



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118236497 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 25

(21) 申请号 202410379157.3

(22) 申请日 2017.08.29

(30) 优先权数据

62/381,263 2016.08.30 US

62/411,032 2016.10.21 US

(62) 分案原申请数据

201780065987.7 2017.08.29

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 J·科洛马达 冈本春香

S·贾斯珀 J·哈普

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 吴瑜 黄遵玲

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/7036 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

权利要求书6页 说明书26页

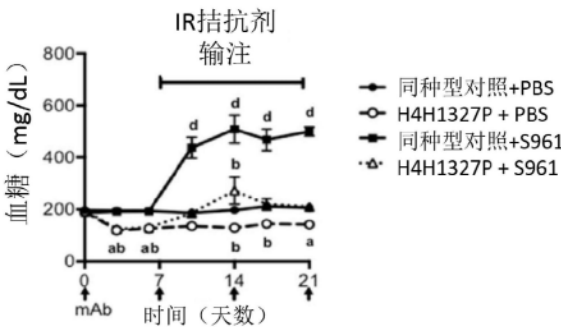
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

通过干扰胰高血糖素受体的信号传导治疗
重度胰岛素抵抗的方法

(57) 摘要

本发明提供了治疗具有重度胰岛素抵抗的患者的方法。所述方法包括向有此需要的患者施用治疗量的GCG/GCGR信号传导通路抑制剂,从而降低血糖或 β -羟基丁酸的水平或者调节重度胰岛素抵抗,或调节以重度胰岛素抵抗为特征的病症或疾病,或者减轻或降低与所述病症或疾病相关的至少一种症状或并发症的严重程度。所述GCG/GCGR信号通路抑制剂可以是所述信号通路的小分子抑制剂、所述信号通路的反义抑制剂、GCG的中和单克隆抗体、GCGR拮抗剂、所述信号通路的肽抑制剂、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、Spiegelmer、适体、改造的Fn III型结构域等。所述治疗方法可用于治疗患有重度胰岛素抵抗的人。



1. 一种用于降低血糖水平和/或酮体水平、或用于治疗病症或疾病或者所述病症或疾病的至少一种症状或并发症的方法,所述病症或疾病与高血糖或升高的酮体相关或部分以高血糖或升高的酮体为特征,所述方法包括向具有重度胰岛素抵抗的患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含胰高血糖素 (GCG) 抑制剂或胰高血糖素受体 (GCGR) 拮抗剂,从而降低血糖水平或酮体水平或者调节所述病症或疾病,或者减轻或降低与所述病症或疾病相关的至少一种症状或并发症的严重程度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述具有重度胰岛素抵抗的患者患有选自下组的病症或疾病:多诺霍综合征 (Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN (雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病) 综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征 (Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征 (Werner's 综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶E缺乏症、精氨酸代谢缺陷、巴德-毕德氏综合征 (Bardet-Biedl综合征)、以及与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在相关的病症或疾病。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述患者血清中检测胰岛素降解蛋白酶的活性。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述患者血清中检测抗胰岛素的中和抗体或抗胰岛素受体的抗体。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述胰岛素抵抗与选自下组的一种或多种基因的基因变体相关:INSR、PSMD6、ADRA2A、AGPAT2、AKT2、APPL1、BBS1、BSCL2、CIDEA、GRB10、IRS2、KLF14、LEP、LEPR、LMNA、MC4R、PCNT、PIK2CA、POLD1、PPARG、PTPRD、PTRF、RASGRP1、TBC1D4和TCF7L2。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与胰岛素同时施用。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述组合物与至少一种其他的治疗剂组合施用给所述患者。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述至少一种其他的治疗剂选自下组:胰岛素、双胍、hIGF1、瘦素、吡格列酮、维达列汀、阿卡波糖、 α -糖苷酶抑制剂、L-精氨酸、二肽基肽酶-4抑制剂、胰岛素促分泌素、糊精受体激动剂、胰岛素增敏剂、FGF21、SGLT2抑制剂、SGLT1抑制剂、GLP-1激动剂、GLP-1受体激活剂、 β 3肾上腺素能激动剂、NPR1激动剂、NPR3拮抗剂、三碘甲状腺原氨酸、第二GCG抑制剂和第二GCGR拮抗剂。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述GCGR拮抗剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR) 和轻链可变区 (LCVR) 的CDR,其中所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;其中所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a) HCVR,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;和/或(b) LCVR,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

12. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR序列对, 所述HCVR/LCVR序列对选自下组: SEQ ID NO: 2/10、18/26、34/42、50/58、66/68、70/78、86/88、90/98、106/108、110/118、126/128、130/138和146/148。

13. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO: 86/88所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述GCG抑制剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段, 其包含: (a) 重链可变区 (HCVR) 氨基酸序列内包含的三个重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2和HCDR3), 所述重链可变区 (HCVR) 氨基酸序列选自下组: SEQ ID NO: 150、166、182、198、214、230、246、262、278和294; 和 (b) 轻链可变区 (LCVR) 氨基酸序列内包含的三个轻链CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3), 所述轻链可变区 (LCVR) 氨基酸序列选自下组: SEQ ID NO: 158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR和/或LCVR, 所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 150、166、182、198、214、230、246、262、278和294, 所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

16. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对, 所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组: SEQ ID NO: 150/158; 166/174; 182/190; 198/206; 214/222; 230/238; 246/254; 262/270; 278/286和294/302。

17. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO: 166/174或SEQ ID NO: 182/190所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

18. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述胰岛素促分泌素选自下组: 磺酰脲类、ATP敏感性K通道拮抗剂和氯茴苯酸类。

19. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述胰岛素增敏剂选自由噻唑烷二酮和罗格列酮组成的组。

20. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述酮体是 β -羟基丁酸。

21. 一种治疗具有重度胰岛素抵抗的患者的方法, 其中所述患者表现出升高的血糖水平, 所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的组合物, 所述组合物包含GCG抑制剂或GCGR拮抗剂。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述具有重度胰岛素抵抗的患者患有选自下组的病症或疾病: 多诺霍综合征 (Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN (雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病) 综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征 (Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征 (Werner's综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶E缺乏症、精氨酸代谢缺陷、巴德-毕德氏综合征 (Bardet-Biedl综合征)、以及与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在相关的病症或疾病。

23. 根据权利要求21所述的方法, 其中在所述患者血清中检测胰岛素降解蛋白酶的活性。

24. 根据权利要求21所述的方法, 其中在所述患者血清中检测抗胰岛素的中和抗体或抗胰岛素受体的抗体。

25. 根据权利要求21所述的方法,其中所述胰岛素抵抗与选自下组的一种或多种基因的基因变体相关:INSR、PSMD6、ADRA2A、AGPAT2、AKT2、APPL1、BBS1、BSCL2、CIDEA、GRB10、IRS2、KLF14、LEP、LEPR、LMNA、MC4R、PCNT、PIK2CA、POLD1、PPARG、PTPRD、PTRF、RASGRP1、TBC1D4和TCF7L2。

26. 根据权利要求21所述的方法,其中所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与胰岛素同时施用。

27. 根据权利要求21所述的方法,其中将所述组合物与至少一种其他的治疗剂组合施用给所述患者。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述至少一种其他的治疗剂选自下组:胰岛素、双胍、hIGF1、瘦素、吡格列酮、维达列汀、阿卡波糖、 α -糖苷酶抑制剂、L-精氨酸、二肽基肽酶-4抑制剂、胰岛素促分泌素、糊精受体激动剂、胰岛素增敏剂、FGF21、SGLT2抑制剂、SGLT1抑制剂、GLP-1激动剂、GLP-1受体激活剂、 β 3肾上腺素能激动剂、NPR1激动剂、NPR3拮抗剂、三碘甲状腺原氨酸、第二GCG抑制剂和第二GCGR拮抗剂。

29. 根据权利要求21所述的方法,其中所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段。

30. 根据权利要求21所述的方法,其中所述GCGR拮抗剂是分离的人单克隆抗体,其包含HCVR的CDR和LCVR的CDR,其中所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;其中所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a) HCVR,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;和/或(b) LCVR,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中所述分离的抗体或抗原结合片段包含HCVR/LCVR序列对,所述HCVR/LCVR序列对选自下组:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/68、70/78、86/88、90/98、106/108、110/118、126/128、130/138和146/148。

33. 根据权利要求30所述的方法,其中所述分离的人单克隆抗体包含SEQ ID NO:86/88所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

34. 根据权利要求21所述的方法,其中所述GCG抑制剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:(a) 重链可变区(HCVR)氨基酸序列内包含的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链可变区(HCVR)氨基酸序列选自下组:SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294;和(b) 轻链可变区(LCVR)氨基酸序列内包含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链可变区(LCVR)氨基酸序列选自下组:SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR和/或LCVR,所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294,所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/

LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:150/158;166/174;182/190;198/206;214/222;230/238;246/254;262/270;278/286和294/302。

37.根据权利要求34所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:166/174或SEQ ID NO:182/190所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

38.根据权利要求28所述的方法,其中所述胰岛素促分泌素选自下组:磺酰脲类、ATP敏感性K通道拮抗剂和氯茴苯酸类。

39.根据权利要求28所述的方法,其中所述胰岛素增敏剂选自由噻唑烷二酮和罗格列酮组成的组。

40.一种减少治疗具有重度胰岛素抵抗的患者所需的胰岛素的量和/或剂量的方法,其中所述患者表现出重度胰岛素抵抗和升高的血糖水平,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCG抑制剂或GCGR拮抗剂。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述GCG抑制剂或所述GCGR拮抗剂与胰岛素同时施用。

42.根据权利要求40所述的方法,其中当与GCGR拮抗剂同时施用时,所述胰岛素的量和/或剂量可减少约30%至约95%,并且其中所述GCGR拮抗剂是特异性结合所述GCGR的分离的人单克隆抗体。

43.根据权利要求40所述的方法,其中当与GCGR拮抗剂同时施用时,所述胰岛素的量和/或剂量可减少约90%,并且其中所述拮抗剂是特异性结合GCGR的分离的人单克隆抗体。

44.根据权利要求40所述的方法,其中所述具有重度胰岛素抵抗的患者患有选自下组的病症或疾病:多诺霍综合征(Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN(雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病)综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征(Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征(Werner's综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶E缺乏症、精氨酸代谢缺陷、巴德-毕德氏综合征(Bardet-Biedl综合征)、以及与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在相关的病症或疾病。

45.根据权利要求40所述的方法,其中在所述患者血清中检测胰岛素降解蛋白酶的活性。

46.根据权利要求40所述的方法,其中在所述患者血清中检测抗胰岛素的中和抗体或抗胰岛素受体的抗体。

47.根据权利要求40所述的方法,其中所述胰岛素抵抗与选自下组的一种或多种基因的基因变体相关:INSR、PSMD6、ADRA2A、AGPAT2、AKT2、APPL1、BBS1、BSCL2、CIDEA、GRB10、IRS2、KLF14、LEP、LEPR、LMNA、MC4R、PCNT、PIK2CA、POLD1、PPARG、PTPRD、PTRF、RASGRP1、TBC1D4和TCF7L2。

48.根据权利要求40所述的方法,其中将所述组合物与至少一种其他的治疗剂组合施用给所述患者。

49.根据权利要求48所述的方法,其中所述至少一种其他的治疗剂选自下组:双胍、hIGF1、瘦素、吡格列酮、维达列汀、阿卡波糖、 α -糖苷酶抑制剂、L-精氨酸、二肽基肽酶-4抑制剂、胰岛素促分泌素、糊精受体激动剂、胰岛素增敏剂、FGF21、SGLT2抑制剂、SGLT1抑制剂、GLP-1激动剂、GLP-1受体激活剂、 β 3肾上腺素能激动剂、NPR1激动剂、NPR3拮抗剂、三碘

甲状腺原氨酸、第二GCG抑制剂和第二GCGR拮抗剂。

50. 根据权利要求40所述的方法,其中所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段。

51. 根据权利要求40所述的方法,其中所述GCGR拮抗剂是分离的人单克隆抗体,其包含HCVR的CDR和LCVR的CDR,其中所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;其中所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a) HCVR,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;和/或(b) LCVR,其具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

53. 根据权利要求51所述的方法,其中所述分离的抗体或抗原结合片段包含HCVR/LCVR序列对,所述HCVR/LCVR序列对选自下组:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/68、70/78、86/88、90/98、106/108、110/118、126/128、130/138和146/148。

54. 根据权利要求51所述的方法,其中所述分离的抗体包含SEQ ID NO:86/88所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

55. 根据权利要求40所述的方法,其中所述GCG抑制剂是分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含:(a) 重链可变区(HCVR)氨基酸序列内包含的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3),所述重链可变区(HCVR)氨基酸序列选自下组:SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294;和(b) 轻链可变区(LCVR)氨基酸序列内包含的三个轻链CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3),所述轻链可变区(LCVR)氨基酸序列选自下组:SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR和/或LCVR,所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294,所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

57. 根据权利要求55所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:150/158;166/174;182/190;198/206;214/222;230/238;246/254;262/270;278/286和294/302。

58. 根据权利要求55所述的方法,其中所述分离的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:166/174或SEQ ID NO:182/190所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

59. 根据权利要求49所述的方法,其中所述胰岛素促分泌素选自下组:磺酰脲类、ATP敏感性K通道拮抗剂和氯茴苯酸类。

60. 根据权利要求49所述的方法,其中所述胰岛素增敏剂选自由噻唑烷二酮和罗格列酮组成的组。

61. 一种用于降低血糖水平和/或 β -羟基丁酸水平、或用于治疗病症或疾病或者所述病症或疾病的至少一种症状或并发症的方法,所述病症或疾病与高血糖或升高的酮体水平相关或部分以高血糖或升高的酮体水平为特征,所述方法包括向具有重度胰岛素抵抗的患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCGR信号传导抑制剂,从而降低血糖水平或 β -

羟丁酸的水平或者调节所述病症或疾病,或者减轻或降低与所述病症或疾病相关的至少一种症状或并发症的严重程度。

62. 根据权利要求60所述的方法,其中所述GCGR信号传导抑制剂选自下组:反义分子、GCGR抗体、小分子抑制剂、肽抑制剂、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、Spiegelmer、适体、改造的FnIII型结构域、GCG抗体、及其衍生物。

63. 一种抑制肝葡萄糖输出的方法,所述方法包括向具有重度胰岛素抵抗的患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCGR信号传导抑制剂,从而抑制肝葡萄糖的输出。

64. 一种提升具有重度胰岛素抵抗的患者中 β 细胞量的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCGR信号传导抑制剂,从而使得 β 细胞量相对于治疗前的 β 细胞量有所提升。

通过干扰胰高血糖素受体的信号传导治疗重度胰岛素抵抗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用胰高血糖素 (GCG) 抑制剂或胰高血糖素受体 (GCGR) 拮抗剂来治疗或减缓重度胰岛素抵抗的进展的方法, 和/或降低有此需要的患者中治疗性胰岛素剂量的方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请是申请号为201780065987.7、申请日为2017年08月29日、发明名称为“通过干扰胰高血糖素受体的信号传导治疗重度胰岛素抵抗的方法”的中国发明专利申请的分案申请, 原申请为PCT/US2017/049137的国家阶段申请, 该国际申请要求于2016年08月30日提交的美国临时申请序列号62/381,263、于2016年10月21日提交的美国临时申请序列号62/411,032的优先权和权益。

[0004] 序列表

[0005] 通过EFS-Web与说明书一起电子提交序列表的正式副本, 其为ASCII格式的序列表, 文件名为10282W001_SEQ_LIST_ST25, 创建日期为2017年8月25日, 大小为约116千字节。该ASCII格式文档中所包含的序列表是说明书的一部分, 并且其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0006] 胰高血糖素是具有29个残基的多肽激素, 其与胰岛素共同介导血液中葡萄糖量的稳态调节。胰高血糖素主要通过刺激某些细胞 (例如, 肝细胞) 发挥作用, 从而在血糖水平下降时释放葡萄糖以维持正常的血糖水平。胰高血糖素的作用与胰岛素的作用相反, 胰岛素刺激细胞在血糖水平升高时摄取和储存葡萄糖。胰高血糖素在胰腺的 α 细胞中产生, 而胰岛素则由邻近的 β 细胞分泌。

[0007] 胰高血糖素和胰岛素的不平衡可能在多种疾病 (例如, 糖尿病和糖尿病酮症酸中毒) 中起重要的作用。特别地, 研究表明, 较高的基础性胰高血糖素水平以及对餐后胰高血糖素分泌抑制的不足会导致人产生糖尿病疾病 (Muller et al. (1970), N Eng J Med, 283: 109-115)。

