVEPSSPHSY

[0131]

129	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
130	GCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
131	GCNTATCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVDPSSPHSY
132	GCNTATCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
133	GCSNLTSCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
134	GCGNLTSCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY

135	GCVLGTCQVQNLSHRLWQL----RQESAPVEPS SPSY
136	CVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPSY
137	QVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPSY
138	VQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPSY
139	VQNLSHRL----QLMGPAGRQDSAPVDPSSPSY
140	GTMQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPSY

[0132] 如本领域所知,这样的 AFP-6 类似物优选酰胺化,但在本发明背景下,任选可为酸形式,除非另有说明。

[0133] CCK 家族

[0134] CCK,包括 hCCK 和种变体及其各种类似物,是本领域已知的。一般来说, CCK 具有首先在人中鉴别出的 33 个氨基酸的序列,包含据报导已在猪、大鼠、鸡、毛丝鼠、犬和人中证实的 8 个氨基酸体内 C 端片段(“CCK-8”)。其它种变体包括存在于猪、犬和豚鼠中的 39 个氨基酸的序列,存在于猫、犬和人中的 58 个氨基酸的序列,与 CCK 和胃泌素均同源的 47 个氨基酸的序列。C-端硫酸化八肽序列(CCK-8)在种间相对保守,可为啮齿动物外周组织中最小的生物活性序列。因此,术语 CCK-33 一般指人 CCK(1-33),而 CCK-8(CCK(26-33))指 C 端 8 肽,其一般既可硫酸化,也可未硫酸化,除非另有说明。此外,五肽胃泌素或 CCK-5 指 C 端肽 CCK(29-33), CCK-4 指 C 端四肽 CCK(30-33)。

[0135] 业已报道 A 型受体亚型(CCK_A)是硫酸化八肽选择性的。已在整个脑和胃中鉴别出 B 型受体亚型(CCK_B),据报道其不需要硫酸化或全部 8 个氨基酸。

[0136] CCK 类似物的各种体内和体外筛选方法是本领域已知的。实例包括体内实验和体外实验,体内实验包括在快速静脉内注射要检测其 CCK 样活性的化合物后观察犬或豚鼠胆囊的收缩,体外实验使用兔胆囊条检测。参见 Walsh,“Gastrointestinal Hormones”,载于 Physiology of the Gastrointestinal Tract(第 3 版,1994 ;Raven Press, New York)。

[0137] 某些具有 CCK 活性的优选 CCK 和 CCK 类似物包括:

[0138]

SEQ ID :	
141	DY(SO ₃ H)MGW MDF
142	DYMGW MDF
143	MGW MDF
144	GW MDF
145	W MDF

146	KDY (SO ₃ H) MGW MDF
147	KDYM GW MDF
148	KMGW MDF
149	KGW MDF
150	KW MDF

[0139] 如本领域所知, 这样的 CCK 肽优选酰胺化, 但在本发明背景下, 任选可为酸形式, 除非另有说明。

[0140] 瘦蛋白家族

[0141] 用于本发明的组分肽激素还包括瘦蛋白家族肽激素。天然瘦蛋白家族肽激素是本领域已知的, 功能性类似物和衍生物也是已知的。本文描述了某些优选的天然肽、肽类似物和衍生物, 但是, 应当认识到, 具有本领域已知激素活性的任何已知瘦蛋白家族肽都可连同本发明一起使用。

[0142] 本领域已知的任何瘦蛋白类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中, 瘦蛋白类似物和衍生物具有天然瘦蛋白的至少一种激素活性。在某些实施方案中, 瘦蛋白类似物是天然瘦蛋白能够特异性结合的受体的激动剂。优选的瘦蛋白类似物和衍生物包括描述于例如 W02004/039832、W098/55139、W098/12224 和 W097/02004 的物质, 所有这些文献都通过引用结合到本文中。

[0143] 示例性的瘦蛋白类似物包括这样的类似物: 其中 43 位的氨基酸被 Asp 或 Glu 取代; 48 位的氨基酸被 Ala 取代; 49 位的氨基酸被 Glu 取代或缺失; 75 位的氨基酸被 Ala 取代; 89 位的氨基酸被 Leu 取代; 93 位的氨基酸被 Asp 或 Glu 取代; 98 位的氨基酸被 Ala 取代; 117 位的氨基酸被 Ser 取代, 139 位的氨基酸被 Leu 取代, 167 位的氨基酸被 Ser 取代, 或其任意组合。

[0144] 某些具有瘦蛋白活性的优选瘦蛋白和瘦蛋白类似物包括:

[0145]

SEQ ID :	
151	⁴³ Asp- 瘦蛋白
152	⁴³ Glu- 瘦蛋白
153	⁴⁸ Ala- 瘦蛋白
154	⁴⁹ Glu- 瘦蛋白
155	⁴⁹ 脱-AA- 瘦蛋白
156	⁷⁵ Ala- 瘦蛋白

157	⁸⁹ Leu- 瘦蛋白
158	⁹³ Asp- 瘦蛋白
159	⁹³ Glu- 瘦蛋白
160	⁹⁸ Ala- 瘦蛋白
161	¹¹⁷ Ser- 瘦蛋白
162	¹³⁹ Leu- 瘦蛋白
163	¹⁶⁷ Ser- 瘦蛋白
164	⁴³ Asp ⁴⁹ Glu- 瘦蛋白
165	⁴³ Asp, ⁷⁵ Ala- 瘦蛋白
166	⁸⁹ Leu, ¹¹⁷ Ser- 瘦蛋白

[0146]

167	⁹³ Glu, ¹⁶⁷ Ser- 瘦蛋白
-----	--

[0147] PPF 家族

[0148] 用于本发明的组分肽激素还包括 PPF 肽激素,包括 PP 和 PYY。天然 PPF 肽激素是本领域已知的,功能性肽类似物和衍生物也是已知的。本文描述了某些优选的天然肽、肽类似物和衍生物,但是,应当认识到,具有本领域已知激素活性的任何已知 PPF 家族肽都可连同本发明一起使用。

[0149] 本领域已知的任何 PPF 类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中,PPF 类似物和衍生物具有天然 PPF 多肽的至少一种激素活性。在某些实施方案中,PPF 类似物是天然 PPF 多肽能够特异性结合的受体的激动剂。优选的 PPF 类似物和衍生物包括描述于 W003/026591 和 W003/057235 的物质,这些文献通过引用整体结合到本文中。

[0150] 在一个实施方案中,具有至少一种 PPF 激素活性的优选 PPF 类似物和衍生物一般包含至少两个 PYY 基序,包括聚脯氨酸基序和 C 端尾基序。这样的类似物一般描述于 2004 年 2 月 11 日提交的美国临时申请第 60/543,406 号,其通过引用结合到本文中。其它优选的 PPF 类似物公开于随函同时提交的题为“Pancreatic Polypeptide Family Motifs and Polypeptides Comprising the Same”的 PCT/US05/[XXXXX],代理律师档案号 18528.832,其内容通过引用结合到本文中。作为背景,研究已提示,Y 受体结合亲和性的差异与二级和三级结构差异有关。参见例如 Keire 等,Biochemistry2000,39,9935-9942。天然猪 PYY 已表征为包含由残基 23、24 和 25 处的结分隔的残基 17 至 22 和 25 至 33 两个 C 端螺旋节段、以残基 12-14 为中心的转角以及在残基 30 和 31 附近折叠的 N 端。此外,全长猪 PYY 已表征为包含 PP 折叠,由 N 端和 C 端残基中的疏水相互作用稳定。参见上文出处。

[0151] “PYY”基序一般为天然 PP 家族多肽的一级、二级或三级结构组件,其对生物活性

是关键性的,即生物活性在基序缺失或紊乱时显著下降。优选的 PYY 基序包括天然 PP 家族多肽的 N-端聚脯氨酸 II 型基序、天然 PP 家族多肽的 II 型 β -转角基序、在天然 PP 家族多肽 C 末端的 α -螺旋基序和天然 PP 家族多肽的 C-端尾基序。更具体地说,在 N-端聚脯氨酸区中,对应于天然 PP 家族多肽的残基 5 和 8 的氨基酸一般保守为脯氨酸。II 型 β -转角基序一般包括对应于天然 PP 家族多肽的残基 12-14 的氨基酸。 α -螺旋基序一般可由对应于天然 PP 家族多肽的大约残基 14 的氨基酸延伸至任意点,直到 C 末端并包含 C 末端,只要 α -螺旋基序包含足够数目的氨基酸残基,使得在溶液中形成 α -螺旋转角。 α -螺旋基序还可包含对天然 PP 家族组列的氨基酸置换、插入和缺失,只要 α -螺旋转角仍在溶液中形成。C-端尾基序一般包含对应于天然 PP 家族多肽最后约 10 个残基的氨基酸,更优选为天然 PP 家族多肽的最后 7、6 或 5 个残基,更优选为氨基酸残基 32-35。

[0152] 优选的 PYY 类似物包括在不对应于聚脯氨酸基序和 / 或 C-端尾基序的 PYY 分子区域中具有内部缺失、插入和置换的类似物。例如,预期在 4、6、7、9 或 10 位内部缺失。

[0153] 肠降血糖素和肠降血糖素模拟物

[0154] 用于本发明的组分肽激素还包括 GLP-1 肽激素。天然 GLP-1 肽激素,包括 GLP-1 (1-37)、GLP-1 (7-37) 和 GLP-1 (7-36) 酰胺,是本领域已知的,功能肽类似物和衍生物也是已知的。本文使用的 GLP-1 指所有天然形式的 GLP-1 肽激素。本文描述了某些优选天然肽、肽类似物和衍生物,但是,应当认识到,具有本领域已知激素活性的任何已知 GLP-1 肽都可连同本发明一起使用。

[0155] 本领域已知的任何 GLP-1 肽类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中,GLP-1 肽类似物和衍生物具有天然 GLP-1 肽的至少一种激素活性。在某些实施方案中, GLP-1 肽类似物是天然 GLP-1 肽能够特异性结合的受体的激动剂。优选的 GLP-1 肽类似物和衍生物包括描述于例如 W091/11457 的物质,该文献通过引用结合到本文中。

[0156] 本领域已知的 GLP-1 类似物包括:

[0157]

SEQ ID :	
168	⁹ Gln-GLP-1 (7-37)
169	D- ⁹ Gln-GLP-1 (7-37)
170	¹⁶ Thr- ¹⁸ Lys-GLP-1 (7-37)
171	¹⁸ Lys-GLP-1 (7-37)
172	⁸ Gly-GLP-1 (7-36)
173	⁹ Gln-GLP-1 (7-37)
174	D- ⁹ Gln-GLP-1 (7-37)
175	乙酰基 - ⁹ Lys-GLP-1 (7-37)

176	⁹ Thr-GLP-(7-37)
177	D- ⁹ Thr-GLP-1 (7-37)
178	⁹ Asn-GLP-1 (7-37)
179	D- ⁹ Asn-GLP-1 (7-37)
180	²² Ser ²³ Arg ²⁴ Arg ²⁶ Gln-GLP-1 (7-37)
181	¹⁶ Thr ¹⁸ Lys-GLP-1 (7-37)
182	¹⁸ Lys-GLP-1 (7-37)
183	²³ Arg-GLP-1 (7-37)
184	²⁴ Arg-GLP-1 (7-37)

[0158] 如本领域所知,这样的 GLP-1 类似物优选酰胺化,但在本发明背景下,其可任选为酸形式,除非另有说明。

[0159] 其它 GLP-1 类似物和衍生物公开于美国专利第 5,545,618 号,该专利通过引用结合到本文中。一组优选的 GLP-1 类似物和衍生物包括公开于美国专利第 6,747,006 号的物质,该专利通过引用整体结合到本文中。还设想了描述于美国专利第 5,188,666 号的分子在本发明中的用途,该专利特地通过引用结合到本文中。用于本发明的另一组分子包括描述于美国专利第 5,512,549 号的化合物,该专利特地通过引用结合到本文中。用于本发明的另一组优选的 GLP-1 化合物公开于 W091/11457,其通过引用结合到本文中。

[0160] 用于本发明的组分肽激素还包括 GLP-2 肽激素。天然 GLP-2 肽激素,例如大鼠 GLP-2 及其同系物,包括牛 GLP-2、猪 GLP-2、八齿鼠 GLP-2、牛 GLP-2、豚鼠 GLP-2、仓鼠 GLP-2、人 GLP-2、虹鳟鱼 GLP-2 和鸡 GLP-2,是本领域已知的,功能肽类似物和衍生物也是已知的。本文描述了某些优选的天然肽、肽类似物和衍生物,但是,应当认识到,具有本领域已知激素活性的任何已知 GLP-2 肽都可连同本发明一起使用。

[0161] 本领域已知的任何 GLP-2 肽类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中,GLP-2 肽类似物和衍生物具有天然 GLP-2 肽的至少一种激素活性。在某些实施方案中,GLP-2 肽类似物是天然 GLP-2 肽能够特异性结合的受体的激动剂。优选的 GLP-2 肽类似物和衍生物包括描述于例如美国专利序号 08/669,791 和 PCT 申请 PCT/CA97/00252 的物质,这两个文献都通过引用结合到本文中。本领域已知的特异性 GLP-2 类似物包括:在 2 位改变或通过以 Gly 置换 Ala 赋予 DPP-IV 抗性的大鼠或人 GLP-2。

[0162] 用于本发明的组分肽激素还包括泌酸调节肽 (OXM) 肽激素。天然 OXM 肽激素是本领域已知的,功能性肽类似物和衍生物也是已知的。本文描述了某些优选的天然肽、肽类似物和衍生物,但是,应当认识到,具有本领域已知激素活性的任何已知 OXM 肽都可连同本发明一起使用。

[0163] 本领域已知的任何 OXM 肽类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施

方案中, OXM 肽类似物和衍生物具有天然 OXM 肽的至少一种激素活性。在某些实施方案中, OXM 肽类似物是天然 OXM 肽能够特异性结合的受体的激动剂。

[0164] 用于本发明的组分肽激素还包括 Exendin 肽激素。天然 Exendin 肽激素是本领域已知的, 功能性肽类似物和衍生物也是已知的。本文描述了某些优选的天然肽、肽类似物和衍生物, 但是, 应当认识到, 具有本领域已知激素活性的任何已知 Exendin 肽都可连同本发明一起使用。

[0165] 本领域已知的任何 Exendin 肽类似物或衍生物都可连同本发明一起使用。在一个实施方案中, Exendin 肽类似物和衍生物具有天然 Exendin 肽的至少一种激素活性。在某些实施方案中, Exendin 肽类似物是天然 Exendin 肽能够特异性结合的受体的激动剂。

[0166] 优选的 Exendin 类似物包括:

[0167]

SEQ ID:	
185	¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4
186	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4
187	¹⁴ Leu, ²² Ala, ²⁵ Phe-Exendin-4

[0168] 如本领域所知, 这样的 Exendin 类似物优选酰胺化, 但在本发明背景下, 其可任选为酸形式, 除非另有说明。

[0169] 另外的示例性 Exendin 类似物和衍生物描述于 1998 年 8 月 6 日提交的题为“Novel Exendin Agonist Compounds”的 PCT 申请序号 PCT/US98/16387, 其要求 1997 年 8 月 8 日提交的美国专利申请序号 60/055,404 的权益, 这两个申请都通过引用结合到本文中。其它 Exendin 类似物和衍生物描述于 1998 年 11 月 13 日提交的题为“Novel Exendin Agonist Compounds”的 PCT 申请序号 PCT/US98/24210, 其要求 1997 年 11 月 14 日提交的美国临时专利申请第 60/065,442 号的权益, 这两个申请都通过引用结合到本文中。再其它 Exendin 类似物和衍生物描述于 1998 年 11 月 13 日提交的题为“Novel Exendin Agonist Compounds”的 PCT 申请序号 PCT/US98/24273, 其要求 1997 年 11 月 14 日提交的美国临时专利申请第 60/066,029 号的权益, 这两个申请都通过引用结合到本文中。再其它 Exendin 类似物和衍生物描述于 1997 年 8 月 8 日提交的题为“Methods for Regulating Gastrointestinal Activity”的 PCT 申请序号 PCT/US97/14199, 其是 1996 年 8 月 8 日提交的美国专利申请序号 08/694,954 的部分继续申请, 这两个申请都通过引用结合到本文中。再其它 Exendin 类似物和衍生物描述于 1998 年 1 月 7 日提交的题为“Use of Exendins and Agonists Thereof for the Reduction of Food Intake”的 PCT 申请序号 PCT/US98/00449, 其要求 1997 年 1 月 7 日提交的美国临时专利申请第 60/034,905 号的优先权, 这两个申请都通过引用结合到本文中。再其它 Exendin 类似物和衍生物描述于 2003 年 12 月 19 日提交的题为“Compositions for the Treatment and Prevention of Neuropathy”的 US2004/0209803A1, 该申请通过引用结合到本文中。

