



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102659938 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201210124331. 7

(22) 申请日 2006. 05. 04

(30) 优先权数据

60/678, 066 2005. 05. 04 US

(62) 分案原申请数据

200680015213. 5 2006. 05. 04

(73) 专利权人 西兰制药公司

地址 丹麦格洛斯楚普

(72) 发明人 比亚内·杜·拉森

伊薇特·米亚塔·彼得森

基尔斯滕·埃贝霍伊

(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 顾晋伟 田旻

(51) Int. Cl.

C07K 14/605(2006. 01)

C12N 15/16(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

A61K 38/26(2006. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

A61P 1/12(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

A61P 1/14(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

A61P 43/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 7049284 B2, 2006. 05. 23,

审查员 徐莉

权利要求书2页 说明书52页 附图13页

(54) 发明名称

胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 类似物

(57) 摘要

本文公开了 GLP-2 类似物, 与 [hGly2]GLP-2 相比, 所述 GLP-2 类似物包含一个或多个替换并且提高了体内生物活性和 / 或提高了化学稳定性, 例如通过体外稳定性测定评估的化学稳定性。更具体地, 本文公开的优选 GLP-2 类似物包含野生型 GLP-2 序列 8、16、24 和 / 或 28 位中一个或多个位置上的替换和 / 或 31 至 33 位氨基酸中一个或多个缺失和 / 或 N 端或 C 端稳定肽序列的添加, 其中所述替换任选地与 2 位 (如说明书中所述) 和 3、5、7、10 以及 11 位中的一个或多个位置上的其他替换组合。所述类似物尤其可用于预防或治疗胃和肠相关病症以及用于减轻化学疗法的副作用。

1. 以下通式代表的 GLP-2 类似物或者其可药用盐：

R^1 -His-Gly-Glu-Gly-X5-Phe-Ser-X8-Glu-Leu-X11-Thr-Ile-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Z²-R²

其中：

R¹为氢、C₁₋₄烷基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基

X5 为 Ser 或 Thr

X8 为 Asp 或 Ser

X11 为 Ala、Lys 或 Ser

R²为 NH₂或 OH；并且

Z²不存在或为 Lys₆，

其中所述 GLP-2 类似物在体内具有引起小肠质量增加的生物活性。

2. 权利要求 1 的 GLP-2 类似物，其中所述 GLP-2 类似物包含一种或更多种下述残基：

Thr5, Ser11

Thr5, Lys11

Thr5, Ser8, Lys11

Thr5, Ser8, Ser11

Ser8, Ser11

Thr5, Ala11

Thr5, Ser8, Ala11

Ser8, Ala11

Ser8, Lys11。

3. 前述权利要求任一项的 GLP-2 类似物，用于治疗。

4. 药物组合物，其包含与载体混合的前述权利要求中任一项的 GLP-2 类似物或者其盐。

5. 权利要求 4 的药物组合物，其中所述 GLP-2 类似物为可药用酸加成盐。

6. 权利要求 4 或权利要求 5 的药物组合物，其被配制或适于注射或输注的液体，或被配制成使所述 GLP-2 类似物缓慢释放。

7. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗 / 或预防胃和肠相关病症，其中所述胃和肠相关病症为溃疡、吸收不良综合征、盲管综合征、炎性肠病、腹型斯泼卢腹泻、热带型斯泼卢腹泻、低丙种球蛋白血症型斯泼卢腹泻、小肠损伤、短肠综合征 (short bowel syndrome)、胃炎或腹泻相关的肠易激综合征。

8. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备用于治疗 / 或预防肠炎的药物中的用途。

9. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备用于治疗 / 或预防局限性肠炎（克罗恩病）或溃疡性结肠炎的药物中的用途。

10. 权利要求 7 的用途，其中所述腹型斯泼卢腹泻由麸质诱发的肠病或乳糜泻病引起。

11. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备用于治疗 / 或预防放射性肠炎、传染性肠炎或感染后肠炎，或者由于毒剂或者其它化学治疗剂引起的小肠损伤的药物中的用途。

12. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 和 / 或预防化学疗法或放射治疗的副作用,其中所述副作用是由于化学疗法引起的腹泻、 腹部痛性痉挛或呕吐,或者由化学疗法或放射疗法治疗引起的肠上皮结构和功能损伤。

13. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 新生儿肠功能受损。

14. 权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 和 / 或预防与营养不良相关的病症。

15. 权利要求 14 的用途,其中所述与营养不良相关的病症为恶病质或厌食症。

16. 核酸分子,其包含编码权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物的核酸序列。

17. 表达载体,其包含与指导其表达的控制序列组合的权利要求 16 所述核酸序列。

18. 用权利要求 17 所述表达载体转化的宿主细胞。

19. 生产权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物的方法,所述方法包括在适于表达 GLP-2 类似物的条件下培养权利要求 18 的宿主细胞以及纯化这样生产的 GLP-2 类似物。

20. 治疗药盒,其包含癌症化学疗法药物以及根据权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类 似物,其中每一种均任选地与可药用载体组合。

21. 药物组合物,其包含与可药用载体组合的癌症化学疗法药物以及根据权利要求 1 或权利要求 2 的 GLP-2 类似物。

胰高血糖素样肽 -2 (GLP-2) 类似物

[0001] 本申请是 2006 年 5 月 4 日提交的申请号为 200680015213.5 (PCT/GB2006/001633) 之申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及胰高血糖素样肽 -2 (GLP-2) 类似物及其医药用途, 例如在预防或治疗胃和肠相关病症以及减轻化学疗法和放射疗法的副作用中的用途。

背景技术

[0003] GLP-2 是胰高血糖素原在肠的肠内分泌 L 细胞以及脑干特定区域中翻译后加工所释放的 33 个氨基酸的肽。它与胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1)、胃酸调节素和肠高血糖素 (glicentin) 一起应答于养分摄食而共分泌。

[0004] GLP-2 通过刺激隐窝中干细胞增殖和抑制绒毛凋亡来诱导小肠粘膜上皮的显著生长 (Drucker 等 Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93 :7911-6)。GLP-2 还抑制胃排空和胃酸分泌 (Wojdemann 等 J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84 :2513-7)、增强肠屏障功能 (Benjamin 等 Gut. 2000, 47 :112-9)、通过上调葡萄糖转运蛋白来刺激肠的己糖转运 (Cheeseman, Am J Physiol. 1997, R1965-71) 以及提高肠的血流量 (Guan 等 Gastroenterology. 2003, 125, 136-47)。

[0005] GLP-2 与属于 II 类胰高血糖素分泌家族 (1) 的单 G 蛋白偶联受体结合。GLP-2 受体仅局限于小肠、结肠和胃中, 这些部位是已知应答于 GLP-2 的部位 (Yusta 等 Gastroenterology. 2000, 119 :744-55)。然而, 胃肠道中 GLP-2 受体刺激的靶细胞仍不清楚, 并且对与 GLP-2 偶联的下游胞内中介体的了解甚少。

[0006] GLP-2 在小肠中已被证实的特异性并有益的效果已经引起了人们在治疗肠疾病或损伤中使用 GLP-2 的极大兴趣 (Sinclair 和 Drucker, Physiology 2005 :357-65)。而且, 已显示 GLP-2 在多种临床前肠损伤模型中预防或降低粘膜上皮损伤, 所述模型包括化学疗法诱导的粘膜炎、缺血 - 再灌注损伤、硫酸葡聚糖诱导的结肠炎以及炎性肠病的遗传模型 (Sinclair and Drucker Physiology 2005 :357-65)。

[0007] GLP-2 以具有以下序列的 33 个氨基酸的肽的形式分泌 :H-His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-OH。其迅速地被酶 DPP IV 在 NH₂ 端的 2 位丙氨酸 (A) 处切割, 以形成失活的人 GLP-2 (3-33)。除了肾清除之外, GLP-2 (1-33) 的这种快速酶降解导致该肽的半衰期为约 7 分钟 (Tavares 等, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 278 : E134-E139, 2000)。

[0008] US 5, 994, 500 (Drucker 等) 描述了 GLP-2 拮抗剂及其对胃肠组织生长的影响。其提出了将所述拮抗剂配制成药物用于治疗增生或诱导发育不全。美国 5, 994, 500 通过突变例如替换和缺失来改变哺乳动物 GLP-2 的结构。

[0009] US 6, 184, 208、US 5, 789, 379 和 US 6, 184, 201 公开了 GLP-2 类似物及其医药用

途。所述类似物全是通过人 GLP-2 的替换和 / 或缺失得到的。

[0010] DaCambra 等 (Biochemistry 2000,39,8888-8894) 描述了 GLP-2 活性的结构决定簇。这样的决定簇的实例是 Phe6 和 Thr5, 所述 Phe6 和 Thr5 称为对 GLP-2 受体结合和活化是至关重要的。

[0011] W097/39031 公开了 GLP-2 类似物 [Gly2]GLP-2。其中 2 位的丙氨酸被甘氨酸取代, 以使所述肽抵抗 DPP IV 切割。显示丙氨酸的取代提高所述肽的稳定性和效能 (potency)。该专利申请描述了如何使用 GLP-2 类似物对抗肠上皮粘膜炎症和破坏相关的疾病。它们包括大规模小肠切除、炎性肠病、化学疗法诱发的粘膜炎症以及缺血性损伤。

[0012] W002/066511 描述了体内半衰期延长的 GLP-2 类似物及其作为治疗胃肠病症如炎性肠疾病的药物的用途。

[0013] WO 01/41779 描述了 h[Gly2]GLP-2 用作抑制化学疗法诱导的凋亡和促进细胞存活的预处理的用途。

[0014] 本文引用的所有参考文献明确地以其整体通过参考并入本文。

[0015] 许多科学家已经提出使用 GLP-2 或 GLP-2 类似物治疗多种疾病。然而, 仍然存在对改善的、稳定的 GLP-2 类似物的需要。

发明内容

[0016] 宽泛而言, 本发明涉及 GLP-2 类似物, 其与野生型 GLP-2 相比包含一种或多种替换, 并且可能具有体内生物活性改善和 / 或化学稳定性 (例如体外稳定性测定中评估的稳定性) 改善的特点。更具体地, 本发明优选的 GLP-2 类似物包含野生型 GLP-2 序列 8 位、16 位、24 位和 / 或 28 位中一个或多个位置上的替换, 其任选地与 2 位 (如引言所述) 以及 3、5、7、10 和 11 位中一个或多个位置的其他替换和 / 或野生型 GLP-2 序列 31 至 33 位中一个或多个氨基酸的缺失和 / 或 N- 端或 C- 端稳定肽序列的添加组合。除了提供可能具有改善的化学稳定性和 / 或生物活性的 GLP-2 类似物之外, 本发明还涉及提供这样的化合物: 其在小肠中比在结肠中具有优选的肠生长促进活性, 反之亦然, 尤其是通过包含野生型 GLP-2Asp3 和 / 或 Ser8 和 / 或 Asn16 和 / 或 Asn24 和 / 或 Gln28 位中一个或多个位置上的修饰而产生的化合物。

[0017] 因此, 在一个方面中, 本发明提供通式 I 代表的 GLP-2 类似物或其可药用盐或衍生物:

[0018] $R^1-Z^1-His-X2-X3-Gly-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-Ala-X19-X20-$

[0019] $X21-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33-Z^2-R^2$

[0020] 其中:

[0021] R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基 (例如甲基)、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基

[0022] X2 为 Gly、Ala 或 Sar

[0023] X3 为 Glu 或 Asp

[0024] X5 为 Ser 或 Thr

[0025] X6 为 Phe 或 Pro

[0026] X7 为 Ser 或 Thr

- [0027] X8 为 Asp 或 Ser
- [0028] X9 为 Glu 或 Asp
- [0029] X10 为 Met、Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸
- [0030] X11 为 Asn、Ala、Lys 或 Ser
- [0031] X12 为 Thr 或 Lys
- [0032] X13 为 Ile、Glu 或 Gln
- [0033] X14 为 Leu、Met 或 Nle
- [0034] X15 为 Asp 或 Glu
- [0035] X16 为 Asn 或 Ala
- [0036] X17 为 Leu 或 Glu
- [0037] X18 为 Ala 或 Aib
- [0038] X19 为 Ala 或 Thr
- [0039] X20 为 Arg 或 Lys
- [0040] X21 为 Asp 或 Ile
- [0041] X24 为 Asn、Ala 或 Glu
- [0042] X28 为 Gln、Ala 或 Asn
- [0043] X31 为 Pro、Ile 或缺失
- [0044] X32 为 Thr 或缺失
- [0045] X33 为 Asp、Asn 或缺失
- [0046] R^2 为 NH_2 或 OH；
- [0047] Z^1 和 Z^2 独立地为不存在或选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met 和 Orn 的 3 至 20 个氨基酸单位的肽序列；并且其中所述 GLP-2 类似物包含选自以下的一种或多种替换：X8 为 Ser 和 / 或 X16 为 Ala 和 / 或 X24 为 Ala 和 / 或 X28 为 Ala。
- [0048] 在另一实施方案中，本发明提供通式 II 代表的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物：
- [0049] $R^1-Z^1-His-Gly-X3-Gly-X5-Phe-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-Ala-X19-Arg-$
- [0050] Asp-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33- Z^2-R^2
- [0051] 其中：
- [0052] R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基（例如甲基）、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基
- [0053] X3 为 Glu 或 Asp
- [0054] X5 为 Ser 或 Thr
- [0055] X7 为 Ser 或 Thr
- [0056] X8 为 Asp 或 Ser
- [0057] X9 为 Glu 或 Asp
- [0058] X10 为 Met、Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸
- [0059] X11 为 Asn、Ala、Lys 或 Ser
- [0060] X12 为 Thr 或 Lys

[0061] X13 为 Ile、Glu 或 Gln

[0062] X14 为 Leu、Met 或 Nle

[0063] X15 为 Asp 或 Glu

[0064] X16 为 Asn 或 Ala

[0065] X17 为 Leu 或 Glu

[0066] X19 为 Ala 或 Thr

[0067] X24 为 Asn 或 Ala

[0068] X28 为 Gln、Ala 或 Asn

[0069] X31 为 Pro、Ile 或缺失

[0070] X32 为 Thr 或缺失

[0071] X33 为 Asp 或缺失

[0072] R^2 为 NH_2 或 OH；

[0073] Z^1 和 Z^2 独立地为不存在或选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met 和 Orn 的 3 至 20 个氨基酸单位的肽序列；并且其中所述 GLP-2 类似物包含选自以下的一种或多种替换：X8 为 Ser 和 / 或 X16 为 Ala 和 / 或 X24 为 Ala 和 / 或 X28 为 Ala。

[0074] 在另一实施方案中，本发明提供通式 III 代表的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物：

[0075] $R^1-Z^1-His-Gly-X3-Gly-X5-Phe-X7-X8-Glu-X10-X11-Thr-Ile-Leu-Asp-X16-Leu-Ala-Ala-Arg-$

[0076] $Asp-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33-Z^2-R^2$

[0077] 其中：

[0078] R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基（例如甲基）、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基

[0079] X3 为 Glu 或 Asp

[0080] X5 为 Ser 或 Thr

[0081] X7 为 Ser 或 Thr

[0082] X8 为 Asp 或 Ser

[0083] X10 为 Met、Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸

[0084] X11 为 Asn、Ala、Lys 或 Ser

[0085] X24 为 Asn 或 Ala

[0086] X28 为 Gln 或 Ala

[0087] X31 为 Pro 或缺失

[0088] X32 为 Thr 或缺失

[0089] X33 为 Asp 或缺失

[0090] R^2 为 NH_2 或 OH；

[0091] Z^1 和 Z^2 独立地为不存在或选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met 和 Orn 的 3 至 20 个氨基酸单位的肽序列；并且其中所述 GLP-2 类似物包含选自以下的一种或多种替换：X8 为 Ser 和 / 或 X16 为 Ala 和 / 或 X24 为 Ala 和 / 或 X28 为 Ala。X16 不是 Ala 时，它将是 Asn。

[0092] 在某些实施方案中,当存在 Z^1 时, R^1 可以是 H, 当存在 Z^2 时, R^2 可以是 OH。

[0093] 在本发明的一些实施方案中, GLP-2 类似物与具有本申请引言中所公开序列的野生型 GLP-2 (1-33) 具有至少 60% 的氨基酸序列同一性, 更优选至少 63% 的序列同一性, 更优选至少 66% 的序列同一性, 并且还更优选至少 69% 的序列同一性。

[0094] 就 GLP-2 多肽序列而言, “氨基酸序列同一性百分比 (%)” 定义为候选序列中与野生型 GLP-2 序列中氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比, 所述定义在以下步骤后得出: 比对序列和必要时引入缺口以实现最高序列同一性百分比, 并且不将任何保守性替换认为是序列同一性的一部分。本领域技术人员可使用本领域熟知的技术例如使用公众可用的软件如 BLAST、BLAST2 或 Align 软件进行序列比对, 比对程序参阅: Altschul 等 (Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>) 或 Pearson 等 (Genomics, 46, 24, 36, 1997) 和 <http://molbiol.soton.ac.uk/compute/align.html>。

[0095] 使用这些程序及其默认设置测定本文使用的以及根据本发明的序列同一性百分比。更一般地, 技术人员能够容易地确定用于测定比对的适当参数, 包括在所比较序列的全长上实现最佳比对所需的任何算法。

[0096] 在一些优选实施方案中, 式 I、II 或 III 代表的 GLP-2 肽类似物包含 X8、X16、X24 和 / 或 X28 位中一个以上位置上的替换和 / 或这些替换与其它替换的组合, 优选与 X3、X5、X7、X10 和 / 或 X11 位替换组合。

[0097] 落入式 I 至 III 的 X8 位、X16 位、X24 和 / 或 X28 位替换组合的实例包括:

[0098] Ser8, Ala16

[0099] Ser8, Ala24

[0100] Ser8, Ala28

[0101] Ala16, Ala24

[0102] Ala16, Ala28

[0103] Ala24, Ala28

[0104] Ser8, Ala16, Ala24

[0105] Ser8, Ala16, Ala28

[0106] Ser8, Ala24, Ala28

[0107] Ala16, Ala24, Ala28

[0108] Ser8, Ala16, Ala24, Ala28。

[0109] 落入式 I 至 III 并且可与 X8、X16、X24 和 / 或 X28 位中一个或多个位置上的替换组合的 X3、X5、X7、X10 和 / 或 X11 位替换的实例包括:

[0110] Glu3, Leu10, Ala11, 24

[0111] Glu3, Thr5, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28

[0112] Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28

[0113] Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28

[0114] Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28

[0115] Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28

[0116] Glu3, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28

- [0117] Glu3, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28
- [0118] Glu3, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28
- [0119] Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28
- [0120] Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28, Ile21
- [0121] Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28
- [0122] Glu3, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28
- [0123] Glu3, Leu10, Ala11, 16, 24, 28
- [0124] Thr7, Leu10, Ala11, 24
- [0125] Thr7, Leu10, Lys11, Ala24
- [0126] Thr7, Leu10, Ser11, Ala24
- [0127] Thr7, Leu10, Ser8, 11, Ala24
- [0128] Thr7, Ser8, Leu10, Ala11, 24
- [0129] Thr7, Ser8, Leu10, Lys11, Ala24
- [0130] Ser8, Leu10, Ala11, 24
- [0131] Leu10, Ala24
- [0132] Leu10, Ala11, Ala24
- [0133] Leu10, Ala11, 24, 28
- [0134] Leu10, Ala11, 16, 24, 28
- [0135] Leu10, Lys11, Ala24
- [0136] Leu10, Ser11, Ala24
- [0137] Leu10, Ser8, 11, Ala24
- [0138] 或与上述 8、16、24 和 / 或 28 位变化组合的 X31-X33 位中一个或多个位置上的缺失。

[0139] 下文的详细描述中公开了本发明 GLP-2 化合物的具体实例。

[0140] 除了提供可能改善了化学稳定性和 / 或生物活性的 GLP-2 类似物以外, 本发明还涉及提供这样的化合物: 其在小肠中具有比在结肠中优选的生长促进活性, 反之亦然。具体而言, 本文描述的实验显示, 在对测试动物施用, 与结肠质量增加相比较, 野生型 GLP-2 中 Asp3 和 / 或 Ser8 和 / 或 Asn16 和 / 或 Asn24 和 / 或 Gln28 位的替换提供优选的小肠重量增加。这些发现意味着示例性化合物可用于治疗这样的病症: 其中在小肠中具有提高的生长促进效应而在结肠中效应较低是有利的, 反之亦然。

[0141] 因此, 优选用于引起小肠生长的化合物一般包含野生型 GLP-2 中 3、8、16 和 / 或 28 位中一个或多个位置上的替换。这样的化合物可选择性地引起小肠而不是结肠的生长。因此, 它们可用于影响或涉及小肠的病症。

[0142] 优选地, 这样的小肠选择性化合物包含 X3、X7、X16、X24、X28、X31、X32 和 / 或 X33 位中一个以上位置上的替换。因此, 小肠选择性化合物可包含一个以上的下列替换: X3 为 Glu、X7 为 Ser、X16 为 Ala、X24 为 Ala、X28 为 Ala、X31 为 Ile、X32 为 Thr 和 X33 为 Asp。可任选地缺失 X31、X32 和 X33 位的氨基酸残基。

[0143] 优选刺激小肠中上皮生长的示例性化合物包括 1809、1818、1819、1820、1826、1827、1844、1845、1846、1848、1849、1850、1851、1852、1853、1855、1857、1858、1859。

[0144] 另一方面,不具有这些改动的本发明化合物,例如包含 10、11 和 / 或 24 位中一个或多个位置上的替换的本发明化合物可能优选用于诱导结肠而不是小肠生长。因此,它们可用于治疗影响或涉及结肠的病症。

[0145] 这样的结肠选择性化合物可包含 X3、X8 和 / 或 X24 位中一个以上位置上的替换。例如,它们可包含一个以上选自 X3 为 Asp、X8 为 Asp 和 X24 为 Ala 的替换。可以任选地缺失 X31、X32 和 X33 位的氨基酸残基。

[0146] 优选地刺激结肠中上皮生长的示例性化合物包括 1830、1831、1835、1836、1839、1840、1841 和 1843。

[0147] 不引起小肠或结肠优选生长的示例性化合物:[Gly2]GLP-2(即参照分子)、1559、1821、1822、1823、1825、1828、1829、1832、1833、1834、1842、1854。

[0148] 本发明的化合物还具有提高的化学稳定性,例如针对酸水解、氧化和脱酰胺作用的稳定性。相信 X3 和 / 或 X33 位的替换可提高对酸水解的稳定性。X10 位的替换可提高氧化稳定性。X11、X16 和 / 或 X24 位中一个或多个位置的替换可提高针对脱酰胺作用的稳定性,因此,相对于 Gly2-GLP-2,本发明的 GLP-2 类似物可显示出针对酸性溶液中降解、针对脱酰胺作用和 / 或针对氧化降解的稳定性的增强。

[0149] 优选地,所述 GLP-2 类似物维持下文实施例 7 所述至少一个降解测试中起始纯度的至少 70% 的观察纯度。作为补充或替代,其在 12 天后可维持 0.1M HCl 溶液中起始纯度的至少 60% 的观察纯度。作为补充或替代,其在 6 天后可维持 0.1M NH_4HCO_3 溶液中起始纯度的至少 70% 的观察纯度。

[0150] 在另一方面中,本发明提供包含与载体混合的本文定义的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物的组合物。在优选实施方案中,所述组合物为可药用组合物,所述载体为可药用载体。GLP-2 肽类似物可以是 GLP-2 类似物的可药用酸加成盐。

[0151] 在另一方面中,本发明提供用于治疗的本文定义的 GLP-2 类似物或其盐。

[0152] 在另一方面中,本发明提供 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物用于制备治疗和 / 或预防胃和肠相关病症的药物中的用途,比如治疗患有肠功能受损、骨质疏松和 DPP-IV(二肽基肽酶-IV)介导的病症的新生儿。例如,所述胃和肠相关病症包括溃疡、胃炎、消化病症、吸收不良综合征、短肠综合征(short gut syndrome)、盲管综合征、炎性肠病、腹型斯泼卢腹泻(例如由麸质诱发的肠病或乳糜泻病引起)、热带型斯泼卢腹泻、低丙种球蛋白血症型斯泼卢腹泻、肠炎、局限性肠炎(克罗恩病)、溃疡性结肠炎、腹泻相关的肠易激综合征、小肠损伤或短肠综合征(short bowel syndrome)。

[0153] 可用本发明 GLP-2 类似物治疗或可使用 GLP-2 类似物进行预防或治疗的其它病症包括放射性肠炎、传染性肠炎或感染后肠炎以及由于毒剂或其它化学治疗剂引起的小肠损伤。这可能需要在化学疗法或放射疗法的疗程之前、同时或之后施用 GLP-2 类似物,以降低化学疗法的副作用例如腹泻、腹部痛性痉挛和呕吐,以及降低其后由化学疗法或放射疗法引起的肠上皮结构和功能损伤。

[0154] 因此,本发明还提供治疗药盒,其包含癌症放射疗法药物和本发明的 GLP-2 类似物,其中每一种均任选地与可药用载体组合。所述两种治疗剂可以分开包装(例如在分开的瓶中)以分别施用,或可以在同一组合物中提供。因此本发明还提供包含与可药用载体组合的癌症化学疗法药物和本发明 GLP-2 类似物的药物组合物。

[0155] 对于患有胃肠粘膜瘤形成或胃肠粘膜瘤形成风险提高的患者,可能期望选择化合物以降低或消除已降低副作用(例如刺激或加重胃肠粘膜瘤形成)的风险。例如,选择用于治疗患有结肠瘤形成(良性或恶性)或有发生结肠瘤形成风险的患者的化合物时,选择对小肠的选择性高于结肠的化合物比非选择性化合物或对结肠的选择性高于小肠的化合物可能更合适。

[0156] 在其他方面中,本发明提供 GLP-2 类似物用于制备治疗和/或预防营养不良(例如消耗综合征恶病质和厌食症之类的病症)的药物的用途。

[0157] 在其他方面中,本发明提供包含编码本文定义 GLP-2 类似物的核酸序列的核酸分子。

[0158] 在其他方面中,本发明提供包含任选地与指导其表达的序列组合的上述核酸序列的表达载体,以及用所述表达载体转化的宿主细胞。优选地,所述宿主细胞能够表达并分泌 GLP-2 类似物。在另一方面中,本发明提供生产 GLP-2 类似物的方法,所述方法包括在适于表达所述 GLP-2 类似物的条件下培养宿主细胞和纯化这样制备的 GLP-2 类似物。