[0008] 我们相信, 胰高血糖素对提高血糖水平的效应部分地是由胰高血糖素 (GCG) 与其受体 (称为GCGR) 结合后某些细胞通路的激活所介导的。GCGR是G蛋白偶联受体的分泌素亚家族 (B家族) 成员, 主要在肝脏中表达。胰高血糖素与其受体的结合触发G蛋白信号转导级联, 从而激活细胞内的环AMP并通过从头合成 (糖原异生) 和糖原降解 (糖原分解) 导致葡萄糖输出的增加 (Wakelam et al., (1986) Nature, 323:68-71; Unson et al., (1989) Peptides, 10:1171-1177; 以及Pittner and Fain, (1991) Biochem. J., 277:371-378)。

[0009] 如本文所述, 通过提供拮抗剂 (例如, 小分子抑制剂、GCG抗体或GCGR抗体) 可以抑制胰高血糖素的作用。抗GCG抗体提及于, 例如, 美国专利号4,206,199; 4,221,777; 4,423,034; 4,272,433; 4,407,965; 5,712,105; 以及PCT公开号W02007/124463和W02013/081993中。抗GCGR抗体描述于美国专利号5,770,445、7,947,809和8,545,847; 欧洲专利申请

EP2074149A2;欧洲专利EP0658200B1;美国专利公开号2009/0041784;2009/0252727和2011/0223160;以及PCT公开号W02008/036341中。GCG或GCGR的小分子抑制剂提及于,例如,W0 07/47676;W0 06/86488;W0 05/123688;W0 05/121097;W0 06/14618;W0 08/42223;W0 08/98244;W0 2010/98948;US20110306624;W0 2010/98994;W0 2010/88061;W0 2010/71750;W0 2010/30722;W0 06/104826;W0 05/65680;W0 06/102067;W0 06/17055;W0 2011/07722或W0 09/140342中。

[0010] 重度胰岛素抵抗综合征是比较罕见的代谢紊乱,在这种疾病中,患者对胰岛素表现出不良应答。目前可用于重度胰岛素抵抗综合征的治疗包括定期进食和使用很高剂量的胰岛素来提供足够的血糖控制。IGF-I的施用虽然在短期内有效,但是在患有重度胰岛素抵抗的患者中不能提供长期的血糖控制。Vestergaard et al., (1997) European Journal of Endocrinology, 136:475-482。重组瘦素的施用能在数月内降低血糖的水平,从而在Rabson-Mendenhall综合征(RMS)患者中显示出了一定的成效。Cochran et al., (2004) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89:1548-1554。

[0011] 鉴于缺乏有效的治疗方法来治疗重度胰岛素抵抗疾病或减缓重度胰岛素抵抗疾病的进展(即,延长具有重度胰岛素抵抗患者的生命和/或改善其生活质量),因此需要鉴定和探索使用其他试剂(例如,本文所描述的GCG/GCGR信号传导通路的抑制剂和拮抗剂)来治疗这些疾病。

[0012] 发明概述

[0013] 本文提供了通过施用GCG抑制剂或GCGR拮抗剂(例如,包含GCG抑制剂或GCGR拮抗剂的药物组合物)来治疗患有以重度胰岛素抵抗为特征的病症或疾病的患者的方法。GCG抑制剂或GCGR拮抗剂是能够阻断或抑制胰高血糖素受体信号传导通路的化合物。所述拮抗剂可以是以下形式:小分子抑制剂、肽抑制剂、CRISPR技术(成簇的规律间隔的短回文重复序列;CRISPR技术可以产生GCGR调控序列的敲除或缺失,所述调控序列影响GCGR的活性)、反义抑制剂、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)以及GCG或GCGR的中和单克隆抗体。所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂可以单独施用、在药物组合物中施用、或与一种或多种治疗剂联合施用,所述治疗剂可用于治疗与重度胰岛素抵抗相关的病症或疾病,或治疗与所述病症或疾病相关的一种或多种症状,或降低具有与重度胰岛素抵抗相关的病症或疾病的患者中的血糖和/或酮。

[0014] 在一些实施方案中,提供了用于降低血糖水平和/或 β -羟基丁酸水平、或用于降低酮血症和/或酮症酸中毒、或用于治疗病症或疾病或者所述病症或疾病的至少一种症状或并发症的方法,所述病症或疾病与高血糖和/或酮血症和/或酮症酸中毒相关或部分以高血糖和/或酮血症和/或酮症酸中毒为特征。在一些方面,所述方法包括向具有重度胰岛素抵抗的患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCG/GCGR信号传导通路抑制剂,从而降低血糖或 β -羟基丁酸的水平或者调节所述病症或疾病,或者减轻或降低与所述病症或疾病相关的至少一种症状或并发症的严重程度。在一些实施方案中,所述GCGR信号传导抑制剂是GCGR拮抗剂,例如抗GCGR抗体。在一些实施方案中,所述抗GCGR抗体具有SEQ ID NO: 86/88所示的HCVR/LCVR序列对。在一些实施方案中,所示GCGR信号传导抑制剂是GCG抑制剂,例如抗GCG抗体。在一些实施方案中,所述抗GCG抗体具有SEQ ID NO: 182/190所示的HCVR/LCVR序列对。在一些实施方案中,所述抗GCG抗体具有SEQ ID NO: 166/174所示的

HCVR/LCVR序列对。

[0015] 在一些方面,提供了用于治疗患有重度胰岛素抵抗的患者的方法,其中所述患者表现出升高的血糖水平。所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCG抑制剂或GCGR拮抗剂。

[0016] 在一些方面,提供了用于治疗患有重度胰岛素抵抗的患者的方法,其中所述患者没有表现出升高的血糖水平。所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCG抑制剂或GCGR拮抗剂。

[0017] 在一些实施方案中,提供了用于减少治疗具有重度胰岛素抵抗的患者所需的胰岛素的量和/或剂量的方法,其中所述患者表现出重度胰岛素抵抗和/或升高的血糖水平。在一些方面,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含GCG抑制剂或GCGR拮抗剂。在一些方面,所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与胰岛素同时施用。当与特异性结合所述GCGR的分离的人单克隆抗体同时施用时,所述胰岛素的量和/或剂量可减少约30%至约95%,或者减少约90%。

[0018] 在一些方面,所述GCGR拮抗剂可以是抗GCGR抗体。所述抗GCGR抗体可以抑制或拮抗所述GCGR。所述抗GCGR抗体可以抑制或阻断所述GCGR信号传导通路。在一些方面,所述GCG抑制剂可以是抗GCG抗体。所述抗GCG抗体可以抑制GCG与GCGR的结合。

[0019] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段特异性地结合hGCGR,并且包含重链和轻链序列对中包含的重链和轻链CDR结构域,所述重链和轻链序列对选自下组:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/68、70/78、86/88、90/98、106/108、110/118、126/128、130/138和146/148。

[0020] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:86/88所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对中包含的重链和轻链CDR结构域。

[0021] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含SEQ ID NO:86/88所示的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

[0022] 在一个实施方案中,结合hGCGR的人抗体或人抗体的抗原结合片段包含重链可变区(HCVR)或与其基本相似的序列,所述重链可变区(HCVR)具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146,所述基本相似的序列与所述重链可变区(HCVR)具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0023] 在一个实施方案中,结合hGCGR的人抗体或人抗体的抗原结合片段包含轻链可变区(LCVR)或与其基本相似的序列,所述轻链可变区(LCVR)具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148,所述基本相似的序列与所述轻链可变区(LCVR)具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0024] 在某些实施方案中,所述结合hGCGR的人抗体或其片段包含选自下组的HCVR/LCVR氨基酸序列对:SEQ ID NO:2/10、18/26、34/42、50/58、66/68、70/78、86/88、90/98、106/108、110/118、126/128、130/138和146/148。在某些实施方案中,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组:SEQ ID NO:34/42、70/78、86/88、110/118和126/128。

[0025] 在某些实施方案中,所述特异性结合hGCGR的分离的人抗体或其抗原结合片段包含HCVR和/或LCVR,所述HCVR包含选自下组的HCVR序列内包含的三个重链CDR(HCDR1、HCDR2和HCDR3):SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;所述LCVR包含选

自下组的LCVR序列内包含的三个轻链CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3) :SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。

[0026] 在某些实施方案中,本文提供的方法考虑使用结合hGCGR的分离的人抗体或其抗原结合片段,所述分离的人抗体或其抗原结合片段包含HCDR3结构域和/或LCDR3结构域,所述HCDR3结构域具有选自下组的氨基酸序列或与其基本相似的序列:SEQ ID NO:8、24、40、56、76、96、116和136,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性;所述LCDR3结构域具有选自下组的氨基酸序列或与其基本相似的序列:SEQ ID NO:16、32、48、64、84、104、124和144,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0027] 在一个实施方案中,本文提供的方法考虑使用进一步包含HCDR1结构域、HCDR2结构域、LCDR1结构域和LCDR2结构域的抗体或其片段,所述HCDR1结构域具有选自下组的氨基酸序列或与其基本相似的序列:SEQ ID NO:4、20、36、52、72、92、112和132,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性;所述HCDR2结构域具有选自下组的氨基酸序列或与其基本相似的序列:SEQ ID NO:6、22、38、54、74、94、114和134,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性;所述LCDR1结构域具有选自下组的氨基酸序列或与其基本相似的序列:SEQ ID NO:12、28、44、60、80、100、120和140,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性;所述LCDR2结构域具有选自下组的氨基酸序列或与其基本相似的序列:SEQ ID NO:14、30、46、62、82、102、122和142,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0028] 在一个实施方案中,所述抗体或抗体的抗原结合片段包含:

[0029] (a) HCDR3结构域,所述HCDR3结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、24、40、56、76、96、116和136;和

[0030] (b) LCDR3结构域,所述LCDR3结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、32、48、64、84、104、124和144。

[0031] 在相关实施方案中,所述抗体或所述抗体的抗原结合片段还包含:

[0032] (c) HCDR1结构域,所述HCDR1结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、20、36、52、72、92、112和132;

[0033] (d) HCDR2结构域,所述HCDR2结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、22、38、54、74、94、114和134;

[0034] (e) LCDR1结构域,所述LCDR1结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12、28、44、60、80、100、120和140;和

[0035] (f) LCDR2结构域,所述LCDR2结构域具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、30、46、62、82、102、122和142。

[0036] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含HCVR和LCVR,所述HCVR包含HCDR1结构域、HCDR2结构域和HCDR3结构域,所述HCDR1结构域具有选自SEQ ID NO:4、20、36、52、72、92、112和132中的一个的氨基酸序列;所述HCDR2结构域具有选自SEQ ID NO:6、22、38、54、74、94、114和134中的一个的氨基酸序列;所述HCDR3结构域具有选自SEQ ID NO:

8、24、40、56、76、96、116和136中的一个的氨基酸序列；所述LCVR包含LCDR1结构域、LCDR2结构域和LCDR3结构域，所述LCDR1结构域具有选自SEQ ID NO:12、28、44、60、80、100、120和140中的一个的氨基酸序列；所述LCDR2结构域具有选自SEQ ID NO:14、30、46、62、82、102、122和142中的一个的氨基酸序列；所述LCDR3结构域具有选自SEQ ID NO:16、32、48、64、84、104、124和144中的一个的氨基酸序列。

[0037] 在某些实施方案中，所述结合人GCGR的人抗体或人抗体的抗原结合片段包含选自下组的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对：SEQ ID NO:8/16、24/32、40/48、56/64、76/84、86/88、96/104、116/124和136/144。具有这些HCDR3/LCDR3对的抗GCGR抗体的非限制性实例是分别命名为以下名称的抗体：H4H1345N、H4H1617N、H4H1765N、H4H1321B和H4H1321P、H4H1327B和H4H1327P、H4H1328B和H4H1328P、H4H1331B和H4H1331P、H4H1339B和H4H1339P。

[0038] 在一个实施方案中，能特异性结合GCG并中和至少一种与GCG相关活性的、并且根据本文提供的方法有用的分离的抗体或其抗原结合片段包含：(a) 重链可变区 (HCVR) 氨基酸序列内包含的三个重链互补决定区 (HCDR1、HCDR2和HCDR3)，所述重链可变区 (HCVR) 氨基酸序列选自下组：SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294；和(b) 轻链可变区 (LCVR) 氨基酸序列内包含的三个轻链CDR (LCDR1、LCDR2和LCDR3)，所述轻链可变区 (LCVR) 氨基酸序列选自下组：SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

[0039] 在一些实施方案中，能特异性结合GCG并中和至少一种与GCG相关活性的分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR和LCVR，所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294，所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

[0040] 在一些实施方案中，能特异性结合GCG并中和至少一种与GCG相关活性的分离的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对，所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组：SEQ ID NO:150/158；166/174；182/190；198/206；214/222；230/238；246/254；262/270；278/286和294/302。

[0041] 在一些实施方案中，所述HCVR/LCVR氨基酸序列对包含SEQ ID NO:166/174。

[0042] 在一些实施方案中，所述HCVR/LCVR氨基酸序列对包含SEQ ID NO:182/190。

[0043] 在一个实施方案中，根据本文提供的方法有用的分离的抗体或其抗原结合片段包含：

[0044] (a) HCDR1结构域，其具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:152、168、184、200、216、232、248、264、280和296；

[0045] (b) HCDR2结构域，其具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:154、170、186、202、218、234、250、266、282和298；

[0046] (c) HCDR3结构域，其具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:156、172、188、204、220、236、252、268、284和300；

[0047] (d) LCDR1结构域，其具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:160、176、192、208、224、240、256、272、288和304；

[0048] (e) LCDR2结构域，其具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:162、178、194、210、226、242、258、274、290和306；以及

[0049] (f) LCDR3结构域，其具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:164、180、196、212、

228、244、260、276、292和308。

[0050] 在一个实施方案中,根据本文提供的方法有用的分离的抗体或其抗原结合片段包含:

[0051] (a)HCDR1结构域,其包含SEQ ID NO:168所示的氨基酸序列;

[0052] (b)HCDR2结构域,其包含SEQ ID NO:170所示的氨基酸序列;

[0053] (c)HCDR3结构域,其包含SEQ ID NO:172所示的氨基酸序列;

[0054] (d)LCDR1结构域,其包含SEQ ID NO:176所示的氨基酸序列;

[0055] (e)LCDR2结构域,其包含SEQ ID NO:178所示的氨基酸序列;和

[0056] (f)LCDR3结构域,其包含SEQ ID NO:180所示的氨基酸序列。

[0057] 在一个实施方案中,根据本文提供的方法有用的分离的抗体或其抗原结合片段包含:

[0058] (a)HCDR1结构域,其包含SEQ ID NO:184所示的氨基酸序列;

[0059] (b)HCDR2结构域,其包含SEQ ID NO:186所示的氨基酸序列;

[0060] (c)HCDR3结构域,其包含SEQ ID NO:188所示的氨基酸序列;

[0061] (d)LCDR1结构域,其包含SEQ ID NO:192所示的氨基酸序列;

[0062] (e)LCDR2结构域,其包含SEQ ID NO:194所示的氨基酸序列;和

[0063] (f)LCDR3结构域,其包含SEQ ID NO:196所示的氨基酸序列。

[0064] 根据本文提供的方法,包含重链CDR1 (HCDR1) 的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述重链CDR1 (HCDR1) 包含选自本文提供的任意HCDR1氨基酸序列中的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0065] 根据本文提供的方法,包含重链CDR2 (HCDR2) 的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述重链CDR2 (HCDR2) 包含选自本文提供的任意HCDR2氨基酸序列中的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0066] 根据本文提供的方法,包含重链CDR3 (HCDR3) 的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述重链CDR3 (HCDR3) 包含选自本文提供的任意HCDR3氨基酸序列中的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0067] 根据本文提供的方法,包含轻链CDR1 (LCDR1) 的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述轻链CDR1 (LCDR1) 包含选自本文提供的任意LCDR1氨基酸序列中的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0068] 根据本文提供的方法,包含轻链CDR2 (LCDR2) 的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述轻链CDR2 (LCDR2) 包含选自本文提供的任意LCDR2氨基酸序列中的氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0069] 根据本文提供的方法,包含轻链CDR3 (LCDR3) 的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述轻链CDR3 (LCDR3) 包含选自本文提供的任意LCDR3氨基酸序列中的

氨基酸序列或与其基本相似的序列,所述基本相似的序列与所述氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0070] 根据本文提供的方法,包含HCDR3和LCDR3氨基酸序列对(HCDR3/LCDR3)的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的,所述HCDR3和LCDR3氨基酸序列对(HCDR3/LCDR3)包含本文提供的任意HCDR3氨基酸序列与本文提供的任意LCDR3氨基酸序列的配对。根据某些实施方案,所述抗体或其抗原结合片段包含本文提供的任意示例性抗GCG抗体内含有的HCDR3/LCDR3氨基酸序列对。在某些实施方案中,所述HCDR3/LCDR3氨基酸序列对包含SEQ ID NO:172/180。