[0170] 生物活性肽激素组件

[0171] 如上所述, 本发明的杂合多肽一般包含至少两个共价连接在一起的生物活性肽激

素组件。生物活性肽激素组件可为：(a) 天然组分肽激素；(b) 保留激素活性的天然组分肽激素的类似物或衍生物；(c) 保留激素活性的天然组分肽激素的片段；(d) 保留激素活性的天然组分肽激素的类似物或衍生物的片段；(e) 赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征的天然组分肽激素结构基序；或 (f) 赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和 / 或其它药代动力学特征的天然组分肽激素的类似物或衍生物的结构基序。(e) 和 (f) 的结构基序在本文统称为“肽强化物”。

[0172] 优选的生物活性肽激素组件包括选自以下的天然肽激素：胰淀素、ADM、CT、CGRP、垂体中间叶激素、CCK (1-33)、CCK-8、瘦蛋白、PYY (1-36)、PYY (3-36)、GLP-1 (1-37)、GLP-1 (7-37)、GLP-1 (7-36)、GLP-2、OXM、Exendin-3 和 Exendin-4。

[0173] 其它优选的生物活性肽激素组件包括选自以下的组分肽激素的类似物和衍生物：胰淀素、ADM、CT、CGRP、垂体中间叶激素、CCK、瘦蛋白、PYY (1-36)、PYY (3-36)、GLP-1 (1-37)、GLP-1 (7-37)、GLP-1 (7-36)、GLP-2、OXM、Exendin-3 和 Exendin-4，其中所述类似物或衍生物具有组分肽激素的至少一种激素活性。如本文更全面地描述和本领域所知，类似物可包含组分肽激素氨基酸序列的一个或多个插入、缺失或置换，衍生物可包含类似物或组分肽激素的氨基酸残基的一个或多个化学修饰。

[0174] 更具体地说，类似物和衍生物可选自上述和 / 或本领域所知的任何类似物和衍生物。用作本发明的生物活性肽激素组件、具有至少一种激素活性的特别优选的类似物和衍生物包括以下物质：

[0175]

胰 淀 素:	² Ala-h-胰淀素、 ²⁷ Ala-h-胰淀素、 ²⁸ Pro-h-胰淀素、 ^{25,28} Pro-h-胰淀素、 ^{25,28,29} Pro-h-胰淀素、 ²⁵ Pro、 ²⁶ Val、 ^{28,29} Pro-h-胰淀素、 ¹⁸ Arg、 ^{25,28} Pro-h-胰淀素、 ¹⁸ Arg、 ^{25,28,29} Pro-h-胰淀素、 ²⁵ Pro、 ²⁶ Val、 ^{28,29} Pro-h-胰淀素、 ¹⁸ Arg、 ²³ Leu、 ^{25,28,29} Pro-h-胰淀素、 ¹⁸ Arg、 ²³ Leu、 ^{25,28} Pro-h-胰淀素和 2,7-环-[² Asp, ⁷ Lys]-h-胰淀素
CT:	¹⁴ Gln-sCT、 ¹⁸ Arg-sCT、 ^{11,18} Arg-sCT、 ¹⁴ Gln、 ¹⁸ Arg-sCT、 ¹⁴ Gln、 ^{11,18} Arg-sCT
CGRP:	³⁶ D-Ser-CGRP、 ³⁶ D-Thr-CGRP、 ³⁶ D-Asp-CGRP、 ³⁶ D-Asn-CGRP、 ³⁶ Ser-CGRP、 ³⁶ Hse-CGRP、 ³⁶ Asp-CGRP、 ³⁶ Thr-CGRP、 ³⁶ Asn-CGRP
AFP-6:	TQAQLLRVGCNLTSCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY、 TQAQLLRVGCDTATCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY、 TQAQLLRVGMVLGTMQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY、 TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVEPSSPHSY、 TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQESAPVEPSSPHSY
CCK:	DY(OSO ₃ H)MGWMDF、DYMGMWMDF、MGWMDF、 GWWMDF、WMDF、KDY(OSO ₃ H)MGWMDF、 KDYMGWMDF、KMGWMDF、KGWMDF、KWWMDF
瘦 蛋 白:	⁴³ Asp-瘦蛋白、 ⁴³ Glu-瘦蛋白、 ⁴⁸ Ala-瘦蛋白、 ⁴⁹ Glu-瘦蛋白、 ⁴⁹ 脱-AA-瘦蛋白、 ⁷⁵ Ala-瘦蛋白、 ⁸⁹ Leu-瘦蛋白、 ⁹³ Asp-瘦蛋白、 ⁹³ Glu-瘦蛋白、 ⁹⁸ Ala-瘦蛋白、 ¹³⁹ Leu-瘦蛋白

[0176]

PYY:	³ Leu-PYY、 ³ Val-PYY、 ⁴ Arg-PYY、 ⁴ Gln-PYY、 ⁴ Asn-PYY、 ²⁵ Lys-PYY、 ³⁴ Pro-PYY、 ³⁴ His-PYY、 ^{1,36} Tyr-PYY、 ¹³ Pro ¹⁴ Ala-PYY、 ³¹ Leu ³⁴ Pro-PYY、脱-AA-4-PYY
GLP-1:	⁹ Gln-GLP-1(7-37)、D- ⁹ Gln-GLP-1(7-37)、 ¹⁶ Thr- ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)、 ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)、 ⁸ Gly-GLP-1(7-36)、 ⁹ Gln-GLP-1(7-37)、D- ⁹ Gln-GLP-1(7-37)、乙酰基- ⁹ Lys-GLP-1(7-37)、 ⁹ Thr-GLP-1(7-37)、D- ⁹ Thr-GLP-1(7-37)、 ⁹ Asn-GLP-1(7-37)、D- ⁹ Asn-GLP-1(7-37)、 ²² Ser ²³ Arg ²⁴ Arg ²⁶ Gln-GLP-1(7-37)、 ¹⁶ Thr ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)、 ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)、 ²³ Arg-GLP-1(7-37)、 ²⁴ Arg-GLP-1(7-37)
Exendin :	¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4、 ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4、 ⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4 和 ¹⁴ Leu, ²² Ala, ²⁵ Phe-Exendin-4

[0177] 如本领域所知,这样的肽化合物优选酰胺化,但在本发明背景下,其可任选为酸形式,除非另有说明。

[0178] 再其它优选的生物活性肽激素组件包括选自以下的组分肽激素的片段:胰淀素、ADM、CT、CGRP、垂体中间叶激素、CCK、瘦蛋白、PYY(1-36)、PYY(3-36)、GLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)、GLP-1(7-36)、GLP-2、OXM、Exendin-3 和 Exendin-4,其中所述片段具有组分肽激素的至少一种激素活性。

[0179] 再其它优选的生物活性肽激素组件包括选自以下的组分肽激素类似物或衍生物的片段:胰淀素、ADM、CT、CGRP、垂体中间叶激素、CCK、瘦蛋白、PYY(1-36)、PYY(3-36)、GLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)、GLP-1(7-36)、GLP-2、OXM、Exendin-3 和 Exendin-4,其中所述片段具有组分肽激素的至少一种激素活性。此外,如本文更全面地描述和本领域所知,类似物可包含组分肽激素氨基酸序列的一个或多个插入、缺失或置换,衍生物可包含类似物或组分肽激素的氨基酸残基的一个或多个化学修饰。

[0180] 具有至少一种激素活性的某些优选片段包括以下物质。但是,应当理解的是,设想了上述类似物和衍生物以及本领域已知片段的组合,包括下述优选片段。

[0181]

胰淀素:	胰淀素(1-36)、胰淀素(1-35)、胰淀素(1-20)、胰淀素(1-18)、 胰淀素(1-17)、胰淀素(1-16)、胰淀素(1-15)、胰淀素(1-7)
CT:	CT(8-32)、CT(8-27)、CT(8-26)、CT(8-10)、CT(18-26)、 CT(18-27)
AFP-6:	AFP-6(18-27)
CCK:	CCK-8、CCK-5、CCK-4
瘦蛋白:	瘦蛋白(22-167)、瘦蛋白(56-73)
PYY:	PYY(1-35)、PYY(1-30)、PYY(1-25)、PYY(1-15)、 PYY(1-10)、PYY(2-36)、PYY(3-36)、PYY(4-36)、PYY(5-36)
GLP-1:	GLP-1(7-37)、GLP-1(7-36)、GLP-1(7-35)
Exendin:	Exendin-4(1-27)、Exendin-4(1-28)、Exendin-4(1-29)、 Exendin-4(1-30)或更长

[0182] 此外,如本领域所知,这样的肽化合物优选可酰胺化,但在本发明背景下,其可任选为酸形式,除非另有说明。而且,上述优选的片段可与本文论述或本领域已知的任何类似物或衍生物组合。例如,优选的类似物片段可包括 ^5Ala , ^{14}Leu , ^{25}Phe -Exendin-4(1-28)、 ^{14}Leu , ^{25}Phe -Exendin-4(1-27)、 ^5Ala , ^{14}Leu , ^{25}Phe -Exendin-4(1-28)、 ^{14}Leu , ^{25}Phe -Exendin-4(1-27) 或所公开的片段、类似物和衍生物的任何其它组合。

[0183] 再其它优选的生物活性肽组件包括“肽强化物”,即赋予杂合多肽所需化学稳定性、构象稳定性、代谢稳定性、受体相互作用、蛋白酶抑制和/或其它药代动力学特征的组分肽激素(包括其类似物和衍生物)的结构基序。示例性的肽强化物包括以下物质。此外,应当理解的是,设想了上述类似物和衍生物以及以下生物活性肽组件的组合。例如,还设想了本领域已知和/或上述的胰淀素家族肽激素类似物和衍生物的最后6个氨基酸残基作为优选的生物活性肽组件。

[0184]

胰淀素家族	胰淀素(32-37)、胰淀素(33-37)、胰淀素(34-37)、胰淀素(35-37)、胰淀素(36-37)、胰淀素(37)、ADM(47-52)、ADM(48-52)、ADM(49-52)、ADM(50-52)、ADM(51-52)、ADM(52)、CT(27-32)、CT(27-32)、CT(28-32)、CT(29-32)、CT(30-32)、CT(31-32)、CT(32)、CGRP(32-37)、CGRP(33-37)、CGRP(34-37)、CGRP(35-37)、CGRP(36-37)、CGRP(37)、垂体中间叶激素(42-47)、垂体中间叶激素(43-47)、垂体中间叶激素(44-47)、垂体中间叶激素(45-47)、垂体中间叶激素(46-47)、垂体中间叶激素(47)
PYY	PYY(25-36)、PYY(26-36)、PYY(27-36)、PYY(28-36)、PYY(29-36)、PYY(30-36)、PYY(31-36)、PYY(32-36)、PYY(25-35)、PYY(26-35)、PYY(27-35)、PYY(28-35)、PYY(29-35)、PYY(30-35)、PYY(31-35)、PYY(32-35)
GLP-1 和 2	蛙 GLP-1(29-37)、蛙 GLP-1(30-37)、蛙 GLP-2(24-31)、蛙 GLP-2(25-31)
Exendin-4	Exendin-4(31-39)、Exendin-4(32-39)、Exendin-4(33-39)、Exendin-4(34-39)、Exendin-4(35-39)、Exendin-4(36-39)、Exendin-4(37-39)、Exendin-4(38-39)、Exendin-4(39)

[0185] 肽组件选择理由、间隔基团和连接基团

[0186] 本发明的杂合多肽一般包含至少两个本发明的生物活性肽激素组件，其中至少一个生物活性肽激素组件具有至少一种激素活性。具有至少一种激素活性的生物活性肽激素组件可位于杂合多肽的 N-末端、杂合多肽的 C-末端，或者在杂合多肽含两个以上生物活性肽激素组件的情况下，可位于杂合多肽的内部。

[0187] 在某些实施方案中，可优选定位具有至少一种激素活性的生物活性肽激素组件，使得生物活性肽激素组件的 C-末端酰胺化。可通过将组件定位在杂合多肽的 C-末端，或通过将组件以 C-端至 N-端方向排列在杂合多肽的 N-末端，实现生物活性肽激素组件 C-末端酰胺化。在两种排列中，生物活性肽激素组件的 C-末端都可用于酰胺化。其中优选 C-端酰胺化的特定组分肽激素可包括胰淀素家族肽激素、CCK、PYY、hGLP-1 (7-36) 和 hGLP-2。其中不一定优选 C-端酰胺化（除非另有说明，否则其中在组件 C-末端延长易被接受）的特定组分肽激素包括 Exendin-4、Exendin-4(1-28)、GLP-1 (7-37)、蛙 GLP-1 (7-36) 和蛙 GLP-2。但是，如果这些组分肽激素位于杂合多肽的 C-末端，则其仍可任选酰胺化，实际上可优选任选酰胺化。

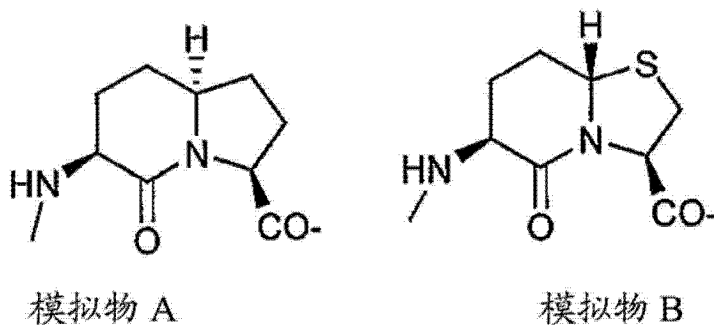
[0188] 生物活性肽激素组件可以本领域已知的任何方式共价连接。可使用稳定的连接，

或者可使用可切割的连接。在一个实施方案中,第一个组件的羧基可直接连接至第二个组件的氨基。在另一个实施方案中,可使用连接基团连接组件。此外,如果有需要,可使用本领域已知的间隔基团或转角诱发物稳定连接。作为实例,当N-端定位的生物活性肽激素组件不需要C-末端酰胺化时,组件可直接地或使用本领域已知的任何合适连接基团连接至第二个组件,所述连接基团例如为烷基;PEG;氨基酸,例如Lys、Glu、 β -Ala;聚氨基酸,例如聚-his、聚-arg、聚-lys、聚-ala、Gly-Lys-Arg(GKR)等;双功能接头(参见例如Pierce catalog, Rockford, IL);氨基己酰基(“Aca”); β -丙氨酰,8-氨基-3,6-二氧杂辛酰基,或本领域已知的其它可切割和不可切割的接头。

[0189] 当N-端定位的生物活性肽激素组件需要C-末端酰胺化时,可使用本领域已知的任何合适连接基团将组件再连接至第二个组件。更具体地说,在以C-端至N-端方向排列具有至少一种激素活性的生物活性肽激素组件而产生氨基至氨基键的情况下,优选的连接基团包括二羧酸、烷基、PEG和氨基酸,例如Lys、Cys和Glu。

[0190] 如上所述,杂合多肽优选还可包括间隔基团,以进一步稳定生物活性肽激素组件的连接。可使用本领域已知的任何间隔基团或转角诱导物。作为实例,所提及的 β -转角模拟物包括以下图示的模拟物A和模拟物B,也叫做Ala-Aib和Ala-Pro二肽。

[0191]



[0192] 示例性组合和具体实施方案

[0193] 形成本发明杂合多肽的生物活性肽激素组件的示例性组合包括选自以下的两个或更多个生物活性肽激素组件的组合:天然肽激素、具有至少一种激素活性的肽激素类似物和衍生物、具有至少一种激素活性的天然肽激素片段、具有至少一种激素活性的肽激素类似物和衍生物的片段,以及肽强化物,前提条件是至少一个组件具有至少一种激素活性。

[0194] 本发明的杂合多肽包含至少两个生物活性肽激素组件,其中每个组件都由组分肽激素组成。在本发明背景下,杂合多肽的组分肽激素可相同或不同,前提条件是至少两个组分肽激素不同。在一个优选实施方案中,至少两个组分肽激素来自不同的肽激素家族,例如胰淀素家族、CCK、瘦蛋白家族、PPF、胰高血糖素家族和Exendin家族。

[0195] 在某些实施方案中,本发明的杂合多肽可包含两个或更多个具有至少一种激素活性的组件。例如,杂合多肽可包含具有至少一种激素活性的第一肽激素或类似物的片段,其共价连接至至少一个另外的肽激素类似物的片段。另外的片段任选可具有至少一种激素活性。第一肽激素可与另外的肽激素相同或不同,前提条件是至少一个另外的肽激素与第一肽激素不同,第一个激素活性可与任选的另外的激素活性相同或不同。

