



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103435700 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201310309673. 0

A61P 15/00(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 01. 04

A61P 9/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2007-0001662 2007. 01. 05 KR

(56) 对比文件

CN 1723220 A, 2006. 01. 18,

WO 2006107124 A1, 2006. 10. 12,

(62) 分案原申请数据

200880001766. 4 2008. 01. 04

审查员 劳芳

(73) 专利权人 韩美科学株式会社

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 宋大海 林昌基 宋台宪 金永勳

权世昌 李宽淳 郑圣烨 崔仁荣

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 郑小粤

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61K 38/22(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

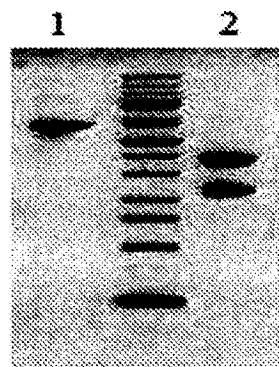
权利要求书2页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称

使用免疫球蛋白片段的促胰岛素缀合物

(57) 摘要

本发明涉及一种具有改善体内功效和稳定性持续时间作用的促胰岛素肽缀合物,该肽缀合物包括促胰岛素肽,非肽聚合物和免疫球蛋白Fc区,它们以共价键相互连接,本发明还涉及该肽的缀合物的用途。本发明的促胰岛素肽缀合物具有相对高的体内活性,并显著增加血液半衰期,因此它可以如愿地用于各种肽类药物的长效配方的开发。



1: 非还原条件
2: 还原条件

1. 一种促胰岛素肽缀合物,所述缀合物含有通过非肽聚合物连接的促胰岛素肽和免疫球蛋白 Fc 区,其中所述的促胰岛素肽是通过用羟基取代 exendin-4 的 N 末端氨基制备的 β -羟基-咪唑-丙酰基-exendin-4,其中所述的非肽聚合物是聚乙二醇,并且,其中所述非肽聚合物的一个末端与所述促胰岛素肽的非 N 末端的氨基酸残基连接。

2. 根据权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述非肽聚合物的两个末端分别与所述免疫球蛋白 Fc 区的氨基或巯基和所述促胰岛素肽连接。

3. 根据权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 区是去糖基化的。

4. 根据权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 区还包括铰链区域。

5. 根据权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述促胰岛素肽的 Fc 区是来自免疫球蛋白的 Fc 区,其中所述的免疫球蛋白选自包括 IgG, IgA, IgD, IgE 和 IgM 的组。

6. 根据权利要求 5 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 区的每个结构域是来自免疫球蛋白的不同源的结构域杂交体,其中所述的免疫球蛋白选自包括 IgG, IgA, IgD, IgE 和 IgM 的组。

7. 根据权利要求 5 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 区是由相同源的单链免疫球蛋白组成的二聚体或多聚体免疫球蛋白 Fc 的结合体。

8. 根据权利要求 5 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 区是 IgG4 Fc 区。

9. 根据权利要求 8 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述免疫球蛋白 Fc 区是去糖基化的人源 IgG4 Fc 区。

10. 根据权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述非肽聚合物的反应基选自包括醛基,丙醛基,丁醛基,马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物的组。

11. 根据权利要求 10 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述琥珀酰亚胺衍生物选自包括琥珀酰亚胺基丙酸酯,琥珀酰亚胺基羧甲基酯,羟基琥珀酰亚胺或琥珀酰亚胺基碳酸酯的组。

12. 根据权利要求 10 所述的促胰岛素肽缀合物,其中所述非肽聚合物的两个末端具有可反应的醛基。

13. 一种促胰岛素肽的衍生物,其中所述促胰岛素衍生物由下面的化学式 1 表示:

$R_1-X-Y-Z-R_2$ < 化学式 1>

其中, R_1 是 β -羟基-咪唑丙基;

R_2 选自由 $-NH_2$, $-OH$ 和 $-Lys$ 组成的组;

X 是 Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- R_3 -Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-P

ro-Ser,

R_3 是 Lys 或 Ser;

Y 是聚乙二醇;和

Z 是免疫球蛋白 Fc 区。

14. 一种制备权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 将两个末端具有反应基的非肽聚合物和促胰岛素肽的氨基或巯基共价地连接, 其中所述的反应基选自包括乙醛, 马来酰亚胺和琥珀酰亚胺衍生物的组;

(2) 从(1)的反应混合物中分离出含有促胰岛素肽的缀合物, 其中所述非肽聚合物与除了 N 末端氨基酸之外的氨基酸共价连接; 和

(3) 将免疫球蛋白 Fc 区共价地连接到被分离的缀合物的非肽聚合物的另一个末端, 产生含有免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽的肽缀合物, 其中所述免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽分别与所述的非肽聚合物的一个末端连接;

其中所述的促胰岛素肽是通过用羟基取代 exendin-4 的 N 末端氨基制备的 β -羟基-咪唑-丙酰基-exendin-4;

其中, 所述的非肽聚合物是聚乙二醇。

15. 一种制备权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

(1) 在 pH7.5 或更高的 pH 下, 将在两个末端具有反应性醛基的非肽聚合物与促胰岛素肽的赖氨酸残基共价地连接;

(2) 从(1)的反应混合物中分离出含有所述促胰岛素肽的缀合物, 其中所述非肽聚合物与所述赖氨酸残基共价连接; 和

(3) 将免疫球蛋白 Fc 区共价地连接到被分离的缀合物的非肽聚合物的另一个末端, 产生含有免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽的肽缀合物, 其中所述免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽分别与所述的非肽聚合物的一个末端连接;

其中所述的促胰岛素肽是通过用羟基取代 exendin-4 的 N 末端氨基制备的 β -羟基-咪唑-丙酰基-exendin-4;

其中, 所述的非肽聚合物是聚乙二醇。

16. 用于治疗糖尿病, 肥胖症, 急性冠状综合症或多囊卵巢综合症的药物组合物, 所述组合物包括权利要求 1 所述的促胰岛素肽缀合物。

使用免疫球蛋白片段的促胰岛素缀合物

[0001] 本申请是于 2008 年 1 月 4 日提交的申请号为 2008800017664, 发明名称为“使用免疫球蛋白片段的促胰岛素缀合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种用于促胰岛素肽的长效配方的促胰岛素肽缀合物。具体地, 本发明涉及一种显著提高体内功效持续时间的改良的促胰岛素肽的缀合物, 该肽缀合物是通过将促胰岛素肽和非肽聚合物以及免疫球蛋白 Fc 共价连接产生的, 以及本发明还涉及该肽缀合物的制备方法。

背景技术

[0003] 肽由于它们的低稳定性而容易变性, 由体内的蛋白水解酶降解, 从而失去活性, 并且肽具有相对较小, 从而容易通过肾。因此, 为了保持血液浓度和包括作为药物有效成分的肽的药物浓度, 必须给病人频繁地服用肽类药物来保持所需要的血液浓度和药物浓度。然而, 该肽类药物通常以注射剂的形式给药, 而这样频繁的给药使得病人很痛苦。为解决这些问题, 已经进行了许多努力。作为其中的一种努力, 已经尝试通过生物膜增加肽类药物的传送以通过口咽或鼻咽吸入来运送肽类药物。然而, 与注射相比, 由于体内的传送效率低, 这种方法仍然很难保持该肽类药物的体内活性。

[0004] 另一方面, 已经进行了很多努力来改善肽类药物的血液稳定性, 并将药物在血液中以高浓度保持长时间, 从而使该药物的药效最大化。因此, 这种肽类药物的长效制剂需要增加肽类药物的稳定性, 并保持不会引起病人免疫反应的足够高浓度的药物浓度。

[0005] 作为稳定肽并抑制它通过蛋白水解酶降解的方法, 已经进行了一些实验来修饰对该蛋白水解酶敏感的特定氨基酸序列。例如, 由于 GLP-1 (7-37 或 7-36 酰胺) 通过二肽基肽酶 IV (DPP IV) 在第 8 氨基酸 (Ala) 和第 9 氨基酸 (Asp) 之间进行剪切而损失了 GLP-1 的药物浓度, 因此具有减少血液中葡萄糖浓度以治疗 2 型糖尿病作用的 GLP-I (7-37 或 7-36 酰胺) 具有 4 分钟或更短的生理活性的半衰期 (Kreymann 等, 1987)。因此, 已经进行了各种关于具有抗 DPP IV 的 GLP-I 类似物的研究, 并且已经进行了用 Gly 取代 Ala (Deacon 等, 1998; Burcelin 等, 1999) 或用 Leu 或 D-Ala 取代 Ala (Xiao 等, 2001) 的实验, 从而在保持它的活性的同时增加了对 DPP IV 的抗性。GLP-1 的 N 末端氨基酸, His⁷ 对 GLP-1 的活性是重要的, 并且作为 DPP IV 的目标。因此, 美国专利第 5,545,618 号描述了用烷基或酰基修饰 N 末端, 并且 Gallwitz 等描述了第 7 位 His 进行 N 甲基化或 α 甲基化, 或者整个 His 用咪唑取代来增加对 DPP IV 的抗性并保持生理活性。

[0006] 除了这些修饰, 从希拉毒蜥蜴的唾液腺纯化的 GLP-1 类似物 exendin-4 (美国专利第 5,424,686 号) 具有对 DPP IV 的抗性并比 GLP-I 具有更高的生理活性。因此, 它具有比 GLP-1 的半衰期更长的 2 至 4 小时的体内半衰期。然而, 仅使用增加 DPP IV 抗性的方法, 生理活性不能被充分地保持, 并且在使用商业可获得的 exendin-4 (exenatide) 的情况下, 它需要一天两次被注射给病人, 这对病人仍然是很痛苦的。

[0007] 这些促胰岛素肽具有一个问题,通常肽的大小很小。从而,它们不能在肾中被重新获得,并且它们随后被排出体外。因此,已经使用以化学方法在肽的表面添加例如聚乙二醇(PEG)的具有高溶解度的聚合物来抑制在肾中的损失的方法。