[0159] 本发明还提供用于治疗的本发明核酸、本发明表达载体或者能够表达并分泌本发明 GLP-2 类似物的宿主细胞。应当理解,所述核酸、表达载体和宿主细胞可用于治疗任何可用 GLP-2 类似物本身进行治疗的本文所述病症。因此提到包含本发明 GLP-2 类似物的治疗组合物或施用本发明的 GLP-2 类似物时,应解释为包括施用本发明的核酸、表达载体或宿主细胞,除非其上下文中另有说明。

[0160] 在另一方面中,本发明提供通过施用有效量的本文定义的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物或者本发明的核酸、表达载体或宿主细胞来治疗有此需要的患者中胃和肠相关病症的方法。上文提供了胃和肠相关病症的实例。

[0161] 在另一方面中,本发明提供治疗或预防有此需要的患者中化学疗法或放射疗法副作用的方法,所述方法包括施用有效量的本文定义的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物或者本发明的核酸、表达载体或宿主细胞。

[0162] 在另一方面中,本发明提供治疗和/或预防有此需要的患者中营养不良(例如消耗综合征恶病质和厌食症之类的病症)的方法,所述方法包括施用有效量的本文定义的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物或者本发明的核酸、表达载体或宿主细胞。

[0163] 用于举例而非限制地,现参照附图更详细地描述本发明的实施方案。

附图说明

[0164] 图 1:四种小肠选择性化合物(化合物编号 1846、1855、1848 和 1858)在 C57BL 小鼠小肠(SI)质量上的完全剂量-应答数据的实施例。在三天中每日两次皮下注射施用以下剂量的化合物:0(载体)、5、15、45、135、405nmol/kg($n = 6$ /剂量组)。将每个剂量下水平的应答与采用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 治疗的配对治疗小鼠中相同剂量水平下得到的应答进行比较。为了校正体重(BW)变化,SI 质量表达为与 BW 的相对值(SI-BW 比值),并且用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 观察到的应答将每个剂量水平下的生长应答归一化。结果证明,在 5 至 405nmol/kg 的剂量范围内,小肠选择性化合物 1846、1855、1848 和 1858 的剂量-应答关系与非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 存在显著差异($p < 0.05$, 两因素 ANOVA),所有四种化合物均以显著高于 [Gly2]GLP-2 的最大应答刺激小肠生长。值

为平均值 $\pm$ SEM。* :相对于等摩尔剂量 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0165] 图 2 : , 四种小肠选择性化合物 (化合物编号 1846、1855、1848、1858) 在小肠 (SI) - 结肠敏感性指标上相对于非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 的完全剂量 - 应答数据的实施例。在三天中每日两次对 C57BL 小鼠皮下注射施用以下剂量的化合物 :0 (载体)、5、15、45、135、405nmol/kg ($n = 6$ / 剂量组)。将每个剂量下水平的应答与采用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 治疗的配对治疗小鼠中相同剂量水平下得到的应答进行比较。SI - 结肠敏感性指标计算为相对于结肠质量的 SI 质量, 并且用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 观察到的应答将每个剂量水平下的敏感性指标归一化。结果证明, 在 5 至 405nmol/kg 剂量范围内, 小肠选择性化合物 1857 和 1820 的剂量 - 应答关系与非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 存在显著差异 ($p < 0.05$, 两因素 ANOVA), 相对于 [Gly2]GLP-2, 化合物 1846、1855 和 1848 均显示最高小肠敏感性的提高。值为平均值 $\pm$ SEM。* :相对于等摩尔剂量 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0166] 图 3 :两种小肠选择性化合物 (化合物编号 1857、1849 和 1820) 在 C57BL 小鼠小肠 (SI) 质量上的全部剂量 - 应答数据的实施例。在三天中每日两次皮下注射施用以下剂量的化合物 :0 (载体)、5、15、45、135、405nmol/kg ($n = 6$ / 剂量组)。将每个剂量下水平的应答与采用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 治疗的配对治疗小鼠中相同剂量水平下得到的应答进行比较。为了校正体重 (BW) 变化, SI 质量表达为与 BW 的相对值 (SI-BW 比值), 并且用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 观察到的应答将每个剂量水平下的生长应答归一化。结果证明, 在 5 至 405nmol/kg 的剂量范围内, 小肠选择性化合物 1857、1849 和 1820 的剂量 - 应答关系与非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 存在显著差异 ($p < 0.05$, 两因素 ANOVA), 两种化合物均以显著高于 [Gly2]GLP-2 的最大应答刺激小肠生长。值为平均值 $\pm$ SEM。* :相对于等摩尔剂量 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0167] 图 4 :三种小肠选择性化合物 (化合物编号 1857、1820、1849) 在小肠 (SI) - 结肠敏感性指标上相对于非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 的完全剂量 - 应答数据的实施例。在三天中每日两次对 C57BL 小鼠皮下注射施用以下剂量的化合物 :0 (载体)、5、15、45、135、405nmol/kg ($n = 6$ / 剂量组)。将每个剂量下水平的应答与采用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 治疗的配对治疗小鼠中相同剂量水平下得到的应答进行比较。SI - 结肠敏感性指标计算为相对于结肠质量的 SI 质量, 并且用非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 观察到的应答将每个剂量水平下的敏感性指标归一化。结果证明, 在 5 至 405nmol/kg 剂量范围内, 小肠选择性化合物 1857、1820 和 1849 的剂量 - 应答关系与非选择性参照化合物 [Gly2]GLP-2 存在显著差异 ($p < 0.05$, 两因素 ANOVA), 相对于 [Gly2]GLP-2, 全部三种化合物均显示最高小肠敏感性的提高。值为平均值 $\pm$ SEM。* :相对于等摩尔剂量 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0168] 图 5 :非选择性化合物 ([Gly2]GLP-2) 和小肠选择性化合物 (化合物 1848) 在小肠、结肠和胃质量上的完全剂量 - 应答数据的实施例。在三天中每日两次对 C57BL 小鼠皮下注射施用以下剂量的化合物 :0 (载体)、5、15、45、135、405nmol/kg ($n = 6$ / 剂量组)。结果证明, 在 5 至 405nmol/kg 剂量范围内, [Gly2]GLP-2 在小肠、结肠和胃中产生剂量依赖性生长刺激, 而化合物 1848 仅在小肠中产生剂量依赖性生长刺激。值为平均值 $\pm$ SEM。* :相对于载体的 $p < 0.05$ 。

[0169] 图 6 :显示化合物 1846 (5、15、45、135、405 和 810nmol/kg, 皮下, 每日两次, $n = 6$ /

剂量组)对采用细胞抑制药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理的小鼠中 A) 小肠-体重比(SI-BW)和 B) 小肠长度(SI 长度)的影响的实施例。化合物 1846 在施用每日一次腹膜内注射的 50mg/kg 5-FU 之前施用 3 天,然后与 5-FU 一起施用 4 天。作为参照,对一组动物给予 [Gly2]GLP-2(405nmol/kg)。还显示了仅使用载体(PBS)或 5-FU 处理的对照动物的结果。化合物 1846 阻止了 C57BL 小鼠中 5-FU 诱导的小肠萎缩(器官质量减少和缩短)。值为平均值 $\pm$ SEM。*:相对于 5-FU 的 $p < 0.05$ 。

[0170] 图 7:显示化合物 1848(5、15、45、135、405 和 810nmol/kg,皮下,每日两次, $n = 6$ /剂量组)对采用细胞抑制药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理的小鼠中 A) 小肠-体重比(SI-BW)和 B) 小肠长度(SI 长度)的影响的实施例。化合物 1848 在施用每日一次腹膜内注射的 50mg/kg 5-FU 之前施用 3 天,然后与 5-FU 一起施用 4 天。作为参照,对一组动物给予 [Gly2]GLP-2(405nmol/kg)。还显示了仅使用载体(PBS)或 5-FU 处理的对照动物的结果。化合物 1848 阻止了 C57BL 小鼠中 5-FU 诱导的小肠萎缩(器官质量减少和缩短),并且高剂量的化合物 1848 比 [Gly2]GLP-2 更有效。值为平均值 $\pm$ SEM。*:相对于 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0171] 图 8:显示化合物 1855(5、15、45、135 和 405nmol/kg,皮下,每日两次, $n = 6$ /剂量组)对采用细胞抑制药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理的小鼠中 A) 小肠-体重比(SI-BW)和 B) 小肠长度(SI 长度)的影响的实施例。化合物 1855 在施用每日一次腹膜内注射的 50mg/kg 5-FU 之前施用 3 天,然后与 5-FU 一起施用 4 天。作为参照,对一组动物给予 [Gly2]GLP-2(405nmol/kg)。还显示了仅使用载体(PBS)或 5-FU 处理的对照动物的结果。化合物 1855 阻止了 C57BL 小鼠中 5-FU 诱导的小肠萎缩(器官质量减少和缩短),并且最高剂量的化合物 1855 比等摩尔剂量的 [Gly2]GLP-2 更有效。值为平均值 $\pm$ SEM。*:相对于 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0172] 图 9:显示化合物 1857(5、15、45、135 和 405nmol/kg,皮下,每日两次, $n = 6$ /剂量组)对采用细胞抑制药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理的小鼠中 A) 小肠-体重比(SI-BW)和 B) 小肠长度(SI 长度)的影响的实施例。化合物 1857 在施用每日一次腹膜内注射的 50mg/kg 5-FU 之前施用 3 天,然后与 5-FU 一起施用 4 天。作为参照,对一组动物给予 [Gly2]GLP-2(405nmol/kg)。还显示了仅使用载体(PBS)或 5-FU 处理的对照动物的结果。化合物 1857 阻止了 C57BL 小鼠中 5-FU 诱导的小肠萎缩(器官质量减少和缩短),并且最高剂量的化合物 1857 比等摩尔剂量的 [Gly2]GLP-2 更有效。值为平均值 $\pm$ SEM。*:相对于 [Gly2]GLP-2 的 $p < 0.05$ 。

[0173] 图 10:显示化合物 1846(16、80 和 400nmol/kg/天,皮下, $n = 6$ /剂量组)在用细胞抑制药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理的雄性 Spague-Dawley 大鼠中的作用的实施例。化合物 1846 在施用每日一次腹膜内注射的 75mg/kg 5-FU 之前施用 3 天,然后与 5-FU 一起施用 4 天。将结果与仅使用载体(盐水)或 5-FU 处理对照动物中的应答进行比较。还显示了盐水和 5-FU 对照。化合物 1846 阻止了大鼠中 5-FU 诱导的小肠萎缩(小肠质量减少和肠缩短)。值为平均值 $\pm$ SEM。*:相对于仅有 5-FU 的 $p < 0.05$ 。

[0174] 图 11:该实施例展示化合物 1846 对由细胞抑制药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理诱发的腹泻的影响。每日一次用 5-FU 75mg/kg 处理大鼠 4 天(第 1 至 4 天);($n = 40$ 只大鼠)。在 5-FU 处理之前最后 3 天(第 -3 至 -1 天)和 5-FU 处理的 4 天(第 0 至 3 天)中,

半数动物接受化合物 1846 (400nmol/kg, 皮下, 每日一次) 的其他处理。每日两次 (早晨和傍晚) 观察大鼠以确定动物是否发生腹泻, 并且根据以下尺度对腹泻的严重程度进行评分: (0) 无腹泻; (1) 轻度 - 肛门周围粪便污染; (2) 中度 - 后肢和尾巴粪便污染; 和 (3) 重度 - 前肢和腹部粪便污染。第 5 天, 约 70% 仅接受 5-FU 的 Sprague Dawley 大鼠发生腹泻 (图 11A), 而仅 30% 与化合物 1846 共处理的大鼠发生腹泻 (图 11B)。这些结果表明化合物 1846 有效地防止小肠损伤, 从而在用 5-FU 进行细胞抑制处理期间防止了腹泻的发生。

[0175] 图 12: 该实施例展示化合物 1846 对上皮隐窝 - 绒毛高度 (图 12A) 和空肠 (即小肠中段) 肌厚度 (图 12B) 的影响。用化合物 1846 (0.62、3.41 或 6.2mg/kg, 每日一次) 静脉内处理 Sprague Dawley 大鼠 5 天 ($n = 6$ /剂量组)。然后处死动物, 在幽门括约肌远端 25cm 处收集小肠活检 (1cm)。固定所述活检、石蜡包埋、切片并用苏木精和伊红染色。在显微镜下检查染色的切片, 测量隐窝深度、绒毛高度、隐窝 - 绒毛长度和肌厚度。根据图示, 化合物 1846 剂量依赖性地提高空肠肠上皮中的隐窝 - 绒毛长度, 但是对空肠肌厚度没有影响。这些结果提示化合物 1846 通过刺激小肠上皮生长而主要在小肠中发挥其增殖作用。值为平均值 $\pm$ SEM。*: 相对于载体对照 (0mg/kg/天) 的 $p < 0.05$ 。

[0176] 图 13: 该实施例展示化合物 1848 对吡啶美辛诱导的小肠溃疡的影响。使用载体 (盐水; 第 1 组) 或吡啶美辛 (7mg/kg 皮下, 每日一次, 进行 2 天; 第 2 至 7 组) 处理雄性 Sprague Dawley 大鼠。仅给予吡啶美辛 (第 2 组) 或与泼尼松龙组合 (10mg/kg 皮下, 第 3 组) 或与 8、40 或 200nmol/kg 化合物 1848 组合 (皮下, 每日一次, 第 4 至 6 组)。最后, 采用泼尼松龙 (10mg/kg 皮下) 和化合物 1848 (200nmol/kg 皮下, 每日一次) 的组合处理来处理一组大鼠 (第 7 组)。吡啶美辛之前 4 天开始进行化合物 1848 处理并且在吡啶美辛处理的 2 天期间继续处理。第 3 天, 处死大鼠, 在尸检时轻轻地用 10% 福尔马林冲洗小肠并用福尔马林填充小肠 5 分钟, 之后沿系膜小肠对向部边缘将肠剪开并悬挂在聚丙烯盘上。小心地用镊子除去任何剩余的肠内容物。室温下再固定 24 小时后, 在 Milli-Q 水中清洗组织, 并用制备为 1% 乙酸 (Bie&Bernstsen) 中 0.5% 溶液的 Alcian Green3BX (Chroma) 表面染色 20 分钟。除去过量的染色液和 Milli-Q 水后, 将所述组织制备物转移到 70% 醇中并使用立体显微镜在低倍 ($\times 7$) 下进行分析。从幽门开始仔细检查小肠并利用标准尺 (精度: 0.5mm) 测量所有溃疡的性状 (圆形和线形) 和大小 (圆形溃疡: 直径, 线形溃疡: 长 $\times$ 宽)。溃疡定义为缺少上皮表面的部分。在正在愈合的溃疡中, 即使较大面积中仍然缺少绒毛结构, 也仅将仍然缺少上皮表面的部分认为是溃疡。以盲法进行所有分析。如图 13 所示, 吡啶美辛强烈诱导小肠溃疡 (总小肠溃疡 = $333 \pm 21\text{mm}^2$)。泼尼松龙处理引起溃疡范围显著下降约 29%。化合物 1848 处理以剂量依赖性方式防止吡啶美辛诱导的溃疡, 在最高剂量下, 总溃疡降低约 50% ($178 \pm 17\text{mm}^2$)。这种对化合物 1846 的最大应答高于泼尼松龙的作用, 与高剂量化合物 1848 组合加入泼尼松龙未产生任何附加效应。这些结果表明, 化合物 1848 有效防止吡啶美辛诱导的小肠溃疡。值为平均值 $\pm$ SEM。*: 与吡啶美辛 (第 2 组) 的 $p < 0.05$ 。#: 与泼尼松龙 (第 3 组) 的 $p < 0.05$ 。

[0177] 图 14: 该实施例展示化合物 1848 对由吡啶美辛诱导小肠炎症的大鼠中小肠 TNF- α 含量的影响。使用载体 (盐水; 第 1 组) 或吡啶美辛 (7mg/kg 皮下, 每日一次, 进行 2 天; 第 2 至 7 组) 处理雄性 Sprague Dawley 大鼠。仅给予吡啶美辛 (第 2 组) 或与泼尼松龙组合 (10mg/kg 皮下, 第 3 组) 或与 8、40 或 200nmol/kg 化合物 1848 组合 (皮下,

每日一次,第 4 至 6 组)。最后,采用泼尼松龙(10mg/kg 皮下)和化合物 1848(200nmol/kg 皮下,每日一次)的组合处理来处理一组大鼠(第 7 组)。吡喹酮之前 4 天开始进行化合物 1848 处理并且在吡喹酮处理的 2 天期间继续处理。第 3 天处死大鼠,在尸检时将小肠分成长度相等的三个节段,分别对应于 1) 十二指肠和近端空肠、2) 中部空肠和远端空肠以及 3) 回肠。立即在液氮中快速冷冻样品并保存在 -80°C 至分析。根据下述方案进行小肠节段的匀浆和细胞蛋白的提取:对组织节段称重,加入每克组织 1.5ml 体积用冰预冷(4°C)的提取缓冲液(10mM Tris-HCl(Sigma)和 1mM EDTA(J. T. Baker), (pH 7.6), 含 0.05% 叠氮化钠(Fluka)、1% Tween-80(Fluka)、2mM 苯甲基磺酰氟(PMSF, Fluka)以及蛋白酶抑制剂抑肽酶、亮抑蛋白酶肽和胃蛋白酶抑制剂 A 各 $1\mu\text{g/ml}$ (Roche Diagnostics))。用剪刀将组织剪成小块并以 9500rpm 20 秒匀浆 3 次(IKA UltraTurrax T25homogenizer, Janke&Kunkel),其间在冰上冷却 30 秒。在 4°C 下以 $20,000\times g$ 离心组织匀浆 30 分钟,收集上清液并保存在 -20°C 至分析 TNF- α 。根据生产商的说明书使用市售的 ELISA 试剂盒(Rat Tumor Necrosis Factor- α Ultrasensitive ELISA kit, Biosource International Inc.) 分析小肠蛋白提取物的 TNF- α 。该测定的检出限为 0.7pg/ml。使用市售的测定(DC protein assay, Bio-Rad Laboratories Ltd.) 分析蛋白提取物中的总蛋白含量。TNF- α 的小肠组织水平表达为与总蛋白的相对值。化合物 1848 显著降低促炎细胞因子 TNF- α 的小肠组织水平,并且这种效应在近端节段(小肠的前 1/3)最为显著。在近端和中部节段(小肠第二个 1/3)中,化合物 1848 比泼尼松龙更有效。有意思的是,化合物 1848 比泼尼松龙更有效地抑制小肠炎症,并且当与化合物 1848 组合施用,泼尼松龙没有附加效应。这些结果提示化合物 1848 对影响小肠的疾病过程具有显著的抗炎潜能。值为平均值 $\pm$ SEM。
*:与吡喹酮(第 2 组)的 $p < 0.05$ 。

[0178] 本发明的详细说明

[0179] 定义

[0180] 除非另外指出,为上述书面描述中使用的特定术语提供下述定义。

[0181] 在说明书和权利要求书全篇中,使用天然氨基酸的常规单字母代码和三字母代码以及其它 α -氨基酸例如肌氨酸(Sar)、正亮氨酸(Nle)和 α -氨基异丁酸(Aib)的普遍公认的三字母代码。本发明的肽中所有氨基酸残基优选为 L-构型,然而,也可以存在 D-构型的氨基酸。

[0182] 本发明的优选化合物具有至少一种 GLP-2 生物活性,尤其是引起肠生长。这可以如实施例所述在体内测定中进行评估,其中在用 GLP-2 类似物处理或接触测试动物之后测定肠或其部分的质量。

[0183] 与天然 GLP-2 和上述定义的 GLP-2 相比较,本发明的 GLP-2 类似物具有一个或多个氨基酸替换、缺失、倒位或添加。这一定义还包括同义术语 GLP-2 模拟物和 / 或 GLP-2 激动剂。此外,本发明的类似物还可具有一个或多个其氨基酸侧基、 α -碳原子、末端氨基、或末端羧基的化学修饰。化学修饰包括但不限于添加化学部分、形成新键以及去除化学部分。氨基酸侧基修饰包括但不限于赖氨酸 ϵ -氨基的酰化、精氨酸、组氨酸或赖氨酸的 N-烷基化、谷氨酸或天冬氨酸羧基的烷基化以及谷氨酸或天冬氨酸的脱酰胺作用。末端氨基修饰包括但不限于去氨基(des-amino)、N-低级烷基、N-二低级烷基以及 N-酰基修饰。末端羧基修饰包括但不限于酰胺、低级烷基酰胺、二烷基酰胺以及低级烷基酯修饰。本文优选

的低级烷基为 C_1 - C_4 烷基。此外，可通过肽化学普通技术人员公知的保护基保护一个或多个侧基或端基。氨基酸的 α -碳可被单甲基化或二甲基化。

[0184] 在其存在时，氧化稳定的 Met- 取代氨基酸指选自以下的氨基酸：Met(O) (甲硫氨酸亚砷)、Met(O)₂ (甲硫氨酸砷)、Val、Ile、Asn、Glx (Glu 或 Gln)、Tyr、Phe、Trp，优选为 Leu、Nle、Ala、Ser 和 Gly。

[0185] 应当理解，本发明的肽还可以以盐或其它衍生物的形式提供。盐包括可药用盐例如酸加成盐和碱盐。酸加成盐的实例包括盐酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐。碱盐的实例包括阳离子选自以下的盐：碱金属例如钠和钾、碱土金属例如钙以及铵离子 $N(R^3)_3(R^4)$ (其中 R^3 和 R^4 独立地表示任意取代的 C_{1-6} 烷基、任意取代的 C_{2-6} 烯基、任意取代的芳基或任意取代的杂芳基)。可药用盐的其它实例描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”第 17 版 Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U. S. A., 1985 和更新的版本以及 the Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology 中。

[0186] 本发明 GLP-2 类似物的其它衍生物包括与金属离子如 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 的配位络合物、酯如体内可水解的酯、游离酸或碱、水合物、前药或脂质。可以使用本领域熟知的技术在化合物中存在的羟基或羧酸基之间以及适当的羧酸或醇反应配偶体之间形成酯。作为前药的化合物衍生物可在体内或体外转化成母体化合物之一。一般地，化合物的至少一种生物活性将在化合物前药形式中降低，并且可通过前药转化被活化，以释放该化合物或其代谢物。前药的实例包括使用保护基，所述保护基可原位除去以释放活性化合物，或者可在体内抑制药物的清除。

[0187] 在其存在时， Z^1 和 Z^2 各自独立地代表 3 至 20 个或 4 至 20 个氨基酸残基的肽序列，例如在 4 至 15 个氨基酸残基范围内、更优选在 4 至 10 个氨基酸残基范围内，尤其是在 4 至 7 个氨基酸残基范围内，例如 4、5、6 或 7 个氨基酸残基，比如 6 个氨基酸残基。肽序列 Z 中每个氨基酸残基可独立地选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met、Orn。优选地，所述氨基酸残基选自 Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Orn 和 Met 以及落入 W001/04156 中所定义的式 I 的氨基酸，例如 Dbu (2,4-二氨基丁酸) 或 Dpr (2,3-二氨基丙酸)，更优选选自 Glu、Lys 和 Met，尤其是 Lys。上述氨基酸可为 D- 或 L- 构型，但优选上述氨基酸为 L- 构型。特别优选的序列 Z 是 4 个、5 个或 6 个连续赖氨酸残基、特别是 6 个连续赖氨酸残基的序列。示例性序列 Z 示于 W001/04156。

[0188] 在某些实施方案中不存在 Z^1 。在这种情况下，可以存在或不存在 Z^2 。

[0189] 本发明包含下文实验章节中进一步描述的下述肽。

[0190] 参照 GLP-2 类似物

[0191] 1559H-[Gly2]hGLP-2-OH

[0192] H-HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD-OH

[0193] 本发明 GLP-2 类似物的实例

[0194] 1809[Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-(Lys)₆-NH₂

[0195] HGEFTSDELATILDALAARDFIAWLIATKIDK₆-NH₂

[0196] 1810[Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28, Ile21]hGLP-2(1-30)-(Lys)₂-NH₂

[0197] HGEFTSDELATILDALAARIFIAWLIATK₆-NH₂

[0198] 1811[Gly2, Pro6, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-NH₂

- [0199] HGDGSPSDELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH₂
- [0200] 1812[Gly2, Glu3, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2-NH₂
- [0201] HGEGSFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTKITD-NH₂
- [0202] 1813[Gly2, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-NH₂
- [0203] H-HGDGSFSDELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH₂
- [0204] 1814[Gly2, Leu10, Ala11, 24, 28]hGLP-2-NH₂
- [0205] H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFIAWLIATKITD-NH₂
- [0206] 1815[Gly2, Glu3, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-N H₂
- [0207] H-HGEGSFSDELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH₂
- [0208] 1818[Gly2, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0209] H-HGDGSFSSELATILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0210] 1819[Gly2, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0211] H-HGDGSFSDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0212] 1820[Gly2, Thr7, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0213] H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0214] 1821[Gly2, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0215] H-HGDGSFSDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0216] 1822[Gly2, Thr7, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0217] H-HGDGSFTDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0218] 1823[Gly2, Thr7, Ser8, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0219] H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0220] 1824[Gly2, Thr7, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0221] H-HGDGSFTDELATILDNL-AARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0222] 1825[Gly2, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0223] H-HGDGSFSSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0224] 1826[Gly2, Leu10, Ala24]hGLP-2-K₆-NH₂
- [0225] H-HGDGSFSDELNTILDNLAARDFIAWLIQTKITDK₆-NH₂
- [0226] 1827[Gly2, Thr7, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0227] H-HGDGSFTDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0228] 1828[Gly2, Thr7, Leu10, Ser8, 11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0229] H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0230] 1829[Gly2, Leu10, Ser8, 11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K₆-NH₂
- [0231] H-HGDGSFSSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK₆-NH₂
- [0232] 1830[Gly2, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0233] H-HGDGSFSDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0234] 1831[Gly2, Thr7, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0235] H-HGDGSFTDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0236] 1832[Gly2, Thr7, Leu10, Ser8, 11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0237] H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂

- [0238] 1833[Gly2, Leu10, Ser8, 11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0239] H-HGDGSFSSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0240] 1834[Gly2, Thr7, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0241] H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0242] 1835[Gly2, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0243] H-HGDGSFSDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0244] 1836[Gly2, Thr7, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0245] H-HGDGSFTDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0246] 1839[Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-33)-K₆-NH₂
- [0247] H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTKITDK₆-NH₂
- [0248] 1840[Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0249] H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTKITD-NH₂
- [0250] 1841[Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0251] H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0252] 1842[Thr7, Ser8, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0253] H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0254] 1843[Thr7, Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH₂
- [0255] H-HGDGSFTDELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH₂
- [0256] 1844[Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0257] H-HGEGTFSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0258] 1845[Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0259] H-HGEGTFSDELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0260] 1846[Gly2, Glu3, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0261] H-HGEGSFSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆NH₂
- [0262] 1847[Gly2, Glu3, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0263] H-HGEGSFSDELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0264] 1848[Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0265] H-HGEGTFSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0266] 1849[Gly2, Glu3, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0267] H-HGEGSFSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0268] 1850[Gly2, Glu3, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0269] H-HGEGSFSDELKTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0270] 1851[Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)₆-NH₂
- [0271] H-HGEGTFSDELKTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0272] 1852[Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0273] H-HGEGTFSSELKTILDALAARDFIAWLIATKITDK₆-NH₂
- [0274] 1853[Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0275] H-HGEGTFSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH₂
- [0276] 1854[Gly2, Glu3, Thr5, Lau10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂

- [0277] H-HGEGTFSDELSTILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0278] 1855[Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0279] H-HGEGSFSSELSTILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0280] 1856[Gly2, Glu3, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0281] H-HGEGSFSDELSTILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0282] 1857[Gly2, Glu3, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0283] H-HGEGTFSSELATILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0284] 1858[Gly2, Glu3, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0285] H-HGEGSFSSELATILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0286] 1859[Gly2, Glu3, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0287] H-HGEGSFSDELKTILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0288] 1860[Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0289] H-HGEGTFSDELKTILDALAARDFAWLIATKID-NH₂
- [0290] 1861[Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH₂
- [0291] HGEGTFSSELKTILDALAARDFAWLIATKID
- [0292] 本发明特别优选的化合物包括化合物 1834、1846、1847、1848、1849、1855、1857 和 1858。
- [0293]

1834	H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFAWLIQTK-NH ₂
1846	H-HGEGSFSSELSTILDALAARDFAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1847	H-HGEGSFSDELSTILDALAARDFAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1848	H-HGEGTFSSELATILDALAARDFAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1849	H-HGEGSFSSELATILDALAARDFAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1855	H-HGEGSFSSELSTILDALAARDFAWLIATKID-NH ₂
1857	H-HGEGTFSSELATILDALAARDFAWLIATKID-NH ₂
1858	H-HGEGSFSSELATILDALAARDFAWLIATKID-NH ₂

[0294] 稳定性研究

[0295] 技术人员能设计适当方法（例如定量法）用于检测 GLP-2 类似物的降解产物，例如基于下面描述的方法。降解可以以氧化、水解和脱酰胺作用的形式发生，取决于任何给定的 GLP-2 类似物中氨基酸的特性和位置以及条件例如 pH、溶液和温度。当在应激条件（即可能引起降解的条件）下孵育化合物并且随后分析化合物中剩余完整肽的含量时，可根据化学稳定性对化合物进行分级。此外，得到的对应激条件下所得主要降解产物的了解对于任何后来分析方法的开发都是很重要的。

[0296] 检测 GLP 类似物的定量测定

[0297] 技术人员还能够设计方法（例如定量法）用于检测复杂环境或溶液（例如血浆、尿、组织匀浆、细胞匀浆、唾液等）中的 GLP-2 类似物，以研究施用于哺乳动物之后 GLP-2 类似物的吸收、分布、代谢和排泄，或者作为体外细胞体系功能研究的一部分。

[0298] 在一个实施方案中，定量测定可基于针对 GLP 类似物或其片段的抗体。从经免疫的动物中得到的抗体可用于定量分析。在一个实施例中，可利用固定在多孔板中的与所述分子中一部分具有亲和力的第一抗体制备直接夹层 ELISA。然后对孔应用样品，GLP 类似物

被第一抗体捕获。然后所捕获的 GLP 类似物被与 GLP 类似物另一部分具有亲和力的第二抗体识别。可用酶（辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶）或放射性同位素标记所述第二抗体。然后可通过加入比色底物或直接计数辐射或通过闪烁来检测所捕获的 GLP 类似物的量。或者，通过加入与第二抗体具有亲和力的标记抗体来间接检测所捕获的 GLP 类似物的量。可由含有已知量 GLP 类似物的外标曲线得到的应答来估计样品中的浓度。或者，所述抗体可用于制备直接竞争性免疫测定，其中将对 GLP 类似物具有特异性的抗体固定在多孔板上，并将样品与预定固定浓度的标记 GLP 类似物一起在孔中孵育。所述标记可以是酶、荧光团、放射性同位素或生物素，并使用以下方法检测，例如对所述酶具有特异性的底物（例如比色、荧光或化学发光）、闪烁或者与酶连接的抗生物素蛋白，随后进行上述检测。可通过适当的方法检测已结合的标记 GLP 类似物的量，并可由得自上述外标曲线的应答来得出样品中 GLP 类似物的浓度。

[0299] 在另一个实施方案中，定量测定可基于液相层析-串联质谱法。在这样的设置中，根据与惰性气体（He 或 Ar）碰撞引起的母体化合物断裂来监测对待研究 GLP 类似物具有特异性的片段的应答。断裂之前通过反相层析分离样品组分，或直接将样品注入质谱仪中。适当时可对样品进行预处理（即加入蛋白酶抑制剂、蛋白质沉淀、固相萃取、免疫-亲和萃取等）。由上述外标曲线所得应答得出样品中存在的 GLP 类似物浓度，这可以是在使用与待研究的 GLP 类似物相似的内标校正应答之后。

[0300] 产生特异性抗体

[0301] 可在哺乳动物中诱导并从血清中纯化针对 GLP 类似物或其片段的特异性抗体。GLP 类似物或片段可直接与佐剂一起用于免疫兔、小鼠或其它哺乳动物，或者 GLP 类似物或其片段可与载体分子（即匙孔械血蓝蛋白、卵白蛋白、白蛋白等）化学连接，并与佐剂一起注射。可在延长的时间中以 2 至 4 周的间隔重复所述注射，以提高抗体的亲和力和选择性。可直接从血清获得多克隆抗体。为了得到单克隆抗体，应将分离自免疫动物（优选小鼠）的 B 细胞与肿瘤细胞融合，以形成产生抗体的杂交瘤。利用固定的 GLP 类似物或其肽随后用标记的抗-抗体检测来筛选和选择适当的克隆和抗体。或者，所述筛选和选择可基于固定抗体随后用标记的 GLP 类似物或其片段检测。在所有情况下，所述标记均可以是放射性同位素、酶、荧光团或生物素，并使用以下方法检测，例如对所述酶具有特异性的底物（例如比色、荧光或化学发光）、闪烁或者抗生物素蛋白与酶连接，随后进行上述检测。

[0302] 合成 GLP 类似物

[0303] 优选通过固相或液相肽合成手段合成本发明的类似物。在该上下文中，参照 W098/11125 和 Fields, GB 等, 2002, “Principles and practice of solid-phase peptide synthesis”. In: Synthetic Peptides (2nd Edition) 以及本文的实施例。

[0304] 因此，可用多种方式合成 GLP 类似物，例如包括以下步骤的方法：

[0305] (a) 通过固相或液相肽合成手段合成肽并回收这样得到的合成肽；或

[0306] (b) 当所述肽由天然存在的氨基酸组成时，在宿主细胞中表达编码所述肽的核酸构建体，并从所述宿主细胞培养物中回收表达产物；或

[0307] (c) 当所述肽由天然存在的氨基酸组成时，实现编码所述肽的核酸构建体的无细胞体外表达，并回收所述表达产物；或

[0308] (a)、(b) 和 (c) 方法的组合以得到所述肽的片段，随后连接所述片段以得到所述

肽,并回收所述肽。

[0309] 因此,对于本发明的一些类似物,使用基因工程技术可能是有利的。这可能是当肽足够大(或作为融合构建体产生)和当肽仅包含可由活生物 RNA 翻译的天然存在氨基酸的情况。

[0310] 就重组基因技术而言,编码本发明肽的核酸片段是重要的化学产物。因此,本发明的另一方面提供包含编码本发明 GLP-2 类似物的核酸序列的核酸分子,其中所述肽优选包含于天然存在氨基酸中。本发明的核酸片段为 DNA 或 RNA 片段。

[0311] 本发明的核酸片段通常插入适当的载体中,以形成携带本发明核酸片段的克隆载体或表达载体;这种新载体也是本发明的一部分。涉及构建本发明这些载体的细节将在下文转化细胞和微生物的上下文中讨论。取决于应用的目的和类型,所述载体可以是质粒、噬菌体、粘粒、微染色体或病毒的形式,但仅在某些细胞中瞬时表达的裸 DNA 也是重要的载体。本发明优选的克隆载体和表达载体(质粒载体)能自主复制,从而能够为了用于随后克隆的高水平表达或高水平复制而实现高拷贝数。

[0312] 本发明载体的一般概况包括在 5' → 3' 方向有效连接的下述特征:用于驱动本发明核酸片段表达的启动子,任选的编码允许分泌(分泌至胞外相或适当时分泌至周质体中)的前导肽或多种目的(如组合分泌、纯化标记和酶修饰以校正肽或将多肽片段整合到膜中)的前导肽的核酸序列、编码本发明肽的核酸片段以及任选的编码终止子的核酸序列。当用表达载体在生产株或细胞系中操作时,为了转化细胞的基因稳定,优选所述载体在引入宿主细胞时整合进宿主细胞基因组中。

[0313] 使用本发明的载体转化宿主细胞以产生经修饰的本发明肽。这样的转化细胞也是本发明的一部分,可以是用于增殖本发明核酸片段和载体或用于重组产生本发明肽的培养的细胞或细胞系。

[0314] 本发明优选的转化细胞是微生物例如细菌(如埃希菌(*Escherichia*)(如大肠杆菌)、芽孢杆菌(*Bacillus*)(如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*))、沙门氏菌(*Salmonella*)或分枝杆菌(*Mycobacterium*)(优选非致病性的,如牛分枝杆菌(*M. bovis*) BCG)的物种)、酵母(如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))和原生动物。或者,所述转化细胞来自多细胞生物,即可以是真菌细胞、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。来自人的细胞也是有意义的,参照下文对细胞系和载体的讨论。为了克隆和/或最优化表达的目的,优选所述转化细胞能复制本发明核酸片段。本发明的实施方案优选使用表达所述核酸片段的细胞;它们可用于小规模或大规模制备本发明的肽。

[0315] 通过转化细胞生产本发明的肽时,虽然远非必要,但将表达产物运出至培养基或携带到转化细胞表面是便利的。

[0316] 已经鉴定了有效的生产细胞时,优选基于所述生产细胞建立携带本发明载体和表达编码所述肽的核酸片段的稳定细胞系。优选地,这种稳定细胞系分泌或携带本发明的肽,从而便于纯化。

[0317] 一般而言,将含有复制子和控制序列的质粒载体(来源于与宿主细胞相容的物种)与宿主一起使用。所述载体通常带有复制位点以及能在转化细胞中提供表型选择的标记序列。例如,一般使用来源于大肠杆菌物种的质粒 pBR322(但是存在许多其它可用的质粒)转化大肠杆菌(参阅如 Bolivar 等,1977)。pBR322 质粒含有氨苄青霉素和四环素抗性

基因,因而提供鉴定转化细胞的简单手段。pBR质粒或其它微生物质粒或噬菌体必须还包含启动子或经修饰以包含启动子,其可被原核微生物用于表达。

[0318] 在原核重组 DNA 构建中最普遍使用的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统(Chang 等,1978;Itakura 等,1977;Goeddel 等,1979)以及色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel 等,1979;EP 0036776A)。尽管这些是最常用的,但也已发现并使用了其它微生物启动子,其核苷酸序列的细节已公开,使得技术人员能将其与质粒载体功能性连接(Siebwienlist 等,1980)。除了原核生物、真核微生物以外,还可使用例如酵母培养物,而且这时所述启动子也应能够启动表达。在真核微生物中,酿酒酵母或普通面包酵母是最常用的,尽管许多其它株也是普遍可得的。例如,对于酵母属中的表达,质粒 YRp7 是常用的(Stinchcomb 等,1979;Kingsman 等,1979;Tschemper 等,1980)。该质粒已含有为不能生长在色氨酸中的酵母突变株(如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1(Jones,1977))提供选择标记的 trp1 基因。然后,作为酵母宿主细胞基因组特征的 trp1 损伤的存在提供了用于通过无色氨酸情况下培养检测转化的有效环境。

[0319] 酵母载体中适当的启动序列包括 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzman 等,1980)或其它糖酵解酶(Hess 等,1968;Holland 等,1978)的启动子,例如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶以及葡糖激酶的启动子。在构建适当的表达质粒时,还将与这些基因相关的终止序列还被连接到表达载体中待表达序列的 3',以提供 mRNA 多聚腺苷酸化和终止。

[0320] 具有转录由生长条件控制的额外优点的其它启动子为乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶和上述甘油醛-3-磷酸脱氢酶以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。含有酵母兼容性启动子、复制起点和终止序列的任何质粒载体都是适用的。

[0321] 除了微生物以外,来源于多细胞生物的细胞培养物也可用作宿主。原则上任何这样的细胞培养物都是可使用的,不管来自脊椎动物或无脊椎动物培养物。然而,脊椎动物细胞是最有意义的,近年来,脊椎动物在培养(组织培养)中的繁殖已经成为常规方案(Tissue Culture,1973)。这种可用的宿主细胞系的实例为 VERO 和 HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系以及 W138、BHK、COS-7293、草地贪夜蛾(spodoptera frugiperda, SF)细胞(完整的表达系统可购自 i. a. Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, U. S. A. 和 Invitrogen)、Invitrogen(P.O. Box 2312, 9704 CH Groningen, The Netherlands)提供的黑腹果蝇(D. melanogaster)细胞系 S₂以及 MDCK 细胞系。

[0322] 这些细胞的表达载体通常包括(如果需要)复制起点、位于待表达基因之前的启动子以及任何必需的核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点以及转录终止子序列。

[0323] 对于哺乳动物中的应用,表达载体的控制功能通常由病毒物质提供。例如,常用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒 2,最常用的是猿猴病毒 40(SV40)。SV40 病毒的早期和晚期启动子是特别有用的,因为它们都容易以同时包括 SV40 病毒复制起点的片段的形式从病毒中得到(Fiers 等,1978)。还可以使用更小或更大的 SV40 片段,只要其包括从 Hind III 位点至病毒复制起点中 Bgl II 位点的约 250bp 序列。此外,还可能(并且通常希望)利用正常情况下与目的基因序列相关的启动子或控制序列,只要这样的控制序列与宿主细胞系

统相容。

[0324] 复制起点可通过构建载体提供以包含外源起点来提供,例如可来自 SV40 或其它病毒(例如多瘤病毒、腺病毒、VSV、BPV),或者可以由宿主细胞染色体复制机制提供。如果所述载体整合进宿主细胞染色体中,后者通常是足够的。

[0325] 为了在重组生产方法中得到满意的产量,通过将肽与可用作亲和标记(为了易于纯化)的融合配偶体和/或通过具有多个肽重复来将所述类似物制备为融合蛋白可能是有利的。这些方法需要存在适当的肽酶切割位点,但是技术人员会知道如何加工其背后的基因构建体。

[0326] 重组制备后,可通过本领域普遍公知的方法纯化本发明的肽,包括多步层析(离子交换、大小排阻以及亲和层析技术)。

[0327] 或者,可在无细胞体系中体外制备由天然存在的氨基酸组成的肽。这在肽可能对推定的宿主细胞有毒性的情况下特别有利。因此,本发明还考虑使用无细胞体外翻译/表达以制备本发明的肽。在这种情况下,参照来自例如 Ambion Inc., 2130 Woodward, Austin, TX 78744-1832, USA 的市售体外翻译试剂盒、材料和技术文件。

[0328] 最后,当然可以组合可用方法,从而制备如半合成类似物。在这样的设置中,使用至少 2 个分开的步骤或方法制备肽片段,随后连接所述片段以得到最终的肽产物。

[0329] 药物组合物和施用

[0330] 本发明的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物可配制成用于保存或施用的药物组合物,并且其在可药用载体中包含治疗有效量的本发明 GLP-2 肽或者其盐或衍生物。

[0331] 本发明化合物的治疗有效量取决于给药途径、受治哺乳动物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(concurrent medication)和其它因素。

[0332] 本发明中提供药物组合物,其中所述 GLP-2 类似物或其盐以有效治疗或预防胃和肠相关病症的量存在。

[0333] 利用有机和无机碱可形成具有酸性部分的本发明化合物的可药用盐。与碱形成的适当盐包括金属盐比如碱金属或碱土金属盐,例如钠、钾或镁盐;铵盐和有机胺盐,比如与吗啉、硫代吗啉、哌啶、吡咯烷、单-、二-或三羟基低级烷基胺(例如单-、二-或三乙醇胺)形成的盐。还可以形成内盐。相似地,当本发明的化合物包含碱性部分时,可利用有机和无机酸形成盐。例如,可由下述酸形成盐:醋酸、丙酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、延胡索酸、马来酸、丙二酸、苦杏仁酸、苹果酸、邻苯二甲酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲基磺酸、萘磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸和樟脑磺酸以及其它公知的可药用酸。还可利用氨基酸例如赖氨酸、甘氨酸或苯丙氨酸形成氨基酸加成盐。

[0334] 对医药领域中技术人员显而易见地,本发明的肽或药物组合物的“治疗有效量”将根据年龄、体重和受治哺乳动物的物种、使用的具体化合物、具体的给药方式以及所需效果和治疗适应证进行变化。由于这些因素与确定该量的关系是医药领域熟知的,因此确定治疗有效的剂量水平、实现预防和/或治疗本文描述的肠和胃相关疾病的理想结果所需的量以及本文公开的其它医学适应证将在技术人员的能力范围内。

[0335] 本文使用的“治疗有效量”是降低给定病症或病理的症状、优选使患有所述病症或

病理的个体的生理反应正常化的量。可以使用本领域的常规方法确定症状的降低或生理反应的正常化,并且可根据给定的病症或病理而改变。在一个方面中,一种或多种 GLP-2 类似物或含有一种或多种 GLP-2 类似物的药物组合物的治疗有效量是这样的量:其将可检测的生理参数恢复到与未患所述病症或病状的个体中所述参数基本相同的值(优选在所述值的 +30% 以内,更优选在 +20% 以内,并且还更优选在 +10% 以内)。

[0336] 在本发明的一个实施方案中,开始以较低的剂量水平施用本发明的化合物或药物组合物,提高剂量水平直至实现预防/治疗相关医疗适应证例如肠和胃相关疾病的理想效果。这将定义为治疗有效量。对于单独的或作为药物组合物一部分的本发明的肽,这样的剂量可以在约 0.01mg/kg 体重至 100mg/kg 体重之间,比如在约 0.01mg/kg 体重至 10mg/kg 体重之间,例如在 10 至 100 μ g/kg 体重之间。

[0337] 对于治疗用途,将选定的 GLP-2 类似物与可药用并且适于通过选定的给药途径递送肽的载体配制在一起。就本发明目的而言,外周肠胃外途径包括静脉内、肌内、皮下以及腹膜内给药途径。用于本发明的某些化合物还可能适于通过口服、直肠、鼻腔或下呼吸道途径给药。这些是所谓的非胃肠外(non-parenteral)途径。本发明的药物组合物包含本发明的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物以及可药用载体。适当的可药用载体是常规地与基于肽的药物一起使用的载体,比如稀释剂、赋形剂等。用于治疗用途的可药用载体是药学领域熟知的,并且描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)。例如,可以使用弱酸性或生理 pH 的无菌盐水和磷酸缓冲盐水。PH 缓冲剂可以是磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)、碳酸氢铵、二乙醇胺、组氨酸(是优选的缓冲剂)、精氨酸、赖氨酸、或乙酸盐或其混合物。优选的缓冲范围是 pH4 至 8、pH 6.5 至 8,更优选 pH 7 至 7.5。所述药物组合物中可包含防腐剂,例如对甲酚、间甲酚和邻甲酚、对羟苯甲酸甲酯和对羟苯甲酸丙酯、酚、苯甲醇、苯甲酸钠、苯甲酸、苯甲酸苄酯、山梨酸、丙酸、对羟基苯甲酸酯。所述药物组合物中可包含防止氧化、脱酰胺、异构化、消旋化、环化、肽水解的稳定剂,例如抗坏血酸、甲硫氨酸、色氨酸、EDTA、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、谷氨酰胺和甘氨酸。所述药物组合物中可包含防止聚集、纤维化和沉淀的稳定剂,比如十二烷基硫酸钠、聚乙二醇、羧甲基纤维素、环糊精。所述药物组合物中可包含增溶或防止聚集的有机改性剂,比如乙醇、乙酸或乙酸酯及其盐。所述药物组合物中可包含等渗剂比如盐例如氯化钠或最优选的碳水化合物例如葡萄糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、蔗糖或其混合物。

[0338] 所述药物组合物中可包含去污剂比如 Tween 20、Tween 80、SDS、泊洛沙姆例如 Pluronic F-68、Pluronic F-127。所述药物组合物中可包含染料甚至是芳香剂。在另一个实施方案中,包含 GLP-2 肽类似物的可药用酸加成盐。可以使用助悬剂。

[0339] 所述药物组合物中可包含有机调节剂比如乙醇、叔丁醇、2-丙醇、乙醇、甘油、聚乙二醇,用于冷冻冻干的产物。所述药物组合物中可包含填充剂和等渗剂比如盐例如氯化钠或最优选的碳水化合物例如葡萄糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、蔗糖或其混合物、氨基酸例如甘氨酸、谷氨酸或赋形剂半胱氨酸、卵磷脂或人血清白蛋白或其混合物用于冷冻。

[0340] 本发明的药物组合物可以配制以下形式并使用:用于口腔给药的片剂、胶囊剂或酞剂;用于直肠给药的栓剂;用于注射给药的优选的无菌溶液或无菌粉剂或悬液等等。可调整给药剂量和方法以实现最佳效力,但是将取决于这样的因素比如体重、饮食、并行的

药物处理和其它因素,这是医药领域中技术人员应当认识到的。

[0341] 当进行胃肠外给药时,比如静脉内和皮下,例如以每日为基础,注射用药物组合物可制备成水溶液或悬液的常规形式;适用在临用前重建或在注射前悬于液体中的冻干固体形式,或作为乳剂。

[0342] 用于重建冻干产品的稀释剂可以是上述列表中的适当缓冲剂、水、盐水、葡萄糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、蔗糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、盐酸半胱氨酸;或添加洗涤剂比如 Tween 20、Tween 80、SDS、泊洛沙姆例如 Pluronic F-68 或 Pluronic F-127、聚乙二醇和或添加防腐剂比如对甲酚、间甲酚和邻甲酚、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、酚、苯甲醇、苯甲酸钠、苯甲酸、苯甲酸苄酯、山梨酸、丙酸、对羟基苯甲酸酯和或添加有机改性剂比如乙醇、乙酸、柠檬酸、乳酸或其盐的注射用水。

[0343] 此外,如果需要,所述注射用药物组合物可包含少量非毒性辅助物质,比如湿润剂或 pH 缓冲剂。可使用增强吸收的制剂(例如脂质体、洗涤剂和有机酸)。

[0344] 在本发明的一个实施方案中,将化合物配制成用于输注给药,例如在用作全胃肠外营养治疗的患者(例如新生儿,或患有恶病质或厌食症的患者)的液体营养补充剂时,或用于注射给药,例如皮下、腹膜内或静脉内,并且相应地以无菌和无热原形式的水溶液使用,并优选地缓冲至生理上可接受的 pH,例如弱酸性或生理 pH。用于肌肉给药的制剂可基于植物油溶液或悬液,例如芸苔油、玉米油或大豆油。这些基于油的制剂可利用抗氧化剂进行稳定,例如 BHA(丁化羟基苯甲醚)和 BHT(丁化羟基甲苯)。

[0345] 因此,本发明的肽化合物可在载体如蒸馏水或盐水、磷酸缓冲盐水、5%葡萄糖溶液或油中施用。如果需要,可通过掺入增溶剂例如洗涤剂和乳化剂提高 GLP-2 类似物的溶解度。

[0346] 为了用作注射剂,可向水性载体或载体中补充明胶,所述明胶的量是在注射部位处或附近驻留 GLP-2 类似物使得 GLP-2 类似物向理想的作用部位缓慢释放的量。替代的凝胶剂比如透明质酸也可用作驻留剂(depot agents)。

[0347] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂包含:

[0348] a. 溶解在水中的 L-组氨酸,终浓度为 0.5mM 至 300mM,优选 3 至 200mM,最优选 20 至 100mM;

[0349] b. 甘露醇,最高为 350mM,优选 30 至 300mM,最优选 100mM 至 230mM;和

[0350] c. 乙酸,溶液中最高为 200mM,优选 0.05 至 100mM,最优选 0.5 至 50mM。

[0351] 添加适当量的治疗化合物以达到浓度为 1 至 100mg/mL,优选 5 至 50mg/mL,最优选 10 至 30mg/mL。将 pH 调整为终 pH 为 4 至 8,优选 6.5 至 7.5,最优选 6.7 至 7.3。将所得的溶液调整成目标重量,无菌过滤并以适当的等分试样分装到瓶中用于药用。按照液体产物或冻干产物进一步处理所述制剂。

[0352] 在本发明的另一个实施方案中,所述制剂包含:

[0353] a. 溶解在水中的 L-组氨酸,终浓度为 0.5mM 至 300mM,优选 3 至 200mM,最优选 20 至 100mM;

[0354] b. L-精氨酸,最高为 200mM,优选 0.5 至 100mM,最优选 5 至 50mM;

[0355] c. 甘露醇,最高为 350mM,优选 30 至 300mM,最优选 100 至 230mM;和

[0356] d. 醋酸,溶液中最高为 200mM,优选 0.05 至 100mM,最优选 0.5 至 50mM。

[0357] 添加适当量的治疗化合物以达到浓度为 1 至 100mg/mL, 优选 5 至 50mg/mL, 最优选 10 至 30mg/mL。将 pH 调整为终 pH 为 4 至 8, 优选 6.5 至 7.5, 最优选 6.7 至 7.3。将所得的溶液调整成目标重量, 无菌过滤并以适当的等分试样分装到瓶中用于药用。按照液体产物或冻干产物进一步处理所述制剂。

