



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101870728 A

(43) 申请公布日 2010.10.27

(21) 申请号 200910135363.5

(22) 申请日 2009.04.23

(71) 申请人 派格生物医药(苏州)有限公司

地址 215125 江苏省苏州市工业园区星湖街
218号纳米生物园A3楼417室

(72) 发明人 徐敏 王永祥 张映辉 罗晓苏
龚念 张丽洁 周向军

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 刘晓东 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

C07K 17/10 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 28 页 附图 16 页

(54) 发明名称

新型 Exendin 变体及其缀合物

(57) 摘要

本发明提供了一种新型的 Exendin 变体以及其上缀合了聚合物的 Exendin 变体缀合物, 含有它们的药物组合物以及它们在治疗疾病、尤其是 II 型糖尿病中的用途。

1. 一种 Exendin 变体,其具有与野生型序列相比有一个或多个残基被半胱氨酸置换的氨基酸序列,优选具有与 Exendin-4 序列 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :1) 或 Exendin-3 序列

His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :2) 或者其相似序列相比有一个或多个残基被半胱氨酸置换的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的 Exendin 变体,其中氨基酸置换位于 C 端。

3. 权利要求 1 的 Exendin 变体,其在选自下述的一个或多个位点具有半胱氨酸置换: SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 中第 20 位 Arg(精氨酸)、25 位 Trp(色氨酸)、35 位 Ala(丙氨酸)、39 位 Ser(丝氨酸),或者其他位点。

4. 权利要求 1-3 中任一项的 Exendin 变体,其中还包含一个或更多个进一步的氨基酸修饰。

5. 权利要求 1 的 Exendin 变体,其具有选自下述的氨基酸序列:

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO :3);

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :4);

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Cys-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :5);或

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Cys-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :6)。

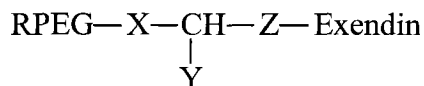
6. 一种缀合物,其中包含权利要求 1-5 中任一项的 Exendin 变体,以及与之相缀合的一个或多个聚合物基团。

7. 权利要求 6 的缀合物,其中一个或多个聚合物基团缀合在所述 Exendin 变体的半胱氨酸残基上。

8. 权利要求 6 或 7 的缀合物,其中所述一个或多个聚合物基团各自独立地选自天然或合成聚合物,例如多糖或聚亚烷基二醇,优选聚乙二醇,或者其衍生物。

9. 权利要求 8 的缀合物,其中所述一个或多个聚合物基团相同或不同,并且是聚乙二醇基团,其分子量范围为 2000 道尔顿至 50000 道尔顿,优选 5000 至 20000 道尔顿。

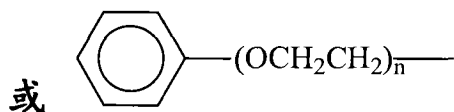
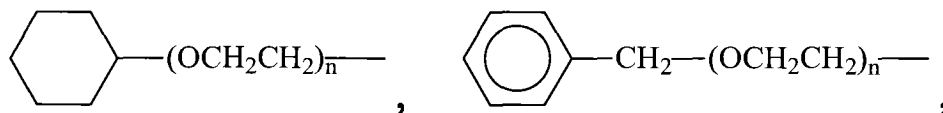
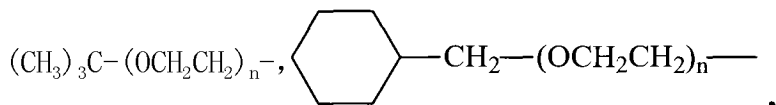
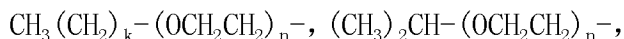
10. 权利要求 8 的缀合物,其中具有如下结构:



其中在式中, Exendin 代表权利要求 1-5 中任一项定义的 Exendin 变体, Y 为 H 或

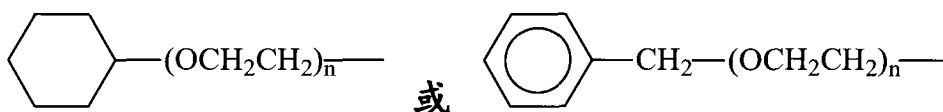
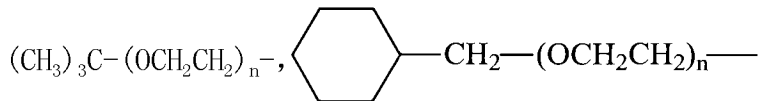
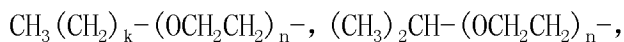
RPEG-X-, 并且每个 X 和 Z 各自独立为连接基, 每个 R 各自独立地选自烷基、环烷基、烯基或芳基。

11. 权利要求 10 的缀合物, 其中每个“RPEG-”各自独立地具有选自如下的结构:



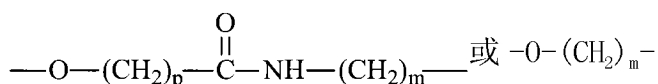
在上述式中: k 为 0、1、2、3、4、5、6 中任一整数, 每个 n 各自独立地选自 45-1200 的整数, 例如 46、47、48 等。

12. 权利要求 10 的缀合物, 其中每个“RPEG-”各自独立地具有选自如下的结构:



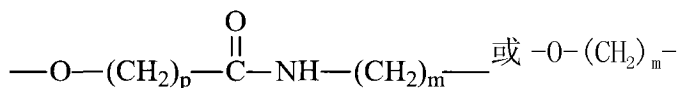
在上述式中: k 为 0、1、2、3 中任意整数; 每个 n 各自独立地选自 45-1200 的整数, 例如 46、47、48 等。

13. 权利要求 10 的缀合物, 其中每个连接基“-X-”各自独立地具有选自如下的结构:



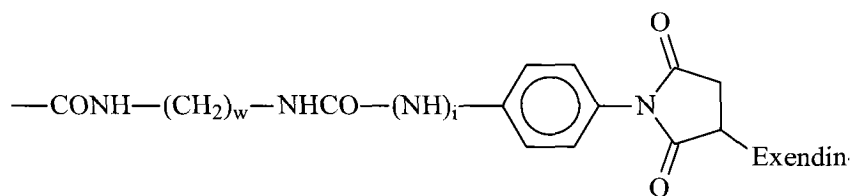
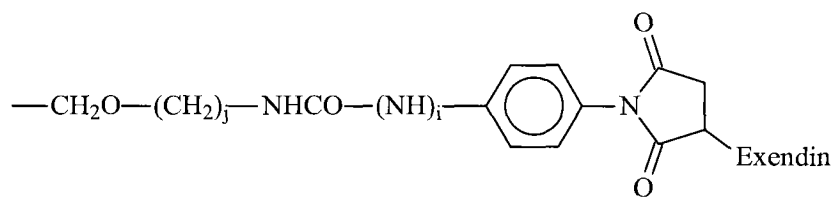
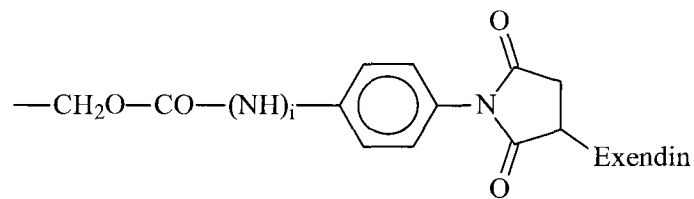
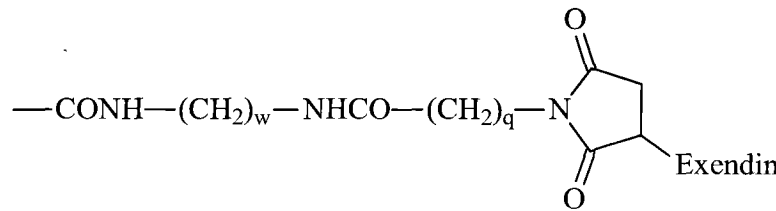
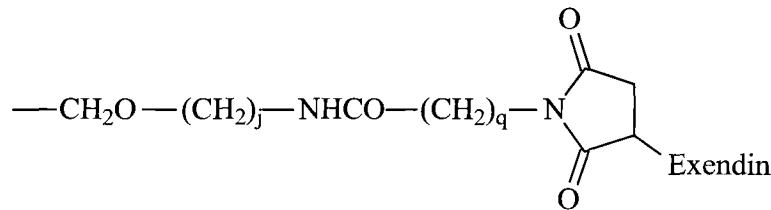
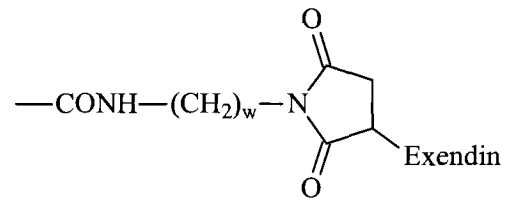
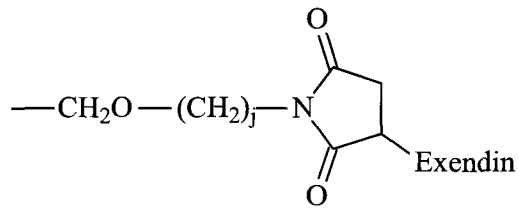
其中: 每个 p 和 m 各自独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中任意整数。

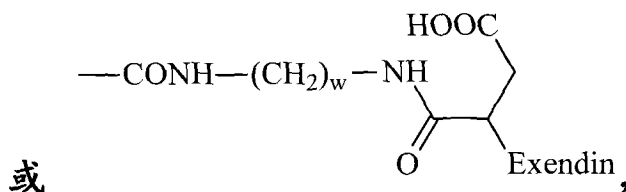
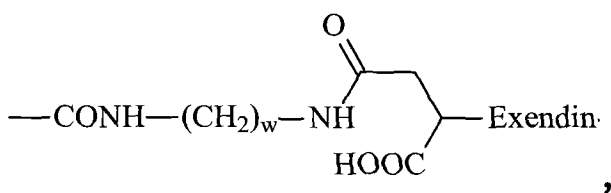
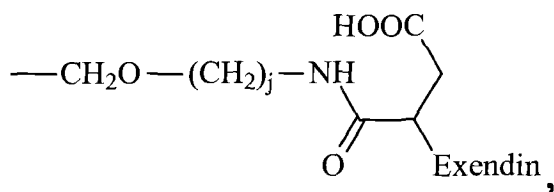
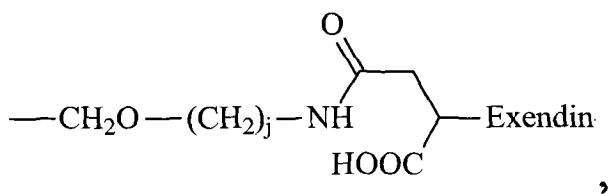
14. 权利要求 13 的缀合物, 其中每个连接基“-X-”各自独立地具有选自如下的结构:



其中: 每个 p 各自独立地为 0、1、2、3、4 或 5 中任意整数; 每个 m 各自独立地为 0、1、2、3 或 4 中的整数。

15. 权利要求 10 的缀合物, 其中所述的“-Z-Exendin”具有如下结构:





其中 ;每个 i 各自独立地为 0 或 1 的整数 ;每个 j 各自独立地为 1、2、3、4、5 或 6 中的整数 ;每个 q 各自独立地为 1、2、3、4、5 或 6 中的整数 ;以及每个 w 各自独立地为 1、2、3、4、5 或 6 中的整数。

16. 权利要求 10 的缀合物,其中所述的 Exendin 变体具有选自下述的氨基酸序列 :

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO :3) 或

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :4)。

17. 一种制备权利要求 6 的缀合物的方法,其中包括在合适的温育条件下将权利要求 1-5 中任一项定义的 Exendin 变体与聚合物相温育。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述聚合物是聚乙二醇,优选其分子量范围为 2000 道尔顿至 50000 道尔顿,更优选为 5000 至 20000 道尔顿。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述温育条件如下 :pH 值 5.0-7.0,PEG 与肽的摩尔比值为 1-10,反应时间为 0.5-12 小时,反应温度为 4-37℃。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述聚乙二醇缀合在该 Exendin-4 变体氨基酸序列中的半胱氨酸残基上。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述聚乙二醇被马来酰亚胺所活化。
22. 一种药物组合物,其中包含有效量的权利要求 1-5 中任一项所述的 Exendin 变体和 / 或权利要求 6-16 中任一项所述的缀合物,以及任选地药学上可接受的载体。
23. 权利要求 22 的药物组合物,其用于降低血糖,优选用于治疗 II 型糖尿病。
24. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述药学上可接受的载体包含缓冲体系,优选地所述缓冲体系为 pH 为约 3.0 ~ 约 6.0 的醋酸盐缓冲溶液,或者 pH 为约 5.0 ~ 约 9.0 的磷酸盐缓冲溶液。
25. 权利要求 22 的药物组合物,其中包含 0.02mg/ml ~ 50mg/ml Exendin 变体和 / 或包含 0.4mg/ml ~ 400mg/ml Exendin 变体缀合物,优选地 0.20mg/ml ~ 5mg/ml Exendin 变体和 / 或 4mg/ml ~ 40mg/ml Exendin 变体缀合物,更优选地 0.5mg/ml ~ 2mg/ml Exendin 变体和 / 或 10mg/ml ~ 20mg/ml Exendin 变体缀合物。
26. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述药学可接受载体包括等渗调节剂和 / 或防腐剂,优选地所述等渗调节剂为蔗糖、甘露醇、氯化钠和丙三醇中的一种或多种,所述防腐剂选自间甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯中的一种或多种。
27. 权利要求 22 的药物组合物,其中所述 Exendin 变体缀合物为与亲水性高分子相缀合的 Exendin 变体缀合物,优选地所述亲水性高分子为 PEG 或 PEO,更优选地所述 PEG 或 PEO 的分子量为 2000 ~ 50000Da。
28. 权利要求 22-27 中任一项的药物组合物,其为液体制剂形式。
29. 权利要求 22-27 中任一项的药物组合物,其为冻干制剂形式。
30. 权利要求 29 的药物组合物,其中所述冻干制剂含有冻干保护剂,优选地所述冻干保护剂选自糖类如蔗糖、甘露醇、海藻糖等的一种或多种。
31. 权利要求 1-5 中任一项的 Exendin 变体或者权利要求 6-16 中任一项的缀合物在制备用于降低血糖的药物中的用途。
32. 权利要求 31 的用途,其中所述的药物用于治疗 II 型糖尿病。
33. 一种降低血糖的方法,其中包括对由此需要的对象施用权利要求 1-5 中任一项的 Exendin 变体或者权利要求 6-16 中任一项的缀合物。
34. 权利要求 33 的方法,其用于治疗 II 型糖尿病。
35. 一种试剂盒,其中包含权利要求 1-5 中任一项的 Exendin 变体和 / 或权利要求 6-16 中任一项的缀合物,以及使用说明书。

新型 Exendin 变体及其缀合物

技术领域

[0001] 本发明涉及新型的 Exendin 变体及其与聚合物相缀合的缀合物,含有它们的药物组合物以及它们在降低血糖、尤其是治疗 II 型糖尿病中的用途。

背景技术

[0002] 随着经济社会的发展、人口平均寿命的延长和生活方式的变化,糖尿病已经成为世界各国主要的卫生保健问题。无论在发达国家或是发展中国家,糖尿病的发病率都在急剧上升。2007 年全球约有 2.46 亿糖尿病患者,全球范围内每 10 秒钟就有一个糖尿病患者死亡,预计到 2025 年全世界糖尿病患者将达到 3.33 亿。我国已成为糖尿病发病的“重灾区”,目前有糖尿病患者 4000 万,糖尿病的发病率约为 5%,是全球糖尿病第二大国(第一为印度)。糖尿病患者分为两种,一是胰岛素依赖型糖尿病(I 型糖尿病)和非胰岛素依赖型糖尿病(II 型糖尿病)。其中,II 型糖尿病占糖尿病患者的 90%以上。II 型糖尿病特点是胰岛素分泌或作用失调及 β -细胞功能障碍,致使脂肪、碳水化合物以及蛋白质代谢紊乱,造成慢性血糖过高,最终导致各种微血管、大血管及各种脏器并发症出现。如今,控制糖尿病的药物有 2 类:1) 促胰岛素分泌类,如磺酰脲类,氯茴苯酸类,二肽基肽酶抑制剂,GLP-1 类似物;2) 非胰岛素促分泌药物,如胰岛素, α -葡萄糖苷酶抑制剂,双胍类,噻唑烷二酮类,胰岛素类似物等。目前,临床上使用较多的传统糖尿病治疗药物对 II 型糖尿病患者皆无能为力,不能遏制胰岛 β -细胞的不断进行性的恶化,不能降低血液中糖化血红蛋白(HbA1c)水平,也不能阻止糖尿病的并发症如心脏病、肾衰竭,且都伴随着不同程度的毒副作用。因此,需要研究新的 II 型糖尿病治疗药物。

[0003] 1985 年发现了一种肠激素胰高血糖素样肽-1(GLP-1(7-36)-NH₂),其是进食后由胰高糖素原基因表达,主要在肠道黏膜 L-细胞分泌的一种产物,它能刺激胰岛 β -细胞分泌胰岛素(J Med Chem,47,4128-4134,2004),对稳定血糖水平有重要作用。外源给予 GLP-1 能使 II 型糖尿病患者的血糖水平正常化(Diabetes Care,15,270-276,1992; Lancet,359,824-830,2002;Endocr. Rev,16,390-410,1996;Diabetologia,28,565-573,1985)。GLP-1 具有下列功能:以葡萄糖依赖方式作用于胰岛 β -细胞,促进胰岛素基因的转录,增加胰岛素的生物合成和分泌;刺激 β -细胞的增殖和分化,抑制 β -细胞凋亡从而增加胰岛 β -细胞数量;抑制胰高血糖素的分泌;增加周边细胞胰岛素受体的敏感性;降低 HbA1c;抑制食欲及摄食;延缓胃内容物排空(Diabetic Med,18,144-149,2001;Diabetes,51,1443-1452,2002;Diabetologia,45,1263-1273,2002;Diabetes,50,525-529,2001;Diabetes,50,725,2001;Diabetes,52,365-371,2003;Recent Prog. Hormone Res. 56,377-399,2001;Diabetologia,39,1546-1553,1996;Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab,281, E242-247,2001;U. S. patent 477967,478017,478425;Diabetes Care,22,403-408,1999;J. Clin. Endocrinology and Metabolism,88,3082-3089,2003;Diabetes,44,1295,1995)。但 GLP-1 在体内很容易被二肽基肽酶(DPP-IV)降解,半衰期不足 2 分钟,几乎不能成为有效的抗糖尿病药物。

[0004] Exendin-4 是在毒蜥（美国亚利桑那州和北墨西哥州内陆爬行动物）的唾液分泌物中发现的多肽（J. Biol. Chem, 265, 20259-20262, 1990 ;J. Biol. Chem, 267, 7402-7405, 1992），与胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1 (7-36)-NH₂) 具有高度同源性 (53%)。研究表明，Exendin-4 同样可以与胰高血糖素样肽 -1 受体结合，并在药理上表现出相类似的效果，如：增加胰岛素的合成及葡萄糖依赖性促胰岛素分泌；刺激 β 细胞增生和再生，抑制 β 细胞凋亡从而增加 β 细胞的数量；抑制胰高血糖素的分泌；抑制肝糖生成，但不会引起严重低血糖；抑制餐后胃肠道动力及分泌功能；降低食欲，减少食物的摄入；对神经细胞具有保护作用 (Nat. Biotech, 23, 857-861, 2005 ;J. Biol. Chem. , 266, 2897-2902, 1991 ;J. Biol. Chem. , 266, 21432-21437, 1992 ;Diabetes, 44, 16-19, 1995 ;Nature, 379, 69-72, 1996 ;Soc. Neurosci. Abstr, 21, 1995, 460)。Exendin-4 促进胰岛素分泌和抑制餐后胰高血糖素分泌的作用具有血糖依赖性，优于目前所用的磺脲类降糖药，不易发生低血糖反应，能够极大减少血糖监测次数，并能减轻体重。由美国安米林 (Amylin) 和礼来 (EliLilly) 公司共同开发的一天注射两次的 Exendin-4 制剂 (Exenatide, 商品名 :Byetta) 相继于 2005 年和 2006 年在美国和欧洲上市 (U. S. patent 5, 424, 286, 6, 858, 576, 6, 872, 700, 6, 902, 744, 6, 956, 026, 7, 297, 761)，使得该类药物得到全世界糖尿病及肥胖治疗领域的广泛应用。

[0005] 由于多肽类药物普遍存在体内半衰期较短，物理、化学稳定性较差，易被体内各种蛋白酶降解等特性，使得这些药物通常需要在一天之内多次注射。Exenatide 作为一种皮下注射制剂，需每天两次使用，给患者身体、心理和经济带来较大的负担，限制了患者用药依从性。因此，对 Exendin-4 进行结构改造及开发新的剂型，从而延长其血浆周期和增加其系统药物暴露 (systemic drug exposure)，是当前抗糖尿病药物研究的热点。

[0006] 聚合物修饰技术是上世纪 70 年代发展起来的一种强有力的修饰技术，其中尤以聚乙二醇化技术为代表。该技术是将聚乙二醇 (PEG) 与蛋白质药物化学结合，对蛋白质的表面进行修饰，通过 PEG 的修饰，一方面增加了蛋白质的分子量，降低了其在肾脏的排泄速率；另一方面，偶联的 PEG 链在被修饰的蛋白质分子表面产生空间位阻效应，减低血液中蛋白水解酶对该蛋白的水解作用，从而有效地延长了其在循环系统内的滞留时间，导致药物血浆周期延长和系统药物暴露增加并提高疗效。