[0008] PEG 非特异性地结合到特异位点或目标肽的多个位点产生了增加肽的分子量的效果,并从而抑制通过肾的损失,并防止水解,而不产生任何的副作用。例如,国际专利公开第 W02006/076471 号申请描述了 PEG 结合到 B 型利钠肽或 BNP, BNP 结合到 NPR-A 激活 cGMP 的产生, cGMP 使得动脉血压降低,并因此作为充血性心力衰竭的治疗剂,从而保持生理活性。美国专利第 6,924,64 号描述了 PEG 结合到 exendin-4 的赖氨酸残基来增加它的体内停留时间。然而,这种方法增加了 PEG 的分子量,从而增加了肽类药物的体内停留时间,同时随着分子量的增加,该肽类药物的浓度显著地减少了,并且肽的反应性也降低了。因此,产量被不希望的降低了。

[0009] 国际专利公开第 W002/46227 号申请描述了使用基因重组技术通过将 GLP-1, exendin-4 或其类似物与人血清白蛋白或免疫球蛋白区(Fc)结合来制备融合蛋白。美国专利第 6,756,480 号描述了通过将甲状旁腺激素(PTH)和其类似物与 Fc 区结合来制备 Fc 融合蛋白。这些方法可以解决如聚乙二醇化产量低和非特异性的问题,但是它们仍然具有这样一个问题,即增加血液中半衰期的效果不像期待中的那么显著,并且有时浓度也很低。为了使增加血液中半衰期的效果最大化,使用了各种类型的肽连接器,但是可能引起免疫反应。此外,如果肽具有二硫键,例如使用 BNP,那么错折叠的概率很高。因此,这类肽几乎不可能被使用。

[0010] 此外, GLP-1 衍生物即 NN2211 是通过取代 GLP-1 的氨基酸并被结合到酰基侧链以形成与白蛋白的非共价键来制备的,从而增加了它的体内停留时间。然而,它具有 11 至 15 小时的半衰期,与 exendin-4 相比,它没有显示出半衰期的显著增加。从而, GLP-1 衍生物仍然需要一天一次地被注射(Nauck 等, 2004)。此外, CJC-1131 是 GLP-I 衍生物,它具有将 GLP-1 和血液中的白蛋白共价结合的马来酰亚胺反应基团,并且为了达到增加体内半衰期的目的,已经努力进行实验来开发 CJC-1131,但是这些努力现在已经停了下来。其后被提议的物质 CJC-1134 是共价结合到重组白蛋白的 exendin-4,并且没有显示增加血液稳定性的显著效果,它具有 17 小时的血液半衰期(鼠)(Thibauoleau 等, 2006)。

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 因此,本发明人将免疫球蛋白 Fc 和非肽聚合物与非 N 末端的氨基酸残基处通过共价键连接到促胰岛素肽的特异性位点,并发现本发明的缀合物具有显著的增加体内功效和半衰期的用途。特别地,他们发现,在促胰岛素肽的缀合物中,肽的缀合物例如 exendin-4, exendin-4 的 N 末端氨基被敲除的去-氨基-组氨酰-exendin-4, exendin-4 的 N 末端氨基被羟基取代的 β -羟基-咪唑-丙酰基-exendin-4, exendin-4 的 N 末端氨基用两个甲基基团修饰的二甲基-组氨酰-exendin-4 和第一个组氨酸的 α 碳和 N 末端氨基均被敲除的咪唑-乙酰基-exendin-4 都产生显著的增加的体内功效和半衰期的作用。

[0013] 技术方案

[0014] 本发明的一个目的是提供一种促胰岛素肽的长效制剂,它具有保持该促胰岛素肽

的体内活性并增加血液半衰期的作用。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 显示了测定天然 exendin-4(N)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0017] 图 2 显示了测定天然 exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0018] 图 3 显示了测定去-氨基-组氨酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0019] 图 4 显示了测定(2-羟基-3-(1H-咪唑-4-基)丙酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0020] 图 5 显示了测定(2-(1H-咪唑-4-基)乙酰基)-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0021] 图 6 显示了测定 Ser12 突变的去-氨基-组氨酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0022] 图 7 显示了测定 Arg12 突变的去-氨基-组氨酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0023] 图 8 显示了测定去-氨基-组氨酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 人血清白蛋白(HSA) 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0024] 图 9 显示了测定二甲基-组氨酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0025] 图 10 显示了测定 GLP-I (N)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0026] 图 11 显示了测定去-氨基-组氨酰-GLP-1 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0027] 图 12 显示了测定天然 exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的反相 HPLC 的结果；

[0028] 图 13 显示了通过 12% 的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定(2-(1H-咪唑-4-基)乙酰基)-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物纯度的结果；

[0029] 图 14 显示了去-氨基-组氨酰-exendin-4 (Lys)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物降低血液中葡萄糖浓度的作用的测定结果。

[0030] 优选实施方式

[0031] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种长效的促胰岛素肽的缀合物,其中在其两端具有反应基团的促胰岛素肽和非肽聚合物共价地相互连接。

[0032] 本发明的促胰岛素肽是用于促进胰岛素在胰脏 β 细胞中合成和表达的具有促胰岛素功能的肽。这些肽包括前体,激动剂,衍生物,片段和突变体,并优选 GLP (胰升血糖素样肽)-1, exendin3 和 exendin4。

[0033] GLP-1 是由小肠分泌的激素,通常促进胰岛素的生物合成和分泌,抑制胰升血糖素的分泌并促进细胞中葡萄糖的吸收。在小肠中,胰升血糖素前体被分解为三种肽,它们是胰升血糖素、GLP-1 和 GLP-2。此处, GLP-1 指 GLP-1 (1-37),它起初是以不具有促胰岛素

功能的形式存在。但是,随后它被加工并被转化为有活性的 GLP-1 (7-37) 的形式。GLP-1 (7-37) 氨基酸的序列如下:

[0034] GLP-1 (7-37)

[0035] HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EPIAW LVKGR G

[0036] GLP-1 衍生物指显示与 GLP-1 有至少 80% 同源性的氨基酸序列的肽,它可以是被化学改性的并显示至少与 GLP-1 相等或更好的促胰岛素功能。

[0037] GLP-1 片段指在天然 GLP-1 的 N 末端或 C 末端添加或敲除了一个或多个氨基酸的形式,其中该添加的氨基酸可以是非天然存在的氨基酸(例如, D 型氨基酸)。

[0038] GLP-1 突变体指具有促胰岛素功能的肽,其具有不同于天然 GLP-1 的一个或多个氨基酸序列。

[0039] exendin3 和 exendin4 是由 39 个氨基酸组成的促胰岛素肽,其具有与 GLP-1 的氨基酸序列的 53% 的同源性。exendin3 和 exendin4 的氨基酸序列如下:

[0040] Exendin-3

[0041] HSDGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNNG PSSGA PPPS

[0042] Exendin-4

[0043] HEGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNNG PSSGA PPPS

[0044] exendin 激动剂指与体内受体进行反应的化合物并具有与 exendin 相等的生理活性,其与 exendin 的结构无关。Exendin 衍生物指与天然 exendin 相比具有至少 80% 的氨基酸序列同源性的肽,它可以在氨基酸残基上的一些基团上被化学取代(例如, α -甲基化, α -羟基化),被敲除(例如,脱氨)或被修饰(例如 N-甲基化),并具有促胰岛素功能。

[0045] exendin 片段指在天然 exendin 的 N 末端或 C 末端添加或敲除了一个或多个氨基酸的片段,其中可以添加非天然存在的氨基酸(例如, D 型氨基酸),并具有促胰岛素功能。

[0046] exendin 变体指具有与天然 exendin 不同的至少一个氨基酸序列的肽,它具有促胰岛素功能。

[0047] exendin 激动剂,衍生物,片段和突体的每种制备方法可以单独或结合使用。例如,本发明包括的促胰岛素肽的氨基酸序列具有至少一个氨基酸与天然促胰岛素肽不同的氨基酸并在 N 末端的氨基酸残基处被脱氨。

[0048] 在一个特定实施方案中,本发明使用的天然促胰岛素肽和改性的促胰岛素肽可以使用固相合成方法被合成,并且包括天然促胰岛素肽的大多数天然肽可以通过重组技术产生。

[0049] 此外,在本发明中使用的促胰岛素肽可以结合到非肽聚合物的不同位点上。

[0050] 根据本发明制备的肽的缀合物可以根据被连接到促胰岛素肽的位点的改变具有不同的活性。

[0051] 例如,它可以分别与 N 末端和除了 N 末端的例如 C 末端的其它末端结合,其体外活性不同。乙醛反应基团在低 pH 选择性地结合到 N 末端,并且在例如 pH9.0 的高 pH 可以结合到赖氨酸残基来形成共价键。允许聚乙二醇化反应在不同 pH 中进行,并且随后位置异构体可以使用离子交换色谱柱从反应混合物中分离出来。

[0052] 如果促胰岛素肽与非 N 末端的对于体内活性重要位点的位点结合,使用非肽聚合物上的马来酰亚胺连接器可以将活性巯基引入到该天然氨基酸序列中被修饰的氨基酸残

基的位点以形成共价键。

[0053] 如果促胰岛素肽与非 N 末端的对于体内活性重要位点的位点结合,使用在非肽聚合物上的乙醛连接器将活性氨基引入到该天然氨基酸序列中被修饰的氨基酸残基的位点以形成共价键。