[0196] 在其它实施方案中,本发明的杂合多肽可包含一个或多个具有至少一种激素活性的组件,其与一个或多个肽强化物组件组合。例如,具有至少一种激素活性的第一肽激素的

片段可共价连接至肽强化物,或具有至少一种激素活性的第一肽激素的片段可共价连接至具有至少一种激素活性的第二肽激素,第二肽激素又连接至肽强化物。或者,肽强化物可位于两个肽激素组件之间,作为稳定性间隔基团。此外,第一肽激素可与第二肽激素相同或不同,第一肽激素的活性可与第二肽激素的活性相同或不同。

[0197] 在另一个实施方案中,本发明的杂合多肽可包含 2、3、4 或更多个生物活性肽激素组件。示例性的组合包括具有激素活性的组件与 1、2 或 3 个肽强化物组合;两个具有激素活性的组件和 1 或 2 个肽强化物组合;3 个具有激素活性的组件和 1 个肽强化物组合等。

[0198] 组分肽激素优选选自胰淀素、肾上腺髓质素、降钙素、降钙素基因相关肽、垂体中间叶激素、缩胆囊素、瘦蛋白、肽 YY、胰高血糖素样肽-1、胰高血糖素样肽 2、泌酸调节肽或 Exendin-4。

[0199] 更具体的说,优选的组件组合包括含 Exendin、胰淀素和 PYY 作为组分肽激素的组合。具体的组合包括 Exendin-4/PYY 和 PYY/Exendin-4 组合,有和没有间隔基团或连接基团。其它组合包括 Exendin/胰淀素和胰淀素/Exendin 组合,有和没有间隔基团或连接基团。再其它组合包括胰淀素/PYY 和 PYY/胰淀素组合,有和没有间隔基团或连接基团。

[0200] 在一方面,优选的组件组合包括含第一个组件和至少一个另外的生物活性肽激素组件的组合,第一个组件包含 Exendin-4、具有至少一种激素活性的 Exendin-4 片段、具有至少一种激素活性的 Exendin-4 类似物或衍生物,或具有至少一种激素活性的 Exendin-4 类似物片段。在一个实施方案中,第一个组件连接至 1、2 或 3 个另外的生物活性肽激素组件。

[0201] 在优选的实施方案中,含 Exendin-4 肽的第一个组件连接至第二个生物活性肽激素组件,该组件含具有至少一种激素活性的胰淀素肽。在另一个实施方案中,第二个组件进一步连接至第三个生物活性肽激素组件,该组件含具有至少一种激素活性的降钙素肽。在再另一个实施方案中,第三个组件可进一步连接至第四个生物活性肽激素组件,该组件含选自胰淀素肽的肽强化物。在一个实施方案中,第一个组件可位于杂合多肽的 C-末端。或者,第一个组件可位于杂合多肽的 N-末端。在某些实施方案中,如果需要连接组件,可插入间隔基团或接头,例如 β Ala。

[0202] 优选的 Exendin-4 肽包括:Exendin-4、Exendin-4(1-27)、Exendin-4(1-28)、 $^{14}\text{Leu}^{25}\text{Phe}$ -Exendin-4(1-28) 和 ^5Ala , ^{14}Leu , ^{25}Phe -Exendin-4(1-28)。具有至少一种激素活性的优选胰淀素肽包括胰淀素;胰淀素片段,例如胰淀素(1-17)、胰淀素(1-16)、胰淀素(1-15)和胰淀素(1-7);和胰淀素类似物,例如普兰林肽、 ^2Ala -h-胰淀素、 ^{27}Ala -h-胰淀素,及其片段。具有至少一种激素活性的优选降钙素肽包括 sCT;sCT 片段,例如 sCT(8-10)、sCT(8-27);和降钙素类似物,例如 ^{18}Arg -sCT、 ^{14}Gln , ^{18}Arg -sCT、 ^{14}Gln , $^{11,8}\text{Arg}$ -sCT, 及其片段。优选的胰淀素肽强化物包括胰淀素(32-37)、胰淀素(33-37)和胰淀素(34-37)及其类似物。连同本发明一起使用的胰淀素/sCT 组合包括公开于随函同时提交的 PCT/US05/[XXXXX]-Amylin Family Agonist,代理律师档案号 18528.835,其通过引用结合到本文中。

[0203] 在一方面,优选的组件组合包括含第一个组件和肽强化物的组合,第一个组件包含 Exendin-4、具有至少一种激素活性的 Exendin-4 片段、具有至少一种激素活性的 Exendin-4 类似物或衍生物,或具有至少一种激素活性的 Exendin-4 类似物片段。优选的 Exendin-4 化合物包括:Exendin-4、Exendin-4(1-27)、Exendin-4(1-28)、 ^{14}Leu ,

²⁵Phe-Exendin-4(1-28) 和 ⁵Ala, ¹⁴Leu, ²⁵Phe-Exendin-4(1-28)。优选的肽强化物包括：PYY(25-36)、PYY(30-36) 和 PYY(31-36)。在一个实施方案中，第一个组件可定位在杂合多肽的 C- 末端，肽强化物定位在杂合多肽的 N- 末端。或者，第一个组件可定位在杂合多肽的 N- 末端，肽强化物可定位在杂合多肽的 C- 末端。在某些实施方案中，如果需要连接组件，可插入间隔基团或接头，例如 βAla。

[0204] 在另一方面，优选的组件组合包括含第一个组件和第二个组件的组合，第一个组件包含 Exendin-4、具有至少一种激素活性的 Exendin-4 片段、具有至少一种激素活性的 Exendin-4 类似物或衍生物，或具有至少一种激素活性的 Exendin-4 类似物片段，第二个组件包含 CCK、具有至少一种激素活性的 CCK 片段、具有至少一种激素活性的 CCK 类似物或衍生物，或具有至少一种激素活性的 CCK 类似物片段。此外，优选的 Exendin-4 化合物包括：Exendin-4、Exendin-4(1-27)、Exendin-4(1-28)、¹⁴Leu, ²⁵Phe-Exendin-4(1-28) ⁵Ala, ¹⁴Leu, ²⁵Phe-Exendin-4(1-28) 和 ¹⁴Leu-Exendin-4(1-28)。优选的 CCK 化合物包括：CCK-8 和 CCK-8(Phe(CH₂SO₃))。在一个实施方案中，第一个组件定位在杂合多肽的 C- 末端，第二个组件定位在杂合多肽的 N- 末端。或者，第一个组件可定位在杂合多肽的 N- 末端，第二个组件定位在杂合多肽的 C- 末端。在某些实施方案中，如果需要连接组件，可插入间隔基团或接头，例如 βAla。

[0205] 在另一方面，优选的组件组合包括含第一个组件和第二个组件的组合，第一个组件包含胰淀素、具有至少一种激素活性的胰淀素片段、具有至少一种激素活性的胰淀素类似物或衍生物，或具有至少一种激素活性的胰淀素类似物片段，第二个组件包含肽强化物，例如 PYY(25-36) 或 PYY(30-36)。在一个实施方案中，第一个组件定位在杂合多肽的 C- 末端，肽强化物定位在杂合多肽的 N- 末端。或者，第一个组件可定位在杂合多肽的 N- 末端，肽强化物可定位在杂合多肽的 C- 末端。在某些实施方案中，如果需要连接组件，可插入间隔基团或接头，例如 βAla。

[0206] 其它优选的组件组合包括含 Exendin 和 CCK 组合的组合，或包含胰淀素、降钙素和 CCK 作为三元组合的组合。具体的组合包括 Exendin/CCK 和 CCK/Exendin，有和没有间隔基团或接头和连接基团。其它组合包括 CCK/ 胰淀素 / 降钙素和 CCK/ 胰淀素 / 降钙素 / 胰淀素，有和没有间隔基团或连接基团。根据杂合多肽的需要特性，每个组件均可独立地为肽强化物，或可具有激素活性。

[0207] 再其它优选的组件组合包括含 Exendin、胰淀素和降钙素组合作为三杂合和四杂合分子的组合。示例性的组合包括 Exendin/ 胰淀素 / 降钙素、Exendin/ 胰淀素 / 降钙素 / 胰淀素、胰淀素 / 降钙素 / Exendin 和胰淀素 / 降钙素 / 胰淀素 / Exendin 组合，有和没有间隔基团或连接基团。根据杂合多肽的需要特性，每个组件均可独立地为肽强化物，或可具有激素活性。

[0208] 在一个实施方案中，当具有至少一种激素活性的一个生物活性肽激素组件为胰淀素或其类似物或片段、而第二个生物活性肽激素组件含 CCK 时，则杂合多肽优选应包含选自不同组分肽激素的第三个生物活性肽激素组件。示例性的第三个生物活性肽激素组件包括降钙素，更优选为鲑鱼降钙素、其类似物或片段。

[0209] 在另一个实施方案中，当具有至少一种激素活性的一个生物活性肽激素组件为胰淀素或其类似物或片段、而第二个生物活性肽激素组件含 CT 时，则杂合多肽优选应包含选

自不同组分肽激素的第三个生物活性肽激素组件。示例性的第三个生物活性肽激素组件包括 Exendin-4、其类似物或片段。

[0210] 在再另一个实施方案中,当具有至少一种激素活性的一个生物活性肽激素组件为 GLP-1 或其类似物或片段、而第二个生物活性肽激素组件为含 Exendin 片段的肽强化物时,则杂合多肽优选应包含选自不同组分肽激素的第三个生物活性肽激素组件。示例性的第三个生物活性肽激素组件包括 PYY(包括其类似物、衍生物和片段)和 CCK(包括其类似物、衍生物和片段)。

[0211] 要理解的是,在上述优选组合的每一种中,所提及的组分肽激素包括所提及的类似物、衍生物、片段,以及与其相关的肽强化物。

[0212] 在一个优选方面,杂合多肽包括:

[0213]

SEQ ID:	
1	Exendin-4-PYY(22-36)
2	Exendin-4-PYY(25-36)
3	Exendin-4-PYY(18-36)
4	Exendin-4-βAla-βAla-PYY(22-36)
5	Exendin-4-βAla-βAla-PYY(25-36)
6	Exendin-4-βAla-βAla-PYY(31-36)
7	Exendin-4(1-28)-PYY(22-36)
8	Exendin-4(1-28)-PYY(25-36)
9	Exendin-4(1-28)-PYY(18-36)
10	Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(22-36)
11	Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(25-36)
12	Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(31-36)
13	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-PYY(18-36)
14	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-PYY(22-36)
15	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-PYY(25-36)
16	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-17)-PYY(18-36)
17	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(22-36)
18	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(25-36)
19	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(31-36)
20	Exendin-4-CCK-8
21	Exendin-4(1-28)-CCK-8
22	Exendin-4(1-28)-CCK-8(Phe(CH ₂ SO ₃))
23	Exendin-4(1-28)-(8-氨基-3,6-二氧杂辛酰基)-CCK-8
24	Exendin-4(1-28)-(8-氨基-3,6-二氧杂辛酰基)-CCK-8(Phe(CH ₂ SO ₃))
25	Exendin-4(1-27)-h 胰淀素(1-7)- ¹⁴ Gln, ^{11,18} Arg-sCT(8-27)-胰淀素(33-37)
26	Exendin-4(1-27)- ^{2,7} Ala-h 胰淀素(1-7)-sCT(8-10)

[0214]

27	$^{29}12\text{Ado-Exendin}(1-28)\text{-h}$ 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
28	$^{29}12\text{Ado-Exendin}(1-28)\text{-}^1$ 脱-Lys-h 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
29	$^{29}3,6\text{-二氧杂辛酰基-Exendin}(1-28)\text{-h}$ 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
30	$^{29}3,6\text{-二氧杂辛酰基-Exendin}(1-28)\text{-}^1$ 脱-Lys-h 胰淀素(1-7), $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
31	$^{29}5\text{ Apa-Exendin}(1-28)\text{-h}$ 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
32	$^{29}5\text{ Apa-Exendin}(1-28)\text{-}^1$ 脱-Lys-h 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
33	$^{29}\beta\text{Ala-}\beta\text{Ala-Exendin}(1-28)\text{-h}$ 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
34	$^{29}\beta\text{Ala-}\beta\text{Ala-Exendin}(1-28)\text{-}^1$ 脱-Lys-h 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
35	$^{29}4,7,10\text{-三氧杂-13-十三烷胺琥珀酰亚胺基-Exendin}(1-28)\text{-h}$ 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
36	$^{29}4,7,10\text{-三氧杂-13-十三烷胺琥珀酰亚胺基-Exendin}(1-28)\text{-}^1$ 脱-Lys-h 胰淀素(1-7)- $^{11,18}\text{Arg-sCt}(8-32)\text{-h}$ 胰淀素(33-37)
37	$\text{CCK-8-GKR-}^{15}\text{Glu-h}$ 胰淀素(1-17)- $^{18}\text{Arg-sCT}(18-26)\text{-}$ 胰淀素(32-37)
38	胰淀素(1-18)-PYY(19-36)
39	异己酰基-STAVL-(Aib)-K(甲酰)-LSQEL-(Aib)-K(甲酰基)-LQT-PYY(18-36)
40	异己酰基-STAVL-(Aib)-K(甲酰)-LSQEL-(Aib)-K(甲酰

[0215]		基)-L-PYY(16-36)
	41	CCK-8-[琥珀酰-Cys]-PYY(3-36)
	42	CCK-8-[双-Cys(N-乙酰)]-PYY(3-36)
	43	CCK-8-[Gly-氨基氧基甲基羰基]-PYY(3-36)

[0216] 本发明的杂合多肽还可包含进一步的修饰,其包括但不限于此杂合多肽氨基酸序列的置换、缺失和插入及其任意组合。在一个优选方面,本发明的杂合多肽包括一个或多个“非必需”氨基酸残基的修饰。在本发明背景下,“非必需”氨基酸残基为在片段(例如组分肽激素片段)的天然人氨基酸序列中可改变(即缺失或置换)而不消除或基本不降低杂合多肽的组分肽激素受体激动剂活性的残基。

[0217] 优选的置换包括保守氨基酸置换。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链或物理化学特征(例如静电、氢键键合、等排、疏水特征)的氨基酸残基取代的置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族是本领域已知的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0218] 本发明还涉及杂合多肽衍生物。这样的衍生物包括缀合至一个或多个水溶性聚合物分子或加入聚氨基酸的杂合多肽,聚合物分子例如聚乙二醇(“PEG”)或各种长度的脂肪酸链(例如硬脂酰、棕榈酰、辛酰等),聚氨基酸例如聚组氨酸、聚精氨酸、聚赖氨酸和聚丙氨酸。对杂合多肽的修饰还可包括小分子取代基,例如短烷基和约束烷基(例如支链、环状、融合、金刚烷基)和芳基。水溶性聚合物分子优选具有约 500 至约 20,000Da 的分子量。

[0219] 这样的聚合物缀合和小分子取代基修饰可单独地发生在杂合多肽的 N 端或 C 端或序列中氨基酸残基的侧链上。或者,沿着杂合多肽可有多数衍生化位点。用赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或半胱氨酸取代一个或多个氨基酸可提供另外的衍生化位点。参见例如美国专利第 5,824,784 号和 5,824,778 号。优选地,杂合多肽可缀合至 1、2 或 3 个聚合物分子。

[0220] 水溶性聚合物分子优选连接至氨基、羧基或巯基,可连接在 N 端或 C 端或赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或半胱氨酸的侧链上。或者,水溶性聚合物分子可与二胺基和二羧基连接。在一个优选实施方案中,本发明的杂合多肽通过赖氨酸氨基酸上的 ϵ 氨基缀合 1、2 或 3 个 PEG 分子。

[0221] 本发明的杂合多肽衍生物还包括一个或多个氨基酸残基具有化学改变的杂合多肽。这样的化学改变包括酰胺化、糖基化、酰化、硫酸化、磷酸化、乙酰化和环化。化学改变可单独地发生在 PPF 杂合多肽的 N 端或 C 端或序列中氨基酸残基的侧链上。在一个实施方案中,这些多肽的 C-端可具有游离 -OH 或 -NH₂ 基团。在另一个实施方案中, N-末端可用异丁氧基羰基、异丙氧基羰基、正丁氧基羰基、乙氧基羰基、异己酰基(isocap)、辛烷基、辛基甘氨酸基(G(Oct))或 8-氨基辛酸基加帽。在一个优选实施方案中,可通过形成二硫键环化。或者,沿着杂合多肽可有多数化学改变位点。

