



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108697769 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201780013643.1

(22)申请日 2017.03.10

(30)优先权数据

62/306121 2016.03.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/055679 2017.03.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/153575 EN 2017.09.14

(71)申请人 免疫医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

(72)发明人 M.A.贝纳雷 L.U.耶尔穆图斯

P.安贝里 M.彼得罗内

(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 周齐宏

(51)Int.Cl.

A61K 38/26(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 9/12(2006.01)

权利要求书8页 说明书56页

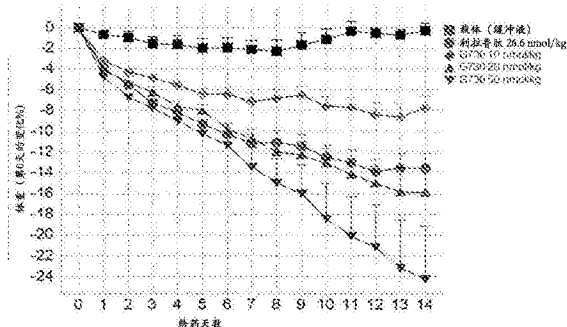
序列表12页 附图31页

(54)发明名称

用于治疗肥胖症的胰高血糖素和GLP-1共激动剂

(57)摘要

本文提供了预防和治疗患者的肥胖症和糖尿病的方法,所述方法包括给予GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。



1. 一种降低体重的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含以下的氨基酸序列的肽

HX₂QGTFTSDX₁₀SX₁₂X₁₃LX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈AX₂₀X₂₁FX₂₃X₂₄WLX₂₇X₂₈GX₃₀;

其中X₂是G或S,X₁₀是Y或K,X₁₂是K、E、R或S,X₁₃是K或Y,X₁₅是D或E,X₁₆是S或G,X₁₇是E、R、Q或K,X₁₈是R、S或A,X₂₀是R、K或Q,X₂₁是D或E,X₂₃是V或I,X₂₄是A或Q,X₂₇是E或V,X₂₈是A或K,并且X₃₀是G或R(SEQ ID NO:4)。

2. 一种降低体脂肪的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

3. 一种治疗肥胖症的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

4. 一种治疗或预防由体重过重引起或表征的疾病或病症的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

5. 一种治疗非酒精性脂肪肝炎(NASH)的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

6. 一种增加脂质氧化的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

7. 一种减少进食的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

8. 一种降低血浆葡萄糖的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述受试者患有糖尿病。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述糖尿病是2型糖尿病。

11. 一种治疗2型糖尿病的方法,所述方法包括向人类给予包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

12. 一种改善患有2型糖尿病的人类受试者中的血糖控制的方法,所述方法包括向所述受试者给予100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

13. 如权利要求11或12所述的方法,其中所述给予减轻体重。

14. 如权利要求11-13中任一项所述的方法,其中所述给予治疗肥胖症。

15. 如权利要求9-12中任一项所述的方法,其中所述给予降低体脂肪。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中X₂是G,X₁₀是K,X₁₂是E、R或S,X₁₃是K,X₁₇是E或K,X₁₈是S,X₂₀是R,X₂₇是E,或者X₂₈是A。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述肽包含SEQ ID NO:19,基本上由SEQ ID NO:19组成,或由SEQ ID NO:19组成。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述给予包括给予初始剂量持续3至10天,和其后的第二较高剂量。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述初始剂量给予持续3天至7天。

20. 如权利要求18或19所述的方法,其中所述初始剂量是100μg的所述肽。

21. 如权利要求18-20中任一项所述的方法,其中所述第二剂量给予持续至少四天。

22. 如权利要求18-21中任一项所述的方法,其中所述初始剂量给予持续连续四天,并

且所述第二剂量给予持续至少连续四天。

23. 如权利要求18-22中任一项所述的方法,其中所述第二剂量为150 μ g-200 μ g的所述肽。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述第二剂量为150 μ g的所述肽或200 μ g的所述肽。

25. 如权利要求18-24中任一项所述的方法,其中所述给予还包括在所述第二剂量之后给予第三剂量,其中所述第三剂量高于所述第二剂量。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述初始剂量给予持续3天至10天,并且所述第二剂量给予持续3天至10天。

27. 如权利要求25所述的方法,其中所述初始剂量给予持续3天至7天,并且所述第二剂量给予持续3天至7天。

28. 如权利要求25所述的方法,其中所述初始剂量给予持续连续四天,所述第二剂量给予持续连续四天,并且所述第三剂量给予持续至少连续四天。

29. 如权利要求25所述的方法,其中所述初始剂量给予持续连续四天,所述第二剂量给予持续连续七天,并且所述第三剂量给予持续至少连续四天。

30. 如权利要求25-29中任一项所述的方法,其中所述第三剂量为200 μ g-400 μ g的所述肽。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述第三剂量为200 μ g的所述肽,300 μ g的所述肽,或400 μ g的所述肽。

32. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中给予100 μ g的所述肽。

33. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中给予150 μ g的所述肽。

34. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中给予200 μ g的所述肽。

35. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中给予250 μ g的所述肽。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的方法,其中每天给予所述肽。

37. 如权利要求1-36中任一项所述的方法,其中所述肽每天给予一次。

38. 如权利要求1-37中任一项所述的方法,其中所述肽给予持续至少一周、持续至少两周、持续至少三周、或持续至少四周。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述肽通过注射给予。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述给予是皮下给予。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的方法,其中所述给予导致混合进餐测试后在浓度-时间曲线下的葡萄糖面积减少至少20%。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的方法,其中所述给予导致体重减轻至少1.0kg、至少1.3kg、或约1.3kg至约2.0kg。

43. 如权利要求2、9、10和15-42中任一项所述的方法,其中所述脂肪是肝脏脂肪。

44. 如权利要求1-43中任一项所述的方法,其中所述给予导致肝脏脂肪减少约三分之一。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的方法,其中所述给予降低血红蛋白A1c (HbA1c) 水平。

46. 如权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述给予降低果糖胺水平。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的方法,其中所述肽是通过固相合成以合成方式制

备的。

48. 如权利要求47所述的方法, 其中所述固相合成使用苄基甲基氧基羰基氯化物化学过程。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的方法, 其中 X_{30} 的羧基基团是未经修饰的G或R。

50. 如权利要求1-48中任一项所述的方法, 其中 X_{30} 的羰基基团被酰胺化。

51. 如权利要求1-50中任一项所述的方法, 其中所述肽在赖氨酸残基的N(ϵ)基团上包含棕榈酰部分。

52. 如权利要求51所述的方法, 其中所述棕榈酰基团经由接头连接到所述赖氨酸上。

53. 如权利要求52所述的方法, 其中所述接头是 γ 谷氨酸盐。

54. 如权利要求1-50中任一项所述的方法, 其中所述肽在赖氨酸残基的N(ϵ)基团上包含硬脂酰或硬脂酸部分。

55. 如权利要求51-54中任一项所述的方法, 其中所述赖氨酸残基是 X_{10} 。

56. 如权利要求1-55中任一项所述的方法, 其中所述肽以在cAMP测定1中小于10, 000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的EC₅₀结合到人类胰高血糖素受体上。

57. 如权利要求1-56中任一项所述的方法, 其中所述肽以在cAMP测定1中小于10, 000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的EC₅₀结合到人类GLP-1受体上。

58. 如权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中所述肽是GLP-1活性的激动剂、胰高血糖素活性的激动剂、或GLP-1活性和胰高血糖素活性二者的激动剂。

59. 如权利要求1-58中任一项所述的方法, 其中所述肽结合胰高血糖素受体和GLP-1受体两者, 其中相对于天然配体而言所述肽展现出在GLP-1受体上比在胰高血糖素受体上高至少约2倍、5倍或10倍的活性。

60. 如权利要求1-59中任一项所述的方法, 其中所述肽还包含异源部分。

61. 如权利要求60所述的方法, 其中所述异源部分是蛋白质、肽、蛋白质结构域、接头、有机聚合物、无机聚合物、聚乙二醇(PEG)、生物素、白蛋白、人血清白蛋白(HSA)、HSA FcRn结合部分、抗体、抗体的结构域、抗体片段、单链抗体、结构域抗体、白蛋白结合结构域、酶、配体、受体、结合肽、非FnIII支架、表位标签、重组多肽聚合物、细胞因子、脂质、或这些列举部分的两种或更多种的组合。

62. 如权利要求1-61中任一项所述的方法, 其中所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的体重指数(BMI)。

63. 如权利要求1-61中任一项所述的方法, 其中所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。

64. 如权利要求1-61中任一项所述的方法, 其中所述受试者具有至少40kg/m²的BMI。

65. 如权利要求5-12和16-64中任一项所述的方法, 其中所述受试者超重。

66. 如权利要求5-12和16-64中任一项所述的方法,其中所述受试者是肥胖的。
67. 如权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述肽的半衰期为约10小时至约12小时。
68. 如权利要求1-67中任一项所述的方法,其中所述给予是饮食和运动的辅助。
69. 一种降低体重的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含以下的氨基酸序列的肽
HX₂QGTFTSDX₁₀SX₁₂X₁₃LX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈AX₂₀X₂₁FX₂₃X₂₄WLX₂₇X₂₈GX₃₀;
其中X₂是G或S,X₁₀是Y或K,X₁₂是K、E、R或S,X₁₃是K或Y,X₁₅是D或E,X₁₆是S或G,X₁₇是E、R、Q或K,X₁₈是R、S或A,X₂₀是R、K或Q,X₂₁是D或E,X₂₃是V或I,X₂₄是A或Q,X₂₇是E或V,X₂₈是A或K,并且X₃₀是G或R (SEQ ID NO:4)。
70. 一种降低体脂肪的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
71. 一种治疗肥胖症的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
72. 一种治疗或预防由体重过重引起或表征的疾病或病症的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
73. 一种管理体重的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
74. 一种治疗非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
75. 一种增加脂质氧化的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
76. 一种减少进食的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
77. 一种降低血浆葡萄糖的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
78. 一种改善血糖控制的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
79. 一种实现血糖控制的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
80. 一种减轻体重并控制葡萄糖的方法,所述方法包括向对其有需要的人类受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
81. 如权利要求69-80中任一项所述的方法,其中所述受试者患有糖尿病。
82. 如权利要求81所述方法,其中所述糖尿病是2型糖尿病。
83. 一种治疗2型糖尿病的方法,所述方法包括向人类给予包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
84. 一种改善患有2型糖尿病的人类受试者中的血糖控制的方法,所述方法包括向所述受试者给予50 μ g-600 μ g的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。
85. 如权利要求83或84所述的方法,其中所述给予减轻体重。

86. 如权利要求83-85中任一项所述的方法,其中所述给予治疗肥胖症。
87. 如权利要求77-80中任一项所述的方法,其中所述给予降低体脂肪。
88. 如权利要求69-87中任一项所述的方法,其中 X_2 是G, X_{10} 是K, X_{12} 是E、R或S, X_{13} 是K, X_{17} 是E或K, X_{18} 是S, X_{20} 是R, X_{27} 是E,或者 X_{28} 是A。
89. 如权利要求69-88中任一项所述的方法,其中所述肽包含SEQ ID NO:19,基本上由SEQ ID NO:19组成,或由SEQ ID NO:19组成。
90. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中所述给予包括给予初始剂量持续3天至10天,和其后的第二较高剂量。
91. 如权利要求90所述的方法,其中所述初始剂量给予持续3天至7天。
92. 如权利要求90或91所述的方法,其中所述初始剂量是100 μ g的所述肽。
93. 如权利要求90-92中任一项所述的方法,其中所述第二剂量给予持续至少四天。
94. 如权利要求90-93中任一项所述的方法,其中所述初始剂量给予持续连续四天,并且所述第二剂量给予持续至少连续四天。
95. 如权利要求90-94中任一项所述的方法,其中所述第二剂量为150 μ g-200 μ g的所述肽。
96. 如权利要求95所述的方法,其中所述第二剂量为150 μ g的所述肽或200 μ g的所述肽。
97. 如权利要求90-96中任一项所述的方法,其中所述给予还包括在所述第二剂量之后给予第三剂量,其中所述第三剂量高于所述第二剂量。
98. 如权利要求97所述的方法,其中所述初始剂量给予持续3天至10天,并且所述第二剂量给予持续3天至10天。
99. 如权利要求97所述的方法,其中所述初始剂量给予持续3天至7天,并且所述第二剂量给予持续3天至7天。
100. 如权利要求97所述的方法,其中所述初始剂量给予持续连续四天,所述第二剂量给予持续连续四天,并且所述第三剂量给予持续至少连续四天。
101. 如权利要求97所述的方法,其中所述初始剂量给予持续连续四天,所述第二剂量给予持续连续七天,并且所述第三剂量给予持续至少连续四天。
102. 如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中所述第三剂量为200 μ g-400 μ g的所述肽。
103. 如权利要求102所述的方法,其中所述第三剂量为200 μ g的所述肽,300 μ g的所述肽,或400 μ g的所述肽。
104. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予100 μ g的初始剂量持续四天,给予150 μ g的第二剂量持续四天,并且随后每天给予200 μ g的第三剂量。
105. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予100 μ g的初始剂量持续五天,给予150 μ g的第二剂量持续五天,并且给予200 μ g的第三剂量持续五天,并且随后每天给予300 μ g的第四剂量。
106. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予100 μ g的初始剂量持续五天,给予200 μ g的第二剂量持续五天,并且随后每天给予300 μ g的第三剂量。
107. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予50 μ g的所述肽。
108. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予100 μ g的所述肽。

109. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予150 μ g的所述肽。
110. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予200 μ g的所述肽。
111. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予250 μ g的所述肽。
112. 如权利要求69-89中任一项所述的方法,其中给予300 μ g的所述肽。
113. 如权利要求69-112中任一项所述的方法,其中每天给予所述肽。
114. 如权利要求69-113中任一项所述的方法,其中所述肽每天给予一次。
115. 如权利要求69-114中任一项所述的方法,其中所述肽给予持续至少一周、持续至少两周、持续至少三周、或持续至少四周。
116. 如权利要求69-115中任一项所述的方法,其中所述肽通过注射给予。
117. 如权利要求116所述的方法,其中所述给予是皮下给予。
118. 如权利要求69-117中任一项所述的方法,其中所述给予导致混合进餐测试后在浓度-时间曲线下的葡萄糖面积减少至少20%。
119. 如权利要求69-76、81-83和85-117中任一项所述的方法,其中葡萄糖降低。
120. 如权利要求119所述的方法,其中所述葡萄糖是空腹血浆葡萄糖。
121. 如权利要求119所述的方法,其中所述葡萄糖是来自混合进餐测试的餐后葡萄糖。
122. 如权利要求69-121中任一项所述的方法,其中所述给予导致体重减轻至少1.0kg、至少1.3kg、或约1.3kg至约2.0kg。
123. 如权利要求69-121中任一项所述的方法,其中所述受试者的体重减少了至少3.5kg或至少5kg。
124. 如权利要求69-121中任一项所述的方法,其中所述受试者的体重减少了约2kg至约30kg。
125. 如权利要求69-124中任一项所述的方法,其中所述受试者的体重减少了至少2%、至少4%、至少5%或至少10%。
126. 如权利要求69-125中任一项所述的方法,其中所述受试者的体重减少了约2%至约20%、约2%至约25%、或约2%至约30%。
127. 如权利要求70、81、82和85-126中任一项所述的方法,其中所述脂肪是肝脏脂肪。
128. 如权利要求69-126中任一项所述的方法,其中所述受试者中的肝脏脂肪减少了至少20%。
129. 如权利要求69-126中任一项所述的方法,其中所述受试者中的肝脏脂肪减少了约20%至约40%。
130. 如权利要求69-126中任一项所述的方法,其中所述给予导致肝脏脂肪减少约三分之一。
131. 如权利要求69-130中任一项所述的方法,其中所述受试者的肝脏体积减小。
132. 如权利要求69-131中任一项所述的方法,其中所述受试者中的HbA1c水平降低。
133. 如权利要求132所述的方法,其中所述受试者中的HbA1c水平降低了至少0.6%。
134. 如权利要求132所述的方法,其中所述受试者中的HbA1c水平降低了至少0.9%。
135. 如权利要求132所述的方法,其中所述受试者中的HbA1c水平降低了约0.5%至约1.5%、约0.5%至约2%、或约0.5%至约3%。
136. 如权利要求132所述的方法,其中所述受试者中的HbA1c水平降低至6.3%或更低。

137. 如权利要求69-136中任一项所述的方法,其中所述给予降低了果糖胺水平。
139. 如权利要求69-137中任一项所述的方法,其中所述受试者的食欲下降。
140. 如权利要求69-139中任一项所述的方法,其中所述受试者的能量消耗增加。
141. 如权利要求69-140中任一项所述的方法,其中疾病进展停止。
142. 如权利要求69-140中任一项所述的方法,其中疾病进展被逆转。
143. 如权利要求69-142中任一项所述的方法,其中所述肽是通过固相合成以合成方式制备的。
144. 如权利要求143所述的方法,其中所述固相合成使用苄基甲基氧基羰基氯化物化学过程。
145. 如权利要求69-143中任一项所述的方法,其中X₃₀的羧基基团是未经修饰的G或R。
146. 如权利要求69-143中任一项所述的方法,其中X₃₀的羰基基团被酰胺化。
147. 如权利要求69-146中任一项所述的方法,其中所述肽在赖氨酸残基的N(ε)基团上包含棕榈酰部分。
148. 如权利要求147所述的方法,其中所述棕榈酰基团经由接头连接到所述赖氨酸上。
149. 如权利要求148所述的方法,其中所述接头是γ谷氨酸盐。
150. 如权利要求69-88或90-146中任一项所述的方法,其中所述肽在赖氨酸残基的N(ε)基团上包含硬脂酰或硬脂酸部分。
151. 如权利要求147-150中任一项所述的方法,其中所述赖氨酸残基是X₁₀。
152. 如权利要求69-151中任一项所述的方法,其中所述肽以在cAMP测定1中小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的EC₅₀结合到人类胰高血糖素受体上。
153. 如权利要求69-152中任一项所述的方法,其中所述肽以在cAMP测定1中小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的EC₅₀结合到人类GLP-1受体上。
154. 如权利要求69-153中任一项所述的方法,其中所述肽是GLP-1活性的激动剂、胰高血糖素活性的激动剂、或GLP-1活性和胰高血糖素活性二者的激动剂。
155. 如权利要求69-154中任一项所述的方法,其中所述肽结合胰高血糖素受体和GLP-1受体两者,其中相对于天然配体而言所述肽展现出在GLP-1受体上比在胰高血糖素受体上高至少约2倍、5倍或10倍的活性。
156. 如权利要求69-155中任一项所述的方法,其中所述肽还包含异源部分。
157. 如权利要求156所述的方法,其中所述异源部分是蛋白质、肽、蛋白质结构域、接头、有机聚合物、无机聚合物、聚乙二醇(PEG)、生物素、白蛋白、人血清白蛋白(HSA)、HSA FcRn结合部分、抗体、抗体的结构域、抗体片段、单链抗体、结构域抗体、白蛋白结合结构域、酶、配体、受体、结合肽、非FnIII支架、表位标签、重组多肽聚合物、细胞因子、脂质、或这些列举部分的两种或更多种的组合。

158. 如权利要求69-157中任一项所述的方法,其中所述受试者具有 $27\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的体重指数(BMI)。

159. 如权利要求69-157中任一项所述的方法,其中所述受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。

160. 如权利要求69-157中任一项所述的方法,其中所述受试者具有至少 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。

161. 如权利要求74-79、81-84和88-160中任一项所述的方法,其中所述受试者超重。

162. 如权利要求74-79、81-84和88-160中任一项所述的方法,其中所述受试者是肥胖的。

163. 如权利要求69、70、72-85和87-161中任一项所述的方法,其中所述受试者(i) 超重以及(ii) 患有高血压、2型糖尿病、血脂异常、心血管病史或其组合。

164. 如权利要求69、70、72-85和87-161中任一项所述的方法,其中所述受试者(i) 超重以及(ii) 患有血糖异常、高血压、血脂异常、阻塞性睡眠呼吸暂停或其组合。

165. 如权利要求1-164中任一项所述的方法,其中所述受试者正在接受胰岛素疗法。

166. 如权利要求165所述的方法,其中所给予的胰岛素量降低。

167. 如权利要求165所述的方法,其中胰岛素疗法停止。

168. 如权利要求69-167中任一项所述的方法,其中所述受试者正在接受胰岛素、二甲双胍、磺酰脲、钠-葡萄糖协同转运蛋白-2 (sglt-2) 抑制剂、二肽基肽酶-4 (DPP-IV) 抑制剂、欣促胰、 α 葡萄糖苷酶抑制剂或其组合。

169. 如权利要求69-168中任一项所述的方法,其中所述肽的半衰期为约10小时至约12小时。

170. 如权利要求69-169中任一项所述的方法,其中所述给予是饮食和运动的辅助。

171. 如权利要求1-170中任一项所述的方法,

其中所述肽包含SEQ ID NO:19,并且

其中所述肽以 $100\mu\text{g}$ 的初始剂量给予持续四天、以 $150\mu\text{g}$ 的第二剂量给予持续四天、并且随后以 $200\mu\text{g}$ 的剂量每日给予。

172. 如权利要求1-170中任一项所述的方法,

其中所述肽包含SEQ ID NO:19,并且

其中所述肽以 $100\mu\text{g}$ 的初始剂量给予持续五天、以 $200\mu\text{g}$ 的第二剂量给予持续五天、并且随后以 $300\mu\text{g}$ 的剂量每日给予。

173. 如权利要求1-170中任一项所述的方法,

其中所述肽包含SEQ ID NO:19,并且

其中所述肽以 $100\mu\text{g}$ 的初始剂量给予持续五天、以 $150\mu\text{g}$ 的第二剂量给予持续五天、以 $200\mu\text{g}$ 的第二剂量给予持续五天、并且随后以 $300\mu\text{g}$ 的剂量每日给予。

174. 如权利要求171-173中任一项所述的方法,其中所述受试者患有2型糖尿病。

175. 如权利要求171-173中任一项所述的方法,其中所述受试者是肥胖的。

176. 如权利要求171-173中任一项所述的方法,其中所述受试者(i) 超重以及(ii) 患有高血压、2型糖尿病、血脂异常、心血管病史或其组合。

177. 如权利要求171-173中任一项所述的方法,其中所述受试者(i) 超重以及(ii) 患有血糖异常、高血压、血脂异常、阻塞性睡眠呼吸暂停或其组合。

用于治疗肥胖症的胰高血糖素和GLP-1共激动剂

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2016年3月10日提交的美国临时专利申请号62/306,121的权益,将其通过引用以其全文结合在此。

对以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 与本申请一起提交的ASCII文本文件的以电子方式提交的序列表内容(名称:Sequencelisting_ST25.txt;大小:14,333字节;以及创建日期:2017年3月6日)通过引用以其全部内容结合在此。

发明背景

[0003] 肥胖症是全世界重大且日益增长的健康问题。它与许多危及生命的疾病相关,这些疾病如心血管疾病、肾脏病、高血压、中风、不育、呼吸功能障碍和2型糖尿病。

[0004] 胰高血糖素和胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 衍生自前胰高血糖素原,所述前胰高血糖素原为具有158个氨基酸的前体多肽,其在不同的组织中被加工形成许多种不同的胰高血糖素原衍生肽,包括胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2) 和胃泌酸调节素 (OXM),它们涉及许多种生理功能,包括葡萄糖稳态、胰岛素分泌、胃排空、和肠道生长,以及调节进食。胰高血糖素是具有相应于胰高血糖素原的氨基酸33到61(前胰高血糖素原的53到81)的29个氨基酸的肽,而GLP-1产生为具有相应于胰高血糖素原的氨基酸72到108(前胰高血糖素原的92到128)的37个氨基酸的肽。GLP-1 (7-36) 酰胺或GLP-1 (7-37) 酸是GLP-1的生物活性形式,其在GLP-1受体处显示出基本上等同的活性。

[0005] 胰高血糖素是通过胰脏产生的并且与胰高血糖素受体(“glucR”)相互作用。胰高血糖素在肝脏中起作用经由糖异生和糖原分解而升高血糖。当血糖开始下降时,胰高血糖素发信号给肝脏以便分解糖原和释放葡萄糖,从而引起血糖水平朝向正常水平上升。

[0006] GLP-1相比于胰高血糖素具有不同的生物活性。它从肠L细胞分泌并且结合到GLP-1受体上。它的活性包括刺激胰岛素合成和分泌、抑制胰高血糖素分泌、和抑制进食。

[0007] 胰高血糖素和GLP-1二者,充当它们各自的受体处的激动剂,已经显示出对减轻体重有效。正在销售或处于开发中的用于治疗肥胖症的某些GLP-1类似物包括,例如,利拉鲁肽(Liraglutide)(来自诺和诺德公司(Novo Nordisk)的VICTOZA®)和艾塞那肽(Exenatide)(来自礼来公司/艾米林生物制药公司(Eli Lilly/Amylin)的Byetta®)。胰高血糖素/GLP-1激动剂肽也已在WO 2014/091316中公开。

[0008] 虽然一些疗法可用于控制血糖,但目前没有一种疗法实现显著的体重减轻,这仍然是患者的显著未满足需求。50%患者在10年内从用于糖尿病控制的口服单药治疗(通常使用二甲双胍)进展到开始胰岛素治疗,通常在开始胰岛素治疗前进行多次口服联合治疗。胰岛素的使用加剧了体重增加,在开始胰岛素疗法后的第一年里,体重增加可达6kg。这种体重增加可导致胰岛素抗性增加,而这与高血压、血脂异常和主要的不良心血管事件的风险增加有关。关于降低胰岛素抗性,显著的体重减轻(>5%)是降低胰岛素抗性的最佳干预,尽管这目前只能通过集中的饮食和生活方式干预和/或减肥手术可靠地实现。仍然需要向人类给予GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的方法,所述方法使用在治疗糖尿病和肥胖症上具

有疗效但避免不良反应的剂量方案。

发明概述

[0009] 本文提供了预防和治疗患者的肥胖症和糖尿病以及相关病症的方法,所述方法包括给予GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。

[0010] 在一个例子中,降低体重的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含以下的氨基酸序列的肽:
HX₂QGTFTSDX₁₀SX₁₂X₁₃LX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈AX₂₀X₂₁FX₂₃X₂₄WLX₂₇X₂₈GX₃₀;

其中X₂是G或S,X₁₀是Y或K,X₁₂是K、E、R、或S,X₁₃是K或Y,X₁₅是D或E,X₁₆是S或G,X₁₇是E、R、Q、或K,X₁₈是R、S、或A,X₂₀是R、K、或Q,X₂₁是D或E,X₂₃是V或I,X₂₄是A或Q,X₂₇是E或V,X₂₈是A或K,并且X₃₀是G或R(SEQ ID NO:4)。

[0011] 在一个例子中,降低体脂肪的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0012] 在一个例子中,治疗肥胖症的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0013] 在一个例子中,治疗或预防由体重过重引起或表征的疾病或病症的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0014] 在一个例子中,管理体重的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0015] 在一个例子中,治疗非酒精性脂肪肝炎(NASH)的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0016] 在一个例子中,增加脂质氧化的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0017] 在一个例子中,降低进食的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0018] 在一个例子中,降低血浆葡萄糖的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0019] 在一个例子中,改善血糖控制的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0020] 在一个例子中,实现血糖控制的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0021] 在一个例子中,降低体重并控制葡萄糖的方法包括向对其有需要的人类受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0022] 在一个例子中,所述受试者患有糖尿病。在一个例子中,所述糖尿病是2型糖尿病。

[0023] 在一个例子中,治疗2型糖尿病的方法包括向人类给予包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0024] 在一个例子中,改善患有2型糖尿病的人类受试者中的血糖控制的方法包括向受试者给予50μg-600μg或100μg-600μg的包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的肽。