[0071] 根据本文提供的方法,包含本文提供的任意示例性抗GCG抗体内含有一组六个CDR(即,HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)的特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段也是有用的。在某些实施方案中,所述HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3氨基酸序列组包含SEQ ID NO:168/170/172/176/178/180。在某些实施方案中,所述HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3氨基酸序列组包含SEQ ID NO:184/186/188/192/194/196。

[0072] 在相关实施方案中,所述特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对内含有一组六个CDR(即,HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3),所述HCVR/LCVR氨基酸序列对如本文提供的任意示例性抗GCG抗体所定义。例如,所述特异性结合GCG的抗体或其抗原结合片段包含HCVR/LCVR氨基酸序列对内含有的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3氨基酸序列组,所述HCVR/LCVR氨基酸序列对选自下组:166/174;182/190;198/206;214/222;230/238;246/254;262/270;278/286和294/302。

[0073] 特异性结合GCG并包含上文提供的CDR序列的抗体的非限制性实例包括HIH059P、H4H10223P、H4H10231P、H4H10232P、H4H10236P、H4H10237P、H4H10238P、H4H10250P、H4H10256P和H4H10270P。

[0074] 用于鉴定HCVR和LCVR氨基酸序列内的CDR的方法和技术是本领域熟知的,并且可用于鉴定本文公开的特定HCVR和/或LCVR氨基酸序列内的CDR。可用于识别CDR的边界的示例性约定包括,例如,Kabat定义、Chothia定义和AbM定义。一般来说,Kabat定义以序列多样性为基础,Chothia定义以结构性环区域的位置为基础,AbM定义是Kabat和Chothia方法之间的折衷。参见,例如,Kabat,(1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md.; Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948; 和 Martin et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272。公共数据库也可用于鉴定抗体内的CDR序列。

[0075] 在一些实施方案中,具有重度胰岛素抵抗的患者可能患有选自以下的一种病症或疾病:多诺霍综合征(Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN(雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病)综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征(Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征(Werner's综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶E缺乏症、精氨酸代谢缺陷、巴德-毕德氏综合征(Bardet-Biedl综合征)、以及与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在相关的病症或疾病。在一些实施方案中,在所述患者血清中检测胰岛素降解蛋白酶的活性。在一些实施方案中,在所述患者血清中检测抗胰岛素的中和抗体或抗胰岛素受体的中和抗体。在一些患者中,重度胰岛素抵抗是在导致脂肪代谢障碍的脂肪细胞

自身免疫性破坏的背景下产生的。

[0076] 在一些方面,与重度胰岛素抵抗相关的基因变体选自以下:INSR、PSMD6、ADRA2A、AGPAT2(与脂肪代谢障碍和胰岛素抵抗相关)、AKT2、APPL1、BBS1(与巴德-毕德氏综合征1相关)、BSCL2、CIDEC、GRB10、IRS2、KLF14、LEP、LEPR、LMNA(与脂肪代谢障碍相关)、MC4R、PCNT、PIK2CA、POLD1(与脂肪代谢障碍相关)、PPARG、PTPRD、PTRF(与脂肪代谢障碍相关)、RASGRP1、TBC1D4和TCF7L2。

[0077] 在一些方面,将包含胰高血糖素/GCGR拮抗剂的所述组合物与至少一种其他的治疗剂组合施用给患者。所述其他的治疗剂可以是缓解或减少与重度胰岛素抵抗相关的症状和体征的任何试剂。在一些实施方案中,至少一种其他的治疗剂选自以下:胰岛素、双胍、hIGF1、瘦素、美曲普汀、吡格列酮、维达列汀、阿卡波糖、 α -糖苷酶抑制剂、L-精氨酸、二肽基肽酶-4抑制剂、胰岛素促分泌素、糊精受体激动剂、胰岛素增敏剂、FGF21、SGLT2抑制剂、SGLT1抑制剂、GLP-1受体激动剂、GLP-1受体激活剂、第二GCG抑制剂和第二GCGR拮抗剂。在一些方面,所述胰岛素促分泌素选自下组:磺酰脲类、ATP敏感性K通道拮抗剂和氯茴苯酸类。在一些方面,所述胰岛素增敏剂选自噻唑烷二酮和罗格列酮。在一些方面,所述其他的治疗剂可以是增加能量消耗和/或棕色脂肪活性的试剂,例如,如 β 3肾上腺素能激动剂(例如,米格列醇)、NPR1激动剂、NPR3拮抗剂、三碘甲状腺原氨酸、噻唑烷二酮、VEGF、鸢尾素(Irisin)、镍纹蛋白样(meteorin-like)、利尿钠肽、食欲素(orexin)、去甲肾上腺素、T4、胆汁酸、FGF-21、薄荷醇、slit2-C BMP7、BMP8 β 和FnIII结构域样/Tn3支架(基于人肌腱蛋白C的第三纤连蛋白III型结构域的结合分子)。

[0078] 通过阅读随后的详细描述,其他目的和优点将变得显而易见。

[0079] 附图简述

[0080] 图1A-1E显示了重度胰岛素抵抗小鼠模型中的血糖水平、胰岛素水平、胰高血糖素水平和B-羟基丁酸水平、以及体重。在图1A中,与经胰岛素受体拮抗剂和同种型对照抗体处理过的小鼠(实心方块)的血糖水平相比,经胰岛素受体拮抗剂S961和GCGR的抗体H4H1327P处理过的小鼠(空心三角形)表现出了血糖水平的升高。在图1B中,用S961处理的小鼠显示,即使在存在H4H1327P(空心三角形)的条件下,胰岛素水平也能随时间增加(实心方块)。在图1C中,在不存在(空心圆圈)或存在S961(空心三角形)的条件下,经H4H1327P处理的小鼠表现出了比经同种型对照处理的(实心圆圈)或S961处理的(实心方块)小鼠更高水平的胰高血糖素。在图1D中,经S961和H4H1327P(空心三角形)处理的小鼠将 β -羟基丁酸的水平维持在类似于经同种型对照处理的(实心圆圈)和仅经抗体对照处理的(空心圆圈)小鼠的水平。在不存在GCGR抗体的情况下,经胰岛素受体拮抗剂处理的小鼠表现出了比其他处理组更高水平的 β -羟基丁酸(实心方块)。四个治疗组的体重没有变化。参见图1E。

[0081] 图2A-2F显示了重度胰岛素抵抗小鼠模型中的血糖水平、胰岛素水平、胰高血糖素水平、B-羟基丁酸水平和氨基酸水平、以及体重。胰岛素受体拮抗剂(S961)的处理先于抗体H4H1327P的处理,引起了血糖水平的升高,并且在开始抗体治疗(空心三角形)的数天内证实了抗体降低血糖水平的能力。参见图2A。在图2B中,S961的处理导致了胰岛素水平升高(实心方块),随后用GCGR抗体H4H1327P进行的处理并没有降低胰岛素水平(空心三角形)。如图2C所示,胰高血糖素水平在经H4H1327P(空心圆圈)处理的小鼠中较高,并且在经抗体和S961(空心三角形)处理的小鼠中胰高血糖素水平更高。图2D显示了在用S961(实心方块)

处理后,血浆 β -羟基丁酸的水平升高,但是在用H4H1327P处理后的数天内,该水平降至未经处理的对照和单独抗体对照(空心三角形)的水平。图2E显示了氨基酸水平在经H4H1327P(空心圆圈)处理的小鼠中较高,并且在经抗体和S961(空心三角形)处理的小鼠中更高。没有观察到体重的变化。参见图2F。

[0082] 图3A和3B提供了对小鼠肝脏样品进行蛋白印迹分析的结果,所述小鼠肝脏样品获自经S961和H4H1327P中的一种或两种处理的小鼠。与经同种型处理的对照组相比,H4H1327P的处理使小鼠肝脏中的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(Pepck)减少了70%,并且S961的处理导致Pepck水平增加了2.3倍。H4H1327P的处理使S961引起的水平升高逆转至比基线低30%。参见图3A和3B。

[0083] 图4A-4D显示了四种处理对胰腺组织的效应:胰腺重量,图4A;胰腺 α 细胞量,图4B;胰腺 β 细胞量,图4C;以及相对于胰腺总面积的胰岛数,图4D。与存在单独S961的条件相比,在存在S961和H4H1327P的条件下 β 细胞量发生倍增,并且与对照小鼠相比增加了5.8倍。参见图4C。

[0084] 发明详述

[0085] 在描述本发明方法之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件是可以变化的。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求的限制。

[0086] 除非上下文另有明确说明,否则本说明书和所附权利要求中使用的单数形式“一”、“一种”和“所述”包括复数指代。因此,例如,当提及“一种方法”时,其包括一种或多种方法,和/或本文所述的步骤类型,并且/或者其在本领域技术人员阅读本公开之后将变得显而易见等。

[0087] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然与本文描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料都可用于本发明的实践或测试,但是现在描述的是优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。

[0088] 一般描述

[0089] 重度胰岛素抵抗与多种生理和病理生理状态相关。临床的发现包括高胰岛素血症、黑棘皮病、卵巢雄激素过多症、多囊卵巢、以及最终的高血糖症,并且在极少数情况下,患者可能发展为酮症酸中毒。虽然还没有能将重度胰岛素抵抗和更常见的胰岛素抵抗区分开的共识定义,但是已经将综合征胰岛素抵抗(syndromic insulin resistance)归类为原发性胰岛素信号缺陷(胰岛素受体病或胰岛素信号通路的部分破坏)或继发于脂肪组织异常(严重肥胖或脂肪营养不良)的胰岛素抵抗。参见Semple et al., (2011), Genetic Syndromes of Severe Insulin Resistance, Endocrine Reviews, 32(4):498-514。

[0090] 重度胰岛素抵抗的证据见于需要超过100至200单位/天剂量的外源性胰岛素的患者,或具有长期升高的内源性胰岛素循环水平的患者。Moller and Flier, (1991) New England Journal of Medicine, 325:938-948。空腹胰岛素水平高于约50-70 μ U/mL或(口服葡萄糖耐量测试之后的)胰岛素水平峰值高于约350 μ U/mL,则表明具有重度胰岛素抵抗。通常,在存在重度胰岛素抵抗的情况下,胰岛素敏感指数值低于 $2 \times 10^{-4} \mu$ U/mL.min。具有重度胰岛素抵抗的患者还表现出低于2mg/kg.min的葡萄糖利用率。参见Tritos and Mantzoros,

(1998) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83:3025-3030。

[0091] 胰岛素与靶细胞质膜上的胰岛素受体相互作用。胰岛素受体是跨膜的酪氨酸激酶受体,其功能是调节葡萄糖稳态。胰岛素受体由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成,所述 α 亚基含有胰岛素结合位点,所述 β 亚基含有酪氨酸激酶结构域;所述亚基通过二硫键连接形成350kDa的 β - α - α - β 四聚体。所述受体有两种同种型,一种同种型具有外显子11 (IR-B),一种同种型不含外显子11 (IR-A),并且这些同种型在各种组织中的表达水平不同。IR-B同种型表现出比IR-A同种型更高效的信号传导活性,并且IR-B同种型主要在肝脏、脂肪组织和肌肉组织中表达。IR-A同种型在CNS细胞和造血细胞中表达,并且具有稍高的胰岛素结合亲和力。

[0092] 活化的胰岛素受体的酪氨酸激酶活性负责葡萄糖转运的跨膜信号传导和葡萄糖稳态的调节。

[0093] 重度胰岛素抵抗通常与胰岛素受体突变相关,导致在细胞表面的表达减弱或受体的信号传导能力减弱。其他突变包括受体结合亲和力的缺陷或参与胰岛素信号转导通路的蛋白质(例如,胰岛素受体的酪氨酸激酶结构域的保守区域)的突变。

[0094] 具有重度胰岛素抵抗的患者可能患有选自下组的病症或疾病:多诺霍综合征(Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN(雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病)综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征(Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征(Werner's综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶E缺乏症、精氨酸代谢缺陷、或巴德-毕德氏综合征(Bardet-Biedl综合征)。

[0095] 遗传性和获得性重度胰岛素抵抗是较为罕见的疾病,在该疾病中,身体的组织和器官不会对胰岛素产生适当的应答。与重度胰岛素抵抗相关的临床发现包括生长迟缓、器官肿大、骨骼和脂肪组织发育受损、软组织过度生长、糖尿病、肝脂肪变性、黑棘皮病、卵巢雄激素过多症和多毛症。实验室检查结果包括高胰岛素血症、胰岛素清除率降低、高血糖、血脂异常和雄激素升高。除了一些或所有的一般临床和实验室特征之外,与重度胰岛素抵抗相关的各种综合征中的每一种还都具有独特的特征。

[0096] 多诺霍综合征(DS,也称为矮妖精貌综合征)和Rabson-Mendenhall综合征(RMS)是罕见的常染色体隐性疾病,在这两种疾病中,胰岛素受体的两个等位基因都是异常的,并且患者对内源性和外源性胰岛素没有应答。DS和RMS的个体在出生前就发育不全,然后在婴儿时也不能茁壮成长。患者呈现出极高的循环胰岛素水平,高达正常水平的1000倍。DS的主要代谢结果是空腹低血糖,其次是餐后高血糖。被诊断患有DS的个体通常在一岁之前死亡,并且不会发生糖尿病酮症酸中毒。患有RMS的个体也经历空腹低血糖并且通常能在婴儿期存活,但随着时间的推移,发展为严重且难以治愈的糖尿病酮症酸中毒和胰岛素水平下降。

[0097] 当通过脂肪酸的分解和氨基酸的脱氨作用形成酮体并在血液中积聚时,就会发生酮血症。如果没有治疗任其继续,患者会继续发展成糖尿病酮症酸中毒。 β -羟基丁酸和乙酰乙酸是两种较常见的酮类,并且其水平升高可用于衡量酮症的严重程度和酮症酸中毒的指标。

[0098] A型胰岛素抵抗综合征是另一种以重度胰岛素抵抗为特征的罕见疾病,症状通常出现在女性的青春期或男性的成年期。女性会呈现出原发性闭经或月经稀发、卵巢囊肿、多

毛症和黑棘皮病,但通常不会超重。男性患者会在患上糖尿病时显现出来。与DS和RMS一样,胰岛素受体基因的突变导致了A型胰岛素抵抗综合征。

[0099] 脂肪营养不良是指以脂肪的分布、利用和代谢异常为特征的一组疾病,这些异常归因于胰岛素受体本身或胰岛素信号级联下游组分的缺陷。患有脂肪营养不良的患者表现为全身或部分缺乏脂肪组织、胰岛素抵抗(有或没有糖尿病)、显著的血脂异常和脂肪肝。一些脂肪营养不良综合征(例如,Berardinelli-Seip综合征)是遗传性的,而其他一些(包括劳伦斯综合征)是获得性的,有时是在感染性前驱症状后获得的。其他的脂肪营养不良综合征包括Kobberling-Dunnigan综合征、具有其他畸形特征的脂肪营养不良、以及头胸部脂肪营养不良。

[0100] B型胰岛素抵抗综合征不同于DS、RMS和A型胰岛素抵抗综合征,前者与抗胰岛素受体的血清自身抗体的存在相关,并且可能具有自身免疫疾病的背景。症状类似于其他胰岛素抵抗综合征,包括非酮症和重度胰岛素抵抗型糖尿病、黑棘皮病和多毛症、以及偶尔的反常低血糖症(paradoxal hypoglycemia)。

[0101] HAIR-AN(雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病)综合征发生于年轻女性中,通常为肥胖女性,其中胰岛素抵抗呈现出不同的形式;一些人的胰岛素浓度很高但葡萄糖水平正常,而其他人则表现为糖尿病症状。不同于重度胰岛素抵抗的其他综合症的罕见性,HAIR-AN综合征估计会影响全球约5%的少女。该综合征与胰岛素受体基因的酪氨酸激酶结构域的突变有关。

[0102] 假肢端肥大症表现为与肢端肥大症相关的重度胰岛素抵抗,并且可能由胰岛素信号传导通路的缺陷引起或由通过IGF-1受体的高胰岛素水平信号传导引起。

[0103] 举几例来说,其他重度胰岛素抵抗综合征包括Alstrom综合征、肌强直性营养不良和韦尼克氏综合征(Werner's综合征)。

[0104] 在一些患者中,所述病症或疾病与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在有关。示例性的基因变体包括INSR、PSMD6、ADRA2A、AGPAT2(与脂肪代谢障碍和胰岛素抵抗相关)、AKT2、APPL1、BBS1(与巴德-毕德氏综合征1相关)、BSCL2、CIDEA、GRB10、IRS2、KLF14、LEP、LEPR、LMNA(与脂肪代谢障碍相关)、MC4R、PCNT、PIK2CA、POLD1(与脂肪代谢障碍相关)、PPARG、PTPRD、PTRF(与脂肪代谢障碍相关)、RASGRP1、TBC1D4和TCF7L2。