[0222] 在序列表中提供了本发明杂合多肽的实例,并在以下的实施例章节进一步讨论。

[0223] 杂合多肽在治疗或预防代谢疾病或障碍中的用途

[0224] 在本发明的另一方面,提供治疗或预防肥胖的方法,其中该方法包括将治疗或预防有效量的杂合多肽给予有需要的受试者。在一个优选实施方案中,受试者为肥胖或超重受试者。尽管“肥胖”一般定义为身体质量指数超过 30,但对本说明书来说,需要或希望减轻体重的任何受试者,包括身体质量指数低于 30 的受试者,都包括在“肥胖”的范围内。为胰岛素抵抗、葡萄糖不耐受或具有任何形式糖尿病(例如 1 型、2 型或妊娠期糖尿病)的受试者均可由该方法获益。

[0225] 在本发明的其它方面,提供减少食物摄取、降低营养物利用度、引起体重下降、影响机体组成、改变机体能含量或增加能量消耗、治疗糖尿病以及改善脂质谱(包括降低 LDL 胆固醇和甘油三酯水平和/或改变 HDL 胆固醇水平)的方法,其中该方法包括给予受试者有效量的本发明杂合多肽。在一个优选实施方案中,本发明的方法用于治疗或预防可通过在有需要受试者中降低营养物利用度而减轻的病症或障碍,包括给予所述受试者治疗或预防有效量的本发明杂合多肽。这样的病症和障碍包括但不限于高血压、血脂异常、心血管疾病、摄食障碍、胰岛素抵抗、肥胖和任何种类的糖尿病。

[0226] 非为理论所囿,一般认为,通过与 PP 家族中的或类似于 PP 家族的一种或多种独特受体类别相互作用,测定外周给予本发明的杂合多肽在减少食物摄取、延迟胃排空、降低营养物利用度和引起体重下降中的作用。更具体地说,似乎涉及类似于 PYY 优选(或 Y7)受体的一种或多种受体。

[0227] 用于本发明的其它实验包括可测定 PPF 化合物对机体组成的作用的实验。示例性实验可为包括使用用于代谢疾病的膳食诱导肥胖(DIO)小鼠模型的实验。在治疗期之前,可于 4 周龄开始,喂饲雄性 C57BL/6J 小鼠高脂肪膳食(#D12331,58%的卡路里来自脂肪;Research Diets, Inc.),持续 6 周。在研究过程中,小鼠可继续吃其高脂肪膳食。在整个研究中,水可任意提供。为了与 DIO 组对比代谢参数,可对一组相似年龄的非肥胖小鼠喂饲低脂肪膳食(#D12329,11%的卡路里来自脂肪)。

[0228] DIO 小鼠可皮下(SC)肩胛内植入渗透泵,以传递溶媒(50%二甲基亚砜(DMSO)的水溶液)或本发明化合物。后一组的泵可设定为传递任意量,例如 7-28 天内传递 1000 μ g/kg/天的本发明化合物。

[0229] 在整个研究阶段内,可以固定间隔检测体重和食物摄取。可使用全动物间接测热法(Oxymax, Columbus Instruments, Columbus, OH)测定呼吸商(RQ,定义为 CO_2 产生 $\div$ O_2 消耗)和代谢率。可用过量异氟烷麻醉小鼠,检测肥胖指数(两侧附睾脂垫重量)。而且,在测定附睾重量之前,可使用双能 x-射线吸光测定(DEXA)仪器,按照生产商的说明(Lunar Piximus, GE Imaging System),分析每只小鼠的机体组成(瘦组织量、脂肪量)。在本发明方法中,本发明的优选 PPF 多肽是这样的多肽:其在本文描述的一种实验(优选为食物摄取、胃排空、胰腺分泌、体重下降或机体组成实验)中所具有的效力高于组分肽激素在相同实验中的效力。

[0230] 除了在有需要的患者中由于减少食物摄取、体重下降或治疗肥胖而改善高血压之外,本发明的化合物还可用于治疗低血压。

[0231] 本发明的化合物还可用于加强、诱导、增强或恢复胰腺胰岛或细胞中的葡萄糖

反应性。这些作用可用于治疗或预防与代谢疾病相关的病症,例如描述于美国专利申请 US20040228846 的疾病。测定此活性的实验是本领域已知的。例如,在公开的美国专利申请 US20040228846 (其通过引用整体结合到本文中)中,描述了用于胰岛分离和培养的实验以及测定胎儿胰岛成熟度的实验。在专利申请 US20040228846 的实施例中,包括胰多肽(PP)、神经肽 Y(NPY)、神经肽 K(NPK)、PYY、肠促胰液素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和铃蟾肽在内的肠源激素肽购自 Sigma。XI 型胶原酶得自 Sigma。RPMI1640 培养基和胎牛血清得自 Gibco。含抗胰岛素抗体的放免实验试剂盒($[^{125}\text{I}]$ -RIA 试剂盒)购自 Linco, St Louis。

[0232] 产后大鼠胰岛得自 P-02 岁大鼠。成年大鼠胰岛得自 6-8 周龄大鼠。胎大鼠胰岛如下获得。在妊娠日 e21 处死妊娠雌性大鼠。由子宫中取出胎儿。从各幼仔中解剖出 10-14 个胰腺,用 Hanks 缓冲液清洗两次。合并胰腺,悬浮在 6ml 1mg/ml 胶原酶(XI 型, Sigma)中,并于 37°C 以恒定振荡温育 8-10 分钟。通过加入 10 体积的冰冷 Hanks 缓冲液,接着用 Hanks 缓冲液清洗 3 次,终止消化。然后利用 Fico11 梯度纯化胰岛,并在有或没有加入 1tM IBMX 的 10% 胎牛血清(FBS)/RPMI 培养基中培养。在第 5 天结束时,将 20 个胰岛人工挑选入各个试管中,并检测静态胰岛素释放。一般地讲,首先用 KFP 缓冲液清洗胰岛,然后与 1ml 含 3mM(低)葡萄糖的 KFP 缓冲液在恒定振荡下于 37°C 温育 30 分钟。在收集上清液后,接着将胰岛与 17mM(高)葡萄糖于 37°C 温育 1 小时。使用 $[^{125}\text{I}]$ -RIA 试剂盒通过放免实验(RIA)检测低或高葡萄糖刺激释放的胰岛素。在 200ng/ml PYY、PP、CCK、NPK、NPY、肠促胰液素、GLP-1 或铃蟾肽存在下培养 E21 胎胰岛 5 天。

[0233] 还提供使用 Zucker 糖尿病肥胖(ZDF)雄性大鼠的示例性体内实验,ZDF 是在喂饲标准啮齿动物膳食 Purina5008 的所有 fa/fa 雄性大鼠中自发表现出糖尿病的近交(>F30 代)大鼠模型。在 ZDFfa-fa 雄性大鼠中,在约 7 周龄开始出现高血糖,葡萄糖水平(喂饲)通常在 10-11 周龄达到 500mg/DL。在发展糖尿病的过程中胰岛素水平(喂饲)高。但是,到第 19 周龄时,胰岛素降低至约同窝出生的瘦大鼠对照的水平。肥胖大鼠的甘油三酯和胆固醇水平一般高于瘦大鼠的水平。在检测中,每组 6 只大鼠的 3 组 7 周龄 ZDF 大鼠通过 ALZA 泵接受 14 天的输注治疗:1) 溶媒对照,2) 和 3),具有两种不同剂量(分别为 100pmol/kg/小时和 500pmol/kg/小时)的 PYY。在输注前和输注后的第 7 天和第 14 天进行 4 种检测:1) 血浆葡萄糖水平,2) 血浆胰岛素水平,和 3) 血浆甘油三酯(TG)水平,以及口服葡萄糖耐受(OGTT)测试。因此,这些实验可与本发明的化合物一起用于测试所需活性。

[0234] 杂合多肽的其它设想用途包括在中枢神经系统中降低铝(A1)浓度的方法(参见美国专利 6,734,166,其通过引用整体结合到本文中),用于治疗、预防或延迟 Alzheimer 病发作。测定对 A1 的作用的实验是本领域已知的,可见于使用二倍体和 Ts 小鼠的美国专利 6,734,166。这些小鼠单独图养在 Nalgene® 牌代谢笼或聚丙烯笼中,在实验前给小鼠 3 天时间适应笼。在实验过程中小鼠自由获取食物(LabDiet® NIH Ratand Moust/Auto6F5K52, St. Louis, Mo.) 和水,除了在安乐死前 16 小时以外,此时不提供食物。每天对小鼠皮下注射活性化合物或盐水。对于一个实验,在第 13 天结束时处死小鼠,对另一个实验,在第 3 天结束时处死小鼠,收集样品。在干净的聚四氟乙烯衬垫中制备小鼠脑样品并称重,用于在低痕量元素级硝酸中通过微波消化进行分析。然后使用电感耦合等离子体质谱测定法(Nuttall 等, Annals of Clinical and Laboratory Science 25, 3, 264-271 (1995)) 分析样品的 A1 含量。分析过程中的所有组织处理都在使用 HEPA 空气过滤系统的洁净室环境中进行,以使本

底污染最小化。

[0235] 本发明的化合物具有广泛的生物活性,有一些涉及其抗分泌特性和抗动力特性。所述化合物可通过与上皮细胞直接相互作用,或者可能通过抑制刺激肠分泌的激素或神经递质的分泌,抑制胃肠分泌。抗分泌特性包括抑制胃和/或胰腺分泌,可用于治疗或预防疾病和障碍,包括胃炎、胰腺炎、Barrett 食管和胃食管反流病。

[0236] 本发明的化合物用于治疗许多胃肠疾病(参见例如 Harrison' s Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill Inco, New York, 第 12 版),这些胃肠疾病与过量肠电解质和水分泌和降低的吸收相关,例如传染性腹泻、炎性腹泻、短肠综合症或通常在手术例如回肠造口术后发生的腹泻。传染性腹泻的实例包括但不限于急性病毒性腹泻、急性细菌性腹泻(例如沙门氏菌、弧形杆菌和梭状芽胞杆菌或由于原生动物感染)或旅行者腹泻(例如 Norwalk 病毒或轮状病毒)。炎性腹泻的实例包括但不限于吸收障碍综合症、热带口炎性腹泻、慢性胰腺炎、Crohn 病、腹泻和肠易激综合症。还已经发现,本发明的肽可用于治疗与胃肠疾病相关的紧急情况或危及生命的情况,例如在手术后或由于霍乱。

[0237] 和仅用于治疗肠损伤相关综合症(例如腹泻)相反,本发明的化合物还可用于治疗或预防肠损伤。这样的肠损伤可为溃疡性结肠炎、炎性肠病、肠萎缩、肠粘膜脱落和/或肠粘膜功能丧失或为这些疾病的后果(参见 W003/105763,其通过引用整体结合到本文中)。如 W003/105763 所述,用于此活性的检测包括处于 12:12 昼:夜循环中图养的 250-300g 11 周龄雄性 HSD 大鼠,允许其随意获取标准啮齿动物膳食(Teklad LM485, Madison, WI)和水。动物在实验前禁食 24 小时。先前 Morris GP 等,“Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon”1989;96:795-803 已描述了慢性结肠炎的简单且可重现的大鼠模型。其具有相对较长的炎症和溃疡时程,提供了以明确可控方式研究结肠炎疾病病理生理学和评价潜在可应用于人炎性肠病的新治疗的机会。

[0238] 用 3% 异氟烷麻醉大鼠,将大鼠置于设定在 37°C 的可调节加热垫上。将管针经直肠插入结肠 7cm。如 Mazelin 等, Juton Nerv Syst. 1998;73:3845 所述,通过管针将溶解在 50% 乙醇(v/v) 中的半抗原三硝基苯磺酸(TNBS)以 30mg/kg 剂量、0.4-0.6mL 总体积传递入结肠腔中。对照组结肠内接受盐水溶液(NaCl 0.9%)。

[0239] 诱发结肠炎后 4 天,切除麻醉大鼠的结肠,然后使大鼠断头安乐死。检测离体的结肠和脾的重量,对结肠拍照,以记录总体形态学损伤。炎症被定义为充血和肠壁变厚的区域。

[0240] 本发明的杂合多肽还可用于治疗或预防胰腺肿瘤(例如抑制胰腺肿瘤增殖)。本发明的方法包括减少肿瘤细胞增殖。可按照本发明治疗的良性胰腺肿瘤细胞的类型包括浆液性囊腺瘤、微囊性肿瘤和囊性-实体肿瘤。该方法还有效降低恶性胰腺肿瘤细胞(例如由胰腺导管、腺泡或胰岛产生的癌)的增殖。美国专利 5,574,010(其通过引用整体结合到本文中)提供了测试抗增殖特性的示例性实验。例如,' 010 专利指出,PANC-1 和 MiaPaCa-2 是两种人胰腺腺癌细胞系,可由提供者如美国典型培养物保藏中心 ATCC(Rockville, Md) 购买获得。在 NAPCO 水夹套式 5% CO₂ 培养箱中,在补加 10% 胎牛血清、29.2mg/L 谷氨酰胺、25 μg 庆大霉素、5ml 青霉素、链霉素和两性霉素 B 溶液(JRHBiosciences, Lenexa, Kans.) 的 RPMI-1640 培养基中,于 37°C 培养两种肿瘤细胞。当肿瘤细胞达到铺满单层时,1 周 1-2

次用 0.25%胰蛋白酶 (Clonetics, San Diego, Calif.) 分离所有细胞系。在冷冻离心机中于 4℃ 以 500g 沉淀细胞 7 分钟, 将细胞重悬浮在无胰蛋白酶的强化 RPMI1640 培养基中。用血细胞计数板和锥虫蓝计数活细胞。

[0241] 将每种类型的 10,000、20,000、40,000 和 80,000 细胞以每孔 200 μ l 培养基总体积加入到 96 孔微量培养板 (Costar, Cambridge, Mass.) 中。在加入 PYY 或测试肽之前, 使细胞贴壁 24 小时。在加入肽之前更换新鲜培养基。将胰腺肿瘤细胞和 PYY 或测试化合物继续在体外温育 6 小时和 36 小时。将 PYY 以 250pmol、25pmol 和 2.5pmol/ 孔的剂量加入到细胞中 (N = 14)。将测试化合物以 400pmol、40pmol 和 4pmol/ 孔的剂量加入到细胞中 (N = 14)。对照孔接受 2 μ l 10.9% 盐水, 以模拟体积和对贴壁肿瘤细胞的物理干扰。每个 96 孔板都含有 18 个对照孔, 使得可在实验过程中在每个板内进行对比。对于 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞, 均使用各种浓度的 PYY 或测试化合物重复 6 次 96 孔板检测。

[0242] 在温育期结束时, 将溴化 3-(4,5-二甲基噻唑基-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓-溴化 MTr 四唑鎓 (Sigma, St. Louis, Mo.) 以 0.5mg/ml 加入到新鲜培养基中。更换培养基, 将肿瘤细胞与溴化 MTT 四唑鎓于 37℃ 温育 4 小时。在温育结束时, 对培养基抽气。将甲臞晶体沉淀溶解在 200 μ l 二甲基亚砷 (Sigma, St. Louis, Mo.) 中。通过用 ELISA 读数器 (Molecular Devices, Menlo Park, Calif.) 获得 500nm 波长的吸光读数, 对溶解性甲臞进行定量。MTT 实验检测线粒体 NADH 依赖性脱氢酶活性, 其已成为定量肿瘤细胞体外化疗反应性的最敏感和最可靠的方法之一。(Alley, M. C. 等, Cancer Res., 48 :589-601, 1988 ;Carmichael, J. 等, Cancer Res., 47 :936-942, 1987 ;McHale, A. P. 等, Cancer Lett., 41 :315-321, 1988 ;和 Saxton, R. E. 等, J. Clin. Laser Med. and Surg, 10(5) :331-336, 1992)。通过对相同测试条件的孔分组, 并利用单因素 ANOVA 鉴别对照和各种肽浓度治疗之间的差异, 分析 550nm 的吸光读数。

[0243] 还提供示例性的体内实验。利用肽 PYY 和测试化合物检测人胰腺导管腺癌 Mia PaCa-2 的体内生长抑制。将数千至 100,000 个人 MiaPaCa-2 细胞同位移植至 48 只雄性无胸腺小鼠中。1 周后, 用 PYY 或测试化合物以 200pmol/kg/ 小时经微渗透泵治疗动物 4 周。对应的培养物接受盐水。在处死时, 检测肿瘤大小和质量。通过组织学切片证实, 对照小鼠在胰腺中有显著的人癌生长。在第 9 周时, 90% 的对照小鼠具有实质性转移疾病。测试治疗小鼠中肿瘤质量降低达 60.5%, PYY 治疗小鼠中降低达 27%。