[0358] 在本发明的又一个实施方案中, 所述制剂包含:

[0359] a. 溶解在水中的 L- 组氨酸, 终浓度最高为 200mM, 优选 3 至 100mM, 最优选 5 至 50mM L- 组氨酸;

[0360] b. L- 精氨酸, 最高为 200mM, 优选 0.5 至 100mM, 最优选 5 至 50mM;

[0361] c. 甘露醇, 最高为 350mM, 优选 30 至 300mM, 最优选 100 至 230mM; 和

[0362] d. 醋酸, 溶液中最高为 200mM, 优选 0.05 至 100mM, 最优选 0.5 至 50mM。

[0363] 添加适当量的治疗化合物以达到浓度为 1 至 100mg/mL, 优选 5 至 50mg/mL, 最优选 10 至 30mg/mL。将 pH 调整为终 pH 为 4 至 8, 优选 6.5 至 7.5, 最优选 6.7 至 7.3。将所得的溶液调整成目标重量, 无菌过滤并以适当的等分试样分装到瓶中用于药用。按照液体产物或冻干产物进一步处理所述制剂。

[0364] 在本发明的又一个实施方案中, 所述制剂包含:

[0365] a. 溶解在水中的 L- 组氨酸, 终浓度为 0.5mM 至 300mM, 优选 3 至 200mM, 最优选 20 至 100mM;

[0366] b. L- 精氨酸, 最高为 200mM, 优选 0.5 至 100mM, 最优选 5 至 50mM;

[0367] c. 甘露醇, 最高为 350mM, 优选 30 至 300mM, 最优选 100 至 230mM; 和

[0368] d. 醋酸, 使得溶液中最高为 200mM, 优选 0.05 至 100mM, 最优选 0.5 至 50mM。

[0369] 添加适当量的治疗化合物以达到浓度为 1 至 100mg/mL, 优选 5 至 50mg/mL, 最优选 10 至 30mg/mL。将 pH 调整为终 pH 为 4 至 8, 优选 6.5 至 7.5, 最优选 6.7 至 7.3。将所得的溶液调整成目标重量, 无菌过滤并以适当的等分试样分装到瓶中用于药用。按照液体产物或冻干产物进一步处理所述制剂。

[0370] 在本发明的又一个实施方案中, 所述制剂包含:

[0371] a. 溶解在水中的 L- 组氨酸, 终浓度最高为 200mM, 优选 3 至 100mM, 最优选 5 至 50mM L- 组氨酸;

[0372] b. L- 精氨酸, 最高为 200mM, 优选 0.5 至 100mM, 最优选 5 至 50mM;

[0373] c. 甘露醇, 最高为 350mM, 优选 30 至 300mM, 最优选 100 至 230mM; 和

[0374] d. 醋酸, 使得溶液中最高为 200mM, 优选 0.05 至 100mM, 最优选 0.5 至 50mM。

[0375] 添加适当量的治疗化合物以达到浓度为 1 至 100mg/mL, 优选 5 至 50mg/mL, 最优选 10 至 30mg/mL。将 pH 调整为终 pH 为 4 至 8, 优选 6.5 至 7.5, 最优选 6.7 至 7.3。将所得的溶液调整成目标重量, 无菌过滤并以适当的等分试样分装到瓶中用于药用。按照液体产物或冻干产物进一步处理所述制剂。

[0376] 在本发明的又一个实施方案中, 所述制剂包含:

[0377] a. 溶解在水中的 N- 乙酸盐, 终浓度最高为 200mM, 优选 3 至 100mM, 最优选 5 至 50mM L- 组氨酸;

[0378] b 甘露醇, 最高为 350mM, 优选 30 至 300mM, 最优选 100 至 230mM; 和

[0379] 添加适当量的治疗化合物以达到浓度为 1 至 100mg/mL, 优选 5 至 50mg/mL, 最优选

10 至 30mg/mL。将 pH 调整为终 pH 为 4 至 8, 优选 6.5 至 7.5, 最优选 6.7 至 7.3。将所得的溶液调整成目标重量, 无菌过滤并以适当的等分试样分装到瓶中用于药用。按照液体产物或冻干产物进一步处理所述制剂。

[0380] 还可将本发明的 GLP-2 类似物配制成缓慢释放的植入装置, 用于延长和持续施用 GLP-2 肽类似物。这样的持续释放制剂可以是位于身体表面的贴片形式。持续释放制剂的实例包括生物相容性聚合物的复合材料, 比如聚(乳酸)、乳酸-羟基乙酸共聚物、甲基纤维素、透明质酸、唾液酸、硅酸盐、胶原、脂质体等。当希望提供本发明 GLP-2 类似物的高局部浓度时, 所述持续释放制剂是特别有意义的。

[0381] 可以以含有肠营养 (intestinitrophic) 量的肽的无菌-填充小瓶或安瓿形式、以单位剂量或多剂量的量应用 GLP-2 类似物。所述小瓶或安瓿可含有 GLP-2 类似物和理想的载体, 作为可施用的制剂。或者, 所述小瓶或安瓿可含有适于在适当载体(如无菌水或磷酸缓冲盐水)中重建的形式(如冷冻形式)的 GLP-2 肽。

[0382] 作为注射制剂的替代方案, GLP-2 类似物可配制成用于通过其它途径给药。可根据标准药物实践配制口服剂型比如片剂、胶囊剂等。根据本发明, 施用 GLP-2 类似物以治疗将受益于小肠组织生长的个体。

[0383] 可通过加入增强剂例如壳聚糖或洗涤剂例如 Tween 20、Tween80、泊洛沙姆例如 Pluronic F-68、Pluronic F-127、Brij 35、Brij 72、cremophor EL 来配制鼻腔剂型。

[0384] 本发明的肽化合物可单独使用, 或者与具有抗炎效应的化合物组合使用。不限于理论地, 设想这样的组合治疗可增强本发明肽类似物的有益治疗效果。

[0385] 当然, 最适于患者治疗的治疗剂量和方案将根据待治疗的疾病或病症以及患者的体重和其它参数而变化。不希望限于任何特定理论地, 预计 $\mu\text{g/kg}$ 范围内的剂量以及更短或更长的治疗时间或频率可产生治疗上有用的结果, 比如尤其是小肠质量的统计学显著性增加。在一些情况下, 治疗方案可包括施用维持剂量, 所述剂量适于预防初始治疗停止后出现的组织退化。可根据本发明得到的结果指导最适于人类应用的剂量大小和给药方案, 并可在正确设计的临床试验中进行证实。

[0386] 可通过常规手段确定有效剂量和治疗方案, 从实验动物中的低剂量开始, 然后提高剂量同时监测效果, 并系统性地变化给药方案。在对给定的对象确定最佳剂量时, 临床医生可考虑许多因素。这样的考虑因素是技术人员公知的。

[0387] 在一个实施方案中, 本发明 GLP-2 肽的人类剂量可以从约 $10\mu\text{g/kg}$ 体重/天至约 10mg/kg /天, 优选约 $50\mu\text{g/kg}$ /天至约 5mg/kg /天, 并且最优选约 $100\mu\text{g/kg}$ /天至约 1mg/kg /天。

[0388] 医疗条件

[0389] 通过施用有效量的本文所述的 GLP-2 类似物或其盐, 本发明的肽可用作预防或治疗患有胃肠(包括食管上消化道)病症的个体的药剂。所述胃和肠相关病症包括任何病因的溃疡(例如消化性溃疡、药物诱发的溃疡、与感染或其它病原体有关的溃疡)、消化病症、吸收不良综合征、短肠综合征、盲管综合征、炎性肠病、腹型斯泼卢腹泻(例如由麸质诱发的肠病或乳糜泻病引起)、热带型斯泼卢腹泻、低丙种球蛋白血症型斯泼卢腹泻、肠炎、溃疡性结肠炎、小肠损伤和化学疗法诱发的腹泻/粘膜炎(CID)。

[0390] 如上文一般所述, 将受益于小肠质量提高以及随后发生和/或维持正常小肠粘膜

结构和功能的个体是采用本发明 GLP-2 类似物治疗的候选者。可用 GLP-2 类似物治疗的具体病症包括多种形式的斯泼卢腹泻,包括腹型斯泼卢腹泻,其由热 α -麦醇溶蛋白的毒性反应引起,并且可能是麸质诱发的肠病或乳糜泻病的结果,以小肠绒毛的显著丧失为特征;热带型斯泼卢腹泻,由感染引起,以绒毛的部分扁平为特征;丙种球蛋白血症型斯泼卢腹泻,通常在患有普通变异型免疫球蛋白缺乏症或低丙种球蛋白血症的患者中观察到,以绒毛高度显著降低为特征。GLP-2 类似物治疗的治疗效力可通过检查绒毛形态的肠活检、营养吸收的生物化学评估、患者的体重增加、或这些病症相关症状的改善来监测。

[0391] 除上述以外,可用本发明 GLP-2 类似物治疗或可用 GLP-2 类似物预防的其它病症还包括上述放射性肠炎、传染性肠炎或感染后肠炎以及由于癌症化学治疗剂或毒剂引起的小肠损伤。

[0392] GLP-2 类似物还可用于治疗营养不良,例如恶病质和厌食症。

[0393] 本发明的具体实施方案涉及使用本发明的肽预防和/或治疗肠损伤和功能障碍。这样的损伤和功能障碍是癌症化学疗法治疗熟知的副作用。化学疗法的施用经常伴随着涉及胃肠系统的不需要的副作用,比如粘膜炎、腹泻、细菌易位、吸收不良、腹部痛性痉挛、胃肠出血和呕吐。这些副作用是肠上皮结构和功能损伤的临床结果,经常使得必须降低化学疗法的剂量和频率。施用本发明的 GLP-2 肽激动剂可增强肠隐窝的营养效应并且迅速提供新细胞以取代化学疗法后损伤的肠上皮。施用本发明肽实现的最终目标是降低进行化学疗法治疗患者中相关胃肠损伤的发病率,同时产生癌症治疗的最佳化学疗法方案。根据本发明,可向正在进行或准备进行放射疗法的患者提供伴随的预防性或治疗性治疗。

[0394] 由于增殖迅速,小肠粘膜干细胞对化学疗法的细胞毒效应特别敏感(Keefe 等, Gut 2000 ;47 :632-7)。临床上,化学疗法引起的小肠粘膜损伤通常称为胃肠粘膜炎症,特征为小肠吸收和屏障受损。例如,已经显示广泛应用的化学治疗剂 5-FU、伊立替康和氨甲蝶呤提高凋亡,引起啮齿动物小肠绒毛萎缩和隐窝发育不全(Keefe 等, Gut 47 :632-7, 2000 ; Gibson 等, J Gastroenterol Hepatol. Sep ;18(9) :1095-1100, 2003 ;Tamaki 等, J Int Med Res. 31(1) :6-16, 2003)。在人中,已经显示化学治疗剂在施用后 24 小时提高肠隐窝中的凋亡,并且其后在化学治疗后 3 天降低绒毛面积、隐窝长度、每个隐窝的有丝分裂数和肠细胞高度(Keefe 等, Gut 2000 ;47 :632-7)。因此,小肠内的结构变化直接导致肠功能障碍,并在一些情况下导致腹泻。

[0395] 癌症化学疗法后的胃肠粘膜炎症是一旦出现就基本上不能治疗的日益严重的问题,尽管能逐渐缓和。利用常用的细胞抑制癌症药物 5-FU 和伊立替康进行的研究证明,使用这些药物的有效化学疗法主要影响小肠的结构完整性和功能,而结肠的敏感性较低,并且主要应答为粘液形成的提高(Gibson 等, J Gastroenterol Hepatol. Sep ;18(9) :1095-1100, 2003 ;Tamaki 等, J Int Med Res. 31(1) :6-16, 2003)。

[0396] 本发明的新 GLP-2 类似物可用于预防和/或治疗化学治疗剂的胃肠损伤和副作用。这种可能很重要的治疗应用可适用于目前使用的化学治疗剂,例如但不限于:5-FU、六甲蜜胺、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、Crisantaspase、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、多西紫杉醇、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、脂质体多柔比星、亚叶酸、洛莫司汀、美法仑、巯嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉

素、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、Pemetrexed、喷司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、链脲菌素、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、塞替派、硫鸟嘌呤 / 硫代鸟嘌呤、托泊替康、曲奥舒凡、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、Crisantaspase、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、多西紫杉醇、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、脂质体多柔比星、亚叶酸、洛莫司汀、美法仑、巯嘌呤、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、Pemetrexed、喷司他丁、丙卡巴肼、雷替曲塞、链脲菌素、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、塞替派、硫鸟嘌呤 / 硫代鸟嘌呤、托泊替康、曲奥舒凡、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0397] 设想可通过施用有效量的 GLP-2 类似物或其盐将本发明的肽用于治疗新生儿的方法中。通过利用本发明的肽激动剂可克服由于缺少肠发育造成的喂养新生儿的相关并发症。

[0398] 在本发明的另外一个实施方案中，描述了通过向有此需要的患者施用有效量的 GLP-2 类似物或其盐来治疗 DPP-IV (二肽基肽酶-IV) 介导的病症的方法。这样的疾病包括 DPP-IV 酶过表达的病症。

[0399] 在一个实施方案中，可将药物组合物配制成引起上述 GLP-2 类似物或其盐或衍生物的缓慢释放。

[0400] 设想可通过施用有效量的 GLP-2 类似物或其盐将本发明的肽用于治疗新生儿的方法中。通过利用本发明的肽激动剂可克服由于缺少肠发育造成的喂养新生儿的相关并发症。

[0401] 在本发明的另外一个实施方案中，描述了通过向有此需要的患者施用有效量的 GLP-2 类似物或其盐来治疗 DPP-IV (二肽基肽酶-IV) 介导的病症的方法。这样的疾病包括 DPP-IV 酶过表达的病症。

[0402] 实施例

[0403] 提供下述实施例用于说明本发明的优选方面，而不意在限制本发明的范围。

[0404] 一般肽合成

[0405] 仪器和合成策略

[0406] 在装有益于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中分批合成肽，使用 9- 芴甲氧羰基 (Fmoc) 作为 N- α - 氨基保护基和适当的通用侧链功能性保护基。

[0407] 溶剂

[0408] 将溶剂 DMF (N,N- 二甲基甲酰胺, Riedel de-Haen, Germany) 通过填充强阳离子交换树脂 (Lewatit S 100MB/H strong acid, Bayer AG Leverkusen, Germany) 的柱进行纯化，并在使用前加入 3,4- 二氢 -3- 羟基 -4- 氧代 -1,2,3- 苯并三嗪 (Dhbt-OH) 分析其中的游离胺，如果存在游离胺，则产生黄色 (Dhbt-O⁻ 阴离子)。不经纯化直接使用溶剂 DCM (二氯甲烷, 分析级, Riedel de-Haen, Germany)。不经纯化直接使用乙腈 (HPLC- 级, Lab-Scan, Dublin Ireland)。

[0409] 氨基酸

[0410] 以适当的侧链保护形式从 Advanced ChemTech (ACT) 购得 Fmoc 保护的氨基酸。

[0411] 偶联试剂

[0412] 偶联试剂二异丙基碳二亚胺 (DIC) 购自 Riedel de-Haen, Germany。

[0413] 固体支持物

[0414] 在 TentaGel S 树脂 0.22-0.31mmol/g 上合成肽,在优选 C 端酰胺化肽的情况下使用 TentaGel S-Ram、TentaGel SRAM-Lys(Boc)Fmoc(Rapp polymere, Germany),而当优选 C 端游离羧酸时使用 TentaGel S PHB, TentaGel S PHB Lys(Boc)Fmoc。

[0415] 催化剂和其它试剂

[0416] 二异丙基乙胺 (DIEA) 购自 Aldrich, Germany, 哌啶和吡啶来自 Riedel-de Haen, Frankfurt, Germany。ethandithiol 购自 Riedel-de Haen, Frankfurt, Germany。3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (Dhbt-OH)、1-羟基苯并三唑 (HObt) (HOAt) 得自 Fluka, Switzerland。乙酸酐得自 Fluka。

[0417] 偶联方案

[0418] 在 DMF 中通过 DIC 法由适当的 N- α -保护的氨基酸和 HObt 或 HOAt 将氨基酸偶联为原位合成的 HObt 或 HOAt 酯。在 80℃ 进行茚三酮测试检查酰化作用,以防止测试期间 Fmoc 去保护 (Larsen, B. D. and Holm, A., Int. J. Peptide Protein Res. 43, 1994, 1-9)。

[0419] N- α -氨基保护基 (Fmoc) 的去保护

[0420] 按以下进行 Fmoc 基的去保护:利用 DMF 中的 20% 哌啶进行处理 (1×5 和 1×10 分钟),随后用 DMF 冲洗 (5×15ml, 每次 5 分钟) 直到向排出的 DMF 中加入 Dhbt-OH 后不能检测到黄色为止。

[0421] HObt-酯的偶联

[0422] 将 3 份 N- α -氨基保护的氨基酸与 3 份 HObt 和 3 份 DIC 一起溶解在 DMF 中,然后加入树脂中。

[0423] 用酸从树脂中切割肽

[0424] 利用 95% 三氟乙酸 (TFA, Riedel-de Haen, Frankfurt, Germany)-水 (体积/体积) 或 95% TFA 和 5% 乙二硫醇 (体积/体积) 在室温下处理 2 小时从树脂中切割肽。用 95% TFA-水洗涤过滤的树脂,减压蒸发滤液和洗液。用醚冲洗残留物并在醋酸-水中冻干。通过高效液相层析 (HPLC) 分析粗冷冻产物并通过质谱 (MS) 进行鉴定。

[0425] 在 TentaGel 树脂 (PEG-PS) 上进行分批肽合成

[0426] 将 TentaGel 树脂 (1g, 0.23-0.24mmol/g) 置于装有益于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中。所述树脂在 DMF (15ml) 中膨胀,并用 DMF 中的 20% 哌啶处理,以除去接头 TentaGel S RAM 上或树脂 TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc 的第一个氨基酸上的初始 Fmoc 基团。排干树脂并用 DMF 洗涤直到向排出的 DMF 中加入 Dhbt-OH 后不能检测到黄色为止。如上述将根据序列的氨基酸偶联为预制的 Fmoc-保护的 HObt 酯 (3 份)。除非另外指出,继续偶联 2 小时。排干树脂并用 DMF (5×15ml, 每次 5 分钟) 洗涤以除去过量的试剂。通过上述茚三酮测试检查所有的酰化作用。完成合成后,用 DMF (3×15ml, 每次 5 分钟)、DCM (3×15ml, 每次 1 分钟) 以及最后用二乙醚 (3×15ml, 每次 1 分钟) 洗涤肽-树脂,并真空干燥。如上所述从树脂中切割肽并如下所述分析和纯化粗肽产物。

[0427] HPLC 条件

[0428] 用 HP 1100 四元泵、HP 1100 自动进样器、HP 1100 柱恒温器和 HP 1100 多波长检测器组成的 Hewlett Packard HP 1100HPLC 系统进行梯度 HPLC 分析。使用 Hewlett

Packard Chemstation for LC 软件 (A.06.01 版) 进行仪器控制和数据采集。使用以下的柱和 HPLC 缓冲系统：

[0429] 柱：VYDAC 238TP5415, C-18, 5mm, **300Å** 150×4.6mm。

[0430] 缓冲液：A：MQV 中 0.1% 的 TFA；B：0.085% TFA、10% MQV、90% MeCN。

[0431] 梯度：0-1.5 分钟 0% B

[0432] 1.5-25 分钟 50% B

[0433] 25-30 分钟 100% B

[0434] 30-35 分钟 100% B

[0435] 35-40 分钟 0% B

[0436] 流速 1ml/分钟, 箱温度 40℃, UV 检测：I = 215nm。

[0437] 粗肽的 HPLC 纯化

[0438] 通过 PerSeptive Biosystems VISION 工作站纯化粗肽产物, VISION 3.0 软件用于仪器控制和数据采集。使用下述柱和 HPLC 缓冲系统：

[0439] 柱：Kromasil KR **100 Å**, 10mm C-8, 250×50.8mm。

[0440] 缓冲体系：缓冲液：A：MQV 中 0.1% 的 TFA；B：0.085% TFA、10% MQV、90% MeCN。

[0441] 梯度：0-37 分钟 0-40% B

[0442] 流速 35ml/分钟, UV 检测：I = 215nm 和 280nm。

[0443] 质谱

[0444] 将肽溶解在超梯度甲醇 (Labscan, Dublin, Ireland)、milli-Q 水 (Millipore, Bedford, MA) 和甲酸 (Merck, Darmstadt, Germany) (50 : 50 : 0.1v/v/v) 中得到 1 至 10mg/ml 的浓度。利用准确度为 $\pm 0.1m/z$ 的 LCT 质谱仪 (Micromass, Manchester, UK) 通过 ESI-TOF-MS 以正极性方式分析肽溶液 (20ml)。

[0445] 一般合成方案

[0446] 在所有合成中, 将干燥的 Tentagel-S-Ram 树脂 (1g, 0.22-0.31mmol/g) 置于装用于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中。所述树脂在 DMF (15ml) 中膨胀, 并用含有 20% 哌啶的 DMF 处理以保证树脂上非质子化氨基的存在。排干树脂并用 DMF 洗涤, 直到向排出的 DMF 中加入 Dhbt-OH 后不能检测到黄色为止。如上述将根据序列的氨基酸偶联为预制的 Fmoc-保护的 HOBT 酯 (3 份)。除非另外指出, 继续偶联 2 小时。排干树脂并用 DMF (5×15ml, 每次 5 分钟) 洗涤以除去过量的试剂。在 80℃ 进行茚三酮测试检查所有的酰化作用。完成合成后, 用 DMF (3×15ml, 每次 5 分钟)、DCM (3×15ml, 每次 1 分钟) 以及最后用二乙醚 (3×15ml, 每次 1 分钟) 洗涤肽-树脂, 并真空干燥。如上所述从树脂中切割肽并冻干。利用上述制备性 HPLC 纯化后, 收集肽产物并通过 ES-MS 确定肽的身份。该方案用于合成下文进一步示例的所有肽。

[0447] 合成的化合物

[0448] 利用上述技术, 使用上述方法合成化合物 1809 至 1861 以及参照化合物 1559 (H-[Gly2]hGLP-2-OH) (表 1)。

[0449] 表 1：合成的化合物

[0450]

化合物 #	序列	Mw 计算值	Mw 实测值	纯度 %	产量 *
1559	H HGDGSFSDEMTILDNLAARDFIWLIQTKITD NH2	3749.80	3749.16	95	5.4
1809	H HEGTFSDELATILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4341.42	4341.62	96	46.5
1810	H HEGTFSDELATILDALAARIFIWLIATKKKKKKK NH2	4010.32	4010.63	91	20
1811	H HGDGSPSDELATILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3494.8	3494.13	94	44.7
1812	H HEGGSFSDELATILDNLAARDFIWLIQTKITD NH2	3658.86	3658.3	91	8
1813	H HGDGSFSDELATILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3544.82	3545	95	15.9
1814	H HGDGSFSDELATILDNLAARDFIWLIATKITD NH2	3587.83	3588	92	31
1815	H HEGGSFSDELATILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3558.84	3559	95	33
1818	H HGDGSFSSELATILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4056.26	4056.25	92	68.3
1819	H HGDGSFSDELSTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4100.25	4100.13	92	38.7
1820	H HGDGSFTSELATILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4070.28	4070.38	94	63.3
1821	H HGDGSFSDELKTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4141.32	4141.5	93	57.3
1822	H HGDGSFTDELKTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4155.33	4155.13	94	72
1823	H HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4127.34	4127.9	95	100.3
1824	H HGDGSFTDELATILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4098.27	4098.25	95	33.9
1825	H HGDGSFSSELATILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3287.69	3287.75	92	82.0
1826	H HGDGSFSDELNTILDNLAARDFIWLIQTKITDKKKKKK NH2	4456.42	4456.38	93	68.9
1827	H HGDGSFTDELSTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4114.27	4114.63	93	20.2
1828	H HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4086.27	4086.63	94	84.5
1829	H HGDGSFSSELSTILDNLAARDFIWLIQTKKKKKK NH2	4072.26	4072.5	95	51.8
1830	H HGDGSFSDELSTILDNL AARDFIWLIQTK NH2	3331.68	3331.88	94	26.4
1831	H HGDGSFTDELSTILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3345.7	3345.38	94	46.0
1832	H HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3317.7	3117.88	94	17.5
1833	H HGDGSFSSELSTILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3303.69	3304.13	97	34.5
1834	H HGDGSFTSELATILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3301.71	3301.75	94	16.0
1835	H HGDGSFSDELKTILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3372.75	3373.13	94	89.7
1836	H HGDGSFTDELKTILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3386.76	3386.88	92	26.0
1839	H HGDGSFSDELATILDNLAARDFIWLIQTKITDKKKKKK NH2	4413.42	4413.88	92	18.2
1840	H HGDGSFSDELATILDNLAARDFIWLIQTKITD NH2	3644.85	3644.88	95	21.3
1841	H HGDGSFSDELATILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3315.69	3315.88	91	73.6
1842	H HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3358.77	3358.88	97	26.3
1843	H HGDGSFTDELATILDNLAARDFIWLIQTK NH2	3329.7	3329.88	90	23.6
1844	H HEGTFSSELSTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4329.42	4329.63	90	46.0
1845	H HEGTFSDELSTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4357.42	4357.38	93	52.5
1846	H HEGGSFSSELSTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4315.41	4315.38	90	28.8
1847	H HEGGSFSDELSTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4343.4	4343.5	90	59.4
1848	H HEGTFSSELATILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4313.43	4313.63	90	230.0
1849	H HEGGSFSSELATILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4299.41	4299.5	97	68.0
1850	H HEGGSFSDELKTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4384.46	4384.63	93	38.0

[0451]

1851	H HEGTFSDELKTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4398.48	4398.38	95	90.6
1852	H HEGTFSSELKTILDALAARDFIWLIATKITDKKKKKK NH2	4370.48	4370.63	95	63.2
1853	H HEGTFSSELSTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3560.85	3560.13	97	18.0
1854	H HEGTFSDELSTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3588.85	3589.13	96	17.5
1855	H HEGGSFSSELSTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3546.84	3547	96	27.3
1856	H HEGGSFSDELSTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3574.83	3575	96	18.0
1857	H HEGTFSSELATILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3544.86	3544.88	94	39.3
1858	H HEGGSFSSELATILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3530.84	3530.88	90	43.3
1859	H HEGGSFSDELKTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3615.89	3615.13	90	11.4
1860	H HEGTFSDELKTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3629.91	3629.13	92	13.9
1861	H HEGTFSSELKTILDALAARDFIWLIATKITD NH2	3601.91	3601.13	99	16.2