[0105] 在一些患者中,在所述患者血清中检测胰岛素降解蛋白酶的活性。在一些患者中,在所述患者血清中检测抗胰岛素中和抗体或抗胰岛素受体中和抗体。在一些患者中,重度胰岛素抵抗是在脂肪细胞的自身免疫破坏的背景下产生的,后者导致脂肪营养不良。

[0106] 患有重度胰岛素抵抗的患者最终会发生高血糖症,并且在某些综合征中会出现酮症酸中毒。例如,在RMS患者中,胰岛素水平在生命最早期会一开始非常高,即使在反常的禁食性低血糖期间也是如此。随着疾病的进展,胰岛素水平虽然仍很高,但是会有所下降。此外,部分氧化的脂肪酸水平升高,表明胰岛素不能抑制脂肪细胞释放脂肪酸,最终导致持续的酮酸中毒。同样地,由于胰岛素水平再也不能够抑制肝葡萄糖的产生和释放,因此导致产生了持续的高血糖症。然而,持续输注极高浓度的胰岛素(9.5U/kg.hr)可以逆转升高的脂肪酸氧化并阻断酮尿症。Longo et al., (1991) Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84:2623-2629。此外,高甘油三酯血症和较低的高密度脂蛋白胆固醇水平与重度胰岛素抵抗有关。

[0107] 患有重度胰岛素抵抗综合征的患者虽然具有高血糖,但血浆胰高血糖素水平正常或甚至略微升高。West et al., (1975) Arch. Dis. Child., 50 (9) :703-708; Desbois-Mouthon et al., (1997) Pediatr. Res., 42 (1) :72-77。由于缺乏对胰岛素的抑制以及胰高血糖素信号传导异常高,因此导致肝葡萄糖输出的增加产生了高血糖症。

[0108] 迄今为止,还没有研究检测过拮抗GCG/GCGR信号通路对重度胰岛素抵抗病症或疾病的效应。在实施例描述的研究中,在重度胰岛素抵抗小鼠模型中使用GCGR拮抗剂作为GCG/GCGR信号传导通路的示例性抑制剂,通过测定血浆 β -羟基丁酸的水平来证实经过数周的治疗对血糖水平和酮血症的效应。

[0109] 定义

[0110] “胰高血糖素受体”在本文中也称为“GCGR”,属于G蛋白偶联受体2类家族,并且由较长的氨基末端细胞外结构域、7个跨膜区段和细胞内C-末端结构域组成。胰高血糖素受体在肝细胞表面显著表达,它们与胰高血糖素在肝细胞表面结合,并将由此提供的信号转导到该细胞中。因此,术语“胰高血糖素受体”还指一种或多种与胰高血糖素特异性相互作用以产生生物信号的受体。本领域(EP0658200B1)中已经分离和公开了编码大鼠和人源的胰高血糖素受体的DNA序列。还分离和测序了小鼠和食蟹猴的同源物(Burcelin, et al., (1995) Gene 164:305-310); McNally et al., (2004) Peptides 25:1171-1178)。本文使用的“胰高血糖素受体”和“GCGR”可互换使用。本文使用的表述“GCGR”、“hGCGR”或其片段除非指明来自非人物种(例如,“小鼠GCGR”,“大鼠GCGR”或“猴GCGR”),否则是指人GCGR蛋白或其片段。

[0111] 短语“GCGR拮抗剂”是指GCGR信号传导通路的抑制剂、拮抗剂或反向激动剂。“GCG抑制剂”可以阻止胰高血糖素与受体的结合。GCGR抑制剂也可以阻止胰高血糖素与受体的结合。然而,两者都能有效地阻断或减弱受体的活化,或者可能干扰GCGR活化下游的信号级联。

[0112] GCGR拮抗剂能够结合胰高血糖素受体,从而拮抗由GCGR介导的GCG活性。通过拮抗GCG在GCGR处的结合和活性来抑制GCG的活性可降低糖异生和糖原分解的速率以及血浆中的葡萄糖浓度。确定假定的拮抗剂与胰高血糖素受体结合的方法是本领域已知的,并且确定在胰高血糖素受体处对胰高血糖素活性的干扰的方法是公开的;参见,例如, S. E. de Laszlo et al., (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:641-646。本文考虑这样的GCGR拮抗剂或GCG抑制剂是有用的:其具有小分子化合物(或者换句话说,低分子量的有机化合物)作为其功能组分。小分子通常小于800道尔顿。另外,CRISPR技术可用于降低GCG或GCGR的表达。

[0113] 术语“抑制剂”或“拮抗剂”包括延迟或阻止化学或生理反应或应答的物质。常见的抑制剂或拮抗剂包括但不限于反义分子、抗体、小分子抑制剂、肽抑制剂、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、Spiegelmer、适体、改造的Fn III型结构域、及其衍生物。

[0114] GCG抑制剂或GCGR信号传导通路拮抗剂的实例,包括但不限于,GCG或GCGR的抗体(人的或人源化的)或其抗原结合部分,其阻断GCGR信号传导通路的结合或抑制所述通路的活性。可用于本文所述方法的示例性GCGR拮抗剂包括分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段,所述人单克隆抗体或其抗原结合片段包含:(a) HCVR,所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;和/或(b) LCVR,所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、

138和148。可用于本文所述方法的示例性GCG抑制剂包括分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的人单克隆抗体或其抗原结合片段包含:(a) HCVR,所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294;和/或(b) LCVR,所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

[0115] “治疗有效的剂量”是对接受施用之物产生所需效应的剂量。确切的剂量应当取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员通过使用已知的技术来确定(参见,例如,Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*)。

[0116] 短语“基本上等同”是指这样的蛋白质序列:其与HCVR和/或(b) LCVR具有至少95%的同一性,并且能够结合GCGR并抑制GCGR的生物学活性,所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、18、34、50、66、70、86、90、106、110、126、130和146;所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、26、42、58、68、78、88、98、108、118、128、138和148。短语“基本上等同”还指这样的蛋白质序列:其与HCVR和/或(b) LCVR具有至少95%的同一性,并且能够结合GCG并抑制GCG的生物学活性,所述HCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:150、166、182、198、214、230、246、262、278和294;所述LCVR具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:158、174、190、206、222、238、254、270、286和302。

[0117] 术语“同一性”或“同源性”解释为在不将任何保守取代考虑成是序列同一性的一部分的前提下,在进行了序列比对以及为了获得整个序列的最大百分比同一性而引入了缺口后,候选序列中与和其进行对比的相应序列的残基相同的氨基酸残基的百分比。N-或C-末端的延伸和插入都不应解释为降低同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是公知的。序列同一性可通过使用序列分析软件(例如,Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, Wis. 53705)测得。该软件通过为各种取代、缺失和其他修饰指定同源性程度来匹配相似的序列。

[0118] 术语“治疗(treating)”(或“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”)是指这样的过程:其涉及通过使用本文所述的GCG抑制剂或GCGR拮抗剂减缓、中断、抑制、阻止、控制、停止、降低、改善或逆转现有的症状、紊乱、病症或疾病的进展、持续时间或严重程度,但不一定涉及完全消除所有的疾病相关症状、病症或紊乱。此外,“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treat)”是指用于获得有益的或所需结果(包括临床结果)的方法,其包括,但不限于,以下一种或多种:抑制、延迟或预防重度胰岛素抵抗的进展;抑制、延迟或预防与重度胰岛素抵抗相关的疾病或以升高的血浆胰岛素水平、升高的血糖水平和/或酮血症或酮酸中毒(通过升高的 β -羟基丁酸水平测得)为特征的疾病的进展,例如多诺霍综合征(Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN(雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病)综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征(Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征(Werner's综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶B缺乏症、精氨酸代谢缺陷、巴德-毕德氏综合征(Bardet-Biedl综合征)、以及与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在相关的病症或疾病;或者抑制、预防或改善与重度胰岛素抵抗相关疾病相关的至少一种症状;或降低血糖水平和/或 β -羟基丁酸水平(作为酮症酸中毒的指标),从而调节与高血糖水平和

酮血症相关的所述病症或疾病,或者减轻或降低与所述病症或疾病相关的至少一种症状或并发症的严重程度。本文使用的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”还指提升患有所述疾病的人的生活质量,减少治疗所述疾病所需的其他药物的剂量和/或延长患者的存活期。例如,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”可以包括减少治疗患有重度胰岛素抵抗的患者所需的胰岛素的量和/或剂量。

[0119] 短语“胰岛素抵抗”是指这样的状态:即需要大于正常量的胰岛素来引发在量的形式上正常的应答。短语“重度胰岛素抵抗”通常是指这样的临床实体:虽然他们的内源性胰岛素的分泌和/或胰岛素的血浆水平显著升高,但是通常表现为接近正常的或升高的血糖水平。重度胰岛素抵抗的证据见于需要超过100至200单位/天剂量的外源性胰岛素的患者,或具有长期升高的内源性胰岛素循环水平的患者。Moller and Flier, (1991) New England Journal of Medicine, 325:938-948。空腹胰岛素水平高于约50-70 μ U/mL或胰岛素峰水平(口服葡萄糖耐量测试)高于约350 μ U/mL表明具有重度胰岛素抵抗。胰岛素敏感指数值低于 $2 \times 10^4 \mu$ U/mL.min通常见于重度胰岛素抵抗。具有重度胰岛素抵抗的患者也表现出低于2mg/kg.min的葡萄糖利用率。参见Tritos and Mantzoros, (1998) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83:3025-3030。

[0120] GCG/GCGR信号通路抑制剂

[0121] 本文提供了用于治疗以重度胰岛素抵抗为特征的病症或疾病的GCG抑制剂和GCGR拮抗剂。在一些实施方案中,所述拮抗剂是胰高血糖素的抑制剂。在一些实施方案中,所述拮抗剂是GCGR的抑制剂。在一些实施方案中,所述GCGR拮抗剂为MK-0893、PF-06291874、LGD-6972或LY2409021。

[0122] 在一些实施方案中,所述拮抗剂包含能够结合GCG或GCGR的抗体或其片段。在一些实施方案中,通过,例如,使用CRISPR技术或反义物中断GCG或GCGR的表达来抑制所述信号通路。

[0123] 在一些实施方案中,所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂是反义分子、抗体、小分子抑制剂、肽抑制剂、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、Spiegelmer、适体、改造的Fn III型结构域、或其衍生物等。

[0124] 抗GCGR抗体、抗GCG抗体和抗体片段

[0125] 在一些实施方案中,所述GCGR拮抗剂是美国专利号8,545,847(其通过引用整体并入本文)中公开的抗体或抗体片段。其中公开的抗体提供在表1中。

[0126] 表1

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H1345N	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H1617N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H1765N	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H1321B	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H1321P	66	52	54	56	68	60	62	64

[0127]

[0128]

H4H1327B	70	72	74	76	78	80	82	84
H4H1327P	86	72	74	76	88	80	82	84
H4H1328B	90	92	94	96	98	100	102	104
H4H1328P	106	92	94	96	108	100	102	104
H4H1331B	110	112	114	116	118	120	122	124
H4H1331P	126	112	114	116	128	120	122	124
H4H1339B	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H1339P	146	132	134	136	148	140	142	144

[0129] 预期可用于本文的其他GCGR抗体或抗体片段包括在以下中公开的抗体或抗体片段：美国专利号5,770,445和7,947,809；欧洲专利申请EP2074149A2；EP专利EP0658200B1；美国专利公开号2009/0041784；2009/0252727；和2011/0223160；以及PCT公开号W02008/036341。这些专利和公开物通过引用整体并入本文。

[0130] 在一些实施方案中，所述GCG抑制剂是U.S.2016/0075778(其通过引用整体并入本文)中公开的抗体或其抗体片段。其中公开的抗体提供在表2中。

[0131] 表2

[0132]

抗体名称	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H059P	150	152	154	156	158	160	162	164
H4H10223P	166	168	170	172	174	176	178	180
H4H10231P	182	184	186	188	190	192	194	196
H4H10232P	198	200	202	204	206	208	210	212
H4H10236P	214	216	218	220	222	224	226	228
H4H10237P	230	232	234	236	238	240	242	244
H4H10238P	246	248	250	252	254	256	258	260
H4H10250P	262	264	266	268	270	272	274	276
H4H10256P	278	280	282	284	286	288	290	292
H4H10270P	294	296	298	300	302	304	306	308

[0133] 预期可用于本文的其他GCG抗体或抗体片段包括在以下中公开的抗体或抗体片段：美国专利号4,206,199；4,221,777；4,423,034；4,272,433；4,407,965；5,712,105；以及PCT公开号W02007/124463和W02013/081993。

[0134] 抗体片段包括具有所需目标特异性的任何片段，例如，通过修饰整个抗体（例如，酶消化）产生的抗体片段，或使用重组DNA方法从头合成的抗体片段（scFv、单结构域抗体、DVD（双可变结构域免疫球蛋白）或dAb（单可变结构域抗体））或使用人噬菌体或酵母展示文库鉴定的抗体片段（参见，例如，McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554）。或者，可以使用标准的免疫和抗体分离方法（包括但不限于制备杂交瘤）或使用B细胞筛选技术（例如SLAM）从产生人、人-小鼠、人-大鼠和人-兔嵌合抗体的小鼠中分离得到抗体。免疫球蛋白结合结构域还包括，但不限于，免疫球蛋白的重链（V_H）或轻链（V_L）的可变区。或者通过免疫人并分离抗原阳性的B细胞以及克隆编码所述重链和轻链的cDNA并将它们共表达在细胞（例如，CHO）中。

[0135] 本文使用的术语“抗体”是指特异性结合并识别抗原的多肽或其片段,所述多肽包含来自免疫球蛋白基因的框架区。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其相应地分别定义IgG、IgM、IgA、IgD和IgE免疫球蛋白类别。在每个IgG类中,存在不同的同种型(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。通常,抗体的抗原结合区域对于决定结合的特异性和亲和力是最关键的。

[0136] 示例性免疫球蛋白(抗体)的结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条轻链(约25kD)和一条重链(约50-70kD)。每条链的N-末端限定了具有约100-110或更多氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语“可变轻链”(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

[0137] 抗体以完整的免疫球蛋白形式存在,或以许多充分表征的用各种肽酶消化产生的片段形式存在。例如,胃蛋白酶消化铰链区中二硫键以下的抗体以产生F(ab)'₂,所述F(ab)'₂是Fab的二聚体,其本身是通过二硫键与V_H-C_H1连接的轻链。可以在温和条件下还原F(ab)'₂以破坏铰链区中的二硫键,从而将F(ab)'₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体基本上是具有部分铰链区的Fab。虽然在完整抗体的消化方面定义了各种抗体片段,但是技术人员应当理解,可以通过化学方法或通过使用重组DNA的方法从头合成这些片段。

[0138] 用于制备按本文方法有用的抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,Kohler& Milstein(1975) Nature 256:495-497; Harlow& Lane(1988) Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.)。可以从细胞克隆出编码目的抗体的重链和轻链的基因,例如,可以从杂交瘤克隆出编码单克隆抗体的基因,并用于产生重组的单克隆抗体。可以通过将CDR区标准地克隆到人框架中来对单克隆抗体进行人源化。编码单克隆抗体的人重链和轻链的基因文库也可以由杂交瘤或浆细胞制得。重链和轻链基因产物的随机组合产生大量的具有不同抗原特异性的抗体。用于产生单链抗体或重组抗体的技术(美国专利号4,946,778;美国专利号4,816,567)可适用于产生本文公开的方法中使用的抗体。而且,转基因小鼠或其他生物(例如,其他哺乳动物)可用于表达人的、人-小鼠嵌合的、人-大鼠嵌合的、人-兔嵌合的或人源化的抗体。或者,可以使用噬菌体展示或酵母展示技术来鉴定人抗体和特异性结合选定抗原的异源体Fab片段。

