



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102076353 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 25

(21) 申请号 200980125627. 7

C07K 14/475 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 25

(30) 优先权数据

08158995. 4 2008. 06. 25 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/057972 2009. 06. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02009/156473 EN 2009. 12. 30

(71) 申请人 诺沃 - 诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 L · 舍费尔 T · 克鲁泽

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 梁谋 刘健

(51) Int. Cl.

A61K 38/22 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 37 页 序列表 5 页

附图 0 页

(54) 发明名称

胰岛淀粉样多肽和鲑鱼降钙素的衍生杂合肽

(57) 摘要

本发明描述了杂合肽衍生物和包含它们的药物组合物,其中所述杂合肽包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C- 末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽序列的 N- 末端,并且其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

1. 一种杂合肽衍生物,其中所述杂合肽包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C-末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽序列的 N-末端,并且其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

2. 权利要求 1 的衍生物,所述衍生物是母体杂合肽 (SEQ ID No :5) 或类似杂合肽,其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

3. 权利要求 2 的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-12 个氨基酸取代或者其中所述类似杂合肽选自:

胰岛淀粉样多肽 (2-7)-[Arg11, Arg18]sCT(8-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :6)

胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[Arg11, Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :7)

胰岛淀粉样多肽 (2-8)-[Arg11, Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :8)

[His1] 胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[His11, His18, His24]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :9)。

4. 前述权利要求中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合部分与所述杂合肽的 N-端氨基酸和 / 或 C-端氨基酸和 / 或与所述杂合肽内部的一个或多个氨基酸连接。

5. 前述权利要求中任一项的衍生物,其中所述衍生物包含连接在所述杂合肽 N-端的由 1-12 个额外氨基酸组成的 N-端延伸,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

6. 前述权利要求中任一项的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,已添加 0-8 个额外电荷。

7. 前述权利要求中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是亲脂残基。

8. 前述权利要求中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有 ω -羧酸基团的基团和部分或完全氢化环戊并菲骨架。

9. 前述权利要求中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基任选通过接头连接是通过赖氨酸残基的 ϵ -氨基而连接。

10. 包含权利要求 1-9 中任一项的衍生物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

11. 用作药物的权利要求 1-9 中任一项的衍生物。

12. 用作药物的权利要求 1-9 中任一项的衍生物,所述药物用于治疗或预防高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡。

13. 用作药物的权利要求 1-9 中任一项的衍生物,所述药物用于减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性。

14. 用于治疗或预防以下疾病的方法,所述方法包括给予受治疗者活性量的权利要求 1-9 中任一项的衍生物:高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡。

15. 用于减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性的方法,所述方法包括给予受治疗者活性量的权利要求 1-9 中任一项的衍生物。

胰岛淀粉样多肽和鲑鱼降钙素的衍生杂合肽

发明领域

[0001] 本发明涉及杂合肽衍生物,其中所述杂合肽包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C- 末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽 (amylin) 肽序列的 N- 末端,并且其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

[0002] 发明背景

[0003] 大量人群罹患糖尿病和肥胖症并且数量还在不断增加。糖尿病是一种利用葡萄糖的能力部分或完全丧失的代谢疾病。用于降低血糖的最有效抗糖尿病药就是胰岛素及其类似物。长期以来,已经知道,当传统胰岛素用于治疗糖尿病时,它与体重增加有关。人胰岛淀粉样多肽是一种长度为 37 个氨基酸的肽,其理化性质使其用作药物时很棘手。具体地讲,它具有在体外和 / 或离体形成原纤维的趋势并因沉淀而变得无效。一种称为 Symlin 的药品目前已上市,它含有人胰岛淀粉样多肽的类似物 (普兰林肽 (pramlintide)), 其中 37 个氨基酸中有 3 个被脯氨酸取代。这基本上改善了形成原纤维的趋势。已知普兰林肽能减少人的食物摄取。然而,即使是普兰林肽也难以在中性 pH 溶液中保存,因而在一种酸性溶液中提供,即 Symlin™。

[0004] 在哺乳动物中,降钙素在骨髓更新和钙代谢的调节中起作用。由升高的血清钙水平导致从甲状腺中释放的降钙素对骨和其它器官起作用,从而使血清钙水平趋向减低。

[0005] 降钙素已经用于在临床上治疗钙代谢障碍和疼痛,并且它在哺乳动物中增加葡萄糖水平的关系已经成为不同报告的主题。降钙素在治疗糖尿病中的用途描述于美国专利号 5,321,008 (1994 年 6 月 14 日授权) 和美国专利号 5,508,260 (1996 年 4 月 16 日授权)。

[0006] 国际专利申请 WO 2006083254 公开了胰岛淀粉样多肽家族肽,其包含胰岛淀粉样多肽和其类似物的环状区;降钙素或其类似物的 α 螺旋区的至少部分 α 螺旋区和降钙素或其类似物的 α 螺旋区。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及杂合肽衍生物,其中所述杂合肽包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C- 末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽序列的 N- 末端,并且其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

[0009] 一方面,本发明的衍生物是类似杂合肽衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-12 个氨基酸取代。

[0010] 另一方面,本发明衍生物的白蛋白结合部分与所述杂合肽的 N- 端氨基酸和 / 或 C- 端氨基酸和 / 或与所述杂合肽内部的一个或多个氨基酸连接。

[0011] 本发明的衍生物可包含连接在所述杂合肽 N- 端的由 1-12 个额外氨基酸组成的 N- 端延伸,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N- 端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0012] 本发明还包括这样的衍生物:其中与所述母体杂合肽相比,已添加 0-8 个额外电荷。

[0013] 也描述了包含本发明衍生物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物和用作药物

的本发明衍生物。

[0014] 定义

[0015] 术语“效力”用于描述指定化合物在测定中的效应,在所述测定中已经建立了对数浓度和化合物效应之间的 S 形曲线关系。此外,反应应当可在 0-100% 之间变化。EC50 (有效浓度 50) 可用于描述指定化合物在测定中达到 50% 反应的浓度。效力可在测定部分所述的例如萤光素酶测定中进行检测。

[0016] 术语“活性”一方面是指减少食欲和 / 或增加饱腹感的能力。可以按照例如描述于测定标题下的药理学测定 I, 通过测定减少食欲的能力而测定活性。

[0017] 本文所用的术语“人胰岛淀粉样多肽”是指与来自人胰脏 β - 细胞的胰岛素共分泌的人胰岛淀粉样多肽,其具有以下 SEQ ID No :1 所示序列:

[0018] Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂

[0019] SEQ ID No :1

[0020] 其中二硫桥位于位置 2 和位置 7 的半胱氨酸之间并且其 C- 末端呈酰胺基形式。

[0021] “普兰林肽”在本文中是指人胰岛淀粉样多肽的类似物,其中人胰岛淀粉样多肽在位置 25、28 和 29 已被 3 个脯氨酸残基取代,得到 25Pro, 28Pro, 29Pro 人胰岛淀粉样多肽。因此,普兰林肽具有以下序列:

[0022] Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂

[0023] SEQ ID No :2

[0024] “降钙素”或“CT”是指人的肽激素及其物种变体,包括人降钙素 (h-CT) 或鲑鱼降钙素 (sCT)。

[0025] 降钙素是由哺乳动物甲状腺的滤泡旁细胞以及鸟类和鱼类的腮后腺产生的一种小肽。已经分离出多种类型的降钙素,例如人降钙素、鲑鱼降钙素、鳗鱼降钙素、elkatonin、猪降钙素和鸡降钙素。在不同降钙素种类中有明显的结构非同源性。例如,在构成人降钙素和鲑鱼降钙素的氨基酸之间仅有 50% 同一性。

[0026] 鲑鱼降钙素 (s-CT) 具有以下序列:

[0027] Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂

[0028] SEQ ID No :4

[0029] 人降钙素 (h-CT) 是含有 32 个氨基酸残基的肽激素,它主要由甲状腺的滤泡旁 (也称为 C) 细胞产生。鲑鱼降钙素是由 32 个氨基酸组成的多肽。它在多肽链氨基端的第一和第七氨基酸之间具有二硫桥 (该二硫桥是其生物活性必不可少的) 并且在羧基端氨基酸上具有脯氨酰胺基。人降钙素具有以下序列:

[0030] Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

[0031] SEQ ID No :3

[0032] 术语“母体杂合肽”在本文中应指包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C- 末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽序列的 N- 末端的杂合肽,其具有以下序列:

[0033] Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Arg-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Arg-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂

[0034] SEQ ID No :5

[0035] 本文所用的术语“类似杂合肽”或“杂合类似物”用于指这样的肽:其中母体杂合肽的一个或多个氨基酸残基已被独立修饰,即其中一个或多个氨基酸残基已被其它氨基酸残基取代和/或其中母体杂合肽的一个或多个氨基酸残基已缺失和/或其中一个或多个氨基酸残基已经添加到母体杂合肽上。一方面,取代或添加是任何天然氨基酸。

[0036] 一方面,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 17 个修饰(取代、缺失、添加)。在一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 15 个修饰(取代、缺失、添加)。在一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 13 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 11 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 10 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 9 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 8 个修饰(取代、缺失、添加)。在一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 7 个修饰(取代、缺失、添加)。在一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 6 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 5 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 4 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 3 个修饰(取代、缺失、添加)。在另一个实施方案中,相对于母体杂合肽,杂合类似物包含小于 2 个修饰(取代、缺失、添加)。

[0037] 修饰可以发生在杂合肽序列的任何位置。在本发明的一方面,氨基酸残基的修饰可发生在肽的 N- 端和/或杂合肽的 C- 端。在本发明的一方面,修饰包括在杂合肽的 N- 端添加一个或多个例如 1、2、3 或 4 个氨基酸。

[0038] 本发明也包括这样的杂合类似物:其中 N- 端序列是鲑鱼降钙素的 N- 端序列, C- 端序列是人胰岛淀粉样多肽的 C- 端序列,只要所述杂合类似物在以上解释的杂合类似物的定义之内。

[0039] 本文所用的术语“杂合肽”可理解为本文所定义的母体杂合肽或杂合类似物。当 2 个半胱氨酸存在于杂合肽 N- 端时,应当理解它们具有二硫桥。C- 端通常呈酰胺形式,除非另有说明。

[0040] 本文的杂合类似物是相对于作为其来源的人胰岛淀粉样多肽和鲑鱼降钙素(s-CT)的相应序列而命名的,使人胰岛淀粉样多肽(Seq ID No :1)的氨基酸序列和编号用于描述衍生自人胰岛淀粉样多肽的杂合类似物部分,而且鲑鱼降钙素(Seq ID No :4)的氨基酸序列和编号用于描述衍生自 s-CT 的杂合类似物部分。例如,以上所示的 SEQ ID No :5 由人胰岛淀粉样多肽的氨基酸 1-7、s-CT 的氨基酸 8-27(其中氨基酸编号 11 和 18 已各自从赖氨酸残基取代为精氨酸残基)、人胰岛淀粉样多肽的氨基酸 33-37 组成。所给定的名称因此就是胰岛淀粉样多肽(1-7)-[Arg11, Arg18]sCT(8-27)-胰岛淀粉样多肽(33-37)。

[0041] 本文所用的术语“衍生物”是指这样的肽：其中肽的一个或多个氨基酸残基已被修饰，例如通过烷基化、酰基化、酯形成、酰胺形成或通过马来酰亚胺偶联。

[0042] 本文所用的术语“杂合肽的衍生物”或“杂合肽衍生物”是指母体杂合肽或杂合类似物的衍生物。

[0043] 本文所用的术语“衍生”是指通过共价键的化学连接。例如赖氨酸残基或半胱氨酸残基通过化学键与白蛋白结合残基连接。作为实例，这样的化学键可通过赖氨酸 ϵ 氨基的衍生化，通过与白蛋白结合残基例如长脂肪酸的活性酯酰化而得到。本发明所用的衍生的其它实例包括但不限于烷基化、酯形成、酰胺形成或马来酰亚胺偶联而衍生。

[0044] 本文所用的术语“接头”是指将肽与白蛋白结合残基间隔开来的间隔基 (spacer) (间隔基和接头这两个术语在本说明书中可互换使用)。接头是通过在两者之间具有接头而将白蛋白结合部分与降钙素或其类似物间隔开来的化学部分。例如，接头可包含一个或两个氨基酸，其在一端与白蛋白结合部分结合，而在另一端与杂合肽衍生物位置 1 的氨基酸结合。接头的化学部分可促进 / 增强取代基的白蛋白结合效应，例如包含 γ Glu 的接头就可增强杂合肽衍生物的白蛋白结合效应。本文所用的术语“白蛋白结合部分”是指与人血清白蛋白非共价结合的残基。与治疗性多肽连接的白蛋白结合残基通常对人血清白蛋白的亲和力小于 1 微摩尔，优选小于 500nM，甚至更优选小于 200nM 或甚至小于 100nM。

[0045] 本文所用的术语“亲水接头”是指用包含至少 5 个非氢原子的化学部分将肽和白蛋白结合残基间隔开的间隔基，其中这些非氢原子有 30-50% 是 N 或 O。

[0046] 本文所用的术语“作用时间”是指可测定药理学效应 (例如食物摄取减少) 的时间跨度。

[0047] 术语“稳定制剂”是指物理稳定性、化学稳定性或理化稳定性有所增加的制剂。

[0048] 对于蛋白质制剂，本文所用的术语“物理稳定性”是指当蛋白质暴露给热 - 机械应力和 / 或与不稳定界面和表面 (例如疏水表面和界面) 相互作用时，蛋白质不形成生物失活和 / 或不溶性蛋白质聚集体的趋势。可通过目测、本文其它地方所述的 ThT 原纤维形成测定和 / 或浊度测定，评价含水蛋白质制剂的物理稳定性。在黑暗背景下，在强烈聚焦光线中对制剂进行目测。制剂浊度的特征在于浊度的目测评分等级，例如评分为 0-3 (无浊度制剂对应的目测评分为 0，而在日光下具有目测浊度的制剂对应的目测评分为 3)。当制剂在日光下具有目测浊度时，对于蛋白质聚集而言，就认为制剂是物理不稳定的。或者，可通过技术人员熟知的简单的浊度测定来评价制剂浊度。