[0007] 目前聚乙二醇化技术已发展到第二代——定点聚乙二醇化技术 (site specific PEGylation)。定点聚乙二醇化技术可以特异地修饰蛋白药物的某一特定氨基酸，从而避免随机修饰的盲目性。这样既较少影响蛋白质多肽活性中心结构，又能选择性干扰某些抗原位点，从而减少非定点聚乙二醇化所带来的生物活性降低及均一性不高等缺点。

[0008] 科研人员对 Exendin-4 的聚合物修饰也已进行了一系列研究。杨和普里克特 (CN1372570A) 的研究证明了 Exendin-4 主要是通过肾清除来代谢，因此他们利用分子量范围在 500 至 20,000 道尔顿 (Dalton) 的聚乙二醇对 Exendin-4 进行修饰。包文超、徐宏景、余刚、左亚军 (CN101125207A) 则利用分子量范围在 20,000 至 50,000 道尔顿的聚乙二醇对 Exendin-4 进行了氨基修饰。

[0009] 但是，现在已有的 Exendin-4 或其变体以及各种修饰形式仍有一些缺点，包括在体内使用时给药频率较高，给患者身体、心理和经济带来较大的负担，限制了患者用药依从性，无法广泛应用。因此，仍然需要有新的 Exendin-4 变体及其聚合物修饰形式。

发明内容

[0010] 在一个方面中,本发明提供了一种 Exendin 变体,其与野生型 Exendin 序列相比有一个或多个氨基酸残基被半胱氨酸所取代。任选地,与野生型 Exendin 序列相比,所述 Exendin 变体中还有一个或多个氨基酸残基被其它天然或非天然氨基酸或者氨基酸类似物所取代。在一个优选的实施方案中,所述 Exendin 变体具有与野生型 Exendin-4 序列 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO:1) 或 Exendin-3 序列 His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ IDNO:2) 或者它们的相似序列相比有一个或多个残基被半胱氨酸置换以及任选地其它氨基酸置换的氨基酸序列。所述氨基酸置换各自独立地位于野生型氨基酸序列的 N-端、C-端和 / 或内部。更优选地,所述置换位于 C 端氨基酸。最优选地,所述半胱氨酸置换位于 Exendin-4 或 Exendin-3 中第 20 位 Arg(精氨酸)、25 位 Trp(色氨酸)、35 位 Ala(丙氨酸)、第 39 位 Ser(丝氨酸)和 / 或其他位点。

[0011] 在另一个方面中,本发明提供了一种 Exendin 变体缀合物,其在所述 Exendin 变体中通过一个或多个半胱氨酸残基缀合了一个或多个天然或合成聚合物,优选生理可接受的聚合物,例如聚烷基二醇。在含有多个聚合物的情形下,所述聚合物可以相同或不同。在一个实施方案中,所述聚合物是聚烷基二醇,包括例如聚乙二醇、聚丙二醇等。每个所述聚合物可以具有任意合适的分子量,例如其分子量可以为 2000 道尔顿至 50000 道尔顿,优选 5000 至 20000 道尔顿。

[0012] 任选地,所述 Exendin 变体缀合物还可可在一个或多个其它氨基酸残基位置处缀合一个或多个相同或不同的上述聚合物。所述一个或多个其它氨基酸残基位置可以各自位于 Exendin 变体的 N-端、C-端和 / 或任意中间位置。

[0013] 在本发明中,所缀合的聚合物可以是任何合适的构型,包括例如单臂、双臂、多臂和 / 或分叉的,其中各臂或分叉可以相同或不同。

[0014] 本发明还提供了一种制备上述 Exendin 变体缀合物的方法,其中包括将所述聚合物活化以及将该经活化的聚合物连接到该 Exendin 变体的一个或多个半胱氨酸残基上的步骤。通过选择特异的活化基团及适当的 pH 值,利用不同的聚合链长度和聚合结构的 PEG 分别对 Exendin 表面的半胱氨酸进行特异的化学修饰。在一个实施方案中,该 PEG 特异的活化基团为马来酰亚胺。

[0015] 本发明另外提供了一种药物组合物,其中包含有本发明的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物,以及任选地药学可接受的载体。

[0016] 本发明又提供了一种治疗疾病的方法,其中包括给有此需要的对象施用治疗有效量的本发明的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物。所述疾病可以选自例如餐后倾倒性综合征、餐后高血糖症、葡萄糖耐受不良、可以通过抑制胰高血糖素分泌、调节甘油三酯水平、减少进食量而缓解的病症或疾病、肥胖症、进食障碍、胰岛素抵抗综合征、糖尿病、高血糖症和低血糖症。优选地,所述疾病是糖尿病,特别是 II 型糖尿病。

附图说明

- [0017] 图 1 图示了 PEG 的分子结构。
- [0018] 图 2 图示了 HPLC 法分析按照实施例 2 制得的 PB-110 (PEG5000-PB-105) 的纯度分析结果。
- [0019] 图 3 图示了 PEG5000b 的分子结构。
- [0020] 图 4 图示了 PEG5000c 的分子结构。
- [0021] 图 5A 图示了 PB-105 聚乙二醇化衍生物的碘染色图象。
- [0022] 图 5B 图示了 PB-105 聚乙二醇化衍生物的考马斯亮蓝染色结果, 其中各泳道代表如下: 1. 标准品 (marker), 2. PB-106 (PEG20000-PB-105), 3. PB-107 (PEG30000-PB-105), 4. PB-108 (PEG40000-PB-105) 和 5. PB-109 (PEG20000*2-PB-105)。
- [0023] 图 6 图示了 HPLC 法对按照实施例 3 制备的 PB-106 (PEG20000-PB-105) 的纯度分析结果。
- [0024] 图 7 图示了 PEG20000b 的分子结构。
- [0025] 图 8 图示了 PEG20000c 的分子结构。
- [0026] 图 9 图示了 PEG20000d 的分子结构。
- [0027] 图 10 图示了 PEG20000e 的分子结构。
- [0028] 图 11 图示了通过 HPLC 法对按照实施例 4 制备的 PB-107 (PEG30000-PB-105) 的纯度分析结果。
- [0029] 图 12 图示了通过 HPLC 法对按照实施例 5 制备的 PB-108 (PEG40000-PB-105) 的纯度分析结果。
- [0030] 图 13 图示了 PEG20000×2 的分子结构。
- [0031] 图 14 图示了通过 HPLC 法对按照实施例 6 制备的 PB-109 (PEG20000*2-PB-105) 的纯度分析结果。
- [0032] 图 15 图示了 PEG20000×2b 的分子结构。
- [0033] 图 16 图示了 PEG20000×2c 的分子结构。
- [0034] 图 17 图示了 PEG20000×2d 的分子结构。
- [0035] 图 18A 图示了在 pH 4.5 和 -20 保存 60 天后 PB-106 (PEG20000-PB-105) 的 HPLC 分析结果。
- [0036] 图 18B 图示了在 pH 7.0 和 4℃ 保存 60 天后 PB-106 (PEG20000-PB-105) 的 HPLC 分析结果。
- [0037] 图 18C 图示了在 pH 7.0 和 -20℃ 保存 60 天后 PB-106 (PEG20000-PB-105) 的 HPLC 分析结果。
- [0038] 图 19 图示了 Exendin-4 和 PB-105 对 PC12 细胞内 cAMP 作用的量效关系。
- [0039] 图 20 图示了 PB-105 及其聚乙二醇化衍生物在体外对细胞内 cAMP 活性的作用。
- [0040] 图 21A 图示了聚乙二醇化衍生物中聚乙二醇的分子量与药物的活性 (LogEC_{50}) 的相关性。
- [0041] 图 21B 图示了聚乙二醇化衍生物中聚乙二醇的分子量与药物最大活性 (E_{max}) 的相关性。
- [0042] 图 22 图示了 Exendin-4 和 PB-105 的降血糖作用时效关系。

- [0043] 图 23 图示了 Exendin-4 和 PB-105 降血糖作用量效关系。
- [0044] 图 24 图示了 Exendin-4 及其衍生物 PB-102 的降血糖作用量效关系。
- [0045] 图 25 图示了 PB-105 及其聚乙二醇化衍生物的等量降血糖作用时效关系。
- [0046] 图 26A 图示了聚乙二醇化 Exendin-4 衍生物中聚乙二醇的分子量与生物半衰期 ($T_{1/2}$) 的相关性。
- [0047] 图 26B 图示了聚乙二醇化 Exendin-4 衍生物中聚乙二醇的分子量与最大降糖作用 (% 给药前血糖浓度) 的相关性。
- [0048] 图 26C 图示了聚乙二醇化 Exendin-4 衍生物中聚乙二醇的分子量与降糖作用曲线上面积 (Area Above Curve, AAC) 的相关性。
- [0049] 图 27 图示了 PB-105 及其聚乙二醇化 (PEG30000) 衍生物 PB-107 的等剂量降血糖作用时效关系。
- [0050] 图 28 图示了 PB-105 和其聚乙二醇化 (PEG20000) 衍生物 PB-106 降血糖作用量效关系。
- [0051] 图 29 图示了单次静脉注射 Exendin-4 和 PB-105 药-时曲线。
- [0052] 图 30 图示了单次静脉注射 PB-105 及其聚乙二醇化 Exendin-4 衍生物药-时曲线。
- [0053] 图 31A 图示了聚乙二醇化 Exendin-4 衍生物中聚乙二醇的分子量与血浆半衰期关系。
- [0054] 图 31B 图示了聚乙二醇化 Exendin-4 衍生物中聚乙二醇的分子量与药-时曲线下面积 (AUC) 关系。

具体实施方式

[0055] 定义

[0056] 本文中使用的术语“氨基酸”包括天然氨基酸、非天然氨基酸、和氨基酸类似物以及所有它们的 D 和 L 立体异构体。非天然氨基酸包括但不限于氮杂环丁烷羧酸、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、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、异锁链赖氨酸、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-哌啶酸和硫代脯氨酸。氨基酸类似物包括在其 C-末端羧基、N 末端氨基或其侧链基团可逆或不可逆地化学封闭的、或被化学修饰成另一官能团的天然氨基酸和非天然氨基酸，例如甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷、S-(羧甲基)-半胱氨酸、S-(羧甲基)-半胱氨酸亚砷和 S-(羧甲基)-半胱氨酸砷。

[0057] 本文中使用的术语“多肽”或“蛋白”可互换地指通过共价键（例如肽键）相互连接的一串至少两个氨基酸残基，可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽。

[0058] 本文中使用的术语“半胱氨酸置换”是指通过例如基因工程或人工化学合成的手段，用半胱氨酸残基代替天然多肽（例如 Exendin-4）中的一个或多个其它氨基酸残基。

[0059] 本文中使用的术语“多肽变体”、“变体”或“类似物”是指通过一个或多个取代、缺失、插入、融合、截短或其任意组合在氨基酸序列上有所不同的多肽。变体多肽可以是完全

功能性的或者可缺乏一种或多种活性的功能。完全功能性变体可含有例如仅仅保守性改变或非关键残基或非关键区域的改变。功能性变体还可包含相似氨基酸的替换,其导致功能未改变或不显著的改变。可以通过本领域已知的方法鉴定对于功能来说重要的氨基酸,所述方法例如定点诱变或甘氨酸扫描诱变(Cunningham, B. 和 Wells, J., *Science*, 244: 1081-1085, 1989)。可以例如通过结构分析如结晶、核磁共振或光亲和标记来确定对于多肽活性来说关键的位点(Smith, L. 等, *J. Mol. Biol.*, 224: 899-904, 1992; de Vos, A. 等, *Science*, 255: 306-312, 1992)。术语“巯基变体”是指通过取代、插入、融合或其任意组合而在氨基酸序列上带有巯基的多肽变体。

[0060] 本文中使用的术语“缀合物”是指多肽或多肽变体与本文所述的修饰基团共价或非共价连接后形成的产物,所述修饰基团包括但不限于上文所述的例子。

[0061] 本文中使用的术语“经修饰多肽”或“经修饰多肽变体”是指其中一个或多个氨基酸被化学修饰的多肽或多肽变体,其中所述修饰是指不同类型基团的共价或非共价修饰,其包括但不限于:磷酸化、糖基化、甲基化、PEG化、生物素化、SUMO化、酰基化等等。

[0062] 本文中使用的术语“烷基”表示取代或未取代的直链或支链烷基,例如 C1-C30 烷基、C1-C20 烷基、C2-C15 烷基或 C3-C10 烷基,其中任选地可具有一个或多个独立地选自例如下述的取代基:卤素、氨基、硝基等。

[0063] 本文中使用的术语“环烷基”表示取代或未取代的 C3-C8 环烷基,其中任选地可具有一个或多个独立地选自例如下述的取代基:C1-C10 烷基、C2-C10 烯基、C2-C10 炔基、卤素、氨基、硝基等。

[0064] 本文中使用的术语“烯基”表示其中具有一个或多个碳碳双键的取代或未取代的直链或支链烯基,其中可具有例如 2-20 个、3-15 个、4-10 个碳原子,并且任选地具有一个或多个独立地选自例如下述的取代基:卤素、氨基、硝基等。

[0065] 本文中使用的术语“芳基”表示 C6-C10 芳基,其任选地被一个或多个独立地选自例如下述的取代基所取代:C1-C10 烷基、C2-C10 烯基、C2-C10 炔基、卤素、氨基、硝基等。

[0066] 本文中使用的术语“连接基”表示有机基团,其将 PEG 与 Exendin 相连接。在本发明中,连接基可以是烷基、醚基、酰胺、酯基、硫基等,其中可以包含例如多达 30 个碳原子,如 1-25、2-20、3-15 或 3-10 个碳原子。

[0067] 一般地,本文中使用的术语“PEG”具有本领域普通技术人员通常理解的含义,既包括聚乙二醇本身,也包括其末端修饰的衍生物,除非另有明确说明。

[0068] 经修饰的 Exendin 变体

[0069] 本发明一方面涉及一种经修饰的 Exendin 变体,其具有与 Exendin 野生型序列或者其相似序列相比有一个或多个,如 1、2、3、4、5 或更多个氨基酸残基被半胱氨酸所置换的氨基酸序列。所述氨基酸置换可以各自独立地位于野生型序列的 N-端、C-端或内部。在一些实施方案中,位于 Exendin 野生型序列 C 端的 1、2、3 或 4 个氨基酸残基被半胱氨酸所置换。在又一些实施方案中,位于 Exendin 野生型序列 N-端和 / 或内部的 1、2、3、4 个或更多个氨基酸残基被半胱氨酸所置换。

[0070] 本发明中所述的 Exendin 野生型序列或者相似序列可以是本领域中已知的任何序列,包括其各种变体或类似物或激动剂序列。有关 Exendin 的教导可参见例如 Eng J. 等人, *J. Biol. Chem.*, 265: 20259-62, 1990; Eng J. 等人, *J. Biol. Chem.*, 267: 7402-05, 1992;

W000/66629 和 W000/41546 等,其全部内容均援引并入本文之中。

[0071] 本发明的经修饰 Exendin 变体还可任选地具有一个或更多个,例如 1、2、3、4、5 个或更多个进一步的氨基酸修饰,包括例如氨基酸取代、缺失、插入和 / 或添加。同样的,所述进一步的氨基酸修饰可以各自独立地位于 Exendin 序列的 N-端、C-端和 / 或内部。取代、插入和 / 或添加的氨基酸可以是任何天然氨基酸、非天然氨基酸或氨基酸类似物,或者它们的 D 或 L 立体异构体。在一些实施方案中,所述进一步的氨基酸修饰是保守性氨基酸取代,例如 Ala/Gly、Ser/Thr、Glu/Asp、Gln/Asn、Ala/Val/Ile/Leu、Arg/Lys、Phe/Tyr 等之间的互相取代。有关保守性氨基酸取代,现有技术中有众多的教导,例如可参阅 W0/2006/083301 等,其全部内容通过援引并入本文之中。

[0072] 在本发明中,所述 Exendin 可以是 Exendin-3 或 Exendin-4。因此,在一些实施方案中,本发明涉及这样的 Exendin 变体,其具有与氨基酸序列 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :1 ; Exendin-4) 或 His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :2 ; Exendin-3) 或者其相似序列相比有一个或多个,例如 1、2、3、4、5 或更多个氨基酸残基被半胱氨酸置换的氨基酸序列。优选地,所述 Exendin 变体中选自下列的一个或多个位点被半胱氨酸所取代;SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 中第 35 位 Ala(丙氨酸)、39 位 Ser(丝氨酸),或者其他位点。

[0073] 在一个优选的实施方案中,所述经修饰的 Exendin 变体具有选自下述的氨基酸序列:

[0074] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO :3) ;或

[0075] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Cys-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :4) 。

[0076] 如上文所述,在本发明的 Exendin 变体中,还可以任选地含有一个或更多个、例如 1、2、3、4、5 个或更多个进一步的氨基酸修饰,例如氨基酸残基的取代、缺失、插入和 / 或添加。所述进一步的氨基酸修饰可以各自独立地位于 Exendin 序列的 N-端、C-端和 / 或内部。取代、插入和 / 或添加的氨基酸可以是任何天然氨基酸、非天然氨基酸或氨基酸类似物,或者它们的 D 或 L 立体异构体。在一些实施方案中,所述进一步的氨基酸修饰是保守性氨基酸取代,例如 Ala/Gly、Ser/Thr、Glu/Asp、Gln/Asn、Ala/Val/Ile/Leu、Arg/Lys、Phe/Tyr 等之间的互相取代。

[0077] 本发明的经修饰 Exendin 变体可以通过本领域公知的多种方式得到,包括例如重组制备方法、化学合成法等。

[0078] 在一个实施方案中,本发明的 Exendin 变体通过固相肽合成技术化学合成,然后在实验室规模纯化,例如通过在反相 HPLC 柱上进行单一纯化步骤或者通过其它合适的层析方法。

[0079] 在另一个实施方案中,本发明的 Exendin 变体通过重组方法产生,包括例如在合适的原核或真核宿主细胞中进行表达,然后通过常规技术从中分离出本发明的 Exendin 变体。例如,可以首先通过化学合成法合成编码所述肽的核苷酸序列,然后将所述序列克隆到合适的表达载体中在合适的启动子控制下进行表达。或者,还可以采用诱变法如 PCR 诱变法从野生型 Exendin 获得编码 Exendin 变体的核苷酸序列、并且随后将所述序列克隆到合适的表达载体中在合适的启动子控制下进行表达。这些技术完全在本领域普通技术人员的能力范围之内,并且在现有技术中有众多的教导。

[0080] 合适的真核宿主细胞有哺乳动物细胞,例如 CHO、COS、HEK 293、BHK、SK-Hep 和 HepG2。所述细胞优选地生长于适合表达本发明 Exendin 变体的条件下。至于用于生产或分离本发明的 Exendin 变体的试剂和条件,则没有任何特别的限制,本领域已知的或商业上可得到的任何体系均可应用。在一个优选的实施方案中,所述 Exendin 变体通过本领域中已描述的方法获得。

[0081] 有多种表达载体可用于制备 Exendin 和 / 或其变体,其可选自真核和原核表达载体。原核表达载体可包括例如质粒如 pRSET、pET 和 pBAD 等,其中可采用的启动子有例如 lac、trc、trp、recA 或 araBAD 等。真核表达载体包括有:(i) 用于在酵母中表达的载体如 pAO, pPIC, pYES, pMET, 其中可使用诸如 AOX1, GAP, GAL1, AUG1 等的启动子;(ii) 用于在昆虫细胞中表达的载体如 pMT, pAc[delta], p1B, pMIB, pBAC 等,其中可使用诸如 PH, p10, MT, Ac5, Op1E2, gp64, polh 等的启动子;和 (iii) 用于在哺乳动物细胞中表达的载体如 pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV 等,以及源自病毒体系的载体如痘苗病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、逆转录病毒等,其中可使用诸如 CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV 和 β 肌动蛋白等的启动子。在一个优选的实施方案中,所述 Exendin 变体在原核或真核细胞体系中进行表达,并且使用经过密码子优化的编码序列。在一个优选的实施方案中,表达所述 Exendin 变体的序列包含前导肽和 / 或信号肽,以利于所述 Exendin 变体从细胞中分泌到细胞外,从而进行分离纯化。在另一个优选的实施方案中,表达所述 Exendin 变体的序列不包含前导肽和 / 或信号肽,其不分泌到细胞外,通过裂解细胞对其进行分离纯化。

[0082] Exendin 变体缀合物

[0083] 本发明的 Exendin 变体可以与多种聚合物相缀合,形成 Exendin 变体缀合物。本文所用的“聚合物”优选是生理可接受的,其包括在水溶液或悬液中可溶、并且以药学有效量施用该聚合物-Exendin 缀合物后对哺乳动物没有负面影响如副作用的聚合物。可在本发明中使用的聚合物没有特别的限制。所述聚合物通常优选具有 2 到约 300 个重复单元。该聚合物基团可以选自天然或合成聚合物,其实例包括、但不限于例如多糖、聚亚烷基二醇,如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇 (PPG)、聚氧化乙烯 (PEO)、乙二醇与丙二醇的共聚物、聚乙烯醇等或者其任何组合。

[0084] 在本发明中,所述聚合物并不限于特别的结构,其可以是线性的(如烷氧基 PEG 或双功能 PEG)、分支或多臂的(如分叉 PEG 或连接到多元醇核心的 PEG)、树枝状的或者可以具有可降解的连键。此外,聚合物的内部结构可以以任意数目的不同模式组织,其可选自均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三聚物、无规三聚物和嵌段三聚物等。所述聚合物还可包括聚(环氧烷)聚合物、聚马来酸、聚(D, L-丙氨酸)等。