[0139] 免疫缀合物

[0140] 本公开物包括用与治疗部分(therapeutic moiety)(例如,能够降低血糖水平或解决重度胰岛素抵抗的另一症状的试剂)缀合的人抗GCGR单克隆抗体(“免疫缀合物”)来治疗重度胰岛素抵抗。对于可以与抗GCGR抗体缀合的治疗部分的类型,将考虑待治疗的病症和要实现的所需治疗效果。例如,为了降低血糖和/或维持正常的血糖水平,可以将以下试剂与所述GCGR抗体缀合:例如,双胍(例如,二甲双胍)、磺酰脲(例如,格列本脲、格列吡嗪)、PPAR γ 激动剂(例如,吡格列酮,罗格列酮); α 葡萄糖苷酶抑制剂(例如,阿卡波糖、伏格列波糖)、晚期糖基化终产物形成的抑制剂(例如,氨基胍)、或者第二GCGR抑制剂或GCG抑制剂。或者,如果所需治疗效果是治疗酮血症或与重度胰岛素抵抗相关的任何其他症状或病症,则将合适的试剂与所述抗GCGR的抗体缀合可能是有好处的。用于形成免疫缀合物的合适试剂的实例是本领域已知的,参见例如,WO 05/103081。

[0141] 多特异性抗体

[0142] 根据本文提供的方法有用的抗体可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以特异性针对一种靶多肽的不同表位,或者可以含有特异性针对一种以上靶多肽的抗原结合结构域。参见,例如,Tutt et al., (1991) J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., (2004) Trends Biotechnol. 22:238-244。所述抗GCGR的抗体可以与另一种功能分子(例如,另一种肽或蛋白质)连接或与其共表达。例如,抗体或其片段可以与一种或多种其他分子实体(例如,另一种抗体或抗体片段)功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式连接),以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。例如,考虑这样的双特异性抗体:其中免疫球蛋白的一个臂特异性地针对人GCGR或其片段,并且所述免疫球蛋白的另一个臂特异性地针对第二治疗靶点或者与治疗部分缀合。在某些实施方案中,免疫球蛋白的一个臂特异性地针对hGCGR或其片段的N-末端结构域上的表位,并且所述免疫球蛋白的另一个臂特异性地针对hGCGR或其片段的EC环之一上的表位。在某些实施方案中,免疫球蛋白的一个臂特异性地针对一个EC环或其片段,并且所述第二个臂特异性地针对第二EC环或其片段。在某些实施方案中,免疫球蛋白的一个臂特异性地针对hGCGR的一个EC环上的一个表位,而另一个臂特异性地针对hGCGR的相同EC环上的第二表位。

[0143] 可根据本文所述的方法使用的示例性双特异性抗体形式涉及使用第一免疫球蛋白(Ig)C_H3结构域和第二Ig C_H3结构域,其中所述第一和第二Ig C_H3结构域至少在一个氨基酸上彼此不同,并且其中与缺乏所述氨基酸差异的双特异性抗体相比,至少一个氨基酸的差异降低了所述双特异性抗体与蛋白A的结合。在一个实施方案中,所述第一Ig C_H3结构域结合蛋白A,第二Ig C_H3结构域含有能降低或消除蛋白A结合的突变,例如H95R修饰(以IMGT外显子编号;EU编号为H435R)。所述第二C_H3可进一步包含Y96F修饰(以IMGT编号;EU编号为Y436F)。可在所述第二C_H3中找到的其他修饰包括:IgG1抗体情况下的D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(以IMGT编号;EU编号为D356E、L358M、N384S、K392N、V397M和V422I);IgG2抗体情况下的N44S、K52N和V82I(IMGT;EU编号为N384S、K392N和V422I);IgG4抗体情况下的Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(以IMGT编号;EU编号为Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。上述双特异性抗体形式的变化涵盖在本公开的范围之内。

[0144] 抗体的筛选和选择

[0145] 可以通过本领域已知的多种方法筛选和选择根据本文提供的方法有用的优选抗体。例如,可以通过使用基于ELISA的方法对特异性针对靶抗原的单克隆抗体的存在进行初步筛选。优选进行二次筛选以鉴定和选择用于构建抗体-药物缀合物所需的单克隆抗体。可以用本领域已知的任何合适的方法进行二次筛选。美国公开物2004/0101920中描述了一种称为“生物传感器修饰辅助分析”(Biosensor Modification-Assisted Profiling) (“BiaMAP”)的优选方法,所述公开物通过引用整体并入本文。BiaMAP可快速鉴定出产生具有所需特征的单克隆抗体的杂交瘤克隆。更具体地,基于对抗体:抗原相互作用的评估,将单克隆抗体分选成不同的表位相关组。可以通过基于细胞的测定法鉴定出能够阻断配体或受体的抗体,例如荧光素酶测定法,其利用在NFκB驱动的启动子或cAMP应答驱动的启动子控制下的荧光素酶基因。胰高血糖素对GCGR的刺激导致了NFκB/cAMP/CREB的信号,从而提升细胞中的荧光素酶水平。将阻断性抗体鉴定为阻断胰高血糖素诱导荧光素酶活性的抗体。

[0146] 治疗人群

[0147] 本文提供的治疗方法可用于治疗具有重度胰岛素抵抗或与重度胰岛素抵抗相关的病症或疾病的个体。示例性的病症或疾病包括多诺霍综合征 (Donohue综合征)、Rabson-Mendenhall综合征、A型胰岛素抵抗、B型胰岛素抵抗、HAIR-AN (雄激素过多症、胰岛素抵抗和黑棘皮病) 综合征、假肢端肥大症、阿耳斯特雷姆氏综合征 (Alstrom综合征)、肌强直性营养不良、韦尼克氏综合征 (Werner's综合征)、脂肪代谢障碍、肝硬化、单基因病态肥胖、高胰岛素血症、羧肽酶E缺乏症、精氨酸代谢缺陷、巴德-毕德氏综合征 (Bardet-Biedl综合征)、以及与据报道能引起重度胰岛素抵抗的基因变体的存在相关的病症或疾病。在一些实施方案中,在所述患者血清中检测到胰岛素降解蛋白酶活性。在一些实施方案中,在所述患者血清中检测到抗胰岛素的中和抗体。在一些患者中,重度胰岛素抵抗是在导致脂肪代谢障碍的脂肪细胞自身免疫性破坏的背景下产生的。

[0148] 治疗性的施用和制剂

[0149] 根据本文提供的方法有用的是包含胰高血糖素/GCGR拮抗剂的治疗性组合物,例如,如抗GCGR的抗体。根据本文所述方法的治疗性组合物的施用将通过合适的途径进行,包括但不限于,静脉内、皮下、肌肉内、鞘内、脑内、心室内、鼻内或口服给药,与合适的载体、赋形剂以及掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的其他试剂一起给药。在所有药物化学家都知道的配方中可以找到许多合适的制剂:Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton、Pa。这些制剂包括,例如,粉末、糊剂、软膏、凝胶、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子或阴离子脂质)(如LIPOFECTIN™)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡(carbowax)(具有各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有碳蜡的半固体混合物。另外参见Powell et al."Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0150] 抗体的剂量可以根据待施用的受试者的年龄和体格大小、靶疾病、病症、施用途径等而变化。当所述抗体用于降低患者的血糖水平和/或降低各种病症和疾病(例如,A型胰岛素抵抗综合征、RMS或DS)中与重度胰岛素抵抗相关的酮血症(通过,例如, β -羟基丁酸水平测得)时,通常以约0.01至约30mg/kg体重的剂量,更优选约0.02至约7、约0.03至约5、或约0.05至约3mg/kg体重的剂量静脉内施用所述抗体是有利的。根据病情的严重程度和对治疗的应答,可以调整治疗的频率和持续时间。在某些实施方案中,可以以如下初始剂量施用所述抗体或其抗原结合片段:至少约0.1mg至约800mg,约1至约500mg,约5至约300mg,或者约10至约200mg,至约100mg,或者至约50mg。

[0151] 在某些实施方案中,在所述初始剂量之后可以施用第二个或多个后续剂量的抗体或其抗原结合片段,其量可以与所述初始剂量的量大致相同或比其更小,其中所述后续剂量间隔至少1天至3天;至少一周,至少2周;至少3周;至少4周;至少5周;至少6周;至少7周;至少8周;至少9周;至少10周;至少12周;或至少14周。

[0152] 各种递送系统是已知的并且可用于施用包含所述抗体的药物组合物,例如,包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞作用中(参见例如Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括,但不限于,长效制剂、气溶胶、皮内途径、透皮途径、肌内途径、腹膜内途径、静脉内途径、皮下途径、鼻内途径、硬膜外

途径、鞘内途径、心室内途径和口服途径。所述组合物可以通过任何方便的途径给药,例如通过输注或推注,通过上皮或粘膜皮肤的衬层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。可以是全身给药或局部给药。

[0153] 所述药物组合物还可以在囊泡(特别是脂质体)中递送(参见,例如,Langer (1990) Science 249:1527-1533)。

[0154] 在某些情况下,所述药物组合物可以在控释系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料。在又一个实施方案中,可以将控释系统放置在所述组合物靶标的附近,因此仅需要全身剂量的一小部分。

[0155] 所述可注射制剂可包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射,用于滴注等的剂型。这些可注射制剂可通过公知的方法制备。例如,所述可注射制剂可以通过,例如,将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制备。例如,作为用于注射的水性介质有能与合适的增溶剂组合使用的生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂的等渗溶液等,所述增溶剂包括例如,醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80, HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。例如,使用可以与增溶剂组合使用的芝麻油、大豆油等油性介质,所述增溶剂包括例如,苯甲酸苄酯、苯甲醇等。这样制得的注射剂优选装在适当的安瓿中。

[0156] 可以用标准的针头和注射器皮下或静脉内递送可用于本文的药物组合物。另外,关于皮下递送,笔递送装置可以方便地应用于递送可用于本文所述方法的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常使用包含药物组合物的可更换的药筒。一旦施用了药筒内的所有药物组合物并且药筒为空时,就可以方便地丢弃所述空药筒并用含有所述药物组合物的新药筒替换。然后可以重复使用所述笔递送装置。在一次性笔递送装置中,没有可更换的药筒。相反,所述一次性笔递送装置预装有所述药物组合物,所述药物组合物被放置在所述装置内的贮存器中。一旦所述贮存器中清空了所述药物组合物,就丢弃整个装置。

[0157] 许多可重复使用的笔和自动注射器递送装置可应用于皮下递送根据本文所述方法有用的药物组合物。仅举几例来说,示例包括,但绝不限于AUTOPEN™(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems, Burghdorf, 瑞士)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co., Indianapolis, Inn.)、NOVOPEN™ I, II和III(Novo Nordisk, Copenhagen, 丹麦)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, 丹麦)、BD™笔(Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™、和OPTICLIK™(Sanofi-Aventis, Frankfurt, 德国)。仅举几例来说,可应用于皮下递送根据本文所述方法有用的药物组合物的一次性笔递送装置的实例包括,但绝不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen, Thousand Oaks, Calif.)、PENLET™(Haselmeier, Stuttgart, 德国)、EPIPEN(Dey, L.P.)和HUMIRA™笔(Abbott Labs, Abbott Park, Ill.)。

[0158] 有利的是,可将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成单位剂量的剂型,其适于调整活性成分的剂量。单位剂量的这种剂型包括,例如,片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿剂)、栓剂等。在单位剂量中,上述抗体的含量通常为约5至约750mg/剂型;特别是在

注射剂型中,优选地上述抗体的含量为约5至约100mg,在其他剂型中为约10至约250mg。

[0159] 组合疗法

[0160] 在许多实施方案中,可用于本文的GCG抑制剂或GCGR拮抗剂可以与一种或多种其他化合物或疗法组合施用。组合疗法可以是同时的或依次的。

[0161] 在一些实施方案中,所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与至少一种选自下组的其他的治疗剂一起施用:胰岛素、双胍、hIGF1、瘦素、吡格列酮、维达列汀、阿卡波糖、 α -糖苷酶抑制剂、L-精氨酸、二肽基肽酶-4抑制剂、胰岛素促分泌素、糊精受体激动剂、胰岛素增敏剂、SGLT2抑制剂、SGLT1抑制剂、GLP-1类似物、GLP-1受体激活剂、第二GCG抑制剂和第二GCGR拮抗剂。在一些实施方案中,所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与至少一种选自下组的其他的治疗剂一起施用:钒酸盐或钒盐、苯妥英、苯扎贝特。在一些实施方案中,所述GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与膳食补充剂(例如,富含 ω -3脂肪酸的鱼油)一起施用。

[0162] 在一些实施方案中,所述胰岛素增敏剂是噻唑烷二酮,例如曲格列酮。在一些实施方案中,所述胰岛素增敏剂是罗格列酮。

[0163] 在一些实施方案中,所述胰岛素促分泌素是磺酰脲、ATP敏感性K通道拮抗剂或美格列奈。

[0164] 可以在施用所述GCG抑制剂或所述GCGR拮抗剂之前、同时或之后施用所述其他的治疗活性组分。出于本公开的目的,这种给药方案被认为是将GCG抑制剂或GCGR拮抗剂与第二治疗活性组分“组合地”施用。

[0165] 给药方案

[0166] 根据本文所述的某些实施方案,可以在限定的时间段内向受试者施用多剂量的胰高血糖素/GCGR拮抗剂。所述方法包括向受试者依次施用多剂量的胰高血糖素/GCGR拮抗剂。本文使用的“依次施用”是指在不同时间点(例如在以预定间期(例如,数小时,数天,数周或数月)间隔开的不同日)向所述受试者施用每种剂量的拮抗剂。本文所述的方法包括向所述患者依次施用单次初始剂量的所述胰高血糖素/GCGR拮抗剂,然后施用一次或多次第二剂量的所述胰高血糖素/GCGR拮抗剂,并任选地随后施用一次或多次第三剂量的所述胰高血糖素/GCGR拮抗剂。

[0167] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指可用于本文的胰高血糖素/GCGR拮抗剂的给药时间顺序。因此,所述“初始剂量”是在治疗方案开始时所施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在所述初始剂量后施用的剂量;“第三剂量”是在所述第二剂量后施用的剂量。所述初始、第二和第三剂量可以都含有相同量的胰高血糖素/GCGR拮抗剂,但通常可以在施用频率方面彼此不同。然而,在某些实施方案中,所述初始、第二和第三剂量中包含的胰高血糖素/GCGR拮抗剂的量在治疗过程中彼此不同(例如,适当地向上或向下调整)。在某些实施方案中,在治疗开始时给予两个或更多个(例如,2、3、4或5个)剂量作为“负荷剂量”,然后在频率较低的基础上施用后续剂量(例如,“维持剂量”)。

[0168] 药物组合物

[0169] 本文公开的方法考虑使用药物组合物,所述药物组合物包含至少治疗有效量的可用于治疗重度胰岛素抵抗的活性剂(例如,胰高血糖素/GCGR拮抗剂)和药学上可接受的运载体。术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出可用于动物(特别是人)。术语“运载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、

佐剂、赋形剂或媒介物。这种药物运载体可以是无菌液体(例如,水和油),包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,所述组合物还可含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等形式。可以使用传统的粘合剂和运载体(例如,甘油三酯)将所述组合物配制成栓剂。口服制剂可以包括标准的运载体,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物运载体的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。

[0170] 在一个实施方案中,根据常规程序将所述组合物配制成适于静脉内施用于人类的药物组合物。必要时,所述组合物还可包括增溶剂以及局部麻醉剂(例如,利多卡因)来缓解注射部位的疼痛。当通过输注施用所述组合物时,可以用含有无菌药用级水或生理盐水的输液瓶对其进行分配。当通过注射施用所述组合物时,可以提供无菌注射用水或生理盐水的安瓿,以便可以在施用前混合成分。

[0171] 根据本文所述方法有用的活性剂可被配制成中性的或盐的形式。药学上可接受的盐包括与游离氨基形成的盐(例如,衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐),以及与游离羧基形成的盐(例如,衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐)。

[0172] 基于本说明书可以通过标准的临床技术确定能有效治疗重度胰岛素抵抗的活性剂的量。此外,可任选地使用体外测定法来帮助确定最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量还取决于给药途径和病情的严重程度,并且应当根据医师的判断和每个受试者的情况来决定。然而,用于静脉内施用的合适的剂量范围通常为约20微克至2克活性化合物/千克体重。用于鼻内施用的合适的剂量范围通常为约0.01pg/kg体重至1mg/kg体重。可从源自体外或动物模型测试系统的剂量-应答曲线推算出有效剂量。

[0173] 对于全身施用,最初可以从体外测定法估计治疗有效剂量。例如,可以在动物模型中配制剂量以达到包括在细胞培养中测定的 IC_{50} 在内的循环浓度范围。这些信息可用于更准确地确定人体中的有用剂量。还可以使用本领域熟知的技术从体内数据(例如动物模型)估计初始剂量。本领域普通技术人员可以基于动物数据很容易地优化对人的施用。

[0174] 可以单独调整剂量和间隔时间以提供足以维持治疗效果的化合物血浆水平。在局部施用或选择性摄取的情况下,所述化合物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。本领域技术人员应当无需过多的实验就能够优化治疗有效的局部剂量。