[0452] *) 产量 ;产量 /g 树脂

[0453] 实施例 1. 化合物 1846 的合成

[0454] TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc 上的

[0455] H-His-Gly-Glu-Gly-Ser-Phe-Ser-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Ile-Leu-AsD-Ala-L

eu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂。

[0456] 将干燥的 TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc (0.24mmol/g, 1g) 置于装有利于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中, 并如“TentaGel 树脂上分批式肽合成”所述进行处理直到完成 N 端组氨酸的偶联。所有偶联均持续过夜。如上所述检查酰化作用。完成合成和 N 端 Fmoc 基团去保护后, 如上所述从树脂中切割肽。如上所述利用制备性 HPLC 纯化后, 收集了 28.8mg 纯度高于 90% 的肽产物, 并通过 MS 确定肽的身份 (实测 M 4315.38, 计算 M 4315.41)。

[0457] 实施例 2. 化合物 1848 的合成

[0458] TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc 上的

[0459] H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Ser-Ser-Glu-Leu-Ala-Thr-Ile-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂。

[0460] 将干燥的 TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc (0.24mmol/g, 1g) 置于装有利于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中, 并如“TentaGel 树脂上分批式肽合成”所述进行处理直到完成 N 端组氨酸的偶联。所有偶联均持续过夜。如上所述检查酰化作用。完成合成和 N 端 Fmoc 基团去保护后, 如上所述从树脂中切割肽。如上所述利用制备性 HPLC 纯化后, 收集了 230mg 纯度高于 90% 的肽产物, 并通过 MS 确定肽的身份 (实测 M 4313.63, 计算 M 4313.43)。

[0461] 实施例 3. 化合物 1855 的合成

[0462] FentaGel S RAM-Asp(OtBu)Fmoc 上的

[0463] H-His-Gly-Glu-Gly-Ser-Phe-Ser-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Ile-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂。

[0464] 将干燥的 TentaGel S RAM-Asp(OtBu)Fmoc (0.2mmol/g, 1g) 置于装有利于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中, 并如“TentaGel 树脂上分批式肽合成”所述进行处理直到完成 N 端组氨酸的偶联。所有偶联均持续过夜。如上所述检查酰化作用。完成合成和 N 端 Fmoc 基团去保护后, 如上所述从树脂中切割肽。如上所述利用制备性 HPLC 纯化后, 收集了 27.3mg 纯度高于 90% 的肽产物, 并通过 MS 确定肽的身份 (实测 M 3547, 计算 M 3546.84)。

[0465] 实施例 4. 化合物 1857 的合成

[0466] FentaGel S RAM-Asp(OtBu)Fmoc 上的

[0467] H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Ser-Ser-Glu-Leu-Ala-Thr-Ile-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂。

[0468] 将干燥的 TentaGel S RAM-Asp(OtBu)Fmoc (0.2mmol/g, 1g) 置于装有利于过滤的聚丙烯滤器的聚乙烯容器中, 并如“TentaGel 树脂上分批式肽合成”所述进行处理直到完成 N 端组氨酸的偶联。所有偶联均持续过夜。如上所述检查酰化作用。完成合成和 N 端 Fmoc 基团去保护后, 如上所述从树脂中切割肽。如上所述利用制备性 HPLC 纯化后, 收集了 39.3mg 纯度高于 90% 的肽产物, 并通过 MS 确定肽的身份 (实测 M 3544.88, 计算 M 3544.86)。

[0469] 实施例 5. 化合物 1846A (乙酸盐) 的合成

[0470] 由三氟乙酸反离子交换为化合物 1846 的乙酸盐。

[0471] 由于用于纯化粗合成肽产物的 HPLC 缓冲液中存在三氟乙酸 (0.1% 体积 / 体积), 因此以三氟乙酸盐分离经纯化的化合物 1846 合成肽产物。

[0472] 为了与乙酸交换反离子三氟乙酸,使肽溶液通过在乙酸上填充强碱离子交换树脂的柱(Dowe×1×8)。将365mg化合物1溶解在40ml水中。使所述溶液通过在乙酸上含有40ml强碱离子交换树脂的柱(Dowe×1×8;容量1.33meq/ml树脂)。然后用4×30ml水洗涤树脂,收集洗脱液并冻干得到312mg乙酸盐,根据HPLC分析的纯度为97%。

[0473] 实施例6. 化合物1848C(盐酸盐)的合成

[0474] 由三氟乙酸(Tfa)反离子交换为化合物1846的氯化物(Cl⁻)。

[0475] 将100mg化合物溶解在50ml 0.1M盐酸中并冻干所得的溶液。将剩余物溶解在50ml水中并再次冻干得到80mg盐酸盐,根据HPLC的纯度为93%。

[0476] 实施例7-化学稳定性测试

[0477] 将GLP-2类似物溶解在纯净水中并随后稀释在含有HCl、NaOH、H₂O₂或NH₄HCO₃的溶液中。在40℃孵育所述溶液以产生水解、脱酰胺和氧化产物。通过RP-HPLC分析样品并测定剩余的完整化合物的百分率作为相对稳定性的度量。通过LC-MS试验性地确定主要的降解产物。表3中列举了所用的肽。

[0478] 表2. 测试并比较化学稳定性的GLP-2类似物

[0479]

化合物号	批号	单同位素 MW (g/mol)	肽含量 (%)	纯度 RP-HPLC (%)
ZP1559	70.30 AB and K 1A	3749.80	90	96
ZP1820	78.65 1A	4070.28	80	94
ZP1834	78.90 1A	3301.71	88	94
ZP1846	107.07 1A	4315.41	80	90
ZP1848	91.58 1A	4313.43	80	90
ZP1849	91.60 1A	4299.41	79	97
ZP1855	88.49 1A-2-1A	3546.84	89	96
ZP1857	108.01 X-1A	3544.86	89	94
ZP1858	108.05 1A	3530.84	89	90

[0480] 化合物ZP1559、Gly²-GLP-2用作被测试的其它GLP-2类似物的参照。在GLP-2类似物中,以粗体显示序列中不同于参照化合物ZP1559的位置。表3中列举了所述序列。

[0481] 根据其序列以及含有和不含有C端-K₆延伸以配对形式列举化合物。

[0482] 表3. Gly²-GLP-2和GLP-2类似物的序列

[0483]

化合物	序列
ZP1559	HGDGS FSDEM NTILD NLAAR DFINW LIQTK ITD-OH
ZP1820	HGDGS FTSEL ATILD NLAAR DFIAW LIQTK K ₆ -NH ₂
ZP1834	HGDGS FTSEL ATILD NLAAR DFIAW LIQTK-NH ₂
ZP1846	HGECS FSSEL STILD ALAAR DFIAW LIATK ITD K ₆ -NH ₂
ZP1855	HGECS FSSEL STILD ALAAR DFIAW LIATK ITD-NH ₂
ZP1848	HGECS FSSEL ATILD ALAAR DFIAW LIATK ITD K ₆ -NH ₂
ZP1857	HGECS FSSEL ATILD ALAAR DFIAW LIATK ITD-NH ₂
ZP1849	HGECS FSSEL ATILD ALAAR DFIAW LIATK ITD K ₆ -NH ₂
ZP1858	HGECS FSSEL ATILD ALAAR DFIAW LIATK ITD-NH ₂

[0484] 表 4 列举了实验中所用的化学品。

[0485] 表 4. 用于分析方案的化学品和试剂

[0486]

物质	质量	供应商	产品
乙腈 (MeCN)	HPLC 级	Riedel-deHaën	34851
三氟乙酸 (TFA)	99.9 %	Pierce	28904
甲酸 (FA)	98-100 %	Merck	1.00264.1000
盐酸 HCl	"Baker 分析级"	J.T.Baker	7088
氢氧化钠 NaOH	"Baker 分析级"	J.T.Baker	7098
过氧化氢 H ₂ O ₂	30 % w/w	Sigma-Aldrich	H1009
NH ₄ HCO ₃	99.0 %	AnalaR	103025E

[0487] 首先去除水中的矿物质使得电阻 > 18MΩ cm, 然后将其通过 Milli-Q 系统 (Millipore, Bedford, USA)。最后使 Milli-Q 纯化水 (MQW) 通过 0.22-μm 无菌滤器 (Millipak 40 Gamma Gold, Millipore)。

[0488] 将测试的 GLP-2 类似物和参照 Gly²-GLP-2、ZP1559 溶解在水中, 随后稀释到含有 HCl、NaOH、H₂O₂ 或 NH₄HCO₃ 的溶液中。在 40℃ 孵育所述溶液以分别产生水解、脱酰胺和氧化产物。通过 RP-HPLC 分析化合物中原始主峰的纯度并通过 LC-MS 由主峰和主要降解产物的质量确定特征。

[0489] 胁迫溶液的制备

[0490] 0.2M HCl : 4mL MQW 和 1mL 1M HCl。

[0491] 0.02M NaOH : 4mL MQW 和 1mL 0.1M NaOH。

[0492] 0.2M NH₄HCO₃, pH 8 : 0.79g NH₄HCO₃ 溶解在 50mL MQW 中。

[0493] 1% H₂O₂ : 5.8mL MQW 和 0.2mL 30% H₂O₂。

[0494] 样品溶液 :

[0495] 首先将 GLP-2 类似物溶解在 MQW 中, 浓度为 4mg/mL, 然后以 1 : 1 比例 (例如 125 μL 加 125 μL) 进一步稀释在所述胁迫溶液中。对于分别为 0.1M HCl、0.01M NaOH、0.1M NH₄HCO₃ 和 0.5% H₂O₂ 的胁迫条件, GLP-2 类似物的终浓度为 2mg/mL。

[0496] 在通过 RP-HPLC 和 LC-MS 分析之前, 在 40℃ 下在黑暗中孵育所述溶液, 然后稀释在洗脱液 A 中, 浓度为 0.5mg/mL (加入 750 μL)。

[0497] 表 5. 胁迫测试的条件

[0498]

溶液	0.1M HCl	0.01M NaOH	0.1M NH ₄ HCO ₃	0.5% H ₂ O ₂
温度 (°C)	40	40	40	40
保存 (天数)	12	3	6	3

[0499] RP-HPLC

[0500] 在 Agilent Technologies, Inc. 的 ChemStation (A.08.03[847] 版) 软件的 Agilent Series 1100HPLC 系统上进行 RP-HPLC 分析。利用 Agilent Technologies Revision B01.03 软件将原始数据和峰整合结果存放到 ChemStore C/S 服务器上。

[0501] 表 6. RP-HPLC 法

[0502]

方法文件名	P2204071.M
柱	Vydac 218MS52, 5 μ m, 300 Å, 2.1 x 250 mm
梯度(时间 ; % B)	0;5, 2;5, 7;15, 25;30, 45;40, 65;50, 70;100, 73;100, 75;5, 90;5
洗脱液A	0.05% TFA, 0.05% FA , MQW中
洗脱液B	0.05% TFA, 0.05% FA , MeCN中
流速	0.200 mL/ 分钟
选样体积	20 μ L
柱温	25°C
自动进样器温度	4°C
UV检测	220 nm

[0503] LC-MS

[0504] 在由在线脱气设备、四元梯度泵、自动进样器、柱恒温器、UV检测器组成的Agilent Technologies 1100HPLC 仪器上进行分析性 LC-MS 分析。所述 HPLC 仪器与受控于来自 MicroMass, UK 的 Masslynx 3.5 软件的 Micromass LCT (ESI-TOF) 质谱仪相连。

[0505] 表 7. LC-MS 法

[0506]

方法文件名	P22_04_071_003.M
柱	Vydac 218MS52, 5 μ m, 300 Å, 2.1 x 250 mm
梯度(时间 ; % B)	0;5, 2;5, 7;15, 25;30, 45;40, 65;50, 70;100, 73;100, 75;5, 90;5
洗脱液A	0.05% TFA, 0.05% FA , MQW中
洗脱液B	0.05% TFA, 0.05% FA , MeCN中
流速	0.200 mL/分钟
选样体积	30 μ L
柱温	25°C
自动进样器温度	4°C
UV检测	220 nm

[0507] 表 8. 根据 SOP22-3003 的 MS 设置

[0508]

锥孔电压	30V
毛细管电压	3.1kV
氮雾化气流速	100L/hr
去溶剂化气流速	500L/hr
去溶剂化温度	250°C
源模块温度	100°C

[0509] 表 9 中显示在胁迫条件下孵育后通过 RP-HPLC 测量的化合物纯度结果。现对于 T = 0 测量的纯度, 该纯度是在胁迫溶液中孵育后剩余完整化合物的度量。这些结果不考虑通过该分析性 RP-HPLC 法未观察到的可能隐藏的降解产物。

[0510] 通过 LC-MS 法试验性地确定胁迫试验样品中的主要降解产物。通过该 LC-MS 法未观察到母体化合物的任何异构体以及次要的降解产物。表 11 至 15 列举试验性的鉴定。

[0511] 根据其序列以及含有和不含有 C 端 -K₆ 延伸以配对形式列举 GLP-2 类似物。

[0512] 表 9. 在胁迫条件下孵育后观察到的测试化合物纯度

[0513]

GLP-2 类似物	序列 +/- C-端 K ₆	纯度 HCl 0.1 M 12 天 (%)	纯度 H ₂ O ₂ 0.5 % 3 天 (%)	纯度 NH ₄ HCO ₃ 0.1 M 6 天 (%)
ZP1559	参照物	57	< 5	66
ZP1820	K ₆	45	62	85
ZP1834	-	38	53	91
ZP1846	K ₆	70	64	82
ZP1855	-	85	14	97
ZP1848	K ₆	63	68	93
ZP1857	-	86	59	96
ZP1849	K ₆	64	78	86
ZP1858	-	88	60	91

[0514] 未列举在 NaOH 中孵育的化合物的结果, 因为未能观察到稳定性的差异。通过 LC-MS 分析, 降解产物和主峰都具有相同的质量; 这些化合物可能随时间发生外消旋化。表 9 中的结果显示, 被测试的 GLP-2 类似物一般比 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 具有更好的化学稳定性。

[0515] 酸水解中, 除了 ZP1820 和 ZP1834 以外, 测试的 GLP-2 类似物比 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 更稳定。这主要是由于 3 位的氨基酸 Asp。Glu 而不是 Asp 可能将氨基酸 3 和 4Asp-Gly 之间的切割最小化。被测试的其它 ZP GLP-2 类似物确实具有大致相同的稳定性, 并且不含有 C 端 -K₆ 的化合物、ZP1855、ZP1857 和 ZP1858 的稳定性稍高。这种差异由 33 位氨基酸 Asp 来进行解释。在不含有 C 端 -K₆ 的化合物中, 该氨基酸是 C- 末端, 氨基酸 32 和 33Tyr-Asp 之间的切割比氨基酸 33 和 33Asp-Lys 之间的切割更慢。稳定性的差异是由于 Asp 而不是 C 端 -K₆。

[0516] 在加速氧化 (H₂O₂, 还见表 10 和 13) 条件下, 测试的 GLP-2 类似物比 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 稳定得多。这可能是由于 ZP1559 中 10 位 Met 的氧化。ZP1855 是一个例外, 其显示无法解释的低稳定性。这可能是 ZP1855 批次特有的, 需要进一步研究来解释。

[0517] 促进脱酰胺 (NH₄HCO₃) 条件下的稳定性, 测试的 GLP-2 类似物比 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 更稳定。这可能是由于 ZP1559 中 11 位、16 位和 24 位 Asn 这几个脱氨基位点在测试的 GLP-2 类似物序列中是不存在的。

[0518] 通过 LC-MS 试验性地确定主要降解产物

[0519] 表 10. ZP GLP-2 类似物和参照 ZP1559 中的主要切割位点

[0520]

ZP1559HGD [↓] GS	FSDEM	N [↓] TILD	NLAAR	DFINW	LIQTK	ITD-OH
ZP1820HGD [↓] GS	FTSEL	ATILD	NLAAR	DFIAW	LIQTK	K ₆ -NH ₂
ZP1834HGD [↓] GS	FTSEL	ATILD	NLAAR	DFIAW	LIQTK	-NH ₂
ZP1846HGECS	FSSEL	STILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	ITD [↓] K ₆ -NH ₂
ZP1855HGECS	FSSEL	STILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	IT [↓] D -NH ₂
ZP1848HGEGT	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	ITD [↓] K ₆ -NH ₂
ZP1857HGEGT	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	IT [↓] D -NH ₂
ZP1849HGECS	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	ITD [↓] K ₆ -NH ₂
ZP1858HGECS	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	IT [↓] D -NH ₂

[0521] 用 HCl 胁迫的溶液

[0522] 表 11. 在 40℃和 0.1M HCl 中孵育 12 天的 GLP-2 类似物

[0523]

GLP-2 类似物	测量 MW (Da)	理论 MW (Da)	质量 差异(Da)	主要/次要丰度 可能的ID提示
ZP1559	3749.88	3749.80	+0.08	主要产物
	3732.75	Na	-17.13	次要, 循环脱酰胺
	3751.88	Na	+2.00	次要, 2x脱酰胺
ZP1820	4070.13	4070.28	-0.15	主要产物 A ¹ -A ³⁶
	4071.25	Na	+1.12	次要, 脱酰胺
	3761.25	3761.17	+0.08	次要, 水解 A ⁴ -A ³⁶
	2526.75	2526.56	+0.19	次要, 水解 A ¹⁶ -A ³⁶
	3762.25	3762.16	+0.09	次要, 水解 A ⁴ -A ³⁶ , 脱酰胺
ZP1834	3302.00	3301.71	+0.29	主要产物
	3303.00	Na	+1.00	次要, 脱酰胺
	3283.88	Na	-18.12	次要, 循环脱酰胺
	3302.88	Na	+0.88	次要, 脱酰胺
	2992.88	2992.60	-309.12	主要, 水解 A ⁴ -A ³⁰ , 脱酰胺
	2993.88	2993.59	-308.12	次要, 水解 A ⁴ -A ³⁰
	2993.75	2993.59	-308.25	次要, 水解 A ⁴ -A ³⁰
ZP1846	4315.00	4315.41	+0.59	主要产物 A ¹ -A ³⁹
	3547.50	3547.82	-0.32	次要, 水解 A ¹ -A ³³
	3934.88	3935.26	-0.38	次要, 水解 A ⁵ -A ³³
	2755.38	2755.70	-0.32	次要, 水解 A ¹⁶ -A ³⁹
	2158.25	2158.37	-0.12	次要, 水解 A ²² -A ³⁹
	3155.16	Na	-1160.25	未提示
ZP1855	3548.13	3546.84	+1.29	次要, 脱酰胺
	3548.13	Na	+1.29	主要产物/脱酰胺
	3225.13	3223.71	+1.42	次要, 水解 A ⁴ -A ³³ , 脱酰胺
	3433.13	3432.79	+0.34	次要, 水解 A ¹ -A ³²
	3354.50	3352.76	+1.76	次要, 水解 A ³ -A ³³ , 脱酰胺

[0524]

ZP1857	3544.50	3544.86	-0.36	主要产物 A^1-A^{33}
	3430.63	3430.81	-0.18	次要, 水解 A^1-A^{32}
	3351.38	3350.78	+0.60	次要, 水解 A^3-A^{33}
	3165.50	3164.71	+0.79	次要, 水解 A^5-A^{33}
	3222.50	3221.73	+0.77	次要, 水解 A^4-A^{33}
	2830.25	2829.56	+0.69	次要, 水解 A^8-A^{33}
	3545.13	Na	+0.63	次要, 消旋化
ZP1849	4299.63	4299.41	+0.22	主要产物 A^1-A^{39}
	2755.88	2755.70	+0.18	次要, 水解 $A^{16}-A^{38}$
	3532.00	3531.82	+0.18	次要, 水解 A^1-A^{33}
	2158.38	2159.05 2158.37	-0.67 +0.01	次要, 水解 A^1-A^{21} or $A^{22}-A^{39}$
	3976.88	3976.29	+0.59	次要, 水解 A^4-A^{39}
	4105.13	4105.33	-0.20	次要, 水解 A^3-A^{39}
	3920.50	3919.27	+1.23	次要, 水解 A^5-A^{39} , 脱酰胺
	1561.84	1561.73	+0.11	次要, 水解 A^1-A^{15}
ZP1858	3532.13	3530.84	+1.29	主要产物/脱酰胺

[0525] na = 不可得, 未计算或提示理论 MW

[0526] * 质量差异是主峰或所提示化合物的测量 MW 与理论 MW 的差异

[0527] 表 12 的结果显示被测试的 GLP-2 类似物和 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 的测量分子量, 对应于理论分子量。

[0528] ZP1559、ZP1820 和 ZP1834 中最丰富的降解产物是氨基酸 3 和 4; Asp 和 Gly 之间的切割。对于具有 C 端 -K₆ 的化合物 ZP1846、ZP1848 和 ZP1849, 检测到了对应于在 33 至 39 位失去 C 端 -K₆ (LyS₆) 的降解产物。对于不具有 C 端 -K₆ 的化合物 ZP1855 和 ZP1857, 检测到了对应于在 33 位失去 C 端 Asp 的降解产物。

[0529] 检测到的次要降解产物是氨基酸 15 和 16 (Asp 和 Asn 或 Asp 和 Ala)、氨基酸 4 和 5 (Gly 和 Ser)、氨基酸 21 和 22 (Asp 和 Phe) 之间的切割。

[0530] 用 H₂O₂ 胁迫的溶液

[0531] 表 12. 在 40°C 和 0.5% H₂O₂ 中孵育 3 天的 GLP-2 类似物

[0532]

GLP-2 类似物	测量 MW (Da)	理论 MW (Da)	质量 * 差异 (Da)	主要/次要丰度 可能的ID提示
ZP1559	n.d.	3749.80	-	无完整产物
	3766.00	Na	+ 16.2	主要M氧化
ZP1820	4070.63	4070.28	- 0.35	主要产物
	4052.38	Na	- 18.25	主要, 脱酰胺前体
	4086.50	Na	+ 15.87	次要W氧化
	4068.75	Na	- 1.88	次要, 2x脱酰胺
ZP1834	3301.75	3301.71	+ 0.04	主要产物
	3283.75	Na	- 18.00	主要, 脱酰胺前体
	3317.88	Na	+ 16.13	次要W氧化
	3299.75	Na	- 2.00	次要, 2x脱酰胺
ZP1846	4315.50	4315.41	+ 0.09	主要产物
	4331.88	Na	+ 16.38	次要W氧化
ZP1855	3547.00	3546.84	+ 0.16	主要产物
	3481.88	Na	- 65.12	次要未提示
	3410.00	Na	- 137.00	次要, A ² -A ³³
	3563.00	Na	+ 16.00	次要W氧化
ZP1848	4313.50	4313.43	+ 0.07	主要产物
	4329.63	Na	+ 16.13	次要W氧化
ZP1857	3545.00	3544.86	+ 0.14	主要产物
	3408.00	Na	- 137.00	次要, A ² -A ³³
	3561.00	Na	+ 16.00	次要W氧化
	3479.88	Na	- 65.12	次要未提示
ZP1849	4299.50	4299.41	+ 0.09	主要产物
	4315.75	Na	+ 16.25	次要W氧化
ZP1858	3531.00	3530.84	+ 0.16	主要产物
	3394.13	Na	- 136.87	次要, A ² -A ³³
	3547.00	Na	+ 16.00	次要W氧化
	3466.00	Na	- 65.00	次要未提示

[0533] na = 不可得, 未计算或提示理论 MW

[0534] * 质量差异是主峰的测量 MW 与理论 MW 的差异

[0535] 表 13 的结果显示测试的 GLP-2 类似物和 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 的测量分子量对应于理论分子量。对于 ZP1559, 观察到 MW+16Da 的主要降解产物, 这可能是 10 位 Met 的氧化产物。对于 ZP1820 和 ZP1834, 观察到 MW+18Da 的主要降解产物。这可能归因于脱酰胺前体时的失水。此外, 观察到 MW-2Da 的次要产物, 可能在两个位点脱酰胺。在所有化合物中观察到 MW+16Da 的次要降解产物, 可能是 Trp 的氧化。对于不具有 C 端 -K₆ 的化合物 ZP1855、ZP1857 和 ZP1858, 检测到 MW-137Da 和 -65Da 的次要降解产物, 分别相应于在 1 位失去 His 和未鉴定的降解产物。

[0536] 用 NaOH 胁迫的溶液

[0537] 表 13. 在 40℃和 0.01M NaOH 中孵育 3 天的 GLP-2 类似物

[0538]

GLP-2 类似物	测量 MW (Da)	理论 MW (Da)	质量 * 差异 (Da)	注释
ZP1559	3750.38	3749.80	+ 0.58	MW无变化
ZP1820	4070.63	4070.28	+ 0.35	MW无变化
ZP1834	3302.00	3301.71	+ 0.29	MW无变化
ZP1846	4315.63	4315.41	+ 0.22	MW无变化
ZP1855	3547.25	3546.84	+ 0.41	MW无变化
ZP1848	4313.88	4313.43	+ 0.45	MW无变化
ZP1857	3545.13	3544.86	+ 0.27	MW无变化
ZP1849	4299.88	4299.41	+ 0.47	MW无变化
ZP1858	3531.13	3530.84	+ 0.29	MW无变化

[0539] na = 不可得, 未计算或提示理论 MW

[0540] * 质量差异是主峰的测量 MW 与理论 MW 的差异

[0541] LC-MS 分析显示每个化合物的所有峰都具有相同的分子量。这意味着最丰富的降解产物可能是序列中一个或多个氨基酸从 L- 到 D- 形的外消旋。主峰可隐藏一个或几个外消旋产物, 因此未能确定残留的完整肽纯度。没有检测到来自切割的主要降解产物。

[0542] 用 NH_4HCO_3 胁迫的溶液

[0543] 表 14. 在 40℃和 pH8 的 0.1M NH_4HCO_3 中孵育 6 天的 GLP-2 类似物

[0544]