[0025] 在一个例子中,所述给予降低体重。在一个例子中,所述给予治疗肥胖症。在一个

例子中,所述给予降低体脂肪。

[0026] 在一个例子中,

X₂是G,X₁₀是K,X₁₂是E、R、或S,X₁₃是K,X₁₇是E或K,X₁₈是S,X₂₀是R,X₂₇是E,或X₂₈是A。

[0027] 在一个例子中,

X₂是G,X₁₀是K,X₁₂是E、R、或S,X₁₃是K,X₁₇是E或K,X₁₈是S,X₂₀是R,X₂₇是E,并且X₂₈是A。

[0028] 在一个例子中,所述肽包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,基本上其组成,或由其组成。

[0029] 在一个例子中,所述给予包括给予初始剂量,持续3至10天,和其后的第二较高剂量。

[0030] 在一个例子中,所述初始剂量给予持续3至7天。在一个例子中,所述初始剂量为100μg的肽。在一个例子中,所述第二剂量给予持续至少四天。在一个例子中,所述初始剂量给予持续连续四天,并且所述第二剂量给予持续至少连续四天。在一个例子中,所述第二剂量是150μg-200μg的所述肽。在一个例子中,所述第二剂量为150μg的所述肽或200μg的所述肽。

[0031] 在一个例子中,所述给予还包括在所述第二剂量之后给予第三剂量,其中所述第三剂量高于所述第二剂量。在一个例子中,所述初始剂量给予持续3至10天,并且所述第二剂量给予持续3至10天。在一个例子中,所述初始剂量给予持续3至7天,并且所述第二剂量给予持续3至7天。在一个例子中,所述初始剂量给予持续连续四天,所述第二剂量给予持续连续四天,并且所述第三剂量给予持续至少连续四天。在一个例子中,所述初始剂量给予持续连续四天,所述第二剂量给予持续连续七天,并且所述第三剂量给予持续至少连续四天。在一个例子中,所述第三剂量为200μg-400μg的所述肽。在一个例子中,所述第三剂量为200μg的所述肽,300μg的所述肽,或400μg的所述肽。

[0032] 在一个例子中,给予100μg的初始剂量持续四天,给予150μg的第二剂量持续四天,并且随后每天给予200μg的第三剂量。在一个例子中,给予100μg的初始剂量持续五天,给予150μg的第二剂量持续五天,并且给予200μg的第三剂量持续五天,并且随后每天给予300μg的第四剂量。在一个例子中,给予100μg的初始剂量持续五天,给予200μg的第二剂量持续五天,并且随后每天给予300μg的第三剂量。

[0033] 在一个例子中,给予50μg的所述肽。在一个例子中,给予100μg的所述肽。在一个例子中,给予150μg的所述肽。在一个例子中,给予200μg的所述肽。在一个例子中,给予250μg的所述肽。在一个例子中,给予300μg的所述肽。在一个例子中,给予400μg的所述肽。

[0034] 在一个例子中,每天给予所述肽。在一个例子中,每天给予所述肽一次。

[0035] 在一个例子中,所述肽给予持续至少一周、持续至少两周、持续至少三周、或持续至少四周。

[0036] 在一个例子中,通过注射给予所述肽。在一个例子中,所述给予是皮下给予。

[0037] 在一个例子中,所述给予导致混合进餐测试后在浓度-时间曲线下的葡萄糖面积减少至少20%。

[0038] 在一个例子中,降低葡萄糖。在一个例子中,所述葡萄糖是空腹血浆葡萄糖。在一个例子中,所述葡萄糖是来自混合进餐测试的餐后葡萄糖。

[0039] 在一个例子中,所述给予导致体重减轻至少1.0kg、至少1.3kg、或约1.3kg至约

2.0kg。在一个例子中,所述受试者的体重减少了至少3.5kg或至少5kg。在一个例子中,所述受试者的体重减少了至少2%、至少4%、至少5%或至少10%。在一个例子中,所述受试者的体重减少了约2%至约20%、约2%至约25%、或约2%至约30%。

[0040] 在一个例子中,所述脂肪是肝脏脂肪。在一个例子中,所述受试者中的肝脏脂肪减少了至少20%。在一个例子中,所述受试者中的肝脏脂肪减少了约20%至约40%。在一个例子中,所述给予导致肝脏脂肪减少约三分之一。在一个例子中,所述受试者中的肝脏体积减少。

[0041] 在一个例子中,所述给予降低血红蛋白A1c (HbA1c) 水平。在一个例子中,所述受试者中的HbA1c水平降低了至少0.6%。在一个例子中,所述受试者中的HbA1c水平降低了至少0.9%。在一个例子中,所述受试者中的HbA1c水平降低了约0.5%至约1.5%、约0.5%至约2%、或约0.5%至约3%。在一个例子中,所述受试者中的HbA1c水平降低至6.3%或更低。

[0042] 在一个例子中,所述给予降低果糖按水平。

[0043] 在一个例子中,所述受试者的食欲下降。

[0044] 在一个例子中,所述受试者的能量消耗增加。

[0045] 在一个例子中,疾病进展停止。在一个例子中,疾病进展被逆转。

[0046] 在一个例子中,所述肽是通过固相合成以合成方式制备的。在一个例子中,所述固相合成使用苄基甲基氨基羰基氯化物化学过程。

[0047] 在一个例子中,所述肽中的X₃₀的羧基基团是未经修饰的G或R。在一个例子中,所述肽中的X₃₀的羰基基团被酰胺化。

[0048] 在一个例子中,所述肽在赖氨酸残基的N(ε)基团上包含棕榈酰部分。在一个例子中,所述棕榈酰基团经由接头连接到所述赖氨酸上。在一个例子中,所述接头是γ谷氨酸盐。在一个例子中,所述肽在赖氨酸残基的N(ε)基团上包含硬脂酰或硬脂酸部分。在一个例子中,所述赖氨酸残基是X₁₀。

[0049] 在一个例子中,所述肽以在cAMP测定1中小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的EC₅₀结合到人类胰高血糖素受体上。

[0050] 在一个例子中,所述肽以在cAMP测定1中小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM、或小于2pM的EC₅₀结合到人类GLP-1受体上。

[0051] 在一个例子中,所述肽是GLP-1活性的激动剂、胰高血糖素活性的激动剂、或GLP-1活性和胰高血糖素活性这两者的激动剂。

[0052] 在一个例子中,所述肽结合胰高血糖素受体和GLP-1受体两者,其中相对于天然配体而言所述肽展现出在GLP-1受体上比在胰高血糖素受体上高至少约2倍、5倍或10倍的活性。

[0053] 在一个例子中,所述肽还包含异源部分。在一个例子中,所述异源部分是蛋白质、肽、蛋白质结构域、接头、有机聚合物、无机聚合物、聚乙二醇(PEG)、生物素、白蛋白、人血清白蛋白(HSA)、HSA FcRn结合部分、抗体、抗体的结构域、抗体片段、单链抗体、结构域抗体、

白蛋白结合结构域、酶、配体、受体、结合肽、非FnIII支架、表位标签、重组多肽聚合物、细胞因子、脂质、或这些列举部分的两种或更多种的组合。

[0054] 在一个例子中,所述受试者具有 $27\text{kg}/\text{m}^2$ 至 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的体重指数(BMI)。在一个例子中,所述受试者具有 $30\text{kg}/\text{m}^2$ - $39.9\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。在一个例子中,所述受试者具有至少 $40\text{kg}/\text{m}^2$ 的BMI。

[0055] 在一个例子中,所述受试者超重。在一个例子中,所述受试者是肥胖的。在一个例子中,所述受试者(i)超重以及(ii)患有高血压、2型糖尿病、血脂异常、心血管疾病史或其组合。在一个例子中,所述受试者(i)超重以及(ii)患有血糖异常、高血压、血脂异常、阻塞性睡眠呼吸暂停或其组合。

[0056] 在一个例子中,所述受试者正接受胰岛素疗法。在一个例子中,减少给予的胰岛素量。在一个例子中,停止所述胰岛素疗法。

[0057] 在一个例子中,所述受试者正在接受胰岛素、二甲双胍、磺酰脲、钠-葡萄糖协同转运蛋白-2(sgl t-2)抑制剂、二肽基肽酶-4(DPP-IV)抑制剂、欣促胰(glutazone)、 α 葡萄糖苷酶抑制剂或其组合。

[0058] 在一个例子中,所述肽的半衰期为约10至约12小时。

[0059] 在一个例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。

[0060] 在一个例子中,所述肽包含SEQ ID NO:19,并且所述肽以 $100\mu\text{g}$ 的初始剂量给予四天、以 $150\mu\text{g}$ 的第二剂量给予五天、并且随后以 $200\mu\text{g}$ 的剂量每日给予。

[0061] 在一个例子中,所述肽包含SEQ ID NO:19,并且所述肽以 $100\mu\text{g}$ 的初始剂量给予五天、以 $200\mu\text{g}$ 的第二剂量给予五天、并且随后以 $300\mu\text{g}$ 的剂量每日给予。

[0062] 在一个例子中,所述肽包含SEQ ID NO:19,并且所述肽以 $100\mu\text{g}$ 的初始剂量给予五天、以 $150\mu\text{g}$ 的第二剂量给予五天、以 $200\mu\text{g}$ 的第二剂量给予五天、并且随后以 $300\mu\text{g}$ 的剂量每日给予。

[0063] 在一个例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在一个例子中,所述受试者是肥胖的。在一个例子中,所述受试者(i)超重以及(ii)患有高血压、2型糖尿病、血脂异常、心血管疾病史或其组合。在一个例子中,所述受试者(i)超重以及(ii)患有血糖异常、高血压、血脂异常、阻塞性睡眠呼吸暂停或其组合。

附图说明

[0064] 图1显示了在DIO小鼠中在以三个不同的剂量给予胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽G730之后从第0天开始体重变化的平均百分比,与载体治疗以及利拉鲁肽治疗进行比较。在不同组中的初始体重分别为:载体组: $47.4\pm 3.7\text{g}$;G730 $10\text{nmol}/\text{kg}$ 组: $44.5\pm 2.2\text{g}$;G730 $20\text{nmol}/\text{kg}$ 组: $45.9\pm 3.6\text{g}$ 和G730 $50\text{nmol}/\text{kg}$ 组: $46.1\pm 2.4\text{g}$ 。

[0065] 图2显示了在DIO小鼠中在以三个不同的剂量给予胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽G797之后从第0天开始体重变化的平均百分比,与载体治疗以及利拉鲁肽治疗进行比较。在不同组中的初始体重分别为:载体组: $47.4\pm 3.7\text{g}$;G797 $5\text{nmol}/\text{kg}$ 组: $47.5\pm 1.2\text{g}$;G797 $20\text{nmol}/\text{kg}$ 组: $47.4\pm 2.2\text{g}$ 和G797 $50\text{nmol}/\text{kg}$ 组: $47.2\pm 1.8\text{g}$ 。

[0066] 图3显示了在DIO小鼠中在以 $20\text{nmol}/\text{kg}$ 的剂量给予胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽G812之后从第0天开始体重变化的平均百分比,与载体治疗以及利拉鲁肽治疗进行比较。在

不同组中的初始体重分别为：载体组： $47.4 \pm 3.7\text{g}$ 和G812 20nmol/kg 组： $49.2 \pm 3.4\text{g}$ 。

[0067] 图4是比较针对呈现于图1、2和3中的三种胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽的体重结果的变化的曲线图。

[0068] 图5显示了在DIO小鼠中在以两个不同的剂量给予胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽G796之后从第0天开始体重变化的平均百分比，与载体治疗以及利拉鲁肽治疗进行比较。

[0069] 图6显示了在DIO小鼠中在以两个不同的剂量给予胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽G865之后从第0天开始体重变化的平均百分比，与载体治疗以及利拉鲁肽治疗进行比较。

[0070] 图7显示了在DIO小鼠中在以两个不同的剂量给予胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽G933之后从第0天开始体重变化的平均百分比，与载体治疗以及利拉鲁肽治疗进行比较。

[0071] 图8是比较针对呈现于图5、6和7中的三种胰高血糖素/GLP-1共激动剂肽的体重结果的变化的曲线图。

[0072] 图9提供了计划的和实际的G933单次递增剂量研究的流程图。

[0073] 图10提供了G933单次递增剂量研究的受试者处置。

[0074] 图11显示G933单次递增剂量研究中受试者的中值葡萄糖水平。

[0075] 图12显示G933单次递增剂量研究中受试者的中值胰岛素水平。

[0076] 图13提供了G933多次递增剂量研究中的群组1-4的流程图。MEDI0382是指具有SEQ ID NO:19序列的30个氨基酸线性肽。

[0077] 图14显示以下受试者中的平均混合进餐测试葡萄糖水平，在第7天(组群1)用安慰剂或 $100\mu\text{g}$ G933治疗、在第11天用安慰剂或 $150\mu\text{g}$ G933(组群2)治疗、和在第15天用安慰剂或 $200\mu\text{g}$ G933治疗(组群3)。

[0078] 图15显示以下受试者中的基线空腹葡萄糖水平变化，在第7天(组群1)用安慰剂或G933治疗、在第9天用安慰剂或G933(组群3)治疗、和在第15天用安慰剂或G933治疗(组群3)。

[0079] 图16显示分别在组群1和3的研究过程中以及组群1和3中的第7天和第15天相较于基线重量的重量变化。

[0080] 图17显示重复给药后MEDI0382的血浆浓度。

[0081] 图18显示了用G933治疗的患者中如通过葡萄糖水平测量的葡萄糖控制的改善。虚线表示在基线(第1天)观察到的葡萄糖水平，并且实线表示在第41天观察到的葡萄糖水平。

[0082] 图19显示了用G933治疗的患者中如通过HbA1c测量的葡萄糖控制的改善。

[0083] 图20显示用G933治疗的患者的绝对重量减轻。(G933在该图中被称为“MEDI”或“0382”；“Plac”指安慰剂。)

[0084] 图21显示用G933治疗的患者的百分比重量减轻。(“MEDI”在本图中是指“MEDI0382”。)

[0085] 图22显示用G933治疗的患者的肝脏脂肪减少的评估。提供来自个体受试者的代表性图像。

[0086] 图23显示用G933治疗的患者中发生的恶心和呕吐。

[0087] 图24提供了G933多次递增剂量研究中的群组5和6的流程图。

[0088] 图25显示了与安慰剂相比用G933治疗的组群5患者中如通过葡萄糖水平测量的葡萄糖控制的改善。虚线表示在基线(第1天)观察到的葡萄糖水平，并且实线表示在第17天观

察到的葡萄糖水平。(G933在此图中称为“MEDI”。)

[0089] 图26显示了与安慰剂相比用G933治疗的组群6患者中如通过葡萄糖水平测量的葡萄糖控制的改善。虚线表示在基线(第1天)观察到的葡萄糖水平,并且实线表示在第17天观察到的葡萄糖水平。(G933在此图中称为“MEDI”。)

[0090] 图27显示了所有组群中从基线葡萄糖AUC的百分比变化。

[0091] 图28显示了组群5和6中空腹葡萄糖水平的改善。(G933在此图中称为“MEDI”。)

[0092] 图29显示了组群5和6中从基线的重量变化。(G933在此图中称为“MEDI”。)

[0093] 图30显示了所有组群中的体重减轻和葡萄糖变化。

[0094] 图31显示第16天和第22天的群组5中以及第11天和第17天的群组6中的G933血浆浓度。

详细说明

定义

[0095] 贯穿本披露,术语“一个/种(a或an)”实体是指一个/种或多个/种该实体;例如,“多核苷酸”应理解为代表一种或多种多核苷酸。因此,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个(一种或多种)”、以及“至少一个(至少一种)”在此可以互换地使用。

[0096] 此外,在本文使用的“和/或”应当理解为在有或没有另一者的情况下,两个指定的特征或组分中的每一者的特定披露。因此,术语“和/或”如本文的短语诸如“A和/或B”中使用,旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、以及“B”(单独)。同样,术语“和/或”如在词组如“A、B和/或C”中使用是旨在涵盖以下方面中的每一者:A、B、和C;A、B、或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0097] 应当理解,当用语言“包含”来说明方面时,还提供了关于“由.....组成”和/或“主要由.....组成”描述的其他类似方面。“包含”特定氨基酸序列的肽是指含有氨基酸序列的肽,其中所述肽可以包含或不包含另外的氨基酸或其他对氨基酸序列的修饰。由特定氨基酸序列“组成”的肽是指仅含有氨基酸序列且不含另外的氨基酸或其他对氨基酸序列的修饰的肽。“包含”由特定氨基酸序列“组成”的氨基酸序列的肽是指含有氨基酸序列且不含另外的氨基酸的肽;然而,肽可包含其他对氨基酸序列的修饰(例如,酰基部分或棕榈酰部分)。

[0098] 除非另外定义,在此所使用的所有技术和科学术语具有与本披露涉及的领域所属的技术人员通常所理解的相同的意义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology[生物医学与分子生物学简明词典],Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC出版社;The Dictionary of Cell and Molecular Biology[细胞与分子生物学词典]第3版,1999,学术出版社(Academic Press);以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology[生物化学和分子生物学牛津词典],修订版,2000,牛津大学出版社(Oxford University Press)为技术人员提供在本披露中使用的许多术语的通用词典注释。

[0099] 单位、前缀和符号均以它们的国际单位系统(SI)接受形式表示。数值范围包括定义该范围的数字。除非另外指明,否则氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。在此提供的小标题不是本披露的不同方面的限制,可以通过作为一个整体参考本说明书来获得这些方面。因此,通过以其全文参考说明书,更完全地定义了就在以下定义的术语。

[0100] 如在此使用的,术语“多肽”旨在涵盖单数“多肽”以及复数“多肽”,并且包含两个或更多个氨基酸的任何链或多个链。因此,如在此使用的,“肽”、“肽亚单位”、“蛋白质”、“氨基酸链”、“氨基酸序列”、或用来指代两个或更多个氨基酸的链或多个链的任何其他术语,都被包括定义“多肽”中,尽管这些术语的每一者都可具有更具体的含义。术语“多肽”可以用来替代任何这些术语或者与其可互换地使用。该术语进一步包括已经历翻译后或合成后修饰的多肽,这些修饰例如,糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团进行的衍生、蛋白水解裂解或通过非天然存在的氨基酸进行的修饰。

[0101] 更具体地说,如在此使用的术语“肽”涵盖全长肽以及其片段、变体或衍生物,例如,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,在长度上为29、30或31个氨基酸)。如本文公开的“肽”,例如,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽,可以是包含用来增加半衰期的另外的成分(例如像Fc结构域或白蛋白结构域)的融合多肽的一部分。如在此描述的肽还可以许多不同的途径衍生。

[0102] 术语“分离的”是指肽或核酸通常根据本披露的状态。分离的肽和分离的核酸不含或基本上不含在天然状态下与其相关联的材料,例如在其天然环境下,或在此制备是通过在体外或在体内实施的重组DNA技术时在其制备环境(例如细胞培养物)中与其一起存在的其他肽或核酸。肽和核酸可以用稀释剂或佐剂配制,并且仍然为了实用目的可以被分离-例如如果该肽用于包被微量滴定板用于免疫测定,则该蛋白质通常与明胶或其他载体混合,或者当用于诊断或治疗时将与药学上可接受的载体或稀释剂混合。

[0103] “重组”肽是指经由重组DNA技术产生的肽。如同已经通过任何合适的技术分离、分级或部分纯化或基本上纯化的天然或重组多肽一样,出于本披露的目的,在宿主细胞中表达的重组产生的肽也被视为分离的。

[0104] 当提及GLP-1/胰高血糖素激动剂肽时,术语“片段”、“类似物”、“衍生物”或“变体”包括保留至少某种期望的活性(例如,结合到胰高血糖素和/或GLP-1受体上)的任何肽。本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的片段包括在表达、纯化、和或给予受试者的过程中展现出所希望的特性的蛋白水解片段、缺失片段。

[0105] 如在此使用的,术语“变体”指的是由于氨基酸取代、缺失、插入、和/或修饰而不同于所列举肽的肽。变体可以使用本领域已知的诱变技术来产生。变体还可以,或可替代地,含有其他修饰-例如肽可以是缀合或偶联的,例如融合到异源氨基酸序列或其他部分上,例如用于增加半衰期、溶解度、或稳定性。缀合或偶联到在此提供的肽上的部分的实例包括,但不限于,白蛋白、免疫球蛋白Fc区、聚乙二醇(PEG)等等。该肽还可以与便于该肽的合成、纯化或鉴定或增强该多肽结合到固相支持物上的接头或其他序列(例如,6-His)缀合或产生偶联。

[0106] 如在此使用的,术语“序列一致性”指的是在两个或更多个多核苷酸序列之间或在两个或更多个多肽序列之间的关系。当一个序列中的位置被与比较序列的相应位置中的相同核酸碱基或氨基酸占据时,该序列被说成是与那个位置“一致”。“序列一致性”的百分比是通过确定在这两个序列中存在的一致核酸碱基或氨基酸的位置的数目进行计算的,从而产生“一致”位置的数目。然后将“一致”位置的数目除以在比较窗口中的位置的总数并且乘以100而产生“序列一致性”的百分比。通过将两个最佳比对序列在比较窗口上进行比较来确定“序列一致性”的百分比。为了对用于比较的序列进行最优化的比对,多核苷酸或多肽

序列的在比较窗口中的部分可包含被称为空位的添加或缺失,而参照序列保持不变。最佳比对是,即使存在空位,也可在参照序列与比较序列之间生成最大可能数量的“一致的”位置的比对。可以使用国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)截止到2004年9月1日提供的程序“BLAST2序列”的版本来确定在两个序列之间的“序列一致性”百分比,该程序可与程序BLASTN(用于核苷酸序列比较)以及BLASTP(用于多肽序列比较)结合使用,这些程序基于Karlin和Altschul的算法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90(12):5873-5877,1993)。当利用“BLAST 2序列”时,对于下述参数使用截止到2004年9月1日的默认参数:字长(3)、开放空位罚分(11)、扩展空位罚分(1)、空位急速下降(50)、期望值(10)以及任何其他需要的包括但不限于基质选项的参数。

[0107] 术语“组合物”或“药物组合物”指的是含有在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽连同例如药学上可接受的、用于向需要治疗的受试者(例如,针对肥胖症正在进行治疗的人类受试者)给药的载体、赋形剂、或稀释剂的组合物。

[0108] 术语“药学上可接受的”是指这样的组合物,它们在合理的医学判断范围内适合于与人以及动物的组织接触而没有过度的毒性或与合理的利益/风险比相当的其他并发症。

[0109] “有效量”是本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的量,其以单剂量或作为一系列剂量的一部分向受试者给药对于治疗(例如治疗肥胖症)是有效的。例如,当它的给药导致体重减轻或体重维持(例如,预防体重增加)、减少体脂肪、预防或调节低血糖症、预防或调节高血糖症、促进胰岛素合成、或减少进食中的一者或多者时,这个量是有效的。这个量可以是对于所有被治疗的受试者而言的固定剂量,或者可以取决于被治疗的受试者的重量、健康、和身体状况、所希望的体重减轻或体重维持的程度、肽的配制、医疗状况的专业评估、以及其他相关因素而改变。

[0110] 术语“受试者”意指任何受试者,尤其是需要用在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽进行治疗的哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括,但不限于,人、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、熊、母牛、猿类、猴子、猩猩和黑猩猩等等。在一个实施例中,该受试者是人类受试者。

[0111] 如本文使用的,“需要治疗的受试者”指的是其希望治疗的个体,例如,肥胖受试者或希望促进体重或体脂肪减少、体重或体脂肪维持、或在规定时间段预防体重增加或将其降低到最低限度的有肥胖症倾向的受试者。

[0112] 术语例如“治疗(treating或treatment或to treat)”是指治愈和/或停止已诊断的病理病症或障碍的进展的治疗性措施。术语如“预防”是指预防和/或减缓靶标病理病症或障碍发展的防御性或预防性措施。因此,需要治疗的那些包括已患有疾病或病症的那些。需要预防的那些包括容易患上疾病或病症的那些以及有待预防疾病或病症的那些。例如,短语“治疗患有由体重过重引起或表征的疾病或病症的患者”是指将疾病或病症的严重程度降低到受试者不再遭受由此引起的不适和/或功能改变的程度。短语“预防”由体重过重引起或表征的疾病或病症是指降低疾病或病症的可能性和/或减少疾病或病症的发生率(例如与未经治疗患者相比发生率相对减少)。

[0113] 术语,例如“降低严重程度”是指减慢或减轻经诊断的病理病症或障碍的症状的治疗措施。例如,“降低由体重过重引起或表征的疾病或病症的严重程度”是指降低疾病或病

症的严重程度(例如,与未经治疗的患者相比体重减轻或葡萄糖控制增加)。

[0114] 如在此使用的“GLP-1/胰高血糖素激动剂肽”是嵌合肽,在测定1的条件下,其展现出相对于天然胰高血糖素的至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更高的在胰高血糖素受体上的活性,并且还展现出相对于天然GLP-1的至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更高的在GLP-1受体上的活性。

[0115] 如在此使用的术语“天然胰高血糖素”指的是天然存在的胰高血糖素,例如,人胰高血糖素,其包含SEQ ID NO:1的序列。术语“天然GLP-1”指的是天然存在的GLP-1,例如,人GLP-1,并且是涵盖例如,GLP-1 (7-36) 酰胺 (SEQ ID NO:2)、GLP-1 (7-37) 酸 (SEQ ID NO:3) 或者这两种化合物的混合物的通用术语。如在此使用的,在没有任何进一步指定的情况下,对“胰高血糖素”或“GLP-1”的一般参考旨在分别表示天然的人胰高血糖素或天然的人GLP-1。除非另外指出,“胰高血糖素”指的是人胰高血糖素,并且“GLP-1”指的是人GLP-1。

GLP-1/胰高血糖素激动剂肽

[0116] 在此提供了结合到胰高血糖素受体上且结合到GLP-1受体上的肽。示例性肽在WO 2014/091316中提供,所述文献通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,所述肽是MEDI0382,即具有SEQ ID NO:19序列的含有30个氨基酸的线性肽,其在残基10处含有 γ 谷氨酸盐接头和棕榈酰基团衍生化。在某些实施例中,在此提供的肽是胰高血糖素和GLP-1活性的共激动剂。这样的肽在此称为GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。GLP-1/胰高血糖素激动剂肽在此提供为具有有利比率的GLP-1和胰高血糖素活性,以便促进体重减轻、预防体重增加、或者维持所希望的体重,并且具有优化的溶解度、可配制性、和稳定性。在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽在此被提供为对人GLP1和人胰高血糖素受体具有活性,在某些实施例中相比于天然配体,对GLP-1受体的相对活性比对胰高血糖素受体至少约高1倍、2倍、5倍、8倍、10倍、15倍、20倍或25倍。

[0117] 在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为对胰高血糖素和GLP-1受体具有所希望的效价,并且具有所希望的促进体重减轻的相对效价。在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为在cAMP测定1(参见实例2)中展现出对GLP-1受体小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的以EC₅₀表示的体外效价。在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为在4.4%人血清白蛋白中的cAMP测定(测定2,参见实例2)中展现出对GLP-1受体小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的以EC₅₀表示的体外效价。在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为在4.4%人血清白蛋白中的cAMP

测定(测定2,参见实例2)中展现出对胰高血糖素受体小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为当使用测定2时, 当与天然配体比较时具有在约0.01到0.50范围, 例如, 从约0.02到0.30, 例如, 约0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28或0.30的相对GLP1-R/gIucR效价比。

[0118] 在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为在cAMP测定1(参见实例2)中展现出对葡萄糖依赖性促胰岛素肽(抑胃肽)(GIPR)小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的以EC50表示的体外效价。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为在4.4%人血清白蛋白中的cAMP测定(测定2,参见实例2)中展现出对GIPR小于10,000pM、小于5000pM、小于2500pM、小于1000pM、小于900pM、小于800pM、小于700pM、小于600pM、小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于100pM、小于50pM、小于25pM、小于20pM、小于15pM、小于10pM、小于5pM、小于4pM、小于3pM或小于2pM的以EC50表示的体外效价。