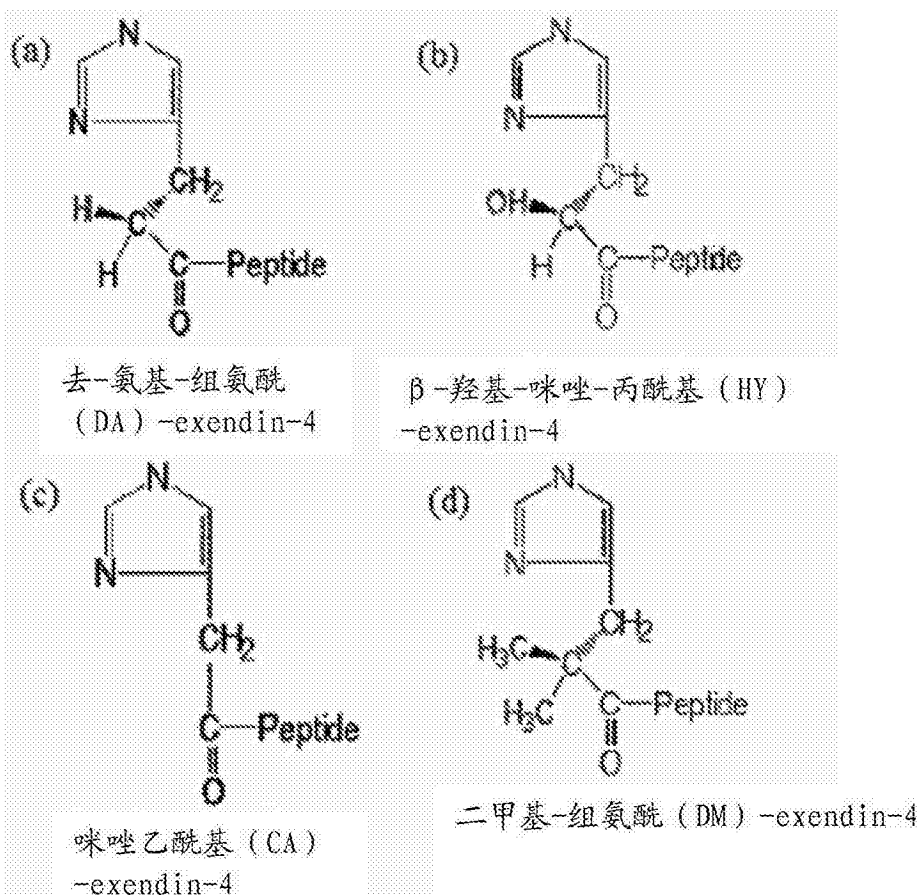
[0054] 当使用非肽聚合物上的乙醛连接器时,它与 N 末端的氨基和赖氨酸残基反应,并且可以使用改性形式的促胰岛素肽来选择性地增加反应产量。例如,使用 N 末端阻断方法,赖氨酸残基取代方法,在 C 末端将氨基引入的方法等,可以仅将被反应的一个氨基保留在所需位点,从而增加聚乙二醇化和结合反应的产量。保护 N 末端的方法包括二甲基化,以及甲基化,脱氨作用,乙酰化作用等,但不限于这些烃基化方法。

[0055] 在一个优选实施方案中,本发明的促胰岛素肽缀合物是免疫球蛋白 Fc 区特异性地结合到促胰岛素肽的非 N 末端氨基的氨基上的促胰岛素肽的缀合物。

[0056] 在一个特定实施方案中,本发明人在 pH9.0 诱导了天然 exendin-4 的聚乙二醇化来选择性地将 PEG 结合到促胰岛素肽的赖氨酸残基上。可选地,为了在 Lys 残基进行聚乙二醇化,具有被敲除的或被保护的 N 末端的 exendin-4 衍生物的聚乙二醇化在 pH7.5 中进行。通过敲除 N 末端组氨酸的 α 氨基,或通过用羟基取代 N 末端氨基,或通过用两个甲基修饰 N 末端组氨酸的 α 氨基,或通过敲除第一氨基酸(组氨酸)的 α 碳并将其与 N 末端氨基连接起来以保留咪唑-乙酰基等来阻断 N 末端的聚乙二醇化。这些衍生物通过下面的化学式表示:

[0057] < 化学式 1>

[0058]



[0059] 与 N 末端结合不同的是, 当将 PEG 结合到赖氨酸残基而不是 N 末端时, 体外活性被保持在 8.5% (表 1)。此外, 即使通过敲除 exendin-4 的 N 末端氨基制备的去-氨基-组氨酰-exendin-4 (以下称为 DA-exendin-4), 通过用羟基取代 exendin-4 的 N 末端氨基制备的 β -羟基-咪唑-丙酰基-exendin-4 (以下称为 HY-exendin-4), 通过用两个甲基修饰 exendin-4 的 N 末端氨基制备的二甲基-组氨酰-exendin-4 (以下称为 DM-exendin-4) 和通过敲除 exendin-4 的第一组氨酸的 α 碳并将其与 N 末端氨基连接制备的咪唑乙酰基-exendin-4 (以下称为 CA-exendin-4) 的 Fc 缀合物显示了与天然 exendin-4 缀合物可比的体外活性和血液半衰期(表 1), 这些缀合物显示了出乎意料地高体内功效持续时间(图 14)。根据本发明制备的 DM-exendin-4- 免疫球蛋白 Fc 缀合物, DA-exendin-4- 免疫球蛋白 Fc 缀合物, CA-exendin-4- 免疫球蛋白 Fc 缀合物和 HYexendin-4- 免疫球蛋白 Fc 缀合物显示了 50 小时或更长的增加的血液半衰期。通过结合到不影响肽活性的 Lys 残基上, 最少地减少了浓度。此外, 通过去除 N 末端的氨基或 α 碳观察到了出乎意料地葡萄糖降低的高活性。

[0060] 免疫球蛋白 Fc 区用作药物载体是安全的, 因为它是在体内代谢的生物可降解多肽。此外, 与整个免疫球蛋白分子相比, 免疫球蛋白 Fc 区具有相对低的分子量, 并且因此有利于缀合物的制备, 纯化和生产。由于免疫球蛋白 Fc 区不包含其氨基酸序列根据抗体子类而不同并且因此是高度非同源性的 Fab 片段, 因此可以预测免疫球蛋白 Fc 区可以极大地增加物质的同源性并减少抗原。

[0061] 本发明中使用的促胰岛素肽用载体物质和非肽聚合物连接。

[0062] 可以用于本发明的载体物质可以选自包括免疫球蛋白 Fc 区, 白蛋白, 转铁蛋白和 PEG 的组, 并优选免疫球蛋白 Fc 区。

[0063] 在此使用的术语“免疫球蛋白 Fc 区”指免疫球蛋白的重链恒定区 2 (C_H2) 和重链恒定区 3 (C_H3), 而不是免疫球蛋白的重链和轻链的可变区, 重链恒定区 1 (C_H1) 和轻链恒定区 1 (C_L1)。它还可以包括重链恒定区的绞链区。此外, 本发明的免疫球蛋白 Fc 区可以包含 Fc 区的部分或全部, 只要它具有与天然蛋白基本相似或更好的生理活性, 除了重链和轻链的可变区外, Fc 区包括重链恒定区 1 (C_H1) 和 / 或轻链恒定区 1 (C_L1)。此外, Ig Fc 区可以是在 C_H2 和或 C_H3 的氨基酸序列的相对长的部分具有缺失的片段。即, 本发明的免疫球蛋白 Fc 区可以包括 1) C_H1 结构域, C_H2 结构域, C_H3 结构域和 C_H4 结构域, 2) C_H1 结构域和 C_H2 结构域, 3) C_H1 结构域和 C_H3 结构域, 4) C_H2 结构域和 C_H3 结构域, 5) 一个或多个结构域和免疫球蛋白绞链区(或绞链区的一部分)的结合, 和 6) 重链恒定区和轻链恒定区的每个结构域的二聚体。

[0064] 本发明的免疫球蛋白 Fc 区包括天然氨基酸序列和其序列衍生物(突变体)。由于一个或多个氨基酸残基的缺失, 插入, 非保守或保守取代或其结合, 因此氨基酸序列衍生物是与天然氨基酸序列不同的序列。例如, 在 IgG Fc 中, 已知 214 至 238, 297 至 299, 318 至 322, 或 327 至 331 位置是结合中起重要作用的氨基酸残基, 可以用作修饰的适合目标。其它各种衍生物也是可行的, 包括可以形成二硫键的区域被敲除, 或者天然 Fc 形式的 N 末端的某些氨基酸残基被除去或者甲硫氨酸残基被添加在此。此外, 为了去除效应子作用, 缺失可以在补体结合位点进行, 例如 C1q- 结合位点和 ADCC (抗体依赖细胞介导的细胞毒作用) 位点。制备这些免疫球蛋白 Fc 区的序列衍生物的方法在国际专利公开第 W097/34631 和

W096/32478 中公开。

[0065] 通常不改变分子活性的蛋白质和肽中的氨基酸交换在现有技术中是已知的 (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。大多数通常发生的交换是双向的 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, 和 Asp/Gly 交换。

[0066] 如果需要, Fc 区可以通过磷酸化, 硫酸盐化, 丙烯酸酯化, 糖基化, 甲基化, 法尼基化, 乙酰化, 酰胺化等进行修饰。

[0067] 上述 Fc 衍生物是与本发明的 Fc 区具有相同生理活性或例如对于耐热, pH 等具有改善的结构稳定性的衍生物。

[0068] 此外, 这些 Fc 区可以是从小人或其它动物中分离得到的天然形式, 动物包括牛, 羊, 猪, 小白鼠, 兔, 仓鼠, 鼠和豚鼠, Fc 区可以是从小转换的动物细胞或微生物中获得的重组体或其衍生物。在此, 它们可以由天然免疫球蛋白通过从小人或动物有机体分离全部免疫球蛋白并用蛋白水解酶处理它们获得。木瓜蛋白酶将天然免疫球蛋白消化为 Fab 和 Fc 区, 并且胃蛋白酶的处理使得产生 pF' c 和 F(ab)2 片段。例如, 这些片段可以进行分子筛色谱来分离 Fc 或 pF' c。

[0069] 优选地, 人源 Fc 区是从微生物获得的重组体免疫球蛋白 Fc 区。

[0070] 此外, 本发明的免疫球蛋白 Fc 区可以是具有天然糖链的形式, 与天然形式相比增加的糖链或与天然形式相比降低的糖链, 或可以是去糖基化的形式。免疫球蛋白 Fc 糖链的增加, 降低或去除可以通过现有技术中已知的方法实现, 例如化学方法, 酶法和使用微生物的基因工程方法。从 Fc 区去除糖链导致第一补体成分 C1 的 C1q 部分的亲和力明显降低和抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用或补体依赖性细胞毒性反应的降低或损失, 因此在体内不诱导不需要的免疫反应。在这点上, 去糖基化或无糖基化 (aglycosylated) 形式的免疫球蛋白 Fc 更适合本发明的用作药物载体的目的。