[0175] 当然,施用的化合物的量将取决于所治疗的受试者、受试者的体重、病情的严重程度、施用方式和处方医师的判断。当可以检测到症状或者甚至当它们不能被检测到时,可以间歇性地重复治疗。可以单独提供或与其他药物组合提供所述治疗。

[0176] 试剂盒

[0177] 本文还提供了一种制品,所述制品包含包装材料和包含在所述包装材料内的药剂,其中所述药剂包含至少一种根据本文公开的方法有用的GCG/GCGR拮抗剂,并且其中所述包装材料包含标签或包装说明书,所述标签或包装说明书表明所述GCG/GCGR拮抗剂可用于治疗以重度胰岛素抵抗为特征的病症或疾病。

[0178] 虽然已经参考多个实施方案具体示出和描述了本发明,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的条件下,可对本文公开的各种实施方案的形式和细节进行改变,并且本文公开的各种实施方案并不旨在限制权利要求的范围。

实施例

[0179] 提供以下实施例,使得本领域普通技术人员知道如何实施本文公开的方法的完整公开内容和描述。已经努力确保了有关所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份量是指按重量计(parts are by weight),分子量是平均分子量,温度为摄氏度,压力为大气压或接近大气压。

[0180] 实施例1:对GCGR拮抗剂在极端胰岛素抵抗小鼠模型中预防高血糖症的评估

[0181] 通过渗透性微型泵在小鼠中施用S961(一种胰岛素受体拮抗剂)能导致重度胰岛素抵抗和高血糖(Gusarova V et al., (2014) Cell, 159:691-696; Yi P et al., (2013) Cell, 153:747-758; Schaffer L., (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun., 376:380-383)。该重度胰岛素抵抗模型用于确定抗GCGR抗体在预防高血糖中的效果,以及对由重度胰岛素抵抗引起的血糖水平和血浆 β -羟基丁酸水平(酮血症的量度)的效果。

[0182] 材料:

[0183] • hIgG4同种型对照

[0184] • H4H1327P, 抗hGCGR hIgG4

[0185] • S961, 胰岛素受体拮抗剂(由Celtek Peptides通过使用公开的序列定制合成(Schaffer L., (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun., 376:380-383))

[0186] 动物和注射剂:

[0187] 将二十九只小鼠分成四组,每组六至八只小鼠。第一组在第0、6和14天皮下注射10mg/kg的hIgG4同种型对照,并且从第7天开始通过渗透性微型泵(Alzet 2002)皮下输注PBS。第二组在第0、6和14天皮下注射10mg/kg的H4H1327P,并且从第7天开始通过渗透性微型泵(Alzet 2002)皮下输注PBS。第三组在第0、6和14天皮下注射10mg/kg的hIgG4同种型对照,并且从第7天开始通过渗透性微型泵(Alzet 2002)皮下输注S961(20nmol/周)。第四组在第0、6和14天皮下注射10mg/kg的H4H1327P,并且从第7天开始通过渗透性微型泵(Alzet 2002)皮下输注S961(20nmol/周)。在第0、3、6、10、14、17和21天对小鼠采血进行血糖测量。计算每组在每个时间点的血糖水平的平均值 \pm SEM并显示在表3中。在基线和第6、14和21天收集血浆以确定胰岛素和 β -羟基丁酸的水平。计算每组在每个时间点的血浆 β -羟基丁酸水平和胰岛素水平的平均值 \pm SEM并显示在表4和5中。

[0188] 表3:血糖水平

[0189]	血糖 (mg/dL)	时间 (天数)	同种型对照 + PBS	H4H1327P + PBS	同种型对照+ S961	H4H1327P + S961
		0	196 \pm 6	191 \pm 4	186 \pm 5	196 \pm 3
		3	195 \pm 7	119 \pm 3	191 \pm 6	124 \pm 6
		6	194 \pm 9	126 \pm 4	192 \pm 5	129 \pm 12
		10	186 \pm 4	135 \pm 2	437 \pm 40	185 \pm 7

[0190]	14	197 ± 5	128 ± 4	508 ± 53	272 ± 53
	17	211 ± 6	144 ± 3	467 ± 41	219 ± 22
	21	206 ± 5	141 ± 5	499 ± 18	209 ± 6

[0191] 表4:血浆 β -羟基丁酸水平

[0192]		时间 （ 天数）	同种型对照+ PBS	H4H1327P + PBS	同种型对照+ S961	H4H1327P + S961
	β-羟基 丁酸 (mg/dL)	0	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.02
		6	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01
		14	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.26 ± 0.03
		21	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.25 ± 0.03

[0193] 表5:血浆胰岛素水平

[0194]		时间 （ 天数）	同种型对照+ PBS	H4H1327P + PBS	同种型对照+ S961	H4H1327P + S961
	胰岛素 （ ng/mL）	0	0.80 ± 0.14	1.90 ± 0.69	1.15 ± 0.68	1.62 ± 0.67
		6	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.06	0.21 ± 0.10	0.24 ± 0.04
		14	0.37 ± 0.09	0.36 ± 0.05	22.83 ± 4.32	18.51 ± 2.30
		21	0.40 ± 0.13	0.46 ± 0.15	23.97 ± 4.36	25.11 ± 5.15

[0195] 结果

[0196] 用Prism软件 (版本6) 进行统计学分析。为了评估与对照组 (组1) 相比的显著性, 使用了带有Bonferroni多重比较检验的双边ANOVA。a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$, c: $p < 0.001$, d: $p < 0.0001$ 。

[0197] 在施用H4H1327P后 (在第3天和第21天之间), 与施用了同种型对照并输注了PBS的动物 (组1) 相比, 经H4H1327P处理并输注了PBS的动物 (组2) 显示出了血糖的降低, 证实了H4H1327P具有降低葡萄糖的功效。在输注S961后 (在第10天和第21天之间), 与施用了同种型对照并输注了PBS的动物 (组1) 相比, 施用了同种型对照并输注了S961的动物 (组3) 显示出了血糖的升高, 证实了S961的高血糖效应。在输注S961后第10天和第21天之间, 经H4H1327P处理并输注了S961的动物 (组4) 中的血糖水平与组1小鼠的血糖水平相当。参见图1A。

[0198] 在第14天和第21天, 与施用了同种型对照并输注了PBS的动物 (组1) 相比, 施用了同种型对照并输注了S961的动物 (组3) 中血浆胰岛素水平有所升高, 证实了S961在研究期间抑制胰岛素受体的作用。与施用了同种型对照并输注了S961的动物 (组3) 相比, 经H4H1327P处理并输注了S961的动物 (组4) 中胰岛素水平同样有所上升。参见图1B。

[0199] 与之前的研究 (Okamoto et al., (2015) Endocrinology, 156(8):2781-2794) 一致的是, H4H1327P表现出了升高的血浆胰高血糖素水平, 这种效应与S961的施用无关 (参见图1C)。

[0200] 在第14天和第21天, 与施用了同种型对照并输注了PBS的动物 (组1) 相比, 在施用了同种型对照并输注了S961的动物 (组3) 中血浆 β -羟基丁酸的水平有所升高, 而血浆 β -羟基丁酸的水平在经H4H1327P处理并输注了S961的动物 (组4) 中没有变化。参见图1D。此外,

在治疗组之间没有观察到体重的差异 (参见图1E)。

[0201] 这些数据表明,即使存在严重的高胰岛素血症,H4H1327P也能阻止胰岛素受体拮抗剂诱导的高血糖和酮血症并降低血糖。

[0202] 实施例2:对GCGR拮抗剂在极端胰岛素抵抗小鼠模型中逆转高血糖的评估

[0203] 使用与实施例1提到的相同动物模型和相同材料测定抗GCGR抗体逆转由重度胰岛素抵抗诱导建立的高血糖的效果,差别在于在注射抗GCGR抗体之前4天施用胰岛素受体拮抗剂。还测定了对血糖和血浆 β -羟基丁酸水平的效果。

[0204] 动物和注射剂:

[0205] 将32只小鼠分成四组,每组八只小鼠。第一组从第0天开始通过渗透性微型泵(Alzet2002)皮下输注PBS并且在第4、11和18天皮下注射10mg/kg的hIgG4同种型对照。第二组从第0天开始皮下输注PBS并且在第4、11和18天皮下注射10mg/kg的H4H1327P。第三组从第0天开始皮下输注S961 (20nmol/周)并且在第4、11和18天皮下注射10mg/kg的hIgG4同种型对照。第四组从第0天开始皮下输注S961 (20nmol/周)并且在第4、11和18天皮下注射10mg/kg的H4H1327P。在第0、4、7、11、14、18和21天对小鼠采血进行血糖测量。计算每组在每个时间点的血糖水平的平均值 \pm SEM并显示在表6中。在基线和第4、11和12天收集血浆以确定胰岛素和 β -羟基丁酸的水平。计算每组在每个时间点的血浆 β -羟基丁酸水平和胰岛素水平的平均值 \pm SEM并显示在表7和8中。

[0206] 表6:血糖水平 (mg/dL)

时间 (天数)	PBS + 同种型对照	PBS + H4H1327P	S961 + 同种型对照	S961 + H4H1327P
0	186 \pm 4	189 \pm 4	192 \pm 4	183 \pm 4
4	196 \pm 3	197 \pm 3	491 \pm 29	490 \pm 21
7	216 \pm 5	142 \pm 6	523 \pm 34	203 \pm 6
11	206 \pm 6	137 \pm 4	533 \pm 14	201 \pm 6
14	210 \pm 7	145 \pm 5	595 \pm 6	211 \pm 9
18	202 \pm 7	140 \pm 4	550 \pm 16	203 \pm 5
21	168 \pm 6	123 \pm 4	526 \pm 12	172 \pm 5

[0208] 表7:血浆 β -羟基丁酸水平 (mmol/L)

时间 (天数)	PBS + 同种型对照	PBS + H4H1327P	S961 + 同种型对照	S961 + H4H1327P
0	0.20 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02
4	0.27 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.41 \pm 0.02	0.37 \pm 0.04
11	0.26 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01	0.39 \pm 0.03	0.26 \pm 0.02
21	0.26 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.45 \pm 0.06	0.26 \pm 0.02

[0210] 表8:血浆胰岛素水平 (ng/mL)

	时间 (天数)	PBS + 同种型对照	PBS + H4H1327P	S961 + 同种型对照	S961 + H4H1327P
[0211]	0	1.05 ± 0.31	0.77 ± 0.25	0.52 ± 0.08	0.42 ± 0.09
	4	0.62 ± 0.32	0.50 ± 0.11	19.23 ± 3.18	21.68 ± 2.02
	11	0.39 ± 0.09	0.35 ± 0.05	25.97 ± 3.48	64.25 ± 18.17
	21	1.67 ± 0.47	0.37 ± 0.04	51.43 ± 15.03	64.78 ± 14.91

[0212] 结果:

[0213] 用Prism软件 (版本6) 进行统计学分析。为了评估与对照组 (组1) 相比的显著性, 使用了带有Bonferroni多重比较检验的双边ANOVA。a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$, c: $p < 0.001$, d: $p < 0.0001$ 。

[0214] 在输注S961之后 (在第4天和第21天之间), 与输注了PBS并施用了同种型对照的动物 (组1) 相比, 输注了PBS并施用了同种型对照的动物 (组3) 显示出了血糖的升高, 证实了S961的高血糖效应。在施用了H4H1327P之后, 输注了S961并经H4H1327P处理的动物 (组4) 显示了与输注了PBS并施用了同种型对照的动物 (组1) 几乎等同的血糖水平。在施用了H4H1327P之后 (在第4天和第21天之间), 与施用了同种型对照并输注了PBS的动物 (组1) 相比, 输注了PBS并经H4H1327P处理的动物 (组2) 维持了降低的血糖水平, 证实了H4H1327P具有降低葡萄糖的功效。参见图2A。

[0215] 在第14、11和21天, 与输注了PBS并施用了同种型对照的动物 (组1) 相比, 输注了S961并施用了同种型对照的动物 (组3) 中血浆胰岛素水平有所升高, 证实了S961在研究期间抑制胰岛素受体的作用。参见图2B。高胰岛素血症 (表8和图2B) 和高葡萄糖血症 (参见图2C) 在接受了两种受体拮抗剂的小鼠中更明显。

[0216] 在第11和21天, 与输注了PBS并施用了同种型对照的动物 (组1) 相比, 输注了S961并施用了同种型对照的动物 (组3) 中血浆 β -羟基丁酸的水平有所升高, 而在输注了S961并经H4H1327P处理的动物 (组4) 中, 血浆 β -羟基丁酸的水平在这些相同的时间点处相对于组1的动物没有变化。参见图2D。

[0217] 与之前的发现 (Okamoto et al., 2015) 一致的是, H4H1327P与S961一样提升了循环氨基酸的水平, 但程度低于抗体 (参见图2E)。对胰岛素和胰高血糖素受体的抑制引起了血浆氨基酸水平的累积增加 (参见图2E)。没有观察到体重的变化 (参见图2F)。

[0218] 这些数据表明, 即使存在重度高胰岛素血症, H4H1327P也能逆转胰岛素受体拮抗剂诱导的高血糖症和酮血症并降低血糖。

[0219] 实施例3: 对GCGR拮抗剂逆转胰岛素受体拮抗剂诱导的肝脏Pepck表达的评估

[0220] 在存在蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物 (Thermo-Fisher)、1mM DTT和2mM Na_3VO_4 的条件下, 将从实施例1的四组中每一组处理的小鼠中获得的肝脏样品用冰冷的RIPA缓冲液 (50mM Tris、150mM NaCl、1mM EDTA、50mM NaF、10mM β -甘油磷酸盐、5mM焦磷酸钠二钠和1% NP-40) 裂解。将总的样品裂解物与6x SDS上样缓冲液 (Alfa-Aesar) 混合并煮沸5分钟。将蛋白样品 (10-100 μg) 上样, 并在4-20%的梯度SDS-PAGE凝胶 (Bio-Rad) 上分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。用5%牛血清白蛋白的1x TBS (补充有0.1% Tween20) (Bio-Rad) 将膜封闭1h, 并将所述膜与抗磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 的抗体 (1:250; Abcam) 一起孵育。使用辣根过氧化物酶缀合的抗兔或抗小鼠二抗 (1:10,000; Jackson ImmunoResearch) 和增强的

化学发光试剂(Thermo-Fisher)检测结合的抗体。用Image J软件量化条带强度。

[0221] 蛋白质印迹分析显示,经H4H1327P处理的小鼠的肝脏中,限速性糖异生酶磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(Pepck)的水平降低了70%(参见图3A和B)。相反,在输注了S961的小鼠的肝脏中,Pepck的水平升高了2.3倍,H4H1327P将该效应逆转至比基线低30%。因此,如先前所证实的(Lynedjian et al., (1995); Rucktäschel et al., (2000); Chakravarty et al., (2005)),胰高血糖素和胰岛素信号传导的相对水平能调节Pepck的表达。这些数据表明,用H4H1327P阻断GCGR可以通过抑制肝葡萄糖的输出来预防小鼠中重度胰岛素抵抗诱导的高血糖。

[0222] 实施例4:评估GCGR和胰岛素受体在 α 和 β 细胞量中的拮抗作用

[0223] 将从实施例2的四组中每一组处理的小鼠中获得的胰腺在10%中性缓冲福尔马林溶液中固定48h,包埋在石蜡中,并切片到载玻片上。根据制造商的说明(Advanced Cell Diagnostics),将胰腺组织和细胞透化并与针对小鼠Gcg和Ins2的mRNA探针组合杂交。使用显色试剂盒扩增mRNA信号(Advanced Cell Diagnostics)。使用Halo数字成像分析软件(Indica Labs)测量胰高血糖素和胰岛素阳性细胞的面积。计算胰高血糖素和胰岛素阳性区域与整个胰腺面积成比的百分比。通过将每只动物的 α 和 β 细胞面积与其相应的胰腺重量相乘来计算 α 和 β 细胞量。通过使用Halo数字成像分析软件计数切片上胰岛素阳性胰岛的数量,并对所述切片的整个胰腺区域进行标准化来测量胰岛数。