[0085] 在一些实施方案中,所述聚合物是 PEG 或其衍生物例如甲氧基 PEG (mPEG)。PEG

侧链可以是线性的、分枝的、分叉的或者由多个臂组成,不同的聚乙二醇可以具有不同的聚合链长度和聚合结构。本发明中对于所用的 PEG 没有特别的限制,其分子量范围可以是 100 至 200000 道尔顿,优选 1000 至 150000 道尔顿、2000 至 100000 道尔顿、3000 至 80000 道尔顿或 4000 至 50000 道尔顿,更优选 5000 至 20000 道尔顿。一种特别有用的 PEG 具有 5000-20000 道尔顿范围的分子量。其它有用的 PEG 分子包括例如 WO 03/040211、US 6,566,506、US6,864,350 和 US 6,455,639 中公开的那些。特别地,所述 PEG 具有通式 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$,其中 n 的范围是约 5 至 4000。本文所述的 PEG 包括经修饰的 PEG,例如甲氧基 PEG、分支 PEG、分叉 PEG 等。合适的分支 PEG 可按照美国专利 No. 5,932,462 中所述进行制备,该专利的全部公开内容通过参考并入本文。所述分叉 PEG 是指在靠近聚合物链一端的地方具有分支的 PEG,分叉 PEG 的主链可以是直链或支链的。

[0086] 用于本发明中的聚合物是所属领域中已知的,其可通过多种途径得到,包括例如通过商业途径获得,如 CarboMer, Inc., J. T. Baker, TheDow Chemical Company 等等,或者根据本领域中已知的方法自行制备,例如 EP1245608 中所述的。本发明并不局限于通过任何具体方法制得的聚合物。

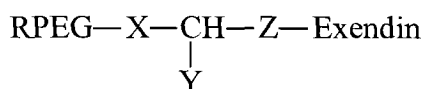
[0087] 在本发明的缀合物中,所述至少一个聚合物可以通过 Exendin 上的氨基、羧基、羟基和 / 或巯基等与 Exendin 相偶联。这样的基团通常位于氨基酸残基如赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸等的 N-端、C-端和侧链上。

[0088] 在一些实施方案中,有一个或更多个聚合物分子通过 Exendin 上半胱氨酸的巯基与 Exendin 变体相偶联。对蛋白质的半胱氨酸残基巯基进行聚合物如聚乙二醇修饰,可以提高修饰的选择性,因为与巯基特异反应的试剂有很多,而且蛋白质中有用的巯基要比例如赖氨酸残基的自由氨基少得多。优选地,所述 Exendin 变体在第 35 位和 / 或第 39 位具有半胱氨酸,并且通过其巯基与聚合物如聚乙二醇相偶联。多肽 / 肽通过半胱氨酸巯基的聚乙二醇化可通过 PEG 马来酰亚胺来实现,形成稳定的硫化物。半胱氨酸残基的 PEG 化也可通过使用例如 PEG- 乙烯砜、PEG- 碘代乙酰胺或 PEG- 连巯基正吡啶进行。

[0089] 在本文中,“PEG 化 Exendin”、“PEG 修饰 Exendin”或“Exendin 变体-PEG 缀合物”包括与一个或多个 PEG 相偶联的 Exendin 变体。如本文中所用的,“PEG 化”或“PEG 修饰”包括将一个或多个 PEG 与 Exendin 相偶联。合适的 PEG 化方法公开在例如 US 5,122,614 和 US5,539,063 中,其中公开的所有 PEG 化方法均通过引用而全文并入本文之中。

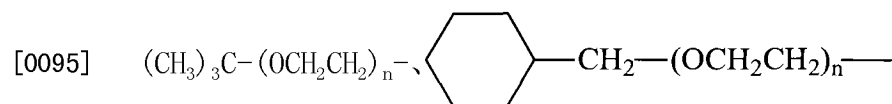
[0090] 在一些实施方案中,所述缀合物具有如下结构:

[0091]

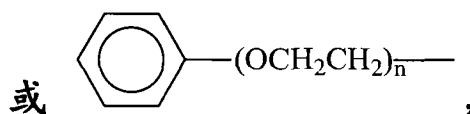
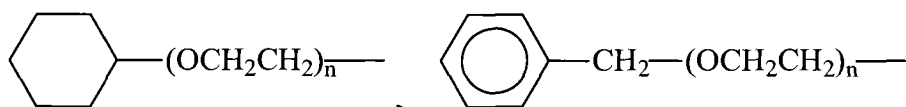


[0092] 其中在式中,Exendin 代表本发明的 Exendin 变体,R 代表烷基、环烷基、烯基或芳基,X 和 Z 为连接基,Y 为 H 或 RPEG-X-,其中所述 R 独立地选自烷基、环烷基、烯基或芳基。

[0093] 在一些实施方案中,其中所述的“RPEG-”具有如下结构:



[0096]



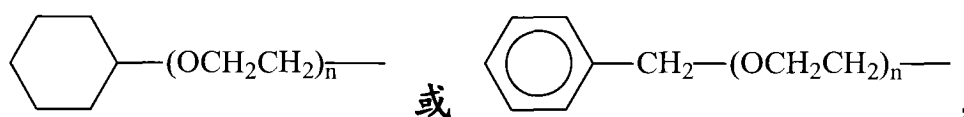
[0097] 其中:k 和 n 都是整数, $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$; $n = 45, 46, 47, \dots, 1200$ 。

[0098] 在另一些优选地实施方案中, 其中所述的“RPEG-”具有如下结构:

[0099] $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_k-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、

[0100] $(\text{CH}_3)_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、 $\text{Cyclohexane ring}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ 、

[0101]



[0102] 其中:k 和 n 都是整数, $k = 0, 1, 2, 3$; $n = 45, 46, 47, \dots, 1200$ 。

[0103] 在一些实施方案中, 其中所述的“-X-”具有如下结构:

[0104] $-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-$ 或 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-$

[0105] 其中:p 和 m 都是整数, $p = 0, 1, 2, \dots, 12$; $m = 0, 1, 2, \dots, 12$ 。

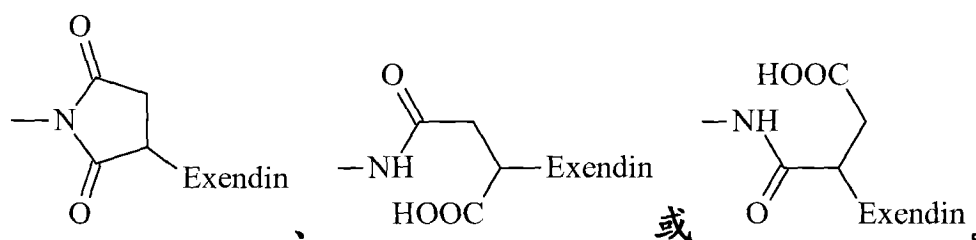
[0106] 在另一些实施方案中, 其中所述的“-X-”具有如下结构:

[0107] $-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-$ 或 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_m-$

[0108] 其中:p 和 m 都是整数, $p = 0, 1, 2, \dots, 5$; $m = 0, 1, 2, 3, 4$ 。

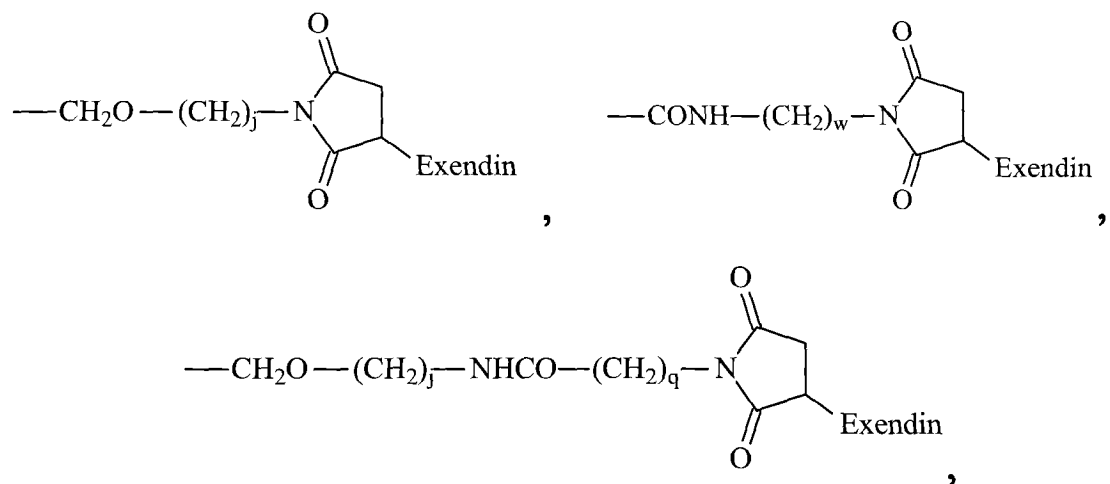
[0109] 在一些实施方案中, 其中所述的“-Z-Exendin”具有如下结构:

[0110]

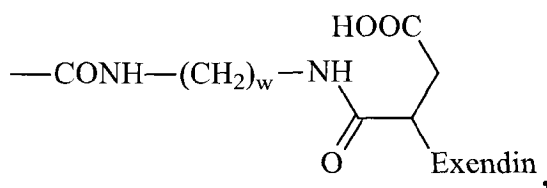
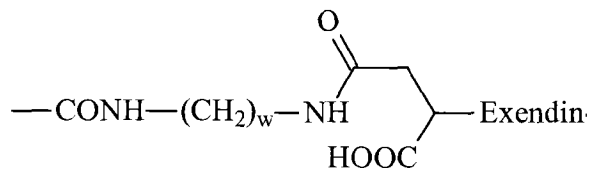
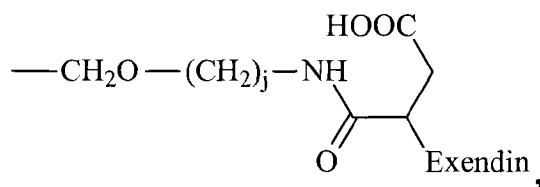
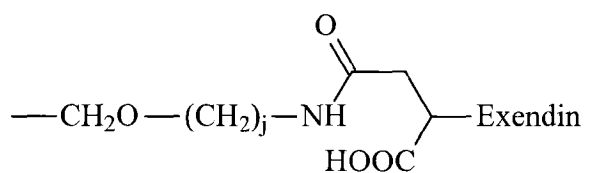
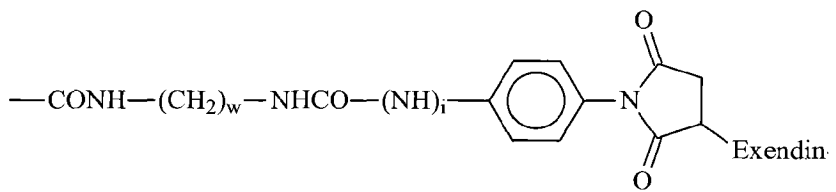
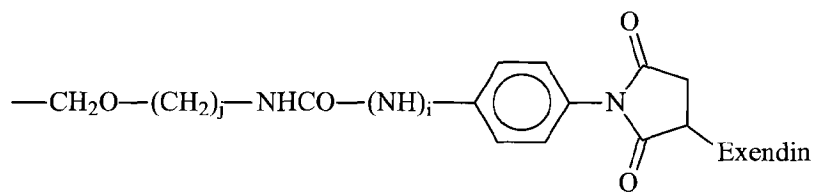
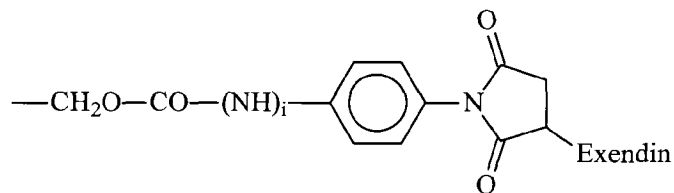
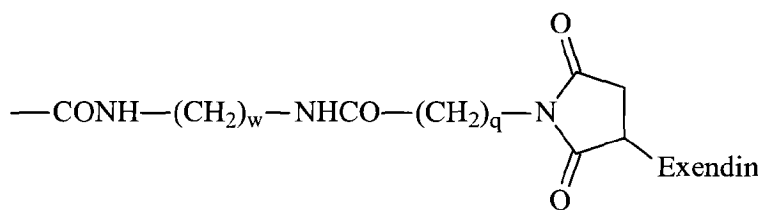


[0111] 优选地, 其中所述的“-Z-Exendin”具有如下结构:

[0112]



[0113]



或

[0114] 其中 :i、j、q、w 是整数, $i = 0, 1$; $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$; $q = 1, 2, 3, 4, 5, 6$; $w = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ 。

[0115] 本发明的 Exendin 变体缀合物可以通过任何合适的方法进行制备。现有技术中已知多种可以将聚合物缀合到蛋白质或肽上的方法,其中包括在合适的条件下将本发明的 Exendin 变体与聚合物、优选经过活化的聚合物相温育。在一个实施方案中,所述聚合物是聚乙二醇,其可通过例如溴化氰法、羰基二咪唑法、N-羟基琥珀酰亚胺法、氰脲酰氯法等活化和缀合到 Exendin 上。或者,通过 PEG-马来酰亚胺、PEG-乙烯基砜、PEG-碘代乙酰胺或 PEG-连硫基正吡啶,可以将 PEG 特异性地缀合到 Exendin 的半胱氨酸残基的巯基上。

[0116] 在一些具体实施方案中,在如下条件下将经过活化的 PEG 与本发明的 Exendin 变体一起孵育:pH 值 5.0-7.0, PEG 与肽的摩尔比值为 1-10,反应时间为 0.5-12 小时,反应温度为 4-37°C。

[0117] 缀合反应之后,可以通过合适的方法将缀合物分离出来。适用的方法包括例如超滤法、透析法或色谱法等,这些均在本领域普通技术人员的能力范围之内。

[0118] 药物组合物

[0119] 本发明的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物可以有多种用途,包括例如用于降低血糖。因此,本发明还提供了一种用于降低血糖的药物组合物,其中包含治疗有效量的本发明的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物,以及任选地药学上可接受的载体。优选地,所述药物组合物可用于治疗 II 型糖尿病。

[0120] 本发明的 Exendin 变体或者 Exendin 变体缀合物的治疗有效量取决于给药途径、受试者的类型以及所考虑的具体哺乳动物的身体特征。这些因素及其与确定该量之间的关系是医药领域中技术人员熟知的。可调整该量和施用方法以达到最佳效力,从而将肽递送到大肠,但是将取决于医药领域技术人员熟知的因素例如体重、饮食、同时用药和其它因素。

[0121] 本发明的药物组合物可在联合疗法中施用,即与一种或多种其它药剂联合应用,其中所述治疗剂一起施用,或者依次施用。在其它一些实施方案中,所述其它药剂可在施用一种或多种本发明的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物或者其药物组合物之前、期间或之后施用。可用于本发明的所述其它药剂包括例如可降低血糖的药剂,胰岛素、胰岛素类似物、糊精激动剂、缩胆囊素、和 / 或其它用于治疗疾病的化合物或组合物。优选地,这样的联合用药可以实现组合的、甚至协同的效果。

[0122] 本文所使用的“可药用载体”或“生理可接受载体”包括任何和所有的生理上相容的盐、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等等。在一些实施方案中,所述载体适于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮给药(例如通过注射或灌注)。取决于给药途径,可用一定材料包被所述治疗剂,以保护该治疗剂免受酸和其它可能使该治疗剂失活的天然条件的作用。

[0123] 施用,本发明的药物制剂以可药用量在可药用组合物中施用。术语“可药用的”意为不干扰活性成分的生物活性效力的无毒物质。这样的制剂通常含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体和任选的其它治疗剂,例如补充性免疫增强剂,包括佐剂,趋化因子和细胞因子。当使用在药物中时,所述盐应该是可药用的,但是非可药用盐可方便的用于制备其可药用盐,它们并不排除在本发明的范围之外。

[0124] 如果需要,本发明的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物可与可药用载体组合。本文所使用的术语“可药用载体”指一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或封装物

质,其适于施用于哺乳动物例如人。术语“载体”表示有机或无机、天然或合成的成分,其与活性成分组合以便于应用。药物组合物的组分也能够以不存在可显著破坏所需药物疗效的相互作用的形式共混合。

[0125] 优选地,本发明的药物组合物可以包含缓冲体系,优选地所述缓冲体系为 pH 为约 3.0 ~ 约 6.0 的醋酸盐缓冲溶液,或者 pH 为约 5.0 ~ 约 9.0 的磷酸盐缓冲溶液。在一些具体实施方案中,合适的缓冲剂包括乙酸盐;柠檬酸盐;硼酸盐;磷酸盐。

[0126] 任选地,所述药用组合物也可含有合适的防腐剂,例如:苯扎氯铵;氯叔丁醇;对羟基苯甲酸酯类和硫柳汞。

[0127] 所述药用组合物可方便地以单位剂量形式存在,并可通过药学领域任何公知方法制备。所有方法包括将所述活性剂与载体联合的步骤,所述载体包含一种或多种辅助成分。通常,通过将所述活性化合物与液体载体、精细分割的固体载体或以上两者均一并密切地联合来制备所述组合物,必要时接着使产品成形。

[0128] 适于胃肠外给药的药物组合物可以是包含一种或多种 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物的无菌水性或非水性制剂。在一些实施方案中,所述制剂与受试者的血液等渗。可根据已知方法使用合适的分散剂或润湿剂以及助悬剂配制此制剂。所述无菌注射制剂也可以是在无毒胃肠外可接受稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬液,例如 1,3- 丁二醇中的溶液。可使用的可接受载体和溶剂包括水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发性油常规用作溶剂或悬浮介质。为此,可使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸如油酸可用于注射制剂。适于经口、皮下、静脉内、肌内等施用的载体配方可在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 中找到。

[0129] 本发明的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物可与保护其避免快速释放的载体制备在一起,例如受控释放配方,包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。现有技术中已知许多制备这样的配方的方法,参阅如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 等。

[0130] 本发明的治疗剂可通过任何常规途径施用,包括注射或随时间逐渐输注。例如,所述施用可以是经口、静脉内、腹膜内、肌内、腔内、肿瘤内、或透皮。

[0131] 本发明的药物组合物以有效量施用。“有效量”是本文提供的任何 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物的量,其单独或者与进一步的剂量和 / 或其它治疗剂一起产生所需应答(例如在受试者中降低血糖水平)。这可包括仅仅暂时减缓糖尿病的发展,或者在一些实施方案中,还包括使糖尿病的发展永久性停止。

[0132] 当然这样的量将取决于受治疗的具体疾病、所述疾病的严重程度、患者个体参数(包括年龄、生理状况、身高和体重)、治疗持续时间、同时进行治疗的性质(如果有的话)、具体的给药途径以及在医疗卫生工作者知识范围内的类似因素。这些因素对本领域技术人员来说是公知的,仅仅使用常规实验就可获知。一般优选使用各个成分或其组合的最大剂量,也就是说根据合理医学判断的最高安全剂量。但是,本领域技术人员可以理解,患者可由于医学原因、心理原因或基本上任何其它原因而要求较低剂量或可容许的剂量。

[0133] 在前述方法中所使用的药物组合物优选是无菌的,且在适于施用给患者的重量单

位或体积单位中含有有效量的单独或与另一种制剂组合的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物,以产生期望的应答,例如血糖的降低。

[0134] 施用于受试者的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物的剂量可根据不同参数进行选择,特别是根据所使用的给药模式和受试者的状态。其它因素包括所需的治疗时期。如果在所应用的最初剂量下受试者中的应答不足,可应用更高的剂量(或通过不同的更局部的递送途径实现的有效更高剂量)到患者容忍度允许的范围。

[0135] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含 0.20mg/ml ~ 5mg/ml Exendin 变体和 / 或包含 4mg/ml ~ 40mg/ml Exendin 变体缀合物,优选地 0.20mg/ml ~ 5mg/ml Exendin 变体和 / 或包含 4mg/ml ~ 40mg/ml Exendin 变体缀合物,更优选地 0.5mg/ml ~ 2mg/ml Exendin 变体和 / 或包含 10mg/ml ~ 20mg/ml Exendin 变体缀合物。一般地,本发明的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物的剂量范围可从约 10 μ g/kg 患者体重到约 100,000 μ g/kg 患者体重。在一些实施方案中,所述剂量范围可从约 0.1mg/kg 到约 20mg/kg。在另一些实施方案中,所述剂量范围可从约 0.1mg/kg 到 5mg/kg、0.1mg/kg 到 10mg/kg 或 0.1mg/kg 到 15mg/kg。在另一些实施方案中,所述剂量范围可从约 1mg/kg 到 5mg/kg、5mg/kg 到 10mg/kg、10mg/kg 到 15mg/kg 或 15mg/kg 到 20mg/kg。在另一些实施方案中,所述剂量约为 0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg、12mg/kg、15mg/kg、17mg/kg、20mg/kg、25mg/kg 或 30mg/kg。在另一个实施方案中,所述剂量约为 1mg/kg、3mg/kg、5mg/kg 或 6mg/kg(请分析这样的剂量范围是否合适??)。基于所述组合物,所述剂量可连续递送(例如通过连续泵),或者以周期性间隔递送。在一些实施方案中,当静脉内给药时,本发明的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物的剂量可以为 0.1 至 20mg/kg 或其中任何值。特定组合物多次给药的理想时间间隔可由本领域技术人员确定,而不需过度实验。所提供组合物的其它给药方案是本领域技术人员已知的,其中剂量、施用时间表、给药部位、给药模式等可以与前述有所不同。在一个实施方案中,所述剂量以静脉内给药。在另一个实施方案中,药剂施用方案是单次静脉内给药。