[0071] 在此使用的术语“去糖基化”指从 Fc 区酶法去除含糖部分, 而术语“无糖基化”指通过原核生物, 优选大肠杆菌来产生的不含糖基化形式的 Fc 区。

[0072] 另一方面, 免疫球蛋白 Fc 区可以从小人或包括牛, 羊, 猪, 小白鼠, 兔, 仓鼠, 鼠和豚鼠的其它动物, 并优选人中获得。此外, 免疫球蛋白 Fc 区可以是从小 IgG, IgA, IgD, IgE 和 IgM, 或通过其结合或其杂交体获得的 Fc 区。优选地, 它源自人血中的丰富蛋白中的 IgG 或 IgM, 并且最优选已知的能提高配体结合蛋白的半衰期的 IgG。

[0073] 另一方面, 在此使用的术语“结合”指相同来源的编码单链免疫球蛋白 Fc 区的多肽被连接到不同来源的单链多肽来形成二聚体或多聚体。即, 二聚体或多聚体可以由选自包括 IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, 和 IgE Fc 片段的组的两个或多个片段形成。

[0074] 在此使用的术语“杂交体”指编码不同来源的两个或多个免疫球蛋白 Fc 区的序列均存在于单链免疫球蛋白 Fc 区中。在本发明中, 各种类型的杂交体是可行的。即, 结构域杂交体可以由选自包括 IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 和 IgD Fc 的 C_H1, C_H2, C_H3 and C_H4 的组的一至四个结构域组成, 并且可以包括绞链区域。

[0075] 另一方面, IgG 被分类为 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4 亚类, 并且本发明包括其结合体和杂交体。优选的是 IgG2 和 IgG4 亚类, 并且最优选的是几乎不具有例如 CDC (补体依赖性

细胞毒性)效应子功能的 IgG4 的 Fc 区。

[0076] 也就是,作为本发明的药物载体,最优的选免疫球蛋白 Fc 区是源于人的 IgG4 非糖基化的 Fc 区。源于人的 Fc 区比非源于人的 Fc 区更加优选,非源于人的 Fc 区在人体中作为抗原并引起例如针对该抗原产生新抗体的不希望免疫反应。

[0077] 在此使用的术语“非肽聚合物”指通过除了肽键之外的任何共价键相互连接的包括两个或多个重复单元的生物相容的聚合物。

[0078] 可以用于本发明的非肽聚合物可以选自包括聚乙二醇,聚丙二醇,乙二醇和丙二醇共聚物,聚氧乙烯化的多元醇(polyoxyethylated polyol),聚乙烯醇,多糖,葡聚糖,聚乙烯基醚,例如 PLA(聚乳酸)和 PLGA(聚乳酸-羟基乙酸)的生物可降解的聚合物,脂类聚合物,角素,透明质酸和其结合的组,并优选聚乙二醇。此外,现在技术中已知的和本领域的技术人员容易制备的它们的衍生物也包含在本发明的范围内。

[0079] 通过现有的框内融合方法获得的用于融合蛋白的肽连接器具有如下缺点,它在体内容易被蛋白分解酶裂解,因此不能预期的获得通过载体充分增加活性药物的血液半衰期的效果。然而,在本发明中,可以使用对蛋白水解酶具有耐受力的聚合物将肽的血液半衰期保持到与载体相似的水平。因此,可以用于本发明的任何非肽聚合物可以没有任何限制的被使用,只要它是具有上述功能的聚合物即可,即,对体内蛋白水解酶有耐受力的聚合物。该非肽聚合物优选具有 1 至 100kDa 的分子量,并优选 1 至 20kDa。此外,本发明的连接到免疫球蛋白 Fc 区的非肽聚合物可以是一种聚合物或不同类型聚合物的结合体。

[0080] 本发明中使用的非肽聚合物具有能够结合到免疫球蛋白 Fc 区和蛋白质药物的反应基。

[0081] 非肽聚合物在两端具有反应基,其优选选自包括起反应的醛基,丙醛基,丁醛基,马来酰亚胺基和琥珀酰亚胺衍生物的组。琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺基丙酸酯,羟基琥珀酰亚胺,琥珀酰亚胺羧甲基或琥珀酰亚胺碳酸酯。特别地,当非肽聚合物在两端具有反应醛基时,在两端与生理活性的多肽和具有最小非特异性反应的免疫球蛋白的连接是有效的。通过醛键的还原性烷基化产生的终产物比通过酰胺键连接的更加稳定。在低 pH 下,醛基反应基选择性地结合到 N 末端,并在例如 pH9.0 的高 pH 下结合到赖氨酸残基上形成共价键。

[0082] 非肽聚合物两端的反应基可以是相同的或不同的。例如,非肽聚合物可以在一端具有马来酰亚胺基并在另一端具有醛基,丙醛基或丁醛基。当使用在其两端具有反应性羟基的聚乙二醇作为非肽聚合物时,可以通过已知的化学反应将羟基活化为各种反应基,或者可以使用商业上可获得的具有改性的反应基的聚乙二醇来制备本发明的促胰岛素肽的缀合物。

[0083] 本发明的促胰岛素肽的缀合物保持了现有的促胰岛素肽的体内活性,例如促进胰岛素的合成和分泌,控制食欲,体重损失,增加 β 细胞对血液中葡萄糖的敏感性,促进 β 细胞的增殖,延迟胃的排空和胰高血糖素抑制,此外还显著地增加了促胰岛素肽的血液半衰期和肽的体内功效的持续效果,该缀合物对治疗糖尿病,肥胖症,急性冠状综合症或多囊卵巢综合症是有用的。

[0084] 在另一个实施方案中,本发明提供了制备促胰岛素肽的缀合物的方法,该方法包括以下步骤:

[0085] (1) 将具有反应基的非肽聚合物和促胰岛素肽的氨基或巯基共价地连接,其中所述的非肽聚合物的两端具有选自包括乙醛,马来酰亚胺和琥珀酰亚胺衍生物的组的反应基;

[0086] (2) 从(1)的反应混合物中分离出包括促胰岛素肽的缀合物,其中所述非肽聚合物与非 N 末端的位点共价连接;和

[0087] (3) 将免疫球蛋白 Fc 区共价地连接到被分离的缀合物的非肽聚合物的另一端,产生含有免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽的肽的缀合物,其中免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽的肽分别与所述非肽聚合物的一个末端连接。

[0088] 在此使用的术语“缀合物”指通过将非肽聚合物和促胰岛素肽共价连接,并且随后将免疫球蛋白 Fc 区连接到该非肽聚合物的另一端所制备的中间产物。

[0089] 在一个优选实施例中,本发明提供了一种制备促胰岛素肽的缀合物的方法,该方法包括以下步骤:

[0090] (1) 将在两端具有反应性醛基的非肽聚合物和促胰岛素肽的赖氨酸残基共价地连接;

[0091] (2) 从(1)的反应混合物中分离出包括促胰岛素肽的缀合物,其中所述非肽聚合物与赖氨酸残基共价连接;和

[0092] (3) 将免疫球蛋白 Fc 区共价地连接到被分离的缀合物的非肽聚合物的另一端,产生含有免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽的肽的蛋白缀合物,其中免疫球蛋白 Fc 区和促胰岛素肽分别与所述非肽聚合物的一个末端连接。更优选的,(1)的非肽聚合物和促胰岛素肽的赖氨酸残基在 pH7.5 或更高的 pH 下被连接。

[0093] 在另一个实施方案中,本发明提供了包括本发明的促胰岛素肽的缀合物的治疗糖尿病的药物组合物。

[0094] 包括本发明的缀合物的药物组合物还可以包括药物上可接受的载体。对于口服给药,该药物上可接受的载体可以包括粘合剂,润滑剂,崩解剂,赋形剂,增溶剂,分散剂,稳定剂,悬浮剂,着色剂和芳香剂。对于注射制剂,药物上可接受的载体可以包括缓冲剂,防腐剂,止痛剂,增溶剂,等渗压剂(isotonic agent)和稳定剂。对于局部给药的制剂,药物上可接受的载体可以包括碱,赋形剂,润滑剂和防腐剂。本发明的药物组合物可以与上述的药物上可接受的载体结合被制备成各种剂型。例如,对于口服给药,药物组合物可以被制备成小片,片剂,胶囊,酏剂,混悬液,糖浆或薄片。对于注射制剂,药物组合物可以被制备成例如一次剂量的剂型的安瓿或例如多剂量容器的单元型剂型。药物组合物还可以被制备成溶液,悬浮液,药片,药丸,胶囊和长效制剂。

[0095] 另一方面,适合药物配方的载体,赋形剂和稀释液的例子包括乳糖,葡萄糖,蔗糖,山梨糖醇,甘露醇,木糖醇,赤藻糖醇,麦芽糖醇,淀粉,阿拉伯橡胶,藻酸盐,凝胶,磷酸钙,硅酸钙,纤维素,甲基纤维素,微晶纤维素,聚乙烯吡咯烷酮,水,羟基苯甲酸甲酯,羟苯丙酯,滑石,硬脂酸镁和矿物油。此外,药物配方还可以包括填充剂,抗凝血剂,润滑剂,保湿剂,芳香剂和防腐剂。

[0096] 根据本发明的缀合物在治疗糖尿病,肥胖症,急性冠状综合症或多囊卵巢综合症中是有用的。因此,包括该缀合物的药物组合物可以在治疗这些疾病时被给药。

[0097] 在此使用的术语“给药”指将预定量的物质通过某种适合的方式引入病人。本发

明的缀合物可以通过任何常见的途径被给药,只要它可以到达预期的组织。给药的各种方式是可以预期的,包括腹膜,静脉,肌肉,皮下,皮层,口服,局部,鼻腔,肺部和直肠,但是本发明不限于这些已举例的给药方式。然而,由于口服给药时,肽被消化,口服给药的组合物的活性成分应该被包被或被配制以防止其在胃部被降解。优选的,本发明的组合物可以注射制剂被给药。此外,本发明的药物组合物可以使用将活性成分传送到靶细胞的特定器械来给药。

[0098] 本发明的药物组合物的给药频率和剂量可以通过多个相关因素被确定,该因素包括要被治疗的疾病类型,给药途径,病人年龄,性别,体重和疾病的严重程度以及作为活性成分的药物类型。由于本发明的药物组合物具有优良的体内功效和浓度的持续时间,它可以显著地减少本发明的药物的给药频率和剂量。