GLP-2 类似物	测量 MW (Da)	理论 MW (Da)	质量 * 差异 (Da)	主要/次要丰度 可能的ID提示
ZP1559	3750.00	3749.80	+ 0.20	主要产物
	3751.13	Na	+ 1.13	次要, 可能为脱酰胺
	3751.13	Na	+ 1.13	次要, 可能为脱酰胺
ZP1820	4070.13	4070.28	- 0.15	主要产物
	4070.13	Na	- 0.15	次要, 可能为消旋化
ZP1834	3302.00	3301.71	+ 0.29	主要产物
	3302.00	Na	+ 0.29	次要, 可能为消旋化
ZP1846	4315.25	4315.41	- 0.16	主要产物
	4315.63	Na	+ 0.38	次要, 可能为消旋化
ZP1855	3547.13	3546.84	+ 0.29	主要产物
ZP1848	4313.75	4313.43	+ 0.32	主要产物
ZP1857	3544.75	3544.86	- 0.11	主要产物
ZP1849	4299.50	4299.41	+ 0.09	主要产物
ZP1858	3531.00	3530.84	+ 0.16	主要产物

[0545] na = 不可得, 未计算或提示理论 MW

[0546] * 质量差异是主峰的测量 MW 与理论 MW 的差异

[0547] 表 14 的结果显示测试的 GLP-2 类似物和 Gly²-GLP-2 参照、ZP1559 的测量分子量，对应于理论分子量。对于 ZP1559，观察到 MW+1Da 的次要降解产物，这可能是脱酰胺产物。对于 ZP1820、ZP1834 和 ZP1846，观察到与主化合物 MW 相同的次要降解产物。它们可能是外消旋产物或脱酰胺作用。然而，本发明仪器的 MS 分辨率不足以确认或否决这一点。此外，这些化合物可能存在于其它化合物中，但是由于它们可能隐藏在主峰之下而未被检测到。

[0548] 在水解、氧化和脱酰胺的胁迫条件下，所有测试的本发明 GLP-2 类似物具有比参照化合物 Gly²-GLP-2、1559 更好的化学稳定性。由于酸水解，化合物 1820 和 1834 的稳定性低于其余的 6 个候选化合物。当氨基酸 A³ 是 Glu 而不是 Asp 时可见最高的化学稳定性。

[0549] 除了不具有 -K₆ 的候选物具有稍好的稳定性以外，未观察到剩余的 6 个候选物的化学稳定性的显著差异，这主要归因于 Asp 之后的易变位点以及具有 C 端 -K₆ 的候选化合物中 -K₆ 的失去。

[0550] 实施例 8. 在 C57BL 小鼠中筛选化合物的肠生长效应

[0551] 在雄性 C57BL 小鼠中检测本发明化合物刺激肠生长的能力。在连续 10 天中每日两次对每组 (n = 6) 小鼠皮下给予 30nmol/kg 每种化合物。为了对比的目的，在相同的剂量方案中对其它组的动物给予等摩尔剂量的 [Gly²]GLP-2 或载体 (磷酸缓冲盐水, pH7.4)。化合物最后一次给药后 24 小时处死小鼠，清空小肠 (从幽门到盲肠) 和结肠 (肠远端至盲肠) 并称重。为了校正体重 (BW) 的轻微差异，小肠 (SI) 和结肠的器官质量表达为相对于 BW 的值。已经报导非选择性参照化合物 [Gly²]GLP-2 在食道、胃、小肠和结肠中刺激胃肠生长并且评价了化合物引起的生长模式的差异，以下述公式计算化合物 X 的小肠 - 结肠敏感性指标：

$$[0552] \quad (SI / 结肠)_x / (SI / 结肠)_{[Gly^2]GLP-2} \%$$

[0553] 小肠 - 结肠敏感性指标大于或等于 1.05 的化合物认为对小肠具有相对选择性 (表 15)。

[0554] 小肠 - 结肠敏感性指标小于或等于 0.95 的化合物认为对结肠具有相对选择性 (表 15)。

[0555] 表 15. 选择性 GLP-2 类似物化合物列表

[0556]

% [Gly2]GLP-2																																		
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
非选择性参照化合物=[Gly2]GLP-2																																		
H G D G S F S S D E M N T I L D N L A A R D F I N W L I Q T K I T D OH 100 100 100 100																																		
小肠选择性化合物																																		
1844	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 106 89 119
1845	H	G	E	G	T	F	S	D	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 105 98 107
1846	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 120 102 118
1848	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 109 93 117
1849	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 109 95 115
1850	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 103 89 116
1851	H	G	E	G	T	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 109 96 114
1852	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 106 97 109
1853	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 101 96 105
1855	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 106 88 120
1857	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 117 90 130
1858	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 104 96 108
1859	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 83 73 114
结肠选择性化合物																																		
1830	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	S	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 100 106 94
1831	H	G	D	G	S	F	T	D	E	L	S	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 90 102 88
1835	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 96 105 91
1836	H	G	D	G	S	F	T	D	E	L	K	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 94 105 90
1839	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K6 NH2 112 133 84
1840	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 113 131 86
1841	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 113 126 90
1843	H	G	D	G	S	F	T	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH2 111 130 85

[0557] 结果

[0558] 基于所述肽剂量依赖性地提高 SI 质量,相对于等摩尔剂量非选择性参照化合物

[Gly2]GLP-2 的效应测定本发明化合物的肠生长效应。

[0559] 该研究的结果证明,与 [Gly2]GLP-2 相比,在野生型 GLP-2 序列的 8、16、24 和 / 或 28 位具有氨基酸替换的 GLP-2 变体提高了 C57BL 小鼠中的生物活性。

[0560] 实施例 9. 选定的化合物对 C57BL 小鼠肠生长的剂量 - 应答效应

[0561] 选择 1820、1855、1846、1858、1849、1848 和 1857 为先导化合物,因为这些化合物相对于 [Gly2]GLP-2 (实施例 8) 都能提高小肠质量,并且在胁迫条件 (实施例 7) 下相对于 [Gly2]GLP-2 提高化学稳定性。在雄性 C57BL 小鼠中检测了 1820、1855、ZP1846、1858、1849、1848 和 1857 对小肠质量的剂量 - 应答效应。在连续 3 天中每日两次对每组 (n = 6) 小鼠皮下给予 5、15、45、135 或 405nmol/kg 每种化合物。为了对比的目的,在相同的剂量方案中对其它组的动物给予等摩尔剂量的 [Gly2]GLP-2 或载体 (磷酸缓冲盐水, pH7.4)。化合物最后一次给药后 24 小时处死小鼠,清空小肠 (从幽门到盲肠) 并称重以检测对小肠质量的影响。

[0562] 结果

[0563] 图 1 至 5 显示相对于参照化合物 [Gly2]GLP-2 的效应的 1820、1855、1846、1858、1849、1848 和 1857 对小肠质量的效应。在每个测试剂量下,将 [Gly2]GLP-2 对小肠质量的效应标准化为 100%。基于所述肽能相对于等摩尔剂量的 [Gly2]GLP-2 的效应而剂量依赖性地提高 SI 质量来测定本发明的化合物 1820、1855、1846、1858、1849、1848 和 1857 对小肠生长的影响。基于这些发现,我们可推断与用 [Gly2]GLP-2 处理的小鼠相比,含有 8 个替换 (GLP-21809 的 G2、E3、T5、L10、A11、A16、A24、A28) 的 GLP-2 类似物能显著提高小肠重量。

[0564] 具体地,与结肠相比,将 Asp3 替换为 Glu、将 Asn16 替换为 Ala 和将 Gln28 替换为 Ala 以选择性方式使小肠重量提高 (1839 或 1840 与 1809 相比较)。因此,相对于结肠质量,三个氨基酸 Asp3、Asn16 以及 Gln28 的替换引起小肠重量的选择性提高。

[0565] 此外,Asp8 替换为丝氨酸导致选择性的额外提高,因此导致小肠重量的额外提高而不显著性影响结肠的重量 (1818、1820、1844、1846、1848、1849、1852、1853、1855、1858)。

[0566] 图 1 至 4 显示实验结果,其中相对于参照化合物 [Gly₂]GLP-2 地显示示例性化合物 1846、1855、1848、1857、1849 在 SI-BW : 结肠 - BW 比的剂量应答上的效应。在每个测试剂量下,将 [Gly₂]GLP-2 对在小肠质量上的效应标准化为 100%。所有示例性化合物均共有 8、16 和 / 或 28 位的修饰,并且显示引起小肠相对于结肠生长的选择性提高。

[0567] 实施例 10-1846、1848、1855 和 1857 对施用 5-FU 小鼠中小肠萎缩的剂量 - 应答效应

[0568] 小肠干细胞迅速的增殖率使得它们成为抗癌治疗中所使用治疗剂的细胞毒效应的敏感性靶标。因此,化学治疗剂 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 的临床应用经常与癌症患者中的小肠损伤 (萎缩和腹泻) 有关。之前我们已经显示,在连续 4 天中每日一次腹膜内 (i. p) 施用 50mg/kg 5-FU 诱发了 C57BL 小鼠中小肠的显著萎缩。在小鼠中研究了先导化合物 1846、1848、1855 和 1857 在 5-FU 诱发的小肠萎缩上的效应。之前我们已经显示,在连续 4 天中每日一次腹膜内 (i. p) 施用 50mg/kg 5-FU 诱发了 C57BL 小鼠中小肠的显著萎缩。5-FU 之前施用 1846、1848、1855 或 1857 (每日两次,连续三天) 并与 5-FU 一起施用四天。在之前显示有效刺激健康小鼠小肠生长的五个不同剂量 (5、15、45、135 和 405nmol/kg) (实施例 9) 下施用每种先导化合物。为了对比目的,用 405nmol/kg [Gly2]GLP-2 处理一组动物。为了

测定 5-FU 对小肠的影响,一组动物仅给予 5-FU 并维持不处理 (5-FU 对照),另外一组动物仅给予载体 (PBS 对照)。

[0569] 结果

[0570] 相对于 PBS 对照,5-FU 引起 C57BL 小鼠 SI-BW 和 SI 长度的显著降低。图 6 至 9 显示 1846、1848、1855 或 1857 对施用 5-FU 的小鼠 SI-BW 和 SI 长度的剂量-应答效应。还显示了 405nmol/kg[Gly2]GLP-2 的效应。1846、1848、1855 或 1857 剂量依赖性地预防 5-FU 诱发的 SI 萎缩,并将 SI-BW 维持在与 PBS 对照相似的水平。等摩尔剂量的 ZP1848、ZP1855 和 ZP1857 对 SI-BW 显著地比 405nmol/kg[Gly2]GLP-2 更有效。1848 和 1857 对 SI-长度显著地比 405nmol/kg[Gly2]GLP-2 更有效。

[0571] 实施例 11. 1846 对施用 5-FU 的 SD 大鼠中小肠萎缩和腹泻的剂量应答效应

[0572] 在 SD 大鼠中研究了临床候选化合物 1846 在 5-FU 诱导的小肠萎缩和腹泻上的效应。之前我们已经显示,腹膜内 (i.p) 施用 75mg/kg 5-FU (每日一次,四天) 引起 SD 大鼠的显著小肠萎缩和腹泻。5-FU 之前施用 1846 (16、80 和 400nmol/kg/天; n = 20 只大鼠/剂量组) (每日两次,三天) 并与 5-FU 一起施用四天。研究中包括 5-FU 对照和 PBS 对照。1846 最后一次给药后 24 小时处死一个亚组的动物,以测定 1846 在小肠萎缩上的效应。为了测定 1846 在腹泻上的效应,在给药期间和额外 6 天中每日两次 (早晨和傍晚) 观察所有动物。每次观察期间,给每只动物打分 (0, 无腹泻, 1 (轻度), 肛门周围粪便污染, 2 (中度), 后肢和尾巴上有粪便污染, 以及 3 (重度), 前肢和腹部上有粪便污染), 所述分数显示动物是否有腹泻以及腹泻的严重程度。

[0573] 结果

[0574] 相对于 PBS 对照,5-FU 引起 SD 大鼠 SI-BW 和 SI-长度的显著降低并引起腹泻。图 10 和 11 显示 1846 在 5-FU 诱导的小肠萎缩和腹泻上的剂量-应答效应。1846 剂量依赖性地防止 5-FU 诱导的 SI 萎缩并将 SI-BW 和 SI-长度维持在与对照相似的水平。在施用的最高剂量 (400nmol/kg) 下,1846 降低施用 5-FU 大鼠的腹泻发生率和严重程度。

[0575] 实施例 12. 1846 对 SD 大鼠小肠的隐窝-绒毛长度和肌厚度的剂量应答效应

[0576] 研究了临床候选化合物 1846 在 SD 大鼠小肠的隐窝-绒毛长度和肌厚度上的效应。静脉内推注施用 1846 (0.62、3.41 或 6.2mg/kg/天, n = 6 只大鼠/剂量组), 每日一次, 连续五天。施用最后剂量后 24 小时处死大鼠, 并从空肠 (胃十二指肠连接处远端 30cm) 和回肠 (回盲连接处近端 30cm) 剪下 1cm 活检用于组织学处理。

[0577] 结果

[0578] 图 12 显示 1846 对空肠和回肠隐窝-绒毛长度和肌厚度的剂量-应答效应。1846 剂量依赖性地提高空肠平均隐窝-绒毛长度以及回肠的回肠肌厚度。

[0579] 实施例 13. 1848 对吡喹酮诱导的克罗恩病模型小肠炎症标记物的作用

[0580] 克罗恩病是引起小肠短暂性间断性炎症的慢性疾病。研究了 GLP-2 类似物 1848 在吡喹酮诱导的克罗恩病模型中小肠炎症上的效应。之前我们显示施用吡喹酮 (皮下, 每日一次, 两天) 诱发以溃疡为特征的小肠炎症以及促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的增加。为了测定 ZP1848 对溃疡的作用, 在吡喹酮首次给药之前给予 1848 (8、40 和 200nmol/kg, 皮下, 每日两次 (9:00 和 16:00)), 并且与吡喹酮一起再施用两天。皮质类固醇泼尼松龙 (10mg/kg, 口服) 用作阳性对照, 因为皮质类固醇普遍用于治疗克

罗恩病中的活跃炎症。此外,对一组动物给予 1848 (200nmol/kg) 和泼尼松龙以测定组合治疗的效果。1848 最后一次给药后 24 小时处死动物,轻轻地将小肠冲洗干净并固定。为了测定溃疡程度,沿系膜小肠对向部边缘剪开肠,悬挂在聚丙烯盘中并用 Alcian Green 3BX 进行表面染色。从幽门开始仔细检查小肠并使用标准尺(精密度:0.5mm)测量所有溃疡的形状(圆形和线形)和大小(圆形溃疡:直径,线形溃疡:长×宽)。溃疡定义为缺少上皮表面的面积。最后,通过所有单个溃疡的面积总和来计算每只动物的总损伤面积。

[0581] 为了测定 1848 对小肠中 TNF- α 浓度的影响,如上所述给予 1848 和吲哚美辛。然而在处死时将小肠分成相同长度的三段(近端、中部和远端)。使用市售的 ELISA 试剂盒检测每个单独段的 TNF- α 浓度。

[0582] 结果

[0583] 与对照组相比,吲哚美辛强烈诱导小肠溃疡(估计的溃疡程度为 $333 \pm 21 \text{ mm}^2$ 比 10 mm^2)。图 13 显示 1846 对估计的溃疡程度 (mm^2) 的影响。1848 (8nmol/kg、40nmol/kg 和 200nmol/kg) 处理显著降低溃疡程度(分别为 $230 \pm 12 \text{ mm}^2$ 、 $216 \pm 17 \text{ mm}^2$ 和 $178 \pm 17 \text{ mm}^2$,与吲哚美辛的 $p < 0.001$)。在所用的最高剂量 (200nmol/kg) 下,ZP1848 比阳性对照泼尼松龙更有效 ($p < 0.05$)。

[0584] 与对照动物 ($34 \pm 7 \text{ pg/mg}$ 蛋白质,与吲哚美辛的 $p < 0.05$) 相比,吲哚美辛使得远端节段中 TNF- α 的组织水平提高约 2.9 倍 ($97 \pm 14 \text{ pg/mg}$ 蛋白质)。图 14 显示 1846 对小肠 TNF- α 浓度的影响。1848 (8、40 或 200nmol/kg) 处理显著降低 TNF- α 的组织水平(分别为 $45 \pm 14 \text{ pg/mg}$ 蛋白质、 $44 \pm 9 \text{ pg/mg}$ 蛋白质和 $45 \pm 7 \text{ pg/mg}$ 蛋白质),3 种剂量之间没有显著差异。

[0585] 与对照动物 ($34 \pm 6 \text{ pg/mg}$ 蛋白质,与吲哚美辛的 $p < 0.05$) 相比,吲哚美辛使得中部节段的 TNF- α 的组织水平提高约 3.2 倍 ($108 \pm 9 \text{ pg/mg}$ 蛋白质)。1848 (40 或 200nmol/kg) 分别显著降低 TNF- α 的组织水平(与吲哚美辛的 $p < 0.05$)。

[0586] 与对照动物 ($45 \pm 3 \text{ pg/mg}$ 蛋白质,与吲哚美辛的 $p < 0.05$) 相比,吲哚美辛使得远端节段的 TNF- α 组织水平提高约 1.7 倍 ($75 \pm 5 \text{ pg/mg}$ 蛋白质)。1848 对远端节段的 TNF- α 水平具有抑制效应,但是与其它节段相比,该效应较不显著。在全部三个节段中仅使用泼尼松龙均不显著影响 TNF- α 的组织水平,但是泼尼松龙的施用提高了 1848 (200nmol/kg) 对 TNF- α 水平的抑制效应(仅在远端节段中)。

[0587] 实施例 14

[0588] 在组氨酸、甘露醇和乙酸盐制剂中配制 10mg/mL ZP1846

[0589] 1. 在 1L 烧杯中装入 800mL (WFI)

[0590] 2. 在烧杯中称出 13.964g L- 组氨酸并加入所述 1L 烧杯中

[0591] 3. 在烧杯中称出 32.200g 甘露醇并加入所述 1L 烧杯中

[0592] 4. 直接将 629 μL 100% 乙酸加入所述 1L 烧杯中,或称出 12.58g 5% (重量/体积) 乙酸溶液并加入所述烧杯中

[0593] 6. 补充至约 950mL

[0594] 7. 测量 pH,必要时用 10% 乙酸或 0.25M 组氨酸调整至 pH 6.9 至 7.0

[0595] 8. 称出 11.312g 药物物质(肽含量 88.4%) 并加入所述烧杯中

[0596] 9. 补充至 1.015kg (= 约 1000mL) 并测量 pH、摩尔渗透压浓度和密度

- [0597] 10. 通过串联连接的两个无菌滤器使所述制剂过滤除菌
- [0598] 11. 在 LAF 工作台以 0.5mL 的等分试样将所述制剂分装到 2mL 已批准药用的瓶中
- [0599] 12. 不完全密封地装上冻干的塞子, 然后装入已灭菌并预冷却至 4°C 的冷冻干燥器中
- [0600] 13. 冷冻干燥周期进行 40.5 小时, 由冷冻、退火、初级干燥和次级干燥阶段组成。在冷冻干燥器的室中在氮中塞住所述瓶。
- [0601] 14. 对所述瓶进行分选, 应用密封物 (overseal) 和弯折封口 (crimp)。

[0602] 实施例 15

- [0603] 在组氨酸、精氨酸、甘露醇和海藻糖中配制 10mg/mL ZP1846
- [0604] 1. 将 800mL(WFI) 水装入 1L 烧杯中
- [0605] 2. 在烧杯中称出 6.206g L- 组氨酸并加入所述 1L 烧杯中
- [0606] 3. 在烧杯中称出 3.484g L- 精氨酸并加入所述 1L 烧杯中
- [0607] 4. 在烧杯中称出 33.46g 甘露醇并加入所述 1L 烧杯中
- [0608] 5. 在烧杯中称出 11.16g 海藻糖并加入所述 1L 烧杯中
- [0609] 6. 补充至约 950mL
- [0610] 7. 测量 pH, 必要时用 10% 乙酸或 0.25M 组氨酸调节至 pH6.9 至 7.0
- [0611] 8. 称出 11.312g 药物物质 (肽含量 88.4%) 并加入所述烧杯中
- [0612] 9. 补充至 1.015kg (= 约 1000mL) 并测量 pH、摩尔渗透压浓度和密度
- [0613] 10. 通过串联连接的两个无菌滤器将所述制剂过滤除菌
- [0614] 11. 在 LAF 工作台以 0.5mL 的等分试样将所述制剂分装到 2mL 已批准药用的瓶中
- [0615] 12. 不完全密封地装上冻干的塞子, 然后装入已灭菌并预冷却至 4°C 的冷冻干燥器中
- [0616] 13. 冷冻干燥周期进行 40.5 小时, 由冷冻、退火、初级干燥和次级干燥阶段组成。在冷冻干燥器的室中在氮中塞住所述瓶。
- [0617] 14. 对所述瓶进行分选, 应用密封物 (overseal) 和弯折封口 (crimp)。
- [0618] 尽管已经结合上述示例性实施方案描述了本发明, 但是在给出这一公开内容后, 许多等价的改良和变化对于本领域技术人员是显而易见的。因此, 认为所提出的本发明示例性实施方案是用于说明而非限制。可对所述实施方案进行多种变化而不背离本发明的精神和范围。将本文引用的所有文献均明确地以参考方式并入本文。

[0619] 以下内容对应于母案申请的原始权利要求书:

[0620] 1. 通式 I 代表的胰高血糖素样肽 2 (GLP-2) 类似物或者其可药用盐或衍生物:

[0621] $R^1-Z^1-His-X2-X3-Gly-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-Ala-X19-X20-$

[0622] $X21-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33-Z^2-R^2$

[0623] 其中:

[0624] R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基 (例如甲基)、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基

[0625] X2 为 Gly、Ala 或 Sar

- [0626] X3 为 Glu 或 Asp
- [0627] X5 为 Ser 或 Thr
- [0628] X6 为 Phe 或 Pro
- [0629] X7 为 Ser 或 Thr
- [0630] X8 为 Asp 或 Ser
- [0631] X9 为 Glu 或 Asp
- [0632] X10 为 Met、Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸
- [0633] X11 为 Asn、Ala、Lys 或 Ser
- [0634] X12 为 Thr 或 Lys
- [0635] X13 为 Ile、Glu 或 Gln
- [0636] X14 为 Leu、Met 或 Nle
- [0637] X15 为 Asp 或 Glu
- [0638] X16 为 Asn 或 Ala
- [0639] X17 为 Leu 或 Glu
- [0640] X18 为 Ala 或 Aib
- [0641] X19 为 Ala 或 Thr
- [0642] X20 为 Arg 或 Lys
- [0643] X21 为 Asp 或 Ile
- [0644] X24 为 Asn、Ala 或 Glu
- [0645] X28 为 Gln、Ala 或 Asn
- [0646] X31 为 Pro、Ile 或缺失
- [0647] X32 为 Thr 或缺失
- [0648] X33 为 Asp、Asn 或缺失
- [0649] R^2 为 NH_2 或 OH；
- [0650] Z^1 和 Z^2 独立地为不存在或选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met 和 Orn 的 3 至 20 个氨基酸单位的肽序列；并且其中所述 GLP-2 类似物包含选自以下的一种或多种替换：X8 为 Ser 和 / 或 X16 为 Ala 和 / 或 X24 为 Ala 和 / 或 X28 为 Ala。
- [0651] 2. 通式 II 代表的项 1 所述 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物：
- [0652] $R^1-Z^1-His-Gly-X3-Gly-X5-Phe-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-Ala-X19-Arg-$
- [0653] $Asp-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33-Z^2-R^2$
- [0654] 其中：
- [0655] R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基（例如甲基）、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基
- [0656] X3 为 Glu 或 Asp
- [0657] X5 为 Ser 或 Thr
- [0658] X7 为 Ser 或 Thr
- [0659] X8 为 Asp 或 Ser
- [0660] X9 为 Glu 或 Asp

- [0661] X10 为 Met、Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸
- [0662] X11 为 Asn、Ala、Lys 或 Ser
- [0663] X12 为 Thr 或 Lys
- [0664] X13 为 Ile、Glu 或 Gln
- [0665] X14 为 Leu、Met 或 Nle
- [0666] X15 为 Asp 或 Glu
- [0667] X16 为 Asn 或 Ala
- [0668] X17 为 Leu 或 Glu
- [0669] X19 为 Ala 或 Thr
- [0670] X24 为 Asn 或 Ala
- [0671] X28 为 Gln、Ala 或 Asn
- [0672] X31 为 Pro、Ile 或缺失
- [0673] X32 为 Thr 或缺失
- [0674] X33 为 Asp 或缺失
- [0675] R^2 为 NH_2 或 OH；
- [0676] Z^1 和 Z^2 独立地为不存在或选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met 和 Orn 的 3 至 20 个氨基酸单位的肽序列；并且其中所述 GLP-2 类似物包含选自以下的一种或多种替换：X8 为 Ser 和 / 或 X16 为 Ala 和 / 或 X24 为 Ala 和 / 或 X28 为 Ala。
- [0677] 3. 通式 III 代表的项 1 或项 2 所述 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物：
- [0678] R^1 - Z^1 -His-Gly-X3-Gly-X5-Phe-X7-X8-Glu-X10-X11-Thr-Ile-Leu-Asp-X16-Leu-Ala-Ala-Arg-
- [0679] Asp-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33- Z^2 - R^2
- [0680] 其中：
- [0681] R^1 为氢、 C_{1-4} 烷基（例如甲基）、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基或三氟乙酰基
- [0682] X3 为 Glu 或 Asp
- [0683] X5 为 Ser 或 Thr
- [0684] X7 为 Ser 或 Thr
- [0685] X8 为 Asp 或 Ser
- [0686] X10 为 Met、Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸
- [0687] X11 为 Asn、Ala、Lys 或 Ser
- [0688] X24 为 Asn 或 Ala
- [0689] X28 为 Gln 或 Ala
- [0690] X31 为 Pro 或缺失
- [0691] X32 为 Thr 或缺失
- [0692] X33 为 Asp 或缺失
- [0693] R^2 为 NH_2 或 OH；
- [0694] Z^1 和 Z^2 独立地为不存在或选自 Ala、Leu、Ser、Thr、Tyr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、His、Met 和 Orn 的 3 至 20 个氨基酸单位的肽序列；并且其中所述 GLP-2 类似物包含

选自以下的一种或多种替换：X8 为 Ser 和 / 或 X16 为 Ala 和 / 或 X24 为 Ala 和 / 或 X28 为 Ala。

[0695] 4. 项 1 至 3 中任一项的 GLP-2 类似物，其中所述 GLP-2 类似物与野生型 GLP-2(1-33) 具有至少 60% 的氨基酸序列同一性，并且在体内具有引起小肠质量增加的生物活性。