[0119] 在某些实施例中, 在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽具有可接受的溶解度、可易于配制、血浆稳定性、和改进的药代动力学特征中的一个或多个标准。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为可溶于在宽pH范围的标准缓冲液中。

[0120] 在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽可以高达0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml或更高的浓度溶于通用缓冲溶液中, 溶于缓冲系和例如从0.25到150mM的一系列离子强度中, 包括但不限于, 磷酸盐缓冲液、Tris缓冲液、谷氨酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、或组氨酸缓冲液。示例性的缓冲液包括100mM谷氨酸盐pH 4.5缓冲液、100mM乙酸盐pH 5缓冲液、100mM琥珀酸盐pH 5缓冲液、100mM磷酸盐pH 6缓冲液、100mM组氨酸pH 6缓冲液、100mM磷酸盐pH 6.5缓冲液、100mM磷酸盐pH 7.0缓冲液、100mM组氨酸pH 7.0缓冲液、100mM磷酸盐pH 7.5缓冲液、100mM Tris pH 7.5缓冲液和100mM Tris pH 8.0缓冲液。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为能以0.8mg/ml溶于跨一系列pH范围, 例如, 从pH 4.0到pH 8.0, 例如, 在pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0或8.5的标准缓冲液中。在某些实施例中, 所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽可溶于标准缓冲液中, 所述缓冲液的pH为从4.5至8.0、5.0至8.0、5.5至8.0、6.0至8.0、6.5至8.0、7.0至8.0、4.5至8.5、5.5至8.5、5.5至8.5、6.0至8.5、6.5至8.5或7.0至8.5。

[0121] 在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为可在标准药物配制品中配制。示例性配制品包括, 但不限于: 0.1M Tris pH 7.5, 150mM甘露醇, 最终配制品pH=7.2; 0.05M Tris, 50mM精氨酸/精氨酸, 最终配制品pH=8.0; 或磷酸钠缓冲液(pH8)/1.85%W/V丙二醇, 最终配制品pH=7.0。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为以高

达0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml或更高的浓度可溶于这些或其他配制品中。

[0122] 在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为针对在血清或血浆中的蛋白酶是可接受地稳定的。胰高血糖素或GLP-1的常见降解产物包括+1产物(酸)和DPP IV-裂解产物。具有+1质量的产物可由在谷氨酰胺的酰胺基团或在C末端的脱酰胺作用而产生。裂解产物由血浆中的蛋白酶DPP IV的作用而产生。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被披露为在37℃在血浆中24小时之后以高达30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的水平在血浆中保持稳定。

[0123] 在此披露了包含以下氨基酸序列的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽:

HX2QGTFSTDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30;

其中X2是G或S, X10是Y或K, X12是K、E、R、或S, X13是K或Y, X15是D或E, X16是S或G, X17是E、R、Q、或K, X18是R、S、或A, X20是R、K、或Q, X21是D或E, X23是V或I, X24是A或Q, X27是E或V, X28是A或K, 并且X30是G或R (SEQ ID NO:4)。在某些实施例中, 提供了上文所示分离的肽 (SEQ ID NO:4), 其中X2是G, X10是K, X12是E、R、或S, X13是K, X17是E或K, X18是S, X20是R, X27是E, 和/或X28是A。在某些实施例中, 提供了上文所示分离的肽 (SEQ ID NO:4), 其中X10是K, X12是E, X17是E, X20是R, X27是E, 和/或X28是A。

[0124] 在某些实施例中提供了以上所示的分离肽, 其中X2是S, X10是Y或K, X12是K、E、R、或S, X13是K或Y, X15是D, X16是S, X17是E、R、Q、或K, X18是R、S、或A, X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E或V, X28是A, 并且X30是G (SEQ ID NO:5)。在某些实施例中提供了以上所示的分离肽, 其中X2是S, X10是Y或K, X12是K、E、R、或S, X13是K或Y, X15是D, X16是S, 如果X17是E并且X18是R, 或如果X17是R并且X18是S, 则X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E或V, X28是A, 并且X30是G (分别为SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7)。在某些实施例中提供了以上所示的分离肽, 其中X2是S, X10是Y, X12是K, X13是K, X15是D, X16是S, 如果X17是E并且X18是R, 或如果X17是R并且X18是S, 则X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是V, X28是A, 并且X30是G (分别为SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9)。在某些实施例中提供了以上所示的分离肽, 其中X2是S, X10是K, X12是K、E、R、或S, X13是Y, X15是D, X16是S, 如果X17是E并且X18是R, 并且如果X17是R并且X18是S, 则X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11)。在某些实施例中提供了以上所示的分离肽, 其中X2是S, X10是K, X12是E, X13是Y, X15是D, X16是S, 如果X17是E并且X18是R, 或者如果X17是R并且X18是S, 则X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (分别为SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13)。在某些实施例中提供了以上所示的分离肽, 其中X2是S, X10是K, X12是R, X13是Y, X15是D, X16是S, 如果X17是E并且X18是R, 或者如果X17是R并且X18是S, 则X20是R, X21是D, X23是V, X24是A, X27是E, X28是A, 并且X30是G (分别为SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15)。

[0125] 在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽包括, 但不限于G730 (SEQ ID NO:16)、G797 (SEQ ID NO:17)、G849 (SEQ ID NO:18)、G933 (SEQ ID NO:19)、G865 (SEQ ID NO:20)、G796 (SEQ ID NO:21)、G812 (SEQ ID NO:22) 和G380 (SEQ ID NO:23)。这些GLP-1/胰高血糖素激动剂肽列在表1中:

表1:GLP-1/胰高血糖素肽序列

肽	序列	SEQ ID NO:
G730	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG- 酰胺 X13 = K (gE-棕榈酰化)	16
G797	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG- 酰胺 X10 = K (gE-棕榈酰化)	17
G849	HSQGT FTSDX SRYLD SRSAR DFVAW LEAGG- 酰胺 X10 = K (gE-棕榈酰化)	18
G933	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG- 酸 X10 = K (gE-棕榈酰化)	19
G865	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG- 酰胺 X10 = K (gE-棕榈酰化)	20
G796	HSQGT FTSDX SSYLD SRRAR DFVAW LEAGG- 酰胺 X10 = K (gE-棕榈酰化)	21
G812	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFIAW LEKGR- 酰胺 X10 = K (gE-棕榈酰化)	22
G380	HGQGT FTSDY SKYLD SXRAQ DFVQW LVAGG- 酰胺 X17 = K (gE-棕榈酰化)	23
G931	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG- 酸 X13 = K (gE-棕榈酰化)	24
G934	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFIAW LEKGR- 酸 X10 = K (gE-棕榈酰化)	25
G973	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG- 酸 X10 = K (gE-棕榈酰化)	26
GLP1	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGR	SEQ ID NO: 2 (7-36 酰胺) /SEQ ID NO: 3 (7-37 酸)
胰高 血糖 素	HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LMNT	SEQ ID NO: 1

K (gE-棕榈酰化) = 具有通过 γ 谷氨酸接头缀合到 ϵ 氮上的棕榈酰基团的赖氨酸。

[0126] 在某些实施例中,分离的肽是G933 (SEQ ID NO:19)。

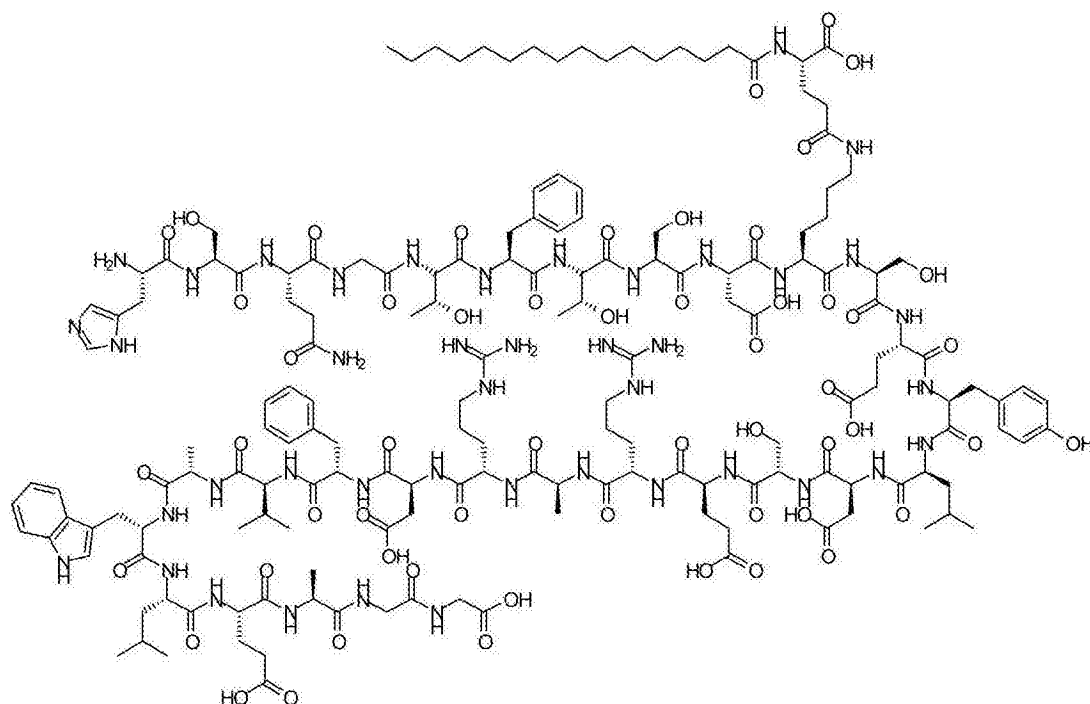
[0127] 肽G797和G933两者都具有在位置12的谷氨酸残基,并且对胰高血糖素受体和GLP-1受体两者都保持稳健的活性,如在实例2中所示。该相应的残基在毒蜥外泌肽(exendin-4)和胰高血糖素中是赖氨酸,而在GLP-1中是丝氨酸。虽然这个残基被认为不与该受体接触,但是在电荷上从正到负的变化可改变邻近的环境。此外,G797、G849和G933具有在位置27处的谷氨酸残基。在毒蜥外泌肽4中的残基27是赖氨酸并且在GLP1(缬氨酸)和胰高血糖素(甲硫氨酸)中是不带电的疏水残基。艾塞那肽的赖氨酸与GLP1受体在残基Glu127和Glu24处发生静电相互作用(C.R.Underwood等人,J Biol Chem[生物化学杂志]285 723-730 (2010); S.Runge等人,J Biol Chem[生物化学杂志]283 11340-11347 (2008))。虽然当在位置27处的电荷被改变为负的时候可预期到GLP1R效价的损失,但是这种改变与G797、G849、和G933中的GLP1R活性相容。

[0128] MEDI0382是胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 和胰高血糖素受体的合成肽双重激动剂。MEDI0382是G933 (SEQ ID NO:19), 其在残基10处含有 γ 谷氨酸盐接头和棕榈酰基团衍生化。

[0129] MEDI0382是化学合成的。使用制造商提供的用于偶联Fmoc-氨基酸的方案,借助于固相肽合成仪进行树脂上的肽链延伸。谷氨酰胺残基20和24被不易脱酰胺的氨基酸取代,并且精氨酸残基17被谷氨酸盐置换以降低对蛋白水解的易感性。

[0130] MEDI0382的序列如下所示:

[0131] L-组氨酸基-L-丝氨酸基-L-谷氨酰胺基甘氨酸基-L-苏氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-苏氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -天门冬氨酸基-(N6-[N-(1-氧代十六烷基)-L- γ -谷氨酰胺基])L-赖氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-酪氨酸基-L-亮氨酸基-L- α -天门冬氨酸基-L-丝氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-精氨酸基-L-丙氨酸基-L-精氨酸基-L- α -L-天门冬氨酸基-L-苯丙氨酸基-L-缬氨酸基-L-丙氨酸基-L-色氨酸基-L-亮氨酸基-L- α -谷氨酸基-L-丙氨酸基甘氨酸基甘氨酸



标记GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的方法

[0132] 本披露提供了制造GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的方法。可通过任何适合的方法制造在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。例如,在某些实施例中,通过本领域普通技术人员熟知的方法,例如通过如Merrifield描述的固相合成(1963, J. Am. Chem. Soc. [美国化学学会杂志] 85: 2149-2154), 化学合成在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。可以例如,通过使用自动合成仪,使用标准试剂完成固相肽合成,如在实例1中解释的。

[0133] 可替代地,可以使用如本领域普通技术人员熟知的合宜的载体/宿主细胞组合以重组方式产生在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。用于以重组方式产生GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的许多种方法是可得的。通常,将编码GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的多核苷酸序列插入适当的表达载体,例如,含有用于该插入的编码序列的转录和翻译的必需元件的载体。将编码GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的核酸插入载体的正确阅读框中。然后将该表达载体转染到适合的表达该GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的宿主细胞中。适合的宿主细胞包括但不限于细菌、酵母、或哺乳动物细胞。许多种可商购的宿主-表达载体系统可以用来表达在此所述的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。

修饰、缀合、融合和衍生

[0134] 在某些实施例中,在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽经由氨基酸修饰而被稳定化。在某些实施例中,C末端氨基酸的羧基被酰胺化。在某些实施例中,该C末端氨基酸是酰胺化的甘氨酸,例如,G730、G797、G849、G865、G796、G812和G380。在某些实施例中,例如,G933,该C末端甘氨酸是未修饰的酸。在某些实施例中,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽被提供为其中一个或多个氨基酸残基被酰化。例如,在某些实施例中,在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽含有一个或多个赖氨酸残基,其中棕榈酰部分被附接到N(ε)基团上。在某些实施例中,接头结合在赖氨酸与该棕榈酰基团之间。这个接头可以是γ谷氨酸基团,或为替代接头,例如但不限于,β丙氨酸和氨基己酸。可以使用不同的酰化方法,如添加胆固醇基或肉豆蔻酰基。在某些实施例中,该棕榈酰部分被添加在位置13(例如,G730)。在某些实施例中,该棕榈酰部分被添加在位置10(例如,G797、G849、G933、G865、G796和G812)。在某些实施例中,该棕榈酰部分被添加在位置17(例如,G380)。

[0135] 在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽,例如,G730、G797、G849和G933可以被棕榈酰化,以便借助于与血清白蛋白结合而延长它们的半衰期,由此降低它们的肾脏清除倾向,如在实例1中所述。

[0136] 可替代地或另外,本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽可与异源部分结合,例如以延长半衰期。该异源部分是蛋白质、肽、蛋白质结构域、接头、有机聚合物、无机聚合物、聚乙二醇(PEG)、生物素、白蛋白、人血清白蛋白(HSA)、HSA FcRn结合部分、抗体、抗体的结构域、抗体片段、单链抗体、结构域抗体、白蛋白结合结构域、酶、配体、受体、结合肽、非FnIII支架、表位标签(epitope tag)、重组多肽聚合物、细胞因子、或此类部分的两种或更多种的组合。

[0137] 例如,GLP-1/胰高血糖素激动剂肽可与异源多肽融合。通过重组基因融合和表达或通过化学缀合,这些肽可融合到蛋白质上。适合于作为用于融合的伴侣的蛋白质包括但不限于,人血清白蛋白、抗体和包含到抗体的Fc部分上的融合的抗体片段。GLP-1融合到这些蛋白质上同时保留效价(L. Baggio等人, Diabetes [糖尿病] 53: 2492-2500 (2004); P. Barrington等人, Diabetes, Obesity and Metabolism [糖尿病、肥胖症和代谢] 13: 426-

433 (2011); P. Paulik 等人, American Diabetes Association [美国糖尿病协会] 2012, Poster 1946)。还已描述了延伸的重组肽序列以给出高分子量肽 (V. Schellenberger 等人, Nature Biotechnol [自然生物技术] 27 1186-1190 (2009); PASylation (EP 2173890))。在某些实施例中, GLP-1/胰高血糖素激动剂肽与C末端的融合伴侣 (例如白蛋白或Fc部分) 结合为融合蛋白的N末端部分。如在此所述的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽还可被融合到肽或蛋白质结构域上, 例如对于人血清白蛋白具有亲和力的“Albudabs” (M.S. Dennis 等人, J Biol Chem [生物化学杂志] 277 35035-35043 (2002); A. Walker 等人, Protein Eng Design Selection [蛋白质工程、设计与选择] 23271-278 (2010))。用于将本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽与异源多肽例如白蛋白或Fc部分融合的方法是本领域普通技术人员已知的。

[0138] 其他异源部分可以缀合到GLP-1/胰高血糖素激动剂肽上以进一步稳定或增加半衰期。为了化学融合, 某些实施例的特征为维持自由N末端, 但是可以产生用于衍生的可替代点。另一种替代方法是用大的化学部分, 例如高分子量聚乙二醇 (PEG), 来衍生这种肽。“聚乙二醇化GLP-1/胰高血糖素激动剂肽”具有共价结合到其上的PEG链。GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的衍生, 例如, 聚乙二醇化, 可以在经棕榈酰化的赖氨酸上进行, 或者替代地在被取代或通过延伸而被结合的残基 (如半胱氨酸) 上进行, 以允许衍生。可以针对相对效价和在GLP-1受体与胰高血糖素受体活化之间的平衡将以上GLP-1/胰高血糖素激动剂肽形式进行体外和/或体内表征。

[0139] 通用术语“聚乙二醇链”或“PEG链”指的是以通式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 表示的处于支链或直链形式的氧化乙烯和水的缩合聚合物的混合物, 其中n是3、4、5、6、7、8、9或更大的整数。PEG链包括乙二醇的聚合物, 具有选自大约500到大约40,000道尔顿范围的平均总分子量。PEG链的平均分子量以数字指示, 例如, PEG-5,000指的是具有平均大约5,000的总分子量的聚乙二醇链。

[0140] 可以通过本领域已知的任何聚乙二醇化反应来进行聚乙二醇化。参见, 例如, Focus on Growth Factors [聚焦生长因子], 3:4-10, 1992和欧洲专利申请EP 0 154 316和EP 0 401 384。可以通过使用反应性聚乙二醇分子 (或类似的反应性水溶性聚合物) 的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。

[0141] 用于制备聚乙二醇化的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的方法通常包括以下步骤: (a) 在分子藉此附接到一个或多个PEG基团的条件下, 使GLP-1/胰高血糖素激动剂肽与聚乙二醇 (如PEG的反应性酯或醛衍生物) 反应, 和 (b) 获得一种或多种反应产物。

药物组合物

[0142] 进一步提供了组合物, 例如, 含有有效量的如在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的药物组合物, 其被配制为用于治疗代谢性疾病, 例如, 肥胖症。

[0143] 可以根据已知的方法配制本披露的组合物。适合的制备方法描述于, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学], 第19版, A.R. Gennaro 编著, 马克出版公司 (Mack Publishing Co.), 宾夕法尼亚州伊斯顿市 (Easton, PA) (1995), 将其通过引用以其全文结合在此。组合物可以处于多种形式, 包括但不限于, 水溶液、乳剂、凝胶剂、混悬剂、冻干形式或本领域已知的任何其他形式。另外, 该组合物可含有药学上可接受的添加剂, 包括例如, 稀释剂、粘合剂、稳定剂和防腐剂。一旦配制, 本发明的组合物即可以直接给予受试者。

[0144] 可以与本发明的组合物一起使用的载体是本领域熟知的,并且包括但不限于,例如甲状腺球蛋白、白蛋白(如人血清白蛋白)、破伤风类毒素、和聚氨基酸(如聚L-赖氨酸、聚L-谷氨酸)、流感病毒和乙肝病毒核心蛋白等等。可以使用许多种水性载体,例如,水、缓冲水、0.8%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等等。可以通过常规的、熟知的灭菌技术将组合物灭菌,或者可以将其过滤灭菌。可将得到的组合物包装为原样使用、或冻干,该冻干制剂在给药之前与无菌溶液组合。根据需要,组合物可以含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如PH调节和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。

治疗方法

[0145] 具有有效血糖控制的实质非手术性体重减轻仍然是患有2型糖尿病患者的关键未满足的需求。本文提供的治疗方法可以满足这种需求。

[0146] GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可将胰高血糖素的作用(例如,抑制进食或调节血糖水平)与GLP-1的作用(例如,抑制胃动力、或促进胰岛素释放)结合。因此它们起作用而加速过多脂肪组织的消除,诱导可持续的体重减轻,并且改进血糖控制。GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)还起作用而降低心血管危险因素,如高胆固醇、和高LDL胆固醇或异常HDL/LDL比率。GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)也可用于降低甘油三酯。

[0147] 本披露提供了治疗肥胖症或肥胖相关疾病或障碍的方法,其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。进一步提供了50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382),用于治疗肥胖症或肥胖相关疾病或障碍。进一步提供了50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)的如本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)在制备用于治疗肥胖症或肥胖相关疾病或障碍的药物中的用途。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按单剂量或分剂量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的体重指数(BMI)。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。

[0148] 本披露还提供了减轻体重的方法,其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的

如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按单剂量或分剂量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。在某些例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在某些例子中,所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中,所述受试者超重。在某些例子中,所述受试者是肥胖的。

[0149] 本披露还提供了降低体脂肪的方法,其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按单剂量或分剂量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。在某些例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在某些例子中,所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中,所述受试者超重。在某些例子中,所述受试者是肥胖的。在某些例子中,所述脂肪是肝脏脂肪。肝脏脂肪的减少可以导致胰岛素敏感性增强和/或肝功能改善。在某些例子中,所述受试者中的肝脏脂肪减少了至少20%。在某些例子中,所述受试者中的肝脏脂肪减少了约20%至约40%。在某些例子中,所述给予导致肝脏脂肪减少约三分之一。在某些例子中,所述受试者中的肝脏体积减少。在某些例子中,所述给予降低血红蛋白A1c(HbA1c)水平(例如降低了至少0.6%,至少0.9%,约0.5%至约1.5%,约0.5%至约2%,约0.5%至约3%、或至6.3%或更低)。

[0150] 本披露还提供了管理体重的方法,其包括向对其有需要的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按单剂量或分剂量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。在某些例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在某些例子中,所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中,所述受试者超重。在某些例子中,所述受试者是肥胖的。

[0151] 本披露还提供了治疗非酒精性脂肪肝炎(NASH)的方法,其包括向需要治疗的受试

者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g (例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g) 如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382) 可以按单剂量或分剂量给予。此外, 50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382) 可以按递增的剂量给予 (例如, 剂量调整, 例如初始剂量100 μ g, 第二剂量150 μ g或200 μ g, 和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g, 例如, 其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中, 所述给予是饮食和运动的辅助。所述给予还可以减轻体重或治疗肥胖症。在某些例子中, 所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中, 所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中, 所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中, 所述受试者超重。在某些例子中, 所述受试者是肥胖的。

[0152] 如本文所提供的, 可以给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g (例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g) 如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如MEDI0382) 用于预防体重增加、预防脂肪增加 (如肝脏脂肪)、促进体重减轻、促进脂肪减少 (如肝脏脂肪)、减少体重过重、减少脂肪 (如肝脏脂肪)、或治疗肥胖症 (包括病态肥胖症) (例如通过控制食欲、喂养、进食、卡路里摄入和/或能量消耗)。例如, 增加的能量消耗可以由肝脏中脂肪酸和/或葡萄糖的氧化增加引起。本披露还提供了治疗或预防由体重过重引起或表征的疾病或病症的方法, 其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g (例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g) 如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382)。在某些例子中, 所述给予是饮食和运动的辅助。此外, 50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g (例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g) 的本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382) 可用于治疗其他肥胖相关的代谢紊乱。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382) 可以按单剂量或分剂量给予。此外, 50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382) 可以按递增的剂量给予 (例如, 剂量调整, 例如初始剂量100 μ g, 第二剂量150 μ g或200 μ g, 和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g, 例如, 其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。其他肥胖症相关 (体重过重相关) 疾病的实例包括但不限于: 胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良、糖尿病前期、空腹血糖增加、2型糖尿病、高血压、血脂异常 (或这些代谢危险因素的组)、胰高血糖素瘤、心血管疾病例如充血性心力衰竭、动脉硬化、动脉粥样硬化、冠心病、或外周动脉疾病; 中风、呼吸功能障碍、或肾脏病。

[0153] 本披露还提供了治疗2型糖尿病的方法, 其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g (例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g) 如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽 (例如, MEDI0382) 可以按单剂量或分剂

量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。所述给予还可以减轻体重或治疗肥胖症。在某些例子中,所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中,所述受试者超重。在某些例子中,所述受试者是肥胖的。

[0154] 本披露还提供了改善血糖控制或实现血糖控制的方法,其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按单剂量或分剂量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。所述给予还可以减轻体重或治疗肥胖症。在某些例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在某些例子中,所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中,所述受试者超重。在某些例子中,所述受试者是肥胖的。可以使用混合进餐测试评估血糖控制的改善。在某些例子中,在混合进餐测试后,血糖控制的改善导致在浓度-时间曲线(AUC)下葡萄糖面积减少至少10%(例如,与治疗前的AUC相比)。在某些例子中,血糖控制的改善导致混合进餐测试后AUC降低至少15%(例如,与治疗前的AUC相比)。在某些例子中,血糖控制的改善导致混合进餐试验后葡萄糖AUC降低至少20%(例如,与治疗前的AUC相比)。在某些例子中,血糖控制的改善导致混合进餐试验后葡萄糖AUC降低至少25%(例如,与治疗前的AUC相比)。在某些例子中,血糖控制的改善导致混合进餐试验后葡萄糖AUC降低至少30%(例如,与治疗前的AUC相比)。还可以基于血红蛋白A1c和果糖胺来评估血糖控制的改善。

[0155] 本披露还提供了减轻体重并控制葡萄糖的方法,其包括向需要治疗的受试者给予50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)如本文所公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)。50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按单剂量或分剂量给予。此外,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g的如本文公开的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以按递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量持续3-10天或3-7天)。在某些例子中,所述给予是饮食和运动的辅助。所述给予还可以减轻体重或治疗肥胖症。在某些例子中,所述受试者患有2型糖尿病。在某些例子中,所述受试者具有27kg/m²至40kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有30kg/m²至39.9kg/m²的BMI。在某些例子中,所述受试者具有至少40的BMI。在某些例子中,所述受试者

超重。在某些例子中,所述受试者是肥胖的。在某些例子中,所述给予导致体重减轻至少1.0kg、至少1.3kg、或约1.3kg至约2.0kg。在某些例子中,所述受试者的体重减少了至少3.5kg或至少5kg。在某些例子中,所述受试者的体重减少了约2kg至约30kg。在某些例子中,所述受试者的体重减少了至少2%、至少4%、至少5%或至少10%。在某些例子中,所述受试者的体重减少了约2%至约20%、约2%至约25%、或约2%至约30%。

[0156] 在某些例子中,给予本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)导致体重减轻至少1kg。在某些例子中,给予本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)导致体重减轻至少1.3kg。在某些例子中,给予本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽导致体重减轻至少1.5kg。在某些例子中,给予本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)导致在每天一次重复给药四周后体重减轻1kg至3kg。在某些例子中,给予本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)导致在每天一次重复给药四周后体重减轻1.3kg至2kg。

[0157] 本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)的给予途径可以例如为口服、肠胃外、经由吸入或局部给予。如在此所用的术语肠胃外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或经阴道给药。用于给药的形式的一个实例是注射用溶液,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。在此提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)可以作为单剂量或作为多剂量给药。在某些实施例中,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g、或600 μ g)的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽可以通过皮下注射给予。

[0158] 胃肠外配制品可以是单次推注剂量,输注或加载推注剂量,随后是维持剂量。这些组合物可以按特定的固定的或可变的间隔给予,例如每天一次,或在“根据需要”的基础上给予。也可以调整剂量方案以便提供最佳期望应答(例如治疗性或预防性应答)。