[0244] 在优选实施方案中, 对于所有适应症, 以单剂量或分剂量或受控持续释放的约 0.5 μ g/ 天至约 5mg/ 天的剂量, 或以每剂约 0.01 μ g/kg 至约 500 μ g/kg, 更优选约 0.05 μ g/kg 至约 250 μ g/kg, 最优选约 50 μ g/kg 以下, 外周给予本发明的杂合多肽。在这些范围中的剂量随每种类似物或衍生物的效力而变化, 当然, 剂量可由本领域技术人员确定。

[0245] 在本发明方法中, 本发明的杂合多肽可单独地或与一种或多种对降低营养物利用度具有长期或短期作用的其它化合物和组合物一起给予, 其它化合物和组合物包括但不限于含胰淀素或胰淀素类似物激动剂、鲑鱼降钙素、缩胆囊素 (CCK) 或 CCK 激动剂、瘦蛋白 (OB 蛋白) 或瘦蛋白激动剂、Exendin 或 Exendin 类似物激动剂或者 GLP-1 或 GLP-1 类似物激动剂的其它化合物和组合物。合适的胰淀素激动剂包括例如 [^{25,28,29}Pro-] 人胰淀素 (也称为“普兰林肽”, 述于美国专利第 5,686,511 和 5,998,367 号)。使用的 CCK 优选为 CCK 八肽 (CCK-8)。瘦蛋白论述于例如 (Pelleymounter 等, Science 269 :540-3(1995) ;Halaas 等,

Science269 :543-6(1995) ;Campfield 等, Science269 :546-9(1995))。合适的 Exendin 包括 Exendin-3 和 Exendin-4, Exendin 激动剂化合物包括例如描述于 PCT 公开 W099/07404、W099/25727 和 W099/25728 的化合物。

[0246] 多肽生产和纯化

[0247] 可使用本领域已知的标准重组技术或化学肽合成技术(例如使用自动化或半自动化肽合成仪),或这二者,制备本文描述的杂合多肽。

[0248] 可按照常规技术,在溶液中或固相支持体上合成本发明的杂合多肽。可获得市售的各种自动化合成仪,并可按照已知的方法使用。参见例如 Stewart 和 Young, SolidPhase Peptide Synthesis, 第 2 版, Pierce Chemical Co. (1984) ; Tam 等, J. Am. Chem. Soc. 105 : 6442(1983) ; Merrifield, Science232 :341-7(1986) ; 以及 Barany 和 Merrifield, The Peptides, Gross 和 Meienhofer 编辑, Academic Press, New York, 1-284(1979)。可用使用 NMP/HOBt(选项 1) 系统的自动化肽合成仪(例如 430A 型, Applied Biosystems Inc., Foster City, Califbrnia) 和包含加帽的 tBoc 或 Fmoc 化学法(参见 Applied Biosystems 关于 ABI430A 肽合成仪的用户指引, 1.3B 版, 1998 年 7 月 1 日, 第 6 章, 49-70 页, Applied Biosystems, Inc., Foster City, California) 进行固相肽合成。还可使用 Advanced Chem Tech 合成仪(MPS350 型, Louisville, Kentucky) 组装肽。可使用例如 Waters Delta Prep3000 系统和 C4、C8 或 C18 制备型柱(10 μ , 2.2 $\times$ 25cm ; Vydac, Hesperia, California), 通过 RP-HPLC(制备型和分析型)纯化肽。可容易地合成活性肽,然后用设计用于鉴别反应性肽的筛选实验筛选活性肽。

[0249] 或者,可通过本领域众所周知的重组技术生产本发明的杂合多肽。参见例如 Sambrook 等, MolecularCloning. A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold S pring Harbor(1989)。通过重组技术产生的这些杂合多肽可由多核苷酸表达。本领域技术人员会认识到,包括 DNA 和 RNA 在内的编码杂合多肽各种不同片段的多核苷酸,考虑到密码子选择的简并性,可由野生型 cDNA 获得,或者可根据需要工程改造。这些多核苷酸序列可掺入有利于 mRNA 在微生物宿主中转录和翻译的密码子。按照本领域众所周知的方法,可容易地构建这种生产序列。参见例如 W083/04053。以上多核苷酸还可任选地编码 N-端甲硫氨酰残基。可利用本领域已知的方法制备用于本发明的非肽类化合物。例如,可使用本领域已知的方法制备含磷酸盐/酯的氨基酸和含这些氨基酸的肽。参见例如 Bartlett 和 Landen, Bioorg Chem. 14 :356-77(1986)。

[0250] 可利用各种各样的表达载体/宿主系统,以包含和表达杂合多肽编码序列。这些系统包括但不限于微生物,例如用重组噬菌体、质粒或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒 CaMV;烟草花叶病毒, TMV)转染或用细菌表达载体(例如 Ti 或 pBR322 质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。用于重组蛋白生产的哺乳动物细胞包括但不限于 VERO 细胞、HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、COS 细胞(例如 COS-7)、WI38、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PCI2、K562 和 293 细胞。下文描述了蛋白重组表达的示例性方案。

[0251] 因此,本发明提供的多核苷酸序列用于产生新且有用的病毒和质粒 DNA 载体、新且有用的转化和转染原核和真核宿主细胞(包括在培养基中生长的细菌、酵母和哺乳动物

细胞)以及能够表达本发明杂合多肽的宿主细胞的新且有用的培养生长方法。在待缓解嵌合体的组分肽激素生产不足或要满足其水平增加需要的情况下,编码本文杂合多肽的多核苷酸序列可用于基因治疗。

[0252] 本发明还提供本发明杂合多肽的重组 DNA 生产方法。提供由含杂合多肽编码核酸的宿主细胞生产该杂合多肽的方法,其包括:(a)在有利于表达此 DNA 分子的条件下培养含该杂合多肽编码多核苷酸的所述宿主细胞;和(b)获得该杂合多肽。

[0253] 宿主细胞可为原核细胞或真核细胞,包括细菌、哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、猴细胞、幼仓鼠肾细胞、癌细胞或其它细胞)、酵母细胞和昆虫细胞。

[0254] 表达重组蛋白的哺乳动物宿主系统对本领域技术人员来说也是众所周知的。可根据加工表达蛋白或生产某些用于提供蛋白活性的翻译后修饰的特定能力,选择宿主细胞株。这样的多肽修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。切割“前原”形式蛋白的翻译后加工对正确的插入、折叠和/或功能可能也很重要。不同的宿主细胞,例如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38 等,对这样的翻译后活性具有特定的细胞机器和特征机制,可对宿主细胞进行选择,以确保导入的外源蛋白的正确修饰和加工。

[0255] 或者,可使用酵母系统生产本发明的杂合多肽。通过 PCR 扩增杂合多肽 cDNA 的编码区。使用一个含 α 交配因子基因核苷酸 1-20 的引物和与该基因核苷酸 255-235 互补的另一个引物,在 PCR 反应中由酵母基因组 DNA 扩增编码酵母前-原- α 前导序列的 DNA(Kurjan 和 Herskowitz, Cell, 30:933-43(1982))。将前-原- α 前导编码序列和杂合多肽编码序列片段连接入含酵母乙醇脱氢酶(ADH2)启动子的质粒中,使得该启动子引导由融合至成熟杂合多肽的前-原- α 因子组成的融合蛋白的表达。如 Rose 和 Broach, Meth. Enz. 185:234-79, Goeddel 编辑, Academic Press, Inc., San Diego, California(1990) 所述,载体进一步包含克隆位点下游的 ADH2 转录终止子、酵母“2- μ ”复制起点、酵母 leu-2d 基因、酵母 REP1 和 REP2 基因、大肠杆菌 3-内酰胺酶基因和大肠杆菌复制起点。 β -内酰胺酶和 leu-2d 基因分别用于细菌和酵母中的选择。leu-2d 基因还有利于增加质粒在酵母中的拷贝数,以诱导较高水平的表达。REP1 和 REP2 基因编码蛋白参与质粒拷贝数的调节。

[0256] 使用已知方法,例如乙酸锂处理(Steams 等, Meth. Enz. 185:280-97(1990)),将在前述章节中描述的 DNA 构建物转化入酵母细胞中。当生长培养基中的葡萄糖耗尽时诱导 ADH2 启动子(Price 等, Gene 55:287(1987))。前-原- α 序列影响细胞分泌融合蛋白。与此相伴的是酵母 KEX2 蛋白切开成熟 PYY 类似物多肽和前-原序列(Bitter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330-4(1984))。

[0257] 还可以使用市售的表达系统,例如 Pichia 表达系统(Invitrogen, San Diego, California),按照生产商的说明,在酵母中重组表达本发明的杂合多肽。此系统也依靠前-原- α 序列引导分泌,但插入片段的转录在甲醇诱导时由醇氧化酶(AOX1)驱动。通过例如用于由细菌和哺乳动物细胞上清液纯化杂合多肽的方法,由酵母生长培养基中纯化分泌的杂合多肽。

[0258] 或者,可将编码杂合多肽的 cDNA 克隆入杆状病毒表达载体 pVL1393(PharMingen, San Diego, California)中。然后按照生产商的指引(PharMingen),使用含此杂合多肽的载体感染无 sF9 蛋白培养基中的草地夜蛾细胞,并生产重组蛋白。使用肝素-Sepharose 柱(Pharmacia, Piscataway, New Jersey)和串接的分子量筛分柱(Amicon, Beverly,

Massachusetts),由培养基中纯化和浓缩蛋白,并重悬浮在PBS中。SDS-PAGE 分析显示单一条带,确定蛋白大小,用Proton2090 肽测序仪进行Edman 测序确认其N-端序列。

[0259] 例如,可将杂合多肽编码DNA 序列克隆入含所需启动子和任选前导序列的质粒中(参见例如Better 等,Science240 :1041-3(1988))。该构建物的序列可通过自动化测序确认。然后使用采用CaCl₂ 温育和细菌热休克处理的标准方法将质粒转化入大肠杆菌菌株MC1061 中(Sambrook 等,出处同上)。转化的细菌在补加羧苄青霉素的LB 培养基中培养,通过在合适的培养基中生长诱导表达蛋白的生产。如果存在前导序列,则前导序列影响杂合多肽的分泌,并在分泌过程中被切除。利用下文描述的方法由细菌培养基中纯化分泌出的重组蛋白。

[0260] 或者,本发明的杂合多肽可在昆虫系统中表达。用于蛋白表达的昆虫系统是本领域技术人员周知的。在一个这样的系统中,使用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV) 作为在草地夜蛾细胞或银纹夜蛾(*Trichoplusia larvae*) 中表达外源基因的载体。将杂合多肽编码序列克隆入病毒的非必需区域(例如多角体蛋白基因)中,并处于多角体蛋白启动子控制之下。杂合多肽的成功插入将使多角体蛋白基因失活,产生没有外壳蛋白包被的重组病毒。然后使用重组病毒感染草地夜蛾细胞或银纹夜蛾,在其中表达杂合多肽(Smith 等,J. Virol. 46 :584(1983);Engelhard 等,Proc. Nat. Acad. Sci. USA91 :3224-7(1994))。

[0261] 在另一个实施例中,可通过PCR 扩增编码杂合多肽的DNA 序列,并将其克隆入合适的载体中,例如pGEX-3X(Pharmacia, PiscataWay, New Jersey)。pGEX 载体设计用于生产融合蛋白,其包含由载体编码的谷胱甘肽-S-转移酶(GST) 和由插入到载体克隆位点中的DNA 片段编码的蛋白。可生产含例如合适切割位点的PCR 引物。然后可由融合蛋白的GST 部分切割重组融合蛋白。将pGEX-3X/PYY 类似物多肽构建物转化入大肠杆菌XL-1Blue 细胞(Stratagene,La Jolla,California) 中,分离单个转化子,并在LB 培养基(补加羧苄青霉素) 中于37℃培养至600nm 波长的光密度为0.4,接着在0.5mM 异丙基β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) 存在下再温育4 小时。纯化单个转化子的质粒DNA,并使用自动化测序仪部分测序,以确认存在正确方向的目的PPF 杂合多肽编码基因插入片段。

[0262] 预期可作为不溶性包涵体在细菌中生产的融合蛋白可如下纯化。通过离心收集细胞;用0.15M NaCl、10mM Tris(pH8)、1mM EDTA 清洗;并用0.1mg/mL 溶菌酶(Sigma Chemical Co.) 于室温处理15 分钟。超声澄清裂解物,通过以12,000×g 离心10 分钟沉淀细胞碎片。将含融合蛋白的沉淀重悬浮在50mM Tris(pH8) 和10mM EDTA 中,经50%甘油分层,并以6000×g 离心30 分钟。沉淀重悬浮在无Mg⁺⁺ 和Ca⁺⁺ 的标准磷酸缓冲盐溶液(PBS) 中。通过在变性SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分级分离重悬浮沉淀,进一步纯化融合蛋白(Sambrook 等,出处同上)。凝胶浸泡在0.4M KCl 中,以显现蛋白,切下蛋白,并在没有SDS 的凝胶电泳缓冲液中电洗脱。如果GST/PYY 类似物多肽融合蛋白在细菌中作为可溶性蛋白生产,则其可使用GST 纯化模块(Pharmacia Biotech) 纯化。

[0263] 融合蛋白可经历消化,以切开GST 和PPF 杂合多肽。消化反应物(20-40 μg 融合蛋白、20-30 单位人凝血酶(4000U/mg(Sigma) 的0.5mL PBS 溶液) 于室温温育16-48 小时,并上变性SDS-PAGE 凝胶,以分级分离反应产物。将凝胶浸泡在0.4M KCl 中,以显现蛋白条带。使用自动化测序仪(Applied Biosystems473A 型,Foster City, California),通过部

分氨基酸序列分析,可确认对应于杂合多肽预期分子量的蛋白条带的同一性。

[0264] 在特别优选的本发明杂合多肽重组表达方法中,可通过磷酸钙法,用在 pCMV 载体(5' CMV 启动子,3' HGH 聚腺苷酸序列)中含杂合多肽 cDNA 的质粒和 pSV2neo(含 neo 抗性基因)共转染 293 细胞。优选地,载体应当在转染前用 ScaI 线性化。同样,可使用替代性构建物,其使用相似的 pCMV 载体,具有掺入的 neo 基因。通过在 10-14 天的含 0.5mg/mL G418(新霉素样抗生素)的生长培养基中有限稀释,由单个细胞克隆选择稳定细胞系。通过 ELISA 或蛋白质印迹筛选细胞系的杂合多肽表达,并扩增高表达细胞系,以用于大规模生长。

[0265] 优选将转化细胞用于长期、高产的蛋白生产,因此需要稳定表达。一旦应用含选择标记以及所需表达盒的载体转化这样的细胞,就可使细胞在滋养培养基中生长 1-2 天,然后将其转换至选择培养基。选择标记用于赋予选择抗性,其存在使得成功表达导入序列的细胞可生长和回收。可使用适于该细胞的组织培养技术增殖稳定转化细胞的抗性凝块(Resistant clumps)。

[0266] 可使用多种选择系统回收已转化用于重组蛋白生产的细胞。这样的选择系统包括但不限于分别在 tk⁻、hgprt⁻ 或 aprt⁻ 细胞中的 HSV 胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因。另外,抗代谢抗性可用作 dhfr、gpt、neo、also 和 hyg^r 的选择基础,dhfr 赋予对氨基喋呤的抗性;gpt 赋予对霉酚酸的抗性;neo 赋予对氨基糖苷 G418 的抗性;also 赋予对氯喹的抗性;而 hyg^r 赋予对潮霉素的抗性。其它可使用的选择基因包括 trpB 或 hisD, trpB 允许细胞利用吡啶代替色氨酸, hisD 允许细胞利用组氨酸代替组氨酸。产生用于鉴别转化子的目测指示的标记包括花色素苷、 β -葡萄糖醛酸酶及其底物 GUS 和荧光素酶及其底物荧光素。

[0267] 可使用自动化肽合成和重组技术二者的组合生产本发明的多种杂合多肽。例如,本发明的杂合多肽可包含 PEG 化和修饰的组合,包括缺失、置换和插入。这样的杂合多肽可分阶段生产。在第一阶段,可通过如所述的重组技术生产含缺失、置换、插入及其任意组合的修饰的中间体多肽。接着,在如下所述的任选纯化步骤后,通过用合适的 PEG 化试剂(例如得自 Nectar Transforming Therapeutics, San Carlos, California)通过化学修饰 PEG 化中间体多肽,以产生所需杂合多肽。本领域技术人员会认识到,上述步骤可推广应用于含修饰组合的杂合多肽,所述修饰组合选自缺失、置换、插入、衍化以及本领域众所周知和本发明设想的其它修饰手段。