[0049] 对于蛋白质制剂或药物制剂，术语“化学稳定性”是指在蛋白质结构中没有化学共价变化，因此，与天然蛋白质结构相比，不会导致潜在的生物学效力降低和或潜在的免疫原性增加的化学降解产物的形成。根据天然蛋白质的种类和特性的不同以及蛋白质所接触的环境的不同，可形成多种化学降解产物。在本领域技术人员众所周知的蛋白质制剂的贮存和使用期间，大多数情况下可能无法完全避免对化学降解的消除，经常可观察到化学降解产物数量不断增加。大部分蛋白质都倾向于脱酰胺作用，在该过程中谷氨酰胺酰基残基或天冬酰胺酰基残基的侧链酰胺基水解而形成游离羧酸。其它降解途径包括形成高分子量转化产物，其中两个或更多个蛋白质分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用而彼此共价结合，导致形成共价结合的二聚体、寡聚体和多聚体降解产物 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. & Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。可提及的

化学降解的另一种变体形式就是氧化（例如甲硫氨酸残基的氧化）。可通过在接触不同环境条件之后的不同时间点测定化学降解产物的含量，来评价蛋白质制剂的化学稳定性（降解产物通常因例如增加温度而加速形成）。通常按照分子大小和 / 或电荷，使用不同的色谱技术（例如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC）来分离每种降解产物从而测定其含量。

[0050] 术语“稳定制剂”是指与肽的水溶液相比，其物理稳定性、化学稳定性或理化稳定性有所增加的制剂。

[0051] 发明详述

[0052] 本发明涉及这样的杂合肽：所述杂合肽包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C- 末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽序列的 N- 末端。

[0053] 已经证明，包含胰岛淀粉样多肽 C- 末端和 N- 末端以及鲑鱼降钙素中间部分的杂合肽在各种胰岛淀粉样多肽模型中都具有良好的体外和体内效力。然而，仍然需要提供具有天然人胰岛淀粉样多肽活性的衍生物，以及具有比天然人胰岛淀粉样多肽更延长的 PK 特性、表现出更高的溶解度和 / 或稳定性的衍生物。

[0054] 一方面描述了包含白蛋白结合部分的杂合肽衍生物。

[0055] 尤其需要得到在非皮下（例如口服、含服、肺部或鼻腔）给予时稳定的肽或衍生物。一方面，相对于胰岛淀粉样多肽类似物例如普兰林肽而言，本发明的杂合肽衍生物因此具有改进的酶稳定性。本发明的杂合肽衍生物因此尤其可用于口服、含服、肺部或鼻腔给药途径。

[0056] 一方面，相对于胰岛淀粉样多肽类似物例如普兰林肽而言，本发明的杂合肽衍生物对胰蛋白酶的酶促降解具有改进的稳定性。

[0057] 一方面提供具有高效力的杂合肽衍生物。又一方面，相对于人胰岛淀粉样多肽而言，提供具有改进的效力的杂合肽衍生物。再一方面提供效力与普兰林肽相当的杂合肽衍生物。再一方面，相对于普兰林肽而言，提供具有改进的效力的杂合肽衍生物。

[0058] 一方面提供物理稳定的杂合肽衍生物。另一方面，相对于普兰林肽，提供具有保持的物理稳定性的杂合肽衍生物。又一方面，相对于人胰岛淀粉样多肽，提供具有增加的物理稳定性的杂合肽衍生物。

[0059] 杂合类似物一方面优选具有 20-45 个天然存在的或非天然存在的氨基酸，优选 30-35 个天然存在的或非天然存在的氨基酸。

[0060] 在本发明的一方面，杂合肽衍生物的氨基酸序列选自：

[0061] 胰岛淀粉样多肽 (1-7)-[Arg11, Arg18]sCT(8-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :5)

[0062] 胰岛淀粉样多肽 (2-7)-[Arg11, Arg18]sCT(8-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :6)

[0063] 胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[Arg11, Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :7)

[0064] 胰岛淀粉样多肽 (2-8)-[Arg11, Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :8)

[0065] [His1] 胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[His11, His18, His24]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :9)

[0066] 其中至少一个氨基酸残基与白蛋白结合残基连接,任选通过接头连接,其中,当两个半胱氨酸存在于杂合肽的 N-端时,二硫桥桥接所述两个半胱氨酸,并且其中 C-端是呈酰胺形式,除非另有说明。

[0067] 当生理表达时,本发明的肽通常在 C-端酰胺化,但为了本发明的目的并不需要,因此可具有游离 OH 或 $-NH_2$ 基团或其它翻译后修饰。

[0068] 一方面,氨基酸残基的取代或添加包括谷氨酸残基、赖氨酸残基、精氨酸残基、组氨酸残基和 / 或天冬氨酸残基的取代和 / 或添加,以得到与母体杂合肽相比具有 0-8 个额外电荷的杂合类似物。又一方面,氨基酸残基的取代或添加包括组胺残基和 / 或精氨酸残基的取代和 / 或添加,以得到与母体杂合肽相比具有 0-8 个额外电荷的杂合类似物。再一方面,氨基酸残基的取代或添加包括组氨酸残基的取代和 / 或添加,以得到与母体杂合肽相比具有 0-8 个额外电荷的杂合类似物。

[0069] 杂合肽中的任何氨基酸位置都可以被衍生。在本发明的一方面,衍生的氨基酸残基包含氨基。包含氨基的氨基酸残基的实例是赖氨酸、鸟氨酸、 ϵ -N-烷基化赖氨酸例如 ϵ -N-甲基赖氨酸、O-氨基乙基丝氨酸、O-氨基丙基丝氨酸或更长的 O-烷基化丝氨酸,其在侧链中含有伯氨基或仲氨基。在本发明的又一方面,衍生的氨基酸残基包含在侧链中的伯氨基。包含伯氨基的氨基酸残基实例是赖氨酸、鸟氨酸、O-氨基乙基丝氨酸、O-氨基丙基丝氨酸或更长的 O-烷基化丝氨酸,其在侧链中含有伯氨基。在本发明的还一方面,衍生的氨基酸残基是赖氨酸。在本发明的还一方面,本发明的衍生物仅在一个位置被衍生,例如仅一个氨基酸残基被衍生。

[0070] 在本发明的一方面,接头包含一个或多个烷撑二醇单元,例如 1-5 个烷撑二醇单元。烷撑二醇单元在又一方面是乙二醇、丙二醇或丁二醇,但也可以是更高级的烷撑二醇。

[0071] 在本发明的另一方面,接头是选自以下的亲水接头:

[0072] $-(CH_2)_1D[(CH_2)_nE]_m(CH_2)_pQ_q-$, 其中

[0073] 1、m 和 n 独立地为 1-20, p 为 0-10,

[0074] Q 为 $-Z-(CH_2)_1D[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$,

[0075] q 为 0-5 的整数,

[0076] 每个 D、每个 E 和每个 G 独立选自 $-O-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-N(COR^4)-$ 、 $-PR^5(O)-$ 和 $-P(OR^6)(O)-$, 其中 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 独立代表氢或 C_{1-6} -烷基,

[0077] Z 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2CH_2-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-(CH_2)_s-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 或 $-NHC(O)-$, 其中 s 为 0 或 1。

[0078] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 1 为 1 或 2, n 和 m 独立地为 1-10, p 为 0-10。

[0079] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 D 为 $-O-$ 。

[0080] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 E 为 $-O-$ 。

[0081] 在本发明的还一方面,亲水接头是

[0082] $-CH_2O[(CH_2)_2O]_m(CH_2)_pQ_q-$, 其中 m 为 1-10, p 为 1-3, Q 为 $-Z-CH_2O[(CH_2)_2O]_m(CH_2)_p-$, 其中 Z 如上定义。

[0083] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 q 为 1。

[0084] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 G 为 $-O-$ 。

[0085] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 Z 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 和 $-OC(O)NH-$ 。

[0086] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 q 为 0。

[0087] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 l 为 2。

[0088] 在本发明的另一方面,接头是如上定义的亲水接头,其中 n 为 2。

[0089] 在本发明的一方面,使用了以化学部分使肽与白蛋白结合残基间隔开的“亲水接头”。

[0090] 在本发明的一方面,亲水接头是

[0091] $-C(O)-(CH_2)_1-O-[(CH_2CH_2-O)_m-(CH_2)_p-NHC(O)-(CH_2)_1-O-[(CH_2)_n-O]_m-(CH_2)_p]_q-NH-$,

[0092] 其中 l、m、n 和 p 独立地为 1-5, q 为 0-5。

[0093] 在本发明的还一方面,亲水接头是

[0094] $-C(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2[NHC(O)-CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2]_q-NH-$,

[0095] 其中 q 为 0-5。

[0096] 在本发明的还一方面,亲水接头是

[0097] $-C(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NHC(O)-CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2-NH-$ 。

[0098] 在本发明的还一方面,亲水接头是 $-[CH_2CH_2O]_{m+1}(CH_2)_pQ_q-$,

[0099] 其中 m 和 p 独立地为 0-10, 和

[0100] Q 为如上定义的 $-Z-(CH_2)_1D[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$ 。

[0101] 在本发明的还一方面,亲水接头是

[0102] $-(CH_2)_1-O-[(CH_2)_n-O]_m-(CH_2)_p-[C(O)NH-(CH_2)_1-O-[(CH_2)_n-O]_m-(CH_2)_p]_q-$,

[0103] 其中 l、m、n 和 p 独立地为 1-5, q 为 0-5。

[0104] 在本发明的又一方面,接头包含除 Cys 之外的氨基酸残基,或二肽例如 Gly-Lys。本文所用的术语“二肽例如 Gly-Lys”是指这样的二肽:其中 C-端氨基酸残基是 Lys、His 或 Trp,优选 Lys,并且 N-端氨基酸残基选自下列基团:Ala、Arg、Asp、Asn、Glv、Glu、Gln、Ile、Leu、Val、Phe 和 Pro。

[0105] 一方面,本发明的杂合肽用任何白蛋白结合物来酰化。

[0106] 又一方面,在杂合肽衍生物中仅一个赖氨酸残基与白蛋白结合残基连接,任选通过接头连接。

[0107] 一方面,本发明的杂合肽包含介于杂合肽与一个或多个白蛋白结合残基之间的亲水间隔基。

[0108] 一方面,亲水间隔基是在两端具有合适官能团的无支链的低聚乙二醇部分,所述官能团可形成杂合肽的氨基与白蛋白结合残基的官能团之间的桥。

[0109] 已知一系列白蛋白结合残基是含有 4-40 个碳原子并具有远端酸性基团的直链和支链的亲脂部分。

[0110] 在本发明的一方面,白蛋白结合残基是亲脂残基。又一方面,亲脂残基通过缀合化学 (conjugation chemistry) (例如通过烷基化、酰基化、酯形成或酰胺形成),任选通过接头与赖氨酸残基连接,或通过马来酰亚胺偶联与半胱氨酸残基连接。

[0111] 在本发明的又一方面,白蛋白结合残基在生理 pH 时带负电荷。在本发明的另一方

面,白蛋白结合残基包含可带负电荷的基团。一个优选的可带负电荷的基团是羧酸基团。

[0112] 在本发明的还一方面,白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有 ω -羧酸基团的基团和部分或完全氢化环戊并菲(cyclopentanophenanthrene)骨架。

[0113] 在本发明的又一方面,白蛋白结合残基是汽巴克隆基(cibacronyl)残基。

[0114] 在本发明的又一方面,白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子、8-26 个碳原子或 8-20 个碳原子。

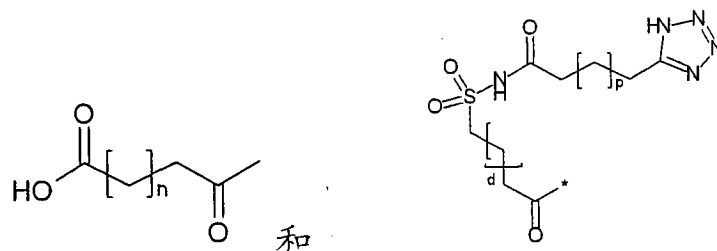
[0115] 在本发明的又一方面,白蛋白结合残基是选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-$ 的酰基,其中 r 为 4-38 的整数,优选为 4-24 的整数,更优选选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

[0116] 在本发明的另一方面,白蛋白结合残基是直链或支链烷烃 α , ω -二羧酸的酰基。

[0117] 在本发明的一方面,至少一个氨基酸残基是用 A-B-C-D- 衍生的,

[0118] 其中 A- 选自

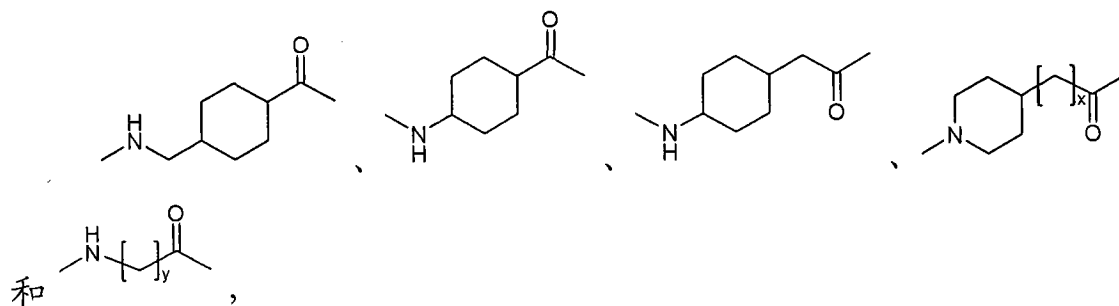
[0119]



[0120] 其中 n 选自 14、15、16、17、18 和 19, p 选自 10、11、12、13 和 14, d 选自 0、1、2、3、4 和 5,

[0121] -B- 选自

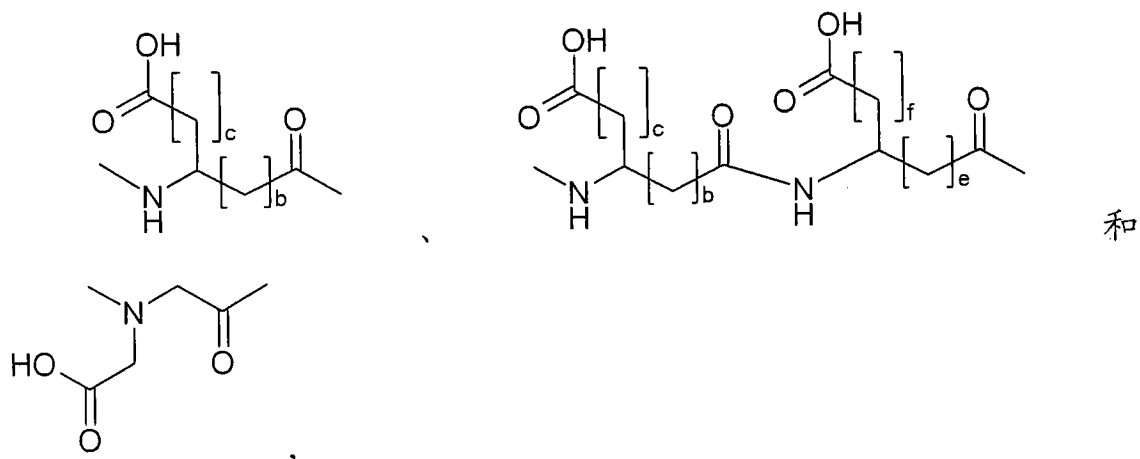
[0122]