[0136] 包含 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物(例如药物组合物)和使用说明的药盒也在本发明的范围内。所述药盒可另外含有至少一种其它的试剂,例如一种或多种其它降低血糖的药剂。在另一个实施方案中,药盒可包含载体,所述载体经区室化,以在其中紧密固定地容纳一个或多个容器装置或一系列容器装置(例如试管、管、烧瓶、瓶、注射器等)。所述药盒的成分可包装在水性介质中,或者为冻干形式。

[0137] 本文提供的组合物可以是冻干形式或在水性介质中提供。

[0138] 优选地,所述受试者是脊椎动物,更优选是哺乳动物,最优选是人,但也可以是其它动物,如家养动物(如狗、猫等),家畜(如牛、羊、猪、马等)或实验动物(如猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠等)。

[0139] 本发明中的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物可以单独施用,但优选地作为药物组合物施用,其通常包括根据施用的计划方式所选的适合的药物赋形剂、稀释剂或载体。其可以通过任何适合的方式适用于需要治疗的患者 / 受试者。精确的剂量将取决于多个因素,包括该 Exendin 变体和 Exendin 变体缀合物的精确性质。

[0140] 一些合适的使用方式包括(但不限于)口服、直肠、鼻部、局部(包括口腔和舌下)、皮下、阴道或胃肠外的(包括皮下、肌肉、静脉、皮内、鞘内和硬脑膜外)施用。

[0141] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含等渗调节剂和 / 或防腐剂,优选地所述等渗调节剂为蔗糖、甘露醇、氯化钠和丙三醇中的一种或多种,以及所述防腐剂选自间甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯。本领域的技术人员通过使用例如等张赋形剂如氯化钠注射液、林格氏注射液或乳酸林格氏注射液等,能够很好的制备本发明的 Exendin 变体或 Exendin 变体缀合物的适合的溶液。根据要求,还可以加入稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和 / 或其它一些添加剂。口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉剂或口服液等形式。片剂可以包括固体载体,如明胶或辅料。液体药物组合物通常包括液体载体,如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。也可以包括生理盐水溶液、葡萄糖或其它糖溶液或二醇类,如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。在一些实施方案中,所述药物组合物为液体制剂和 / 或冻干制剂的形式,优选地所述冻干制剂含有冻干保护剂,更优选地所述冻干保护剂选自蔗糖、甘露醇、海藻糖等糖

[0142] 本文所述的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物优选以“治疗有效量”或“有效量”施用给受试者。所述组合物优选以“治疗有效量”施用给受试者,所述治疗有效量或有效量足以显示其对于所述受试者的益处。施用的实际量,以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方(例如确定剂量等)由医护人员决定,并且通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

[0143] 在一些实施方案中,所述的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物的剂量范围可以是 30mg/kg 体重 / 天至 0.00001mg/kg 体重 / 天,或者 3mg/kg / 天至 0.0001mg/kg / 天,或者 0.3mg/kg / 天至 0.01mg/kg / 天。

[0144] 本发明还提供一种治疗疾病的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的 Exendin 变体和 / 或 Exendin 变体缀合物。在一些实施方案中,所述疾病选自下述之中:餐后倾倒综合征、餐后高血糖、葡萄糖耐量降低、肥胖、进食紊乱、胰岛素耐受综合征、糖尿病和高血糖症。在一个优选的实施方案中,所述疾病是 II 型糖尿病。

[0145] 本发明将通过以下实施例进行进一步说明,其不应以任何方式解释为进一步限制。本申请中所有引用的参考文献的全部内容(包含文章参考、授权的专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请)均明确地通过引用并入本文。

[0146] 实施例 1 固相合成 Exendin-4 巯基变体

[0147] 使用“Fmoc-Rinker Amide MBHA 树脂”类型的固相载体,选择 Fmoc 氨基保护策略合成 Exendin-4 巯基变体。第一步:将 Fmoc 保护的氨基酸,用 HBTU/DIPEA 为缩合剂、在 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂中,反应 1-5 小时时间,用茚三酮方法监测缩合反应是否完全。第二步:用 10-30%哌啶为脱保护试剂,在 DMF 溶剂中,反应 10-30 分钟,用茚三酮方法监测氨基保护基是否完全脱除。第三步:按照目标多肽序列,依次使用相应的氨基酸,重复“第一步和第二步”,直到序列中的最后一个氨基酸偶联完毕。第四步:用三氟醋酸(TFA)为裂解试剂,反应 1-5 小时,将多肽从固相载体上裂解下来,同时脱除各种保护基。第五步:对裂解下来的多肽溶液用乙醚进行沉淀;过滤收集沉淀,然后用 C18 类型的色谱柱,选择 0.1% TFA/乙腈-水体系为流动相进行洗脱,收集组分溶液,冷冻干燥得到产物。第六步:用高效液相色谱方法鉴定产物纯度,用氨基酸序列分析和质谱测定产品结构。根据上述实验步骤,合成了 Exendin-4(PB-101),其结构式为:His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-S

er-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :1) ;

[0148] C端第35位为半胱氨酸(Cys)的Exendin-4衍生物PB-102,其结构式为:His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Cys-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :3) ;

[0149] C端第39位为半胱氨酸(Cys)的Exendin-4衍生物PB-105,其结构式为:His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO :4)。

[0150] C端第30位为半胱氨酸(Cys)的Exendin-4衍生物PB-103,其结构式为:His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Cys-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :5)。

[0151] C端第25位为半胱氨酸(Cys)的Exendin-4衍生物PB-104,其结构式为:His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Cys-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO :6)。

[0152] 实施例2 PB-110 (PEG5000-PB-105) 的制备与分析

[0153] 取1.0mg PB-105溶解于1ml 20mM的磷酸钠盐缓冲液(pH 6.5),按PEG与肽摩尔比为2:1的量称取2.5mg PEG5000(5000代表PEG的分子量是5kD,分子结构见图1),加入上述溶液,适当摇匀而使PEG溶解并与肽混合均匀,在4-37℃条件下反应不少于1小时,然后用过量的半胱氨酸溶液终止反应,最后放置于-20℃下为分离纯化备用。

[0154] 用50mM醋酸钠缓冲液(pH 4.5)5倍稀释样品,上样于用50mM醋酸钠缓冲液(pH 4.5)平衡3-5CV的SP离子交换层析柱,上样后用含1M NaCl的50mM醋酸钠缓冲液(pH 4.5)梯度洗脱,在AKTA Purifier收集洗脱峰。产品得率约50%。

[0155] 用300A孔径的C4反相分析柱,0.1% TFA水溶液/0.1% TFA乙腈溶液由61/39到54/46梯度洗脱(10min),在分析性HPLC分析样品保留时间为10.4min,纯度为100%(见图2)。采用GPC分析(条件为0.1M硝酸钠溶液1.0ml/min洗脱),纯度为97%。

[0156] 实施例2b PB-110b (PEG5000b-PB-105) 的制备与分析

[0157] 取1.0mg PB-105溶解于1ml 20mM的磷酸钠盐缓冲液(pH 6.5),按PEG与肽摩尔比为2:1的量称取2.5mg PEG5000b(分子结构见图3),加入上述溶液,适当摇匀而使PEG溶解并与肽混合均匀。其余同实施例2,最后采用GPC分析(条件为0.1M硝酸钠溶液1.0ml/min洗脱),纯度为96.7%。

[0158] 实施例2c PB-110c (PEG5000c-PB-102) 的制备与分析

[0159] 取1.0mg PB-105溶解于1ml 20mM的磷酸钠盐缓冲液(pH 6.5),按PEG与肽摩尔比为2:1的量称取2.5mg PEG5000c(分子结构见图4),加入上述溶液,适当摇匀而使PEG溶解并与肽混合均匀。其余同实施例2,最后采用GPC分析(条件为0.1M硝酸钠溶液1.0ml/min洗脱),纯度为97.8%。

[0160] 实施例 3PB-106 (PEG20000-PB-105) 的制备与分析

[0161] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 10mg PEG20000 (20000 代表 PEG 的分子量是 20kD, 分子结构见图 1), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀, 在 4-37°C 条件下反应不少于 1 小时, 然后用过量的半胱氨酸溶液终止反应, 最后放置于 -20°C 下为分离纯化备用。

[0162] 用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 5 倍稀释样品, 上样于用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 平衡 3-5CV 的 SP 离子交换层析柱, 上样后用含 1M NaCl 的 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 梯度洗脱, 在 AKTA Purifier 收集洗脱峰。产品得率约 50%。

[0163] 上述收集液用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 使用考马斯亮蓝染色法和碘染色法进行对照染色 (见图 5)。用 300A 孔径的 C4 反相分析柱, 0.1% TFA 水溶液 / 0.1% TFA 乙腈溶液由 61/39 到 54/46 梯度洗脱 (10min), 在分析性 HPLC 分析样品保留时间为 11.5min, 纯度为 100% (见图 6)。采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 98.9%。

[0164] 实施例 3b PB-106b (PEG20000b-PB-105) 的制备与分析

[0165] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000b (分子结构见图 7), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 3, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 98.2%。

[0166] 实施例 3c PB-106c (PEG20000c-PB-105) 的制备与分析

[0167] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000c (分子结构见图 8), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 3, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 97.2%。

[0168] 实施例 3d PB-106d (PEG20000d-PB-105) 的制备与分析

[0169] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000-3 (分子结构见图 9), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 3, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 97.5%。

[0170] 实施例 3e PB-106e (PEG20000e-PB-105) 的制备与分析

[0171] 取 1.0mg PB-102 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000e (分子结构见图 10), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 3, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 95.8%。

[0172] 实施例 4PB-107 (PEG30000-PB-105) 的制备与分析

[0173] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 的 20mM 磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 15mg PEG30000 (30000 代表 PEG 的分子量是 30kD, 分子结构见图 1), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀, 在 4-37°C 条件下反应不少于 1 小时, 然后用过量的半胱氨酸溶液终止反应, 最后放置于 -20°C 下为分离纯化备用。

[0174] 用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 5 倍稀释样品, 上样于用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH

4.5) 平衡 3-5CV 的 SP 离子交换层析柱, 上样后用含 1M NaCl 的 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 梯度洗脱, 在 AKTA Purifier 收集洗脱峰。产品得率约 50%。

[0175] 上述收集液用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 使用考马斯亮蓝染色法和碘染色法进行对照染色 (见图 5)。用 300A 孔径的 C4 反相分析柱, 0.1% TFA 水溶液 / 0.1% TFA 乙腈溶液由 61/39 到 54/46 梯度洗脱 (10min), 在分析性 HPLC 分析样品保留时间为 11.5min, 纯度为 100% (见图 11)。采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 98.7%。

[0176] 实施例 5PB-108 (PEG40000-PB-105) 的制备与分析

[0177] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 20mg PEG40000 (40000 代表 PEG 的分子量是 40kD, 分子结构见图 1), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀, 在 4-37°C 条件下反应不少于 1 小时, 然后用过量的半胱氨酸溶液终止反应, 最后放置于 -20°C 下为分离纯化备用。

[0178] 用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 5 倍稀释样品, 上样于用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 平衡 3-5CV 的 SP 离子交换层析柱, 上样后用含 1M NaCl 的 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 梯度洗脱, 在 AKTA Purifier 收集洗脱峰。产品得率约 50%。

[0179] 上述收集液用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 使用考马斯亮蓝染色法和碘染色法进行对照染色 (见图 5)。用 300A 孔径的 C4 反相分析柱, 0.1% TFA 水溶液 / 0.1% TFA 乙腈溶液由 61/39 到 54/46 梯度洗脱 (10min), 在分析性 HPLC 分析样品保留时间为 11.4min, 纯度为 100% (见图 12)。采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 97.2%。

[0180] 实施例 6PB-109 (PEG20000×2 (双臂 PEG)-PB-105) 的制备与分析

[0181] 取 1.0mg Exendin-4 (PB105) 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 20mg PEG20000×2 (20000 代表 PEG 分子中一个臂的分子量是 20kD, 分子结构见图 13), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀, 在 4-37°C 条件下反应不少于 1 小时, 然后用过量的半胱氨酸溶液终止反应, 最后放置于 -20°C 下为分离纯化备用。

[0182] 用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 5 倍稀释样品, 上样于用 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 平衡 3-5CV 的 SP 离子交换层析柱, 上样后用含 1M NaCl 的 50mM 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 梯度洗脱, 在 AKTA Purifier 收集洗脱峰。产品得率约 50%。

[0183] 上述收集液用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 使用考马斯亮蓝染色法和碘染色法进行对照染色 (见图 5)。用 300A 孔径的 C4 反相分析柱, 0.1% TFA 水溶液 / 0.1% TFA 乙腈溶液由 61/39 到 54/46 梯度洗脱 (10min), 在分析性 HPLC 分析样品保留时间为 11.5min, 纯度为 100% (见图 14)。采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 99.3%。

[0184] 实施例 6b PB-109b (PEG20000×2 (双臂 PEG) b-PB-105) 的制备与分析

[0185] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000×2-1 (分子结构见图 15), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 6, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 99.2%。

[0186] 实施例 6c PB-109c (PEG20000×2 (双臂 PEG) c-PB-105) 的制备与分析

[0187] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000×2c (分子结构见图 16), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 6, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 98.8%。

[0188] 实施例 6d PB-109d (PEG20000×2 (双臂 PEG) d-PB-105) 的制备与分析

[0189] 取 1.0mg PB-105 溶解于 1ml 20mM 的磷酸钠盐缓冲液 (pH 6.5), 按 PEG 与肽摩尔比为 2 : 1 的量称取 2.5mg PEG20000×2d (分子结构见图 17), 加入上述溶液, 适当摇匀而使 PEG 溶解并与肽混合均匀。其余同实施例 6, 最后采用 GPC 分析 (条件为 0.1M 硝酸钠溶液 1.0ml/min 洗脱), 纯度为 99.2%。

[0190] 实施例 7PB-105 聚乙二醇化衍生物稳定性试验

[0191] 将 PB-110 (PEG5000-PB-105), PB-106 (PEG20000-PB-105), PB-107 (PEG30000-PB-105), PB-108 (PEG40000-PB-105) 和 PB-109 (PEG20000*2-PB-105) 分别放在 pH 值为 4.5 醋酸钠缓冲液和 pH 值为 7.0 磷酸盐缓冲液, 温度为 4℃ 和 -20℃ 条件下, 考察其稳定性。在 7、15、30、60 天分别取样用 HPLC 分析, 60 天结果表明, 样品在 pH 4.5 和 -20℃ 时保存稳定 (图 18A), 样品在 pH 7.0 时在 4℃ 或 -20℃ 保存均稳定 (图 18B, 18C)。

[0192] 实施例 8Exendin-4 与 PB-105 在体外对细胞内 cAMP 活性的影响

[0193] 将 PC12 细胞消化并按 10^5 细胞/ml 密度接种于 24 孔板, 培养 48 小时 (到 60-70% 融合), 弃去原培养液, 并用 PBS 清洗 2 次, 加入 1ml 含 1% BCA 的 PBS, 将受试的 Exendin-4 和 C 端第 39 位为半胱氨酸的 Exendin-4 衍生物 PB-105 (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} 和 10^{-6} M) 与 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (IBMX, 终浓度为 100 μ M) 共同孵育 30min, 弃去孵药培养基, 加入 500 μ l HCl (0.1M), 终止酶对 cAMP 的降解, 收集细胞, 超声裂解细胞, 按 BCA 检测法测定细胞蛋白含量。按 cAMP 酶联免疫试剂盒说明进行操作, 设立不同浓度的标准品组以建立标准曲线, 反应完成后在酶标仪于 450nm 测定光吸收值, 用该吸收值在标准曲线上读出对应的 cAMP 浓度, 最后计算样品中 cAMP 浓度。使用 GraphpadPrizm 软件, 对 Exendin-4 和 PB-105 在体外增加细胞内 cAMP 量效关系结果进行计算。

[0194] 实验结果如图 19 所示, Exendin-4 呈剂量依赖式地增加 PC12 细胞内 cAMP 含量, 增加 cAMP 最大值 (E_{max}) 为 133.2 ± 7.2 pmol/mg (蛋白), EC_{50} 值为 1.9×10^{-9} M。PB-105 在体外对 PC12 细胞内 cAMP 的影响与 Exendin-4 非常相似。其中 PB-105 增加 cAMP 最大值 (E_{max}) 为 129.4 ± 6.8 pmol/mg (蛋白) (PB-105 vs Exendin-4, $P > 0.05$); EC_{50} 值为 2.5×10^{-9} M。进一步分析表明 Exendin-4 与 PB-105 的 Log EC_{50} 值分别为 -8.71 ± 0.15 和 -8.61 ± 0.15 (PB-105 vs Exendin-4, $P > 0.05$)。说明在 C 端第 39 位引入半胱氨酸 (巯基), 不改变 Exendin-4 本身的生物活性。

[0195] 实施例 9PB-105 及其聚乙二醇化衍生物在体外对细胞内 cAMP 活性的影响

[0196] 将 PC12 细胞消化并按 10^5 细胞/ml 密度接种于 24 孔板, 培养 48 小时 (到 60-70% 融合), 弃去原培养液, 并用 PBS 清洗 2 次, 加入 1ml 含 1% BCA 的 PBS, 将受试药物 PB-105, PB-105 聚乙二醇化 (PEG5000) 衍生物 PB-110, PB-105 聚乙二醇化 (PEG20000) 衍生物 PB-106, PB-105 聚乙二醇化 (PEG30000) 衍生物 PB-107, PB-105 聚乙二醇化 (PEG40000) 衍生物 PB-108 和和 PB-105 聚乙二醇化 (PEG20000x2, 双臂) 衍生物 PB-109 (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} ,

10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} 和 10^{-5} M) 与 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (IBMX, 终浓度为 $100 \mu\text{M}$) 共同孵育 30min, 弃去孵药培养基, 加入 $500 \mu\text{l}$ HCl (0.1M), 终止酶对 cAMP 的降解, 收集细胞, 超声裂解细胞, 按 BCA 检测法测定细胞蛋白含量。按 cAMP 酶联免疫试剂盒说明进行操作, 设立不同浓度的标准品组以建立标准曲线, 反应完成后在酶标仪于 450nm 测定光吸收值, 用该吸收值在标准曲线上读出对应的 cAMP 浓度, 最后计算样品中 cAMP 浓度。使用 Graphpad Prizm 软件, 对 PB-106、PB-107、PB-108、PB-109 及 PB-110 在体外增加细胞内 cAMP 的量效关系进行计算。

[0197] 实验结果表明, PB-105 剂量依赖式地增加 PC12 细胞内 cAMP 含量, 其增加 cAMP 最大值 (E_{max}) 为 $103.9 \pm 1.5 \text{pmol/mg}$ (蛋白), EC_{50} 值为 $1.3 \times 10^{-9}\text{M}$ 。聚乙二醇化修饰呈分子量 ($5\text{--}40\text{kD}$) - 依赖式地平行右移量效关系曲线, 降低 PB-105 生物活性 (图 20)。PB-110, PB-106, PB-107, PB-108 和 PB-109 的 EC_{50} 值分别为 1.1×10^{-9} , 1.1×10^{-9} , 1.2×10^{-8} , 9.7×10^{-8} 和 $1.3 \times 10^{-7}\text{M}$ 。其中 5kD (PB-110) 和 20kD (PB-106) 聚乙二醇化修饰几乎不影响 PB-105 的活性 (分别为 PB-105 活性的 115%), 而 30kD (PB-107) 和 40kD (包括线性和双臂, PB-108 和 PB-109) 聚乙二醇化修饰则分别降低 PB-105 的活性约 90% 和 99%。聚乙二醇化衍生物中聚乙二醇的分子量与这些药物的活性 ($\text{Log } EC_{50}$) 的相关性见图 21A (包括图 19 中 PB-105 的 EC_{50} 值), 从而发现定点与聚乙二醇化修饰 Exendin-4 衍生物对生物活性影响的一个“拐点”, 即在分子量 20kDa 之前, 聚乙二醇化修饰不影响生物活性。相反, 聚乙二醇化修饰不影响 PB-105 的最大刺激 cAMP 生成作用 (E_{max}), PB-110, PB-106, PB-107, PB-108 和 PB-109 的 E_{max} 值分别为 102.1 ± 1.8 , 111.9 ± 2.1 , 126.2 ± 3.4 , 100.4 ± 1.7 和 $115.5 \pm 3.5 \text{pmol/mg}$ (蛋白)。聚乙二醇化衍生物中聚乙二醇的分子量与这些药物的 E_{max} 值无相关性 (见图 21B) (包括图 19 中 PB-105 的 E_{max} 值)。

[0198] 实施例 10 Exendin-4 和 PB-105 降血糖作用时效试验

[0199] 雄性昆明小鼠 (体重 $27\text{--}32\text{g}$), 实验前小鼠不禁食禁水, 随机分为 3 组, 每组 6 只。分别皮下单次注射等体积的 saline (10ml/kg)、Exendin-4 ($10 \mu\text{g/kg}$) 和 C 端第 39 位为半胱氨酸的 Exendin-4 衍生物 PB-105 ($10 \mu\text{g/kg}$)。注射后 0, 1, 2, 4, 8, 12 小时尾尖采血, 使用美国强生公司稳豪型血糖仪及配套试纸检测血糖。以不同时间点的血糖值为纵坐标, 时间为横坐标, 建立降血糖作用的时效曲线, 计算出 Exendin-4 及 PB-105 降血糖作用的生物半衰期。结果如图 22 所示, 经半胱氨酸置换后的 Exendin-4 变体与 Exendin-4 的生物半衰期分别为 $4.7 \pm 0.2\text{hrs}$ 和 $4.4 \pm 0.2\text{hrs}$ (PB-105 vs Exendin-4, $P > 0.05$)。表明在 C 端 39 位经半胱氨酸置换后的 Exendin-4 变体与 Exendin-4 具有相当的生物半衰期。