[0696] 5. 前述任一项的 GLP-2 类似物，其中所述 GLP-2 类似物包含 X8、X16、X24 和 / 或 X28 中一个以上位置的替换和 / 或一个或多个所述替换与 X3、X5、X7、X10 和 / 或 X11 中一个或多个位置上的替换组合。

[0697] 6. 项 5 的 GLP-2 类似物，其中所述 X10 位上的替换为 Leu、Nle 或氧化稳定的 Met 取代氨基酸，例如 Met(O) 或 Met(O)₂。

[0698] 7. 项 5 的 GLP-2 类似物，其中所述 X11 位上的替换为 Ala、Ser 或 Lys。

[0699] 8. 项 4 的 GLP-2 类似物，其中所述 GLP-2 类似物包含一种或多种以下替换：

[0700] Ser8, Ala16

[0701] Ser8, Ala24

[0702] Ser8, Ala28

[0703] Ala16, Ala24

[0704] Ala16, Ala28

[0705] Ala24, Ala28

[0706] Ser8, Ala16, Ala24

[0707] Ser8, Ala16, Ala28

[0708] Ser8, Ala24, Ala28

[0709] Ala16, Ala24, Ala28

[0710] Ser8, Ala16, Ala24, Ala28。

[0711] 9. 项 5 的 GLP-2 类似物，其中所述 GLP-2 类似物包含一种或多种下述替换：

[0712] Glu3, Leu10, Ala11, 24

[0713] Glu3, Thr5, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28

[0714] Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28

[0715] Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28

[0716] Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28

[0717] Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28

[0718] Glu3, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28

[0719] Glu3, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28

[0720] Glu3, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28

[0721] Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28

[0722] Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28, Ile21

[0723] Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28

[0724] Glu3, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28

[0725] Glu3, Leu10, Ala11, 16, 24, 28

[0726] Thr7, Leu10, Ala11, 24

- [0727] Thr7, Leu10, Lys11, Ala24
[0728] Thr7, Leu10, Ser11, Ala24
[0729] Thr7, Leu10, Ser8, 11, Ala24
[0730] Thr7, Ser8, Leu10, Ala11, 24
[0731] Thr7, Ser8, Leu10, Lys11, Ala24
[0732] Ser8, Leu10, Ala11, 24
[0733] Leu10, Ala24
[0734] Leu10, Ala11, Ala24
[0735] Leu10, Ala11, 24, 28
[0736] Leu10, Ala11, 16, 24, 28
[0737] Leu10, Lys11, Ala24
[0738] Leu10, Ser11, Ala24
[0739] Leu10, Ser8, 11, Ala24 ;或
[0740] X31-X33 中一个或多个位置上的缺失。

[0741] 10. 前述任一项的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物, 所述 GLP-2 类似物如本文表 1 所公开。

[0742] 11. 项 10 的 GLP-2 类似物, 所述 GLP-2 类似物为 :

[0743]

1834	H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH ₂
1846	H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1847	H-HGEGSFSEDELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1848	H-HGEGTFSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1849	H-HGEGSFSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK ₆ -NH ₂
1855	H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH ₂
1857	H-HGEGTFSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH ₂
1858	H-HGEGSFSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH ₂ 。

[0744] 12. 项 1 至 9 中任一项的 GLP-2 类似物, 其中所述 GLP-2 类似物包含 X3、X7、X16、X24、X28、X31、X32 和 / 或 X33 中一个以上位置上的替换。

[0745] 13. 项 12 的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物, 其中所述 GLP-2 类似物包含一种或多种选自以下的替换 : X3 为 Glu、X7 为 Ser、X16 为 Ala、X24 为 Ala、X28 为 Ala、X31 为 Ile、X32 为 Thr 和 X33 为 Asp, 并任选地缺失了 X31、X32 和 X33 位置上的氨基酸残基。

[0746] 14. 项 12 或项 13 的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物, 所述 GLP-2 类似物为 :

[0747]

1827 H-HGDGSFTDELSTILDNLAARDFAWLIQTKKKKKKK-NH2
1844 H-HGEGTFSSELSTILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1845 H-HGEGTFSDELSTILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1846 H-HGEGSFSSELSTILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1848 H-HGEGTFSSELATILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1849 H-HGEGSFSSELATILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1850 H-HGEGSFSDELKTILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1851 H-HGEGSFSDELKTILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1852 H-HGEGTFSSELKTILDALAARDFAWLIATKITDKKKKKK-NH2
1855 H-HGEGSFSSELSTILDALAARDFAWLIATKITD-NH2
1857 H-HGEGTFSSELATILDALAARDFAWLIATKITD-NH2
1858 H-HGEGSFSSELATILDALAARDFAWLIATKITD-NH2
1859 H-HGEGSFSDELKTILDALAARDFAWLIATKITD-NH2。

[0748] 15. 项 1 至 9 中任一项的 GLP-2 类似物,其中所述 GLP-2 类似物包含 X3、X8 和 / 或 X24 中一个以上位置上的替换。

[0749] 16. 项 15 的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物,其中所述 GLP-2 类似物包含一种或多种选自以下的替换:X3 为 Asp、X8 为 Asp 和 X24 为 Ala,并任选地缺失了 X31、X32 和 X33 位置上的氨基酸残基。

[0750] 17. 项 15 或项 16 的 GLP-2 类似物或者其可药用盐或衍生物,所述 GLP-2 类似物为:

[0751]

1830 H-HGDGSFSDELSTILDNLAARDFAWLIQTK-NH2
1831 H-HGDGSFTDELSTILDNLAARDFAWLIQTK-NH2
1835 H-HGDGSFSDELKTILDNLAARDFAWLIQTK-NH2
1836 H-HGDGSFTDELKTILDNLAARDFAWLIQTK-NH2
1839 H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFAWLIQTKITDKKKKKK-NH2
1840 H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFAWLIQTKITD-NH2
1841 H-HGDGSFSDELATILDNLAARDFAWLIQTK-NH2
1843 H-HGDGSFTDELATILDNLAARDFAWLIQTK-NH2。

[0752] 18. 项 1 至 9 中任一项的 GLP-2 类似物,其具有 X3、X33、X10、X11、X16 和 / 或 X24 中一个或多个位置上的替换。

[0753] 19. 前述任一项的 GLP-2 类似物,用于治疗。

[0754] 20. 药物组合物,其包含与载体混合的前述任一项的 GLP-2 类似物或者其盐或衍生物。

[0755] 21. 项 20 的药物组合物,其中所述 GLP-2 类似物为可药用酸加成盐。

[0756] 22. 项 20 或项 21 的药物组合物,其被配制成适于注射或输注的液体,或被配制成使所述 GLP-2 类似物缓慢释放。

[0757] 23. 项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 / 或预防胃和肠相关病症。

[0758] 24. 项 23 的用途,其中所述胃和肠相关病症为溃疡、消化病症、吸收不良综合

征、短肠综合征 (short gut syndrome)、盲管综合征、炎性肠病、腹型斯泼卢腹泻 (例如由麸质诱发的肠病或乳糜泻病引起)、热带型斯泼卢腹泻、低丙种球蛋白血症型斯泼卢腹泻、肠炎、局限性肠炎 (克罗恩病)、溃疡性结肠炎、小肠损伤或短肠综合征 (short bowel syndrome)。

[0759] 25. 项 23 的用途, 其中所述胃和肠相关病症为放射性肠炎、传染性肠炎或感染后肠炎, 或者由于毒剂或者其它化学治疗剂引起的小肠损伤。

[0760] 26. 项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗 / 或预防化学疗法或放射治疗的副作用。

[0761] 27. 项 26 的用途, 其中所述化学疗法的副作用是腹泻、腹部痛性痉挛、呕吐或化学疗法治疗引起的肠上皮结构和功能损伤。

[0762] 28. 项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗新生儿、骨质疏松或 DPP-IV (二肽基肽酶 -IV) 介导的病症。

[0763] 29. 项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗 / 或预防与营养不良相关的病症。

[0764] 30. 项 29 的用途, 其中所述与营养不良相关的病症为恶病质或厌食症。

[0765] 31. 核酸分子, 其包含编码项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物的核酸序列。

[0766] 32. 表达载体, 其包含与指导其表达的控制序列组合的项 31 所述核酸序列。

[0767] 33. 已转化项 32 所述表达载体的宿主细胞。

[0768] 34. 生产项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物的方法, 所述方法包括在适于表达 GLP-2 类似物的条件下培养项 22 的宿主细胞以及纯化这样生产的 GLP-2 类似物。

[0769] 35. 根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞, 用于治疗。

[0770] 36. 根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗 / 或预防胃和肠相关病症, 或者用于治疗 / 或预防化学疗法或放射治疗的副作用, 或者用于治疗新生儿、骨质疏松或 DPP-IV (二肽基肽酶 -IV) 介导的病症。

[0771] 37. 治疗有此需要的患者中胃和肠相关病症的方法, 所述方法通过施用有效量的项 1 至 17 中任一项的 GLP-2 类似物、根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞来实现。

[0772] 38. 项 37 的方法, 其中所述胃和肠相关病症为溃疡、消化病症、吸收不良综合征、短肠综合征 (short gut syndrome)、盲管综合征、炎性肠病、腹型斯泼卢腹泻 (例如由麸质诱发的肠病或乳糜泻病引起)、热带型斯泼卢腹泻、低丙种球蛋白血症型斯泼卢腹泻、小肠炎、局限性肠炎 (克罗恩病)、溃疡性结肠炎、小肠损伤或短肠综合征 (short bowel syndrome)。

[0773] 39. 项 37 的方法, 其中所述胃和肠相关病症为放射性肠炎、传染性肠炎或感染后肠炎, 或者由于毒剂或者其它化学治疗剂引起的小肠损伤。

[0774] 40. 在有此需要的患者中治疗或预防化学疗法或放射疗法副作用的方法, 所述方法包括施用有效量的项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物、根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞。

[0775] 41. 项 40 的方法,其中所述化学疗法副作用为腹泻、腹部痛性痉挛、呕吐或由化学疗法治疗引起的肠上皮结构或功能损伤。

[0776] 42. 在需要其治疗的患者中治疗新生儿病症、肥胖、骨质疏松或 DPP-IV(二肽基肽酶-IV)介导的病症的方法,所述方法包括施用有效量的项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物、根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞。

[0777] 43. 治疗药盒,其包含癌症化学疗法药物以及根据项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物、根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞,其中每一种均任选地与可药用载体组合。

[0778] 44. 药物组合物,其包含与可药用载体组合的癌症化学疗法药物以及根据项 1 至 18 中任一项的 GLP-2 类似物、根据项 31 的核酸分子、根据项 32 的表达载体或根据项 33 的宿主细胞。