[0123] 其中 x 选自 0、1、2、3 和 4, y 选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12,

[0124] -C- 选自

[0125]



[0126] 其中 b 和 e 各自独立选自 0、1 和 2, c 和 f 各自独立选自 0、1 和 2, 前提条件是当 c 为 0 时, b 为 1 或 2, 或当 c 为 1 或 2 时, b 为 0, 和当 f 为 0 时, e 为 1 或 2, 或当 f 为 1 或 2 时, e 为 0, 和

[0127] -D- 与所述氨基酸残基连接并且作为接头。

[0128] 一方面, 一个氨基酸残基用 A-B-C-D- 来衍生。

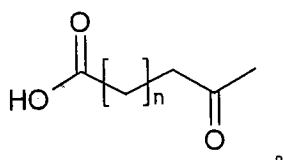
[0129] 在本发明的一方面, 衍生的氨基酸残基包含氨基。

[0130] 在本发明的一方面, 衍生的氨基酸残基在侧链中包含伯氨基。

[0131] 在本发明的一方面, 衍生的氨基酸残基是赖氨酸。

[0132] 在本发明的一方面, A- 是

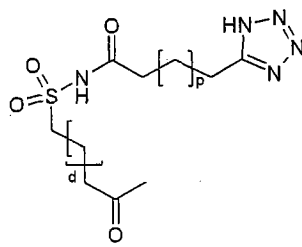
[0133]



[0134] 在本发明的一方面, n 选自 15 和 17, 更优选为 17。

[0135] 在本发明的一方面, A- 是

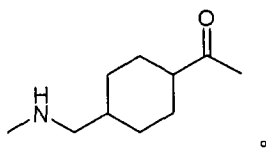
[0136]



[0137] 在本发明的一方面, p 选自 12、13 和 14, 更优选为 13。在本发明的又一方面, d 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 0、1 和 2, 最优选 1。在本发明的又一方面, d 选自 0、1 和 2, p 选自 12、13 或 14, 更优选 d 选自 1 和 2, p 选自 13 和 14, 最优选 d 为 1, p 为 13。

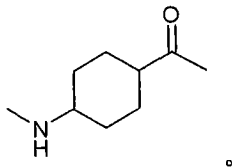
[0138] 在本发明的一方面, -B- 是

[0139]



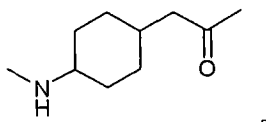
[0140] 在本发明的又一方面, -B- 是

[0141]



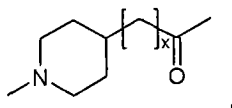
[0142] 在本发明的又一方面, -B- 是

[0143]



[0144] 在本发明的又一方面, -B- 是

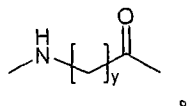
[0145]



[0146] 在本发明的又一方面, x 选自 0、1 和 2, 更优选 x 选自 0 和 1, 最优选 x 为 1。

[0147] 在本发明的又一方面, -B- 是

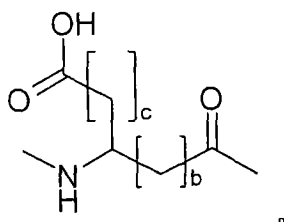
[0148]



[0149] 在本发明的又一方面, y 选自 2、3、4、5、6、7、8、9 和 10, 更优选选自 2、3、4、5、6、7 和 8。

[0150] 在本发明的又一方面, -C- 是

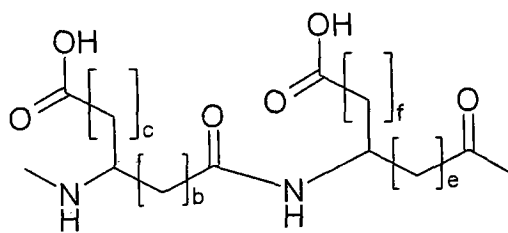
[0151]



[0152] 在本发明的又一方面, c 选自 0 和 1, b 选自 1 和 2, 更优选 b 为 1, c 为 0。

[0153] 在本发明的又一方面, -C- 是

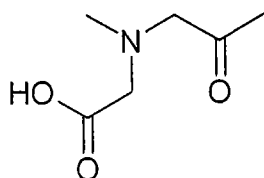
[0154]



[0155] 在本发明的又一方面,选自 0 和 1, e 选自 1 和 2,更优选 e 为 1, f 为 0。

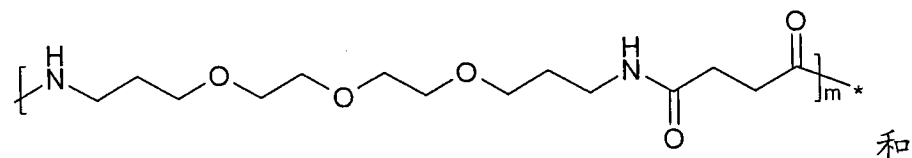
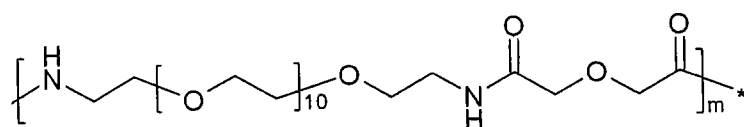
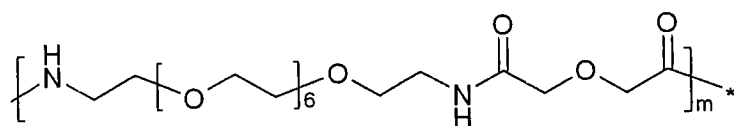
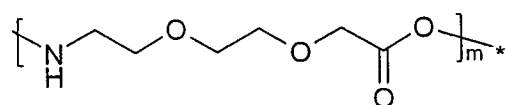
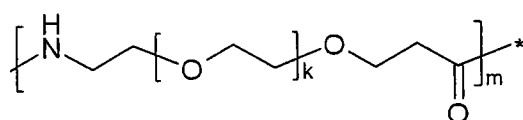
[0156] 在本发明的又一方面, -C- 是

[0157]

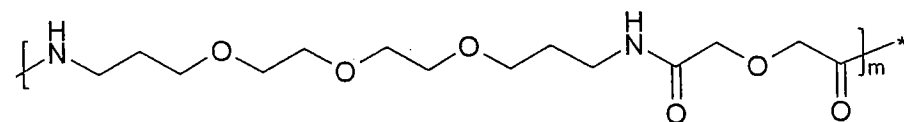


[0158] 在本发明的又一方面, D 选自

[0159]



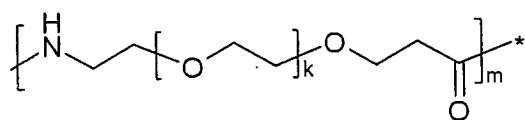
和



[0160] 其中 k 选自 0、1、2、3、4、5、11 和 27, m 选自 0、1、2、3、4、5 和 6。

[0161] 在本发明的又一方面, -D- 是

[0162]

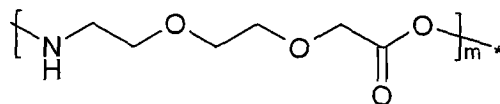


[0163] 在本发明的又一方面, k 选自 1、2、3、11 和 27, 更优选 k 为 1。

[0164] 在本发明的又一方面, m 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 m 选自 0、1 和 2。

[0165] 在本发明的又一方面, -D- 是

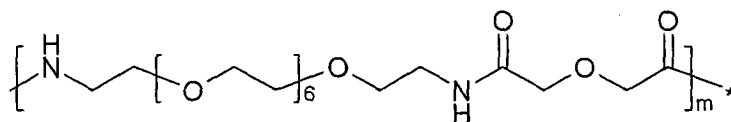
[0166]



[0167] 在本发明的又一方面, m 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 m 选自 0、1 和 2。

[0168] 在本发明的又一方面, -D- 是

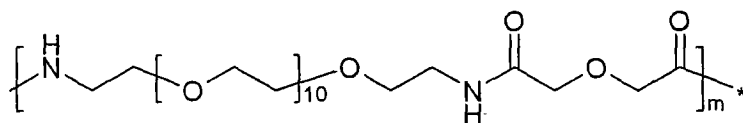
[0169]



[0170] 在本发明的又一方面, m 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 m 选自 0、1 和 2。

[0171] 在本发明的又一方面, -D- 是

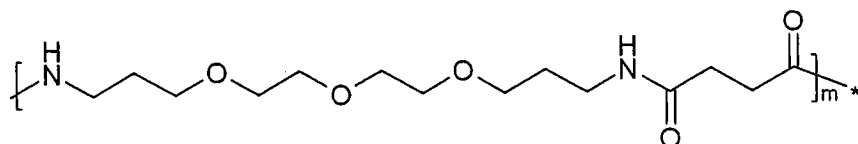
[0172]



[0173] 在本发明的又一方面, m 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 m 选自 0、1 和 2。

[0174] 在本发明的又一方面, -D- 是

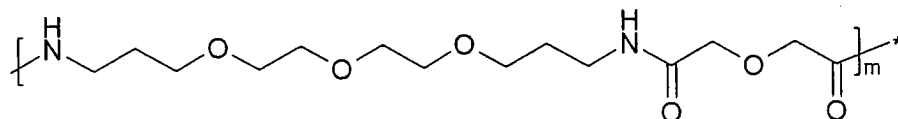
[0175]



[0176] 在本发明的又一方面, m 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 m 选自 0、1 和 2。

[0177] 在本发明的又一方面, -D- 是

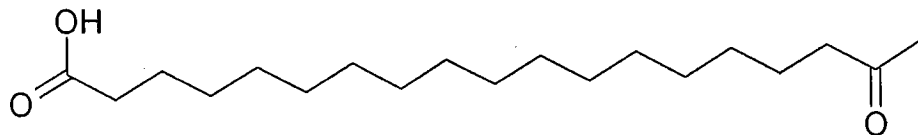
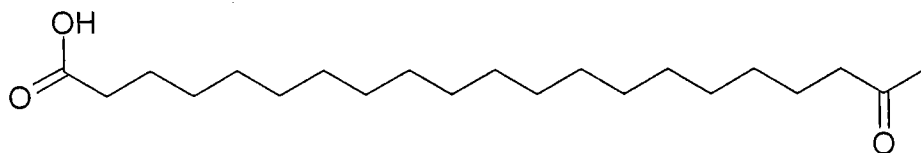
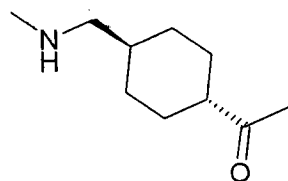
[0178]



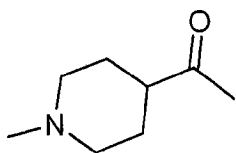
[0179] 在本发明的又一方面, m 选自 0、1、2、3 和 4, 更优选 m 选自 0、1 和 2。

[0180] 在本发明的又一方面, A-B-C-D- 选自以下基团并由它们组合而成:

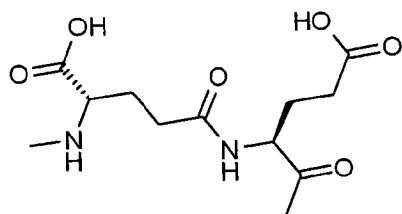
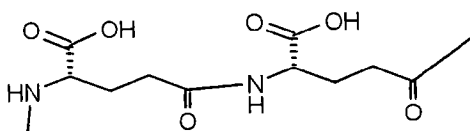
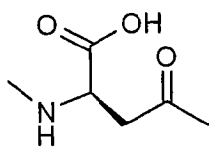
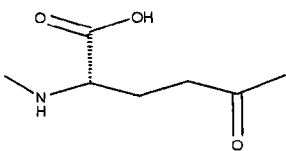
[0181]

A-**-B-**

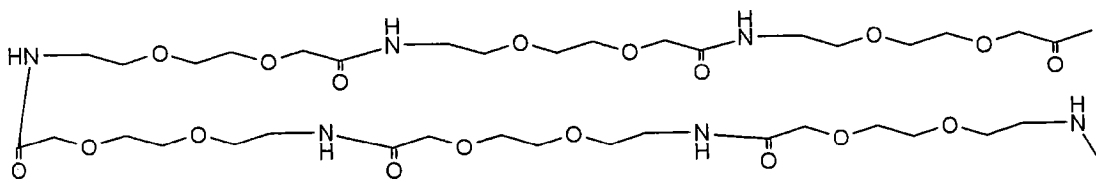
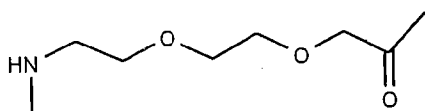
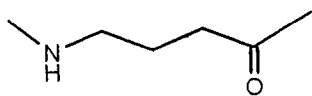
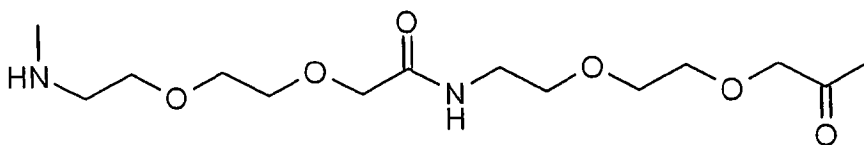
[0182]