[0099] 通过下面的说明性的实施例获得更好的理解本发明,但是这些实施例不能解释为限制本发明。

具体实施例

[0100] 实施例 1. exendin-4 的聚乙二醇化和位置异构体的分离

[0101] 3. 4K 丙酸 ALD(2)PEG(PEG 具有两个丙醛基, IDB Inc., South Korea)和 exendin-4 (AP, USA) 的 N 末端进行聚乙二醇化,使 3mg/ml 浓度的肽和 PEG 在 4℃ 以 1:15 的摩尔比反应 90 分钟。同时,该反应在 pH4.0 的 100mM 浓度的 NaOAc 缓冲液中进行,并且 20mM SCB(NaCNBH3) 作为还原剂被添加到其中来进行该反应。3. 4K 丙酸 ALD(2)PEG 和 exendin-4 的赖氨酸(Lys) 残基进行聚乙二醇化,使 3mg/ml 浓度的肽和 PEG 在 4℃ 以 1:30 的摩尔比反应 3 小时。同时,该反应在 pH9.0 的 100mM 浓度的磷酸钠缓冲液中进行,并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中来进行该反应。单聚乙二醇化的肽使用 SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences) 从每个反应溶液中被纯化,并且异构体使用 SOURCE S(XK16ml, Amersham Biosciences) 被分离。已经发现聚乙二醇化的 N 末端的峰被较早的发现,并且随后依次发现聚乙二醇化的赖氨酸残基的两个峰。洗脱峰的聚乙二醇化的区域通过肽谱法被证实。Lys12- 聚乙二醇化的缀合物被较早的洗脱,而 Lys27- 聚乙二醇化的缀合物在最后的的部分被洗脱,并且 N 末端的位置异构体和 Lys12 的位置异构体相互被完全地分离。

[0102] 色谱柱:SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences)

[0103] 流速:2.0ml/分钟

[0104] 梯度:A0->40%80 分钟 B(A:20mM Tris pH8.5, B:A+0.5M NaCl)

[0105] 色谱柱:SOURCE S(XK16ml, Amersham Biosciences)

[0106] 流速:2.0ml/min

[0107] 梯度:A0->100%50min B(A:20mM 柠檬酸 pH3.0, B:A+0.5M KCl)

[0108] 实施例 2exendin-4 (N)-PEG- 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0109] 使用实施例 1 描述的相同的方法,3. 4K 丙酸 ALD(2)PEG 和 exendin-4 的 N 末端反应,并且仅提纯 N 末端异构体,并且随后与免疫球蛋白 Fc 结合。该反应在肽:免疫球蛋白 Fc1:8 的比例下 4℃ 下进行 17 小时,并且蛋白的总浓度是 50mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行,并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。使用两个纯化柱纯化结合反应溶液。首先,使用 SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences) 去除还没有参与结合

反应的大量的免疫球蛋白 Fc。使用 20mM Tris (pH7.5) 和 1M 具有盐梯度的 NaCl, 具有相对较弱的结合力的免疫球蛋白 Fc 被较早地洗脱, 并且随后 exendin-4- 免疫球蛋白 Fc 被洗脱。通过这第一步的纯化操作, 一定程度上去除了免疫球蛋白 Fc, 但是由于免疫球蛋白 Fc 和 exendin-4- 免疫球蛋白 Fc 在离子交换色谱柱上具有相互类似的结合力, 因此它们不能被相互完全地分离。因此, 利用两种材料各自的疏水性进行二次纯化。在 SOURCE ISO(HR16ml, Amersham Biosciences) 使用 20mM Tris(pH7.5) 1.5M 的硫酸铵, 首次被纯化的样品被结合, 并且该样品用梯度减少浓度的硫酸铵被洗脱。在 HIC 色谱柱中, 具有较弱结合力的免疫球蛋白 Fc 被较早的洗脱, 并且随后具有较强结合力的 exendin-4- 免疫球蛋白 Fc 样品被洗脱。由于它们具有明显不同的疏水性, 比起在离子交换色谱柱中它们可以更容易地相互分离。然而, 由于不同的摩尔比使用了过量的免疫球蛋白 Fc, 仅适用 HIC 色谱柱不能获得高纯度。通过反相 HPLC 测定的纯度是 91.6% (图 1)。

[0110] 色谱柱: SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences)

[0111] 流速: 2.0ml/ 分钟

[0112] 梯度: A0→25%70 分钟 B(A:20mM Tris pH7.5, B:A+1M NaCl)

[0113] 色谱柱: SOURCE ISO(HR16ml, Amersham Biosciences)

[0114] 流速: 7.0ml/ 分钟

[0115] 梯度: B100→0%60 分钟 B(A:20mM Tris pH7.5, B:A+1.5M 硫酸铵)

[0116] 实施例 3. exendin-4 (Lys27) - 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0117] 使用实施例 1 中描述的相同的方法, 3.4K 丙酸 ALD(2)PEG 和 exendin-4 的赖氨酸(Lys)反应, 并且仅赖氨酸异构体被纯化, 并且随后与免疫球蛋白 Fc 结合。在两个异构体的峰之间, 最后的异构体的峰(Lys27 的位置异构体) 具有更多的反应并且它容易与 N 末端异构体峰区分, 用于结合反应。该反应在肽:免疫球蛋白 Fc1:8 的比例, 4℃下进行 16 小时, 蛋白的总浓度是 50mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用 SOURCE Q16ml 和 SOURCE ISO16ml 的两步纯化操作与实施例 2 相同。通过反相 HPLC 测定的纯度是 91.7% (图 2)。

[0118] 实施例 4. 去-氨基-组氨酰基 exendin-4 (Lys27) - 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0119] 为了使 3.4K PropionALD(2)PEG 与去-氨基-组氨酰基 exendin-4 (DA-exedin-4, AP, USA) 的赖氨酸(Lys) 残基发生聚乙二醇化, 通过使肽和 3.4K PropionALD(2) 以 1:30 的摩尔比在 4℃下反应来进行聚乙二醇化, 肽的浓度是 3mg/ml。反应溶液是 100mM pH7.5 的 Na- 磷酸缓冲液, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。聚乙二醇化的肽通过使用 SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences) 和 SOURCE S(XK16ml, Amersham Biosciences) 的两步纯化操作进行纯化。在两个异构体的峰之间, 具有更多的反应并且容易与 N 末端异构体的峰区分的最后的异构体的峰(Lys27 的位置异构体) 用于结合反应。该反应在肽:免疫球蛋白 Fc1:8 的比例, 4℃下进行 20 小时, 蛋白的总浓度是 60mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE ISO16ml 进行两步纯化。通过反相 HPLC 测定的纯度是 95.8% (图 3)。

[0120] 色谱柱: SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences)

[0121] 流速 :2.0ml/ 分

[0122] 梯度 :A0→20%70 分 B(A:20mM Tris pH9.0, B:A+1M NaCl)

[0123] 色谱柱 :SOURCE S(XK16ml, Amersham Biosciences)

[0124] 流速 :2.0ml/ 分

[0125] 梯度 :A0→50%50 分 B(A:20mM 柠檬酸 pH3.0, B:A+1M KCl)

[0126] 实施例 5 羟基 - 咪唑 - 丙酰基 exendin-4 (Lys27) - 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0127] 使用实施例 4 中描述的相同方法, 3.4K PropionALD(2)PEG 和 β -羟基 - 咪唑 - 丙酰基 exendin-4 (HY-exendin-4, AP, USA) 的赖氨酸(Lys) 残基反应。在两个异构体的峰之间, 具有更多的反应并且容易与 N 末端异构体的峰区分的最后的异构体的峰(Lys27 的位置异构体) 用于结合反应。该反应在肽 :免疫球蛋白 Fc1 :8 的比例, 4℃下进行 20 小时, 蛋白的总浓度是 60mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE ISO16ml 进行两步纯化。通过反相 HPLC 测定的纯度是 93.9% (图 4)。

[0128] 实施例 6. 咪唑 - 乙酰基 exendin-4 (Lys27) - 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0129] 使用与实施例 4 中描述的相同方法, 3.4K PropionALD(2)PEG 和咪唑 - 乙酰基 exendin-4 (CA-exendin-4, AP, USA) 的赖氨酸(Lys) 残基反应。在两个异构体的峰之间, 具有更多的反应并且容易与 N 末端异构体的峰区分的最后的异构体的峰(Lys27 的位置异构体) 用于结合反应。该反应在肽 :免疫球蛋白 Fc1 :8 的比例, 4℃下进行 20 小时, 蛋白的总浓度是 60mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE ISO16ml 进行两步纯化。通过反相 HPLC 测定的纯度是 95.8% (图 5)。

[0130] 实施例 7. Ser12 突变的 DA exendin-4 (Lys27) - 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0131] 3.4K PropionALD(2)PEG 和 Ser12 突变的 DA exendin-4 的赖氨酸(Lys) 残基进行聚乙二醇化, 使所述肽和 3.4K PropionALD(2)PEG 以 1 :30 摩尔比, 肽的浓度为 3mg/ml 在 25℃反应 3 小时。此时, 反应在 100mM 浓度, pH7.5 的 Na- 磷酸缓冲液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中进行反应。单聚乙二醇化的肽的纯化操作使用 SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences) 而不使用 SOURCE S(XK16ml, Amersham Bioscience) 如实施例 4 中描述的进行。该反应在肽 :免疫球蛋白 Fc1 :8 的比例, 4℃下进行 20 小时, 蛋白的总浓度是 60mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。由于 Ser12 突变的 DAexendin-4 具有更强的阴离子性质, 不参与反应的过量的免疫球蛋白 Fc 仅使用 SOURCE Q 通过纯化操作被有效地去除了。因此, 使用 SOURCE ISO 的纯化操作被省略了, 并且使用 SOURCE Q 的纯化操作的条件与实施例 2 中的相同。通过反相 HPLC 测定的纯度是 92.5% (图 6)。

[0132] 实施例 8. Arg12 突变的 DA exendin-4 (Lys27) - 免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0133] 使用与实施例 7 中描述的相同方法, 3.4K PropionALD(2)PEG 和 Arg12 突变的 DAexendin-4 (AP, USA) 的赖氨酸(Lys) 残基反应并被纯化。随后, 进行结合反应。该反应在肽 :免疫球蛋白 Fc1 :8 的比例, 4℃下进行 20 小时, 蛋白的总浓度是 60mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE ISO16ml 进行两步纯化。通过反相 HPLC