[0159] 在某些例子中,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g或600 μ g)的本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)可以每天给予一次。在某些例子中,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g或600 μ g)的本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)可以经由注射(例如皮下给予)每天给予一次。在某些例子中,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如50 μ g、100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g或600 μ g)的本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)可以经由注射(例如皮下给予)每天给予一次,在至少一周的时间段内、在至少两周的时间段内、在至少三周的时间段内、或在至少四周的时间段内。在某些例子中,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g或600 μ g)的本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)可以以单剂量或分剂量给予。在某些例子中,50 μ g-600 μ g或100 μ g-600 μ g(例如100 μ g、125 μ g、150 μ g、175 μ g、200 μ g、225 μ g、250 μ g、275 μ g、300 μ g、325 μ g、350 μ g、375 μ g、

400 μ g、425 μ g、450 μ g、475 μ g、500 μ g、525 μ g、550 μ g、575 μ g或600 μ g)的本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)可以以递增的剂量给予(例如,剂量调整,例如初始剂量100 μ g,第二剂量150 μ g或200 μ g,和任选地第三剂量200 μ g、300 μ g或400 μ g,例如,其中给予初始剂量和/或第二剂量3-10天或3-7天)。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以作为100 μ g的初始剂量给予4天,作为150 μ g的第二剂量给予4天,并且随后每天给予200 μ g的第三剂量。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以作为100 μ g的初始剂量给予5天,作为150 μ g的第二剂量给予5天,作为200 μ g的第三剂量给予5天,并且随后每天给予300 μ g的第四剂量。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如,MEDI0382)可以作为100 μ g的初始剂量给予5天,作为200 μ g的第二剂量给予5天,并且随后每天给予300 μ g的第三剂量。

[0160] 在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)的半衰期为约7至13小时。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)的半衰期为约9至13小时。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)的半衰期为约7至12小时。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)的半衰期为约10至12小时。在某些例子中,本文提供的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽(例如MEDI0382)的半衰期为约8至11小时。

试剂盒

[0161] 在又其他实施例中,本公开提供了包含GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的试剂盒,其可用于实施本文所述的方法。在某些实施例中,药盒包含在一个或多个容器中的在此披露的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。本领域的技术人员将易于认识到,这些披露的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽可易于与本领域中熟知的已建立的药盒形式之一相结合。

实例

实例1:GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的合成、修饰和表征

[0162] 缩写列表

Boc:	叔-叔丁基氧基羰基
tert-Bu:	叔-丁基
DCM:	二氯甲烷
DIC:	二异丙基碳二亚胺
Fmoc:	9-芴基甲氧基羰基
HOBt:	1-羟基苯并三唑
HPLC:	高效液相色谱
Mtt:	4-甲基三苯甲基
NMP:	N-甲基吡咯烷酮
Pbf:	2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基
TFA:	三氟乙酸
TIS:	三异丙基硅烷
Trt:	三苯基甲基,三苯甲基

[0163] GLP-1/胰高血糖素激动剂肽合成如下。用PRELUDE™固相肽合成仪(蛋白质技术有限公司(Protein Technologies),美国亚利桑那州图森市(Tucson,AZ,USA)),在NovaSyn

TGR或预加载的Fmoc-王树脂(Fmoc-Wang resin) (NovaBiochem) 上进行肽链延长。应用制造商提供的方案将氨基酸的羟基苯并三唑酯偶联在N-甲基吡咯烷酮(NMP) 中。苄基甲氧基羰基(Fmoc) 基团用于氨基酸的 α -氨基基团的半永久性保护,而对于丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸的侧链用叔丁基(tert-Bu) 保护,并且对于精氨酸用2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf) 保护,对于组氨酸用三苯甲基(Trt) 保护。在位置1的组氨酸的N-末端氨基基团用叔丁氧基羰基基团(Boc) 保护。当需要侧链的后续化学修饰时,将Lys(Mtt) 掺入肽链中。

[0164] 在完成肽链延长时,通过用含有2%TFA和5%TIS(10x 7ml,各0.5分钟)的DCM洗涤肽-树脂去除Mtt基团。在PRELUDE™肽合成仪上,使用DIC作为偶联剂,在HOBT存在下进行脂质部分到Lys侧链上的偶联。

[0165] 使用TFA:TIS:水(95:2.5:2.5)的混合物从该树脂上切割肽。在室温2h之后,过滤该肽基树脂,用TFA洗涤,并且将合并的滤液在真空中蒸发至干燥。用醚研磨残留物,将形成的沉淀过滤,用醚洗涤,并干燥。将粗制的肽溶解于在水中的5%乙酸中,并且通过反相高压液相色谱法在附接到Varian 920-LC系统上的Polaris 3 C8-A柱上进行分析。使用10%到90%缓冲液B的标准梯度系统经过15分钟的过程进行分析。缓冲液A为在水中的0.1%TFA,而缓冲液B为在乙腈中的0.1%TFA。记录在210nm处的HPLC图谱。在具有半制备型C18 RP XBridge Waters(沃特斯)柱的Varian ProStar系统上进行制备分离。使用水和乙腈的上述溶剂系统,处于30%到70%缓冲液B梯度经过30分钟过程,进行分离。通过电喷雾质谱法(MassLynx,沃特斯公司)来分析在色谱分离上同质的产物(>97%纯度)。

实例2:体外研究

胰高血糖素和GLP-1受体介导的cAMP产生

[0166] 在基于细胞的cAMP活性测定(测定1)中的肽的生物活性针对生物活性,测试了通过实例1的方法合成的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的生物活性,例如,通过以下方法刺激一种或多种细胞受体反应。通过标准方法在HEK293s或CHO细胞中产生表达人、小鼠、大鼠、或狗GLP-1受体(GLP-1R)、胰高血糖素受体(GCGR)或葡萄糖依赖性促胰岛素肽(抑胃肽)受体(GIPR)的稳定细胞系。这些不同受体的肽活化导致下游的cAMP第二信使的产生,其可以在功能活性测定中测得。

[0167] 使用“测定培养基”进行cAMP测定:

测定培养基:在DMEM(吉布科公司(Gibco)编号41966)中的10%FBS,含有0.5mM IBMX(西格玛公司(Sigma)编号I7018)。

使用低蛋白结合的384孔板(格瑞纳公司(Greiner)编号781280)来进行制作在测定培养基中的测试样品的十一次1比5连续稀释。所有样品稀释度均制作一式两份。

[0168] 将表达感兴趣受体的细胞的冻结的冷冻小瓶在水浴中迅速解冻,转移到预加温的测定培养基中并且在240xg旋转离心5分钟。以优化的浓度将细胞重新悬浮在测定培养基中(例如,hGCGR细胞为 1×10^5 个细胞/ml,hGLP-1R和hGIPR细胞为 0.5×10^5 个细胞/ml)。

[0169] 从稀释板上将5 μ L重复样品压印到黑色浅孔u型底部的384孔板(康宁公司(Corning)编号3676)上。为此,添加5 μ L细胞悬液,并且将这些板在室温孵育30分钟。

[0170] 使用可商购的cAMP动态2HTRF试剂盒(Cisbio,目录号62AM4PEJ),遵循按照制造商的建议的两步方案测定cAMP水平。简要地说;通过将抗cAMP穴状化合物(供体荧光团)和

cAMP-d2 (受体荧光团) 各1/20稀释于提供在该试剂盒中的缀合与裂解缓冲液中而单独地将它们制成。将5 μ L抗cAMP穴状化合物添加到测定板的所有孔中,并且将5 μ L cAMP-d2添加到除了非特异性结合 (NSB) 孔之外的所有孔中,向其上添加缀合与裂解缓冲液。将这些板在室温孵育一个小时,然后在Envision读取器 (珀金埃尔默公司 (Perkin Elmer)) 上使用320nm的激发波长和620nm和665nm的发射波长进行读数。

[0171] 在“测定培养基”中进行的cAMP测定中确定的合成GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的序列和它们的EC50值显示在表2中。在表2中的所有肽是用C端酰胺合成的。另外的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽是用C端酸合成的,并且在“测定培养基”中进行的cAMP测定中确定的EC50值显示在表3中。在“测定培养基”中进行的另外的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的EC50显示在表4中。在表4中的所有肽具有C端酰胺,除非它们被表示为“酸”,在这种情况下它们具有C端酸。

表2:具有C端酰胺的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的cAMP活性(测定1)

肽	在测定培养基中的测定		
	人 GlucR EC50	人 GLP1R EC50	人 GIPr EC50
	M	M	M
G730	6.23E-12	1.8E-11	4.5E-08
G797	6.14E-12	1.4E-11	3.4E-09
G849	2.26E-12	9.0E-12	1.7E-08
G865	1.26E-11	8.3E-12	2.2E-08
G796	1.76E-12	1.3E-11	1.4E-08
G812	8.17E-12	1.1E-11	2.7E-09
G380	2.17E-10	7.7E-11	1.3E-07
GLP1		8.1E-11	
胰高血糖素	3.3E-12		

表3:具有C端酸的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的cAMP活性(测定1)

肽	人 GlucR EC50	人 GLP1R EC50	人 GIPr EC50
	M	M	M
G931	1.78E-11	1.30E-10	0.00E+00
G933	5.92E-12	3.20E-11	9.70E-09
G934	6.30E-12	1.80E-11	3.60E-09
G973	8.90E-12	1.20E-11	4.70E-08

表4:另外的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的cAMP活性(测定1)

在这个部分中的亲本序列 HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LVAGG 肽都含有在残基 26 到 30 处的 LVAGG				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	亲本序列中的棕榈酰化、取代的位点和性质
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
胰高血糖素	3.3E-12	4.2E-09	1.99E-07	
GLP1	1.53E-07	8.1E-11	1.53E-07	
g715	2.53E-12	2.04E-11	9.98E-10	K(gE-棕榈酰化)10
g716	2.46E-09	1.29E-08	1.18E-08	K(gE 棕榈酰化)11
g702	1.49E-09	3.35E-09	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)12, E17
g728	2.44E-09	1.69E-10	3.95E-07	K(gE 棕榈酰化)12, E17 R20 A24
g729	3.19E-11	7.29E-11	2.09E-07	K(gE 棕榈酰化)13, E17
g730	1.50E-11	3.95E-11	5.66E-08	K(gE 棕榈酰化)13 E17 R20 A24

g875	1.29E-10	2.98E-11	2.90E-08	K(gE 棕榈酰化)13 R20 A24, E17 Aib2
g841	无数据			K(gE 棕榈酰化)13 R20 A24, S18 R12 酸
g802	1.81E-09	9.64E-11	9.12E-08	K(gE 棕榈酰化)13, R20 A24, E17, E12
g820	1.17E-11	3.39E-11	7.11E-08	K(gE 棕榈酰化)13, R20 A24, E17, R12
g842	8.31E-12	5.12E-11	8.83E-08	K(gE 棕榈酰化)13, R20 A24, E17, R12 酸
g733	6.20E-08	2.31E-11	8.17E-07	K(gE 棕榈酰化)14, G2 E3
g803	1.08E-11	2.96E-11	3.29E-08	K(gE 棕榈酰化)14, R20 E24, S18
g843	无数据			K(gE 棕榈酰化)14, R20 E24, S18 R12 酸
g732	3.96E-11	2.32E-11	2.94E-08	K(gE 棕榈酰化)14, R20 A24, E17 G2
g777	1.24E-12	2.74E-11	4.53E-09	K(gE 棕榈酰化)14, R20 A24, E17
g844	无数据			K(gE 棕榈酰化)14, R20 A24, E17 R12 Aib2 酸
g845	无数据			K(gE 棕榈酰化)14, R20 A24, E17 R12 酸
g821	4.63E-12	5.58E-11	1.40E-08	K(gE 棕榈酰化)14, R20 A24, E17, R12
g846	3.41E-11	4.38E-11	1.18E-08	K(gE 棕榈酰化)14, R20 A24, E17, E12
g731	2.77E-11	4.22E-11	4.07E-08	K(gE 棕榈酰化)14, E12
g670	8.00E-12	2.03E-11	1.49E-08	K(gE 棕榈酰化)14, S18
g335	1.05E-11	7.33E-11	5.82E-07	K(gE-棕榈酰化)17
g336	1.77E-12	3.66E-11	1.96E-08	K(gE-gE-棕榈酰化)17
g384	4.29E-11	2.72E-11	1.70E-08	K(gE 棕榈酰化)17, Aib2

g380	3.62E-10	1.00E-10	6.09E-07	K(gE 棕榈酰化)17, G2
g736	9.19E-10	8.54E-11	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)17, G2, A20 A24
g381	1.93E-09	9.08E-11	5.45E-07	K(gE 棕榈酰化)17, E3
g678	4.52E-09	1.06E-10	1.23E-07	K(gE 棕榈酰化)17, G2 E20
g599, g688	6.98E-11	1.20E-10	1.12E-07	K(gE 棕榈酰化)17, E20
g679	1.89E-10	1.35E-10	1.17E-07	K(gE 棕榈酰化)17, G2 E24
g600, g689	5.47E-12	6.66E-11	8.28E-08	K(gE 棕榈酰化)17, E24
g680	3.68E-09	1.95E-10	9.67E-08	K(gE 棕榈酰化)17, G2 E20 E24
g639	8.21E-08	2.44E-10	8.21E-08	K(gE 棕榈酰化)17, S2 E3 E20 E24
g681	3.99E-08	2.83E-10	1.24E-07	K(gE 棕榈酰化)17, G2, E3 E20 E24
g720	3.52E-10	5.34E-11	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)17, G2 R20 E24 R12
g660	1.52E-09	1.06E-09	3.32E-07	K(gE 棕榈酰化)17, G2 R20 E24
g835	4.24E-10	1.91E-10	9.72E-08	K(gE 棕榈酰化)17, R20 E24, E12
g776	4.65E-12	7.02E-11	4.79E-08	K(gE 棕榈酰化)17, R20 E24
g823	9.48E-12	9.73E-11	8.42E-08	K(gE 棕榈酰化)17, R20 E24, R12
g867	7.04E-12	4.48E-11	4.17E-08	K(gE 棕榈酰化)17, R20 A24
g736	9.20E-10	8.54E-11	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)17, A20 A24, G2
g737	7.34E-07	8.14E-11	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)17, A20 A24, G2 E3
g675	3.84E-08	1.51E-10	1.61E-06	K(gE 棕榈酰化)17, E12 R20 A24 G2
在这个部分中的亲本序列 HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFFVQW LEAGG 肽都具有从残基 26 向前的序列 LEAGG , 除非另外说明, 例				

如 LERGG				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	亲本序列中的棕榈酰化、取代的位点和性质
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
g717	4.55E-13	5.77E-12	1.48E-09	K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG
g796	1.81E-12	1.40E-11	1.74E-08	K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG, R20 A24 S12
g847	无数据			K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG, R20 A24 S18 E12 Aib2 酸
g797	9.64E-12	2.26E-11	4.64E-09	K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG, R20 A24 E17 E12
g798	5.10E-13	9.07E-12	1.51E-09	K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG, R20 A24 E17
g848	9.66E-13	9.42E-12	2.77E-09	K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG, R20 A24 E17 R12
g849	2.28E-12	9.07E-12	1.81E-08	K(gE 棕榈酰化)10, LEAGG, R20 A24 S18 R12
g701	3.83E-09	7.40E-09	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)12, LERGG, G2 E17
g840	5.30E-12	1.45E-10	1.02E-07	LEAGG, R20 A24, E17
g824	1.05E-12	4.71E-11	5.74E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG, R20, E24
g780	7.92E-13	1.20E-11	6.40E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG, R20 A24
g601	4.93E-13	3.98E-11	7.41E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG
g816	1.10E-12	3.16E-11	2.00E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG, E17
g817	1.68E-12	2.51E-11	1.52E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG, A18
g876	1.04E-11	8.63E-11	7.90E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG, R20, E24, E12
g805	1.44E-12	2.28E-11	9.97E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEAGG, R20 E24
g850	2.19E-12	2.12E-11	8.96E-08	K(gE 棕榈酰化)14, LEA, R20, A24, S18 R12
g836	1.55E-11	1.24E-10	1.00E-07	K(gE 棕榈酰化)14,

				LEAGG, R20 E24, E17
g804	1.95E-12	7.15E-11	9.97E-08	K(gE-棕榈酰化)14, LEA, R20, A24
g618	无数据			K(Ahx-棕榈酰化)20, LEKGR
g781	2.86E-12	1.04E-10	4.02E-07	K(gE-棕榈酰化)16, LEAGG, R20 A24
g782	1.56E-10	2.54E-11	1.43E-06	K(gE-棕榈酰化)18, LEAGG, R20 A24
g744	3.92E-11	2.45E-09	0.00E+00	K(gE-棕榈酰化)20, LEAGG
g746	3.54E-11	1.15E-08	0.00E+00	K(gE-棕榈酰化)24, LEAGG
g747	9.42E-11	3.16E-09	1.04E-06	K(gE-棕榈酰化)31, LEAGG
g512	6.06E-11	9.80E-11	4.07E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LEAGG, G2,
g513	7.23E-10	1.75E-10	2.98E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LEAGG, E3,
g734	8.28E-08	6.95E-11	1.17E-06	K(bA-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24, E3 E12
g837	2.13E-10	4.67E-10	1.14E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24 E12
g838	5.68E-12	2.37E-11	8.43E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24 E12
g783	9.11E-11	4.24E-11	8.46E-07	K(bA-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24 E12
g851	无数据			K(bA-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24, R12 酸
g852	无数据			K(bA-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24, R12 Aib2 酸
g819	2.34E-12	1.80E-11	1.03E-07	K(bA-棕榈酰化)17, LEAGG, R20 A24
g536	4.78E-12	7.45E-11	0.00E+00	
g600	5.47E-12	6.66E-11	1.24E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LVAGG, E24
g599	9.62E-11	8.76E-11	1.13E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LVAGG, E20
在这个部分中的亲本序列 HSQGT5 FTSDY10 SKYLD15 SRRAQ20				

DFVQW25 LERGG-酰胺肽都具有从残基 26 向前的序列 LERGG, 除非另外说明, 例如 LENT				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	亲本序列中的棕榈酰化、取代的位点和性质
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
g825	3.67E-12	1.91E-11	8.67E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LENT, R20 E24, E12
g588	7.23E-11	1.10E-10	9.80E-08	K(gE 棕榈酰化)17, LERGG, G2,
g614	3.65E-12	9.31E-12	9.93E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, E12
g684	1.64E-10	1.51E-11	1.46E-07	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12 G2
g721	3.23E-09	4.11E-10	9.79E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12 G2
g724	3.09E-08	1.90E-11	9.33E-07	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12 G2 E3
g772	1.84E-10	2.92E-10	1.54E-06	K(gE-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12
g795	1.10E-10	7.34E-11	5.79E-07	K(bA-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12
g794	4.69E-12	1.57E-11	3.22E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12
g826	4.23E-12	2.93E-11	5.80E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12 酸
g727	2.18E-10	2.63E-11	1.77E-07	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 A24 E12 G2 酸
g683	3.72E-10	1.59E-11	1.26E-07	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, A20 A24 E12 G2
g722	1.11E-08	4.26E-10	1.67E-06	K(gE-棕榈酰化)17, LERGG, A20 A24 E12 G2

g725	5.99E-08	2.52E-11	1.48E-06	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, A20 A24 E12 G2 E3
g818	8.90E-12	2.10E-11	9.40E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, A20 A24 E12
g682	1.95E-10	1.43E-11	1.22E-07	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 E24 E12 G2
g723	8.95E-09	3.30E-10	7.61E-07	K(gE-棕榈酰化)17, LERGG, R20 E24 E12 G2
g726	1.31E-08	7.91E-12	2.15E-07	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 E24 E12 G2 E3
g771	5.51E-12	1.75E-11	3.71E-08	K(Ahx-棕榈酰化)17, LERGG, R20 E24 E12
g617	无数据			K(Ahx-棕榈酰化)20, LERGG, G2, E12,
g787	4.36E-11	6.65E-09	0.00E+00	K(Ahx-棕榈酰化)20, LERGG, A24 E17
g806	9.9E-12	1.71E-10	1.05E-07	K(Ahx-棕榈酰化)21, LERGG, A18
g616	无数据			K(Ahx-棕榈酰化)24, LERGG, G2, E12
g701	3.83E-09	7.4E-09	0.00E+00	K(gE 棕榈酰化)12, LERGG, G2 E17
在这个部分中的亲本序列 HSQGT5 FTSDY10 SKYLD15 SRRAQ20 DFVQW25 LVAGG 延伸肽具有注释为 C 端到残基 30 的残基和 C 端 酰胺				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	序列延伸
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
g316	1.06E-11	3.14E-11	3.65E-09	SSGGSS
g317	0.00E+00	2.63E-09	0.00E+00	SSGGSS K
g318	9.04E-09	1.14E-09	0.00E+00	SSGGSSK(棕榈 酰化)
g402	5.96E-11	8.57E-11	0.00E+00	SGSGSG
g319	1.04E-11	3.61E-11	0.00E+00	PSSGA PPPSK
g320	3.20E-12	9.38E-12	1.01E-09	PSSGA

				PPPSK(棕榈酰化)
g315	5.04E-12	2.73E-11	1.97E-08	GGGG
g325	1.03E-11	2.61E-11	0.00E+00	GGGGK
g326	2.82E-12	2.47E-11	1.26E-08	GGGGK(棕榈酰化)
g327	2.32E-12	1.93E-11	1.28E-08	GGGGK(gE 棕榈酰化)
g321	2.79E-11	2.72E-11	6.41E-09	KNNRNNIAK
g322	3.55E-12	1.06E-11	1.72E-09	KNNRNNIAK(棕榈酰化)

缩写:K (gE-棕榈酰化) = 具有通过 γ 谷氨酸接头缀合到 ϵ 氮上的棕榈酰基团的赖氨酸; K (Ahx-棕榈酰化) = 具有通过氨基乙酸接头缀合到 ϵ 氮上的棕榈酰基团的赖氨酸; K (bA-棕榈酰化) = 具有通过 β 丙氨酸接头缀合到 ϵ 氮上的棕榈酰基团的赖氨酸; Aib, 氨基异丁酸。K (棕榈酰化) = 具有直接缀合到 ϵ 氮上的棕榈酰基团的赖氨酸。

[0172] 在血浆浓度的血清白蛋白存在下胰高血糖素和GLP-1受体介导的cAMP产生测定(测定2)。在CHO细胞中测得针对肽诱导cAMP产生的激动剂效价测定,所述CHO细胞分别在如下4.4%、3.2%和3.2%的人、大鼠或小鼠血清白蛋白存在下表达人、大鼠或小鼠胰高血糖素受体(缩写为GlucR或GCGR)或GLP-1受体。

[0173] 将具有人、小鼠、或大鼠GlucR或GLP-1受体的稳定重组表达的CHO细胞在DMEM 10%FBS和遗传霉素(100 μ g/ml)中培养。在1x细胞冷冻培养基-DMSO无血清(西格玛奥德里奇公司)中以 2×10^7 /小瓶制备冷冻保存细胞母液并且在-80 $^{\circ}$ C保存。将细胞在37 $^{\circ}$ C迅速解冻,并且然后稀释在含有血清白蛋白(对于人、大鼠、和小鼠血清白蛋白分别为4.4%、3.2%和3.2%)的测定缓冲液(DMEM)中。将肽连续稀释在DMSO中,然后按照规定的终浓度在含有血清白蛋白的DMEM中稀释100倍。然后将稀释的肽转移到384黑色浅孔微量滴定测定板中。将细胞添加到测定板上并且在室温孵育30分钟。孵育之后停止测定,并且按照制造商的指南使用可获自CisBio生物测定公司的HTRF $^{\circ}$ 动力d2 cAMP测定试剂盒测量cAMP水平。在Perkin Elmer ENVISION $^{\circ}$ 荧光读板仪上进行读数。人和大鼠血清白蛋白购自西格玛奥德里奇公司,而小鼠血清白蛋白购自Equitech生物有限公司。

[0174] 如制造商的指南中所述将数据转化成% ΔF ,并且通过4-参数逻辑拟合法进行分析以确定EC₅₀值。针对选择的肽的测定2EC₅₀值显示在表5中。确定的测定2EC₅₀值取决于所测试的肽在重组细胞系中的GLP1受体和胰高血糖素受体两者上的固有效价并且取决于所述肽对血清白蛋白的亲合力,该亲合力决定游离肽的量。与血清白蛋白的结合增加所获得的EC₅₀值。可基于cAMP产生随着HSA浓度的变化来计算处于血浆浓度的白蛋白的游离肽的部分以及在0%HSA的EC₅₀。例如,G730和G933分别产生针对在4.4%HSA处的游离肽的0.85%和0.29%的值、以及在0%HSA处的GLP1R的7pM和6pM的EC₅₀。例如,G797和G849分别产生针对在4.4%HSA处的游离肽的0.82%和0.48%的值、以及在0%HSA处的GLP1R的7pM和2pM的EC₅₀。为了比较在不同肽之间并且在经过不同的条件下在GLP1R和GlucR上的活性的平衡,可使用以下计算使这些活性相关联,其中EC₅₀与天然配体的活性有关。

表5:在血浆浓度的血清白蛋白存在下GLP-1/胰高血糖素激动剂肽的EC50效价(测定2)

	在 4.4%人血清白蛋白中的测定			在 3.2%小鼠血清白蛋白中的测定			在 3.2%大鼠血清白蛋白中的测定		
肽	人 GLP1R EC50 pM	人 GlucR EC50 pM	人 GlucR/GLP1R 比值 ¹	小鼠 GLP1R EC50 pM	小鼠 GlucR EC50 pM	小鼠 GlucR/GLP1R 比值 ¹	大鼠 GLP1R EC50 pM	大鼠 GlucR EC50 pM	大鼠 GlucR/GLP1R 比值 ¹
G730	455	402	0.122	1100	5460	0.04	81	45080	0.06
G797	739	1137	0.07	290	764	0.08	60	23170	0.08
G849	172	79	0.235	88	103	0.17	44	4055	0.33
G933	943	564	0.179	540	377	0.29	136	15500	0.27
G865	150	570	0.027	96	1100	0.021	18	87100	0.01
G796	140	53	0.275	130	34	0.78	23	2000	0.36
G812	316	764	0.044	130	947	0.032	19	14100	0.04
G380	6543	53590	0.013	15000	576000	0.006			
GLP1	25			21			1.9		
胰高血糖素		2.7		9700	4.97		557	60	

¹GlucR/GLP1R比值确定如下:

相对效价GlucR=胰高血糖素的EC50/测试肽的EC50

相对效价GLP1R=GLP1的EC50/测试肽的EC50

GlucR/GLP1R比值=相对效价GlucR/相对效价GLP1R

[0175] 血浆中的肽的稳定性测试。肽G730、G797、G849和G933在血浆中的稳定性确定如下。

[0176] 通过称量固体肽到Eppendorf低结合管(Eppendorf Low Bind Tube)中并且溶解于DMSO中,制备约200 μ mol/L的肽的储备溶液。将10 μ L储备溶液添加到在Eppendorf低结合管中的990 μ L血浆中,从而生成血浆中约2 μ mol/L的肽初始浓度。在添加到该储备溶液之前,来自人、大鼠和小鼠的冰冻空白血浆已经解冻并加热到37 $^{\circ}$ C的温度。将加标的血浆样品轻轻混合并且在开始实验之前允许平衡约5分钟。将血浆样品在GalaxyR CO₂培养箱中于37 $^{\circ}$ C孵育48小时。在0、1、2、6、5、17、24和48小时时取样(30 μ L)。将这些样品在-70 $^{\circ}$ C保存直到用于分析。

[0177] 血浆样品测定如下。30 μ L血浆样品为蛋白质,将其用180ml冷乙醇在96孔低结合板(Eppendorf蛋白LoBind)中沉淀。在混合和离心之后,将100 μ L上清液转移到新的板上,将1 μ L注射到分析柱上。

[0178] 使用偶联到具有正电喷雾电离的中等分辨率质谱仪 (Perkin Elmer PenTOF) 的 μ LC-系统 (LC Exigent μ LC) 进行分析。该分析柱为5cm的1mm Agilent Poroshell (定制的) C18柱, 粒径为2.7 μ m。流率:0.1ml/min, 使用慢速反相梯度。使用的流动相为含有0.1%甲酸的乙腈和水。