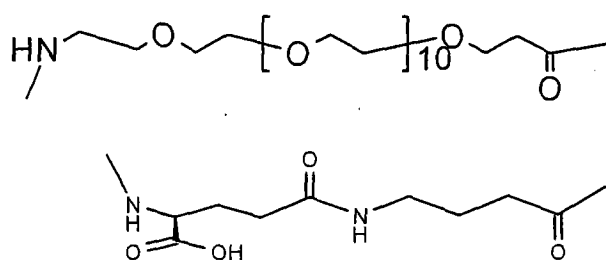
-C-



-D-



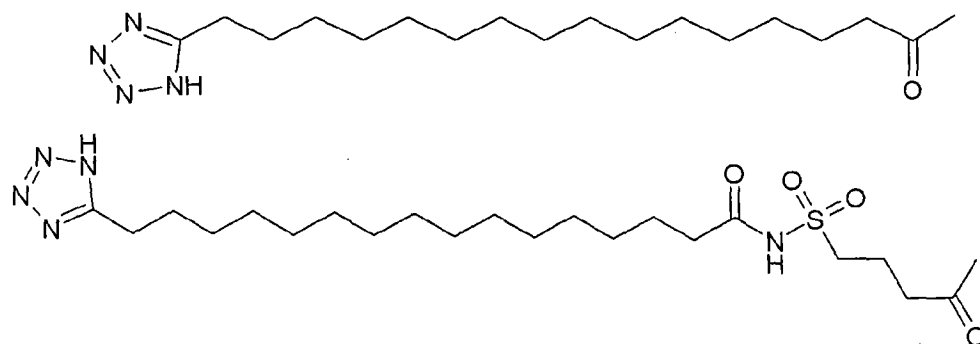
[0183]



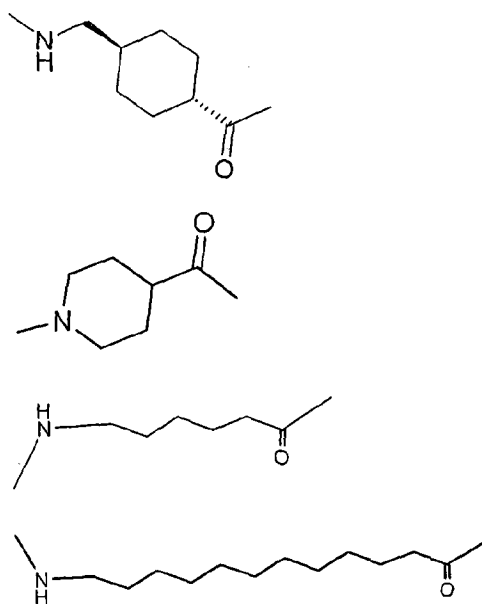
[0184] 在本发明的又一方面，A-B-C-D- 选自以下基团并由它们组合而成：

[0185]

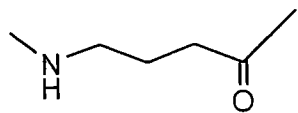
A-



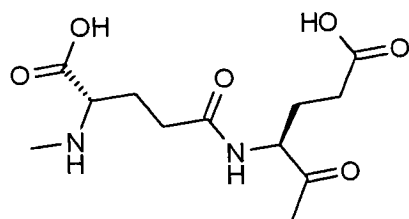
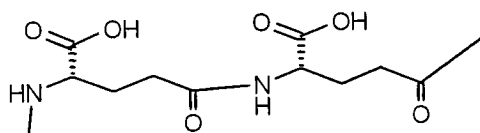
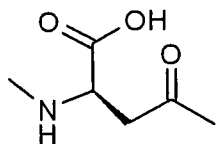
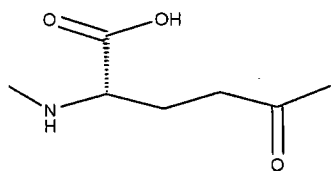
-B-



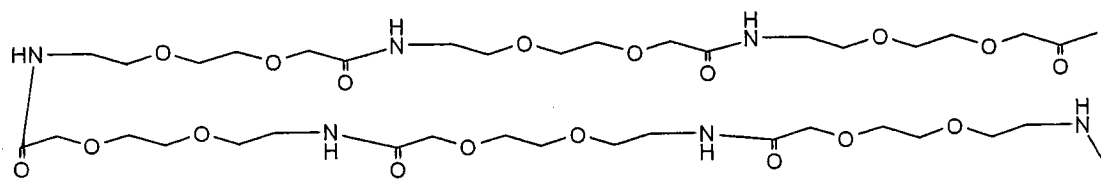
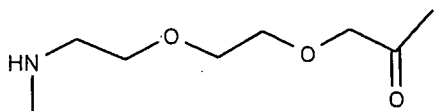
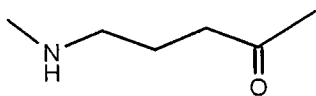
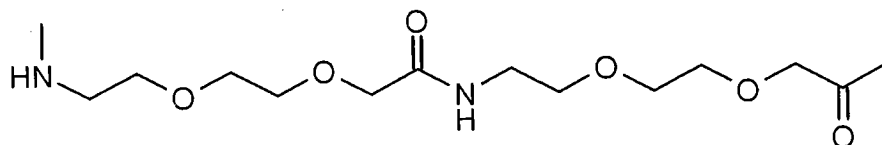
[0186]



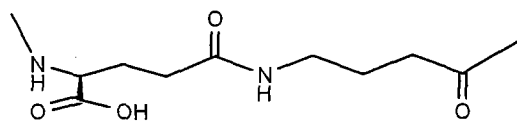
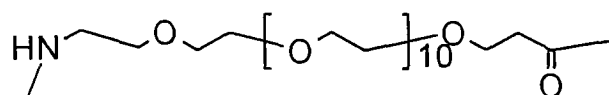
-C-



-D-

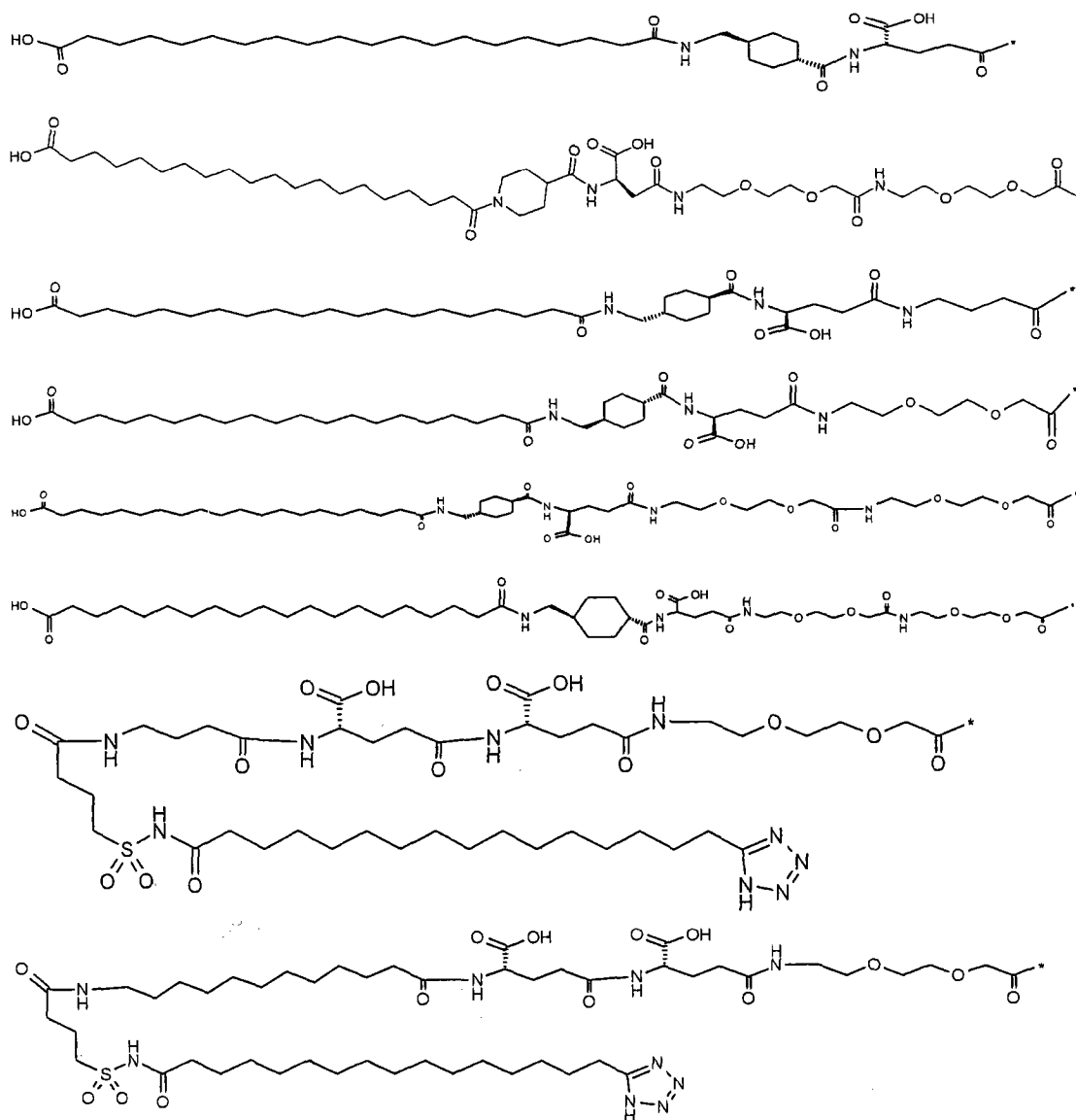


[0187]

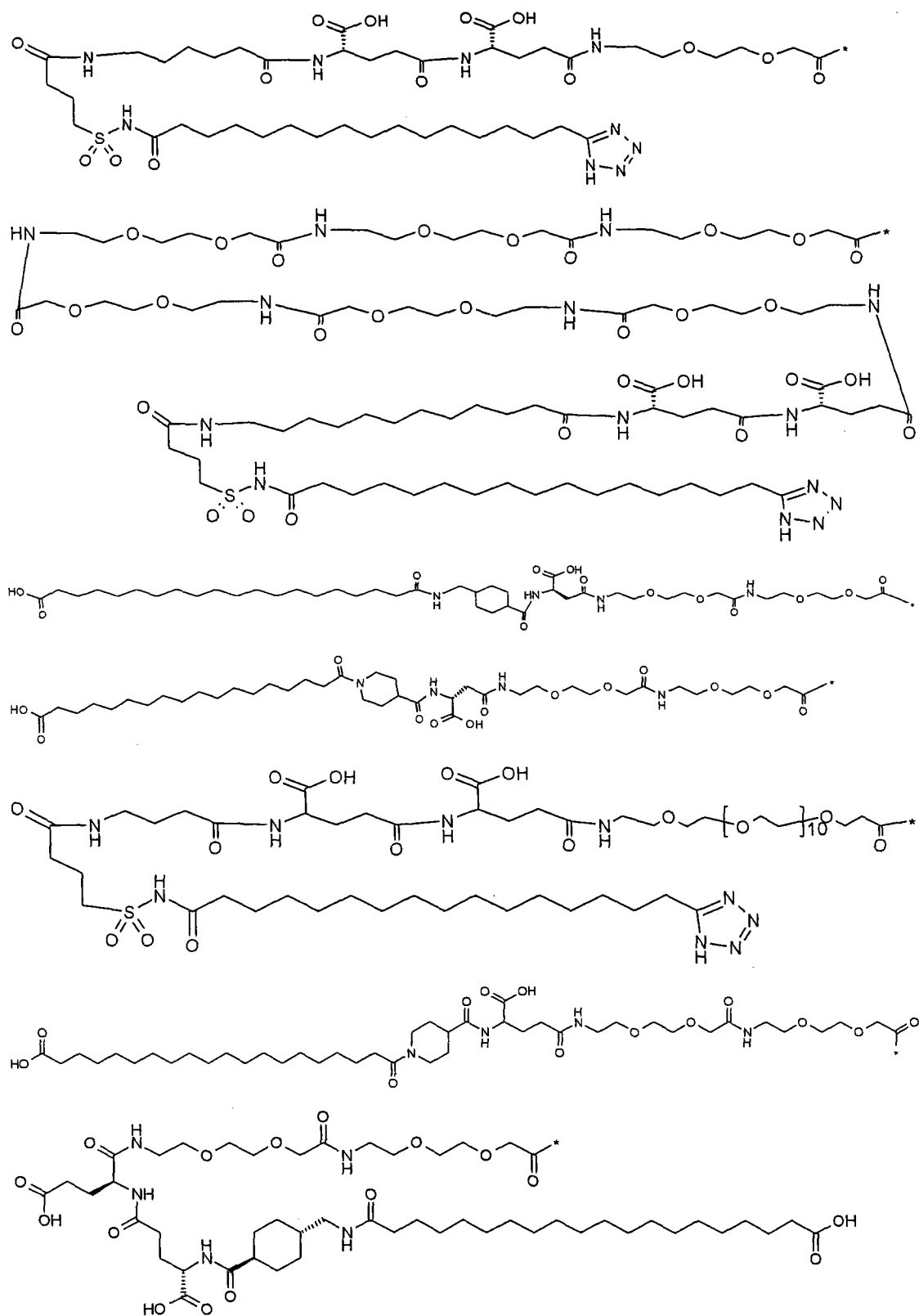


[0188] 在本发明的又一方面, A-B-C-D- 选自

[0189]



[0190]



[0191] 一方面,本发明的杂合肽在 Lys1 的 ϵ 氨基中被酰化和 / 或在已通过取代而引入杂合肽的一个或多个位置的赖氨酸的 ϵ 氨基中被酰化和 / 或在全长或截短的杂合肽的 N-端 α 氨基中被酰化。另一方面,本发明的杂合肽在全长或截短的杂合肽 Lys1 ϵ 氨基中被酰化。另一方面,本发明的杂合肽在已通过取代而引入全长或截短的杂合肽的一个或多个位置的赖氨酸的 ϵ 氨基中被酰化。另一方面,本发明的杂合肽在全长或截短的杂合肽的

N-端 α 氨基中被酰化。

[0192] 又一方面,杂合肽用作为 C20 二酸- γ Glu 或 C18 二酸- γ Glu 的白蛋白结合物酰化。

[0193] 在本发明的一方面,经本领域技术人员已知的标准方法例如 ELISA 测定,与人胰岛淀粉样多肽或普兰林肽相比,杂合肽衍生物具有延长的药物动力学特性。药物动力学特性可用杂合肽衍生物的半衰期 $T_{1/2}$ 来测定。在本发明的一个实施方案中,相对于人胰岛淀粉样多肽而言, $T_{1/2}$ 有所增加。在又一个实施方案中,相对于普兰林肽而言, $T_{1/2}$ 有所增加。在还一个实施方案中,相对于普兰林肽而言, $T_{1/2}$ 增加至少 2 倍。在还一个实施方案中,相对于普兰林肽而言, $T_{1/2}$ 增加至少 3 倍。在还一个实施方案中,相对于普兰林肽而言, $T_{1/2}$ 增加至少 4 倍。在还一个实施方案中,相对于普兰林肽而言, $T_{1/2}$ 增加至少 5 倍。在还一个实施方案中,相对于普兰林肽而言, $T_{1/2}$ 增加至少 10 倍。