[0200] 实施例 11 Exendin-4 和 PB-105 降血糖作用量效试验

[0201] 雄性昆明小鼠 (体重 $23\text{--}27\text{g}$), 实验前小鼠禁食 3h, 但不禁水, 随机分 16 组, 每组 18 只。分别皮下单次注射等体积的 saline (10ml/kg), Exendin-4 ($0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 100 \mu\text{g/kg}$) 和 C 端第 39 位为半胱氨酸的 Exendin-4 衍生物 PB-105 ($0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 100 \mu\text{g/kg}$)。注射后 1 小时尾尖采血, 使用美国强生公司稳豪型血糖仪及配套试纸检测血糖。以血糖值为纵坐标, 剂量为横坐标, 建立降血糖作用的量效曲线 (图 23), 并且运用 Graphpad Prizm 软件, 计算 Exendin-4 和 PB-105 降糖作用量效关系参数 (E_{max} 和 ED_{50})。结果表明, 单次注射 Exendin-4 和 PB-105 的最大降糖效率分别为 32.2% 和 36.1%, ED_{50} 值分别为 0.6 和 $1.2 \mu\text{g/kg}$ 。进一步分析表明, Exendin-4 和 PB-105 的 $\text{Log}ED_{50}$ 值分别

为 -0.25 ± 0.17 和 0.08 ± 0.20 (PB-105 vs Exendin-4, $P > 0.05$)。实验结果显示,在 C 端 39 位经半胱氨酸置换后的 Exendin-4 衍生物 PB-105 与 Exendin-4 降血糖效应没有显著性差异。

[0202] 实施例 12 Exendin-4 及其衍生物 PB-102 降血糖作用量效试验

[0203] 雄性昆明小鼠 (体重 22-26g), 实验前小鼠禁食 3h, 但不禁水, 随机分 18 组, 每组 6 只。分别皮下单次注射等体积的 saline (10ml/kg), Exendin-4 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/kg) 和 C 端第 35 位为半胱氨酸的 Exendin-4 衍生物 PB-102 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/kg)。注射后 1 小时尾尖采血, 使用美国强生公司稳豪型血糖仪及配套试纸检测血糖。以血糖值为纵坐标, 剂量为横坐标, 建立降血糖作用的量效曲线 (图 24), 并且运用 Graphpad Prizm 软件, 计算 Exendin-4 和 PB-102 降糖作用量效关系参数 (E_{max} 和 ED_{50})。结果表明, 单次注射 Exendin-4 和 PB-102 的最大降糖效率分别为 39.8% 和 32.8%, ED_{50} 值分别为 0.5 和 2.5 μ g/kg。进一步分析表明, Exendin-4 和 PB-102 的 $\text{Log } ED_{50}$ 值分别为 -0.2867 ± 0.2272 和 0.4015 ± 0.2946 (PB-102 vs Exendin-4, $P > 0.05$)。实验结果显示, 在 C 端 35 位经半胱氨酸置换后的 Exendin-4 衍生物 PB-102 与 Exendin-4 降血糖效应没有显著性差异。

[0204] 实施例 13 PB-105 及其聚乙二醇化修饰衍生物等量降血糖时效试验

[0205] 雄性昆明小鼠 (体重 22-26g), 实验前小鼠不禁食禁水, 随机分为 6 组, 每组 12 只。分别皮下单次注射 PB-105 (10 μ g/kg), PB-105 聚乙二醇化 (PEG5000) 衍生物 PB-110 (10 μ g/kg), PB-105 聚乙二醇化 (PEG20000) 衍生物 PB-106 (10 μ g/kg), PB-105 聚乙二醇化 (PEG30000) 衍生物 PB-107 (10 μ g/kg), PB-105 聚乙二醇化 (PEG40000) 衍生物 PB-108 (10 μ g/kg) 和 PB-105 聚乙二醇化 (PEG20000x2, 双臂) 衍生物 PB-109 (10 μ g/kg)。注射后 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36 小时尾尖采血, 使用美国强生公司稳豪型血糖仪及配套试纸检测血糖。以不同时间点的血糖值为纵坐标, 时间为横坐标, 建立降血糖作用的时效曲线 (图 25), 并计算出 PB-105 及其聚乙二醇衍生物降血糖作用的生物半衰期和最大降糖作用和降糖作用曲线下面积 (表 1)。进一步采用 PEG 分子量 vs. 生物半衰期、最大降糖作用和降糖作用曲线下面积的相关分析结果表明, PB-105 聚乙二醇化修饰衍生物 PB-106, PB-107, PB-108 和 PB-109 显著延长了 PB-105 降血糖作用的时间 (生物半衰期 $t_{1/2}$), 但在 PEG 分子量在 5-20kDa 区间, 其生物半衰期延长与分子量成正比, 而在 20kDa 后降血糖作用时间 (生物半衰期) 基本维持不变 (图 26A); 聚乙二醇化修饰衍生物在 PEG 分子量在 5-20kDa 区间降血糖活性 (最大降糖作用) 保持不变, 但之后随着聚乙二醇分子量的增加而降低 (图 26B); 在降糖作用曲线下面积方面, 仅 PB-106 (PEG20kDa) 显著性高于 PB-105 (图 26C)。由上可知, 在 PEG 分子量小于 20kDa 时 (“拐点”), 定点聚乙二醇化修饰 (PB-110 和 PB-106) 不影响 Exendin-4 衍生物生物活性 (分别为 PB-105 活性的 96%), 而 PEG 分子量超过 20kDa 时 (PB-107、PB-108 和 PB-109), 聚乙二醇化修饰显著降低生物活性。该发现与前述体外 cAMP 实验结果一致 (见图 21)。

[0206] 表 1 PB-105 及其聚乙二醇衍生物降血糖作用的生物半衰期、最大降糖作用和血糖曲线上面积 (Area Above Curve for lowering blood sugar, AAC) (每组 12 只小鼠)

[0207]

Exendin-4 衍生物	T _{1/2} (hrs)	最大降糖作用 (%给药前 值)	血糖曲线上 面积(AAC, mmol*h/L)
PB-105	4.9 ± 0.1	38.0 ± 4.3	32.8 ± 5.4
PB-110	7.0 ± 2.0	36.3 ± 1.2	31.8 ± 4.6
PB-106	13.4 ± 0.5*	36.5 ± 3.2	53.9 ± 4.3*
PB-107	12.5 ± 2.0*	24.3 ± 2.8*	30.0 ± 7.2
PB-108	10.8 ± 2.0*	22.6 ± 2.9*	25.3 ± 5.7
PB-109	9.2 ± 2.2*	20.2 ± 3.2*	21.6 ± 4.8

[0208] *P < 0.05 (vsPB-105)

[0209] 实施例 14PB-105 及其聚乙二醇化 (PEG30000) 衍生物 PB-107 等效量降血糖作用时效试验

[0210] 由于 PEG30000 (PB-107) 在体外降低了 PB-105 的生物活性约 90% (图 20), 并在体内降低了 PB-105 的生物活性约 50% (图 25), 本研究加大 PB-107 剂量从而在产生与 PB-105 等效的条件下, 进一步研究 PB-107 的生物半衰期。雄性昆明小鼠 (体重 22-25g), 实验前小鼠不禁食禁水, 随机分为 2 组, 每组 6 只。分别皮下单次注射 PB-105 (10 μg/kg) 和 PB-105 聚乙二醇化 (PEG30000) 衍生物 PB-107 (100 μg/kg, 约产生 10 μg/kg PB-105 的 100% 降血糖作用的剂量)。注射后 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72 小时尾尖采血, 使用美国强生公司稳豪型血糖仪及配套试纸检测血糖。以不同时间点的血糖值为纵坐标, 时间为横坐标, 建立降血糖作用的时效曲线, 计算出 PB-105 (10 μg/kg) 和 PB-107 (100 μg/kg) 降血糖作用的生物半衰期。结果如图 27 所示, PB-105 (10 μg/kg) 和 PB-107 (100 μg/kg) 的生物半衰期分别为 4.5 ± 0.4hrs 和 44.6 ± 4.5hrs (P > 0.05, PB-107 vs PB-105)。等效剂量的时效关系研究结果表明, 聚乙二醇化 (PEG30000) (PB-107) 延长 PB-105 降血糖作用时间达 10 倍。

[0211] 实施例 15PB-105 和其聚乙二醇化 (PEG20000) 衍生物 PB-106 降血糖作用量效试验

[0212] 雄性昆明小鼠 (体重 20-24g), 实验前小鼠禁食 3h, 但不禁水, 随机分 13 组, 每组 6 只。分别皮下单次注射等体积的盐水 (10ml/kg), PB-105 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μg/kg) 和等剂量的聚乙二醇化 (PEG20000) 衍生物 PB-106 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μg/kg)。PB-105 组于注射后 1 小时 (降糖峰值时间, 见图 22 和 25) 尾尖采血, PB-106 组于注射后 4 小时 (降糖峰值时间, 见图 25) 尾尖采血, 使用美国强生公司稳豪型血糖仪及配套试纸检测血糖。以血糖值为纵坐标, 剂量为横坐标, 建立降血糖作用的量效曲线 (图 28), 并且运用 Graphpad

Prizm 软件, 计算 PB-105 和 PB-106 降糖作用量效关系参数 (E_{\min} , E_{\max} 和 ED_{50})。单次注射 PB-105 和 PB-106 的 E_{\min} 分别为 8.3 ± 0.2 和 $8.4 \pm 0.3 \text{ mmol/L}$; 其 E_{\max} 分别为 6.0 ± 0.3 和 $5.5 \pm 0.6 \text{ mmol/L}$ (最大降糖效率分别为 27.8% 和 34.5%)。PB-105 和 PB-106 的 ED_{50} 值分别为 1.2 和 $3.3 \mu\text{g/kg}$ 。进一步分析表明, PB-105 和 PB-106 的 $\text{Log } ED_{50}$ 值分别为 0.07 ± 1.2 和 0.5 ± 0.2 (PB-106 vs. PB-105, $P > 0.05$)。实验结果显示, 经聚乙二醇 (PEG20000) 修饰以后的 PB-105 衍生物 PB-106 与 PB-105 降血糖效应 (包括 E_{\max} 和 ED_{50}) 没有显著性差异。

[0213] 实施例 16 Exendin-4 及 PB-105 药代动力学试验

[0214] 雄性 SD 大鼠 (体重 250-300g, 购自中国科学院上海实验动物中心), 给予 30% 水合氯醛 (300mg/kg, i. p.) 麻醉, 在右上缘大腹股沟切口, 分离股动静脉, 实施股动静脉插管术 (聚乙烯 PE50 管, 美国 Becton Dickinson 公司), 右股动脉插管用于采血取样, 右股静脉插管用于给药, PE-50 管经背部皮下从颈背部引出, 将导管内充满肝素液 (200U/ml), 缝合切口, 术后大鼠独笼饲养, 恢复 12h 以上。插管大鼠在饲养笼内保持自由活动状态, 自由饮食, 分为 Exendin-4 组和 PB-105 组 (每组 3-6 只), 分别于右股静脉推注给药 $5 \mu\text{g/kg}$, 分别于给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 和 6 小时通过 PE50 管取血。血样置 Eppendorf 管离心制备血浆 (5000rpm, 5min), -20°C 备用。各组血浆样品制备齐全后采用 Exendin-4 EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. USA) 检测样品中药物浓度。结果以血药浓度值为纵坐标, 时间为横坐标, 分别建立 Exendin-4 和 PB-105 药-时曲线 (图 29), 结果表明 PB-105 与 Exendin-4 在大鼠体内呈现相似分布和消除规律。

[0215] 运用 Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 软件, 进行非房室模型 (Non-compartmental method) 参数统计, 计算出 Exendin-4 和 PB-105 的药代动力学参数 (C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, MRT, CL 和 V_{ss} 等), 结果见表 2。其中 Exendin-4 和 PB-105 的血浆半衰期分别为 4.8 ± 0.7 和 $4.9 \pm 1.4 \text{ hrs}$ (PB-105 vs. Exendin-4, $P > 0.05$); 药-时曲线下面积分别为 45.4 ± 1.6 和 $47.9 \pm 19.0 \text{ ng*hr/ml}$ (PB-105 vs. Exendin-4, $P > 0.05$)。实验结果显示 PB-105 和 Exendin-4 具有相似的药代动力学特性。

[0216] 表 2 Exendin-4 和 PB-105 的药代动力学参数 (每组 3-6 只大鼠)

[0217]

	N	C_{\max} (ng/ml)	AUC_{0-t} (ng*h/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/ml)
PB-101	3	33.0 ± 2.0	45.4 ± 1.6	85.2 ± 4.4
PB-105	6	36.8 ± 10.6	47.9 ± 19.0	103.8 ± 51.1

[0218]

	$T_{1/2}$ (h)	MRT (h)	CL (ml/(h*kg))	V_{ss} (ml/kg)
PB-101	4.8 ± 0.7	6.9 ± 0.7	59.0 ± 3.1	403.2 ± 21.3
PB-105	4.9 ± 1.4	7.2 ± 2.2	117.7 ± 58.5	563.8 ± 186.1

[0219] 实施例 17 PB-105 及其聚乙二醇化修饰衍生物药代动力学试验

[0220] 雄性 SD 大鼠 (体重 250-300g, 购自中国科学院上海实验动物中心), 给予 30% 水合氯醛 (300mg/kg, i. p.) 麻醉, 在右上缘大腹股沟切口, 分离股动静脉, 实施股动静脉插管术 (聚乙烯 PE50 管, 美国 Becton Dickinson 公司), 右股动脉插管用于采血取样, 右股静脉

插管用于给药, PE-50 管经背部皮下从颈背部引出, 将导管内充满肝素液 (200U/ml), 缝合切口, 术后大鼠独笼饲养, 恢复 12h 以上。插管大鼠在饲养笼内保持自由活动状态, 自由饮食。分为 6 组 (每组 3 只): PB-105, PB-110, PB-106, PB-107, PB-108 和 PB-109。分别于右股静脉推注给药 5ug/kg 不同的时间点采血 0.2ml, 在给药后 48 小时前通过 PE50 管取血, 48 小时后采用尾静脉取血。具体如下: PB-105 组 (给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 小时), PB-110 组 (给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 小时), PB-106 组 (给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 小时), PB-107 组 (给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144 小时), PB-108 和 PB-109 组 (给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 小时)。血样置 Eppendorf 管离心制备血浆 (5000rpm, 5min), -20°C 备用。各组血浆样品制备齐全后采用 Exendin-4EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. USA) 检测样品中药物浓度。结果以血药浓度值为纵坐标, 时间为横坐标, 建立聚乙二醇化修饰衍生物药-时曲线, 结果表明 PB-105 及其聚乙二醇化衍生物显示快速分布和慢速消除 (见图 30)。

[0221] 运用 Kinetica 5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 软件, 进行非房室模型 (Non-compartmental method) 参数统计, 计算出 PB-105 及其聚乙二醇化修饰衍生物的药代动力学参数 (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$, MRT, CL 和 V_{ss} 等), 结果见表 3。其中, PB-105 的血浆半衰期为 2.9 ± 0.1 hrs, 其聚乙二醇化衍生物的血浆半衰期随聚乙二醇分子量的增加而延长; PB-105 药-时曲线下面积为 18.2 ± 1.9 ng*hr/ml, 其聚乙二醇化衍生物的药-时曲线下面积随聚乙二醇分子量的增加而增加。图 31A 和图 31B 分别显示聚乙二醇化衍生物中聚乙二醇分子量与血浆半衰期和药-时曲线下面积之间的关系。

[0222] 表 3 PB-105 及其聚乙二醇化修饰衍生物的药代动力学参数 (每组 3 只大鼠)

[0223]

	C_{max} (ng/ml)	AUC_{0-t} (ng*hr/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*hr/ml)
PB-105	23.0 ± 2.8	18.2 ± 1.9	24.5 ± 2.2
PB-110	76.1 ± 14.5	101.0 ± 25.8	165.5 ± 45.3
PB-106	149.2 ± 5.7	942.5 ± 84.6	1146.0 ± 65.2
PB-107	128.2 ± 15.5	1485.2 ± 123.0	1879.3 ± 82.1
PB-108	148.1 ± 24.5	1780.7 ± 279.9	2202.5 ± 318.8
PB-109	240.1 ± 20.9	5478.8 ± 654.3	7033.4 ± 861.6

[0224]

	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	CL (ml/hr*kg)	V_{ss} (ml/kg)
PB-105	2.9 ± 0.1	4.1 ± 0.2	207.8 ± 20.9	846.3 ± 79.0
PB-110	6.1 ± 0.8	9.6 ± 1.0	37.5 ± 13.5	340.1 ± 92.9
PB-106	42.6 ± 8.1	47.3 ± 11.6	4.4 ± 0.3	209.0 ± 57.3
PB-107	70.5 ± 2.6	75.3 ± 9.5	2.7 ± 0.1	201.6 ± 27.3
PB-108	74.8 ± 4.5	90.2 ± 10.2	2.3 ± 0.3	193.6 ± 50.0
PB-109	103.6 ± 2.4	102.0 ± 6.8	0.7 ± 0.1	74.8 ± 10.4

[0225] 本发明的 Exendin 变体具有改善的药理学性质,能显著降低血糖,具有与 Exendin-4 相当或更优的生物学活性。通过半胱氨酸巯基定点偶联聚合物的 Exendin 变体缀合物显著延长了 Exendin 变体的半衰期,保持了高的生物活性。

[0226] 本发明已通过各个具体实施例作了举例说明。但是,本领域普通技术人员能够理解,本发明并不限于各个具体实施方式,普通技术人员在本发明的范围内可以作出各种改动或变型,而仍不背离本发明的精神和范围。这样的改动和变型均在本发明的范围之内。

[0227] 序列表

[0228] <110> 派格生物医药(苏州)有限公司

[0229] <120> 新型 Exendin 变体及其缀合物

[0230] <130>MP090190. ST25

[0231] <160>6

[0232] <170>PatentIn version 3.2

[0233] <210>1

[0234] <211>39

[0235] <212>PRT

[0236] <213> 未知

[0237] <220>

[0238] <223>Exendin-4 多肽

[0239] <400>1

[0240] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

[0241] 1 5 10 15

[0242] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

[0243] 20 25 30

[0244] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

[0245] 35

[0246] <210>2

[0247] <211>39

[0248] <212>PRT

[0249] <213> 未知

[0250] <220>

[0251] <223>Exendin-3 多肽

[0252] <400>2

[0253] His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

[0254] 1 5 10 15

[0255] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

[0256] 20 25 30

[0257] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

[0258] 35

[0259] <210>3

[0260] <211>39
 [0261] <212>PRT
 [0262] <213> 人工序列
 [0263] <220>
 [0264] <223> 来源于 Exendin-4
 [0265] <400>3
 [0266] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 [0267] 1 5 10 15
 [0268] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 [0269] 20 25 30
 [0270] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Cys
 [0271] 35
 [0272] <210>4
 [0273] <211>39
 [0274] <212>PRT
 [0275] <213> 人工序列
 [0276] <220>
 [0277] <223> 来源于 Exendin-4
 [0278] <400>4
 [0279] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 [0280] 1 5 10 15
 [0281] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 [0282] 20 25 30
 [0283] Ser Gly Cys Pro Pro Pro Ser
 [0284] 35
 [0285] <210>5
 [0286] <211>39
 [0287] <212>PRT
 [0288] <213> 人工序列
 [0289] <220>
 [0290] <223> 来源于 Exendin-4
 [0291] <400>5
 [0292] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 [0293] 1 5 10 15
 [0294] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Cys Pro Ser
 [0295] 20 25 30
 [0296] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 [0297] 35
 [0298] <210>6

- [0299] <211>39
[0300] <212>PRT
[0301] <213>人工序列
[0302] <220>
[0303] <223>来源于 Exendin-4
[0304] <400>6
[0305] His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
[0306] 1 5 10 15
[0307] Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Cys Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
[0308] 20 25 30
[0309] Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
[0310] 35