[0179] 对以下降解产物以手工方式评估得到的数据:+1产物(酸)和DPP IV裂解产物。具有+1质量的产物可由在谷氨酰胺的酰胺基团或在C末端的脱酰胺作用而产生。裂解产物由血浆中的蛋白酶DPP IV的作用而产生。肽的降解和肽产物的形成均以初始肽浓度的百分比形式报告。进行峰积分并计算剩余肽的%:(峰面积/峰面积0h)*100。24h时间点的数据显示在表6中。对于G797和G933而言,脱酰胺作用和DPP IV裂解的水平是低的。

表6:血浆中的肽稳定性

	在 24h 时在小鼠血浆中的血浆稳定性			在 24h 时在人血浆中的血浆稳定性			在 24h 时在大鼠血浆中的血浆稳定性		
肽	稳定肽的 %	+1 产物的 %	DPP 裂解产物 /+1 DPP 裂解产物的 %	稳定肽的 %	+1 产物的 %	DPP 裂解产物 /+1 DPP 裂解产物的 %	稳定肽的 %	+1 产物的 %	DPP 裂解产物 /+1 DPP 裂解产物的 %
G730	65	15	14/5	100	<1	<1	24	58	2
G797	84	<1	1	85	<1	<1	60	<1	1
G849	38	<1	22	100	<1	<1	69	16	3
G933	83		1	86		<1	85		<1

[0180] 溶解度如下在pH范围为4.5到8.0内的许多缓冲液种类中评估了肽溶解度。将干燥粉末形式的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽在室温、在不同的缓冲液中重构。使用NanoDrop 2000分光光度计在280nm处测量吸光度,并且使用以下等式计算肽浓度:

$$c = (A_{280} * M_w) / \epsilon$$

其中:c-浓度 ϵ -消光系数 M_w -分子量

A_{280} -在280nm处的吸光度

$$\epsilon = (1x \text{ Trp} = 5560) + (1x \text{ Tyr} = 1200)$$

[0181] 结果被示于表7中。在一定的pH范围(6.5到8.5)中这些肽的每一种能以0.8mg/ml溶解。G730在4.5到8.0的pH范围可溶,G797在6.到8.0的pH范围可溶,并且G933在6到8.0的pH范围可溶。在许多不同的缓冲系统中测试G933的溶解度,这些缓冲系统也示于表7中。G933至少在以下缓冲系统中能以1mg/ml溶解:组氨酸(pH 6和7;离子强度:0.25mM到100mM)、磷酸钠(pH 6-7.5;离子强度:0.25mM到100mM)、和三羟甲基氨基甲烷(pH 7-9;离子强度:0.25mM到100mM)。

表7:肽溶解度概况(所有缓冲液的离子强度:100mM)

缓冲液	浓度 (mg/ml) A280 目标 1 mg/ml			
	G730	G797	G849	G933
谷氨酸盐 pH 4.5	0.83	0.023	NA	0.02
乙酸盐 pH 5	NA	NA	NA	0.03
琥珀酸盐 pH 5	NA	NA	NA	1.1
磷酸盐, pH = 6	0.14	0.84	0.06	1.2
组氨酸 pH 6	NA	NA	NA	1.2
磷酸盐 pH 6.5	0.83	0.84	NA	NA
磷酸盐, pH 7.0	NA	NA	NA	1.1
组氨酸, pH 7.0	NA	NA	NA	1.1
磷酸盐 pH 7.5	0.85	0.86	NA	1.2
Tris pH 7.5	0.83	0.89	0.89	1.2
Tris pH 8.0	1.1	0.83	0.89	1.2

[0182] 配制品。在三种不同的等渗配制品中评估了肽溶解度:

1. 默认配制品 (DF) = 0.1M Tris pH 7.5, 150mM甘露醇. 最终配制品pH=7.2
2. 备用配制品1 (BF1) = 0.05M Tris, 50mM精氨酸/脯氨酸. 最终配制品pH=8.0
3. 备用配制品2 (BF2) = 磷酸钠缓冲液 (pH 8) / 1.85%W/V丙二醇. 最终配制品pH=7.0

[0183] 如上详述测量溶解度, 并且将结果示于表8中。G730、G797和G933能以至少5mg/ml溶于DF中, G849在DF中的最大溶解度是3.7mg/ml, G797能以至少10mg/ml溶于BF1中, 并且G933能以至少10mg/ml溶于BF2中。

表8: 在配制品中的肽溶解度

先导候选物	配制品 浓度	配制品	10 mg/ml 溶解度 (BF2)
G730	5 mg/ml	DF	否
G797	5 mg/ml	DF/BF1	是
G849	3.7 mg/ml	DF	n/a
G933	5 mg/ml	DF	是

由A280nm确定的浓度

[0184] 在一个月之内通过反相超高效液相色谱法 (RP UPLC) 测量纯度来评估DF的稳定性。储存条件为5°C、25°C、40°C和-80°C。结果显示在表9和10中。

表9在稳定性条件下在1个月之后的肽配制品纯度

肽	5°C	25°C	40°C	-80°C
G730_DF	97.7	96.1	86.1	97.7
G797_BF1	98.72	98.84	77.54	NA
G849_DF	95.5	NA	NA	NA
G933_DF	97.8	95.9	88.9	98.9

表10:在稳定性条件下在1个月之后的肽配制品纯度的损失(与T0比较的%)

先导候选物	5°C	25°C	40°C	-80°C
G730_DF	0.82	2.43	12.54	0.3
G797_BF1	0.24	0.12	21.65	0.3
G849_DF	n/a	n/a	n/a	n/a
G933_DF	0.3	2.2	9.3	(-)0.8

这些肽都显示出可接受的关于溶解度、可配制性和稳定性的特性。

实例3:体内研究

[0185] G730、G797和G812(研究A)。如下在膳食诱导肥胖(DIO)小鼠模型中测试了在此披露的选择的GLP-1/胰高血糖素激动剂肽。使雌性C57/B16JHsd01a(从英国哈兰实验室(Harlan Laboratories)获得)在9-11周龄时开始接受D12492高脂肪饮食(研究饮食公司(Research Diets),新泽西州,美国)和巧克力甜点、德利卡托球(delicato ball)(Delicata Bakverk,瑞典),并且在到达动物设备之前维持饮食持续16周,在三周适应期期间以及在药物治疗期间,将两种饮食成分的卡路里含量显示在表11中。将小鼠分成9个组(n=5-6),并且在29周龄开始治疗。这些治疗组和给药显示在表12中。

表11:DIO饮食的含量

产品	蛋白质 (%)	碳水化 合物 (%)	脂肪 (%)	千卡脂 肪(%)	总千 卡/克
德利卡托球 (Delicata Bakverk AB, 胡丁厄 (Huddinge), 瑞典)	5	53	31	54	5.05
D12492 (研究饮食公司, 新泽西州, 美国)	26.2	26.3	34.9	60	5.24

表12: 用于研究A的治疗组

肽	剂量	动物编号
载体	NA	6
利拉鲁肽	26.6nmol/kg	6
G730	10nmol/kg	6
G730	20nmol/kg	5
G730	50nmol/kg	6
G797	5nmol/kg	5
G797	20nmol/kg	6
G797	50nmol/kg	6
G812	20nmol/kg	5

[0186] 将GLP-1/胰高血糖素激动剂肽G730、G797、和G812、以及利拉鲁肽配制在载体100mM Tris/150mM甘露醇中,pH 7.4。治疗为皮下给予,每日两次,持续14天,同时这些动物维持高脂肪饮食。在整个给药期间每天监测这些动物的体重。在第14天,在4小时禁食期之后,从神志清醒的小鼠获得血样,用于测量血浆葡萄糖和胰岛素。然后使用异氟烷(isofluorane)将小鼠麻醉,从眼后的毛细血管床收集末梢血。测量以下参数:甘油三酯、总胆固醇、非酯化脂肪酸(NEFA)、 β -羟丁酸和成纤维细胞生长因子21 (FGF21)的血液化学测量值(以下表14和15)。

[0187] 与利拉鲁肽和载体相比较,用利拉鲁肽和GLP-1/胰高血糖素激动剂肽G730、G797和G812进行治疗对体重的影响显示于图1-4中。用G730或G797治疗的动物在14天的给药期间显示出剂量依赖性的且连续的体重减轻。在50nmol/kg时,用G730和G797治疗的动物相比于用载体治疗的动物在第14天经历了约24%的体重变化。

[0188] 用G730或G797治疗的小鼠在第14天显示出血糖水平的剂量依赖性降低(表13)。对于这两种治疗,尤其是在较高剂量时,还观察到降低的胰岛素水平(表13)。胰岛素敏感指数稳态模型评估(HOMA)在20nmol/kg G730以及20和50nmol/kg G797时得以显著改善。HOMA是使用血浆胰岛素和血糖水平的总和来评估 β 细胞功能和胰岛素抵抗的建模方法(表14)。总血浆胆固醇被所有剂量的利拉鲁肽、G730和G797降低,其中在血浆非酯化脂肪酸(NEFA)水平以及血浆和肝脏甘油三酯(TG)方面的变化较不显著。 β -羟丁酸(BeHy)具有朝向增加水平的趋势,与体重减轻一致。成纤维细胞生长因子21 (FGF21)总体上随着双重GLP-1/胰高血糖素激动剂肽治疗而增加。

表13:GLP-1/胰高血糖素激动剂肽治疗对葡萄糖、胰岛素和HOMA的影响

肽	剂量 (nmol/kg)	起始 bw (g)	SEM	BW第14天 (载体平均值 %变化)	SEM	葡萄糖 (mM)	SEM	胰岛素 (nM)	SEM	HOMA	SEM
载体	0	47.4	± 3.7	0.0	± 0	8.8	± 0.6	0.8	± 0.23	7.2	± 2.0
利拉鲁肽	27	47.5	± 1.8	-13.3	± 1.4	8.0	± 0.2	0.3	± 0.12	2.8	± 1.1
G730	10	44.5	± 2.2	-7.5	± 1.1	7.2	± 0.3 *	0.4	± 0.14	3.3	± 1.1
G730	20	45.9	± 3.6	-15.6	± 2.2	6.7	± 0.6 *	0.2	± 0.06	1.7	± 0.5 *
G730	50	46.1	± 2.4	-24.0	± 5.1	5.9	± 0.7 *	0.3	± 0.13	2.1	± 1.0
G797	5	47.5	± 1.2	-5.7	± 3.2	7.5	± 0.3	0.7	± 0.25	5.3	± 2.0
G797	20	47.4	± 2.2	-16.0	± 4.4	7.1	± 0.6	0.3	± 0.09	2.0	± 0.8 *
G797	50	47.2	± 1.8	-25.4	± 2.0	6.6	± 0.5 *	0.1	± 0.01 *	0.6	± 0.1 *
G812	20	49.2	± 3.4	-8.7	± 1.4	8.0	± 0.4	0.7	± 0.23	6.0	± 2.1

通过双尾分布、两样本不等方差检验评估结果；

*指示与载体比较 $p < 0.05$ 。

表14:GLP-1/胰高血糖素激动剂肽治疗对另外的血液化学测量值的影响

肽	剂量 (nmol/kg)	肝 TG (g TG/100g 组织)	SEM	血浆 TG (mM)	SEM	血浆 NEFA (mM)	SEM	血浆胆 固醇 (mM)	SEM	ReHy (μmol/l)	SEM	FGF21 (pg/ml)	SEM
载体	0	13.6	± 0.5	0.28	± 0.02	0.22	± 0.02	4.85	± 0.22	982	± 45	2737	± 317
利拉鲁肽	27	13.2	± 2.3	0.24	± 0.03	0.20	± 0.03	3.75	± 0.08	362	± 21	2481	± 930
G730	10	9.0	± 0.8	0.21	± 0.03	0.28	± 0.03	3.05	± 0.23 *	438	± 50	2823	± 218
G730	20	17.7	± 8.4	0.20	± 0.03	0.25	± 0.04	2.48	± 0.80 *	750	± 318	2362	± 300
G730	50	28.1	± 10.1	0.23	± 0.03	0.30	± 0.08	2.08	± 0.23 *	1477	± 479	2390	± 2907
G797	5	13.9	± 1.3	0.24	± 0.03	0.28	± 0.03	3.82	± 0.88 *	382	± 111	2362	± 842
G797	20	17.7	± 9.7	0.24	± 0.03	0.27	± 0.03	2.44	± 0.27	609	± 240	2177	± 2433
G797	50	22.8	± 1.8	0.22	± 0.03	0.24	± 0.03	1.85	± 0.07	1297	± 388	2972	± 815 *
G812	20	7.9	± 0.8	0.23	± 0.03	0.24	± 0.03	2.79	± 0.24	938	± 83	2027	± 388

通过双尾分布、两样本不等方差t测试评估结果；

*指示与载体比较 $p < 0.05$ 。

[0189] G865、G933和G796 (研究B)。在饮食诱导肥胖模型中,使用以上相同的方案,测试了另一组GLP-1/胰高血糖素肽,但这些治疗组和给药显示在表15中:

表15:用于研究B的治疗组

肽	剂量	动物编号
载体	NA	6
利拉鲁肽	26.6nmol/kg	6
G865	5nmol/kg	6
G865	10nmol/kg	6
G933	5nmol/kg	6
G933	10nmol/kg	6
G796	20nmol/kg	6
G796	50nmol/kg	6

[0190] 将GLP-1/胰高血糖素激动剂肽G865、G933、和G796、以及利拉鲁肽配制在载体100mM Tris/150mM甘露醇中,pH 7.4。治疗为皮下给予,每日两次,持续14天,同时这些动物维持高脂肪饮食。在整个给药期间每天监测这些动物的体重。在第14天,在4小时禁食期之后,从神志清醒的小鼠获得血样,用于测量血浆葡萄糖和胰岛素。然后使用异氟烷(isofluorane)将小鼠麻醉,从眼后的毛细血管床收集末梢血。测量以下参数:甘油三酯、总胆固醇、非酯化脂肪酸(NEFA)、β-羟丁酸和成纤维细胞生长因子21 (FGF21)的血液化学测量值(以下表16和17)。

[0191] 与利拉鲁肽和载体相比较,用利拉鲁肽和GLP-1/胰高血糖素激动剂肽G933、G865、G796进行治疗对体重的影响显示于图5-8中。用G933、G865或G796治疗的动物在14天的给药期间显示出剂量依赖性的且连续的体重减轻。

[0192] 在治疗后第14天的葡萄糖水平、胰岛素水平和HOMA显示在表16中。在治疗后第14天的总血浆胆固醇水平、血浆非酯化脂肪酸(NEFA)水平、血浆和肝脏甘油三酯(TG)水平、 β -羟丁酸(BeHy)水平、和成纤维细胞生长因子21 (FGF21)水平显示在表17中。

表16:GLP-1/胰高血糖素激动剂肽治疗对葡萄糖、胰岛素和HOMA的影响

组	剂量 (nmol/kg)	起始 bw (g)	SEM	第14天 (载体 平均%变化)	SEM	葡萄糖 (mM)	SEM	胰岛素 (nM)	SEM	HOMA	SEM
载体	0	46.9	± 1	0	± 0	8.7	± 0.8	0.58	± 0.09	5.05	± 0.8
利拉鲁肽	27	46.3	± 1.7	-14	± 2.1	7.7	± 0.7	0.31	± 0.07 *	2.51	± 0.7 *
G865	5	46.9	± 0.8	-4	± 0.1	6.2	± 0.6 *	0.33	± 0.08	2.14	± 0.6 *
G865	33	47.0	± 0.9	-14	± 3.4	6.6	± 0.9 *	0.36	± 0.06	2.43	± 0.5 *
G933	5	48.1	± 1.6	-11	± 2.7	6.2	± 0.8 *	0.53	± 0.13	3.31	± 0.8
G933	33	48.6	± 0.5	-19	± 3.5	7.2	± 0.6 *	0.27	± 0.07 *	3.98	± 0.6 *
G796	20	50.9	± 1.3	-16	± 0.6	6.1	± 0.2 *	0.38	± 0.05	2.24	± 0.2 *
G796	50	49.7	± 0.8	-23	± 1.6	6.4	± 1.1 *	0.43	± 0.14	2.87	± 1.1

通过双尾分布、两样本不等方差t测试评估结果;

*指示与载体比较 $p < 0.05$ 。

表17:GLP-1/胰高血糖素激动剂肽治疗对另外的血液化学测量值的影响

组	剂量 (nmol/kg)	血浆 TG (g TG/100g 组织)	SEM	血浆 TG (mM)	SEM	血浆 NEFA (mM)	SEM	血浆胆固醇 (mM)	SEM	BeHy (μ mol/l)	SEM	FGF21 (pg/ml)	SEM
载体	0	17.53	± 1.33	0.25	± 0.03	0.28	± 0.03	4.36	± 0.33	367.52	± 87.4	2032	± 174
利拉鲁肽	27	18.4	± 3.5	0.28	± 0.08 *	0.29	± 0.03	3.26	± 0.23 *	472.25	± 92.4 *	2850	± 723
G865	5	18.7	± 3.6	0.26	± 0.08	0.29	± 0.05	3.08	± 0.13	776.06	± 295.6	3151	± 4789
G865	33	22.3	± 3.1	0.23	± 0.02	0.27	± 0.03	2.89	± 0.24 *	367.26	± 109.3	3953	± 6609
G933	5	21.3	± 0.6	0.19	± 0.01 *	0.28	± 0.03	2.88	± 0.28 *	773.08	± 117.2	2682	± 248
G933	33	14.7	± 4.1	0.16	± 0.01 *	0.27	± 0.03	2.33	± 0.20 *	998.56	± 198.3 *	4452	± 1393
G796	20	9.6	± 0.9	0.26	± 0.05	0.24	± 0.03	2.11	± 0.57 *	360.49	± 51.1	6941	± 1794
G796	50	9.9	± 0.6 *	0.16	± 0.01 *	0.23	± 0.02	1.83	± 0.26 *	451.83	± 68.4	9830	± 3728

通过双尾分布、两样本不等方差t测试评估结果;

*指示与载体比较 $p < 0.05$ 。

实例4:单递增剂量研究

(A) 受试者

[0193] 共有362名受试者同意参加德国的研究。针对以下入选和排除标准对受试者进行筛选。

[0194] 入选标准:

- 健康志愿者,筛查时年龄为18至45岁;
- 体重指数 ≥ 22 且 $\leq 30 \text{ kg/m}^2$,并且体重 $\geq 70 \text{ kg}$;并且
- 静脉通路适用于多种插管。

[0195] 排除标准:

●任何会干扰G933的评估或者对受试者安全性或研究结果的解释的情况。具体实例包括(a)急性或慢性胰腺炎的既往病史,或筛查时大于正常值上限(ULN)的胰淀粉酶或脂肪酶,(b)需要治疗的胃轻瘫既往病史,(c)影响上消化道的手术既往史(可能影响对安全性和耐受性数据的解释),(d)导致未经胆囊切除术治疗的急性胆囊炎发作的胆结石病史,或已知胆道疾病病史,(e)多发性内分泌腺瘤2型(MEN-2)病史或家族史(筛查时血清降钙素提示甲状腺C细胞增生(降钙素水平 $> 50 \text{ ng/L}$)或甲状腺髓样癌),(f)临床上显著的心律紊乱既

往病史,例如,永久性或阵发性心房颤动/扑动、阵发性室上性心动过速、阵发性室性心动过速、可植入起搏器装置或心律转变器/除颤器的存在,(g)经治疗的或症状性心力衰竭病史,以及(h)既往心肌梗死或脑血管意外(如中风)病史;

●胃肠、肾脏或肝脏疾病(吉尔伯特氏综合征除外)或任何其他已知干扰药物吸收、分布、代谢或排泄的病症史或存在;

●癌症病史,非黑瘤皮肤癌除外;

●在第1天给药前的4周内任何临床重要疾病、医疗/外科手术或创伤;

●筛查时阳性乙肝表面抗原或丙肝病毒抗体血清学;

●根据病史或受试者的口头报告确定的筛查时的阳性人体免疫缺陷病毒(HIV)检测或使用抗逆转录病毒药物;

●筛查时血清钾或钙超出正常范围;

●筛查时血清肌酐、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)或总胆红素大于ULN;

●根据研究者的判断,临床化学、血液学或尿液分析结果中的任何其他临床重要异常也应导致排除在该研究之外;

●使用以下任何一种药品:(a)同时或以前使用GLP-1受体激动剂,(b)目前或以前在筛查前28天内使用全身性皮质类固醇,或(c)在第-1天至第7天之前1周禁止使用任何许可用于控制体重或食欲的药品或草本制剂;

●仰卧休息10分钟后生命体征异常,定义如下:(a)收缩血压 $<90\text{mmHg}$ 或 $\geq 140\text{mmHg}$, (b)舒张血压 $<50\text{mmHg}$ 或 $\geq 90\text{mmHg}$,或(c)心率 <50 或 >90 次/分钟;

●节律、传导(例如,沃尔弗-帕金森-怀特氏综合症,病态窦房结综合征)或静息12导联心电图的形态上的任何临床重要异常或心电图中的任何异常,研究者认为,可能会干扰对做心率校正的QT间期(QTc)变化的解释,包括异常T波形态或左心室肥厚;

●使用Fridericia公式的延长QTc (QTcF) >450 毫秒,或基于12导联心电图的缩短QTcF <340 毫秒,或长QT综合症的家族史;

●PR(PQ)间期缩短至 <120 毫秒或延长 >200 毫秒(一级房室传导阻滞);

●间歇性二级阻滞(不排除睡眠时的文氏阻滞)或三级阻滞,或房室分离;

●QRS间期在50-110毫秒的范围之外;

●过去3年内已知或疑似滥用药物史;

●过去3年内酗酒或过量饮酒史;

●现时吸烟者(每天 >0 支);如果在筛选时检测可替宁阳性,受试者也被排除;

●筛选或进入研究病房时滥用药物的阳性筛选,或在给予研究产品前进入研究病房时阳性酒精呼气试验。利用苯并二氮杂卓治疗慢性焦虑症或睡眠障碍的受试者可被允许进入该研究;

●严重过敏/超敏反应或持续的临床重要过敏/超敏反应史;

●全血或红血球捐赠,或在筛查前2个月内任何失血 $>500\text{mL}$;

●接受另一种新的化学实体(定义为尚未批准上市的化合物),或参与任何其他临床研究,其中包括在该研究中给予研究产品的至少30天或5个半衰期内(以较长者为准)的药物治疗。在最终剂量后或最后一次就诊后(以最长者为准),研究产品开始30天或5个半衰期的

排除期。不排除经同意和筛选、但未被随机分入本研究或之前的研究的受试者；或者

●精神疾病，使受试者通过官方或司法命令被某一机构收纳

[0196] 筛选后，确定313名受试者不符合入选/排除标准。其余48名受试者随机分组并接受G933。48名经治疗的患者的人口统计资料显示在下表中。

表 18 人口统计资料，如经治疗的入口

参数	安慰剂 N = 12	G933						总计 N = 48
		5 µg N = 6	10 µg N = 6	30 µg N = 6	100 µg N = 6	150 µg N = 6	300 µg N = 6	
年龄 (岁)								
平均值	32.8	37.3	31.8	33.2	27.8	34.5	28.3	36
SD	9.1	6.4	6.8	10.4	4.3	6.5	5.9	26.12
中值	29.0	37.0	34.0	32.5	28.5	33.0	26.5	2.29
最小值, 最大值	22, 45	28, 45	22, 39	20, 45	20, 32	27, 44	21, 38	25, 79
性别								
男性	12 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	36 (100%)
人种 *								
美洲印第安人或阿拉斯加原住民	0	0	0	0	0	1 (16.7%)	0	1 (2.8%)
亚洲人	1 (8.3%)	0	0	0	0	0	0	0
白人	11 (91.7%)	6 (100%)	5 (83.3%)	6 (100%)	6 (100%)	5 (83.3%)	6 (100%)	34 (94.4%)
其他	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	0	1 (2.8%)
种族								
西班牙裔或拉丁美洲裔	0	0	0	0	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (5.6%)
非西班牙裔或拉丁美洲裔	12 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	34 (94.4%)
重量 (kg)								
平均值	84.71	88.82	81.82	81.22	84.93	83.68	91.03	85.25
SD	12.10	10.48	7.66	7.28	8.23	12.90	11.07	9.79
中值	78.30	88.15	80.80	78.95	83.80	77.85	94.65	83.60
最小值, 最大值	73.8, 108.1	77.2, 107.5	72.8, 90.5	74.2, 90.6	75.9, 95.9	71.2, 101.0	74.3, 101.0	71.2, 107.5
身高 (cm)								
平均值	181.28	179.17	182.83	181.17	180.30	177.67	182.00	180.52
SD	5.33	5.31	8.57	4.45	6.71	6.38	3.41	5.86
中值	180.00	177.00	179.00	181.50	180.00	175.00	182.00	179.50
最小值, 最大值	174.0, 188.0	174.0, 188.0	176.0, 198.0	174.0, 186.0	171.0, 190.0	170.0, 186.0	177.0, 187.0	170.0, 198.0

表 18 人口统计资料，如经治疗的人口

参数	安慰剂 N = 12	G933							总计	
		5 µg N = 6	10 µg N = 6	30 µg N = 6	100 µg N = 6	150 µg N = 6	300 µg N = 6		总计 N = 36	总计 N = 48
	191.0									
BMI (kg/m ²)										
平均值	25.67	27.61	24.47	24.74	26.09	26.36	27.44		26.12	26.01
SD	2.41	2.25	1.64	1.91	1.55	2.16	2.82		2.29	2.30
中值	25.27	27.39	24.24	24.51	26.19	25.42	28.64		25.79	25.79
最小值, 最大值	22.3, 29.9	24.4, 30.4	22.7, 27.1	22.2, 27.5	23.7, 28.0	24.6, 29.5	22.4, 29.8		22.2, 30.4	22.2, 30.4

BMI = 体重指数; Max = 最大值; Min = 最小值; N= 受试者数; SD = 标准偏差
* 只选择一个类别的每个种族类别计数受试者

(B) 研究设计

[0197] 进行1期、随机、盲法、单次递增剂量研究。图9中提供了所提出研究的流程图。计划

每个群组八名受试者。在每个群组中,受试者随机分组为3:1至G933 (MEDI0382) 或安慰剂。

[0198] 基于使用关于GPL-1和胰高血糖素调节剂的临床文献数据进行的PK/PD建模,预测临床有效剂量的G933在300至2000 μ g/天的范围内。因此,选择5、10、30、100、300、600、1200和2000 μ g G933的剂量增量。在允许剂量递增进行之前评估每个群组的安全性数据。为了进一步增强安全性,在所提出的剂量范围的下端,倍数增加最大,并且逐步降低,使得最后剂量增加小于2倍。该研究中所提出的最大剂量水平为2000 μ g。基于猴子AUC数据,提出的最大人类剂量2000 μ g的安全系数为0.8。

[0199] 受试者在研究期间接受1剂量的G933。对于所有受试者,在随机化前的28天内(第-29天至第-2天)进行筛选访视。受试者在接受研究产品前一天晚上允许进入病房(第-1天),以允许重复评估资格标准、在4小时时间段内进行心脏遥测监测、并在第二天早晨给药前标准化身体活动水平。在第1天,在禁食过夜至少8小时后,获得基线安全性评估和血液样品,并且给予受试者单次皮下(SC)剂量的G933或安慰剂。在第1天和第2天,受试者留在研究设备中进行定时评估和安全监测(包括通过连续遥测和间歇性数字心电图[ECG]进行心脏监测),并留在室内直至出院。在进行安全性评估并收集血样后,在第3天早晨使受试者离开病房。受试者在第4天、第7天和第28天返回该病房进行门诊就诊。

[0200] 筛选后,每个受试者的研究持续时间约为29天,其中包括住院评估期和门诊随访期。

[0201] 对于药效学评估,在第1天,在每餐(早餐、午餐和晚餐)之前和每餐开始后1小时和2小时(± 15 分钟)抽取用于测量葡萄糖和胰岛素水平的血液样品。记录第1天每餐的开始,并使每餐在30分钟内消耗。