测定的纯度是 99.2% (图 7)。

[0134] 实施例 9. 氨基-组氨酰基 exendin-4 (Lys27)-白蛋白缀合物的制备

[0135] 使用与实施例 4 中描述的相同方法, 3.4K PropionALD(2)PEG 和去-氨基-组氨酰基 exendin-4 (AP, USA) 的赖氨酸(Lys)残基反应并被纯化。该反应在肽:作为载体物质的源于人血的白蛋白(Green cross, South Korea)以 1:7 的比例, 4℃下进行 24 小时, 蛋白的总浓度是 50mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE IS016ml 进行两步纯化。通过反相 HPLC 测定的纯度是 90.3% (图 8)。

[0136] 实施例 10. 二甲基-组氨酰基 exendin-4 (Lys27)-免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0137] 使用二甲基-组氨酰基 exendin-4(DM exendin, AP, USA), 由与实施例 4 中描述的相同方法制备二甲基-组氨酰基 exendin-4 (Lys27)-免疫球蛋白 Fc 缀合物。通过反相 HPLC 测定的纯度是 96.4% (图 9)。

[0138] 实施例 11. GLP-1 (N)-免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0139] 3.4K ButyrALD(2)PEG (具有两个丁醛基团的 PEG, Nekatar, USA) 和 GLP-1 的 N 末端(AP, USA) 通过 1:5 摩尔比的肽和 PEG 在 4℃下反应 90 分钟进行聚乙二醇化, 肽的浓度是 3m/ml。此时, 该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB (NaCNBH₃) 作为还原剂被添加到其中。随后, 该反应在肽:免疫球蛋白 Fc 以 1:10 的比例, 4℃下进行 16 小时, 蛋白的总浓度是 50mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE IS016ml 进行两步纯化。通过反相 HPLC 测定的纯度是 91% (图 10)。

[0140] 实施例 12 去-氨基-组氨酰基-GLP-1 (Lys27)-免疫球蛋白 Fc 缀合物的制备

[0141] 3.4K Propion ALD(2)PEG 和去-氨基-组氨酰基 GLP-1 的赖氨酸(Lys)残基(AP, USA)进行聚乙二醇化, 使 1:30 摩尔比的肽和 3.4K Propion ALD(2) 在 4℃下反应 4 小时, 肽的浓度是 3m/ml。此时, 该反应在 pH7.5, 100mM 浓度的 Na-磷酸缓冲液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中来进行反应。单聚乙二醇化的肽的纯化操作使用 SOURCE Q(XK16ml, Amersham Biosciences) 进行。该反应在肽:免疫球蛋白 Fc 以 1:6 的比例, 4℃下进行 16 小时, 蛋白的总浓度是 60mg/ml。该反应在 100mM K-P (pH6.0) 溶液中进行, 并且 20mM SCB 作为还原剂被添加到其中。在结合反应后, 使用与实施例 2 相同的 SOURCE Q16ml 和 SOURCE IS016ml 进行两步纯化。但是, 由于 GLP-1 免疫球蛋白 Fc 缀合物和免疫球蛋白 Fc 之间的疏水性的差异小于 exendin-4 免疫球蛋白 Fc 和免疫球蛋白 Fc 之间的疏水性, 所以在 SOURCE IS016ml 中的溶解度下降了。因此, 在上述纯化操作后还要进行使用 SOURCE IS016ml 的纯化操作。通过反相 HPLC 测定的纯度是 91.9% (图 11)。

[0142] 实施例 13. 使用 ButyrALD 连接器 PEG 的缀合物的制备

[0143] 使用 3.4K ButyrALD(2)PEG (具有两个丁醛基团的 PEG, Nektar, USA), 用与实施例 1 中描述的相同方法制备 3.4Kexendin-4。它使用实施例 3 中描述的相同方法与免疫球蛋白 Fc 结合。通过反相 HPLC 测定的纯度是 92.3% (图 12)。

[0144] 实施例 14. exendin-4 体外活性持续释放的测定

[0145] 为了测定 exendin-4 的长效制剂的功效, 使用测定体外细胞活性的方法。通常, 为了测定 GLP-1 的体外活性, 分离胰岛瘤细胞或胰岛, 并且测定细胞中的 cAMP's 是否在 GLP-1

治疗后增加。

[0146] 对于本实验中使用的测定体外活性的方法,使用已知为老鼠胰岛瘤细胞的 RIN-m5F(ATCC.) 细胞。这些细胞具有 GLP-1 受体,并且因此它们通常用于测定 GLP-1 家族的体外活性的方法中。用 GLP-1,exendin-4 处理 RIN-m5F,并且实验材料是不同的浓度。细胞中的信号分子 cAMP's 的出现通过实验材料被测定,并且从而评价 EC50,并相互比较。结果在表 1 中显示。

[0147] 表 1

[0148]	实验材料	血液半衰期(小时)	体外浓度(%)
	Exendin-4	0.7	100
	Exendin-4(N)-PEG-Fc	62	<0.2
	Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	61	13.2
	DM exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	69	2.6
	DA exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	54	13.2
	HY exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	52	7.6
	CA exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	52	8.5
	Ser12 DA exendin-4(Lys27)-PEG-Fc	N.D.	2.6
	DA exendin-4(Lys27)-白蛋白		<u>2.0</u>
	DA GLP-1(Lys20,28)-PEG-Fc	27	2.0

[0149] -DM exendin-4: 二甲基-组氨酰基 exendin-4

[0150] -DA exendin-4: 去-氨基-组氨酰基 exendin-4

[0151] -HY exendin-4: β -羟基-咪唑-丙酰基 exendin-4

[0152] -CA exendin-4: 咪唑-乙酰基 exendin-4

[0153] -Ser12DA exendin-4: DA exendin-4 其中 exendin-4 的第 12 位赖氨酸残基用丝氨酸取代

[0154] -DA GLP-1: 去-氨基-组氨酰基 -GLP-1

[0155] -Exendin-4(N)-PEG-Fc: exendin-4 的 N 末端和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0156] -Exendin-4(Lys27)-PEG-Fc: exendin-4 第 27 位的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0157] -DM exendin-4(Lys27)-PEG-Fc: 二甲基-组氨酰基 exendin-4 第 27 位的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0158] -DA exendin-4(Lys27)-PEG-Fc: 去-氨基-组氨酰基 exendin-4 第 27 位的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0159] [223]-HY exendin-4(Lys)-PEG-Fc: β -羟基-咪唑-丙酰基 exendin-4 第 27 位

的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0160] -CA exendin-4(Lys)-PEG-Fc: 咪唑 - 乙酰基 exendin-4 第 27 位的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0161] -Ser12DA exendin-4(Lys27)-PEG-Fc: Ser12 去 - 氨基 - 组氨酰基 exendin-4 第 27 位的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物, 其中 exendin-4 的第 12 位残基被丝氨酸取代

[0162] -DA exendin-4(Lys27)-PEG-Albumin: 去 - 氨基 - 组氨酰基 exendin-4 第 27 位的赖氨酸残基和白蛋白被连接到 PEG 的缀合物

[0163] -DA GLP-1 (Lys20, 28)-PEG-Fc: 去 - 氨基 - 组氨酰基 GLP-1 的赖氨酸残基和 Fc 区被连接到 PEG 的缀合物

[0164] 实施例 15. 长效 exendin-4 的体内功效实验

[0165] 为了测定长效制剂 exendin-4 的体内功效, 使用测定糖尿病模型的 db/db 小鼠血液中葡萄糖浓度减少的效果的方法。100mcg/kg 长效 exendin-4 制剂两周给药一次, 并且 100mcg/kg 的天然 exendin-4 被每天给药给 6 至 7 周大的糖尿病小鼠, 不限制食物。在服用实验材料后, 每天收集血液, 并且测定血液葡萄糖含量的变化。特别地, 使用天然 exendin-4 时, 血液葡萄糖浓度在给药 1 小时后被测定(图 14)。当给药一次时, Exendin-4 衍生物的缀合物能维持血液葡萄糖浓度的减少达 10 天或更久, 而天然 exendin-4 的缀合物的减少葡萄糖的活性在 8 天后消失。