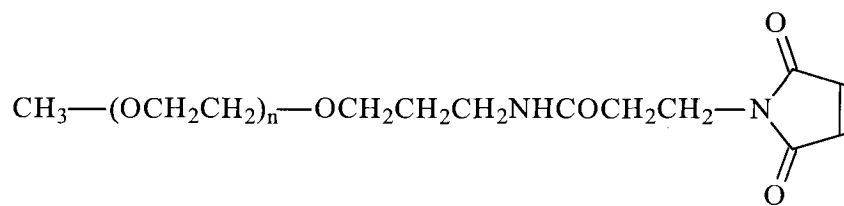


图 1

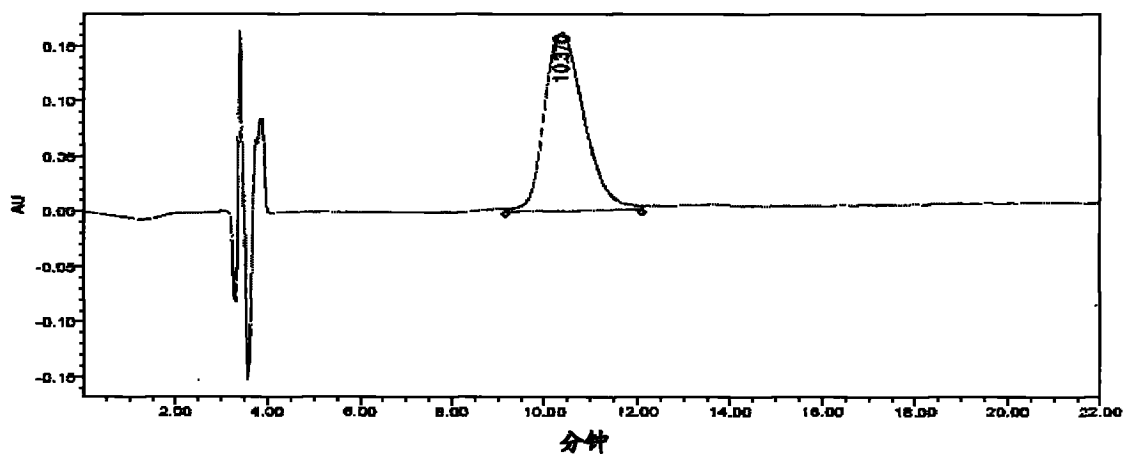


图 2

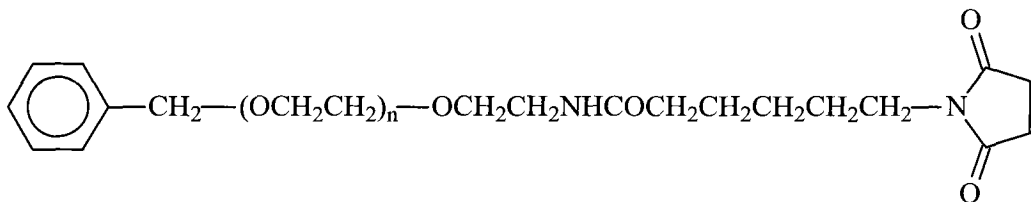


图 3

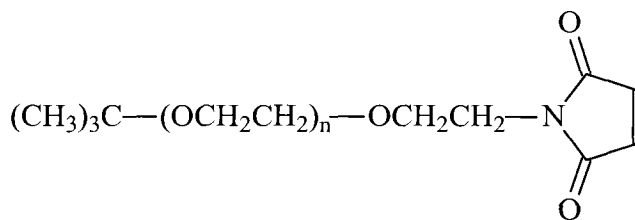


图 4

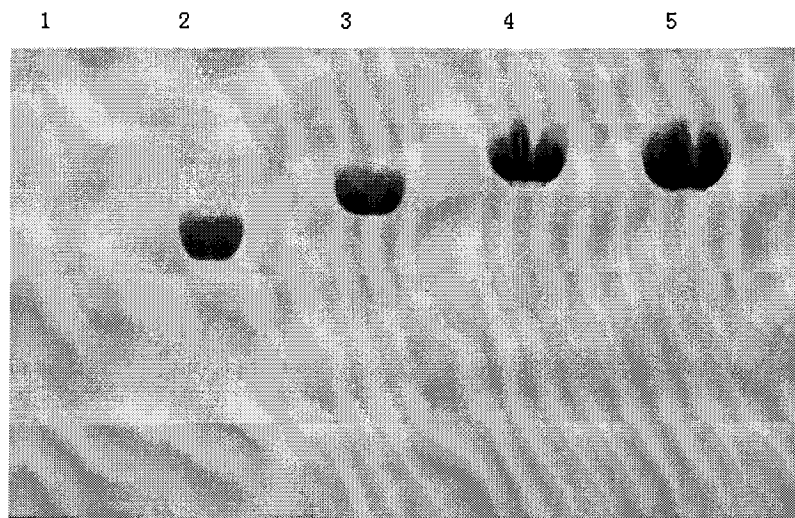


图 5A

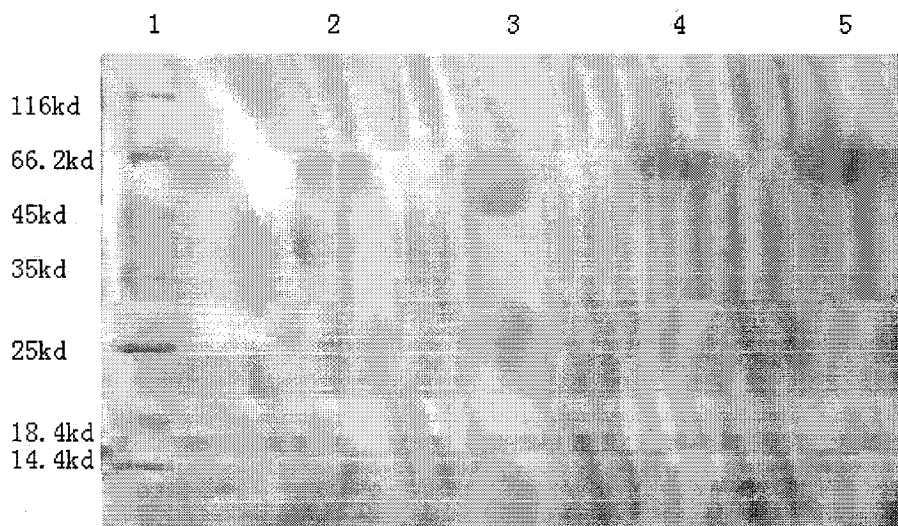


图 5B

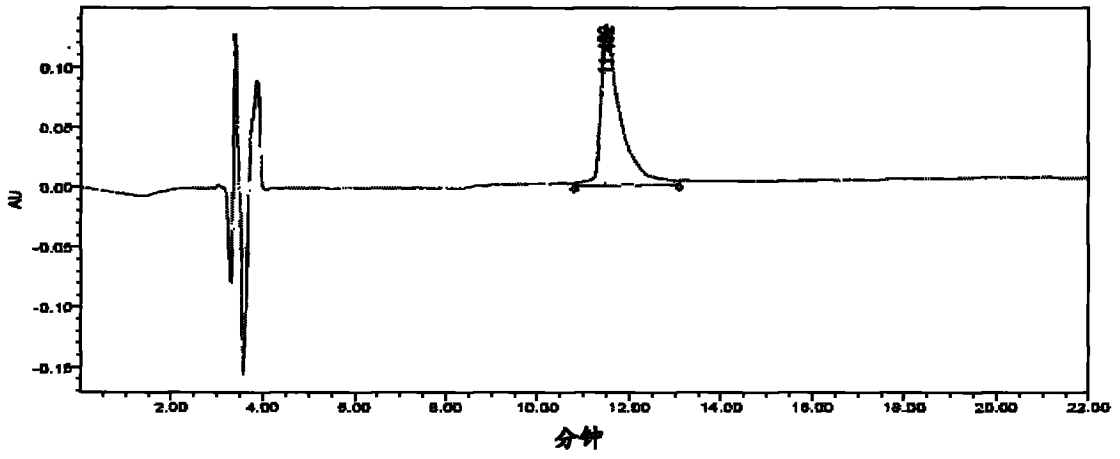


图 6

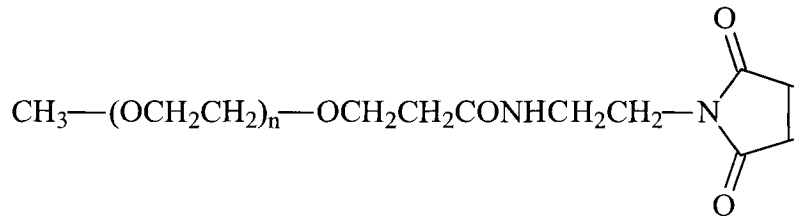


图 7

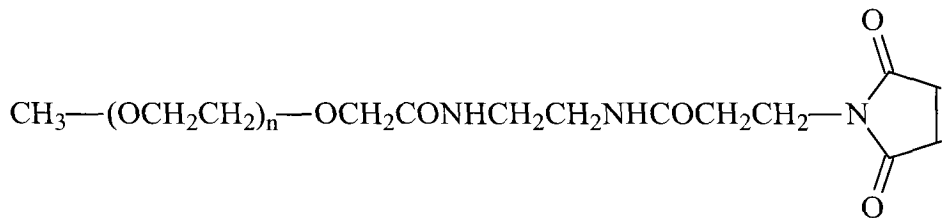


图 8

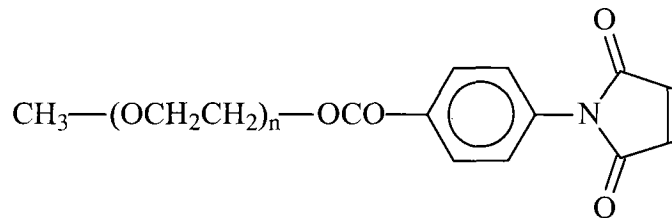


图 9

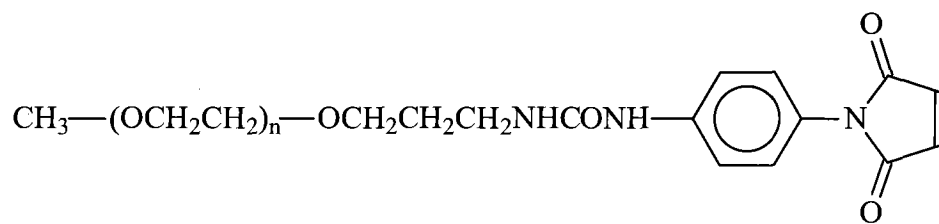


图 10

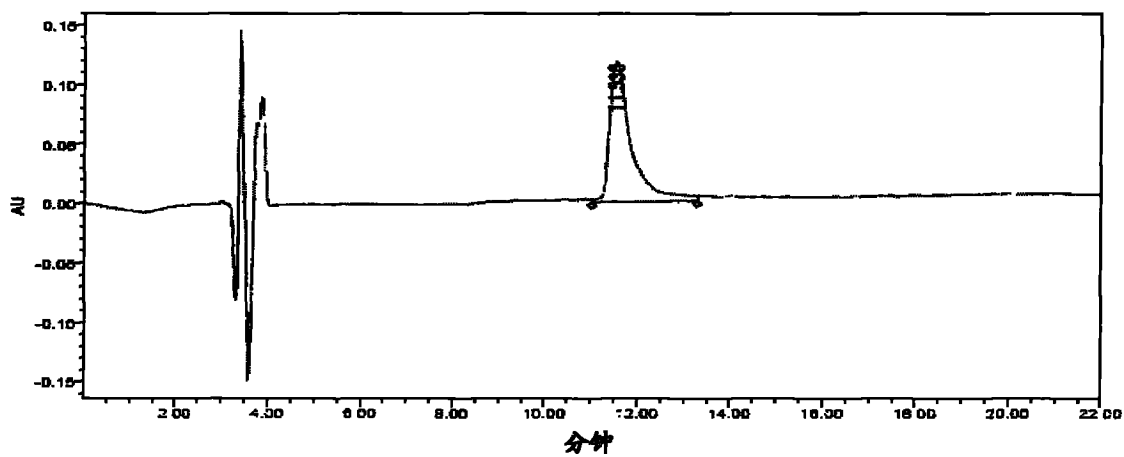


图 11

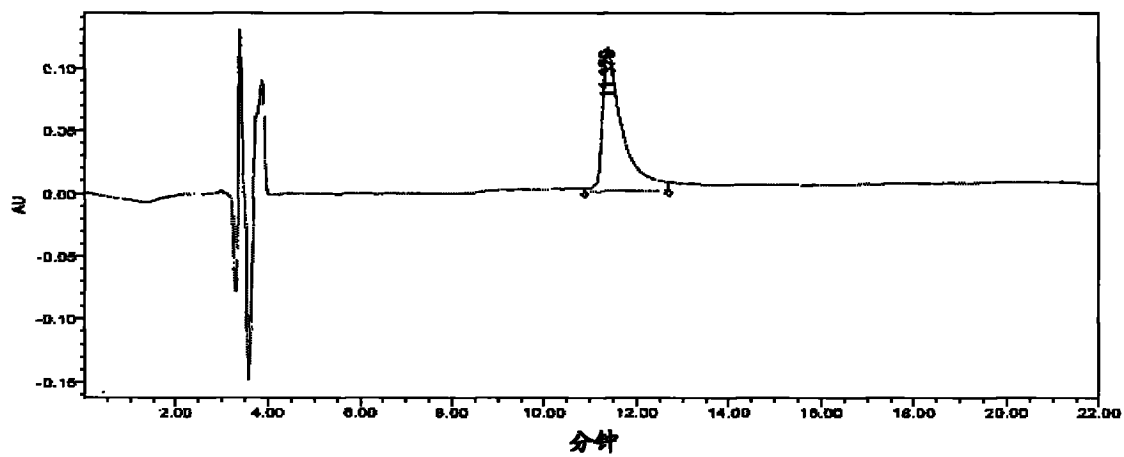