[0202] 对于免疫学评估,在第1天、给药后约1周和给药后约1个月进行抗药物抗体(ADA)取样。

[0203] 对于药代动力学(PK)评估,采样时间是给药前和给药后1、2、4、6、8、10、12、16、24、36、48和72小时(前2小时, ± 15 分钟,和给药后48小时剩余时间点, ± 30 分钟)。在第1天,还在每餐(早餐、午餐和晚餐)之前,每餐开始后1小时和2小时(± 15 分钟)抽取PK样品。

(C) 结果

[0204] 根据协议所计划的,剂量递增为从5 μ g到300 μ g;然而,如显著呕吐事件所证明,300 μ g不被耐受,并且最终组群的剂量降低至150 μ g。图9中提供了实际研究的流程图,并且受试者处置如图10所示。

[0205] 对于5 μ g G933,不能获得PK参数,因为仅3名受试者在血浆中显示至少一个可量化水平。在5 μ g和10 μ g G933组中的所有受试者中,G933的血浆浓度在2小时-4.5小时至16小时-24小时内是可测量的。在100 μ g和300 μ g G933组中的所有受试者中,G933的血浆浓度直至48小时仍可测量。在给药后72小时,没有受试者具有可量化的G933血浆浓度。

[0206] 所有G933剂量的平均浓度-时间曲线在峰值后显示出明显的单指数下降,在峰值和给药后48小时之间具有中度快速的浓度下降。

[0207] 通过受试者和治疗列出单剂量血浆G933PK参数估计值,并通过表19中的处理进行总结。

表 19 单剂量 G933 中值药代动力学参数估计值的总结 (几何平均值[95% CI])

参数	剂量 (μg)					
	5	10	30	100	150	300
C _{max} {ng/mL} ^a	0.47 [0.44-0.50] N=3	0.80 [0.62-1.03] N=6	3.00 [2.59-3.47] N=6	6.19 [4.29-8.92] N=6	8.97 [6.20-12.97] N=6	20.98 [16.21-27.14] N=6
T _{max} {hr} ^b	7.00 [5.88-10.00] N=3	6.94 [4.00-13.50] N=6	9.00 [4.50-10.02] N=6	7.53 [4.50-10.00] N=6	9.00 [4.00-12.00] N=6	4.50 [4.00-5.88] N=6
t _{1/2} {hr} ^c	nc	nc	11.43 [8.42-15.50] N=4	12.07 [9.58-15.20] N=6	10.97 [8.60-13.99] N=6	9.54 [8.63-10.56] N=6
AUC(0-最后) {ng·hr/mL} ^d	1.96 [0.58-6.64] N=3	9.97 [7.01-14.17] N=6	51.99 [44.55-60.67] N=6	137.33 [106.15-177.67] N=6	194.60 [162.84-232.56] N=6	364.47 [298.50-445.02] N=6
AUC(0-∞) {ng·hr/mL} ^d	nc	nc	63.10 [51.49-77.33] N=4	150.03 [118.44-190.04] N=6	209.03 [178.45-244.86] N=6	379.12 [310.26-463.25] N=6
% 外推 AUC(0-∞) {ng·hr/mL} ^e	nc	nc	13.97 [7.22-20.73] N=4	8.35 [3.21-13.48] N=6	6.80 [1.92-11.69] N=6	3.86 [2.64-5.07] N=6
CL/f {L/hr} ^f	nc	nc	0.48 [0.39-0.58] N=4	0.67 [0.53-0.84] N=6	0.72 [0.61-0.84] N=6	0.79 [0.65-0.97] N=6

%外推 AUC(0-∞) = 通过外推法获得的 AUC(0-∞)的百分比; AUC = 浓度 - 时间曲线下面积; AUC(0-最后) = 从零时刻到最后一次可量化浓度的 AUC;

AUC(0-∞) = 从零时刻到无穷的 AUC; CL/f = 表观清除率; C_{max} = 最大观察浓度; CI = 置信区间; t_{1/2} = 半衰期; T_{max} = 到 C_{max} 的时间; n = 统计

分析中包含的值的数量; nc = 未计算

^a 几何平均值 (95%CI)

^b 中值 (范围)

^c 算术平均值 (95%CI)

[0208] 在剂量范围为5μg至150μg的G933单次给予后,G933被吸收,至最大浓度的中值时间(t_{max})为7.0小时-9.0小时,并且在300μg的最高剂量水平下的中值t_{max}为4.5小时。

[0209] 基于72小时采样期的目视检查,使用至少3个数据点确定G933的表观终末消除半衰期(t_{1/2})。由于血浆浓度太低,在剂量组5μg的受试者中T_{1/2}无法评估。在%AUC_{ex}高于20%的其他剂量组中,t_{1/2}和因此AUC_{0-∞}也没有报道。几何平均值t_{1/2}值约为10小时-12小时。

[0210] 对于两个参数,由变异系数(CV)表示的最大血浆浓度(C_{max})和AUC_{0-∞}的受试者间变异性是中等的(3%-37%)。

[0211] 在基线或基线后没有受试者为ADA阳性。

[0212] 在研究过程中监测血压、脉搏、进食和不良事件,并总结在表20中。

[0213] 所有治疗发生的不良事件(TEAE)的严重程度为1级(轻度)或2级(中度)。它们总结在下表21中。

剂量 (μg)	中值脉搏 (bpm) (a)	中值脉冲 最大剂量 后变化 (bpm) (b)	中值舒张 压峰值 (mm Hg)	中值舒张 压最大剂 量后变化 (mm Hg)	中值收缩 压峰值 (mm Hg)	中值收缩 压最大剂 量后变化 (mm Hg)	呕吐(呕 吐发作) 的受试者 人数	与安慰剂 相比,每 日总进食 (%) (c)	早餐后中值 葡萄糖峰 (mmol/L) (e)	晚餐后中值 葡萄糖峰 (mmol/L) (f)
0	72.2	11.8	77	8.5	134	12	0 (0)	100	5.2	7.1
5	79.7	11.3	79.5	13	122	10.5	0 (0)	100	4.9	7.0
10	72.8	12.7	71.5	8	124.5	9.5	0 (0)	100	5.1	6.0
30	70	9.8	76.5	10.5	124	13.5	0 (0)	96	4.4	5.2
100	72	16.8	86.5	16	129.5	8.5	1 (1)	82	4.7	5.2
150	81	15.7	75	15	128.5	7.5	4 (9)	60	5.1	5.2
300	162	35.5	80	19	138.5	26	5 (30)	23	5.1	4.9

BP = 血压

- (a) 中值脉搏定义为从给药前到第28天的最大脉冲的中值
- (b) 中值脉冲最大剂量后变化定义为从给药前到第28天的脉冲最大变化的中值
- (c) 早餐、午餐和晚餐的每日食物总摄入
- (d) 早餐后约1小时(相当于给药后3.5小时)收集的中值葡萄糖水平
- (e) 早餐后约1小时(对应于给药后7小时)收集的中值葡萄糖水平
- (f) 晚餐后约1小时(相当于给药后13.5小时)收集的中值葡萄糖水平

表 21 根据系统器官类别和优选时期的治疗期间出现的不良事件-如经治疗人群

系统器官类别 [*] 优选时期 (MedDRA 版本 18.0)	安慰剂 N=12	G933						总计 N=36
		5 µg N=6	10 µg N=6	30 µg N=6	100 µg N=6	150 µg N=6	300 µg N=6	
具有至少一个事件的受试者	2 (16.7%)	2 (33.3%)	3 (50.0%)	4 (66.7%)	2 (33.3%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	21 (58.3%)
心脏异常	0	0	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)	3 (8.3%)
心律不齐	0	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	1 (2.8%)
房室传导阻滞二级	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	0	1 (2.8%)
室性期外收缩	0	0	0	0	0	0	1 (16.7%)	1 (2.8%)
肠胃疾病	1 (8.3%)	0	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	12 (33.3%)
腹胀	0	0	0	0	0	2 (33.3%)	0	2 (5.6%)
腹痛	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	0	1 (2.8%)
腹泻	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	0	1 (2.8%)
恶心	1 (8.3%)	0	0	0	1 (16.7%)	4 (66.7%)	3 (50.0%)	8 (22.2%)
呕吐	0	0	0	0	1 (16.7%)	4 (66.7%)	5 (83.3%)	10 (27.8%)
一般失调和给药部位失调	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	1 (16.7%)	2 (5.6%)
应用部位糜烂	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
与设备相关的损伤	0	0	0	0	0	0	1 (16.7%)	1 (2.8%)
免疫系统疾病	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
季节性过敏	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
感染和侵袭	1 (8.3%)	1 (16.7%)	0	0	0	0	0	1 (2.8%)
鼻咽炎	1 (8.3%)	1 (16.7%)	0	0	0	0	0	1 (2.8%)
损伤、中毒和手术并发症	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
手术性眩晕	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
代谢和营养失调	0	0	0	0	0	2 (33.3%)	0	2 (5.6%)
食欲下降	0	0	0	0	0	2 (33.3%)	0	2 (5.6%)
肌肉骨骼和结缔组织疾病	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
肌肉骨骼性胸痛	0	0	0	1 (16.7%)	0	0	0	1 (2.8%)
神经系统疾病	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)	1 (16.7%)	7 (19.4%)

表 21 根据系统器官类别和优选时期的治疗期间出现的不良事件-如经治疗人群

系统器官类别 ^a 优选时期 (MedDRA 版本 18.0)	安慰剂 N=12	G933							总计 N=36
		5 µg N=6	10 µg N=6	30 µg N=6	100 µg N=6	150 µg N=6	300 µg N=6		
眩晕	0	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	0	2 (33.3%)	1 (16.7%)	5 (13.9%)	
头痛	0	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	0	4 (11.1%)	
呼吸的、胸的和纵隔的失调	0	0	0	0	0	1 (16.7%)	0	1 (2.8%)	
口咽疼痛	0	0	0	0	0	1 (16.7%)	0	1 (2.8%)	

^a 无论事件的数量是多少，受试者的每个系统器官类别和优选时期都计数一次

[0214] 总体而言，G933对呕吐具有良好的耐受性，并且在较高剂量下观察到脉搏速率和血压的升高。预先指定的探索性终点表明，与安慰剂相比，在以所有剂量用GP933治疗的受

试者的每日总进食减少。

[0215] 在进餐时间左右的个体血糖和胰岛素测量值以及按剂量计的中值血浆葡萄糖和胰岛素血浆水平分别以给药后2.5小时-14小时的时间间隔显示在图11和12中。以所有剂量用G933治疗的受试者的血浆葡萄糖水平中观察到葡萄糖降低效应。这种效应在第一次进餐时间左右更明显。类似地,胰岛素血浆水平显示剂量响应,尤其是在剂量为100 μ g或更高时,与第一次进餐时间相对应。

[0216] 最频繁的TEAE (发生率>10%的受试者) 是呕吐、恶心、眩晕和头痛。呕吐的TEAE仅在最高G933剂量 (100 μ g、150 μ g和300 μ g) 下发生。对于经历呕吐的10名受试者,总共有40次呕吐事件。30次发作来自在300 μ g剂量下的5名受试者,9次发作来自在150 μ g剂量下的4名受试者,并且1次发作来自在100 μ g剂量下的1名受试者的。

[0217] 据报道,在150 μ g G933组中的6名受试者中有2名 (33.3%) 和在300 μ g G933组中的6名受试者中有5名 (83.3%) 出现了被定义为在单日或连续2天内3次或更多次呕吐发作的显著呕吐,尽管饮食有所调整。由于在300 μ g剂量下观察到显著呕吐事件,对于最终组群,G933的剂量降低至150 μ g。

[0218] 在高达150 μ g的剂量下,G933的耐受性在恶心、呕吐、心动过速和血压方面是可接受的。在300 μ g的G933的剂量下,观察到不可接受的呕吐水平,也观察到收缩压和脉搏速率显著升高。单剂量后,在市售的GLP-1激动剂的范围内已经出现显著的脉搏上升,特别是在健康志愿者中,恶心和呕吐也是如此。鉴于在150 μ g的单剂量下观察到G933 (呕吐) 的胃肠道效应,而没有任何心血管效应,G933可以安全地给予患有2型糖尿病的受试者,其剂量预计可以改善血糖控制并减轻体重,而不会对心血管风险状况产生负面影响。在该单剂量健康志愿者研究中,G933符合安全性和耐受性终点。

实例5:多次递增剂量研究第I部分

(A) 受试者

[0219] 招募约75名患有相对良好控制的2型糖尿病 (T2DM) 的超重或肥胖受试者参与该研究。招募的受试者符合以下纳入和排除标准。

[0220] 入选标准:

- 筛查时年龄为18至65岁的男性或女性;
- 体重指数27kg/m²至40kg/m² (包含端值);
- 用二甲双胍单药治疗管理T2DM和葡萄糖控制的诊断,其中在筛查前3个月内未发生显著的剂量变化 (增加或减少 $\geq$ 500mg/天): (a) 筛选血红蛋白A1C (糖化血红蛋白;HbA1c) 值应在6.5%至8.5%的目标范围内,或任选地7.0%至8.5%; (b) 除了二甲双胍单药治疗外,处方二肽基肽酶-4 (DPPIV) 抑制剂的受试者可能有资格在筛选前的4周DPPIV抑制剂清除期后进入该研究; (c) 除二甲双胍单药治疗外,处方少于磺脲类药物许可剂量50%的受试者可能有资格在4周磺酰脲清洗期后进入该研究;以及 (d) 除了二甲双胍单药治疗之外,处方钠-葡萄糖共转运蛋白2 (SGLT2) 抑制剂的受试者可能有资格在4周SGLT2抑制剂清除期后进入该研究;

- 静脉通路适用于多种插管;
- 组群4受试者必须在筛选前每日服用剂量 $\geq$ 10mg他汀类药物,持续至少4周;并且
- 在筛选期间,在初始自我注射安慰剂后,组群4受试者必须愿意并且能够每日自我给

予皮下(SC)注射。

[0221] 排除标准:

●任何会干扰研究产品的评估或者对受试者安全性或研究结果的解释的情况。具体实例为: (a) 急性或慢性胰腺炎既往病史, 或胰腺淀粉酶或脂肪酶比筛查时实验室参考范围的正常值上限(ULN) 高两倍, (b) 需要治疗的胃轻瘫既往病史, (c) 影响上消化道的手术既往史(可能影响对安全性和耐受性数据的解释), (d) 导致未经胆囊切除术治疗的急性胆囊炎发作的胆石症病史, 或已知胆道疾病病史, 以及(e) 血清降钙素提示甲状腺C细胞增生(降钙素水平 $>50\text{ng/L}$), 甲状腺髓样癌, 或筛查时多发性内分泌肿瘤史或家族史;

●GI、肾脏或肝脏疾病(吉尔伯特氏综合征除外) 或任何其他已知干扰药物吸收、分布、代谢或排泄的病症史或存在;

●癌症病史(任选地在过去10年内), 非黑瘤皮肤癌除外;

●糖尿病足溃疡病史或存在;

●在第1天给药前的4周内任何临床重要疾病(对于患有已知糖尿病的受试者, 除了T2DM外)、医疗/外科手术或创伤;

●胰岛素减少或血糖控制不良的症状(例如, 显著的口渴、夜尿、多尿、烦渴或体重减轻);

●空腹血糖 $\geq 200\text{mg/dL}$ (11.1mmol/L);

●筛查时阳性乙肝表面抗原或丙肝病毒抗体血清学;

●根据病史或受试者的口头报告确定的筛查时的阳性人体免疫缺陷病毒(HIV) 检测或受试者服用抗逆转录病毒药物;

●筛查时天冬氨酸转氨酶(AST) $\geq 2.5 \times \text{ULN}$;

●筛查时丙氨酸转氨酶(ALT) $\geq 2.5 \times \text{ULN}$;

●筛选时总胆红素 $\geq 2 \times \text{ULN}$;

●血红蛋白低于筛查时正常范围的下限;

●筛选时中性粒细胞 $< 1.5 \times 10^9/\text{L}$;

●筛查时促甲状腺激素(TSH) 水平高于正常范围;

●肾功能受损定义为肾小球滤过率(GFR) $\leq 60\text{mL/分钟}/1.73\text{m}^2$ (根据肾病的修改(Modification in Renal Disease) 估计的GFR);

●持续性(定义为由受试者常规医生开具证明文件 ≥ 2 次先前记录) 大量清蛋白尿($> 300\text{mg/L}$);

●显著晚期糖尿病并发症(伴有充血性心脏病或外周动脉疾病症状的大血管病变, 伴有神经病变症状的微血管病变, 胃轻瘫, 视网膜病变, 肾病);

●筛选期间心脏传导缺陷(例如, 沃尔弗-帕金森-怀特氏综合症, 病态窦房结综合症)。

●仰卧休息10分钟后生命体征异常, 定义如下: (a) 如果 < 60 岁, 收缩压 $< 90\text{mm Hg}$ 或 $\geq 140\text{mm Hg}$; 如果 ≥ 60 岁, 收缩压 $< 90\text{mm Hg}$ 或 $\geq 150\text{mm Hg}$, (b) 舒张压 $< 50\text{mm Hg}$ 或 $\geq 90\text{mm Hg}$, 或(c) HR < 45 或 > 85 次/分钟;

●节律、传导或静息心电图的形态上的任何临床重要异常或12联导心电图中的任何异常可能会干扰对QTc间期变化的解释, 包括异常ST-T波形态或左心室肥厚;

●延长的QTcF > 450 毫秒(男女两性) 或缩短的QTcF < 340 毫秒, 或长QT综合症的家族

史；

●PR (PQ) 间隔缩短<120毫秒(如果没有心室预激的证据,则PR<120毫秒但>110毫秒是可接受的)；

●PR (PQ) 间期延长(>240毫秒),间歇性二级或三级AV阻滞或AV解离；

●QRS持续时间>120毫秒,包括持续或间歇性束支传导阻滞

●可植入式心脏除颤器或永久起搏器,以及症状性心室和/或房性快速心律失常；

●分类高于加拿大心血管学会II级的不稳定型心绞痛或稳定型心绞痛,或心肌梗死或中风；

●由心力衰竭或心力衰竭诊断引起的住院史；

●过去3年内已知或疑似滥用药物史；

●过去3年内酗酒或过量饮酒史；

●筛选或进入研究病房时滥用药物的阳性筛查,或在给予研究产品前进入病房时的酒精阳性筛查。利用苯并二氮杂卓治疗慢性焦虑症或睡眠障碍的患者可被允许进入该研究；

●严重过敏/超敏反应或持续的临床重要过敏/超敏反应史；

●全血或红血球捐赠,或在筛查前2个月期间任何失血>500mL；

●接受的另一种新的化学实体(定义为尚未批准上市的化合物),或已参与任何其他临床研究,其中包括在该研究中第一次给予研究产品之前至少30天或5个半衰期内(以较长者为准)的药物治疗。在最终剂量后或最后一次就诊后(以最长者为准),研究产品开始30天或5个半衰期的排除期。不排除经同意和筛选、但未被随机分入本研究或之前的1期研究的受试者；

●同时参加另一项任何类型的研究；

●使用以下任何一种药品：(a) 同时或以前使用GLP-1激动剂, (b) 在筛选前28天内使用全身性皮质类固醇；(c) 使用已知可延长QTc间期的化合物,或 (d) 在第1天前的1周内使用任何获准用于控制体重或食欲的草本制剂或药品；

●精神疾病,使受试者通过官方或司法命令被某一机构收纳；以及

●乳酸酸中毒或酮症酸中毒史。

(B) 研究设计

[0222] 分两部分(A和B)进行1/2期、随机、双盲、多次递增剂量研究。图13中提供了该研究的流程图。A部分在维持二甲双胍治疗的T2DM受试者中建立了持续约12天的G933(MEDI0382)的剂量调整方案和滴定后的最大有效剂量,然后在延长的给药期(B部分)使用,以建立G933对体重和血糖控制的功效。

[0223] A部分由3个组群组成。组群1由稳定剂量(例如,100μg)的研究产品组成,每天给予,持续7天(9名受试者；6名G933,3名安慰剂)。组群2由以下组成：初始剂量(例如,100μg)的研究产品,持续4天,和上调滴定步骤(滴定剂量1；例如150μg),持续7天(9名受试者；6名G933,3名安慰剂)；以及组群3由以下组成：初始剂量(例如,100μg)的研究产品,持续4天,上调滴定步骤(滴定剂量1；例如150μg),持续4天,和第二上升滴定步骤(滴定剂量2,例如,200μg),持续7天,(9名受试者；6名G933,3名安慰剂)。

[0224] B部分由1个组群组成。该组群中的受试者(组群4)以以下剂量给药：初始剂量(例如,100μg)的研究产品,持续4天,上调滴定步骤(滴定剂量1；例如150μg),持续4天,第二上

调滴定步骤(滴定剂量2;例如200 μ g),持续4天,并且然后在家中的滴定剂量2(例如200 μ g),持续28天(48名受试者;24名G933,24名安慰剂)。

[0225] 初始剂量为100 μ g。滴定剂量1和2不超过300 μ g。每个受试者的研究持续时间因组群而异,并且包括住院多次递增剂量(MAD)或上调滴定评估期(在第-2天开始,并且组群1在第8天后结束,组群2在第12天后结束,组群3在第16天后结束,以及组群4在第13天后结束)和门诊随访期。此外,仅对于组群4,在第二次住院上调滴定步骤之后和研究访视结束之前,包括28天的在家自我给予研究产品(每周实地访视)。

[0226] 受试者在接受研究产品之前的两个晚上入院,以允许重复评估资格标准和基线混合进餐测试(MMT)并在第二天早晨给药之前标准化身体活动水平。在第1天,在禁食过夜至少8小时后,针对安全性、功效、药代动力学(PK)、药效学(PD)和抗药物抗体(ADA)实验室测试绘制基线血液样品。此外,记录12导联ECG,并且给予受试者单次SC剂量的G933或安慰剂。

[0227] 受试者仍留在观察和安全测试设施中,包括ECG、遥测、生命体征监测、以及注射部位的评估,以便在一天中和治疗期间进行潜在反应。此外,对于组群4,进行24小时动态血压监测(ABPM)。

[0228] 混合进餐测试(MMT)程序在第-1天和所有组群达到最高剂量水平的最后一天进行。另外的时间点包括滴定剂量1的第一天(组群2),滴定剂量2的第一天(组群3),从上调滴定住院期间出院的那天(滴定剂量2的第五天;组群4),以及在家里自我给予的28天期间的每周实地访视(组群4)。对于MMT,受试者在5分钟内消耗标准化膳食(Ensure Plus®),并且就在消耗标准化膳食之后的240分钟之前和整个时间段获得用于测量葡萄糖和与葡萄糖代谢相关的参数的定时连续血液样品。在住院期间,在早餐、中午和晚餐之前15分钟和之后2小时以及在睡觉之前收集手指刺破葡萄糖样品。

[0229] 组群4受试者在家里自我给予期结束时重新入院,过夜住院,以收集最终终点。

[0230] 在多个时间点测量体重,包括(但不限于)第一剂量之前,住院给药期期间(以及组群4的门诊期间),从病房离开时以及7至14天随访时。

[0231] 在给药前和给药后以及在组群的不同时间点直至最后剂量的G933后48小时获得G933的药代动力学样品。在G933给药之前获得二甲双胍浓度的样品。在给药前和在最终剂量后28天的不同时间点获得抗药物抗体样品。

[0232] 在该研究中给予最终剂量后的第二天,使受试者离开该病房。在最后剂量的研究产品后约28天进行最后安全性评估的随访。

(C) 功效评估

[0233] 为了评估与安慰剂相比,多剂量G933后对葡萄糖控制和体重的影响,使用协方差分析,通过针对基线测量和治疗组进行调整,比较G933和安慰剂组之间MMT葡萄糖AUC的百分比变化(MMT后直至240分钟)和从基线(第-1天)到组群4中治疗结束的体重变化。将治疗结束时缺失的测量值替换为最后可获得的测量值。以0.1的双侧显著性水平进行比较。与安慰剂组相比,G933治疗组中体重减轻(例如,在4周重复每日一次给药期间,1.3kg至2.0kg)表明G933,例如剂量为100 μ g-300 μ g,对减轻体重是有效的。

[0234] 将血红蛋白A1c(糖化血红蛋白,HbA1c)和果糖胺从基线(第-2天)的变化,以及MMT后24小时葡萄糖AUC中从基线(第-1天)的变化百分比在组群4中进行分析,类似于重量评估。24小时葡萄糖AUC分析包括来自MMT前/后葡萄糖代谢组的葡萄糖测量值以及血清化学

葡萄糖水平和PD葡萄糖样品,其中这些结果来自不同的时间点。与安慰剂组相比,G933治疗组中葡萄糖控制的增加(例如,混合进餐测试(MMT)后浓度-时间曲线(AUC)下的葡萄糖面积减少至少20%和/或如血红蛋白A1c和果糖胺测定的)表明G933,例如,剂量为100 μ g-300 μ g,可有效改善葡萄糖控制。

(D) 结果

(i) A部分:组群1-3

[0235] G933成功地以每天一次(QD)高达200 μ g的剂量给予持续长达15天。

[0236] 在空腹血浆葡萄糖和来自混合进餐测试的餐后葡萄糖中观察到用G933将葡萄糖显著降低至正常水平。在混合进餐测试中,在组群1-3中曲线下葡萄糖面积(AUC)减少了>40%。(图14。)组群1(第7天)和组群3(第9天和第15天)的基线空腹葡萄糖水平的变化显示在图15中。

[0237] 观察到趋向实质体重减轻多达2kg的剂量依赖性趋势。结果显示在图16中,并证明G933显著降低了患有2型糖尿病的超重/肥胖患者的体重。在组群3中,观察到超过2kg的差异。

[0238] 通过剂量调整,G933对高达200 μ g良好耐受。重复给药后的药代动力学如图17所示。PK是线性的和可预测的。半衰期约为11小时。在每日多次给药后存在极少或没有积累,并且在第4天和第7天之间实现稳态。测试的剂量范围内的最大血浆浓度为4.21ng/mL和18.90ng/mL。每日平均暴露量介于2.89ng/mL和12.45ng/mL之间。

[0239] 在基线后,仅有一个样品被证实为对抗G933抗体阳性。

[0240] 不良事件是可管理的,与GLP-1单激动剂所预期一致。

[0241] 报告的绝大多数恶心和呕吐事件发生在治疗开始时,即100 μ g剂量水平。接受G933的患者中的26%(n=5)中发生呕吐,并且安慰剂组无一例发生呕吐。在组群1中,没有报告呕吐事件。在组群2中,两名活跃患者报告了三次呕吐事件。两种情况均在给药第1天以100 μ g水平发生,并且两种情况均在没有干预的情况下解决。在组群3中,三名活跃患者报告了十三个呕吐事件。两名受试者在第1天呕吐,并且这些病例在没有干预的情况下得到解决。一名受试者在第1天和第5天之间呕吐6次。在第3天给予静脉盐水,并在第5天撤出受试者。

[0242] 在4名(44.4%)安慰剂患者和7名(36.8%)用G933治疗的患者中报告了心脏不良事件。他们的频率似乎没有随着活跃组群的剂量而增加。在用G933处理后,在每个组群中观察到脉搏速率增加约10bpm。没有观察到收缩压或舒张压的显著变化,但是在接受G933或安慰剂的所有组群中观察到血压下降的趋势。

[0243] 在4名(44.4%)安慰剂患者和13名(68.4%)用G933治疗的患者中报告了胃肠道(GI)不良事件。胃肠道不良事件分别影响组群1、2和3中的3、4和6名患者。最常见的胃肠道不良事件是恶心,据报道在用G933治疗的患者中有6例(31.6%)。