[0194] 一方面,本发明杂合衍生物的血浆半衰期至少是 25 小时。另一方面,本发明杂合衍生物的血浆半衰期至少是 50 小时。另一方面,本发明杂合衍生物的血浆半衰期至少是 75 小时。还一方面,本发明杂合衍生物的血浆半衰期至少是 100 小时。

[0195] 可按照本专利说明书的测定部分中所描述的药理学测定 (I),测定本发明的杂合肽衍生物减少累积食物摄取的能力。在本发明的一方面,与给予溶媒相比,当给予每千克体重 30nmol 杂合肽衍生物时,本发明的杂合肽衍生物可表现出累积食物摄取的能力减少超过溶媒的 5%,优选超过 15%,更优选超过 25%,甚至更优选超过 35%或 40%,最优选地超过 50%。

[0196] 在本发明的一方面,在给予之后的头 24 小时内,本发明的杂合肽衍生物可表现出累积食物摄取的能力减少超过给予溶媒的 15%,优选在给予之后的头 24 小时内减少超过 25%,更优选超过 35%,甚至更优选超过 45%或 55%,最优选超过 60%。

[0197] 在本发明的一方面,当在给予之后的 24-48 小时的周期内测定时,在给予之后的 24-48 小时内,本发明的杂合肽衍生物可表现出累积食物摄取的能力减少超过 5%,优选超过 15%,更优选超过 25%,甚至更优选超过 30%。

[0198] 在本发明的一方面,与人胰岛淀粉样多肽相比,所述杂合肽衍生物在体内和 / 或离体较少形成原纤维、胶体和 / 或聚集体。可通过例如本领域技术人员已知的并在本文的药物组合物部分进一步描述的硫黄素 T 试验 (Thioflavin T test),例如评价形成原纤维和 / 或胶体和 / 或聚集体的趋势。另外,可通过本领域技术人员也已知的目测和 / 或浊度测定,评价物理稳定性。

[0199] 肽例如杂合肽的产生是本领域众所周知的。因此,可通过传统肽合成方法产生本发明的肽,所述方法例如固相肽合成,使用 t-Boc 或 Fmoc 化学或其它熟知的技术,参见例如 Greene 和 Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999。肽也可通过以下方法产生:所述方法包括培养宿主细胞,所述宿主细胞含有编码多肽的 DNA 序列并能在合适的营养培养基中、在允许表达肽的条件下表达多肽。对于含有非天然氨基酸残基的肽,应当对重组细胞进行修饰,使非天然氨基酸掺入肽中,例如通过使用 tRNA 突变体。

[0200] 药物组合物

[0201] 可通过例如以下文献所述的常规技术制备含有本发明杂合肽衍生物的药物组

合物:Remington's Pharmaceutical Sciences,1985 或 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第 19 版,1995。

[0202] 本发明的另一个目的是提供包含浓度为 0.1mg/ml 至 500mg/ml 的本发明杂合类似物的药物制剂,并且其中所述制剂的 pH 为 2.0-10.0。所述制剂还可包含蛋白酶抑制剂、缓冲系统、防腐剂、张力剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。

[0203] 在本发明的一方面,药物制剂是含水制剂,即制剂含水。这样的制剂通常是溶液剂或混悬剂。在本发明的又一方面,药物制剂是含水溶液剂。术语“含水制剂”定义为包含至少 50% (重量/重量) 水的制剂。同样,术语“含水溶液剂”定义为包含至少 50% (重量/重量) 水的溶液剂,术语“含水混悬剂”定义为包含至少 50% (重量/重量) 水的混悬剂。

[0204] 本发明的一个目的是提供包含本发明杂合肽的药物制剂。一方面,肽在制剂中的浓度为约 0.1mg/ml 至约 25mg/ml。另一方面,肽在制剂中的浓度为约 1mg/ml 至约 10mg/ml。

[0205] 另一方面,制剂的 pH 为 4.0-10.0。

[0206] 另一方面,制剂的 pH 为 4.0-8.5。

[0207] 还一方面,制剂的 pH 为 4.0-8.0。

[0208] 还一方面,制剂的 pH 为 4.0。

[0209] 还一方面,制剂的 pH 为 7.0-8.0。

[0210] 制剂还可包含缓冲系统、防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和 / 或表面活性剂。这些赋形剂在药物组合物中的用途是技术人员众所周知的。为了方便起见,可参见 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第 19 版,1995。

[0211] 另一方面,药物制剂是冻干制剂,在临用前由医师或患者向其中加入溶剂和 / 或稀释剂。

[0212] 另一方面,药物制剂是干燥制剂 (例如冻干或喷雾干燥),无需任何预先溶解就可使用。

[0213] 在本发明的又一方面,缓冲剂选自乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、双甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三 (羟甲基)-氨基甲烷、二羟乙基甘氨酸、三羟甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些具体缓冲剂的每一种都构成本发明的替代方面。

[0214] 在本发明的又一方面,制剂还包含药学上可接受的防腐剂。在本发明的又一方面,制剂还包含等渗剂。在本发明的又一方面,制剂还包含螯合剂。

[0215] 在本发明的又一方面,制剂还包含稳定剂。稳定剂在药物组合物中的用途是技术人员众所周知的。为了方便起见,可参见 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第 19 版,1995。

[0216] 更具体地讲,本发明的组合物是稳定的液体药物组合物,其治疗活性成分包含在液体药物制剂贮存期间可形成聚集体的多肽。“聚集体形成”是指肽间的物理相互作用,导致寡聚物的形成,其可保持可溶性,或是从溶液中沉淀的可见的大聚集体。“贮存期间”是指液体药物组合物或制剂一旦制备之后,并未立即用于患者。而是在制备后,以液体形式、冷冻形式或干燥形式包装并贮存,用于以后重配成适于给予患者的液体形式或其它形式。“干燥形式”是指干燥的液体药物组合物或制剂,即通过冻干 (即冷冻干燥;参见例如 Williams 和 Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59)、喷雾干燥 (参见 Masters (1991) in

Spray-Drying Handbook(第5版;Longman Scientific and Technical,Essez,U.K.),第491-676页;Broadhead等(1992)Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206;和Mumenthaler等(1994)Pharm. Res. 11:12-20)、或空气干燥(Carpenter和Crowe(1988)Cryobiology 25:459-470;和Roser(1991)Biopharm. 4:47-53)。多肽在液体药物组合物贮存期间形成聚集体,可对该多肽的生物活性造成不利影响,导致药物组合物疗效丧失。此外,聚集体的形成可引起其它问题,例如当用输注系统给予含多肽的药物组合物时,会阻塞导管、膜或泵。

[0217] 本发明的药物组合物也可包含一定量的氨基酸基料(amino acid base),其足以减少组合物贮存期间由多肽形成的聚集体。“氨基酸基料”是指这样的氨基酸或氨基酸组合:其中任何给定氨基酸以其游离碱形式或盐形式存在。当使用氨基酸组合时,所有氨基酸都可以其游离碱形式存在,所有都可以其盐形式存在,或者某一些以其游离碱形式存在,而另一些以其盐形式存在。一方面,用于制备本发明组合物的氨基酸是携带带电荷侧链的那些,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(例如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸及其混合物)的任何立体异构体(即L、D或其混合物)或这些立体异构体的组合,都可存在于本发明的药物组合物中,只要所述特定氨基酸以其游离碱形式或其盐形式存在。一方面,使用L-立体异构体。本发明的组合物也可与这些氨基酸的类似物一起配制。“氨基酸类似物”是指天然存在的氨基酸的衍生物,其对减少本发明液体药物组合物贮存期间由多肽引起的聚集体形成具有所需效果。合适的精氨酸类似物包括例如氨基胍、鸟氨酸和N-乙基L-精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸,合适的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L半胱氨酸。与其它氨基酸一样,氨基酸类似物以其游离碱形式或其盐形式掺入到组合物中。在本发明的又一方面,氨基酸或氨基酸类似物的使用浓度足以阻止或延迟蛋白质的聚集。

[0218] 药物组合物也可包含额外的稳定剂,其可进一步增强其中的治疗活性多肽的稳定性。稳定剂在药物组合物中的用途是技术人员众所周知的。为了方便起见,可参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995。

[0219] 在本发明的又一方面,制剂还包含表面活性剂。在本发明的又一方面,制剂还包含蛋白酶抑制剂。为了抑制自动催化,蛋白酶抑制剂的使用在含有蛋白酶的酶原的药物组合物中尤其有用。

[0220] 在本发明的又一个实施方案中,制剂还包含表面活性剂。本文所用的术语“表面活性剂”是指包含水溶性(亲水)部分、头部和脂溶性(亲脂)区段的任何肽或离子。表面活性剂优选积聚在界面,其亲水部分朝向水(亲水相),亲脂部分朝向油-或疏水相(即玻璃、空气、油等)。表面活性剂开始形成胶束的浓度称为临界胶束浓度或CMC。此外,表面活性剂低于液体的表面张力。表面活性剂也称为两亲化合物。术语“去垢剂”通常用作表面活性剂的同义词。表面活性剂在药物组合物中的用途是技术人员众所周知的。为了方便起见,可参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995。

[0221] 在本发明的又一个实施方案中,制剂还包含蛋白酶抑制剂。

[0222] 在本发明的肽药物制剂中也可含有其它成分。这类额外成分可包含润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。这类额外成分当然不应对本发明药物制剂的总体稳定性具有不利影响。

[0223] 可按照任何已知方法制备口服用制剂,这样的制剂可含有一种或多种选自甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂的试剂,以提供美观而适口的药物制剂。片剂在混合物中可含有活性成分以及适用于片剂制备的无毒的药学上可接受的赋形剂。这些赋形剂可以是例如:惰性稀释剂,例如甘露醇、麦芽糊精、高岭土、碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒和崩解剂,例如玉米淀粉;粘合剂,例如淀粉、明胶、聚合物或阿拉伯胶;和润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是未包衣的或者可以通过已知技术对其进行包衣,以延迟治疗活性多肽的崩解或释放。

[0224] 可按照药物化学众所周知的方法来制备和施用本发明的可口服给予的制剂,参见 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 17 版(A. Osol 主编,1985)。

[0225] 在本发明的一方面,本发明的药物组合物可以固体制剂例如片剂和胶囊剂的方式给予。片剂可通过湿法制粒、干法制粒、直接压片或熔融制粒来制备。

[0226] 可使用常规压片技术制备本发明的片剂。通用制备方法包括将杂合类似物、水溶性稀释剂、亲水性粘合剂和任选部分崩解剂混合在一起。该混合物再用亲水性粘合剂的水溶液或者亲水性粘合剂和表面活性剂的水溶液来制粒,必要时再碾压。将颗粒干燥并缩小到合适大小。将任何其它配料,例如润滑剂(例如硬脂酸镁)和额外崩解剂加入到颗粒中并混合。再用常规压片机例如旋转式压片机,将该混合物压片至合适大小和形状。可通过本领域众所周知的技术将片剂包上薄膜衣。

[0227] 供口服用制剂也可以是硬质或软质明胶胶囊剂,其中活性成分与惰性固体稀释剂混合,所述固体稀释剂例如甘露醇、麦芽糊精、碳酸钙、碳酸钠、乳糖、高岭土、磷酸钙或磷酸钠;或软质明胶胶囊剂,其中活性成分与水或油介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0228] 可使用常规方法制备本发明的胶囊剂。通用制备方法包括将治疗活性肽、藻酸盐、水溶性稀释剂、亲水性粘合剂和任选部分崩解剂混合在一起。该混合物再用亲水性粘合剂的水溶液或者亲水性粘合剂和含水表面活性剂的水溶液来制粒,必要时再碾压。将颗粒干燥并缩小到合适大小。将任何其它配料,例如润滑剂加入到颗粒中并混合。再用常规胶囊填充机,将所得混合物填入合适大小的硬壳明胶胶囊中。

[0229] 可将含有本发明杂合肽衍生物的药物组合物在若干部位给予需要这类治疗的患者,例如在局部(例如皮肤和粘膜部位)、在旁路吸收部位(例如在动脉内、静脉内、心脏内给药)和在吸收相关部位(例如在皮内、皮下、肌内或腹腔内给药)。

[0230] 本发明药物组合物的给予可通过若干给药途径给予需要所述治疗的患者,所述途径例如舌、舌下、含服、口腔、口服、胃肠内、鼻腔、肺部(例如通过细支气管和肺泡或其组合)、表皮、真皮、透皮、阴道、直肠、眼内(例如通过结膜)、输尿管和胃肠外。

[0231] 本发明的组合物可以若干剂型给予,例如溶液剂、混悬剂、乳剂、微型乳剂、复合乳剂、泡沫剂、油膏剂、贴剂、硬膏剂、软膏剂、片剂、包衣片剂、冲洗剂(rinser)、胶囊剂(例如硬质明胶胶囊剂和软质明胶胶囊剂)、栓剂、直肠胶囊剂、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、粉剂、喷雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏剂、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏剂、注射用溶液剂、原位转化溶液剂(例如原位胶凝、原位固化(in situ setting)、原位沉淀、原位结晶)、输注用溶液剂和植入物。

[0232] 本发明的组合物也可通过共价、疏水和静电相互作用,与药物载体、递药系统和高

级递药系统 (advanced drug delivery system) 合用或与之连接,从而进一步增强杂合肽衍生物的稳定性,增加生物利用度,增加溶解度,降低不良反应,达到本领域技术人员熟知的长期治疗,并增加患者顺从性或其任何组合。

[0233] 本发明的组合物可呈固体制剂、半固体制剂、粉剂和溶液剂形式,用于肺部给予人胰岛淀粉样多肽或其类似物的衍生物,使用例如计量吸入器、干粉吸入器和喷雾器,所有这些装置都是本领域技术人员众所周知的。

[0234] 本发明的组合物可用于控释 (controlled release)、缓释 (sustained release)、延释 (protracting release)、阻释 (retarded release) 和慢释放 (slow release) 药物递送系统的制剂。

[0235] 更具体地讲,但不限于,本领域技术人员众所周知,组合物可用于胃肠外控释系统和缓释系统 (这两个系统都导致给药数量的多倍减少)。甚至更优选地,是皮下给予的控释系统和缓释系统。并不限制本发明的范围,有用的控释系统和组合物的实例是水凝胶、油性凝胶、液晶、聚合胶束、微球体、纳米粒。