[0224] H4H1327P使胰腺重量提升了19%,在H4H1327P和S961都存在的条件下该效应更大(33%)(参见图4A)。用使用针对Gcg和Ins2的探针的RNA原位杂交(RNA ISH)进行胰腺切片的形态测定分析。H4H1327P使 α 细胞量提升了5.7倍(参见图4B),并且S961的施用使 β 细胞量提升了3倍(参见图4C)。单独的H4H1327P不影响 β 细胞量,但出乎意料地,与单独的S961相比,当同时存在S961和H4H1327P时, β 细胞量增倍,并且比对照小鼠增加了5.8倍(参见图4C)。值得注意的是,在正常血糖水平的情况下, β 细胞量进一步扩大(表3)。S961处理使得 α -细胞量略微增加(1.6倍),并且在同时存在H4H1327P时 α -细胞量也略微增加(是单独H4H1327P的1.4倍)(参见图4B)。S961使胰岛数/胰腺总面积提升了49%,而S961和H4H1327P的组合处理使胰岛数/面积提升了82%(参见图4D)。总之,当胰高血糖素和胰岛素信号被抑制时,产生了 α 和 β 细胞量的代偿性增加。新的发现是,当胰高血糖素信号被阻断时,胰岛素抵抗小鼠中的 β 细胞量发生倍增,并且这种效应发生于正常的血糖水平。