[0244] 在组群3中用G933治疗的患者中有6例(85.7%)报告食欲下降。

[0245] 报告了一例严重不良事件(SAE):支原体肺炎。

[0246] 总之,G933耐受性良好,导致餐后葡萄糖显著降低,并显示出临床上显著的剂量依赖性体重减轻。

(ii) B部分:组群4

[0247] G933在41天的给药期内有效降低血糖和体重减轻。从基线(第1天)到第41天的曲

线下葡萄糖面积 (AUC) 的平均减少显示在图18中。在此期间, G933导致减少38.5% (90% C.I. -47.1, -29.0), 而安慰剂仅减少16.1% (90% C.I. -24.9, -8.0) (p 值: 0.001)。如通过HbA1c测量, G933也改善了葡萄糖控制 (见图19)。治疗41天后, HbA1c降低了0.92%, 在第42天从基线平均值7.2%降低至平均值6.3%。相比之下, 安慰剂仅使HbA1c降低了0.58%, 从基线平均值7.3%降低至平均值6.7%。

[0248] G933对体重的影响显示在图20和21中。图20显示在用G933治疗41天后, 患者减轻约3.83kg, 而接受安慰剂的患者仅减轻约1.71kg (G933和安慰剂之间的差异为2.12kg; $p < 0.001$)。此外, 44%的接受G933治疗的患者至少减轻5kg, 而接受安慰剂治疗的患者中只有8%至少减轻5kg。图21显示, 在用G933治疗41天后, 患者体重减轻约4.18%, 而接受安慰剂的患者体重仅减轻约1.71% (G933与安慰剂之间差异为2.47%; $p < 0.001$)。此外, 84%的接受G933治疗的患者体重至少减轻2%, 而接受安慰剂治疗的患者中只有42%体重至少减轻2%。

[0249] 用G933治疗也导致肝脏脂肪减少。(参见图22。) G933相对于安慰剂的从基线 (95% CI) 的肝脏脂肪百分比的平均相对降低为20.5% (7.2, 33.9) ($p = 0.004$)。与安慰剂相比, 用G933治疗的患者中也观察到肝脏体积显著减少 (0.14L (-0.24, -0.03), $p = 0.01$)。

[0250] 总体而言, 用G933和安慰剂治疗的患者的不良反应是均衡的。不良反应总结在下表中。未出现死亡。

使用	安慰剂 的患者 N = 26	200 µg G933 N = 25
至少一个事件	21 (80.8%)	22 (88.8%)
至少一个 G933 相关事件	15 (57.7%)	20 (80.0%)
至少一个 ≥ 3 级严重性的事件	2 (7.7%)	0
死亡 (5 级严重性)	0	0
至少一个严重事件	1 (3.8%)	0
至少一个严重和/或 ≥ 3 级严重性事件	2 (7.7%)	0
至少一个 G933 相关严重事件	1 (3.8%)	0
至少一个导致 G933 停用的事件	1 (3.8%)	3 (12.0%)

[0251] 共有17名患者报告恶心: 4名接受安慰剂 (15.4%), 和13名用G933治疗 (52.0%)。共有8名患者呕吐: 0名接受安慰剂治疗, 和8名患者用G933治疗 (32.0%)。在早期剂量期间, 恶心和呕吐更频繁。(参见图23。)

[0252] 没有观察到心脏和血液动力学参数的不良变化。没有观察到收缩压或舒张压的增加。在第13天观察到心率增加12.8次/分钟 (bpm), 但是到第41天该数值已经下降到6.9bpm。

[0253] 总体而言, G933对于41天的血糖降低和体重减轻都是有效的。将基于混合进餐测试的葡萄糖代谢归一化并伴随着HbA1c的显著降低。值得注意的是, 观察到对于体重减轻的更高点估计, 这是用利拉鲁肽 (3mg) 治疗可以预期的。

[0254] 使用从100 μ g至200 μ g的上调剂量,G933良好耐受性高达41天,证实在以200 μ g治疗的一周内达到稳态,并且在多次给药后累积最小。在200 μ g剂量水平下观察到的最大血浆浓度范围在1.98ng/mL和34.30ng/mL之间。

实例6:多次递增剂量研究第II部分

(A) 受试者

[0255] 招募约32名患有相对良好控制的2型糖尿病 (T2DM) 的超重或肥胖受试者参与该研究。招募的受试者符合实例5中描述的纳入和排除标准,但以下例外:

[0256] 入选标准:

●在筛选期间,在初始自我注射安慰剂(或生理盐水)后,组群5和6受试者必须愿意并且能够每日自我给予皮下(SC)注射。

[0257] 排除标准:

●在仰卧休息10分钟后,生命体征异常被定义为以下任何一种:(a) 如果收缩压<90mm Hg或 $\geq$ 140mm Hg;(b) 舒张压<50mm Hg或 $\geq$ 90mm Hg;或(c) HR<45或>85bpm;

●分类高于加拿大心血管学会II级的不稳定型心绞痛或稳定型心绞痛,或任何心肌梗死或中风既往病史,或在先前12个月内发生短暂性脑缺血发作的病史。

(B) 研究设计

[0258] 进行随机、双盲、多次递增剂量研究。图24中提供了该研究的流程图。该研究由2个组群组成:组群5和组群6。组群5由16名受试者(12名活性,4名安慰剂)组成,其开始以100 μ g给药G933(MEDI0382)5天,然后以150 μ g给药5天,以200 μ g给药5天,和以300 μ g给药7天。组群6由另外的16名受试者(12名活性,4名安慰剂)组成,其开始以100 μ g给药G933 5天,然后以200 μ g给药5天,和以300 μ g给药7天。组群5和6具有总共约32名受试者并且并行运行。

[0259] 该研究由以下组成:对于组群5和6,从第3天开始的住院上调滴定评估期,和门诊随访期。以300 μ g给药的前4天和最后一天是住院。

[0260] 如实例5中针对组群1-4所述,使受试者入院。然而,他们具有在第3天结束的初始住院期,随后是在家自我给予G933,在每个剂量上调滴定步骤中进行临床访问,直到开始300 μ g剂量。受试者具有第二个住院期,用于开始300 μ g剂量,在该剂量的第四天结束,然后进行在家自我给予。

[0261] 混合进餐测试(MMT) 程序在第-1天和达到最高剂量水平的最后一天进行。另外的时间点包括在开始300 μ g剂量之前(组群5的第16天和组群6的第11天),以及在给药结束时(组群5的第22天和组群6的第17天)。如实例5中所述进行MMT。

[0262] 在多个时间点测量体重,包括(但不限于)第一剂量之前,住院给药期期间,和门诊期期间,从病房出院时,7至14天随访时,以及28天研究访视结束时。

[0263] 在给药前和给药后以及在组群的不同时间点直至最后剂量的G933后48小时获得G933的药代动力学样品。在G933给药之前获得二甲双胍浓度的样品。在给药前和在最终剂量后28天的不同时间点获得抗药物抗体样品。

[0264] 在该研究中给予最终剂量后的第二天,使受试者离开该病房。在最后剂量的研究产品后约28天进行最后安全性评估的随访。

(C) 结果

[0265] G933在组群5和组群6中有效降低了葡萄糖。在组群5和6中观察到的葡萄糖AUC水

平分别显示在图25和26中。在组群5中,用G933治疗导致葡萄糖AUC降低41.7% (90% C.I. -49.9, -33.5), 而安慰剂治疗仅导致葡萄糖降低8.0% (90% C.I. -19.6, 3.6) ($p < 0.001$)。在组群6中,用G933治疗导致葡萄糖AUC降低35.8% (90% C.I. -43.3, -28.3), 而安慰剂治疗仅导致葡萄糖降低-6.9% (90% C.I. -20.2, 6.3) ($p = 0.002$)。对葡萄糖AUC的影响与先前的组群相当,即归一化约40%的降低。图27中显示了所有组群中从基线葡萄糖AUC的百分比变化。如图28所示,G933还有效降低了组群5和6中的空腹血糖水平。

[0266] G933在减轻体重方面也很有效。如图29所示,在治疗22天后,在组群5中用G933治疗的患者减轻约3.09kg,而用安慰剂治疗的患者仅减轻约0.98kg (相差2.11kg)。类似地,在治疗17天后,在组群6中用G933治疗的患者减轻约2.23kg,而用安慰剂治疗的患者仅减轻约0.35kg (相差1.88kg)。组群5 (2.11kg) 和6 (1.88kg) 二者在第22天和第17天后均显示出与在组群4中给药41天期间观察到的相当的体重减轻。

[0267] 将重量和葡萄糖水平的变化一起绘制在图30中,并总结在下表22中。

表22

组群 N = 活性	重量 (kg)	葡萄糖 AUC	空腹葡萄糖 (mg/dl)
1 100 ug n = 6	-1.1	-27.3	-28.00
2 150 ug n = 6	-0.5	-8.9	-17.90
3 200 ug n = 6	-2.4	-31.6	-43.20
4 200 ug n = 25	-2.11	-22.5	-32.62
5 300 ug n=12	-2.11	-33.7	-24.40
6 300 ug n=12	-1.88	-28.9	-36.94

[0268] G933在组群5和6中耐受良好,并且不良事件状况与其他市售的GLP-1类似物(如利拉鲁肽)一致。两个群组均未观察到死亡或严重不良事件。

[0269] 两种滴定方案均证明,就恶心和呕吐而言,高达300 μ g剂量的G933具有良好的耐受性。在组群5中,共有4名患者报告了8次恶心发作:1名患者(20%)接受安慰剂治疗,和3名患者(27.3%)接受G933治疗。共有3名患者报告了8次呕吐事件:没有接受安慰剂的患者(0%)和3名接受G933的患者(27.3%)。在组群6中,共有5名患者报告了6次恶心发作:没有接受安慰剂的患者(0%)和5名接受G933的患者(41.7%)。一名患者呕吐两次:没有接受安慰剂的患者(0%)和1名接受G933的患者(8.3%)。在第一次给药后48小时,当受试者是门诊患者时,观察到较低比率的恶心(8/24=33%)和呕吐(4/24=16%)。

[0270] 动态血压测量显示G933治疗的患者中的收缩压/舒张压(SBP/DBP)与基线相比没有增加,并且可能趋于减少。在组群5中,在给予G933 22天后,心率从基线增加了约7.6次/分钟(BPM),与之前观察到的和其他GLP-1类似物以及组群4中的情况一致。在组群6中,在给予G933 17天后,心率从基线增加约5.9BPM。

[0271] 用两种滴定方案获得的最高剂量300 μ g 7天后的血浆G933浓度显示在图31中。曲线重叠,尤其一旦达到稳定状态,表明在该剂量水平下的暴露与所采用的滴定方案无关。在300 μ g剂量时观察到的最大血浆浓度范围为7.9ng/mL至30.9ng/mL。

多次递增剂量研究结果总结(第I部分和第II部分)

[0272] 总体而言,在100 μ g-300 μ g的剂量范围内,G933显示线性PK,半衰期为约8小时-11

小时,每日重复剂量后的最小积累,以及以所有四个测试的剂量水平的第4天和第7天之间的稳态实现。结果证实了来自单剂量研究的结果(实例4)。在最高剂量300 μ g 7天后达到的血浆浓度与所采用的滴定方案无关。 C_{max} 中的受试者间变异性在较小的组群中约为20-30%,并且在较大的组群4中为40Weight(-50%。在所测试的剂量范围内和具有采用的滴定方案的最大血浆浓度范围在1.98ng/mL和34.3ng/mL之间,平均每日血浆浓度在0.87ng/mL和16.3ng/mL之间。

[0273] 安全性和耐受性特征与其他GLP-1模拟物相当,并且显著地,G933导致体重减轻和葡萄糖控制。

[0274] 本披露范围不受所描述的具体实施例的限制,这些实施例意欲作为本披露的单独方面的简单说明,并且在功能上等效的任何组合物或方法均处于本披露的范围内。事实上,除了在此示出并且描述的那些,本披露的各种改变从前述说明书和附图对于本领域技术人员来说将变得清楚。这类改变旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0275] 本说明书提到的所有公开和专利申请均通过引用结合在此,引用程度就如同每个单独公开或专利申请特定地并且单独地指示通过引用结合在此一般。

<110> 医学免疫有限公司(MedImmune LIMITED)

JERMUTUS, Lutz

AMBERY, Philip Duncan

BEDNAREK, Maria A.

PETRONE, Marcella

<120> 用于治疗肥胖症的胰高血糖素和GLP-1共激动剂

<130> GLPGG-200-PCT

<150> 62/306,121

<151> 2016-03-10

<160> 26

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20 25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa是Gly或Ser
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa是Tyr或Lys
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12) .. (12)
<223> Xaa是Lys、Glu、Arg或Ser
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (13) .. (13)
<223> Xaa是Lys或Tyr
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (15) .. (15)
<223> Xaa是Asp或 Glu
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (16) .. (16)
<223> Xaa是Ser或Gly
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (17) .. (17)
<223> Xaa是Glu、Arg、Gln或Lys
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (18) .. (18)
<223> Xaa是Arg、Ser或Ala
<220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa是Arg、Lys或Gln
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (21) .. (21)
 <223> Xaa是Asp或Glu
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (23) .. (23)
 <223> Xaa是Val或Ile
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (24) .. (24)
 <223> Xaa是Ala或Gln
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa是Glu或Val
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (28) .. (28)
 <223> Xaa是Ala或Lys
 <220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (30) .. (30)
 <223> Xaa是Gly或Arg
 <400> 4

His	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Trp	Leu	Xaa	Xaa	Gly	Xaa		
			20						25					30	

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa是Tyr或Lys

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa是Lys、Glu、Arg或Ser

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (13) .. (13)

<223> Xaa是Lys或Tyr

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa是Glu、Arg、Gln或Lys

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa是Arg、Ser、或Ala

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (27) .. (27)

<223> Xaa是Glu或Val

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser

1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly

20 25 30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa是Tyr或Lys

<220>

<221> 尚未归类的特征
 <222> (12) .. (12)
 <223> Xaa是Lys、Glu、Arg或Ser
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa是Lys或Tyr
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa是Glu或Val
 <400> 6
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
 20 25 30
 <210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa是Tyr或Lys
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12) .. (12)
 <223> Xaa是Lys、Glu、Arg或Ser
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa是Lys 或Tyr
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa是Glu或Val
 <400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa是Lys、Glu或Arg

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa是Lys、Glu、Arg或Ser

<400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 14

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<400> 15

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Ser	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (13) .. (13)

<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸

<400> 16

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Val	Ala	Gly	Gly		
			20					25					30		

<210> 17

<211> 30

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (10)
<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸
<400> 17
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30
<210> 18
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (10)
<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸
<400> 18
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30
<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10) .. (10)
<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸
<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Glu Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10) .. (10)

<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 21

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10) .. (10)

<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10) .. (10)

<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Glu Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的GLP-1/胰高血糖素肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (17) .. (17)

<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸

<400> 23

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Lys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Val Ala Gly Gly

20 25 30

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G931

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (13) .. (13)

<223> 具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸

<400> 24

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Lys Leu Asp Ser

1 5 10 15

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly

	20	25	30
<210>	25		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	G934		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(10) .. (10)		
<223>	具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸		
<400>	25		
	His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Glu Gly		
	1 5 10 15		
	Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Glu Lys Gly Arg		
	20 25 30		
<210>	26		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	G973		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(10) .. (10)		
<223>	具有通过 γ 谷氨酸接头与 ϵ 氮缀合的棕榈酰基团的赖氨酸		
<400>	26		
	His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ser Tyr Leu Asp Ser		
	1 5 10 15		
	Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly		
	20 25 30		