[0236] 产生可用于本发明组合物的控释系统的方法包括但不限于结晶、缩合、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压均质、包入胶囊、喷雾干燥、包入微胶囊、凝聚、相分离、溶剂蒸发而产生微球体、挤出和超临界流工艺。一般性参考文献可参见 Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L. 主编 .Marcel Dekker, New York, 2000) 和 Drug and the Pharmaceutical Sciences 第 99 卷 :Protein Formulaion and Delivery (MacNally, E. J. 主编 .Marcel Dekker, New York, 2000)。

[0237] 胃肠外给药可用注射器、任选笔型注射器 (pen-like syringe),通过皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射来完成。或者,胃肠外给药通过输注泵来完成。一个进一步的选项是组合物,其可以是溶液剂或混悬剂,用于以鼻腔或肺部喷雾形式给予杂合类似化合物。一个更进一步的选项是,含有本发明的杂合类似化合物的药物组合物也可用于透皮给药,例如通过无针头注射或贴剂 (任选离子电渗贴剂),或用于经粘膜给药 (例如含服)。

[0238] 本发明的杂合肽衍生物可通过肺部途径、在溶媒中作为溶液剂、混悬剂或干粉剂给予,使用任何适于肺部递药的已知类型的装置。这些装置的实例包括但不限于常见的 3 类用于肺部递药的喷雾剂发生装置,可包括喷射或超声喷雾器、计量吸入器或干粉吸入器 (参见 Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery :Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453)。

[0239] 胃肠外给药可用注射器、任选笔型注射器,通过皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射来完成。或者,胃肠外给药通过输注泵来完成。一个进一步的选项是组合物,其可以是溶液剂或混悬剂,用于以鼻腔或肺部喷雾形式给予杂合肽衍生物。一个更进一步的选项是,含有本发明杂合肽衍生物的组合物也可用于透皮给药,例如通过无针头注射或贴剂 (任选离子电渗贴剂),或用于经粘膜给药 (例如含服)。

[0240] 在本发明的一方面,包含杂合肽衍生物的药物制剂在超过 6 周使用和超过 3 年贮存后保持稳定。

[0241] 在本发明的另一方面,包含杂合肽衍生物的药物制剂在超过 4 周使用和超过 3 年贮存后保持稳定。

[0242] 在本发明的又一方面,包含杂合肽衍生物的药物制剂在超过 4 周使用和超过 2 年

贮存后保持稳定。

[0243] 在本发明的甚至又一方面,包含杂合肽衍生物的药物制剂在超过 2 周使用和超过 2 年贮存后保持稳定。

[0244] 水性混悬剂可含有活性化合物以及适用于制备水性混悬剂的赋形剂。

[0245] 油性混悬剂可通过将活性成分悬浮于植物油或矿物油(例如液体石蜡)中而制备,所述植物油例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油。油性混悬剂可含有增稠剂,例如蜂蜡、硬质石蜡或鲸蜡醇。可加入甜味剂例如上述那些,以及矫味剂,以提供适口的口服制剂。这些制剂可通过添加抗氧化剂例如抗坏血酸而保存。

[0246] 适用于通过加入水而制备水性混悬剂的分散粉剂和颗粒剂提供了活性化合物以及分散或润湿剂、混悬剂和一种或多种防腐剂的混合物。合适的分散或润湿剂和混悬剂在以上已经举例说明。也可含有额外赋形剂,例如甜味剂、矫味剂和着色剂。

[0247] 包含用于本发明的化合物的药物制剂也可呈水包油乳剂形式。油相可以是植物油(例如橄榄油或花生油)或矿物油(例如液体石蜡)或其混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶(例如阿拉伯胶或西黄蓍胶)、天然存在的磷脂(例如大豆、卵磷脂)和来自脂肪酸的酯类和偏酯类和己糖醇酸酐例如脱水山梨醇单油酸酯、以及所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。乳剂可含有甜味剂和矫味剂。

[0248] 糖浆剂和酏剂可用甜味剂(例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖)来配制。这样的制剂也可含有缓和剂、防腐剂以及矫味剂和着色剂。

[0249] 在本发明的又一个实施方案中,制剂还包含渗透增强剂。最常考虑的是胆盐和脂肪酸用于增加胃肠道上皮细胞内衬的脂质双层膜的口服渗透性。一般而言,渗透增强剂通过可逆性改变膜的完整性而增加了巨肽的细胞旁(paracellular)转运和跨细胞(trancellular)转运。胆盐选自胆酸盐、脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、甘胆酸盐、牛磺脱氧胆酸盐、熊脱氧胆酸盐、牛磺熊脱氧胆酸盐和鹅脱氧胆酸盐。脂肪酸选自短链、中链和长链脂肪酸,例如辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸等。其它增强剂可以是表面活性剂,例如单甘酯、聚氧乙烯酯、脱水山梨醇表面活性剂(非离子型)和硫酸酯(阴离子型)。

[0250] 在本发明的又一个实施方案中,制剂还包含粘膜粘附聚合物(mucoadhesive polymer)。通过使用这样的粘膜粘附聚合物,可使药物递送系统与胃肠道粘膜密切接触。剂型与膜的密切接触看来是有利的,因为治疗活性多肽在递送系统与吸收膜间的途径上的酶促降解可以避免。此外,可在具有药物被动摄取的驱动力的吸收膜上提供分步浓度梯度。

[0251] 在本发明的又一个实施方案中,制剂还包含蛋白水解酶抑制剂,从而进一步跨越酶屏障并完成治疗活性多肽的递送,所述抑制剂例如氨肽酶抑制剂、amastatin、bestatin、boroleucine 和嘌呤霉素。蛋白酶抑制剂的实例是羟乙酸钠、甲磺酸卡莫司他(camostat mesilate)、杆菌肽、大豆胰蛋白酶抑制剂和抑肽酶。

[0252] 包埋和包胶囊是一种用于药物递送系统的技术,用于治疗活性多肽,以优化递送特性,包括免遭酶促降解的保护作用。包埋和包胶囊可以呈聚合药物递送系统的形式(例如水凝胶和纳米胶囊(nanocapsule)/微球体)和液体药物递送系统的形式(例如脂质体和微型乳剂)。

[0253] 本发明的制剂可以若干剂型给予,例如溶液剂、混悬剂、微米混悬剂(micro-suspension)和纳米混悬剂(nano suspension)、乳剂、微型乳剂、复合乳剂、泡沫

剂、油膏剂、贴剂、软膏剂、片剂、包衣片剂、泡腾片剂、舌下片剂、含化片剂、胶囊剂（例如硬质明胶胶囊剂和软质明胶胶囊剂）、粉剂、颗粒剂、原位转化溶液剂（例如原位胶凝、原位固化、原位沉淀、原位结晶）、胃漂浮制剂（stomach floating formulation）例如漂浮混悬液、漂浮片剂等。

[0254] 另一方面，本发明涉及用作药物的本发明衍生物。

[0255] 一方面，本发明的杂合衍生物用于制备治疗或预防以下疾病的药物：高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常（dyslipidemia）、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡。

[0256] 另一方面，本发明的杂合衍生物用作延迟或预防 2 型糖尿病疾病进程的药物。

[0257] 另一方面，本发明的杂合衍生物用作减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性的药物。

[0258] 在本发明的一方面，本发明的杂合衍生物用作药物，用于治疗或预防以下疾病：高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡；或者用于延迟或预防 2 型糖尿病的疾病进程；或者用于减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性。

[0259] 在本发明的又一方面，提供用于治疗或预防以下疾病的方法：高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡；或者提供用于延迟或预防 2 型糖尿病的疾病进程的方法；或者提供用于减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性；所述方法包括给予需要所述治疗的患者治疗有效量的本发明杂合衍生物。

[0260] 用本发明杂合衍生物的治疗也可与第二种或更多种例如选自以下的药理学活性物质联用：抗糖尿病药、抗肥胖症药、食欲调节药、抗高血压药、用于治疗和 / 或预防糖尿病所致或相关并发症的药物、以及用于治疗和 / 或预防肥胖症所致或相关并发症和疾病的药物。这些药理学活性物质的实例是：胰岛素、磺酰脲、双胍、美格列奈、葡萄糖苷酶抑制剂、高血糖素拮抗剂、DPP-IV（二肽基肽酶-IV）抑制剂、MC4 抑制剂、瘦蛋白、PYY、PP 或参与刺激糖原异生和 / 或糖原分解的肝酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、调节脂质代谢的化合物例如抗高血脂药例如 HMG CoA 抑制剂（他汀类）、减少食物摄取的化合物、RXR 激动剂和作用于 β 细胞 ATP 依赖性钾通道的药物；考来烯胺、考来替泊、氯贝丁酯、吉非贝齐、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、普罗布考、右甲状腺素、内他列奈（neteglinide）、瑞格列奈； β -阻滞药类（例如阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔）、ACE（血管紧张素转化酶）抑制剂（例如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、alatriopril、喹那普利和雷米普利）、钙通道阻滞药类（例如硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔氮卓和维拉帕米）以及 α -阻滞药类（例如多沙唑啉、乌拉地尔、哌唑嗪和特拉唑嗪）；CART（可卡因苯丙胺调节的转录物）激动剂、NPY（神经肽 Y）拮抗剂、MC4（黑皮质素 4）激动剂、食欲肽（orexin）拮抗剂、TNF（肿瘤坏死因子）激动剂、CRF（促肾上腺皮质激素释放因子）激动剂、CRF BP（促肾上腺皮质激素释放因子结合蛋白）拮抗剂、尿皮质

素 (urocortin) 激动剂、 β 3 激动剂、MSH (促黑素细胞激素) 激动剂、MCH (黑素细胞浓缩激素) 拮抗剂、CCK (缩胆囊素) 激动剂、5-羟色胺重摄取抑制剂、5-羟色胺和去甲肾上腺素重摄取抑制剂、混合 5-羟色胺和去甲肾上腺素能化合物、5HT (5-羟色胺) 激动剂、铃蟾肽激动剂、甘丙肽拮抗剂、生长激素、生长激素释放化合物、TRH (促甲状腺素 (thyreotropin) 释放激素) 激动剂、UCP 2 或 3 (解偶联蛋白 2 或 3) 调节剂、瘦蛋白激动剂、DA 激动剂 (溴隐亭 (bromocriptin)、doprexin)、脂肪酶 / 淀粉酶抑制剂、RXR (类视黄醇 X 受体) 调节剂、TR β 激动剂;组胺 H3 拮抗剂、胃泌素和胃泌素类似物。

[0261] 应当理解,本发明衍生物与一种或多种上述化合物和任选一种或多种另外的药理学活性物质的任何合适组合都被认为是在本发明的范围之内。

[0262] 以下是非限制性方面的列表,其在本文的其它地方有进一步说明:

[0263] 1. 一种杂合肽衍生物,其中所述杂合肽包含人胰岛淀粉样多肽序列的 C-末端、鲑鱼降钙素肽序列的中间部分和人胰岛淀粉样多肽序列的 N-末端,并且其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

[0264] 2. 方面 1 的衍生物,所述衍生物是母体杂合肽 (SEQ ID No :5) 或类似杂合肽,其中白蛋白结合部分与杂合肽连接,任选通过接头连接。

[0265] 3. 方面 1 或 2 的衍生物,所述衍生物是类似杂合肽,其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

[0266] 4. 方面 3 的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-12 个氨基酸取代。

[0267] 5. 方面 3 或 4 的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-10 个氨基酸取代。

[0268] 6. 方面 3-5 中任一项的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-8 个氨基酸取代。

[0269] 7. 方面 3-6 中任一项的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-6 个氨基酸取代。

[0270] 8. 方面 3-7 中任一项的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,所述类似杂合肽具有 1-4 个氨基酸取代。

[0271] 9. 前述方面中任一项的衍生物,所述衍生物选自:

[0272] 胰岛淀粉样多肽 (1-7)-[Arg11,Arg18]sCT(8-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :5)

[0273] 胰岛淀粉样多肽 (2-7)-[Arg11,Arg18]sCT(8-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :6)

[0274] 胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[Arg11,Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :7)

[0275] 胰岛淀粉样多肽 (2-8)-[Arg11,Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :8)

[0276] [His1] 胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[His11,His18,His24]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37) (seq ID No :9)

[0277] 其中白蛋白结合部分与所述杂合肽连接,任选通过接头连接。

[0278] 10. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合部分与所述杂合肽的 N-端氨基酸和 / 或 C-端氨基酸和 / 或与所述杂合肽内部的一个或多个氨基酸连接。

[0279] 11. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述衍生物包含连接在所述杂合肽 N-端的由 1-12 个额外氨基酸组成的 N-端延伸,其中所述白蛋白结合部分与额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0280] 12. 方面 11 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 1-10 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0281] 13. 方面 12 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 1-8 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0282] 14. 方面 13 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 1-6 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0283] 15. 方面 14 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 5 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0284] 16. 方面 15 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 4 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0285] 17. 方面 16 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 3 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0286] 18. 方面 17 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 2 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与所述额外氨基酸的 N-端氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0287] 19. 方面 18 的衍生物,其中所述 N-端延伸由 1 个氨基酸组成,其中所述白蛋白结合部分与额外氨基酸连接,任选通过接头连接。

[0288] 20. 前述方面中任一项的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,已添加 0-8 个额外电荷。

[0289] 21. 前述方面中任一项的衍生物,其中与所述母体杂合肽相比,已添加 0-8 个额外正电荷。

[0290] 22. 方面 20 的衍生物,其中通过所述母体杂合肽的一个或多个氨基酸残基被带电荷氨基酸取代和 / 或通过 N-端延伸添加带电荷氨基酸,或通过白蛋白结合残基和 / 或接头中添加负电荷实体,已添加 0-8 个额外电荷。

[0291] 23. 方面 22 的衍生物,其中通过所述母体杂合肽的一个或多个氨基酸残基被组氨酸残基和 / 或精氨酸残基取代和 / 或通过 N-端延伸添加带电荷氨基酸,已添加 0-8 个额外电荷。