[0268] 可能需要纯化本发明生产的杂合多肽。肽纯化技术是本领域技术人员众所周知的。这些技术包括在一个水平上将细胞环境粗分离为多肽和非多肽级分。在将多肽和其它蛋白分离后,可使用层析和电泳技术进一步纯化目的多肽,以达到部分或完全纯化(或纯化至均一)。特别适合于纯肽制备的分析方法是离子交换层析、排阻层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦。特别有效的肽纯化法是反相 HPLC,接着通过液相色谱/质谱法(LC/MS)和基质辅助激光解吸离子化(MALDI)质谱法特征鉴定纯化产物。通过确定氨基酸分析结果获得对纯度的额外证实。

[0269] 本发明的某些方面涉及编码蛋白或肽的纯化,在具体的实施方案中,涉及编码蛋白或肽的大致纯化。本文使用的术语“纯化肽”意指可由其它组分中分离的组合物,其中所述肽相对于其天然可获得的状态被纯化至一定的程度。因此,纯化肽还指脱离其可能天然

存在的环境的肽。

[0270] 一般地讲,“纯化的”指已经过分级分离而去除各种其它组分的肽组合物,该组合物基本保留了其表达的生物活性。在使用术语“大致纯化的”时,该名称指其中肽构成组合物主要组分的组合物,例如在组合物中肽占约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%或更高。

[0271] 适用于肽纯化的各种技术是本领域技术人员周知的。这些技术包括用例如硫酸铵、PEG、抗体等沉淀;热变性后离心;层析步骤,例如离子交换层析、凝胶过滤层析、反相层析、羟磷灰石层析和亲和层析;等电聚焦;凝胶电泳;以及这些技术和其它技术的组合。如本领域一般所已知的,相信可改变进行各种纯化步骤的顺序,或可省略某些步骤,仍可得到用于制备基本纯化的蛋白或肽的方法。

[0272] 一般不要求肽总是以其最纯状态提供。实际上,设想在某些实施方案中使用纯化程度较小的产物。通过使用较少纯化步骤的组合,或利用不同形式的相同通用纯化流程,可实现部分纯化。例如,人们意识到,使用 HPLC 装置进行的阳离子交换柱层析一般产生比使用低压层析系统的相同技术更高“倍”的纯化。具有较低程度的相对纯化的方法在蛋白产物总回收率或保持表达蛋白活性方面可能具有优势。

[0273] 人们可任选地纯化和分离该杂合多肽和由该方法获得的其它组分。纯化多肽的方法可见于美国专利第 5,849,883 号。这些文件描述了分离和纯化 G-CSF 组合物的具体示例性方法,这些方法可用于分离和纯化本发明的杂合多肽。在已知本发明公开内容的情况下,本领域技术人员显然会意识到,可使用各种纯化技术由给定的来源纯化杂合多肽。

[0274] 另外,设想可使用阴离子交换和免疫亲和层析的组合生产本发明的纯化杂合多肽组合物。

[0275] 药物组合物

[0276] 本发明还涉及药物组合物,其包含治疗或预防有效量的至少一种本发明杂合多肽或其药物可接受盐,以及药物可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或用于传递杂合多肽的载体。这样的组合物可包括:各种缓冲内容物(例如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH 和离子强度的稀释剂;添加剂,例如变性剂和增溶剂(例如 Tween80、Polysorbate80)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠)、防腐剂(例如硫柳汞、苯酚)和填充剂(例如乳糖、甘露醇);将材料掺入到特定聚合化合物制品中,例如聚乳酸、聚乙醇酸等;或与脂质体结合。这样的组合物将影响本发明杂合多肽的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 1435-712,第 18 版, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania(1990)。

[0277] 一般来说,本发明杂合多肽的使用方式可以和鉴于单个组成多肽药理学特性而使用其的方式相同。一个优选用途是外周给予此杂合多肽,用于治疗或预防代谢疾病和障碍。具体地说,本发明化合物具有作为降低营养物利用度、减少食物摄取和影响体重下降的物质的活性。在另一个实施方案中,一个优选用途是给予此杂合多肽,用于治疗糖尿病或糖尿病相关疾病和障碍。

[0278] 本发明的杂合多肽可配制用于外周给予,包括配制用于注射、口服给予、鼻给予、肺给予、局部给予或本领域技术人员了解的其它给予类型。更具体地说,可通过任何普通途径给予本发明的药物组合物,只要经过该途径可到达靶组织。在一个优选实施方案中,

可通过任何常规外周方法,例如通过静脉内、皮内、肌内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内(例如末端释放);通过口服、舌下、鼻、肛门、阴道或经皮传递,或通过特定部位手术植入,将药物组合物导入到受试者中。治疗可由一段时间内的单剂量或多剂量组成。还设想可控持续释放本发明组合物。

[0279] 制品可为液体,或可为固体,例如用于重建的冻干固体。本发明的水性组合物包含有效量的杂合多肽,其溶解或分布在药物可接受的载体或水性介质中。短语“药物或药理学可接受的”指在给予动物或人时不产生副反应、变态反应或其它不适当反应的分子实体和组合物。本文使用的“药物可接受的载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂、抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这样的介质和物质对药学活性物质的用途在本领域众所周知。除非任何常规的介质或物质与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗组合物。

[0280] 还可将互补活性成分加入到组合物中。在某些情况下,方便地在一起给予的单个组合物或溶液中提供本发明的杂合多肽和另一种减少食物摄取、治疗糖尿病、降低血浆葡萄糖或改变血浆脂质的物质,例如胰淀素、胰淀素激动剂类似物、CCK 或 CCK 激动剂、瘦蛋白或瘦蛋白激动剂、Exendin 或 Exendin 激动剂类似物。在其它情况下,将另外的物质与所述杂合多肽分开给予可能更有利。

[0281] 可配制本发明的杂合多肽,作为与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合的游离碱或药物可接受盐的水溶液给予。药物可接受盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成),其与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。与游离羧基形成的盐还可来源于无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。这样的产物易于通过本领域技术人员众所周知的方法制备。还可以制备在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中的分散液。在一般的储存和使用条件下,这些制品包含防腐剂,以防止微生物生长。

[0282] 在一个实施方案中,配制本发明的药学组合物以适于胃肠外给予,例如通过注射或输注给予。优选地,杂合多肽悬浮在水性载体中,例如在 pH 约 3.0 至约 8.0 的等渗缓冲溶液中,优选 pH 在约 3.5 至约 7.4、3.5 至 6.0 或 3.5 至约 5.0。有用的缓冲液包括柠檬酸钠-柠檬酸和磷酸钠-磷酸以及乙酸钠/乙酸缓冲液。可使用一种长效或“贮存”缓释的制剂,以在经皮注射或传递后的多个小时或天数内,将治疗有效量的制剂传递入血流中。

[0283] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水性溶液或分散液和用于即时配制无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。就一切情况而论,剂型应当是无菌的,流动性应达到保持易注射能力的程度。还需要本发明的杂合多肽在生产和储存条件下是稳定的,其必须防腐,以对抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可为溶剂或分散介质,包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油。可保持适当的流动性,例如通过使用包衣剂(例如卵磷脂)、在分散液情况下通过保持所需颗粒大小和使用表面活性剂。可利用各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等,达到对微生物作用的预防。在许多情况下,优选包含等渗剂(例如糖或氯化钠)。通过在组合物中使用吸收延迟剂(例如一硬脂酸铝和明胶),可实现可注射组合物的吸收延长。

[0284] 可通过向合适溶剂中加入需要量的活性化合物,以及根据需要加入以上列举的各

种其它成分,接着除菌过滤,制备无菌注射溶液。一般来说,通过将各种无菌活性成分加入到无菌溶媒中,制备分散液,其中无菌溶媒含有基础分散介质和以上列举物质中的所需其它成分。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,由其先前除菌过滤的溶液产生活性成分加任何其它需要成分的粉末。

[0285] 一般来说,根据年龄、体重以及疾病的情况或严重性、受者的病症或障碍来确定本发明杂合多肽的治疗或预防有效量。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 697-773。另参见 Wang 和 Hanson, Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers, Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, 附录 42:2S(1988)。通常,可使用约 $0.001 \mu\text{g/kg}$ 体重/天至约 $1000 \mu\text{g/kg}$ 体重/天的剂量,但熟练医师认识到,可使用更大或更小的剂量。给药可为每日一次或多次,或频率更低,可与本文描述的其它组合物联合给予。应当指出的是,本发明不限于本文提及的剂量。

[0286] 可通过使用已确立的测定代谢疾病或障碍水平的实验连同相关的剂量-反应数据,确定合适的剂量。最终的给药方案由主治医师考虑改变药物作用的因素来确定,这些因素例如为药物的具体活性、损伤的严重性和患者的响应性、患者的年龄、身体状况、体重、性别和膳食、任何感染的严重性、给予时间和其它临床因素。随着研究的进行,将显露出关于具体疾病和病症的合适剂量水平和治疗时程的进一步信息。

[0287] 对于 50kg 患者,有效剂量通常为约 $1-30 \mu\text{g}$ 至约 5mg/天 ,优选约 $10-30 \mu\text{g}$ 至约 2mg/天 ,更优选约 $5-100 \mu\text{g}$ 至约 1mg/天 ,最优选约 $5 \mu\text{g}$ 至约 $500 \mu\text{g/天}$,以单剂量或分剂量给予。优选地,剂量为约 0.01 至约 $100 \mu\text{g/kg/剂}$ 。要给予的确切剂量可由本领域技术人员确定,其取决于具体化合物的效力,以及个体的年龄、体重和身体状况。给予应当在例如需要抑制营养物利用度、食物摄取、体重、血糖或血浆脂质调节的时候开始,例如,在病症最初有征兆的时候或在诊断出肥胖、糖尿病或胰岛素抵抗综合症后不久开始。可通过任何途径给予,例如注射(优选皮下或肌肉注射)、口服、鼻、经皮等。由于生物利用度降低,用于某些途径(例如口服给予)的剂量可增加,例如增加约 5-100 倍。

[0288] 在一个实施方案中,在要胃肠外给予药用制剂时,配制组合物,以便传递 $1 \mu\text{g/kg}$ 至 100mg/kg 体重/天的杂合多肽剂量,优选 0.1mg/kg 至约 50mg/kg 体重/天的剂量。可用初始大剂量,接着持续输注,以保持药品的治疗循环水平,进行胃肠外给予。本领域一般技术人员易于优化有效剂量和给予方案,这可根据良好医疗规范和个体患者的临床病症确定。

[0289] 给药频率取决于药物的药代动力学参数和给予途径。本领域技术人员根据给予途径和需要的剂量确定最佳的药物剂型。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 出处同上, 1435-1712 页。这样的剂型可影响给予药物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。根据给予途径,可按照体重、体表面积或器官大小计算合适的剂量。本领域一般技术人员不需要过多实验即可常规作出确定合适治疗剂量必须的更精细计算,尤其是在依据本文公开的剂量信息和实验以及在动物或人体临床实验中观察到药代动力学数据的情况下。

[0290] 要认识到,本发明的药物组合物和治疗方法可用于人类医药和兽医领域。因此,要治疗的受试者可为哺乳动物,优选为人或其它动物。对于兽用目的,受试者包括例如家畜

(例如牛、绵羊、猪、马和山羊)、宠物(例如狗和猫)、野外动物和/或动物园动物、实验室动物(包括小鼠、大鼠、兔、豚鼠和仓鼠);以及家禽,例如鸡、火鸡、鸭和鹅。

[0291] 另外,本发明设想了一种试剂盒,其包含本发明的杂合多肽、适于制备所述本发明杂合多肽的药周组分和使用所述杂合多肽和药用组分的说明书。

[0292] 为帮助理解本发明,纳入以下的实施例。涉及本发明的实施例当然不应当被解释为对本发明的具体限制,现在已知或以后开发的本发明的这些改变应属于本领域技术人员的能力范围,这些改变被认为属于本文描述的和后文要求保护的本发明范围。

实施例

[0293] 参照以下的非限制性实施例,更详细地描述了本发明,提供这些实施例是为了更全面地理解本发明,不应被解释为限制其范围。实施例阐述了本发明杂合多肽的制备,以及本发明的这些杂合多肽的体外和/或体内测试。本领域技术人员应理解,这些实施例中描述的技术代表了本发明的发明人描述的、在实施本发明时运行良好的技术,因此构成了本发明实施的优选模式。但是,应当认识到,按照本文公开内容,本领域技术人员会意识到,可对所公开的具体方法进行多种改变,仍可获得同样或类似的结果,而不偏离本发明的精神和范围。

[0294] 实施例 1. 杂合多肽的制备

[0295] 可使用以 0.050-0.100mmol 装量为 0.43-0.49mmol/g 的 Rink 酰胺树脂 (Novabiochem), 或 0.63mmol/g 预装填 Wang 树脂 (Fmoc-Tyr(tBu)-Wang 树脂) (Novabiochem), 在 Symphony 肽合成仪 (Protein Technologies, Inc.) 上组装本发明的肽。以 0.10M 浓度将 Fmoc 氨基酸 (5.0 当量, 0.250-0.500mmol) 残基溶解在 1-甲基-2-吡咯烷酮中。所有其它试剂 (HBTU、1-羟基苯并三唑水合物和 N,N-二异丙基乙胺) 都制备为 0.55M 二甲基甲酰胺溶液。然后使用 HBTU (2.0 当量, 0.100-0.200mmol)、1-羟基苯并三唑水合物 (1.8 当量, 0.090-0.18mmol)、N,N-二异丙基乙胺 (2.4 当量, 0.120-0.240mmol), 将 Fmoc 保护的氨基酸与结合树脂的氨基酸偶联 2 小时。在最后的氨基酸偶联后, 使用 20% (v/v) 哌啶的二甲基甲酰胺溶液对肽去保护 1 小时。一旦肽序列完成, Symphony 肽合成仪就按照程序切割树脂。使用 93% TFA、3% 苯酚、3% 水和 1% 三异丙基硅烷, 对肽与树脂进行 1 小时的三氟乙酸 (TFA) 切割。使用叔丁基甲基醚沉淀切割的肽, 通过离心沉淀, 并冻干。沉淀再溶解在水 (10-15mL) 中, 过滤, 经使用 C18 柱和含 0.1% TFA 的乙腈/水梯度的反相 HPLC 纯化。

[0296] 用脂肪酸(例如辛酸和硬脂酸)N-加帽本发明肽的一般方法如下:将在 Rink 酰胺树脂上的肽 (0.1mmol) 悬浮在 NMP (5mL) 中。在单独的小瓶中, 将 HBTU (0.3mmol)、HOBt (0.3mmol) 溶解在 DMF (5mL) 中, 接着加入 DIEA (0.6mmol)。将该溶液加入到树脂中, 振荡该悬浮液 2 小时。过滤溶剂, 用 NMP (5mL×4) 和 CH₂Cl₂ (20mL) 彻底清洗, 干燥, 并进行 1 小时的 TFA 切割。在切割和纯化后, 目的肽的产量约为 40mg。

[0297] 可使用市售的活化 PEG 酯, 在溶液中对赖氨酸的游离 ε-氨基或纯化肽的末端氨基进行 PEG 修饰。通过反相 HPLC 将获得的 PEG 化衍生物纯化至均一, 通过 LC/MS 和 MALDI-MS 确认纯度。

[0298] 本发明的某些示例性杂合多肽示于以下表 1-1。设想了对具体化合物的各种修饰,

例如化学修饰,如糖基化、PEG 修饰等;氨基酸修饰,例如置换、插入和缺失等。此外,要理解的是,虽然以 C- 末端酰胺化为代表,但本发明的杂合多肽可替代性地为游离酸形式。

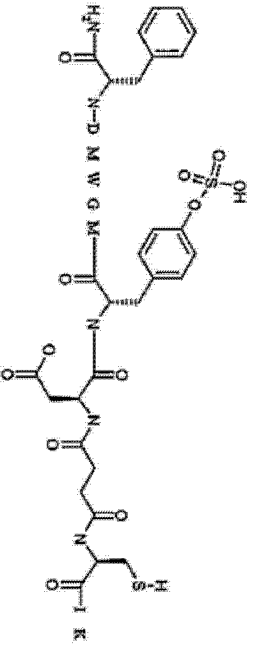
表 1-1: 本发明的某些示例性杂合化合物

SEQ ID:	
1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGPPSGAPPS-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
2	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGPPSGAPPS-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
3	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGPPSGAPPS-NRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
4	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGPPSGAPPS-βAla-βAla-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
5	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGPPSGAPPS-βAla-βAla-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
6	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNKGPPSGAPPS-βAla-βAla-VTRQRY-NH ₂
7	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
8	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
9	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-NRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
10	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
11	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
12	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-VTRQRY-NH ₂
13	HGEGAFTSDDLKQLEEEAVRLFIEFLKNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
14	HGEGAFTSDDLKQLEEEAVRLFIEFLKNASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
15	HGEGAFTSDDLKQLEEEAVRLFIEFLKNRHYLNLVTRQRY-NH ₂
16	HGEGAFTSDDLKQLEENRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂

[0299]

17	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-βAla-βAla-βAla-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
18	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-βAla-βAla-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
19	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-βAla-βAla-VTRQRY-NH ₂
20	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS-DY(SO ₃)MGWMDf-NH ₂
21	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-DY(SO ₃)MGWMDf-NH ₂
22	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-Df(CH ₂ SO ₃)MGWMDf-NH ₂
23	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-[8-氨基-3,6-二氧杂辛酰基]-DY(SO ₃)MGWMDf-NH ₂
24	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-[8-氨基-3,6-二氧杂辛酰基]-Df(CH ₂ SO ₃)MGWMDf-NH ₂
25	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKCCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
26	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKANTATAVLG-NH ₂
27	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-12-Ado-KCNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
28	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-12-Ado-CNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
29	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-3,6-二氧杂辛酰基-KCNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
30	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-3,6-二氧杂辛酰基-CNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
31	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-5-Apa-KCNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
32	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-5-Apa-CNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
33	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-KCNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
34	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-CNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂

[0300]

35	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-4,7,10- 三 氧 杂 -13- 十 三 烷 胺 琥 珀 酰 亚 胺 基 -KCNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
36	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-4,7,10- 三 氧 杂 -13- 十 三 烷 胺 琥 珀 酰 亚 胺 基 -CNTATCVLGRLHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
37	DF(CH ₂ SO ₃)MGWMDf-GKR-KCNTATCATQRLANELVRLQTYPRNTVGSNTY-NH ₂
38	KCNTATCATQRLANELVR-RYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
39	异己酰-STAVL-(Aib)-K(甲酰)-LSQEL-(Aib)-K(甲酰)-LQT-NRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
40	异己酰-STAVL-(Aib)-K(甲酰)-LSQEL-(Aib)-K(甲酰)-L-ELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
41	

[0301]

的杂合多肽。这样的实验包括以下描述的实验。

[0305] 胰淀素结合实验:可如下在由大鼠脑制备的伏核膜中对本发明的某些示例性化合物与胰淀素受体的结合进行评价。断头处死雄性 Sprague-Dawley® 大鼠 (200-250g)。取出脑,并置于冷磷酸缓冲盐水 (PBS) 中。从腹面开始,制作由喙至下丘脑的切口,侧面以嗅束为界,并由这些嗅束向中线以 45° 角延伸。此基础前脑组织包含伏核和周围区域,对其称重并在冰冷的 20mM HEPES 缓冲液 (20mM HEPES 酸,于 23°C 用 NaOH 将 pH 调节至 7.4) 中匀浆。通过以 48,000×g 离心 15 分钟,用新鲜缓冲液清洗膜 3 次。将最终的膜沉淀重悬浮在含 0.2mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 20mM HEPES 缓冲液中。

[0306] 为检测 ^{125}I -胰淀素结合 (参见 Beaumont K 等, Can J Physiol Pharmacol. 1995 Jul ;73(7):1025-9), 将 4mg 原始湿重组织的膜与 12-16pM ^{125}I -胰淀素的 20mM HEPES 缓冲溶液 (其含 0.5mg/ml 杆菌肽、0.5mg/ml 牛血清白蛋白和 0.2mM PMSF) 温育。溶液于 2°C 温育 60 分钟。通过 GF/B 玻璃纤维滤器 (Whatman Inc., Clifton, N. J.) 过滤终止温育,该滤器预先在 0.3% 聚乙烯亚胺中浸泡 4 小时,以便减少放射性标记肽的非特异性结合。在过滤前立即用 5ml 冷 PBS 清洗滤器,在过滤后立即用 15ml 冷 PBS 清洗滤器。取下滤器,在 γ -计数器中以 77% 的计数效率评测放射性。通过在 10^{-12} - 10^{-6}M 未标记测试化合物存在下检测结合,产生竞争曲线,并通过使用 4-参数逻辑斯蒂方程的非线性回归 (Inplot program; GraphPAD Software, San Diego) 分析竞争曲线。

[0307] CGRP 受体结合实验:除了使用由 SK-N-MC 细胞制备的膜以外,基本如对胰淀素的描述评价本发明化合物与 CGRP 受体的结合,已知 SK-N-MC 细胞表达 CGRP 受体 (Muff, R. 等, Ann NY Acad. Sci. 1992 :657, 106-16)。除了使用 13,500cpm ^{125}I -hCGRP/孔或 21.7pM/孔 (Amersham) 以外,如对胰淀素的描述进行结合实验。

[0308] 肾上腺髓质素结合实验:使用含肾上腺髓质素受体的 HUVEC (Karo J 等, Eur J Pharmacol. 1995, 289 :383-5), 使用用于环状 AMP 的 Perkin Elmet AlphaScreen™ 实验,使用优化的 25-30,000 细胞/孔,可研究与肾上腺髓质素受体的结合。相比于 CHO 细胞, HUVEC 的 cAMP 水平提升不大。因此,可选择 CHO 细胞作为阴性对照,因为如果需要的话,其可不表达肾上腺髓质素受体。

[0309] 降钙素受体结合实验:如本领域所知,可使用同样表达降钙素受体的 CHO 细胞或 T47D 细胞 (Muff R. 等, Ann N Y Acad. Sci. 1992, 657 :106-16 和 Kuestner R. E. 等, Mol Pharmacol. 1994, 46 :246-55) 研究与降钙素受体的结合。

[0310] 瘦蛋白结合实验:常规使用两个体外生物实验评测瘦蛋白结合和受体活化 (参见例如 White 等, 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 :10657-10662)。可通过用长 (信号转导) 形式小鼠 OB 受体 (“OB-RL”) 转染的 COS-7 细胞,在没有或有重组小鼠瘦蛋白 (阳性对照) 或肽的情况下,用碱性磷酸酶 (“AP”) - 瘦蛋白 (“OB”) 融合蛋白 (“AP-OB”) 检测瘦蛋白结合抑制。信号转导实验可在用 AP 受体和 OB-RL 构建物共转染的 GT1-7 细胞中进行。可通过化学发光检测在小鼠瘦蛋白或肽刺激作用下的分泌性碱性磷酸酶 (“SEAP”) 活性。

[0311] Y1 受体结合实验:由内源性表达神经肽 Y1 受体的 SK-N-MC 细胞的铺满培养物制备膜。在 96 孔聚苯乙烯板中,将膜与 60pM [^{125}I]-人肽 YY (2200Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences) 和未标记 PPF 多肽于室温温育 60 分钟。然后使用 Perkin Elmer 板收集器将孔

内容物收集在 96 孔玻璃纤维板上。将干燥的玻璃纤维板与闪烁体混合,并在 Perkin Elmer 闪烁计数器上计数。

[0312] Y2 受体结合实验:由内源性表达神经肽 Y2 受体的 SK-N-BE 细胞的铺满培养物制备膜。在 96 孔聚苯乙烯板中,将膜与 30pM^[125I]-人肽 YY(2200Ci/mmol, PerkinElmer LifeSciences) 和未标记 PPF 多肽于室温温育 60 分钟。然后使用 Perkin Elmer 板收集器将孔内容物收集在 96 孔玻璃纤维板上。将干燥的玻璃纤维板与闪烁体混合,并在 Perkin Elmer 闪烁计数器上计数。

[0313] Y4 受体结合实验:用编码神经肽 Y4 基因的 cDNA 瞬时转染 CHO-K1 细胞,然后在 48 小时后由铺满的细胞培养物制备膜。在 96 孔聚苯乙烯板中,将膜与 18pM^[125I]-人胰多肽(2200Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) 和未标记 PPF 多肽于室温温育 60 分钟。然后使用 Perkin Elmer 板收集器将孔内容物收集在 96 孔玻璃纤维板上。将干燥的玻璃纤维板与闪烁体混合,并在 Perkin Elmer 闪烁计数器上计数。

[0314] Y5 受体结合实验:用编码神经肽 Y5 基因的 cDNA 瞬时转染 CHO-K1 细胞,然后在 48 小时后由铺满的细胞培养物制备膜。在 96 孔聚苯乙烯板中,将膜与 44pM^[125I]-人肽 YY(2200Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) 和未标记 PPF 多肽于室温温育 60 分钟。然后使用 Perkin Elmer 板收集器将孔内容物收集在 96 孔玻璃纤维板上。将干燥的玻璃纤维板与闪烁体混合,并在 Perkin Elmer 闪烁计数器上计数。

[0315] GLP-1 受体结合实验:可使用结合置换实验检测 GLP-1 受体结合活性和亲和性,在结合置换实验中,受体源是 RINm5F 细胞膜,配体是 ^[125I]GLP-1。将在 20mM HEPES 缓冲液中的均质 RINm5F 细胞膜与 40,000cpm^[125I]GLP-1 示踪剂和各种浓度的测试化合物于 23℃、恒定混合下温育 2 小时。反应混合物通过预先用 0.3% PEI 溶液浸泡并用冰冷磷酸缓冲盐水淋洗的玻璃纤维垫过滤。使用闪烁计数器测定结合数目。使用 GraphPad Prism 软件(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 计算结合亲和性。

[0316] 实施例 3:小鼠食物摄取实验

[0317] 可在小鼠食物摄取实验中测试本发明杂合多肽的食欲抑制性,并在膳食诱导肥胖(DIO)小鼠中测试本发明杂合多肽对体重增加的作用。用于筛选的实验方法如下所述。

[0318] 以 12:12 小时昼:夜循环分组圈养雌性 NIH/Swiss 小鼠(8-24 周龄),光照由 06:00 时开始。水和标准丸状小鼠饲料可随意获取,注明处除外。动物在实验前 1 天约 15:00 时开始禁食。在实验日早晨,将动物分为各实验组。在典型的研究中, n = 4 笼,每笼 3 只小鼠。

[0319] 在时间 = 0 分钟时,以约 10nmol/kg-75nmol/kg 的量,给所有动物腹膜内注射溶媒或化合物,并立即给予预称重量(10-15g)的标准饲料。取出食物,并于 30、60 和 120 分钟称重,以确定食物消耗量(Morley, Flood 等, Am. J. Physiol. 267 :R178-R184, 1994)。通过由时间 = 0 时开始提供的食物重量中减去例如 30、60、120、180 和 / 或 240 分钟时间点后剩余的食物重量,计算食物摄取。以 ANOVA 鉴定出显著治疗效果 (p < 0.05)。当存在显著差异时,使用 Dunnett 检验 (Prism v. 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, California) 比较测试平均值和对照平均值。

[0320] 实施例 4:催肥的 C57BL/6 (膳食诱导肥胖或 DIO) 小鼠中的体重增长

[0321] 喂饲雄性 C57BL/6 小鼠(在研究开始时为 4 周龄)高脂肪(HF, 58%的膳食千卡为

脂肪)或低脂肪(LF,11%的膳食千卡为脂肪)饲料。在饲料喂养4周后,每只小鼠都植入渗透泵(Alzet#2002),该泵在两周内持续地皮下传递预定剂量的杂合多肽。每周检测体重和食物摄取(Surwit等,Metabolism-Clinical and Experimental,44:645-51,1995)。测试化合物的作用表示为每个治疗组至少14只小鼠体重变化百分率(即由起始重量变化的百分率)的平均值±标准偏差($p < 0.05$ ANOVA, Dunnett 检验, Prism V. 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, California)。

[0322] Exendin/PYY 杂合体:

[0323] 使用C端截短的Exendin(例如Exendin-4(1-28)或⁵Ala,¹⁴Leu,²⁵phe-Exendin-4(1-28))和覆盖18-36至31-36区的N-端截短PYY合成本发明的示例性杂合多肽。因此,示例性的杂合多肽一般包含两个组件,其中第一个组件是Exendin-4类似物的片段,第二个组件是选自PYY截短物的肽强化物。为进行对比,还在几个变体的肽构件之间加入β-丙氨酸二肽间隔区(参见表4-1)。

[0324] 表4-1:Exendin/PYY杂合体及其在食物摄取实验中的作用

[0325]

描述	小鼠食物摄取%基数			
	30 分钟	60 分钟	120 分钟	剂量
⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-17)-PYY(18-36)	-4	-11	-10	10 nmol/Kg
⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-PYY(22-36)	21	9	-4	10 nmol/Kg
⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(22-36)	-3	-5	-22	10 nmol/Kg
⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-PYY(25-36)	8	-13	-30	10 nmol/Kg
⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(25-36)	-9	-25	-42	10 nmol/Kg
⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(31-36)	-14	-36	-52	10 nmol/Kg
Exendin-4-(1-28)PYY(25-36)	-30	-37	-45	10 nmol/Kg
Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(25-36)	-24	-40	-52	10 nmol/Kg
Exendin-4(1-28)-βAla-βAla-PYY(31-36)	-49	-56	-61	10 nmol/Kg

[0326] 由表4-1可见,本发明的某些示例性化合物在食物摄取实验中显示出效力。还在DIO实验中以75nmol/kg测试了某些肽,证明比PYY更有效(图1)。

[0327] Exendin/胰淀素杂合体:

[0328] 由C-端截短的Exendin(1-27)、C-端截短的胰淀素肽(例如胰淀素(1-7)、²,⁷Ala-胰淀素(1-7)和胰淀素(33-27))以及任选的sCT片段(例如sCT(8-10)和¹⁴Gln,¹¹,¹⁸Arg-sCT(8-27))制备本发明另外的示例性杂合多肽。尽管两种杂合多肽在食欲抑制中都非常有效(参见表4-2),但作用的开始与亲代分子的活性模式不同(未列出数据)。

[0329] 表4-2:Exendin/胰淀素杂合体及其在FI实验中的作用

[0330]

描述	小鼠食物摄取%基数			
	30 分钟	60 分钟	120 分钟	剂量
Exendin-4(1-27)- 胰 淀 素 (1-7)- ¹⁴ Gln, ^{11,18} Arg-sCT(8-27)- 胰淀素(33-37)	-24	-40	-48	25 nmol/Kg
Exendin-4(1-27)- ^{2,7} Ala- 胰 淀 素(1-7)-sCT(8-10)	-40	-59	-66	25 nmol/Kg

[0331] 当在 D10 实验中筛选时,两种化合物都显示极佳的效力(图 2)。

[0332] Exendin/CCK-8 杂合体:

[0333] 由直接或通过接头连接至 CCK-8N- 端、保留 CCK-8N- 端酰胺的全长或 C- 端截短的 Exendin-4 制备本发明的再其它示例性杂合多肽(表 4-3)。此外,制备某些加入天然 Tyr(SO₃) 的杂合体,同时制备加入更稳定的 Phe(CH₂SO₃) 基团的另一种杂合体。所有制备的杂合多肽在食物摄取抑制中均有活性(表 4-3)。

[0334] 表 4-3:Exendin/CCK-8 杂合体及其在食物摄取实验中的作用

[0335]

描述	小鼠食物摄取%基数			
	30 分钟	60 分钟	120 分钟	剂量
Exendin-4-CCK-8	-12	-28	-28	10 nmol/Kg
Exendin-4(1-28)-CCK-8	-20	-36	-45	10 nmol/Kg
Exendin-4(1-28)-CCK-8[P he(CH ₂ SO ₃)]	-24	-47	-66	10 nmol/Kg
Exendin-4(1-28)-[8- 氨 基 -3,6- 二 氧 杂 辛 酰 基]-CCK-8	-12	-28	-40	10 nmol/Kg

[0336] 在 D10 实验中以 25nmol/kg 测试了示例性的 Exendin/CCK-8 杂合多肽(图 3A 和 3B)。数据表明,对于所有化合物,初期体重下降,接着出现反弹作用。令人感兴趣的是,在加入对水解更稳定的 Phe(CH₂SO₃) 残基的杂合体中,反弹作用似乎降低,在 Exendin 和 CCK 残基之间加入接头 8- 氨基 -3,6- 二氧杂辛酰基的杂合体也是如此。

[0337] 胰淀素 /PYY 杂合体:

[0338] 合成含每种肽截短节段的胰淀素 /PYY 杂合多肽。在食物摄取实验中的体内活性示于表 4-4。

[0339] 表 4-4:胰淀素 /PYY 杂合体

[0340]

描述	小鼠食物摄取%基数			
	30 分钟	60 分钟	120 分钟	剂量
胰淀素(1-18)-PYY(19-36)	-13	-14	-13	25 nmol/Kg