[0166] 工业适用性

[0167] 本发明的促胰岛素肽的缀合物在体内维持相对高的活性, 并且显著增加血液半衰期, 并且因此它可以如愿地用于各种肽类药物的长效配方的开发中。

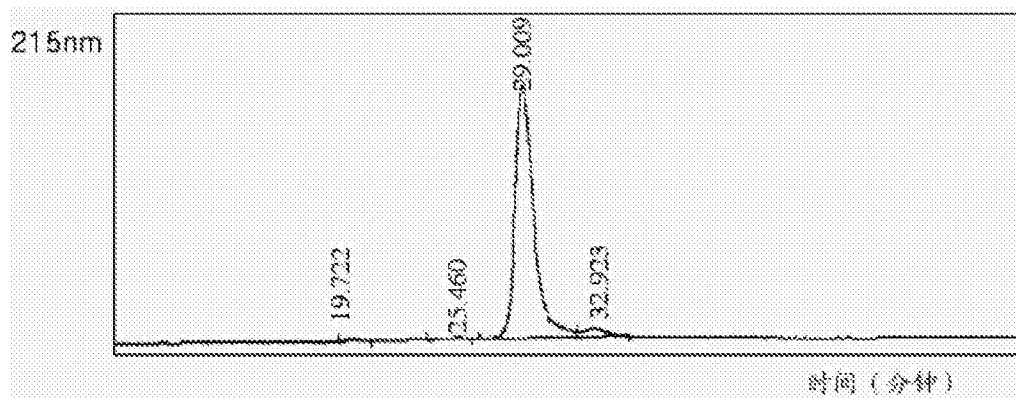


图 1

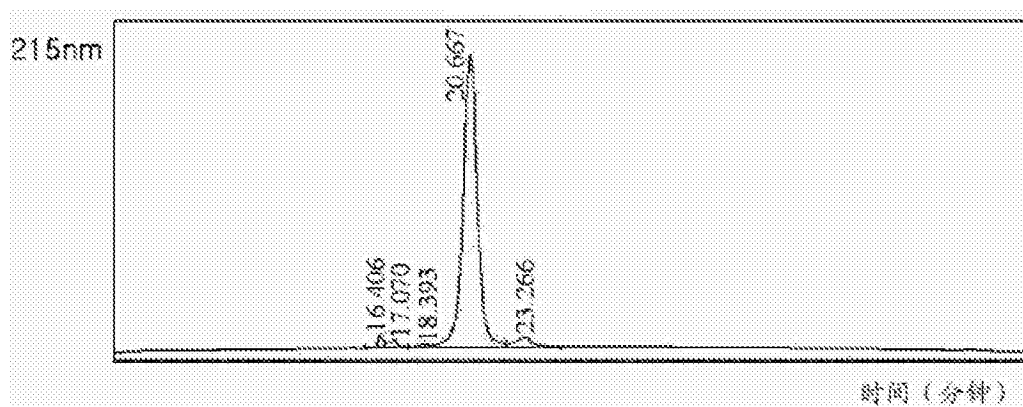


图 2

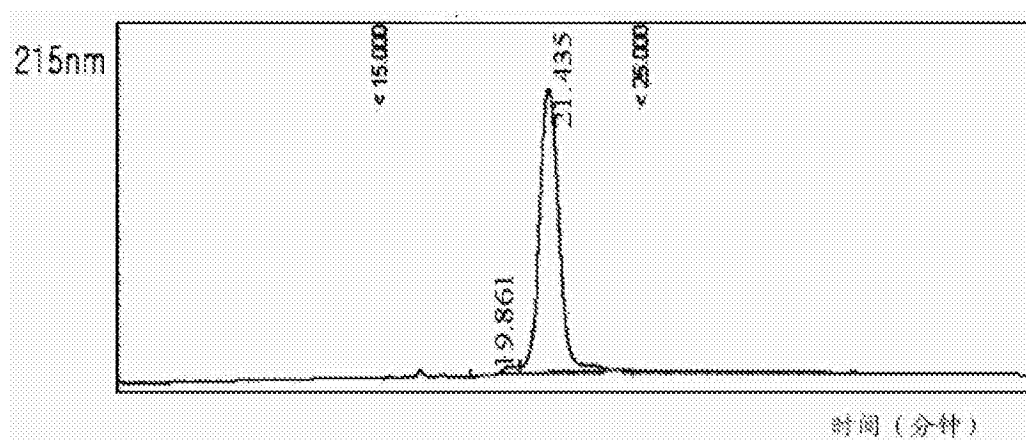


图 3

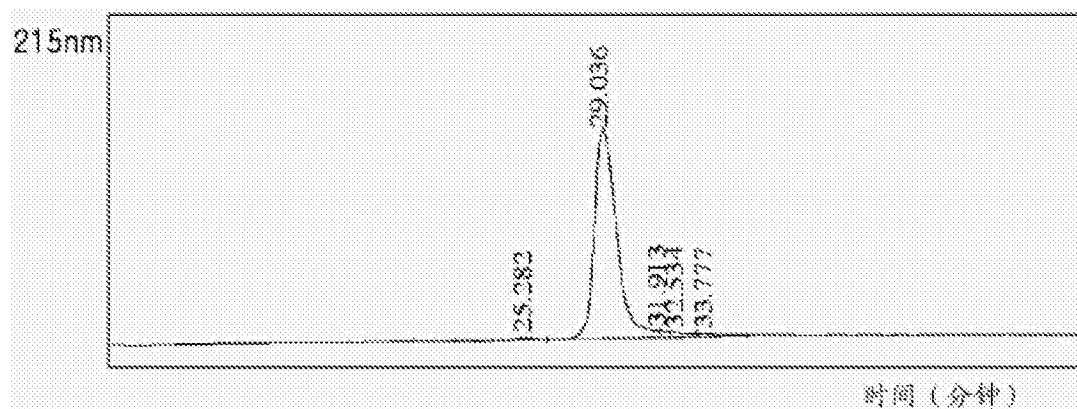


图 4

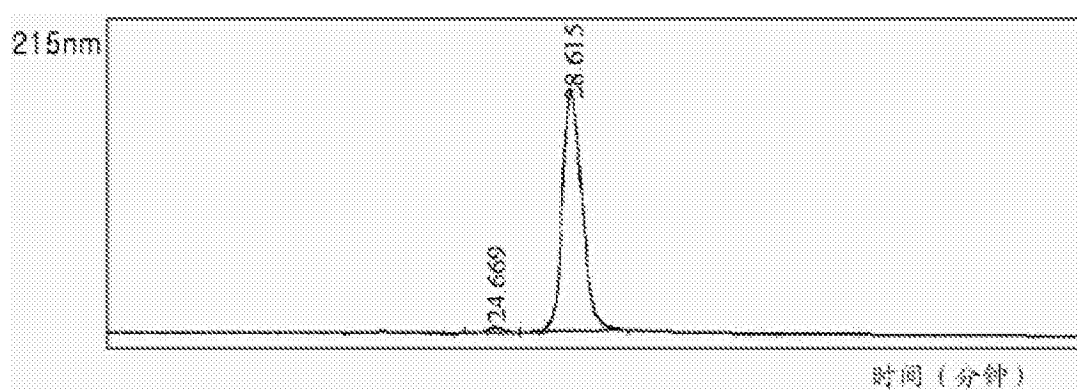


图 5

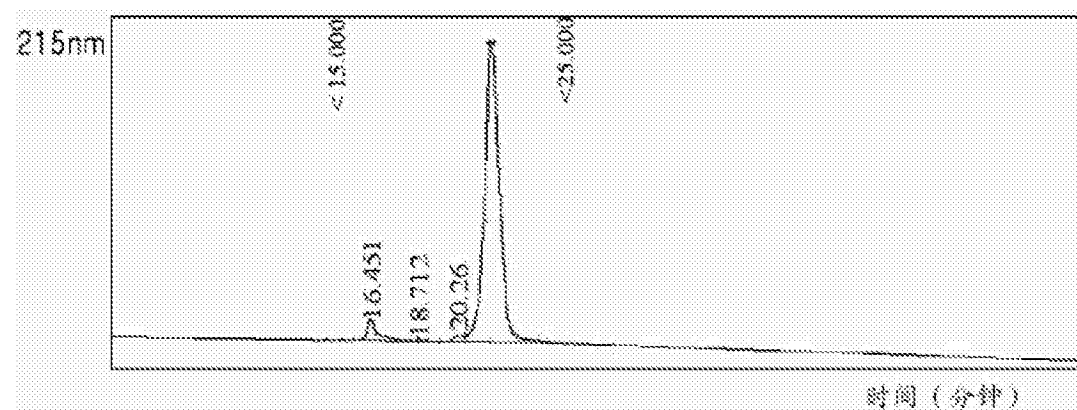


图 6