图 12

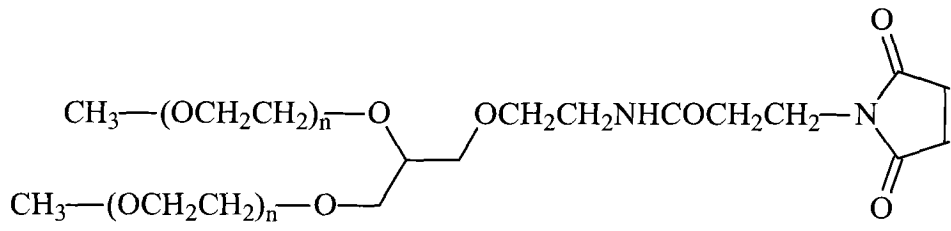


图 13

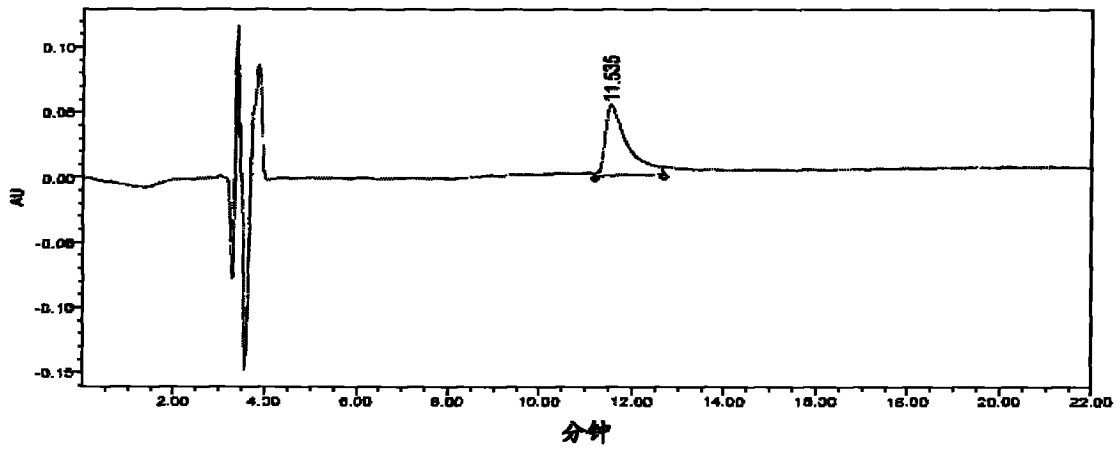


图 14

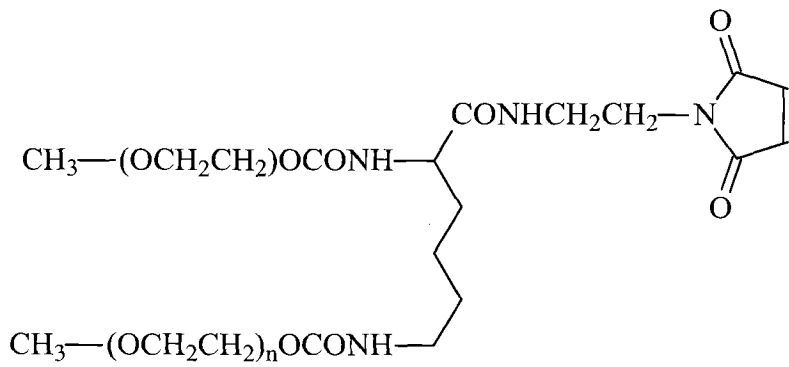


图 15

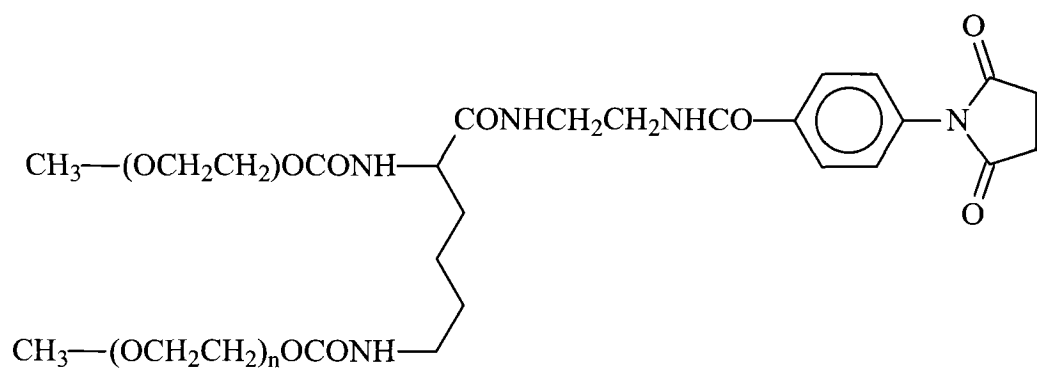


图 16

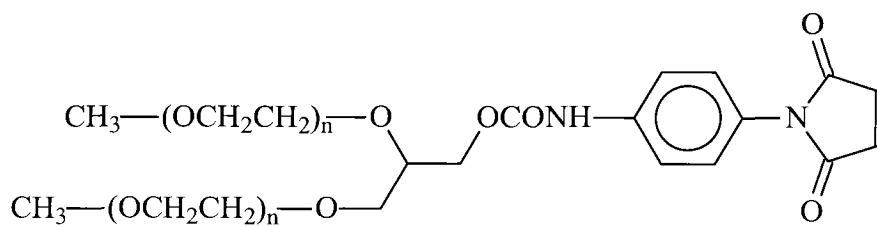


图 17

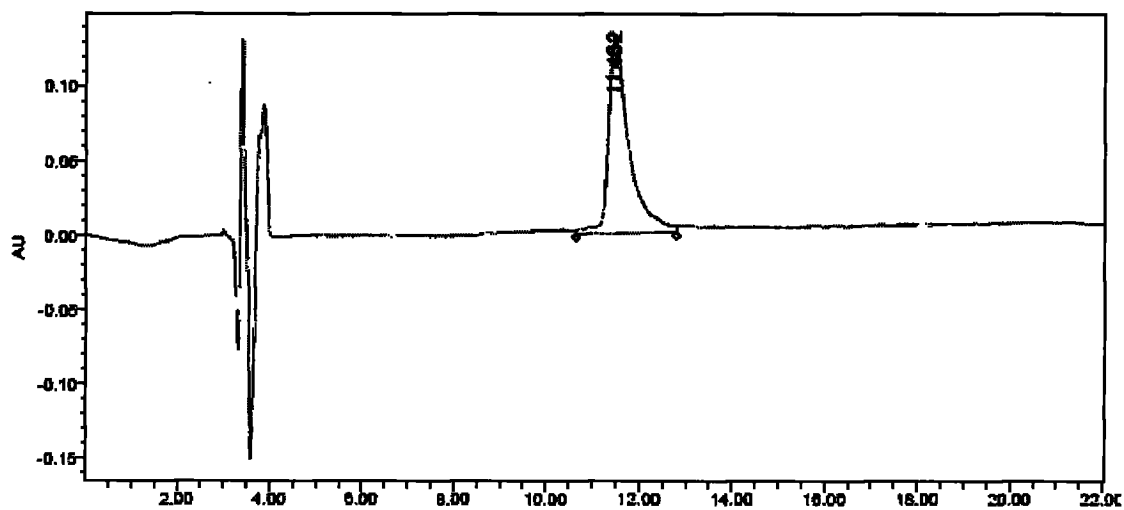


图 18A

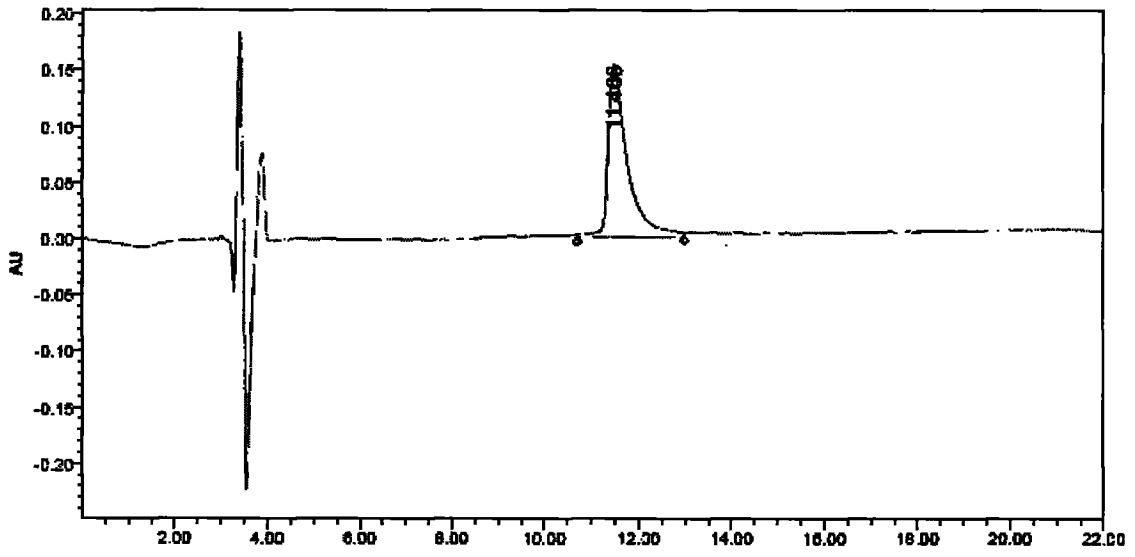


图 18B

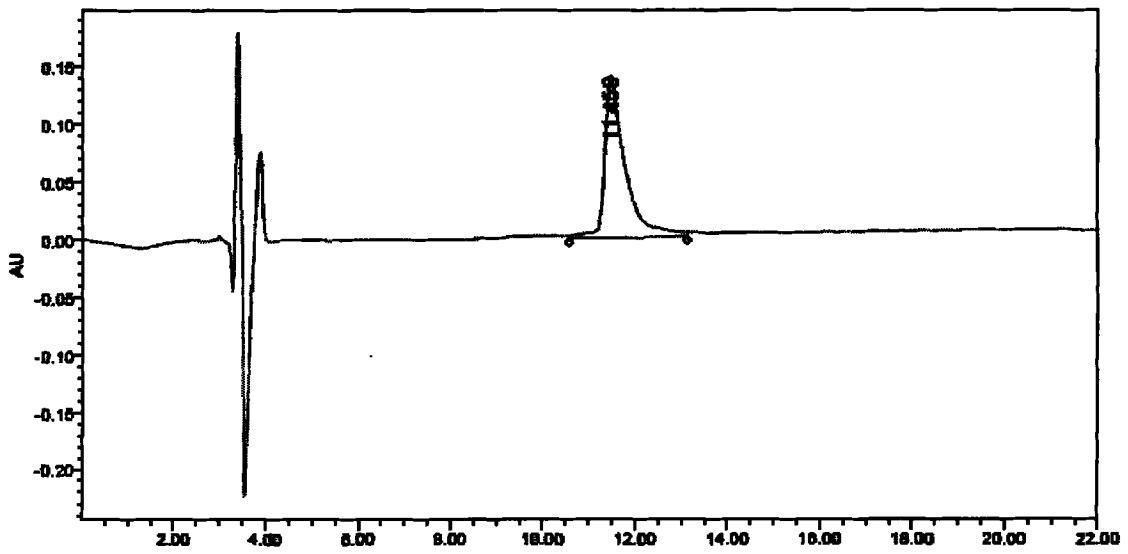


图 18C

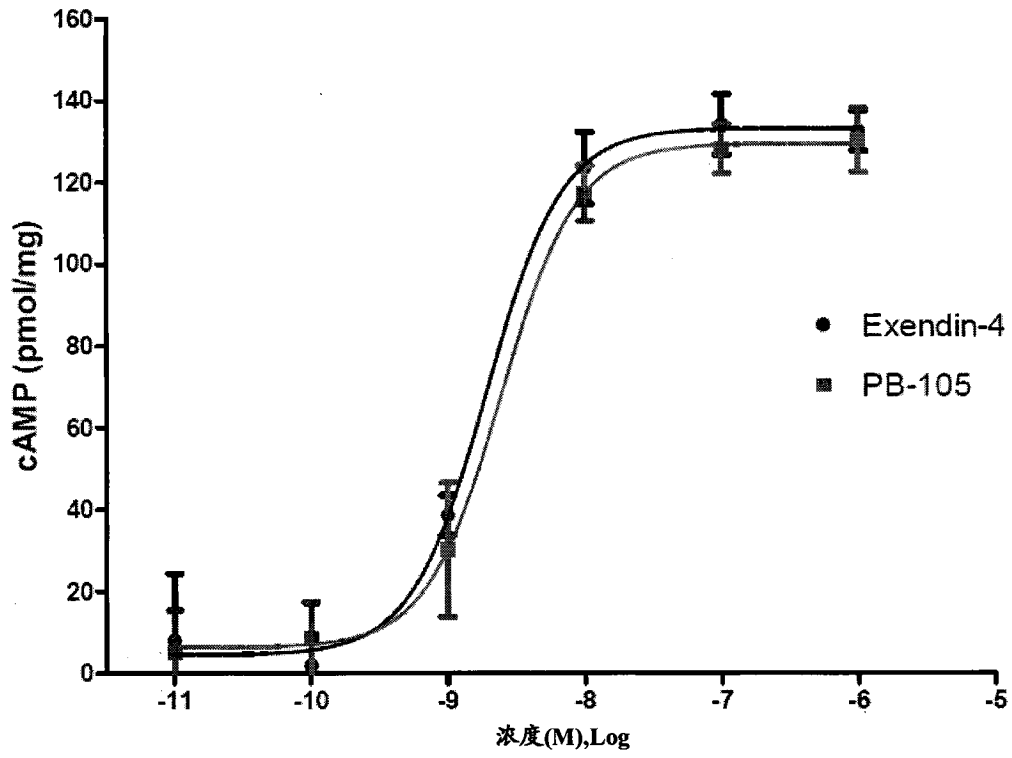


图 19

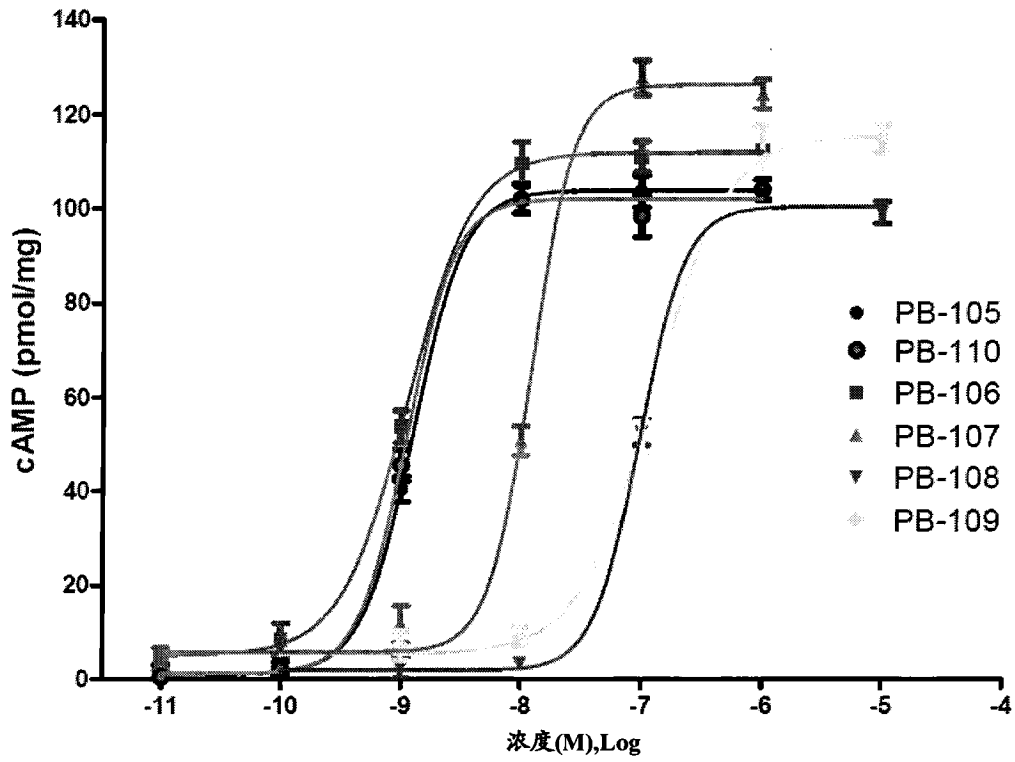


图 20

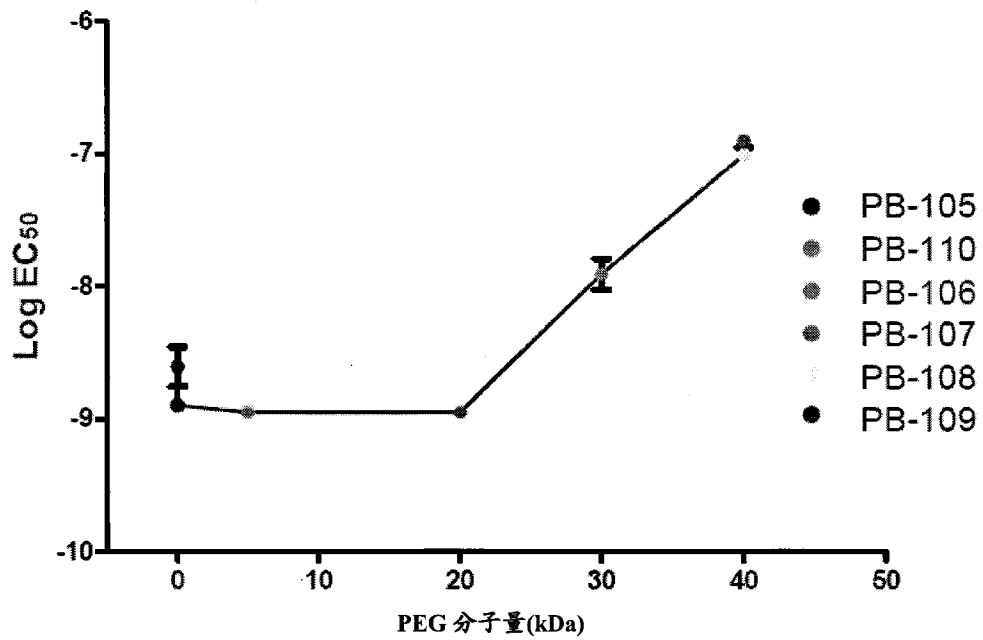


图 21A

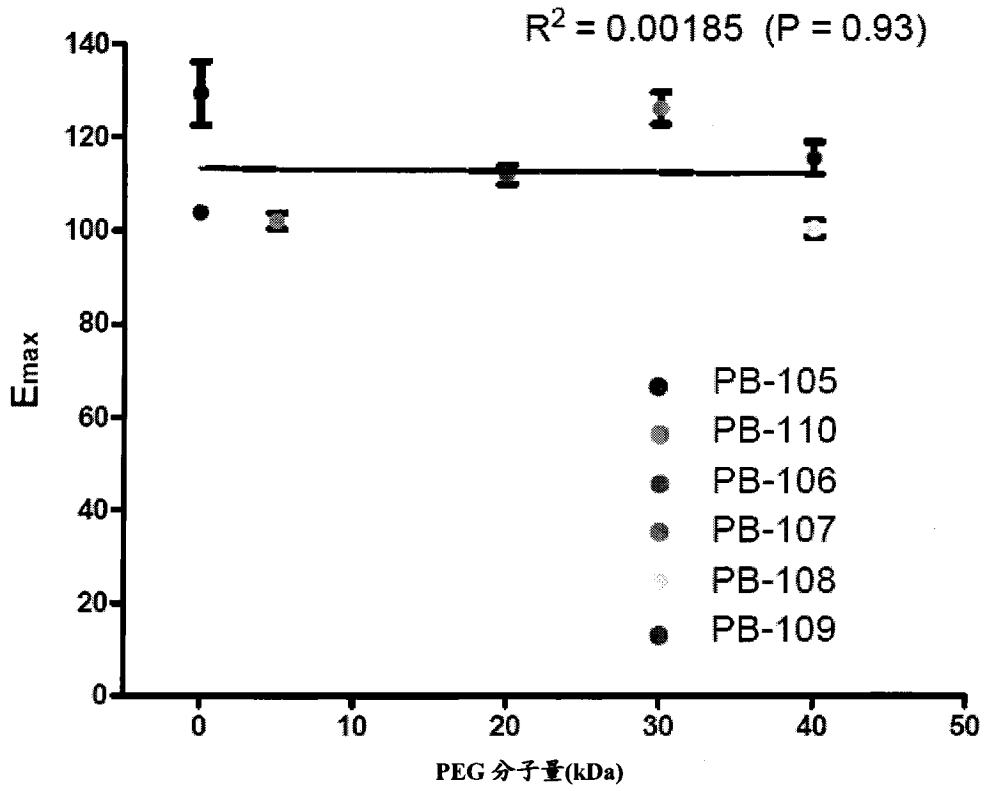


图 21B