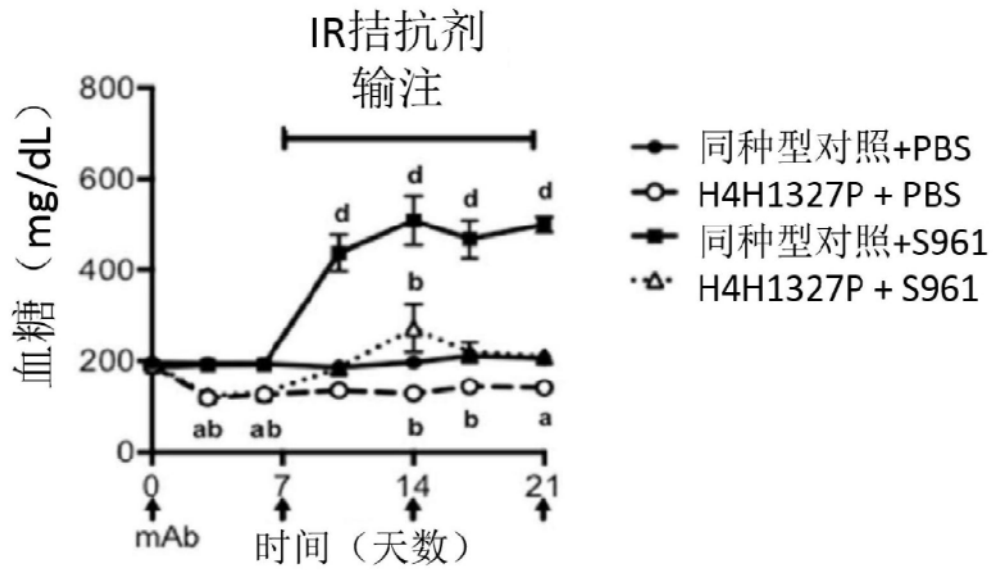


图1A

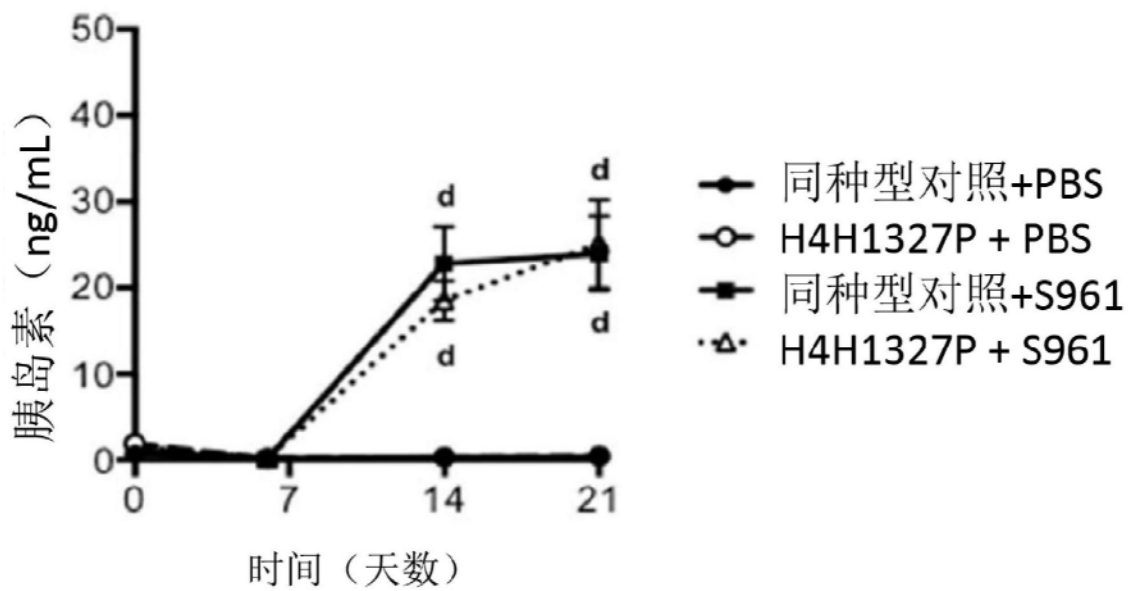


图1B

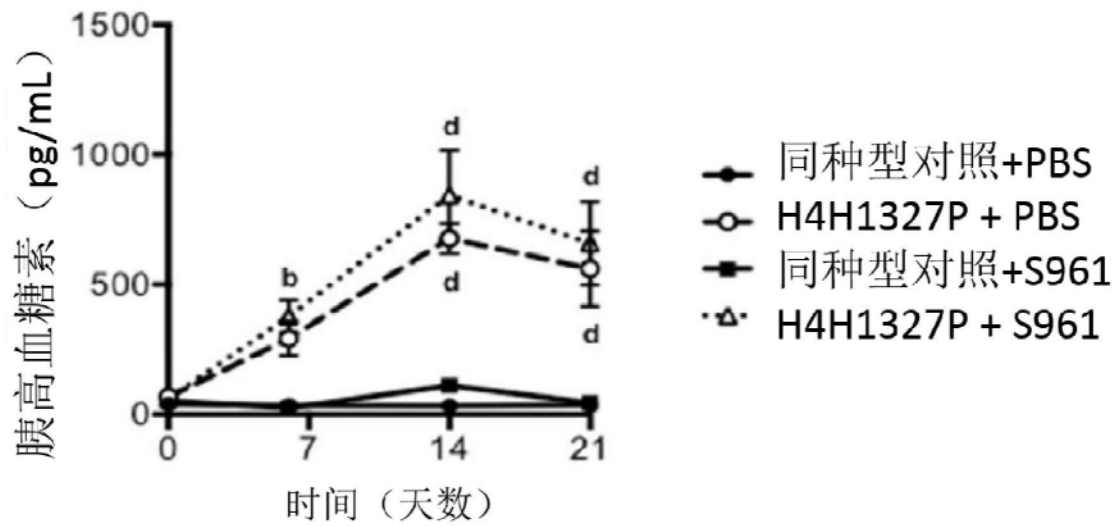


图1C

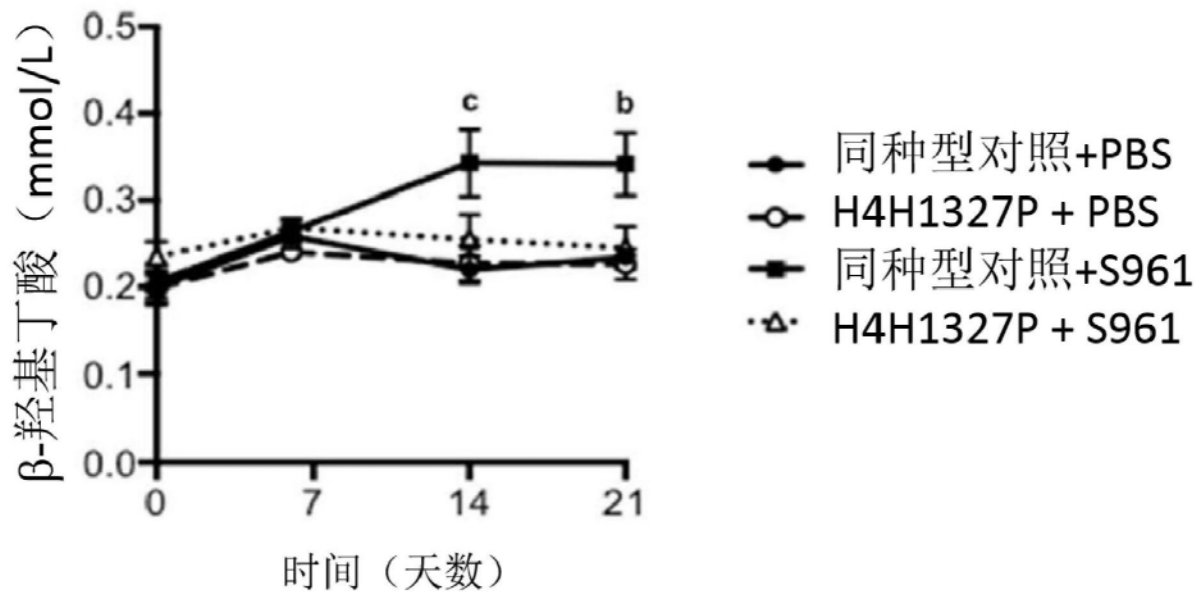


图1D

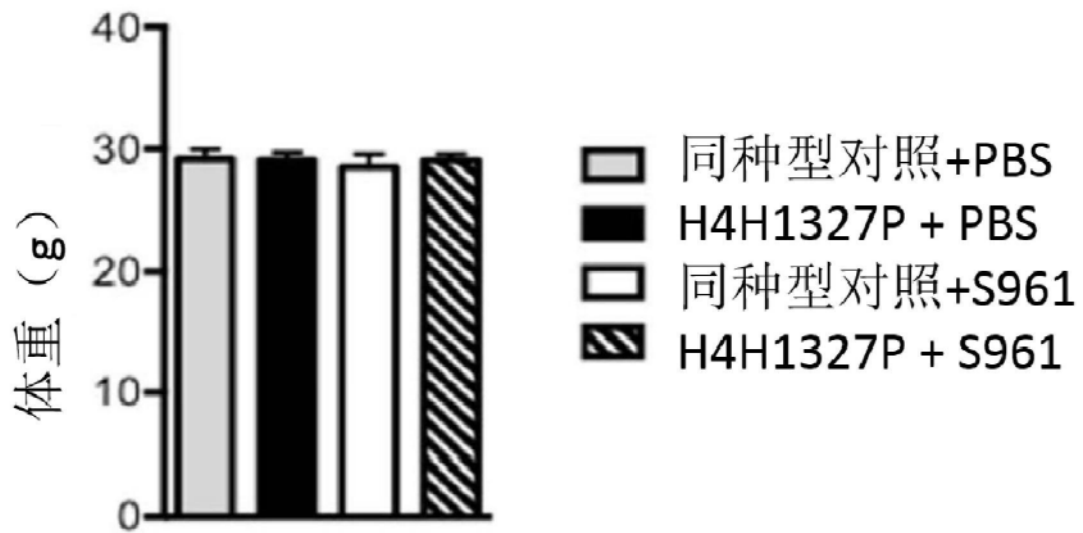


图1E

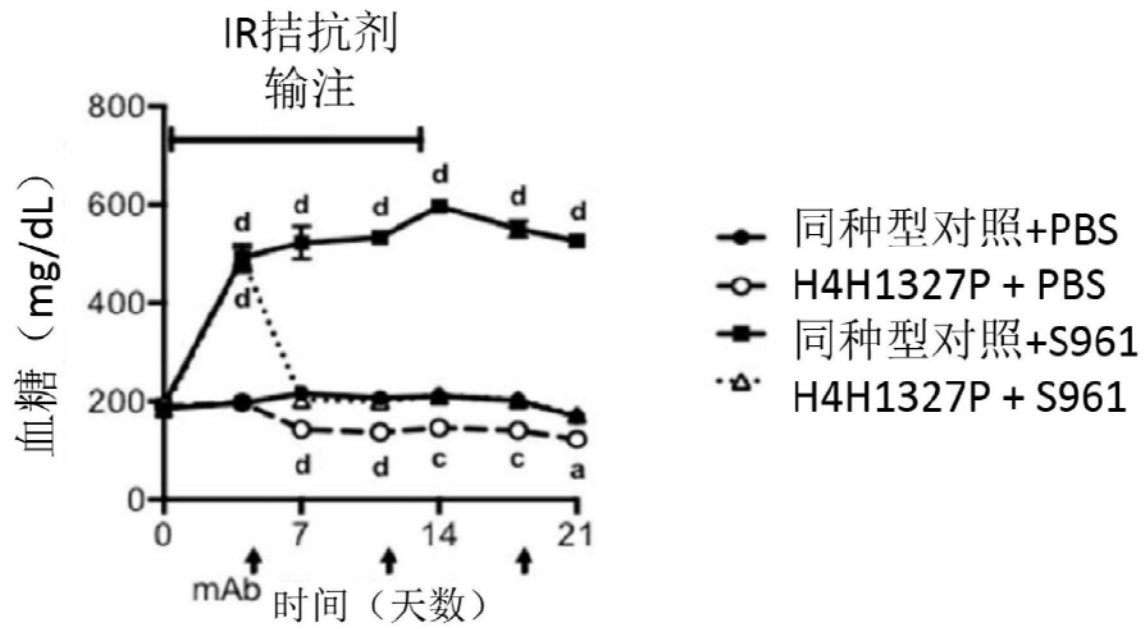


图2A

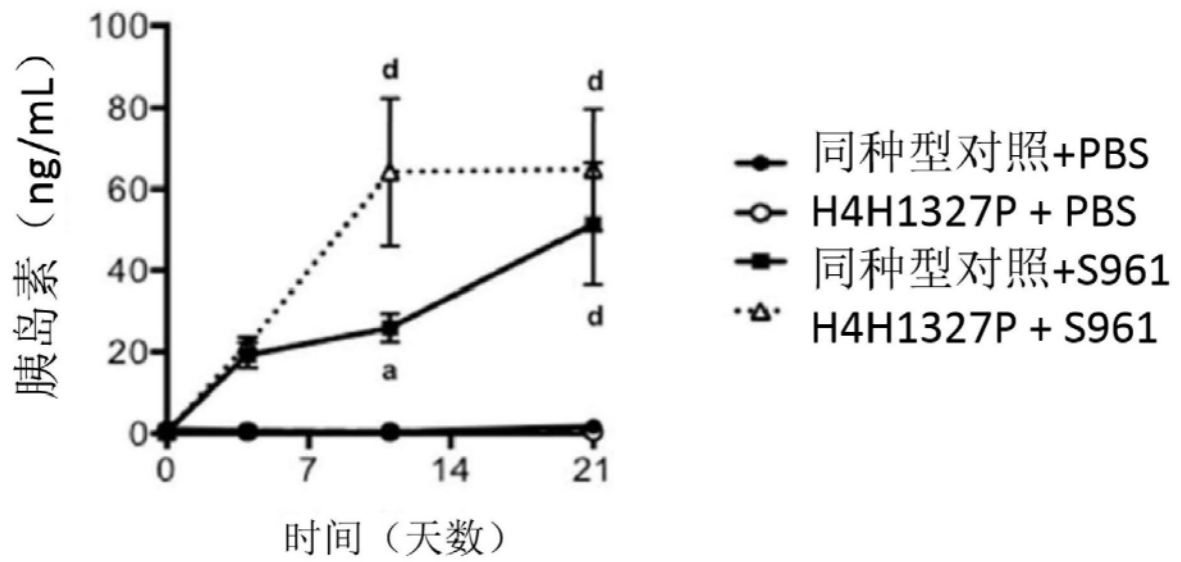


图2B

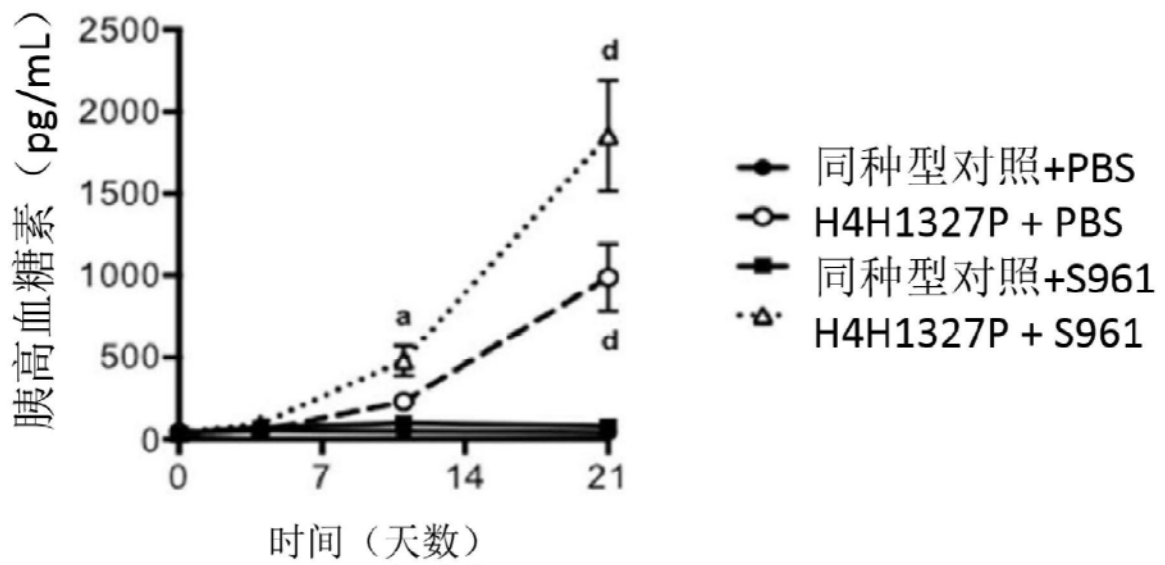


图2C

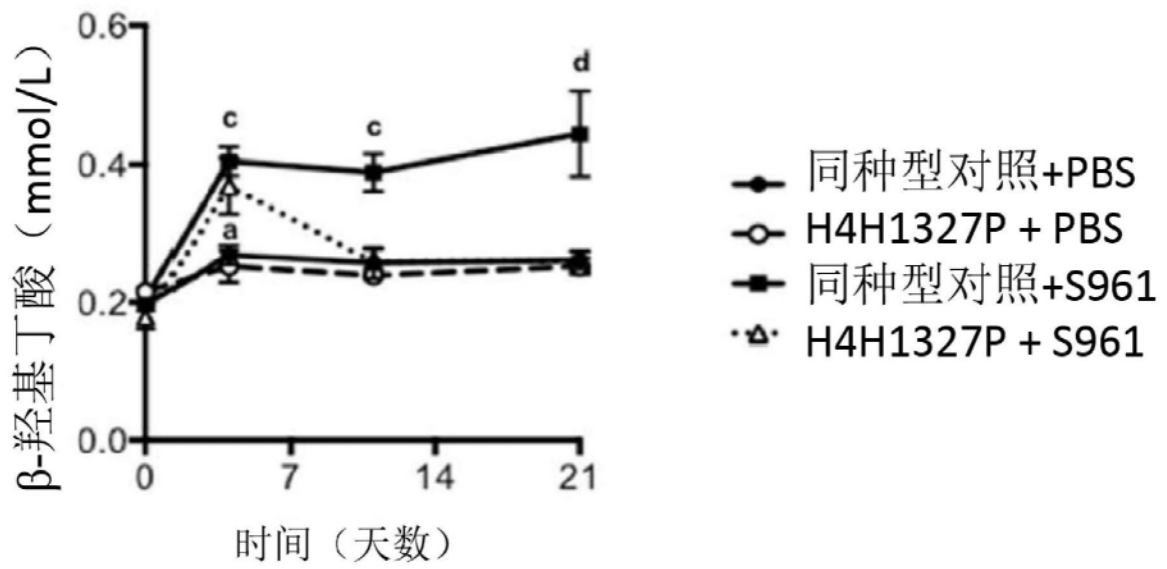


图2D

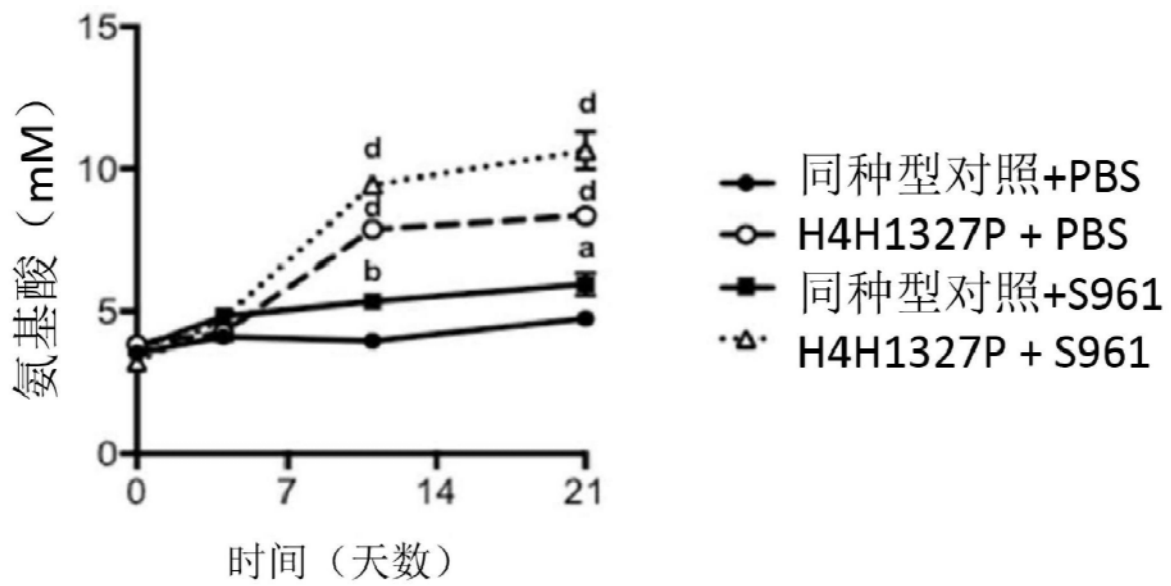


图2E

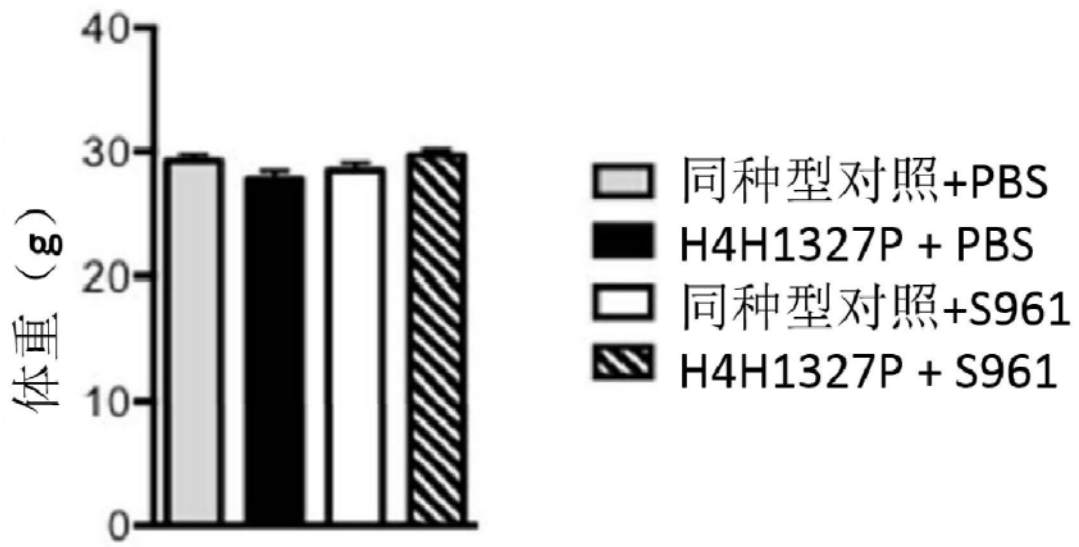


图2F

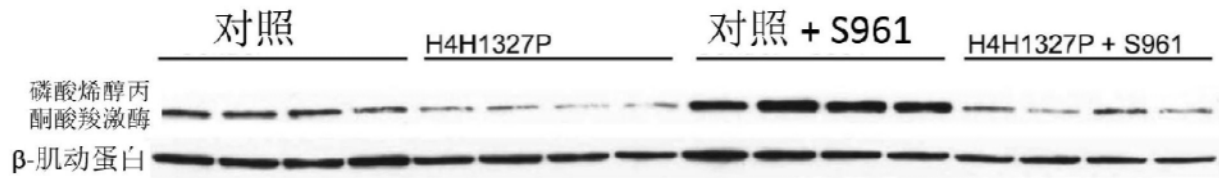


图3A

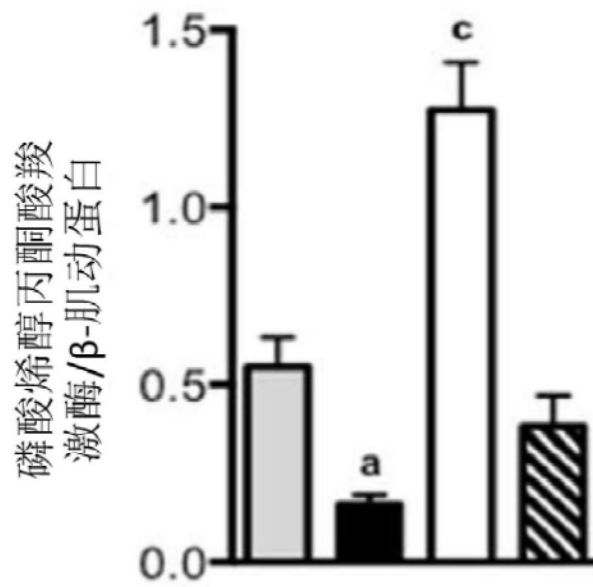


图3B

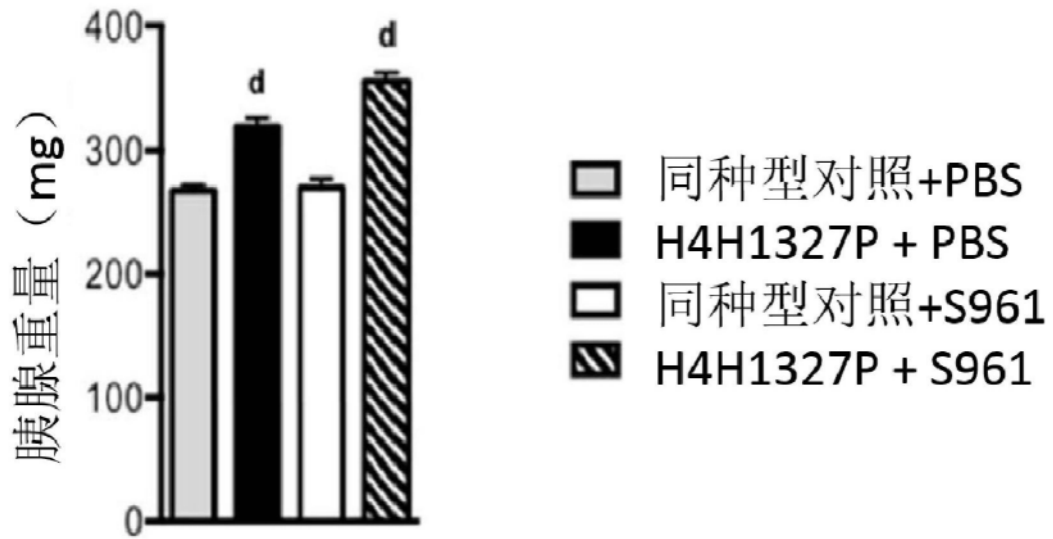


图4A

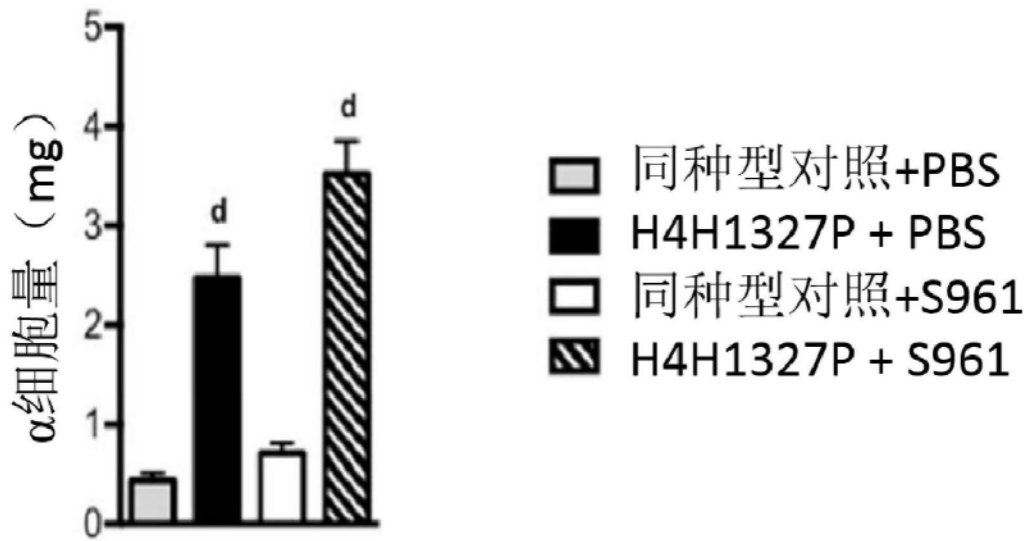


图4B

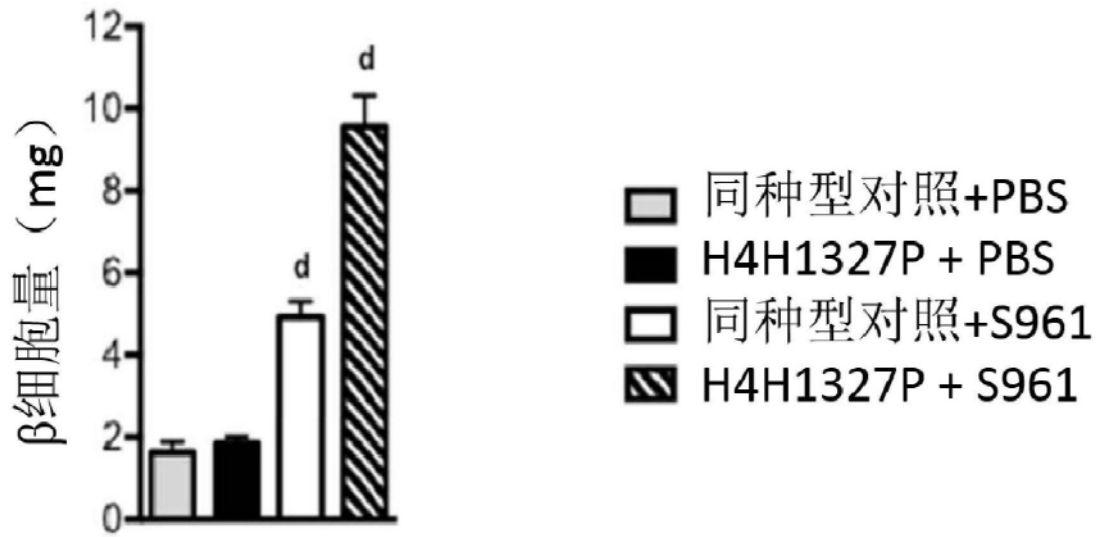


图4C

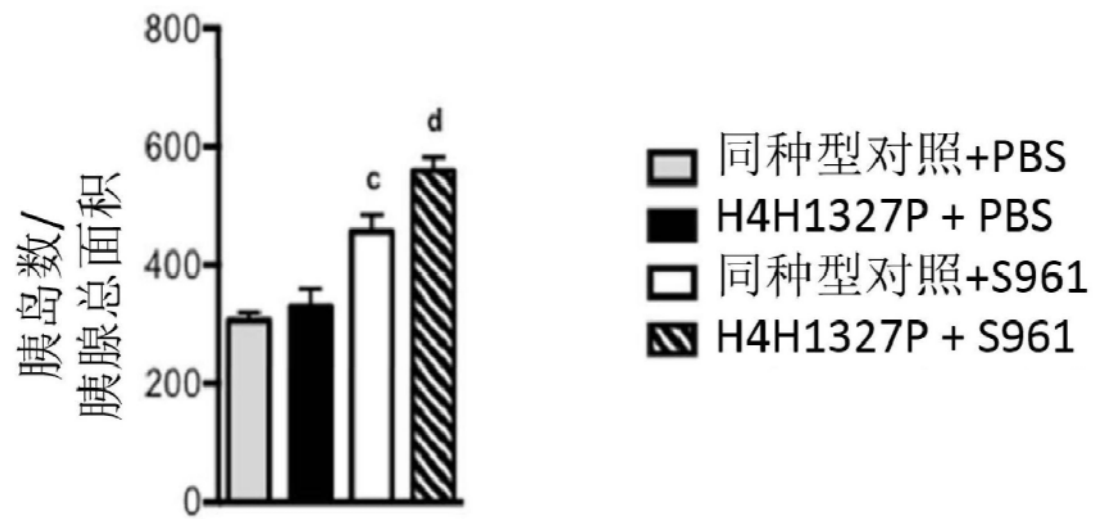


图4D