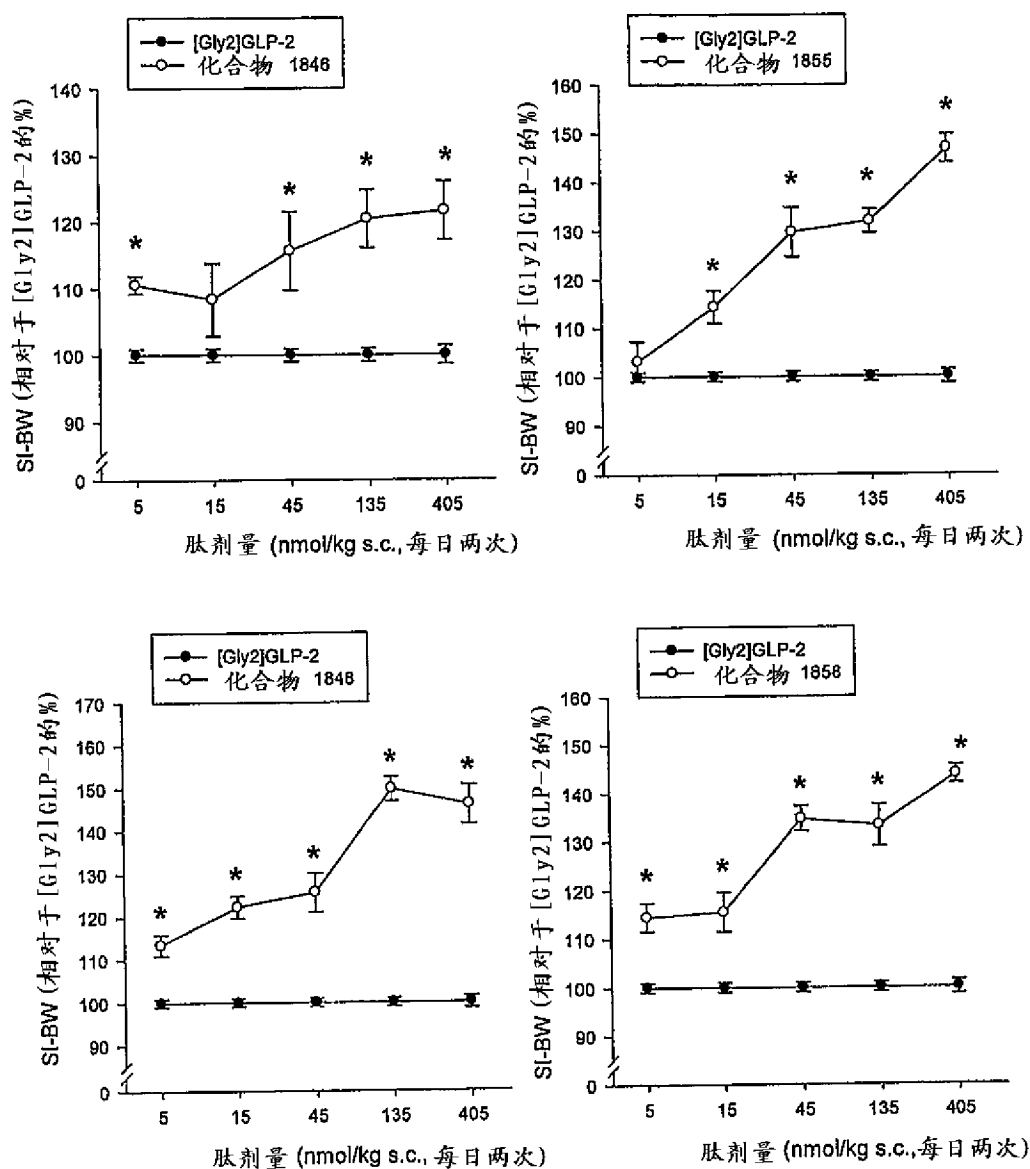


图 1

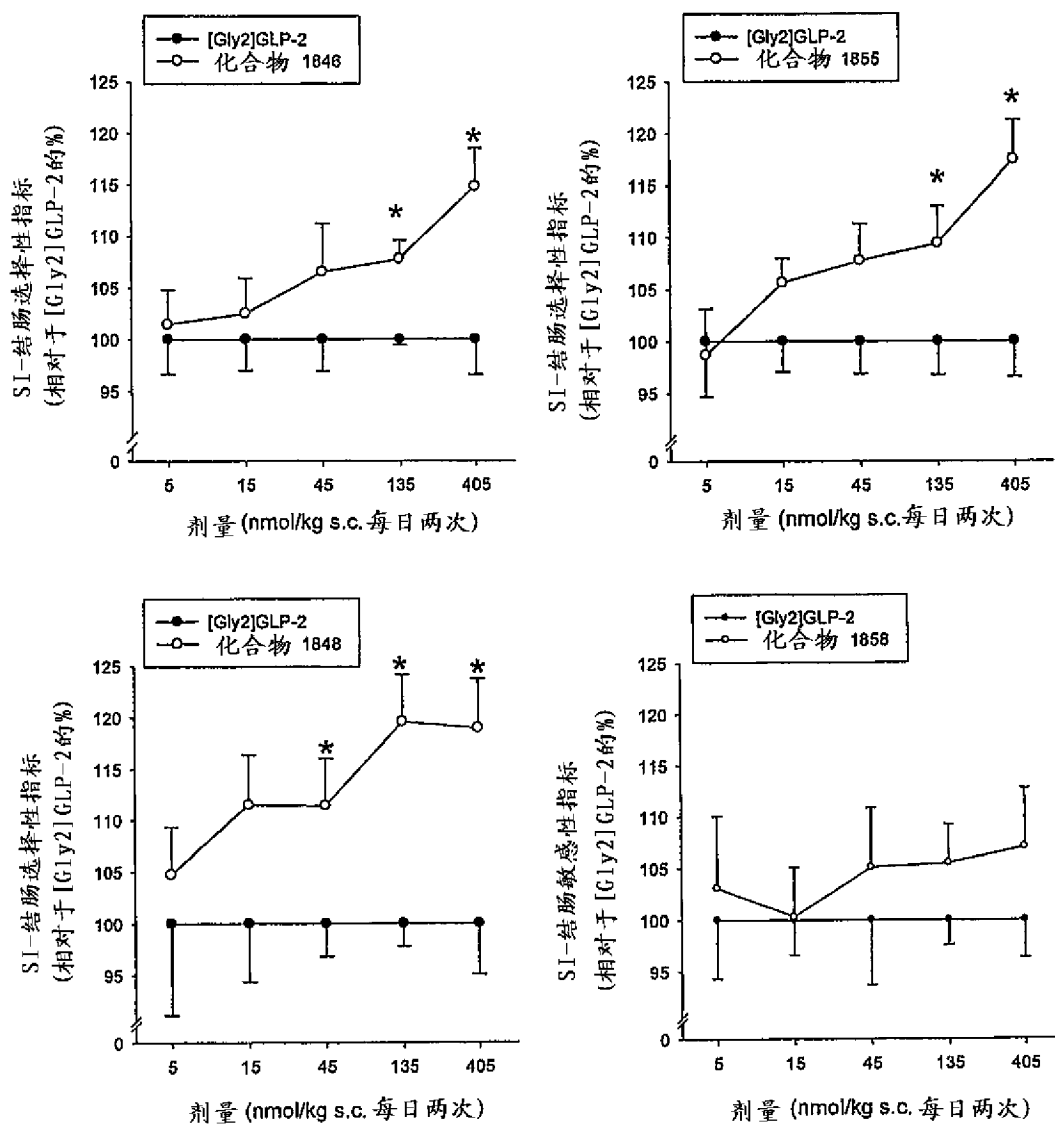


图 2

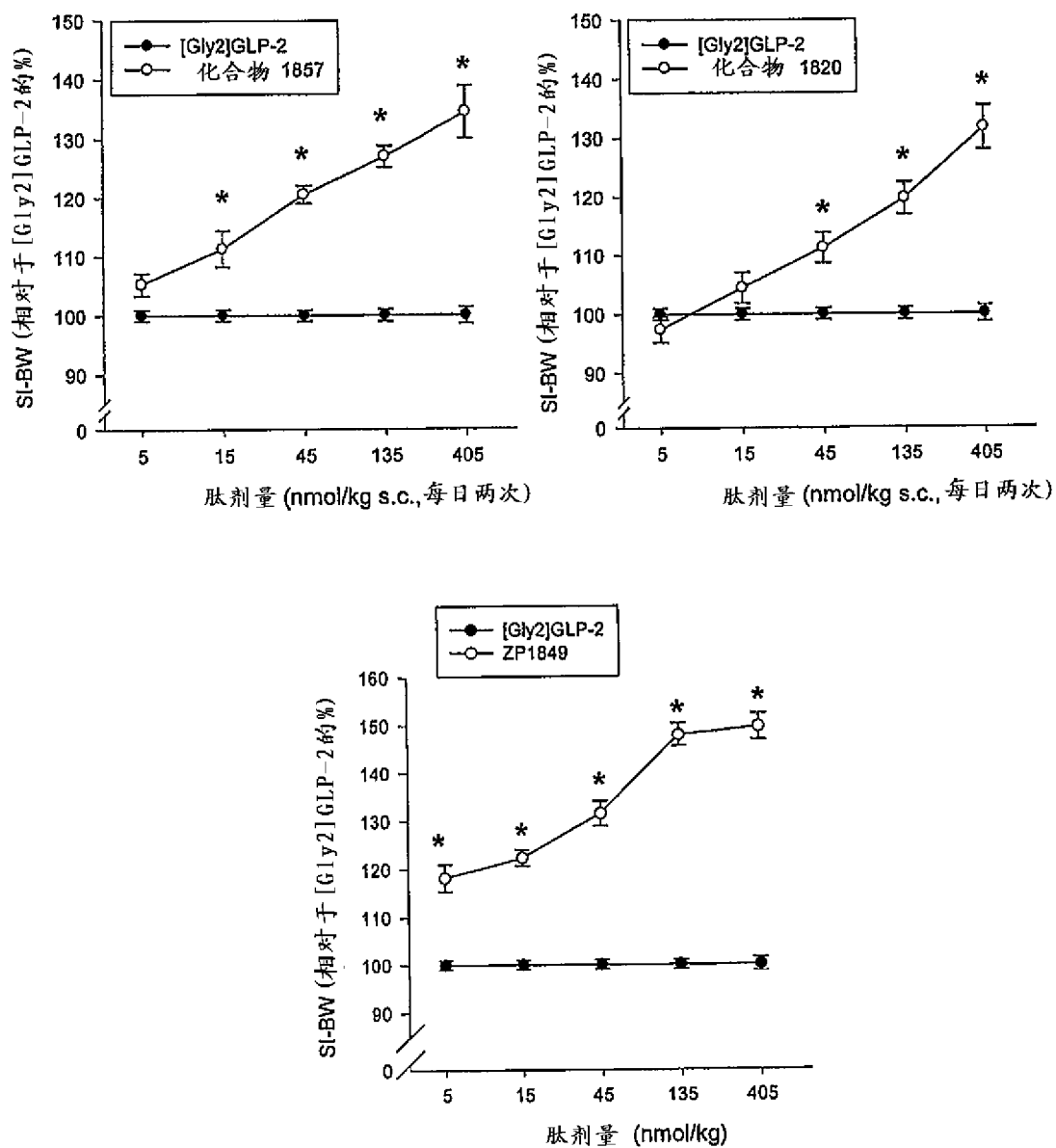


图 3

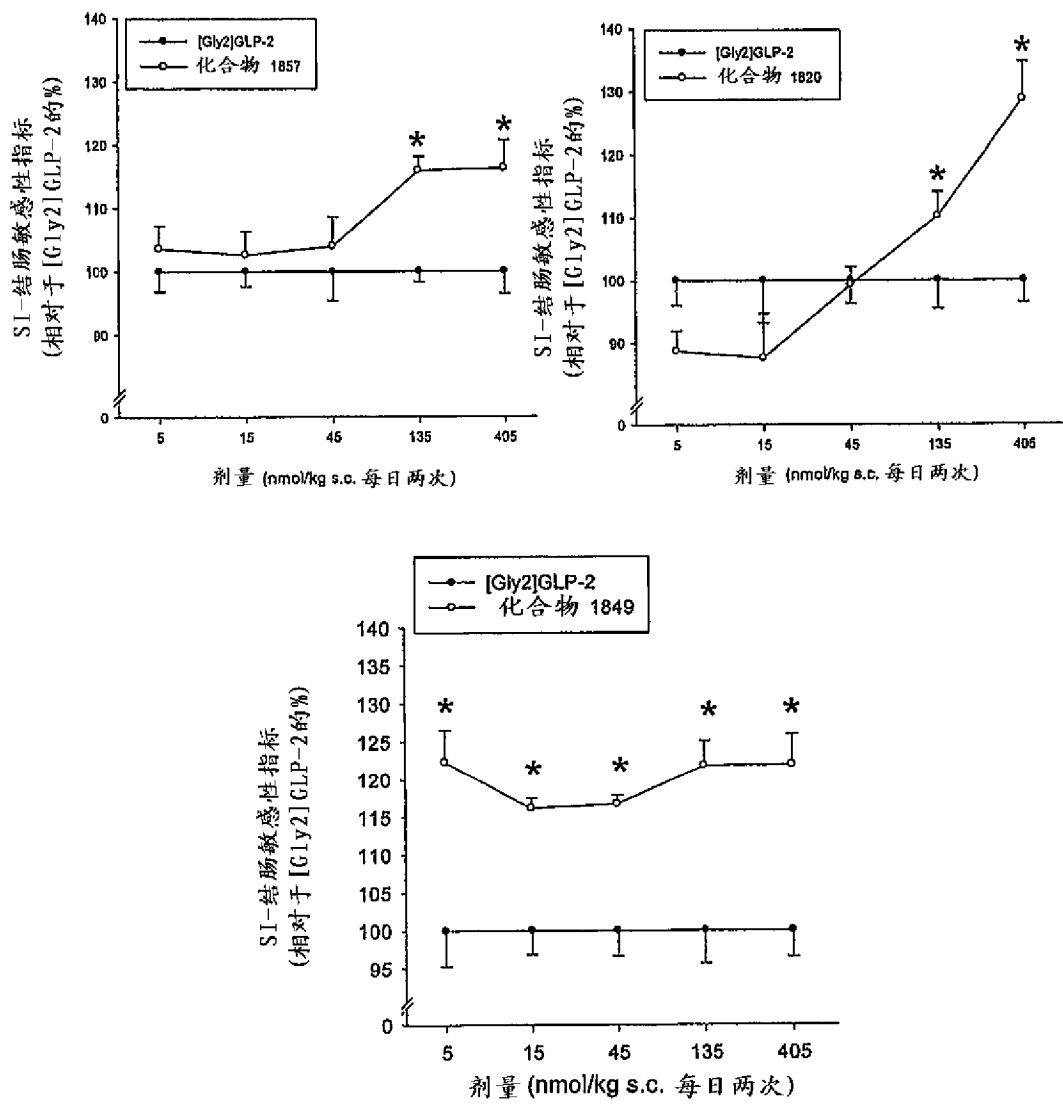


图 4

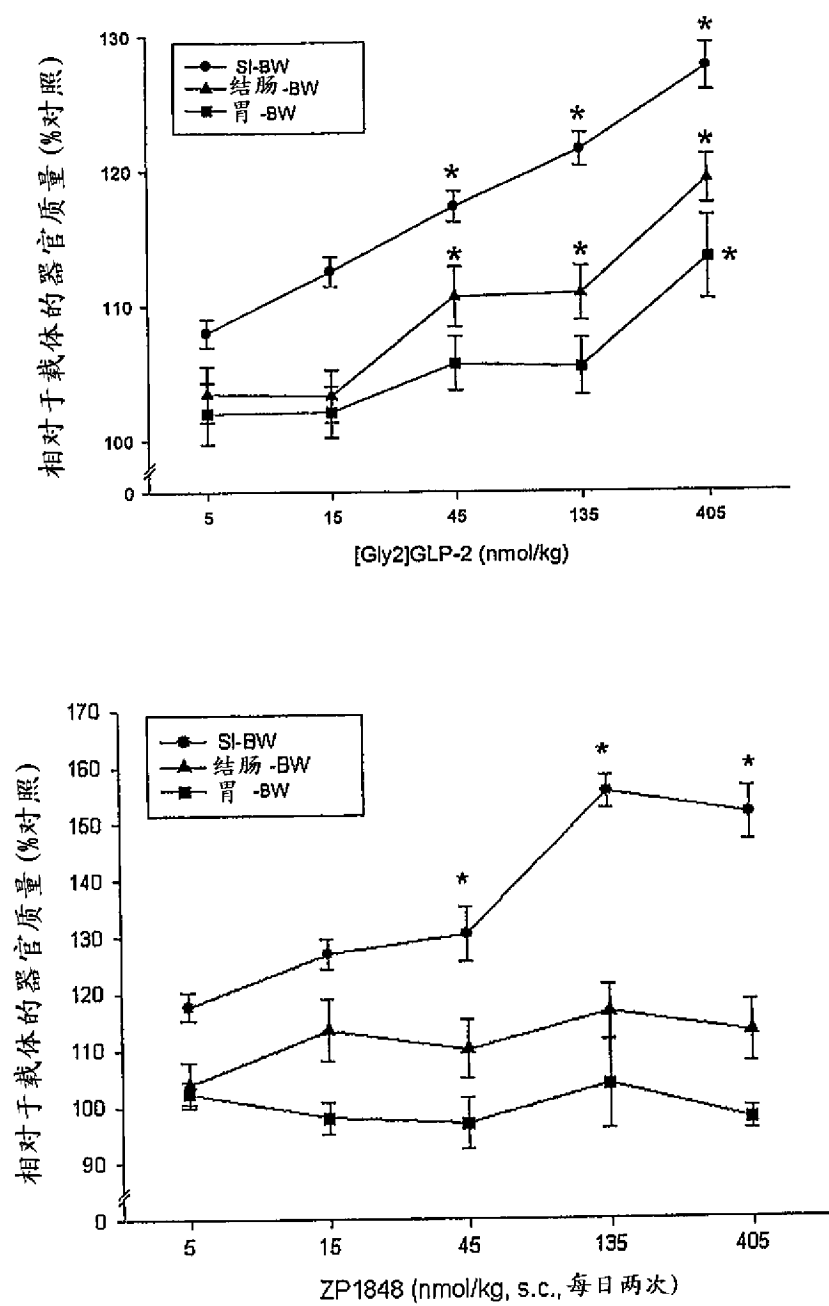
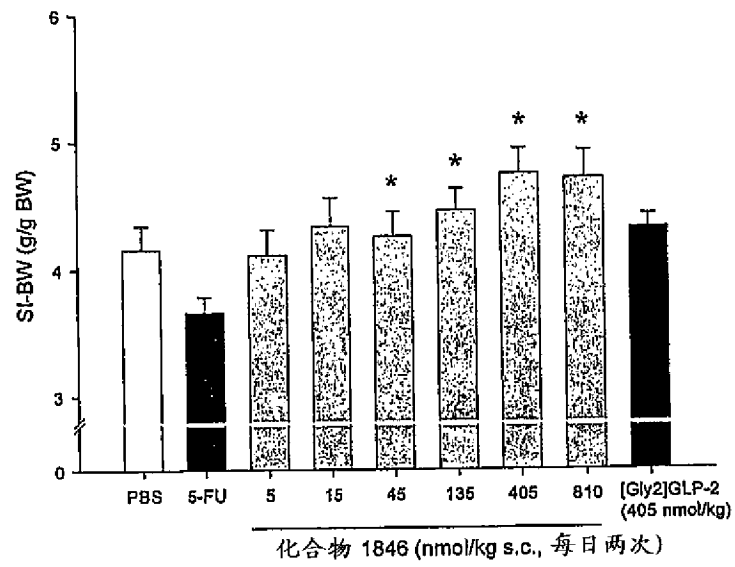


图 5

A)



B)

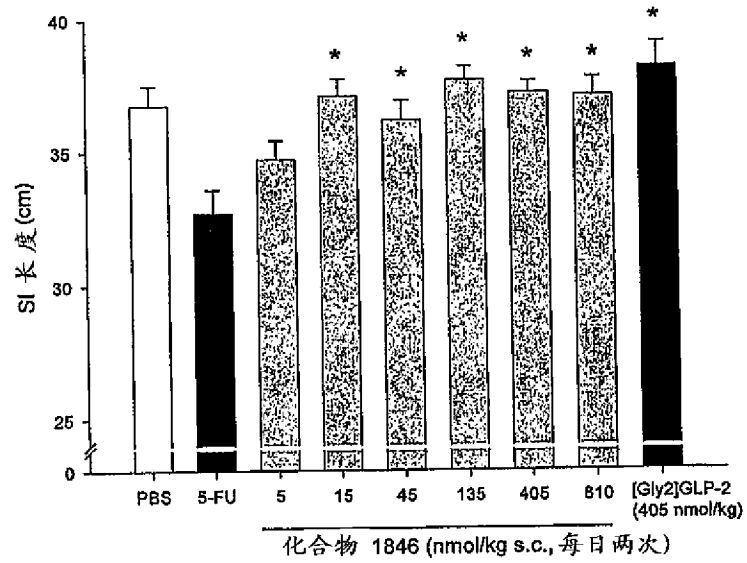
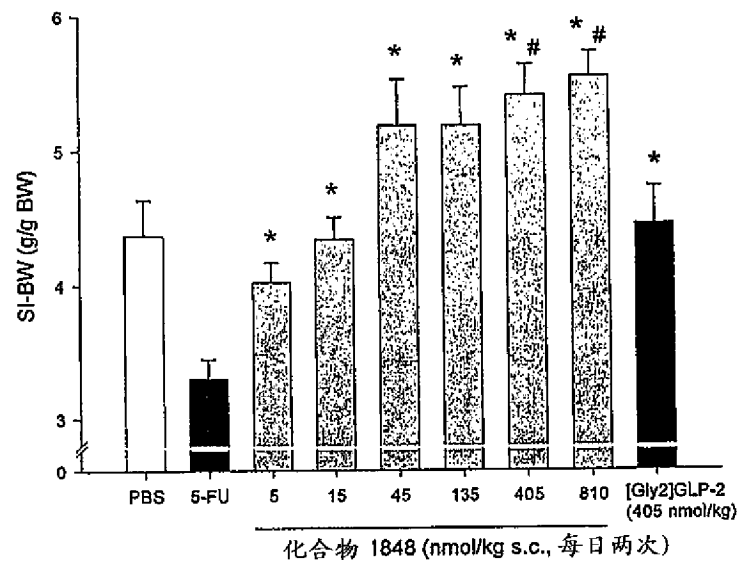


图 6

A)



B)

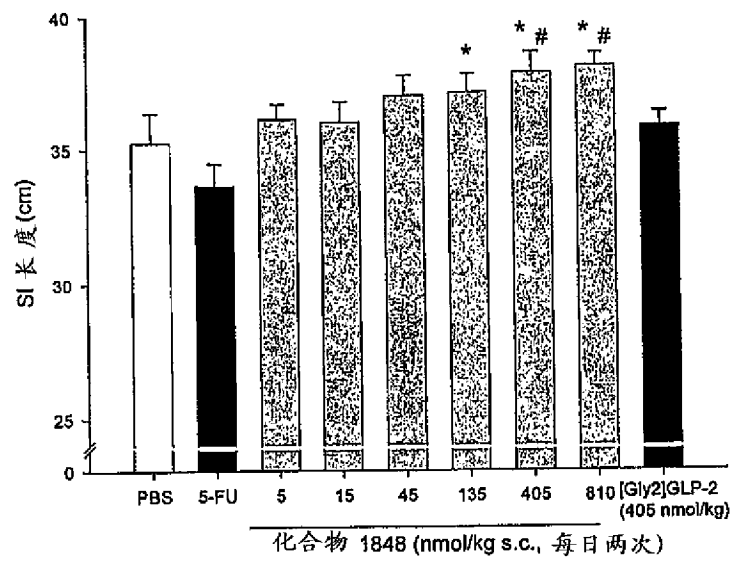
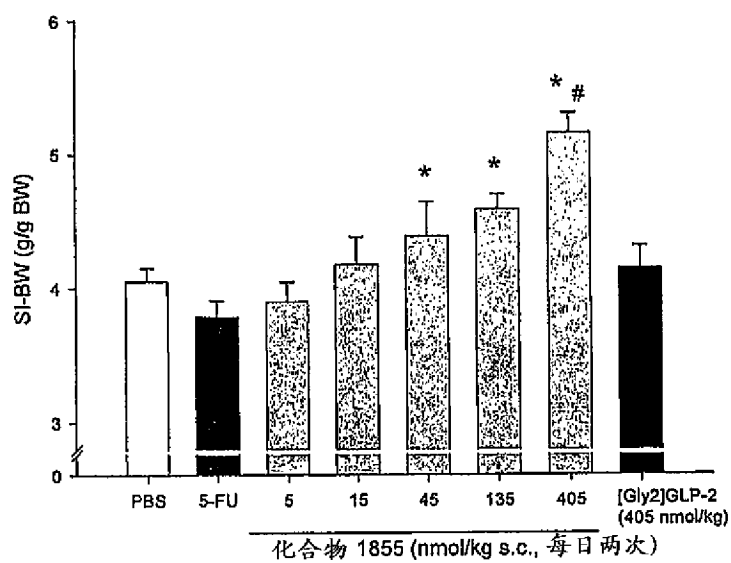


图 7

A)



B)

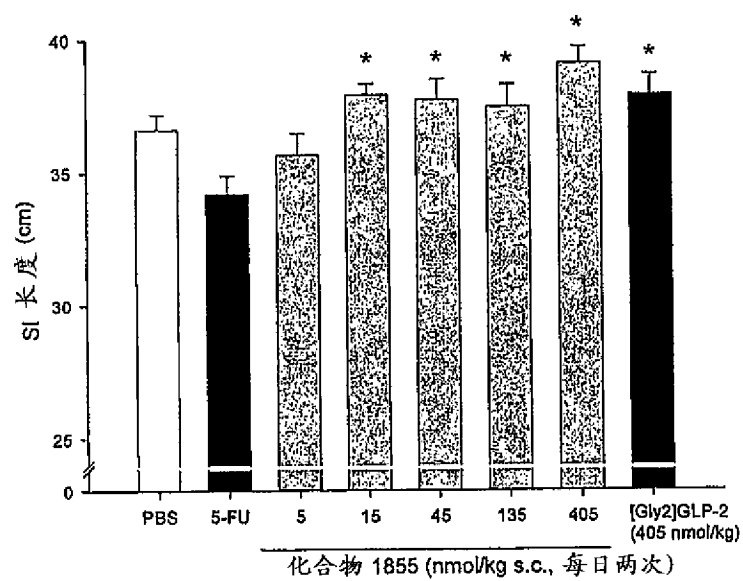
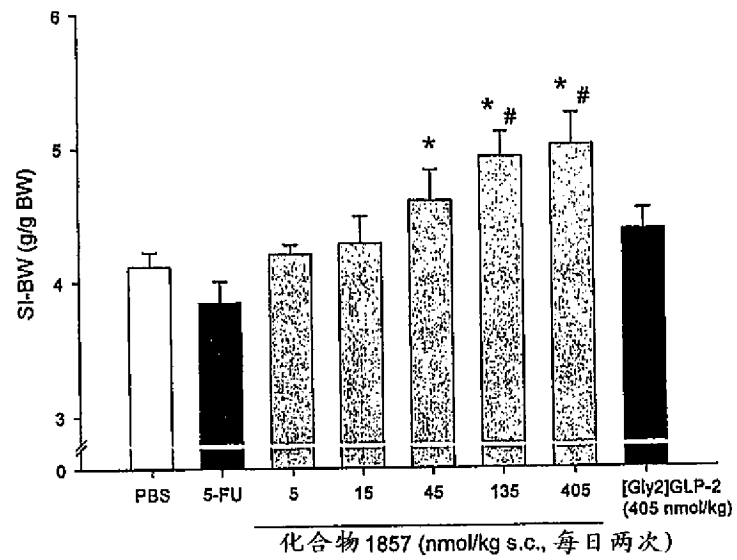


图 8

A)



B)

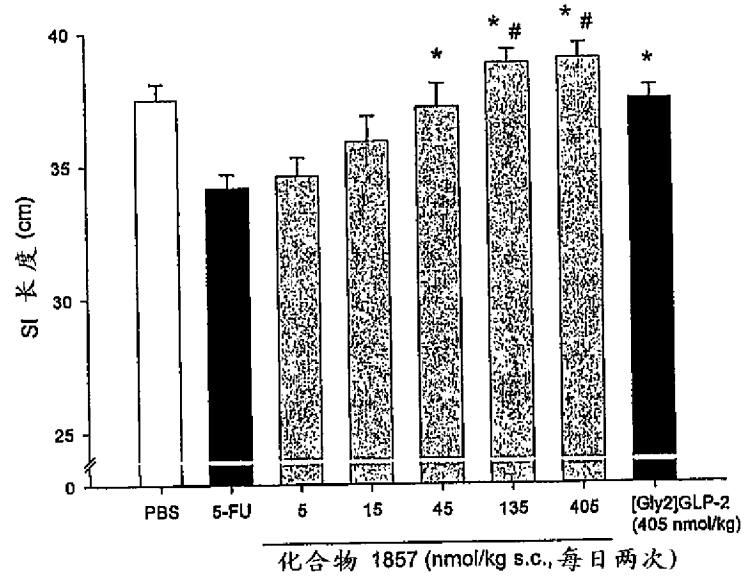
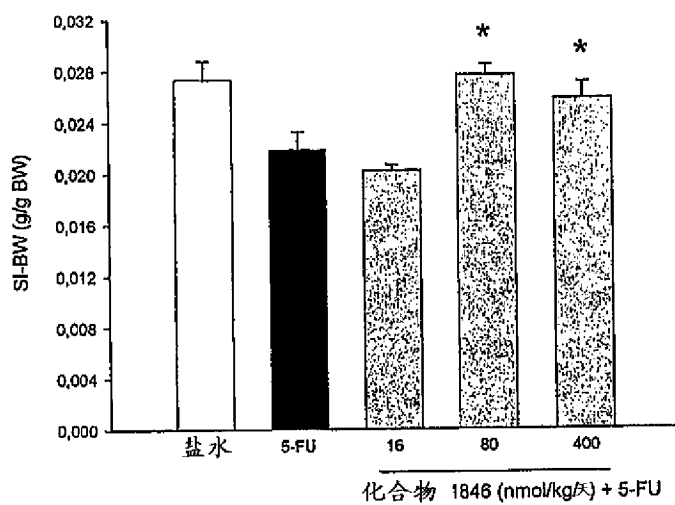


图 9

A)



B)

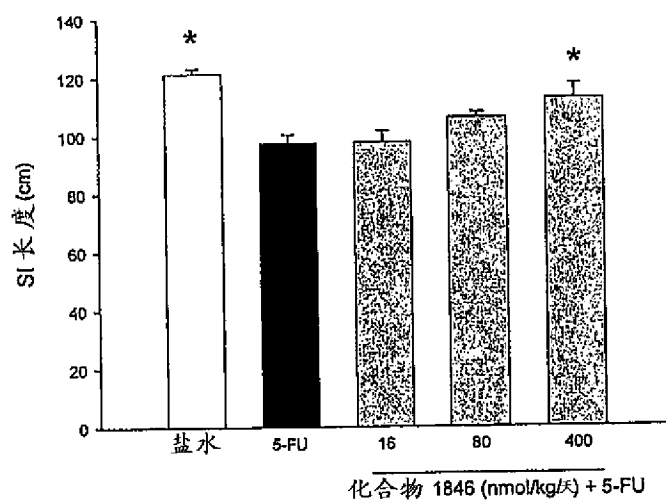


图 10

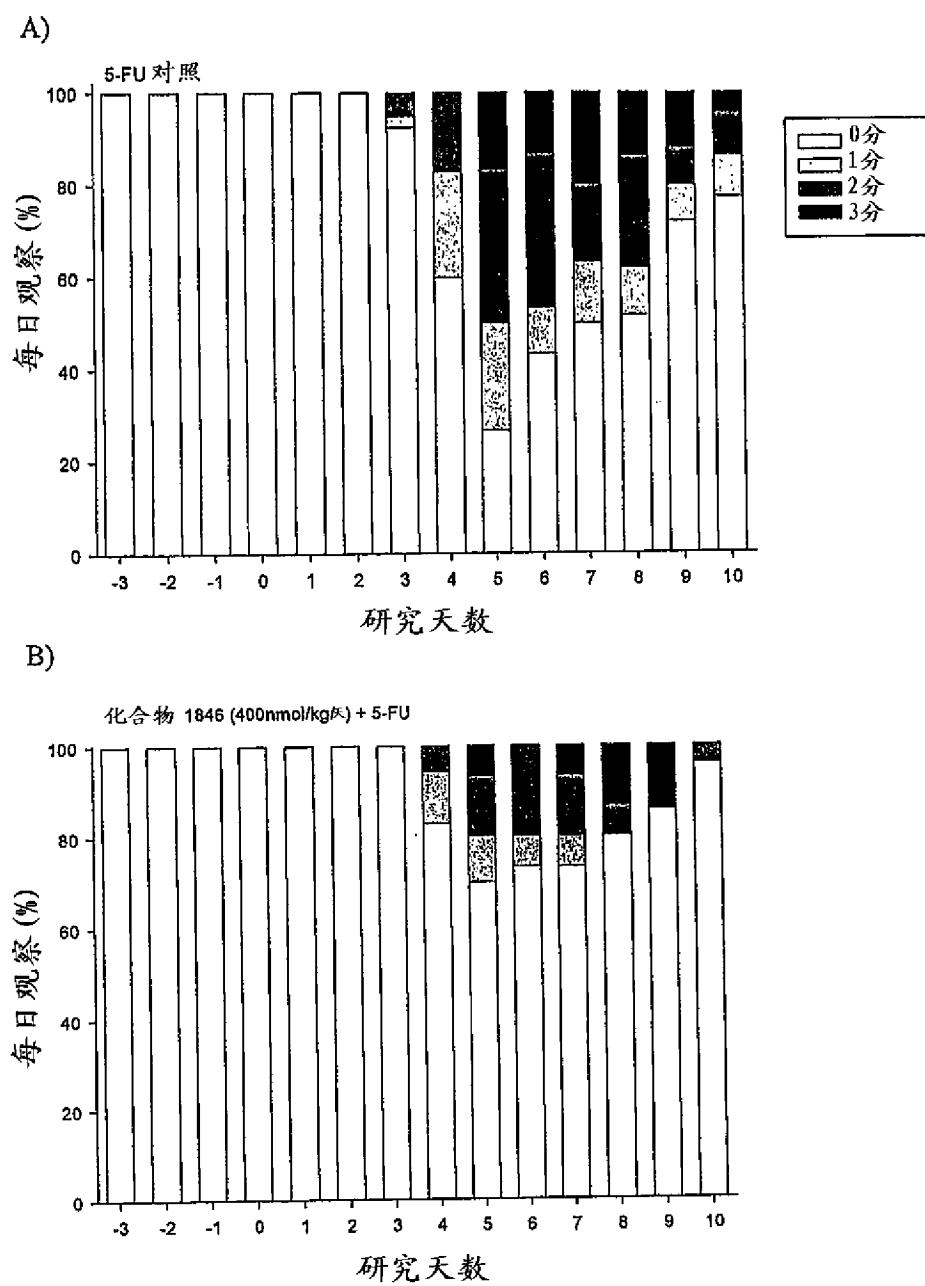


图 11

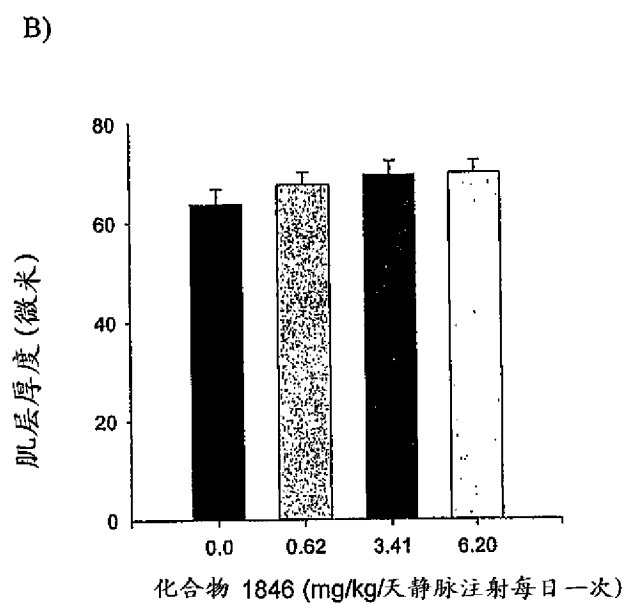
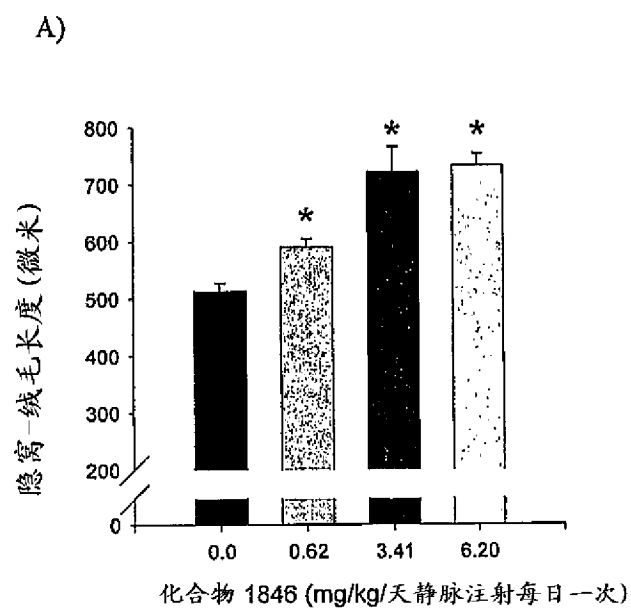


图 12

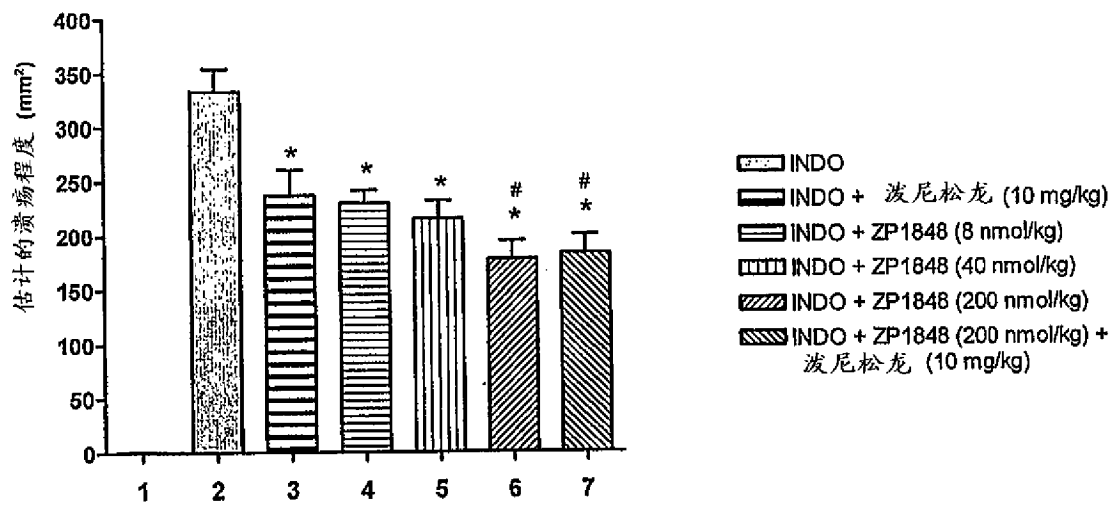


图 13

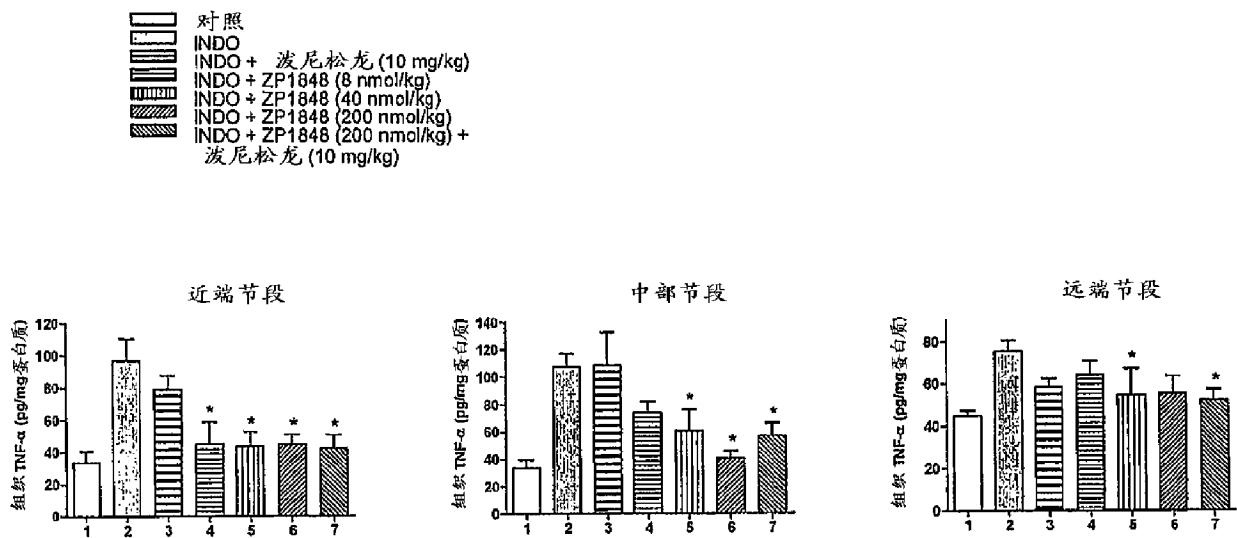


图 14