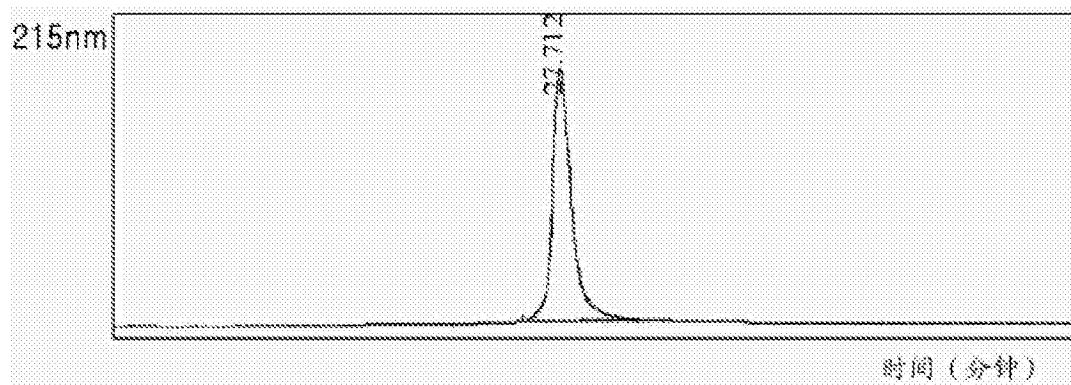


图 7

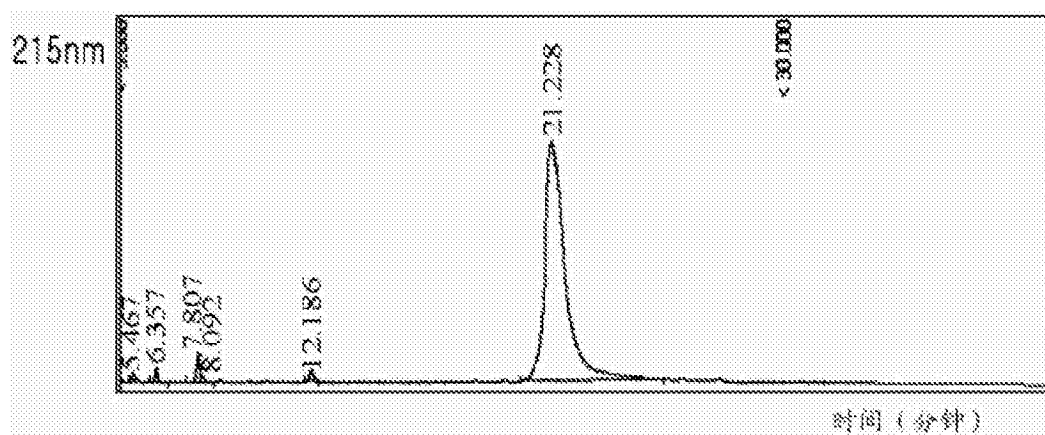


图 8

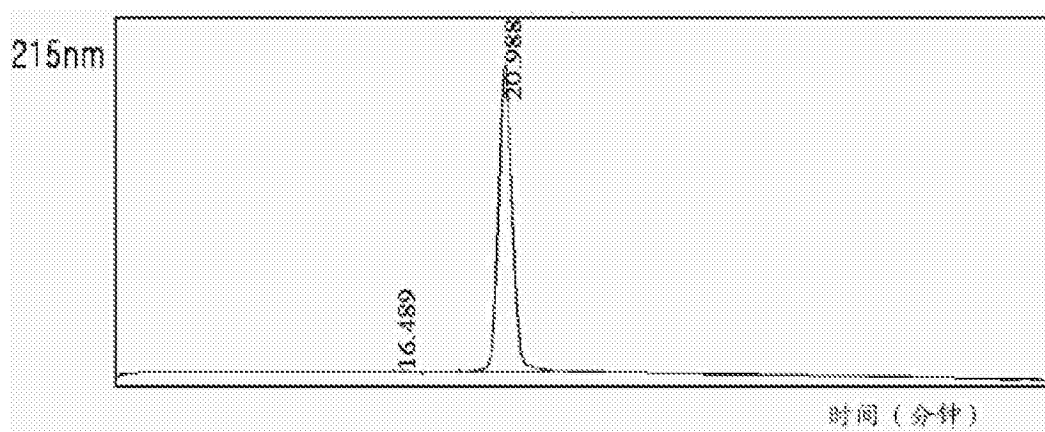


图 9

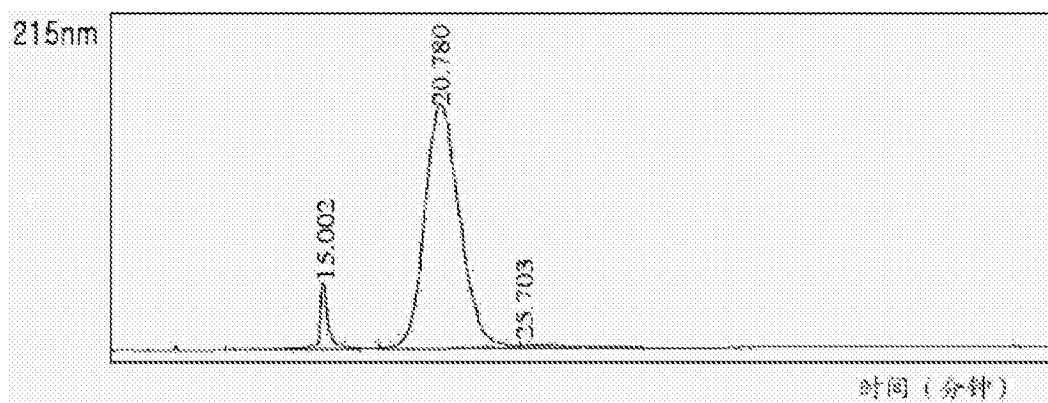


图 10

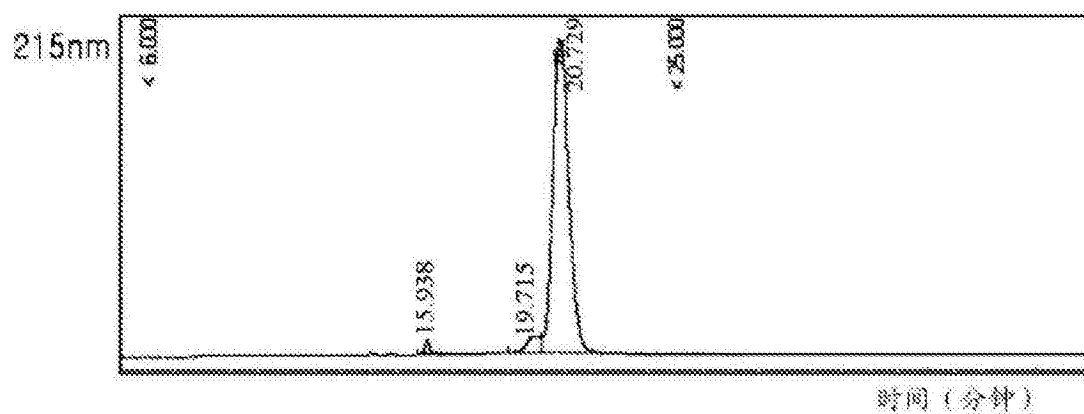


图 11

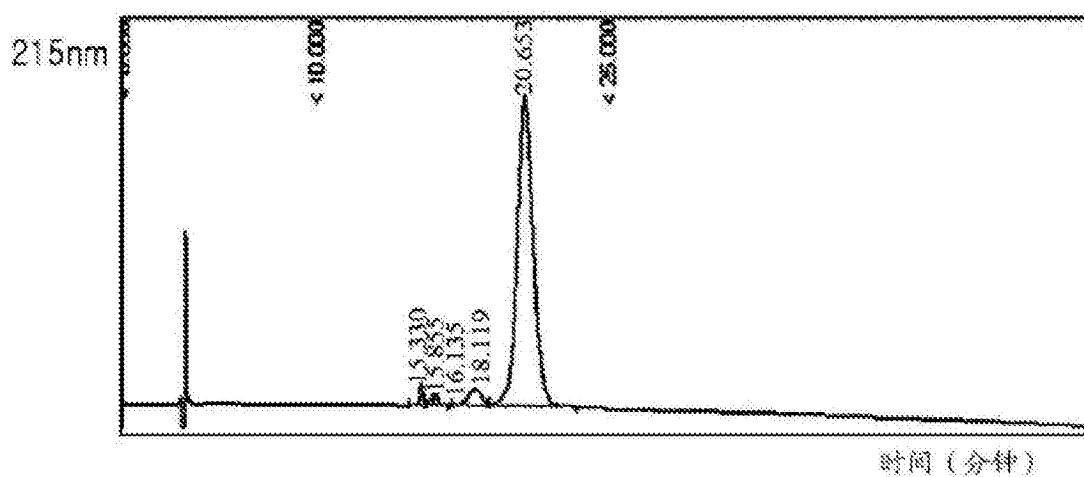
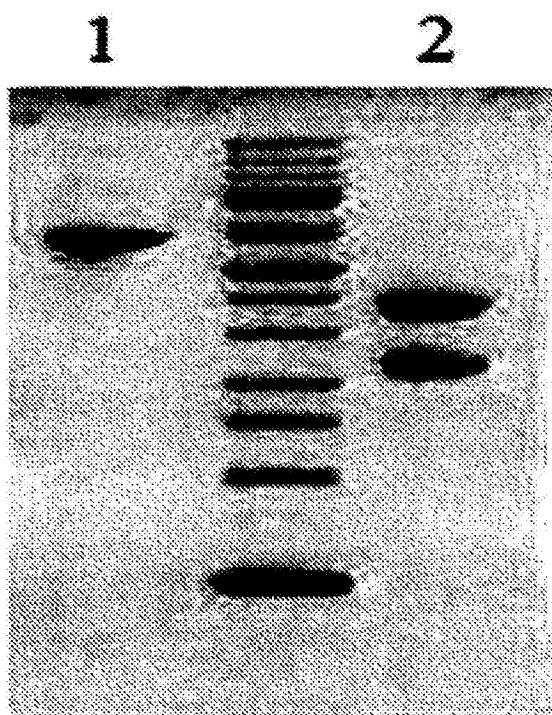


图 12



1: 非还原条件
2: 还原条件

图 13

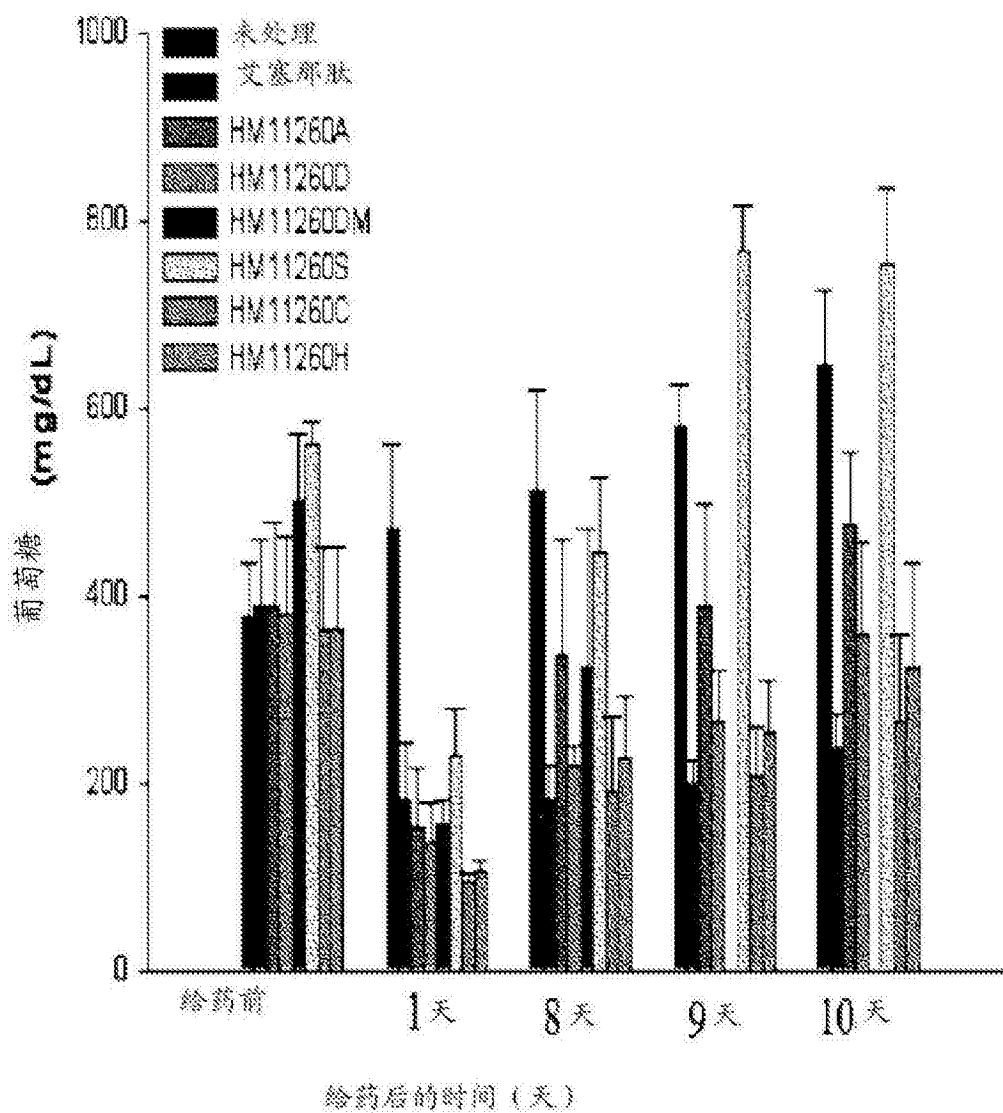


图 14