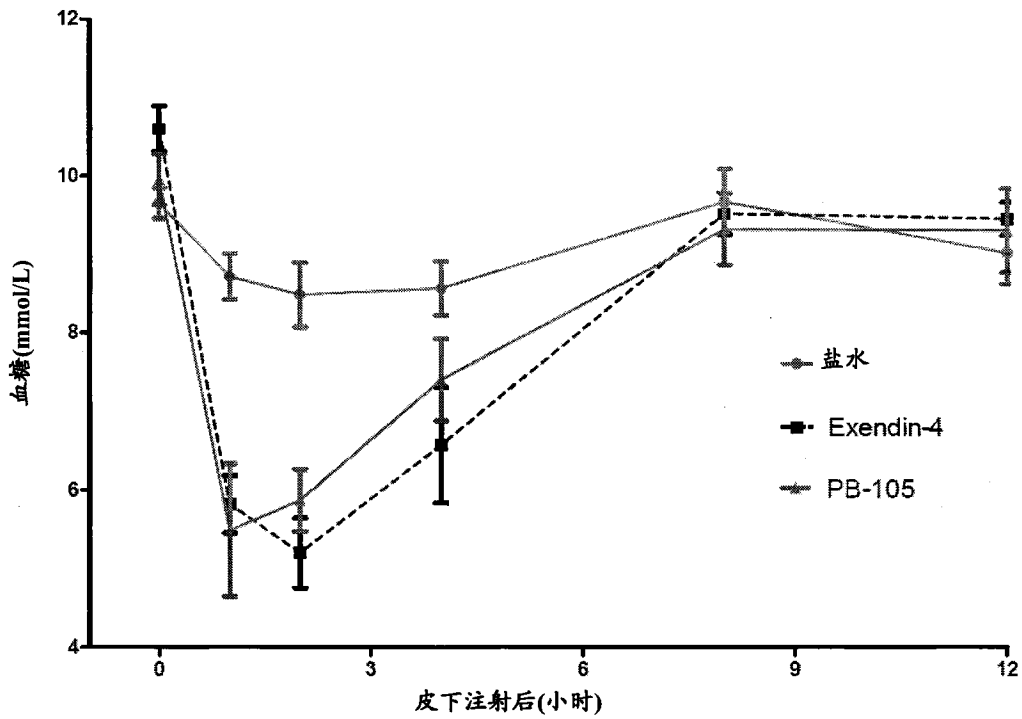


图 22

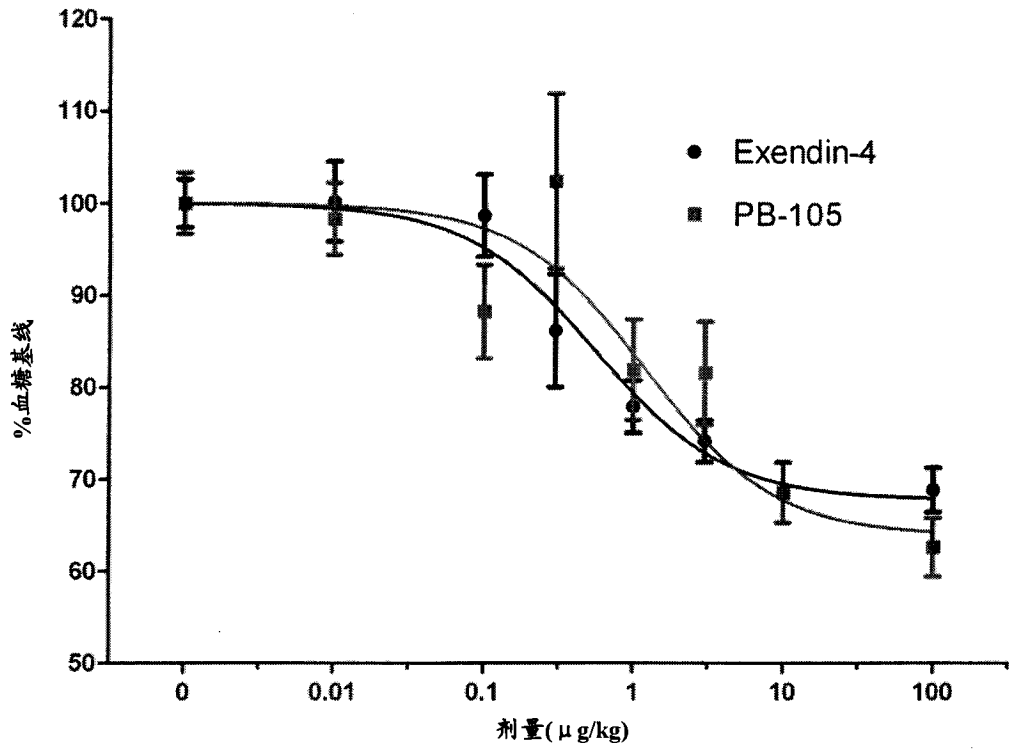


图 23

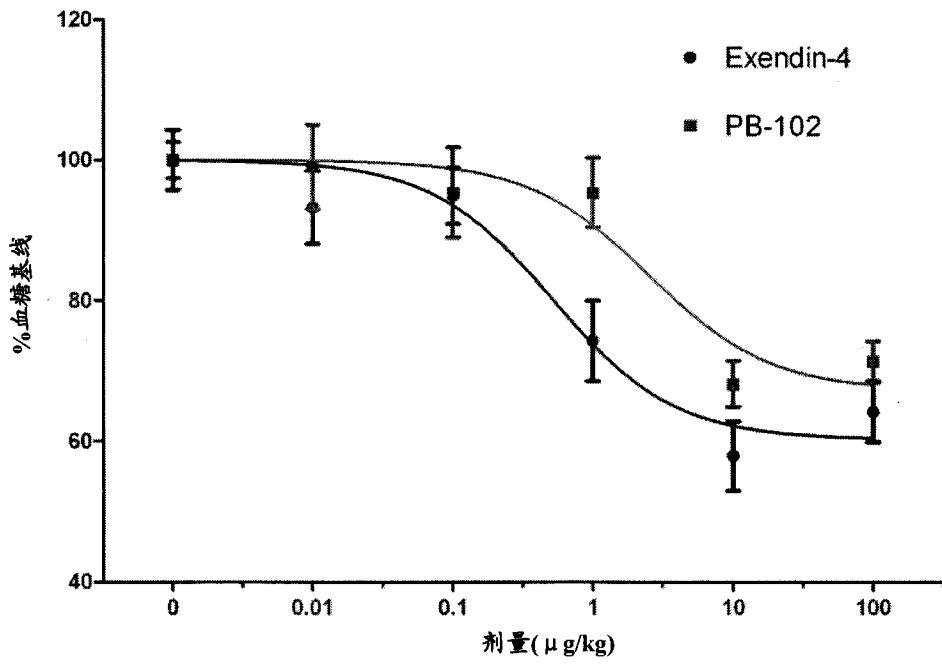


图 24

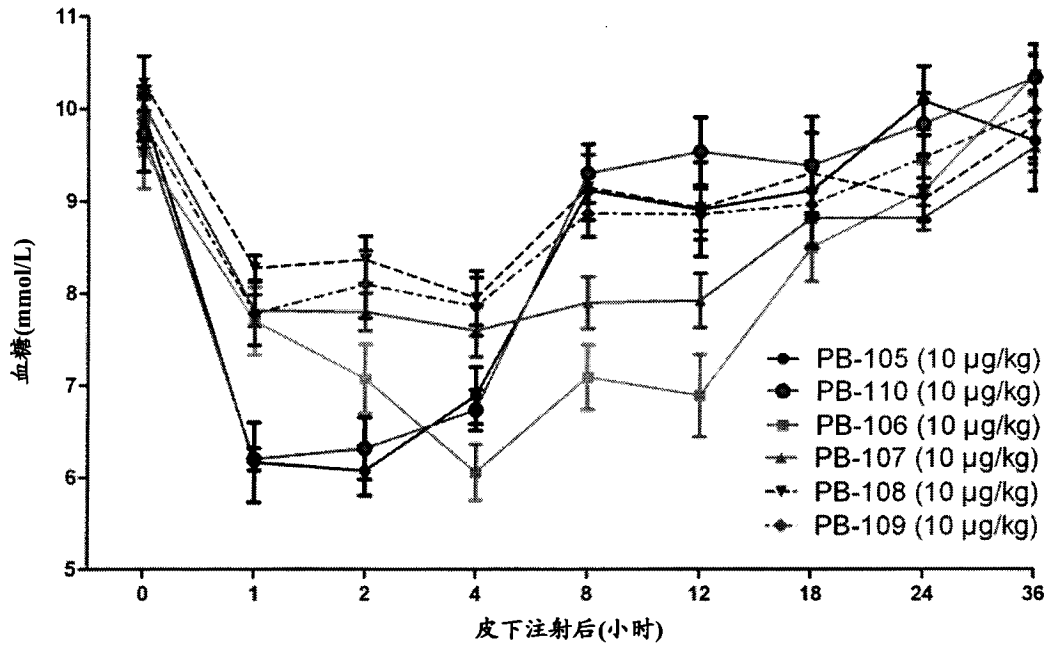


图 25

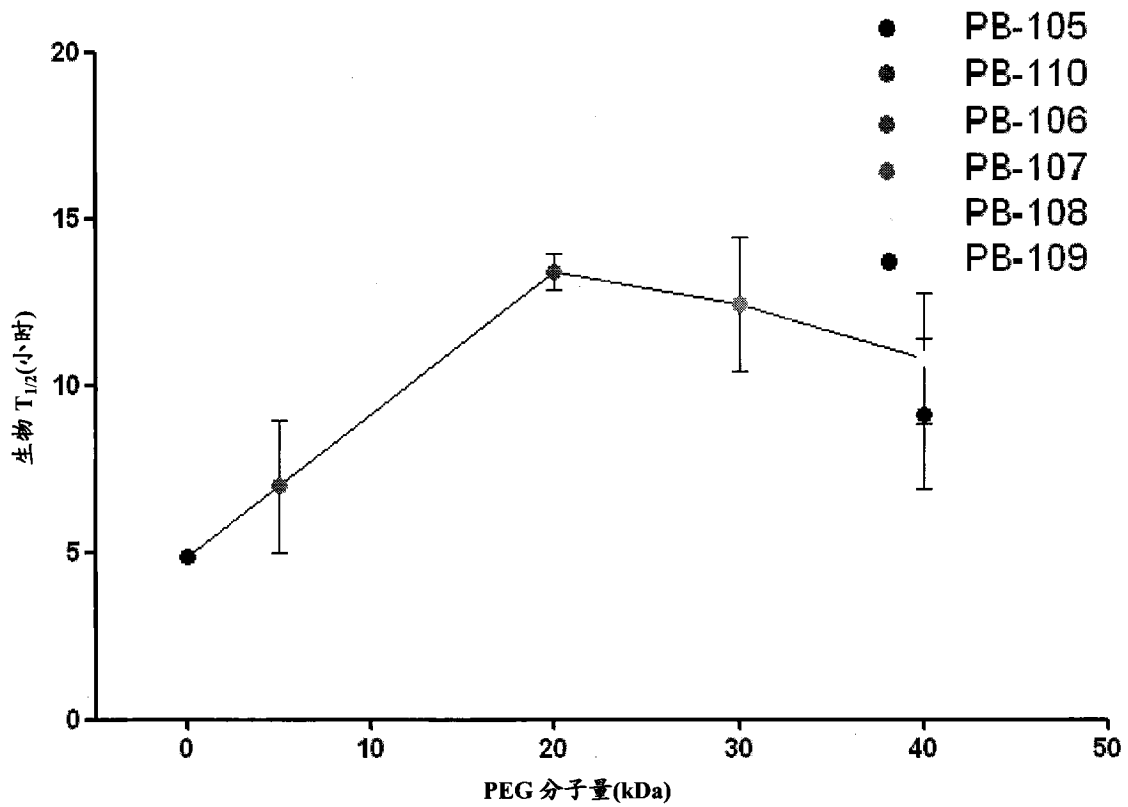


图 26A

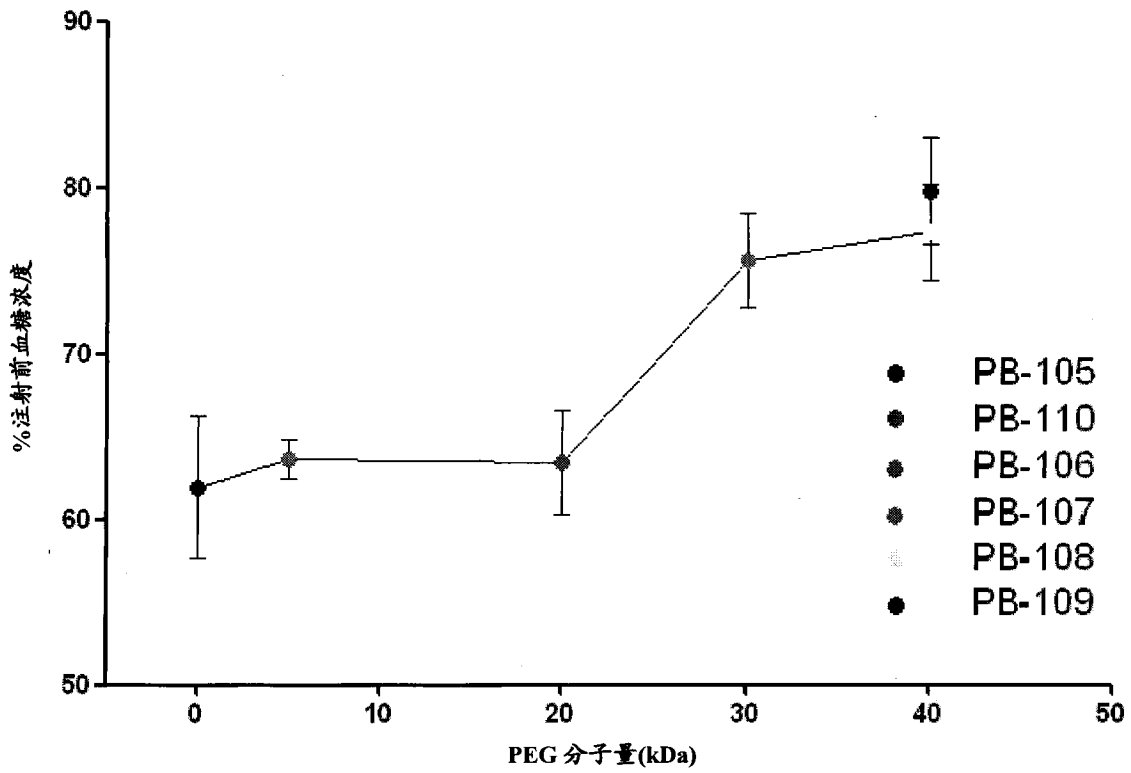


图 26B

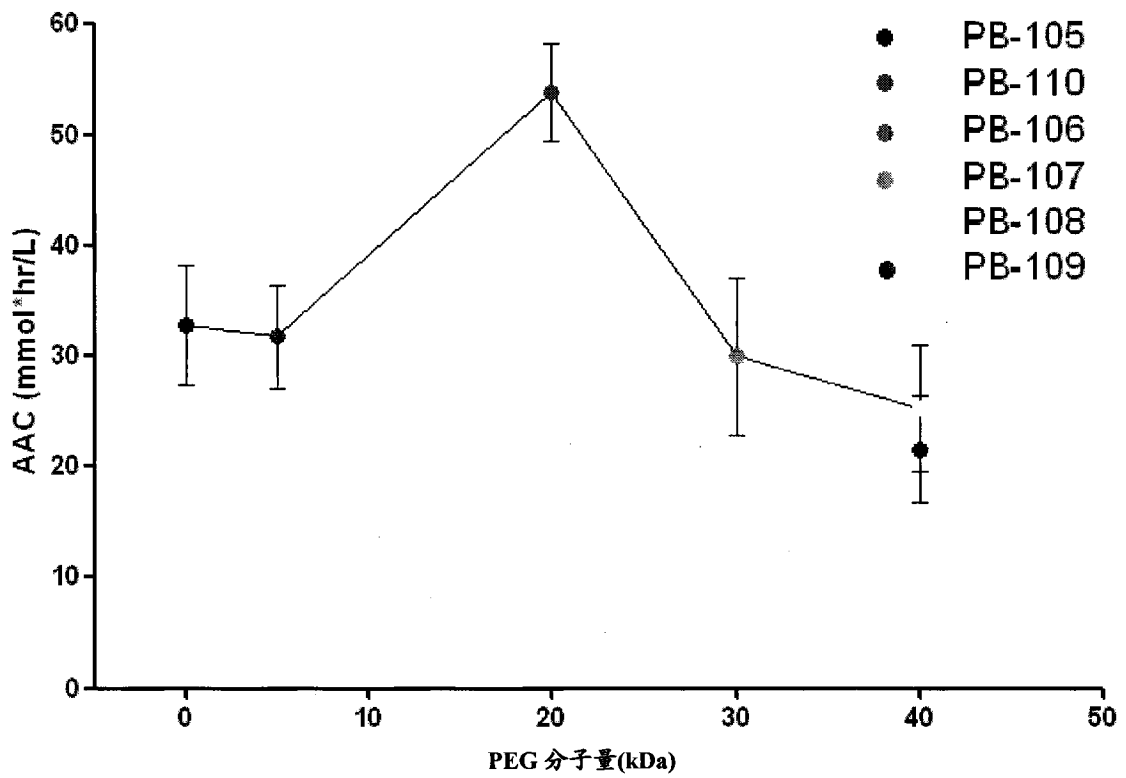


图 26C

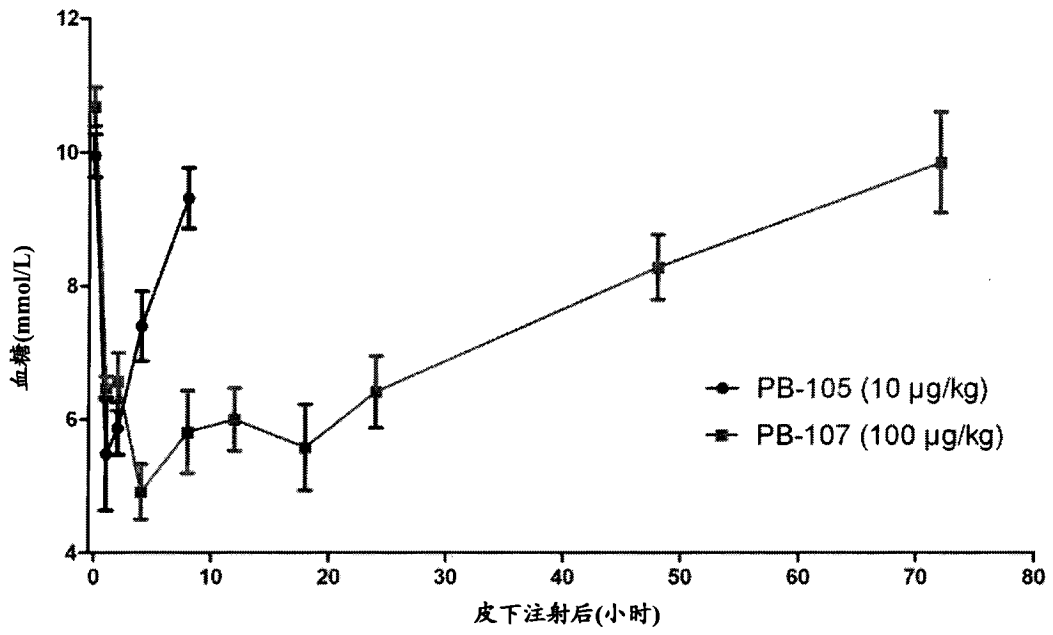


图 27

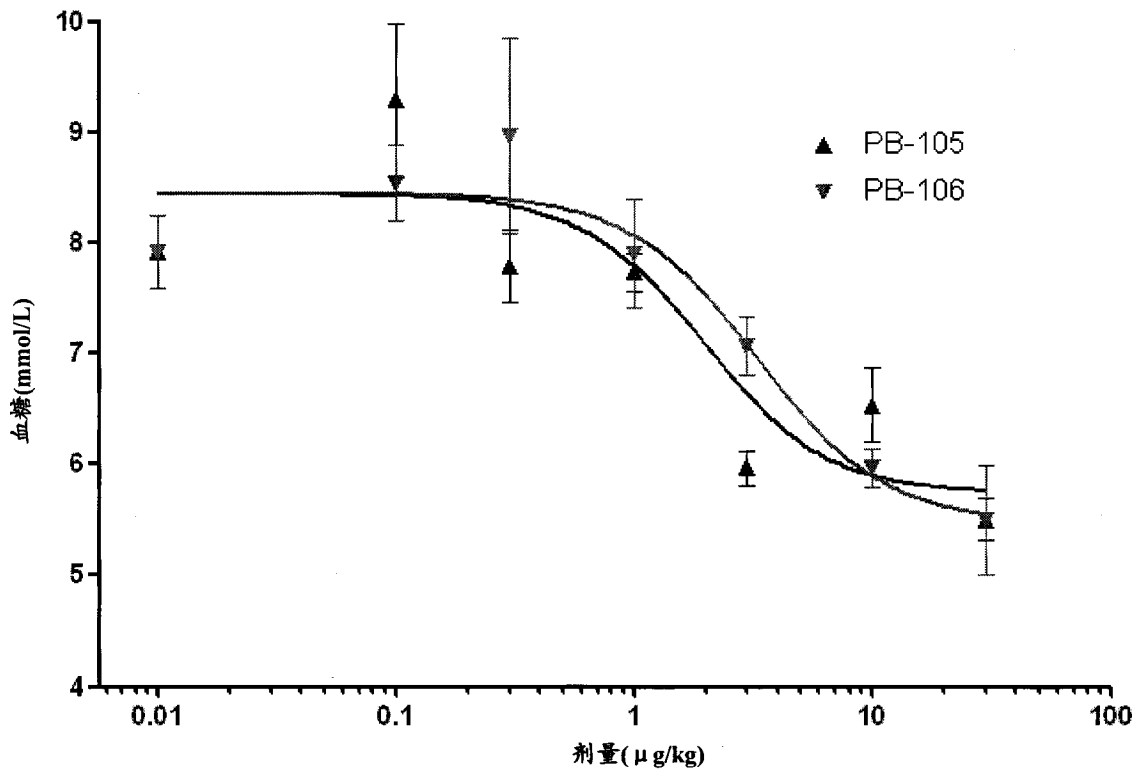


图 28

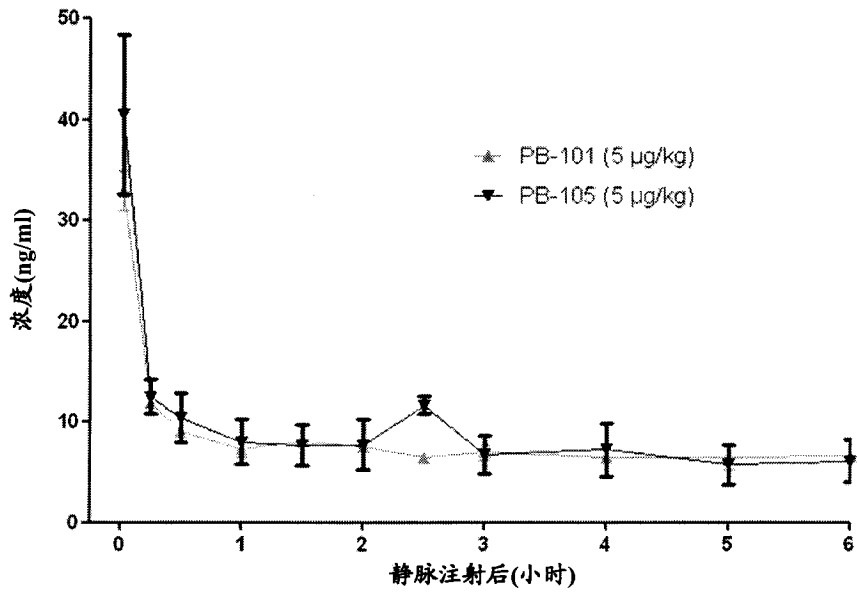


图 29

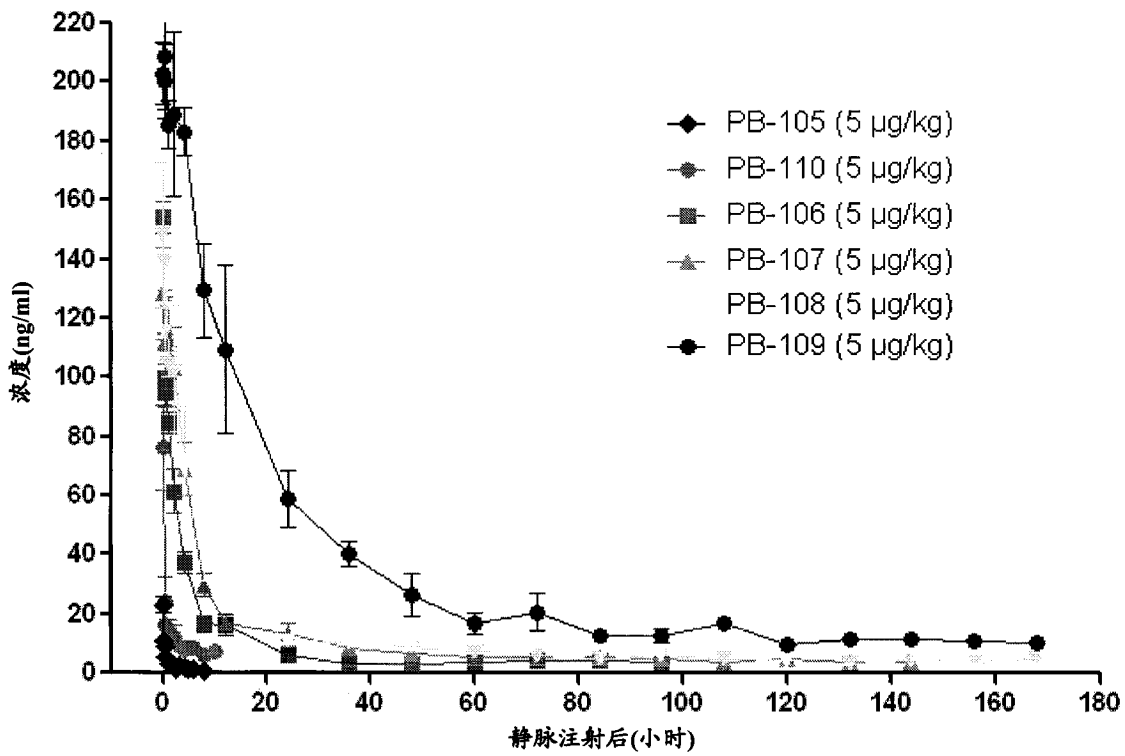


图 30

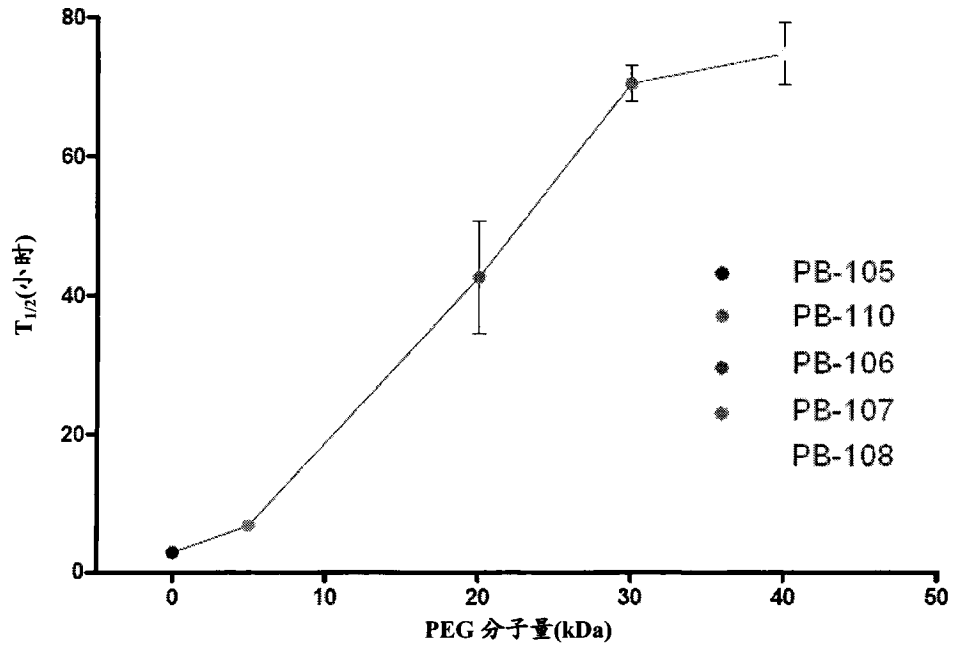


图 31A

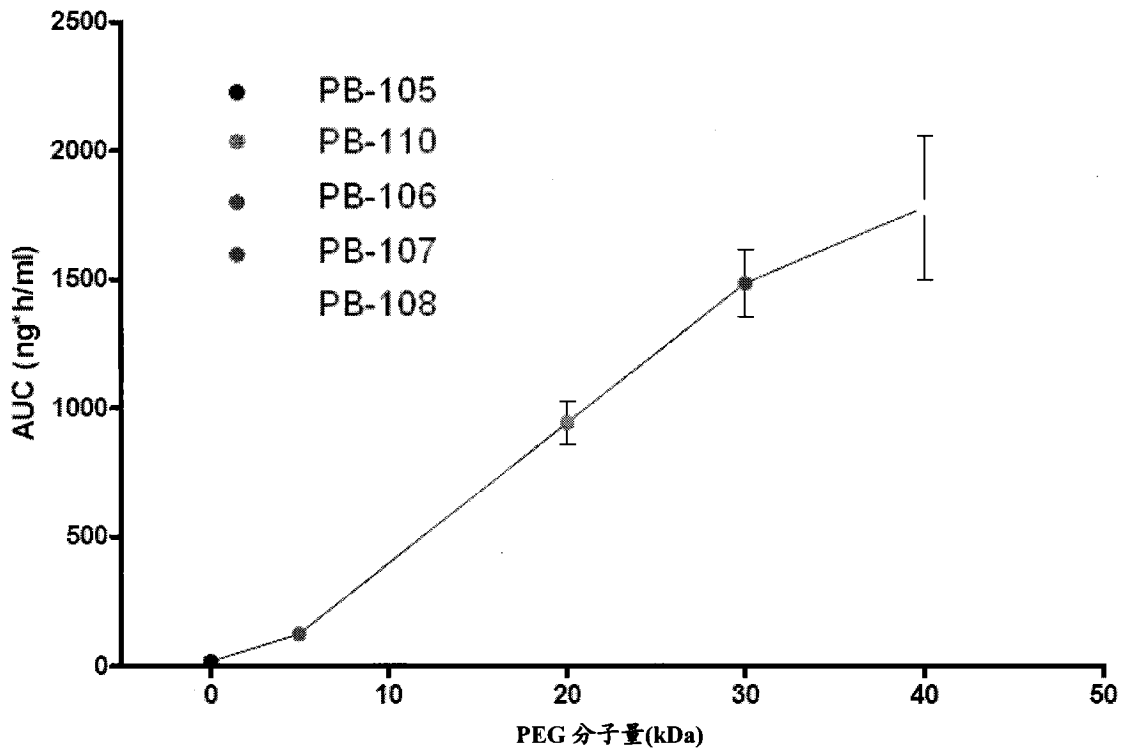


图 31B