[0341] 为确定本发明的示例性杂合多肽是否比其亲代组分肽激素更有效,以更有活性的亲代分子的最小有效剂量在食物摄取实验中测试示例性化合物。结果示于以下的图 4A 和 4B,其也对比了合并的亲代肽的作用(化合物 1、11 和 12 是组分肽激素、其类似物或片段)。数据表明,几种肽至少与合并的亲代肽等效。在体内研究的同时,已对所有化合物进行体外受体结合和功能检测(环化酶活性)(未列出数据)。

[0342] 尽管已按照优选的实施例和实施方案描述了本发明,但要理解的是,本领域技术人员会考虑到改变和修饰。因此,所附权利要求书意在覆盖所有这样的等价改变,这些改变属于本发明要求保护的范围。

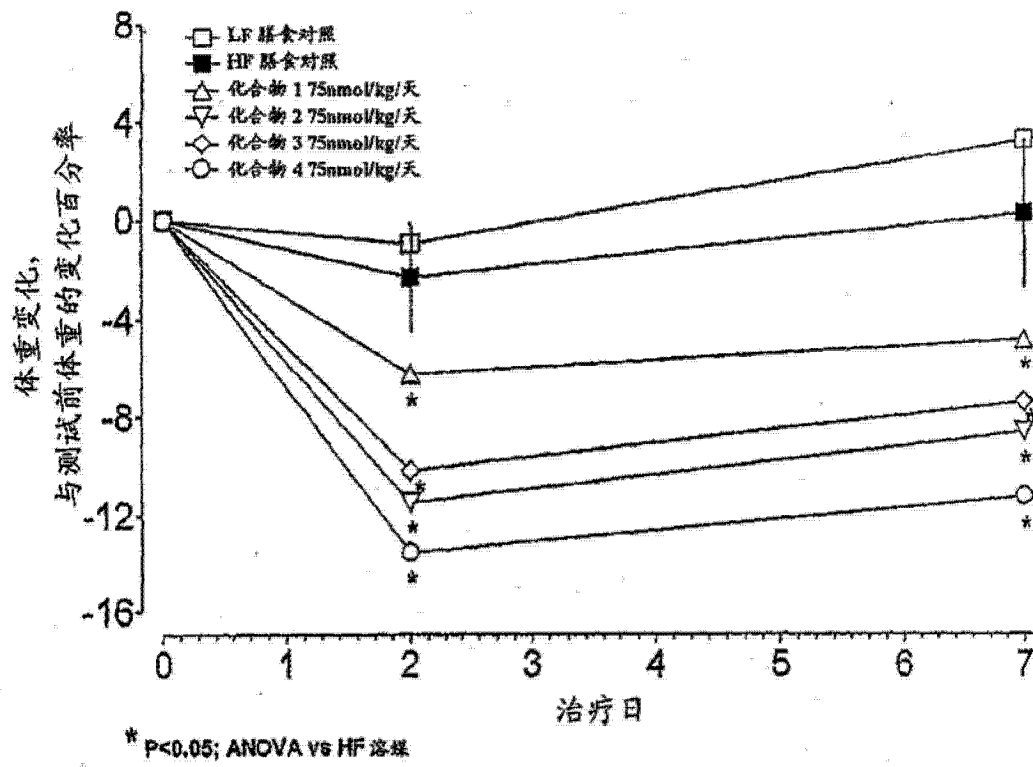


图 1

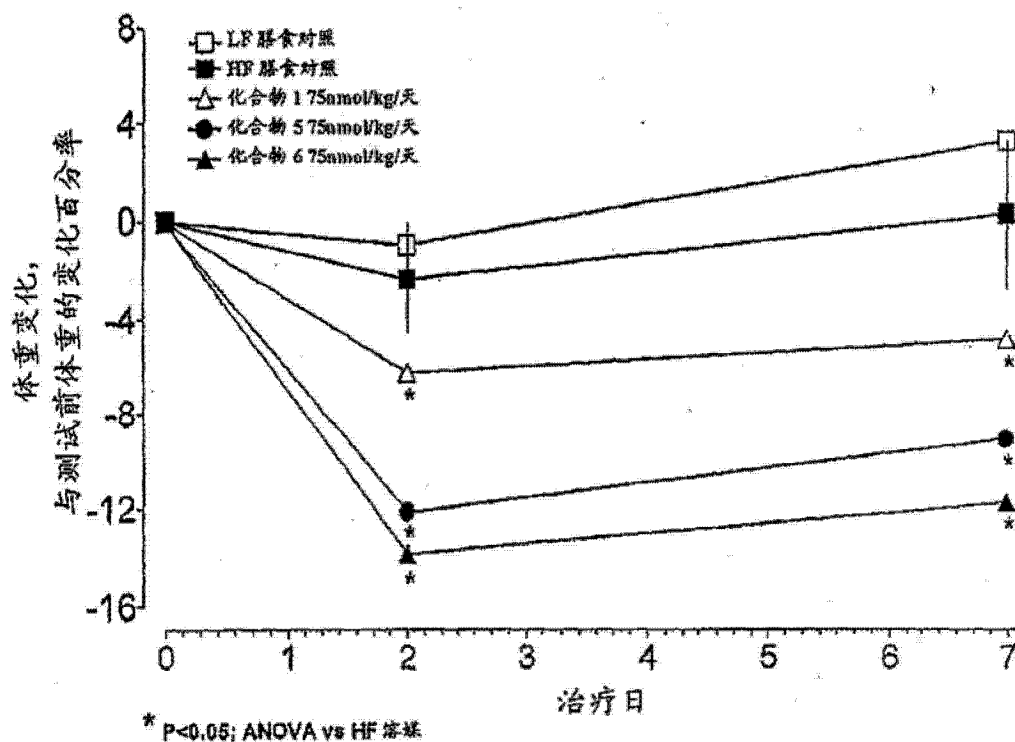


图 2

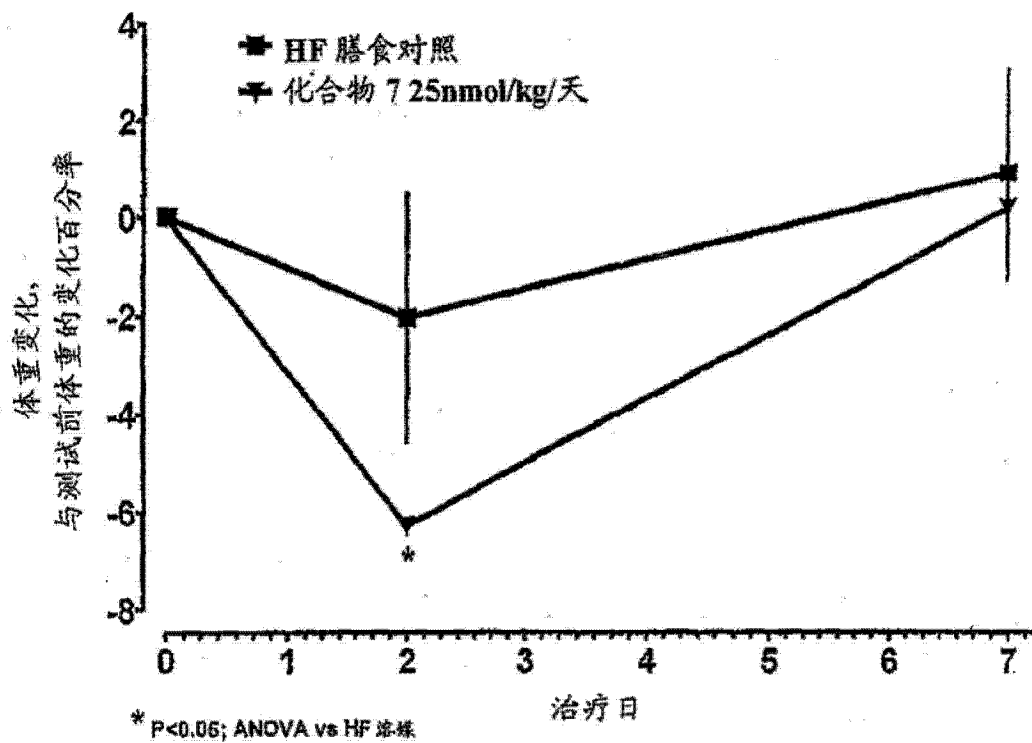


图 3A

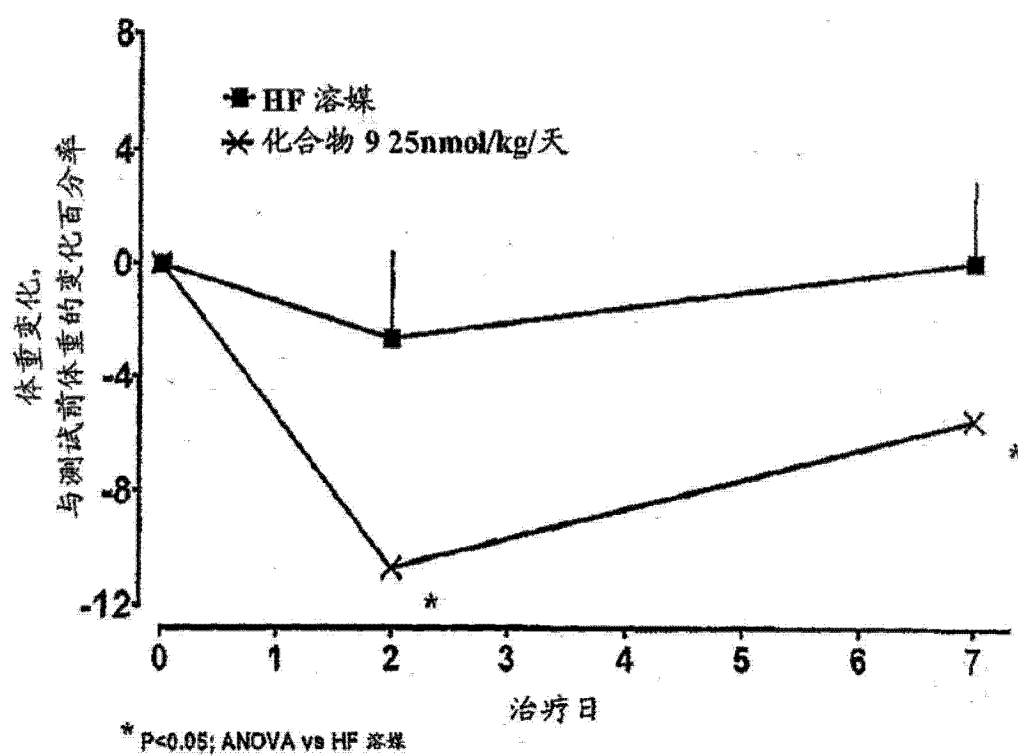


图 3B

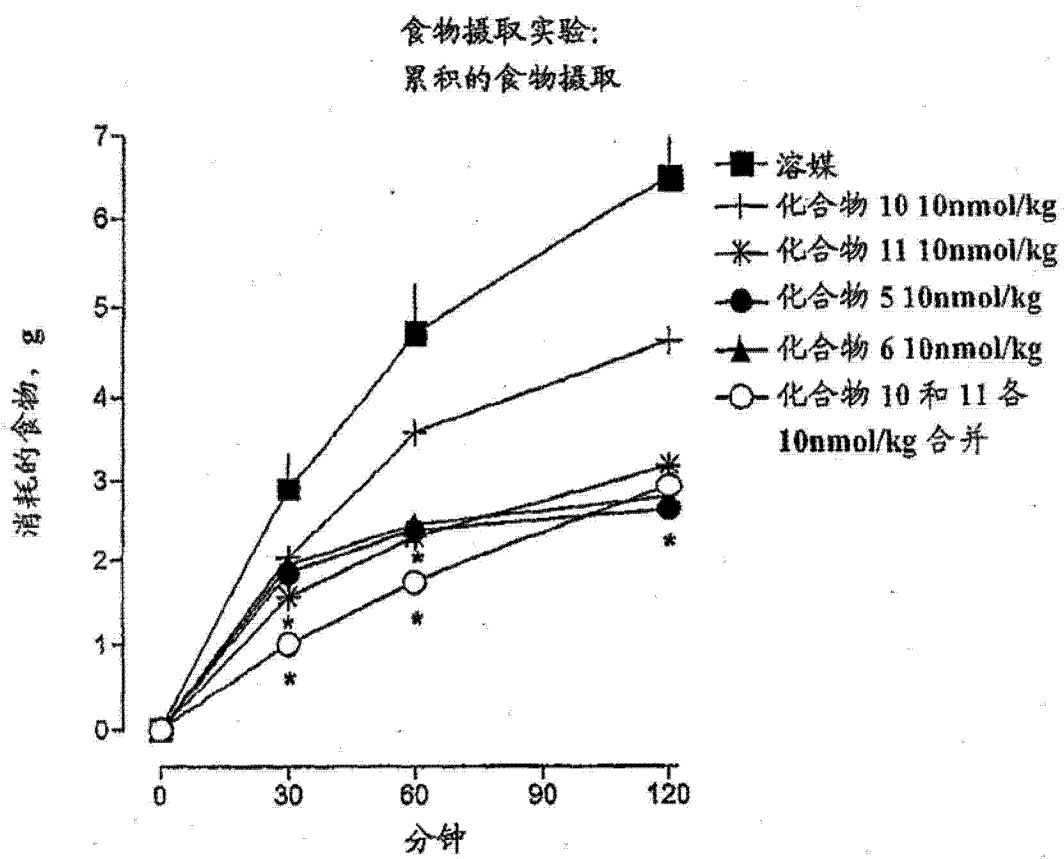


图 4A

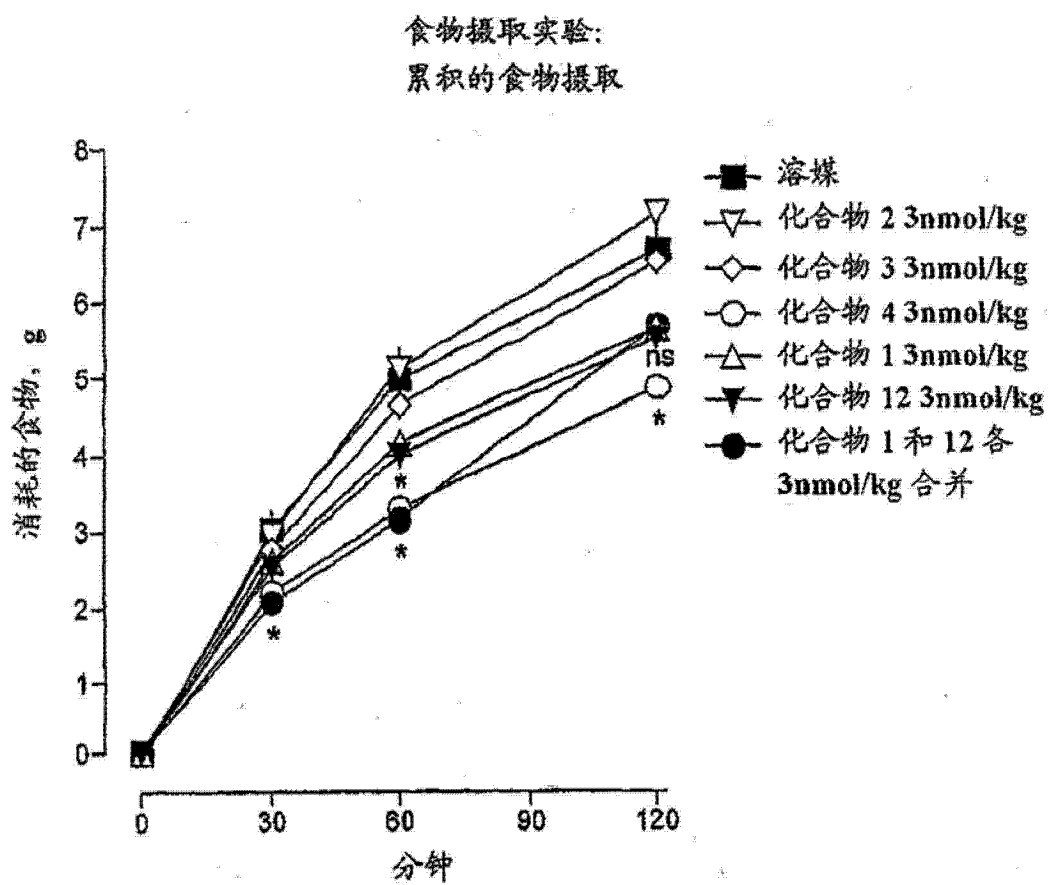


图 4B