[0292] 24. 方面 23 的衍生物,其中通过在 N-端延伸添加带电荷氨基酸,已添加 0-8 个额外电荷。

[0293] 25. 方面 24 的衍生物,其中通过在 N-端延伸添加组氨酸和 / 或精氨酸,已添加 0-8 个额外电荷。

[0294] 26. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是亲脂残基。

[0295] 27. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基在生理 pH 时带负电荷。

[0296] 28. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基包含可带负电荷的基

团。

[0297] 29. 方面 28 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基包含羧酸基团。

[0298] 30. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基与白蛋白非共价结合。

[0299] 31. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基对人血清白蛋白的亲合力小于约 $10\ \mu\text{M}$ 或小于约 $1\ \mu\text{M}$ 。

[0300] 32. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有 ω -羧酸基团的基团和部分或完全氢化环戊并菲骨架。

[0301] 33. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是汽巴克隆基残基。

[0302] 34. 方面 26 的衍生物,其中所述亲脂残基包含部分或完全氢化环戊并菲骨架。

[0303] 35. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子、8-26 个碳原子或 8-20 个碳原子。

[0304] 36. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-$ 的酰基,其中 r 为 4-38 的整数,优选为 4-24 的整数,更优选选自 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

[0305] 37. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是直链或支链烷烃 α , ω -二羧酸的酰基。

[0306] 38. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是选自 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_s\text{CO}-$ 的酰基,其中 s 为 4-38 的整数,优选 4-24 的整数,更优选选自 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ 、 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 和 $\text{HOO}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

[0307] 39. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_v\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 的基团,其中 v 为 10-24 的整数。

[0308] 40. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_w\text{CO}-\text{NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$ 的基团,其中 w 为 8-24 的整数。

[0309] 41. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是式 $\text{COOH}(\text{CH}_2)_x\text{CO}-$ 的基团,其中 x 为 8-24 的整数。

[0310] 42. 方面 26 的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是式 $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$ 的基团,其中 y 为 8-18 的整数。

[0311] 43. 方面 1-25 中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基是肽,例如包含小于 40 个氨基酸残基的肽。

[0312] 44. 前述方面中任一项的衍生物,其中所述白蛋白结合残基任选通过接头连接是通过赖氨酸残基的 ϵ -氨基连接。

[0313] 45. 包含方面 1-44 中任一项的衍生物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0314] 46. 方面 45 的药物组合物,所述组合物适于口服或含服给予。

[0315] 47. 用作药物的方面 1-44 中任一项的衍生物。

[0316] 48. 用作药物的方面 1-44 中任一项的衍生物,所述药物用于治疗或预防高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡。

[0317] 49. 用作药物的方面 1-44 中任一项的衍生物,所述药物用于延迟或预防 2 型糖尿病的疾病进程。

[0318] 50. 用作药物的方面 1-44 中任一项的衍生物,所述药物用于减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性。方面 1-42 中任一项的衍生物在制备药物中的用途。

[0319] 51. 用于治疗或预防以下疾病的方法,所述方法包括给予患者活性量的方面 1-44 中任一项的衍生物:高血糖症、2 型糖尿病、葡萄糖耐量减低、1 型糖尿病、肥胖症、高血压、X 综合征、血脂异常、认知障碍、动脉粥样硬化、心肌梗塞、冠心病和其它心血管疾病、中风、炎症性肠综合征、消化不良和胃溃疡。

[0320] 52. 用于延迟或预防 2 型糖尿病疾病进程的方法,所述方法包括给予患者活性量的方面 1-44 中任一项的衍生物。

[0321] 53. 用于减少食物摄取、减少 β 细胞凋亡、增加 β 细胞功能和 β 细胞量、和 / 或用于恢复 β 细胞的葡萄糖敏感性的方法,所述方法包括给予患者活性量的方面 1-44 中任一项的衍生物。

[0322] 本文所引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利都通过引用全部结合到本文中,其程度如同每篇参考文献单独而具体指明通过引用其全部结合并列举在本文中一样(以法律所允许的最大程度)。

[0323] 本文所采用的所有标题和副标题都仅为方便起见,不应视为以任何方式限制本发明。

[0324] 本文所提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如“例如”)的使用,都仅仅是为了更好地说明本发明,而不应视为对本发明范围的限制,除非另有说明。本说明书中的语言都不应视为意指任何未要求保护的要素是本发明实践中必不可少的。

[0325] 本文对专利文件的引用和结合仅仅是为了方便起见,并不反映对这些专利文件的有效性、专利性(patentability)和 / 或可实施性的任何观点。

[0326] 按照可适用法律所允许的,本发明包括对本文所附权利要求书所述主题的所有修改和等同实施方案。

[0327] 测定

[0328] 药理学测定(I)

[0329] 用杂合肽或杂合肽衍生物进行对食欲的功效测试实验方案,使用随意饲喂的大鼠模型。

[0330] 用 Sprague Dawley (NTac :SD) 大鼠(来自 Taconic Europe, Denmark) 进行本实验。实验开始时,大鼠体重为 200-250g。大鼠到货至少 10-14 天后才开始实验,以便让其适应实验设施。在此期间至少 2 次处理动物。当到货后,大鼠以颠倒的光 / 暗周期(上午 9:00 关灯,晚上 9:00 开灯,是指白天关灯而夜晚开灯)单独笼养。因为大鼠在暗周期期间正常活动并吃掉它们的每日食物摄取量的大部分,所以在关灯之前在早晨给大鼠用药。这种做法导致最低数据误差和最高试验灵敏度。

[0331] 实验在大鼠饲养笼(home cage)内进行,在整个适应周期和实验周期中,让大鼠随意进食和饮水。每一剂量的衍生物都在一组 5-8 只大鼠中进行试验。每组试验都包括 6-8 只大鼠的溶媒组。按照体重,通过腹膜内(ip)、口服(po)或皮下(sc)给予大鼠一次

0.01-3mg/kg 溶液剂。记录每组的给药时间。给药后,把大鼠放回其饲养笼中,在此它们可以随意进食和饮水。通过每小时一次的在线记录或手工记录,连续记录每只动物的食物消耗达 7 小时,然后在 24 小时后和有时在 48 小时后进行记录。在实验期结束时,给动物实施安乐死。

[0332] 把各数据记录在微软 excel 表中。用 Grubbs 统计评价检验异常值后,将其去掉,结果用 GraphPad Prism 程序绘制图表。

[0333] 荧光素酶测定 (II)

[0334] 1. 胰岛淀粉样多肽测定概述

[0335] 先前已报道 (Poyner DR 等,2002, Pharmacological Reviews 54(2) 233-246),胰岛淀粉样多肽所致的胰岛淀粉样多肽受体的活化(降钙素受体和受体活性调节肽 RAMP 共表达),导致 cAMP 胞内浓度增加。因此,转录在含有多拷贝 cAMP 反应元件 (CRE) 的启动子下被激活。因此,通过使用 CRE 荧光素酶报道基因来测定胰岛淀粉样多肽活性是可行的,所述 CRE 荧光素酶报道基因被引入到还表达胰岛淀粉样多肽受体的 BHK 细胞中。

[0336] 2. 胰岛淀粉样多肽 3(a)/CRE-luc 细胞系的构建

[0337] 用人降钙素受体 (CTa) 和 CRE- 反应性荧光素酶报道基因来稳定转染 BHK570 细胞系。采用标准方法,用 RAMP-3 进一步转染该细胞系。这会使降钙素受体转变为胰岛淀粉样多肽 3(a) 受体。甲氨蝶呤、新霉素和潮霉素分别是荧光素酶、降钙素受体和 RAMP-3 的选择标记。

[0338] 3. 胰岛淀粉样多肽荧光素酶测定

[0339] 为了进行活性测定,将 BHK 胰岛淀粉样多肽 3(a)//CRE-luc 细胞接种到白色 96 孔培养板上,密度约为 20,000 个细胞/孔。这些细胞是在 100 μ l 生长培养基(含有以下成分的 DMEM:10% FBS、1% 青霉素/链霉素、1mM 丙酮酸钠、250nM 甲氨蝶呤、500 μ g/ml 新霉素和 400 μ g/ml 潮霉素)中。在 37°C 和 5% CO₂ 中孵育过夜之后,将生长培养基更换为 50 μ l/孔的测定培养基 (DMEM(不含酚红)、Glumamax™、10% FBS 和 10mM Hepes, pH 7.4)。此外,加入溶于测定缓冲液中的 50 μ l/孔的标准品或样品。在 37°C 和 5% CO₂ 中孵育 4 小时后,除去标准品或样品的测定培养基并更换为 100 μ l/孔 PBS。此外,加入 100 μ l/孔的 LucLite™。将各板密封并在室温下孵育 30 分钟。最后,在 TopCounter (Packard) 上用 SPC(单光子计数)模式测量发光。

[0340] 测定 (III) 用于评价蛋白质制剂物理稳定性的 THT 原纤维形成测定的概论

[0341] 肽的物理稳定性低下可导致形成淀粉样蛋白原纤维,在样品中观察到这样的原纤维是井然有序的线状大分子结构,并最终导致凝胶的形成。通常通过目测样品而对其进行测定。然而,这类测定是非常主观的,取决于观察者。因此,使用小分子指示探针要有利得多。硫黄素 T(ThT) 就是这样一种探针,当与原纤维结合时具有明显的荧光信号 [Naiki 等 (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 309, 274-284]。

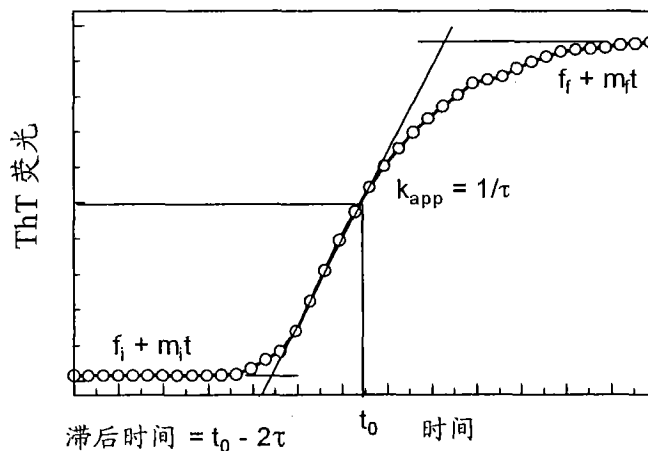
[0342] 用具有下列表达式的 S 形曲线可描述原纤维形成的时程 [Nielsen 等 (2001) Biochemistry 40, 6036-6046] :

$$[0343] \quad F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Eq.(1)}$$

[0344] 式中, F 是在时间 t 的 ThT 荧光。常数 t₀ 是达到最大荧光的 50% 所需要的时间。

描述原纤维形成的两个重要参数是用 $t_0 - 2\tau$ 计算出的滞后时间和表观速率常数 $k_{app} = 1/\tau$ 。

[0345]



[0346] 肽的部分折叠中间体的形成被认为是原纤维形成的常见起始机制。这些中间体中的少数成核而形成模板，而更多中间体可装配在其上并且原纤维形成继续进行。滞后时间相当于建立临界量的核的间隔时间，而表观速率常数则是原纤维本身形成的速率。

[0347] 样品制备

[0348] 每次测定之前都要新制备样品。各实施例中都描述了每种样品的组成。样品的 pH 用适量的浓 NaOH 和 HClO₄ 或 HCl 调节至期望值。将溶于水的硫黄素 T 贮液加入到样品中，终浓度为 1 μ M。

[0349] 取 200 μ l 的等分样品放入 96 孔微量板 (Packard OptiPlate™-96, 白色聚苯乙烯)。通常，将各样品一式 4 份或 8 份（对应于一种试验条件）放入一列孔中。该板用 Scotch Pad (Qiagen) 密封。

[0350] 孵育和荧光检测

[0351] 在给定温度下孵育，振摇并在 Fluoroskan Ascent FL 荧光读板器或 Varioskan 读板器 (Thermo Labsystems) 中对 ThT 荧光发射进行测定。温度调节至 37°C。在所有给出的数据中，定轨振摇都调节至 960rpm，振幅为 1mm。使用通过 444nm 滤色片的激发光并测定通过 485nm 滤色片的发射光，进行荧光测定。

[0352] 每轮一开始都是在测定温度下孵育该板长达 10 分钟。在所需时间周期内，每隔 20 分钟测量该板一次。每次测量之间，按照所述，将该板振摇和加热。

[0353] 数据处理

[0354] 将测量点数据保存在微软 Excel 格式中，用于进一步处理，并用 GraphPad Prism 进行曲线的绘制和拟合。在原纤维不存在时，来自 ThT 的背景发射光可忽略不计。数据点通常是 4 份或 8 份样品的平均值并给出标准偏差误差棒 (standard deviation error bar)。只有同一实验所得数据（即在同一板上的样品）才显示在同一图表中，以确保各实验间原纤维形成的相对度量。

[0355] 数据集可拟合到等式 (1)。然而，因为在这种情况下在测量期间并非总能达到完全 S 曲线，所以原纤维形成的程度表示为按照不同时间点的样品平均值的 ThT 荧光表并给出标准偏差。

[0356] 测定 (IV)PK- 在小猪 (MINI-PIG) 中测定 $T_{1/2}$

[0357] $T_{1/2}$ 是末端半衰期 = 血浆化合物的 $\ln 2 / \lambda_z$ 。 λ_z 是血浆浓度 - 时间曲线末端 (对数 - 线性) 部分相关的一级速率常数, 是根据时间与对数浓度的线性回归而求得的。

[0358] 通过对雄性 Göttingen 小猪 (来自 Ellegaard Göttingen Minipigs ApS) 的药物动力学研究, 测定本发明降钙素衍生物的 $T_{1/2}$ 值, 实验动物管理原则如下。

[0359] 动物进入研究之前, 让其度过约 6-10 天的适应期。在适应期一开始, 小猪约 5-12 月龄, 体重范围为 7-35kg。给小猪插入两条中心静脉导管, 用于采血。

[0360] 研究在动物室进行, 该室的照明提供约 12 小时光照和 12 小时黑暗周期。将动物单独笼养。

[0361] 在研究期间, 让动物随意饮用饲养级饮用水, 但通常从给药前晚到给药后约 6-12 小时禁食。在到货和给药当日给动物称重。

[0362] 在本项研究中, 试验物质经皮下给予约 2nmol/kg 的剂量。动物接受单次皮下注射。在颈右侧, 距离耳朵约 5-7cm, 距离颈中部 7-9cm 处, 给予皮下注射。给予注射时, 在针头上使用制动器, 让约 0.5cm 针头扎入。每种试验物质通常给予 3 只动物, 但某些情况下给予 2 只或 4 只动物。

[0363] 从每只动物获取完整的血浆浓度 - 时间分布型, 采用 12-16 个采样点。在实施例中, 按照以下时间表采集血样:

[0364] 皮下给予之后:

[0365] 给予前 (0 小时), 注射之后的 0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96、120、168 和 240 小时。在某些情况下还采集额外的血样直到注射之后的 288 小时。

[0366] 在每次取样时, 对每只动物抽取 0.5-2ml 血。通过中心静脉导管采集血样。

[0367] 将血样收集到 EDTA 试验管 (即 Sarstedt Micro 管 1.3mL K3E)。将血样保存在冰上至多 20 分钟, 然后离心。用离心分离血浆 (即在 4°C, 10min., 1500G) 并将其立即移至 Micronic 管。将约 200 μ l 血浆移至每个 Micronic 管。将血浆贮存在 -20°C 直到测定。用 ELISA 测定, 测定血浆样品中的胰岛淀粉样多肽含量。

[0368] 通过无房室药物动力学分析 (NCA), 使用 WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA), 分析血浆浓度 - 时间分布型。用来自每只动物的各自的血浆浓度 - 时间分布型进行 NCA。 $T_{1/2}$ 是末端半衰期 = $\ln 2 / \lambda_z$ 并且是根据 λ_z 来测定的, λ_z 是曲线末端 (对数 - 线性) 部分相关的一级速率常数, 是根据时间与对数浓度的线性回归而求得的。

[0369] 测定 (V)PK- 在大鼠中测定 $T_{1/2}$

[0370] $T_{1/2}$ 是末端半衰期 = 血浆化合物的 $\ln 2 / \lambda_z$ 。 λ_z 是血浆浓度 - 时间曲线末端 (对数 - 线性) 部分相关的一级速率常数, 是根据时间与对数浓度的线性回归而求得的。

[0371] 通过对 Sprague Dawley 雄性大鼠 (来自 Taconic Europe) 的药物动力学研究, 测定本发明降钙素衍生物的 $T_{1/2}$ 值, 实验动物管理原则如下。

[0372] 动物进入研究之前, 让其度过约 7 天的适应期。在适应期一开始, 大鼠体重范围为 300-400g。给大鼠在肌内 (in a. carotis) 插入永久性导管, 用于采血。

[0373] 研究在动物室进行, 该室的照明提供约 12 小时光照和 12 小时黑暗周期。将动物单独笼养, 因为插有导管, 让其随意进食和饮水。在给药当日给动物称重。

[0374] 在本项研究中,试验物质经皮下给予约 20nmol/kg 的剂量。动物在颈部接受单次皮下注射,使用 25G 针头和注射器。每种试验物质通常给予 3 只动物,但某些情况下给予 2 只或 4 只动物。

[0375] 从每只动物获取完整的血浆浓度-时间分布型,采用 8-10 个采样点。在实施例中,按照以下时间表采集血样:

[0376] 皮下给予之后:

[0377] 给予前 (0 小时),注射之后的 0.5、1、1.5、2、4、6、12、24、48 和 72 小时。在每次取样时,对每只动物抽取 0.08-0.10ml 血。通过导管采集血样。

[0378] 将血样收集到 EDTA 试验管中。将血样保存在冰上至多 20 分钟,然后离心。用离心分离血浆 (即在 4°C, 10min., 1500G) 并将其立即移至 Micronic 管或 PCR 板。转移约 40 μ l 血浆并贮存在 -20°C 直到测定。用 ELISA 测定,测定血浆样品中的胰岛淀粉样多肽含量。

[0379] 通过无房室药物动力学分析 (NCA), 使用 WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA), 分析血浆浓度-时间分布型。用来自每只动物的各自的血浆浓度-时间分布型进行 NCA。T_{1/2} 是末端半衰期 = $\ln 2 / \lambda_z$ 并且是根据 λ_z 来测定的, λ_z 是曲线末端 (对数-线性) 部分相关的一级速率常数,是根据时间与对数浓度的线性回归而求得的。

[0380] 测定 (VI)-溶解度的测定

[0381] 按照以下方式测定溶解度-pH 曲线。制备制剂并通过加入 HClO₄ 或 HCl 和 NaOH 将等分试样的 pH 值调节至期望范围。让这些样品在室温下平衡 2-3 天。然后将样品离心。对每种样品都取少量等分试样,用于反相 HPLC 分析,以测定溶液中的蛋白质浓度。离心之后,测定各样品的 pH,并描绘各蛋白质浓度与所测 pH 的曲线。

[0382] 测定 (VII)-白蛋白结合亲和力的测定。

[0383] “白蛋白结合亲和力”可通过本领域已知的若干方法来测定。在一种方法中,将待测衍生物用例如 ¹²⁵I 或 ³H 进行放射性标记并与固定化白蛋白一起孵育 (Kurtzhals 等, Biochem. J., 312, 725-731 (1995))。相对于标准,计算衍生物的结合。在另一种方法中,将相关化合物进行放射性标记,其与待测衍生物的系列稀释液竞争性结合固定在例如 SPA 珠上的白蛋白。竞争的 EC₅₀ 值就是衍生物亲和力的度量。在第三种方法中,用不同浓度的白蛋白,测定受体亲和力或衍生物的效力,相对亲和力或衍生物效力随白蛋白浓度的变化就反映出其对白蛋白的亲和力。

实施例

[0384] 合成和纯化

[0385] 按照下述肽合成法,制备出实施例的化合物:

[0386] 一种肽合成方法是通过在基于微波的 Liberty 肽合成仪 (CEM Corp., North Carolina) 的 Fmoc 化学。树脂是 Tentagel S RAM, 装载量为 0.25mmol/g。偶联化学是溶于 NMP 的 DIC/HOAt, 使用溶于 NMP 的 0.3M 氨基酸溶液并且摩尔过量 6-8 倍。偶联条件是 5 分钟, 可达 70°C。脱保护是用溶于 NMP 的 5% 哌啶, 可达 70°C。所用的被保护氨基酸是 0.3M 标准 Fmoc-氨基酸 (由例如 Anaspec 或 Novabiochem 供应), 其溶于含有 0.3M HOAt 的 NMP。

[0387] 另一种肽合成方法是在 Applied Biosystems 433 肽合成仪上, 以 0.25mmol 或

1.0mmol 规模,使用制造商供应的 FastMoc UV 方案,该方案使用 HBTU(六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓)或 HATU(六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓)在 NMP 中介导偶联,并用 UV 监测 Fmoc 保护基的脱保护。用于肽的酰胺合成的起始树脂是 Rink-Amide 树脂。所用的被保护的氨基酸衍生物是标准 Fmoc-氨基酸(由例如 Anaspec 或 Novabiochem 供应),用于适用于 ABI433A 合成仪的预称重柱。

[0388] 当需要赖氨酸侧链的化学修饰时,将赖氨酸掺入作为 Lys(Mtt),N-端氨基酸也掺入到序列中,作为 Boc-氨基酸,或者,如果掺入 N-端氨基酸作为 Fmoc-氨基酸,则除去 Fmoc 基团并且 N-端通过用 6 当量 Boc-碳酸酯和 6 当量 DIPEA/NMP 处理 30 分钟而受到保护。树脂用 NMP 和 DCM 洗涤,通过将树脂悬浮在纯净六氟异丙醇中达 20 分钟,再用 DCM 和 NMP 洗涤而除去 Mtt 基团。通过采用肽合成所用的相同方法,即通过在 Liberty 或 ABI 433 上的一个或多个自动化步骤或通过室温下的一个或多个手工偶联步骤,添加一个或多个下述构建模块(building block)而进行赖氨酸的化学修饰。合成之后,树脂用 DCM 洗涤并干燥,然后用 TFA/TIPS/水(92.5/5/2.5)处理 2 小时,再通过用 4 倍体积二乙醚沉淀,将肽从树脂上裂解下来。进一步用二乙醚洗涤并干燥之后,将肽重新溶于水中,浓度为 1-2mg/ml,将 pH 调节至约 4.5,再通过用 1.1 当量 $[\text{Pt(IV)}1,2\text{-乙二胺}_2\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$ 处理过夜而形成二硫桥。或者,通过用 10 当量的碘/NMP 处理 1 小时,在树脂上形成二硫桥。在此情况下,在裂解和乙醚沉淀之后,直接纯化粗制肽。

[0389] 纯化:粗制肽通过半制备型 HPLC,在装有 5μ 或 7μ C-18 硅胶的 20mmx250mm 柱上进行纯化。将肽溶液泵至 HPLC 柱上,并将沉淀的肽溶于 5ml 50%乙酸 H_2O 中并用 H_2O 稀释至 20ml,注入柱中,然后在 50 分钟内,在 40℃用 40-60% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA 梯度洗脱,流速为 10ml/min。收集含有肽的流分。用水稀释洗脱液之后,将纯化的肽冻干。

[0390] 为了分析 HPLC-流分和终产物,用 214nm 紫外检测和例如 Vydac218TP54 4.6mmx250mm 5μ C-18 硅胶柱(The Separations Group,Hesperia,USA)并在 42℃,按照例如 1ml/min 的流速洗脱,进行了 RP-HPLC 分析。通常使用下列 4 种不同洗脱条件中的 1 种:

[0391] A1:用含有 0.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液(其用浓 H_2SO_4 调节至 pH2.5)平衡柱子并在 50 分钟内,用溶于同一缓冲液的 0%→60% CH_3CN 梯度洗脱。

[0392] B1:用 0.1% TFA/ H_2O 平衡柱子并在 50 分钟内,用 0% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA/ H_2O →60% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA/ H_2O 梯度洗脱。

[0393] B6:用 0.1% TFA/ H_2O 平衡柱子并在 50 分钟内,用 0% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA/ H_2O →90% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA/ H_2O 梯度洗脱。

[0394] 或者,用 214nm 紫外检测和 Symmetry300,3.6mmx150mm,3.5 μ C-18 硅胶柱(Waters)并在 42℃,按照 1ml/min 的流速洗脱,进行了 RP-HPLC 分析。

[0395] B4:用 0.05% TFA/ H_2O 平衡柱子并在 15 分钟内,用 5% $\text{CH}_3\text{CN}/0.05\%$ TFA/ H_2O →95% $\text{CH}_3\text{CN}/0.05\%$ TFA/ H_2O 梯度洗脱。

[0396] 肽的结构特征通过 MALDI-MS 在 Bruker Microflex 上予以证实。

[0397] 所用缩略语:

[0398] HBTU:六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓

[0399] Fmoc:9H-芴-9-基甲氧基羰基

[0400] Boc:叔丁氧基羰基

[0422] 实施例 5

[0423] [His1] 胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[His11, His18, His24]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37)

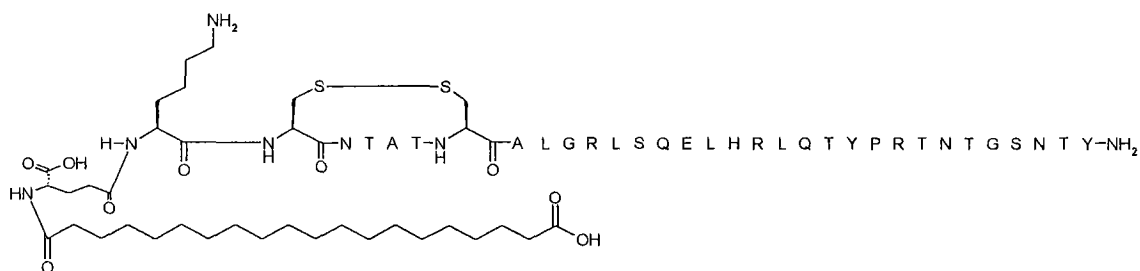
[0424]



[0425] 实施例 6

[0426] N- α 1-(4-羧基-4-(19-羧基-十九烷酰基氨基)丁酰基)-胰岛淀粉样多肽 (1-8)-[Arg11, Arg18]sCT(9-27)-胰岛淀粉样多肽 (33-37)

[0427]



[0428] 荧光素酶测定 (II) 的效力

[0429]

肽	荧光素酶测定的 EC50 (pM)
实施例 1	3
实施例 2	30
实施例 3	60
实施例 4	3
实施例 5	10
实施例 6	50

[0430] 药理学测定 (I) 的效力

[0431] 表格显示在 0-24 小时和 24-48 小时的周期内食物摄取的减少。从表格可见,与非衍生杂合肽 (实施例 1) 相比,衍生杂合肽 (实施例 2、3 和 6) 能更有效地减少食物摄取。n = 5-7, 数据 = 平均值, 化合物剂量 : 30mmol/kg。

[0432]

肽	食物摄取的减少率 0-24h	食物摄取的减少率 24-48h
实施例 1	52%	7%
实施例 2	93%	98%
实施例 3	88%	71%
实施例 6	91%	100%

[0001]

CPCH1063753P

序 列 表

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 胰岛淀粉样多肽和鲑鱼降钙素的衍生杂合肽

<130> 7805.204-W0

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 其它特征

<222> (38).. (38)

<223> Xaa 为 NH₂

<400> 1

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr Xaa
35

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 普兰林肽

<220>

<221> 其它特征

<222> (38).. (38)

<223> Xaa 为 NH₂

[0002]

<400> 2

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr Xaa
35

<210> 3
<211> 33
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 其它特征
<222> (33).. (33)
<223> Xaa 为 NH2

<400> 3

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

Xaa

<210> 4
<211> 33
<212> PRT
<213> 大麻哈鱼

<220>
<221> 其它特征
<222> (33).. (33)
<223> Xaa 为 NH2

[0003]

<400> 4

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
20 25 30

Xaa

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 杂合肽

<220>

<221> 其它特征

<222> (33)..(33)

<223> Xaa 为 NH2

<400> 5

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr
20 25 30

Xaa

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合肽

[0004]

<220>

<221> 其它特征

<222> (3).. (32)

<223> Xaa 为 NH2

<400> 6

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu His
1 5 10 15

Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr Xaa
20 25 30

<210> 7

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合肽

<220>

<221> 其它特征

<222> (33).. (33)

<223> Xaa 为 NH2

<400> 7

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr
20 25 30

Xaa

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合肽

[0005]

<220>

<221> 其它特征

<222> (32).. (32)

<223> Xaa 为 NH₂

<400> 8

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu His
1 5 10 15

Arg Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr Xaa
20 25 30

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合肽

<220>

<221> 其它特征

<222> (33).. (33)

<223> Xaa 为 NH₂

<400> 9

His Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Leu Gly His Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His His Leu Gln Thr Tyr Pro His Thr Asn Thr Gly Ser Asn Thr Tyr
20 25 30

Xaa