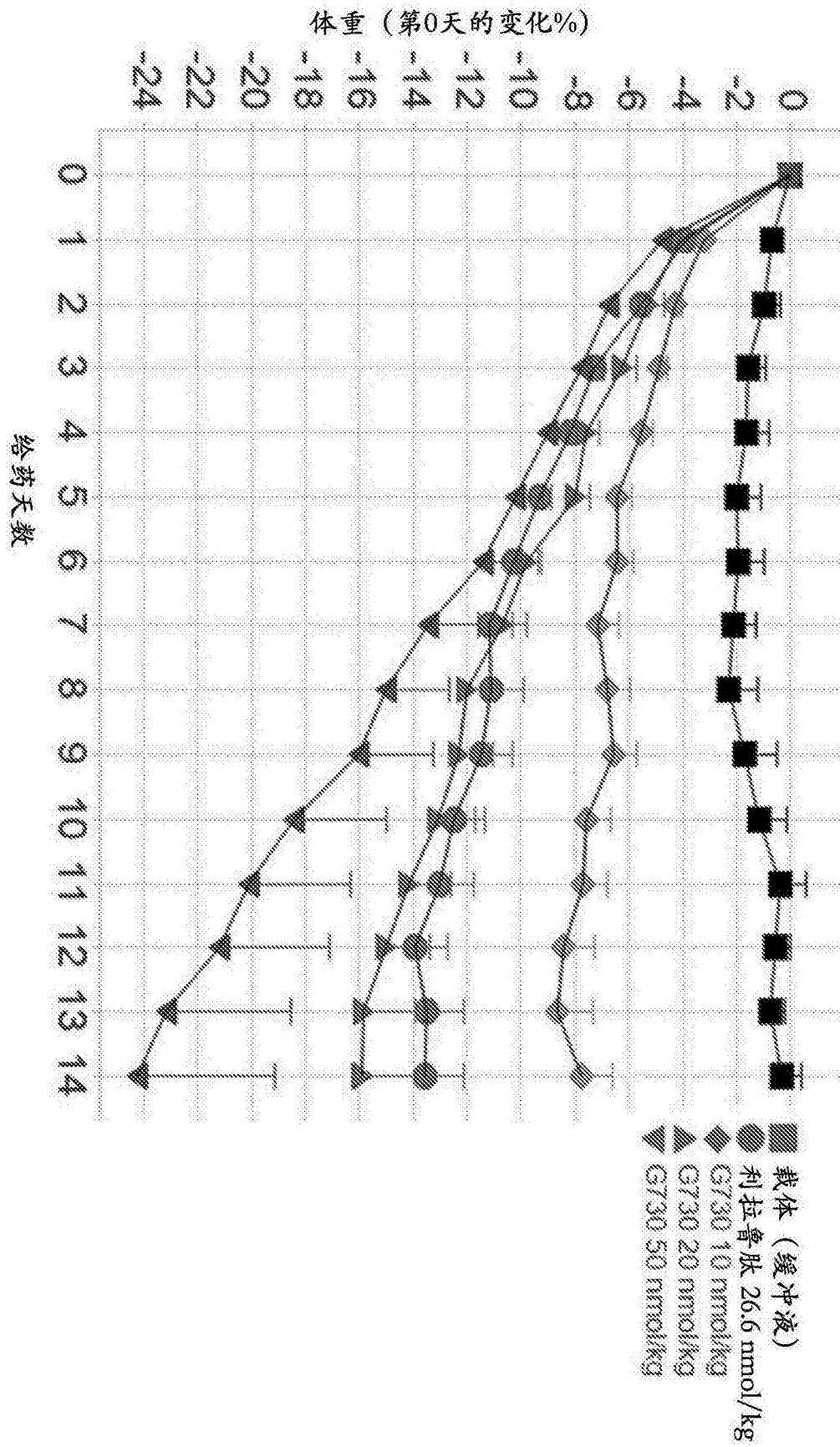


图1

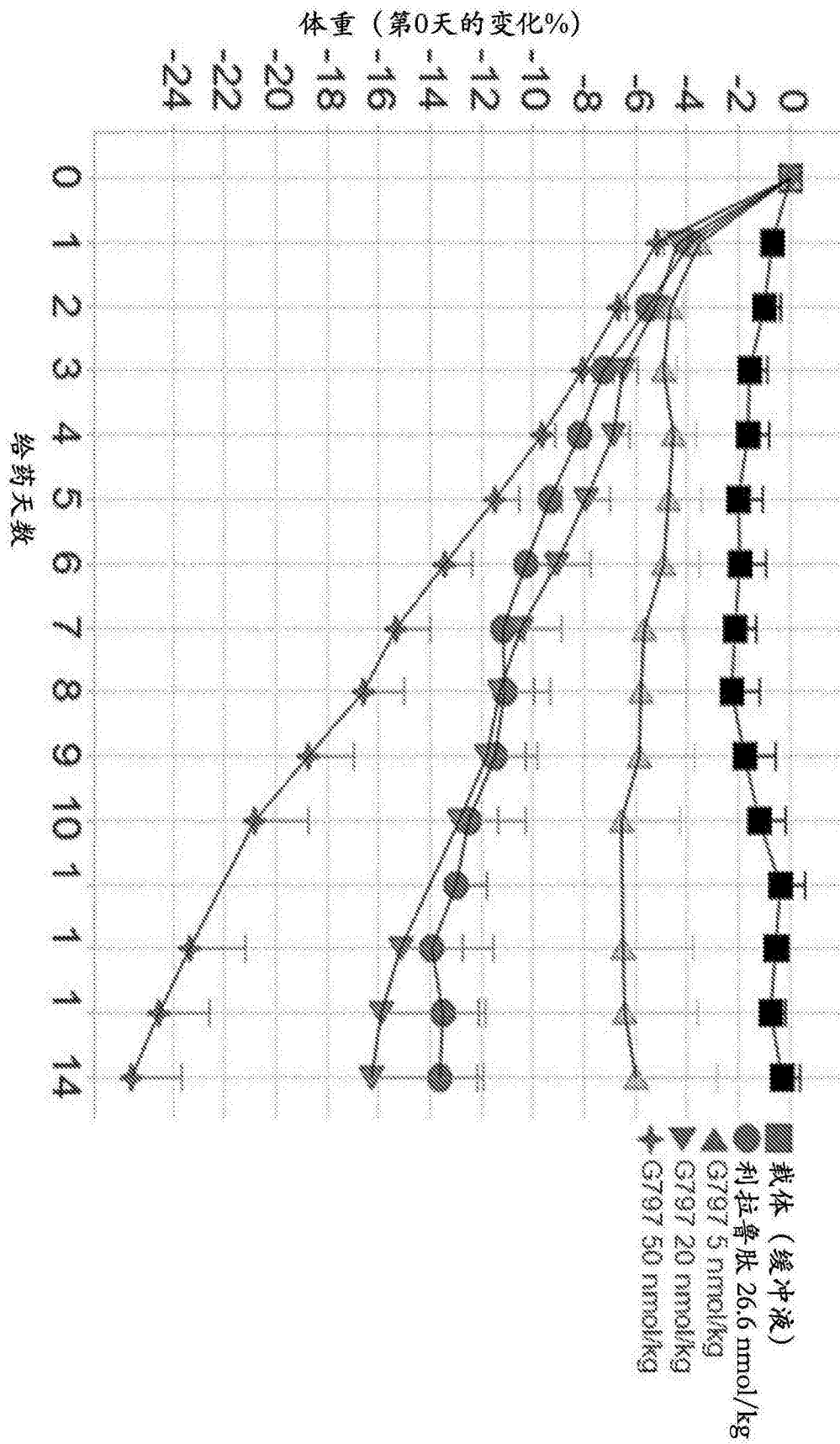


图2

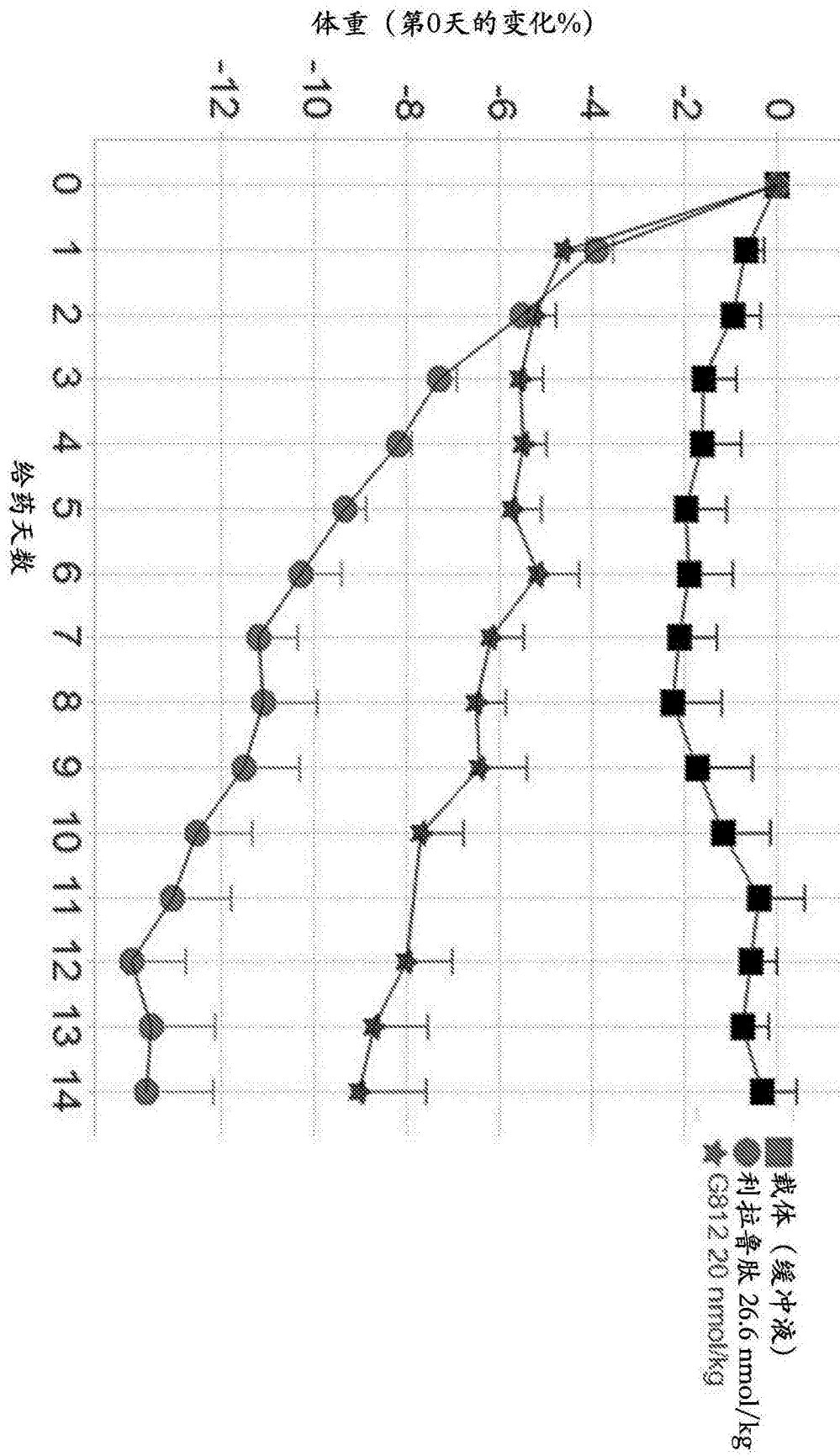


图3

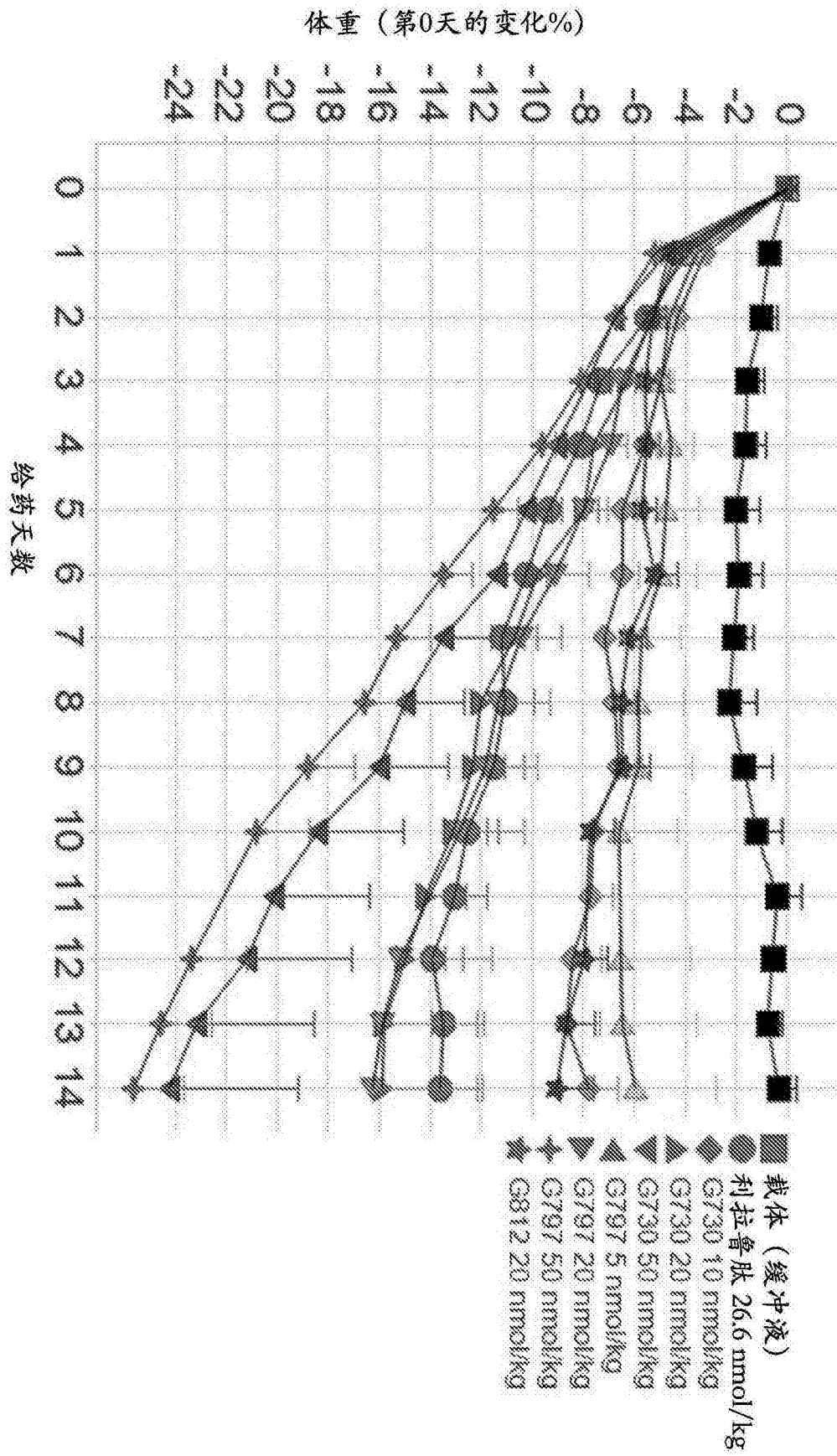


图4

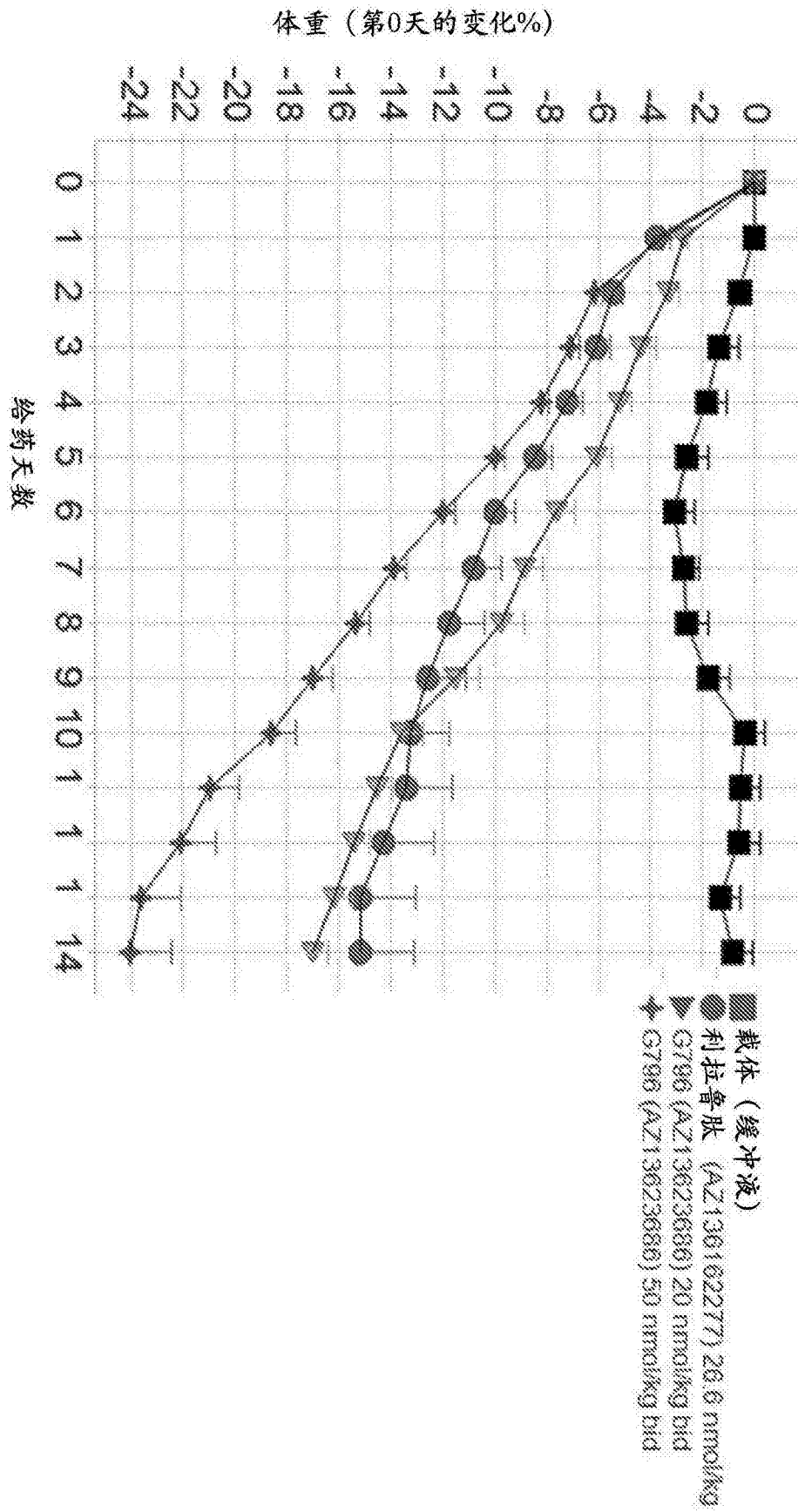


图5

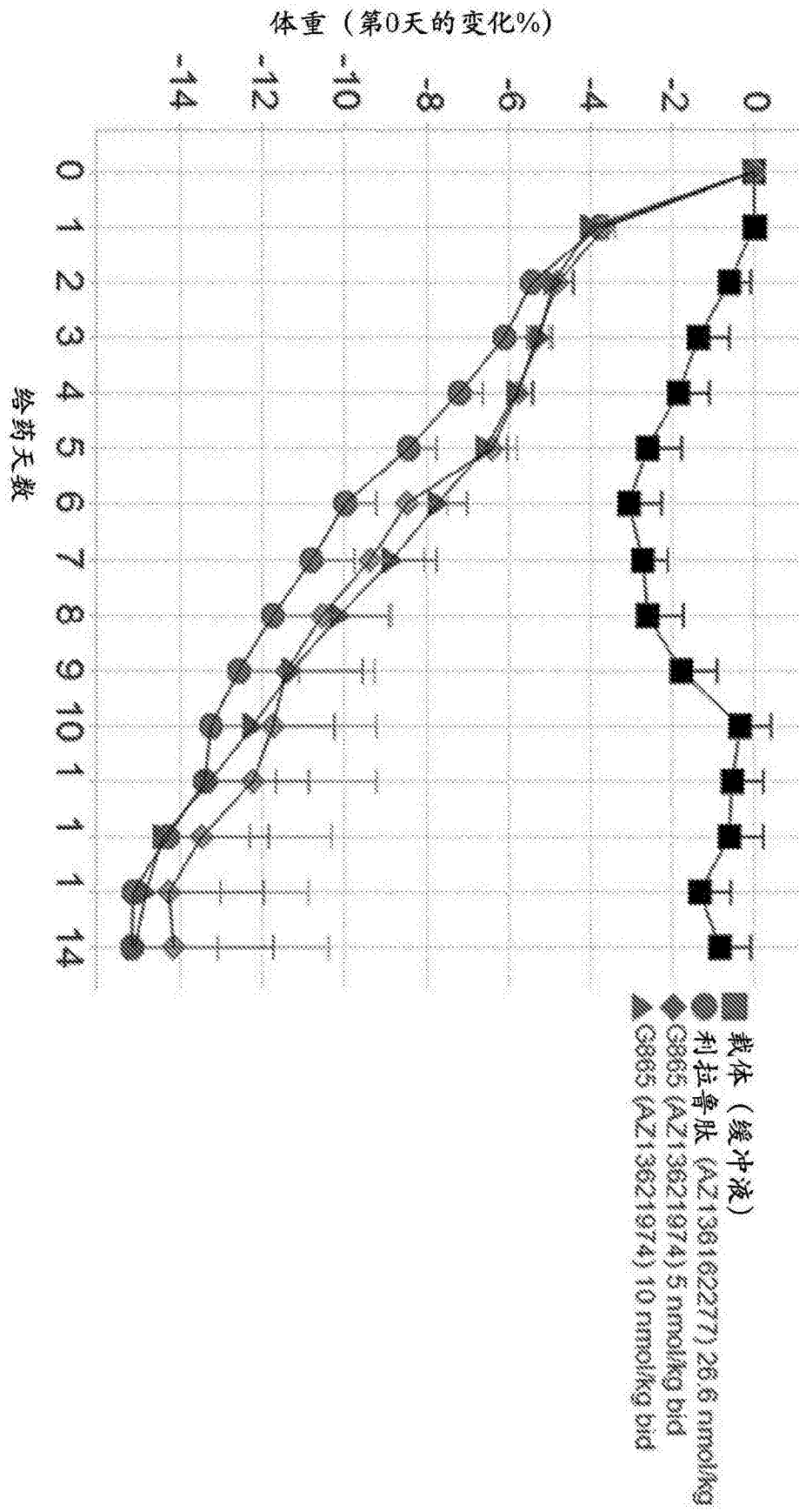


图6

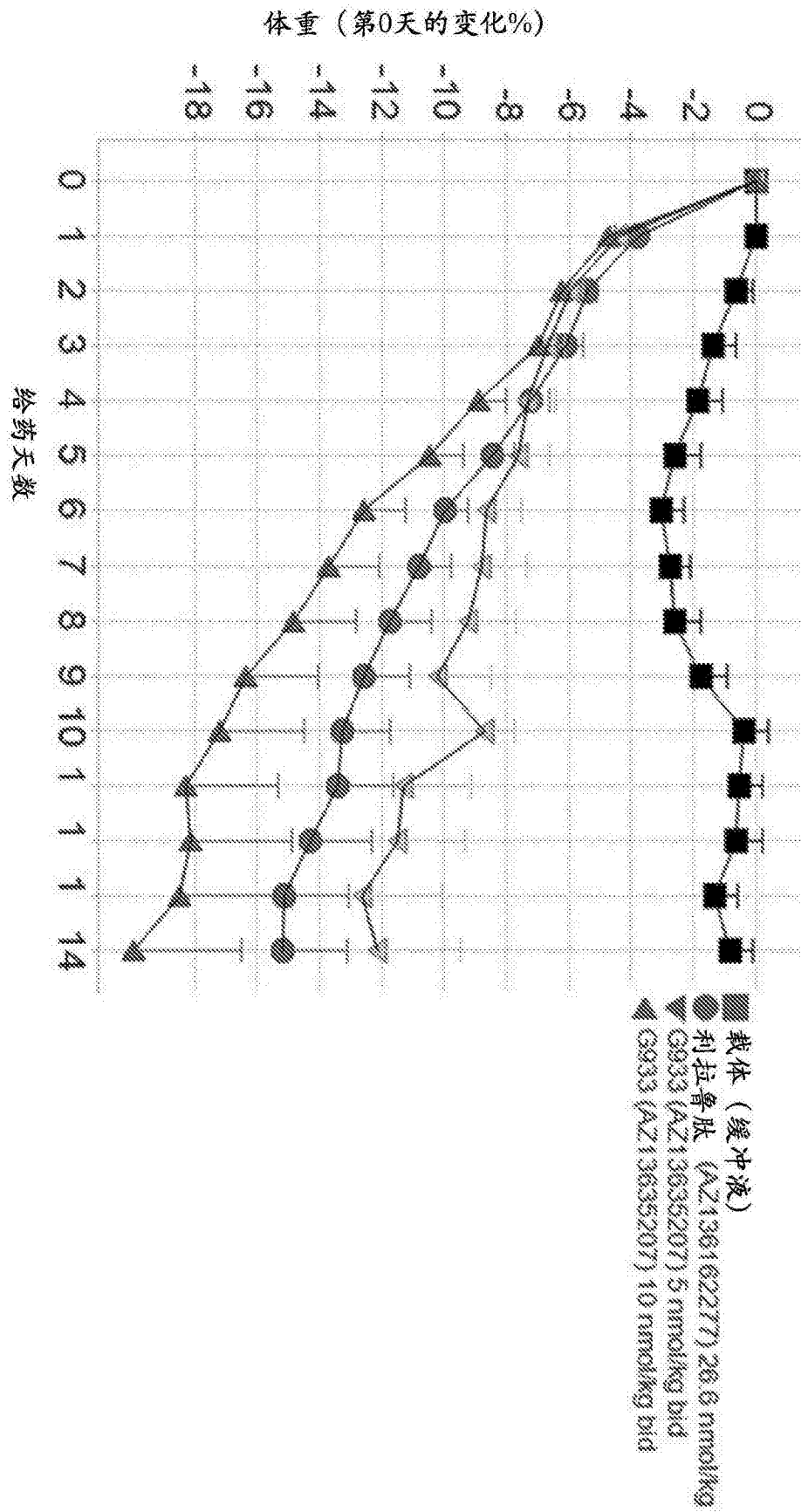


图7

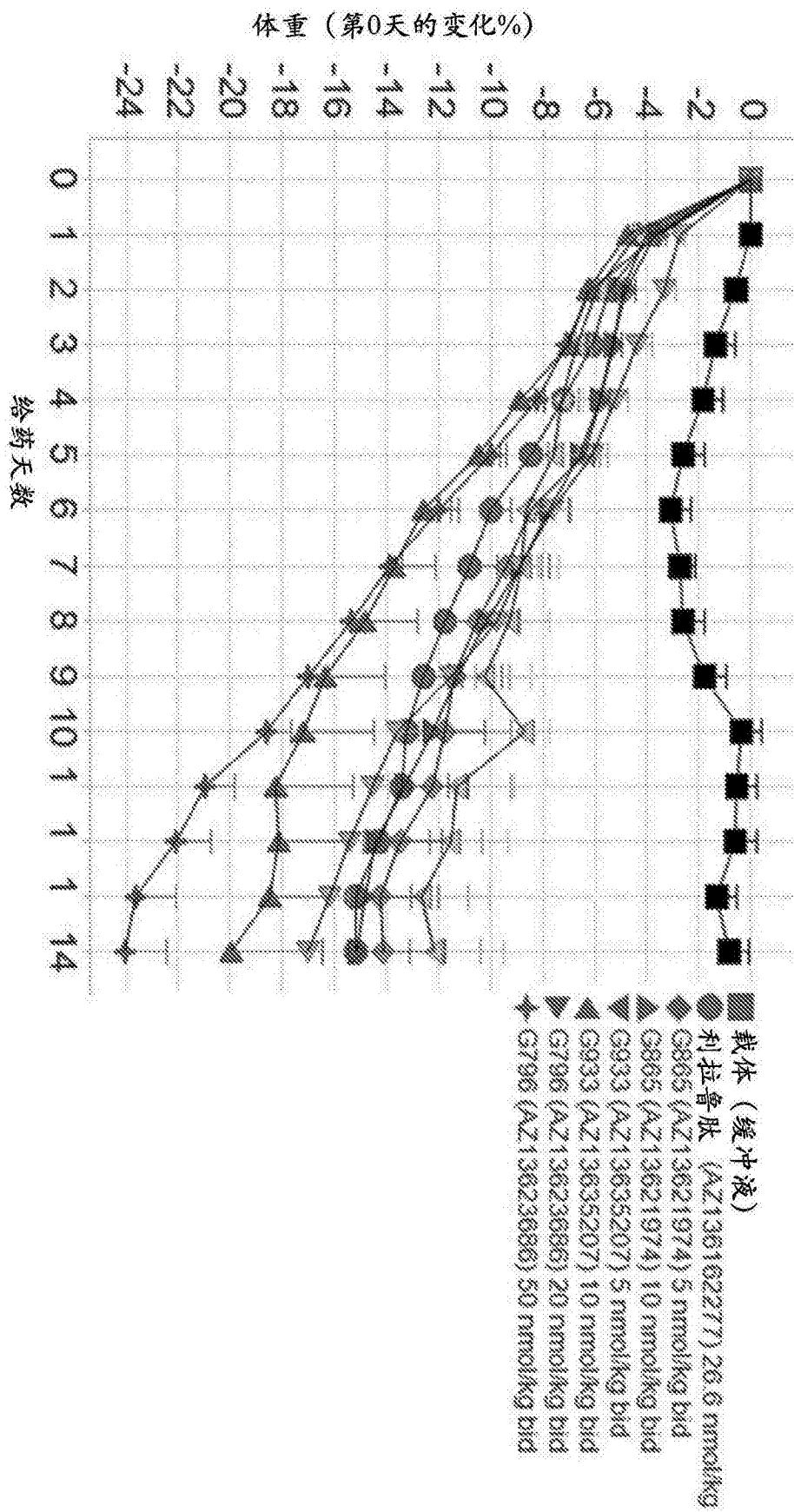


图8

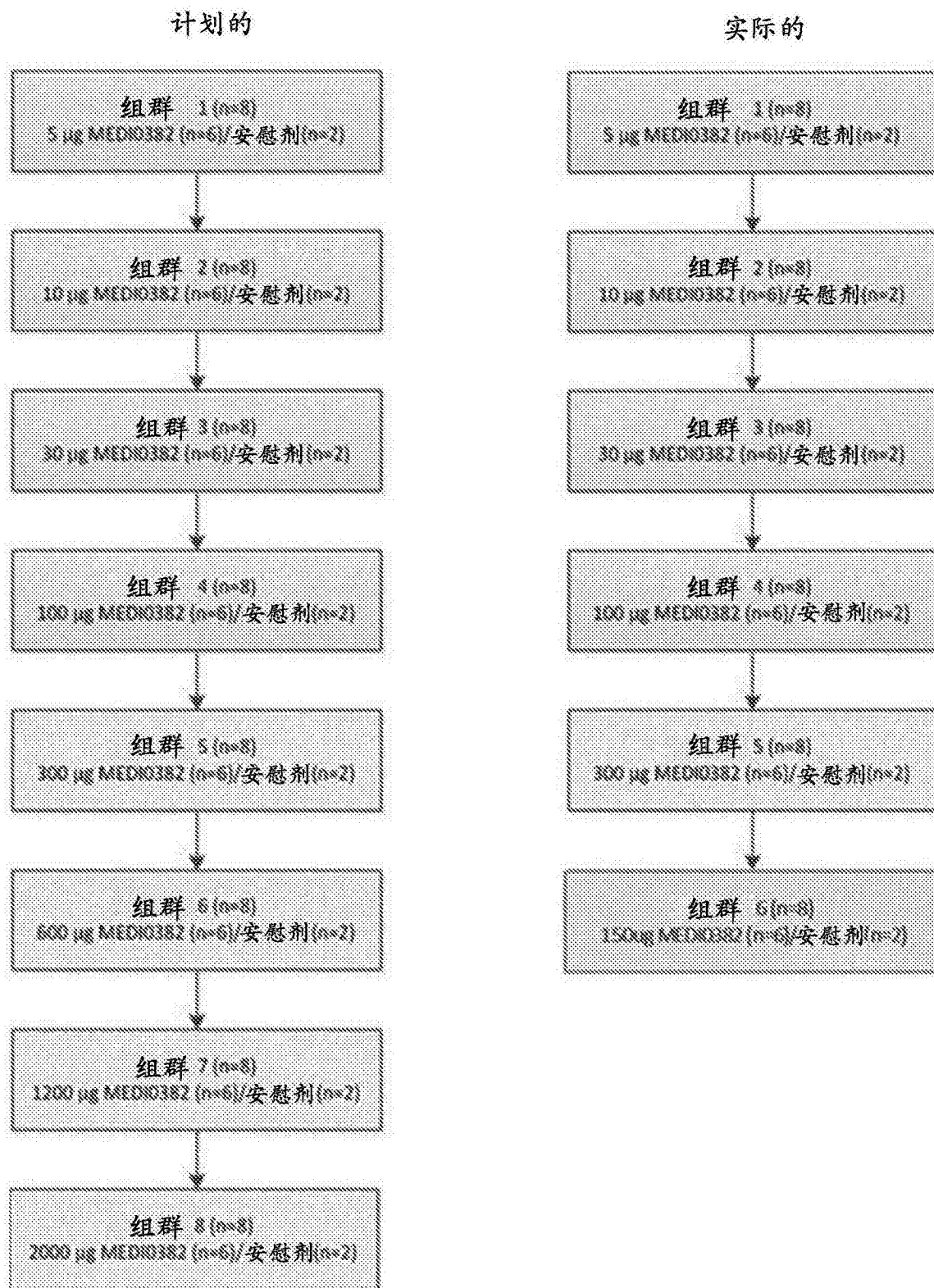


图9

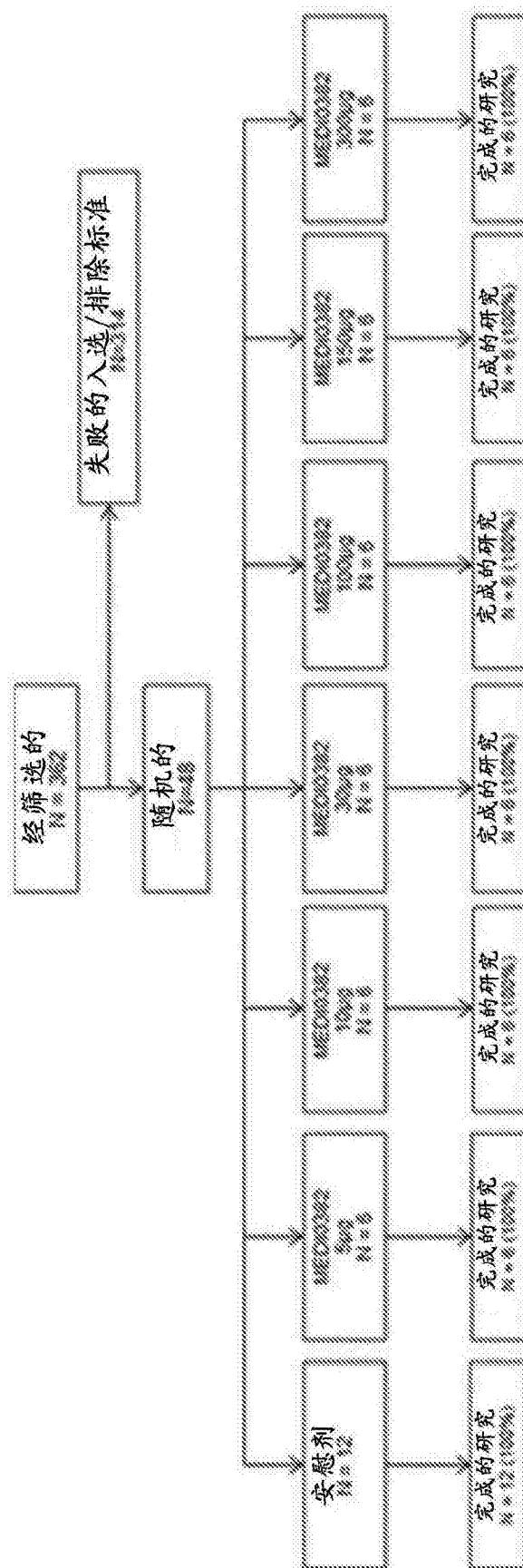


图 10

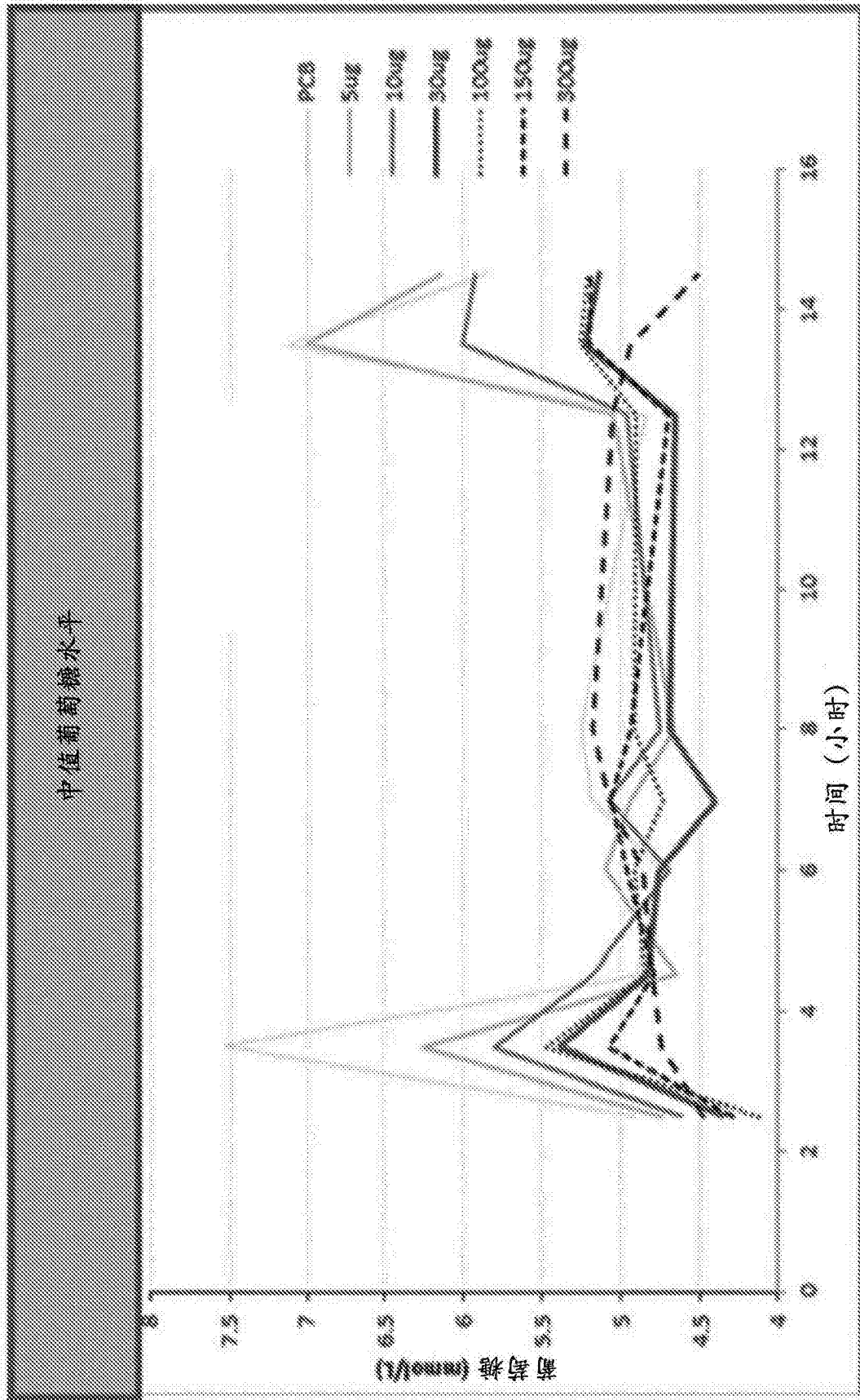


图11

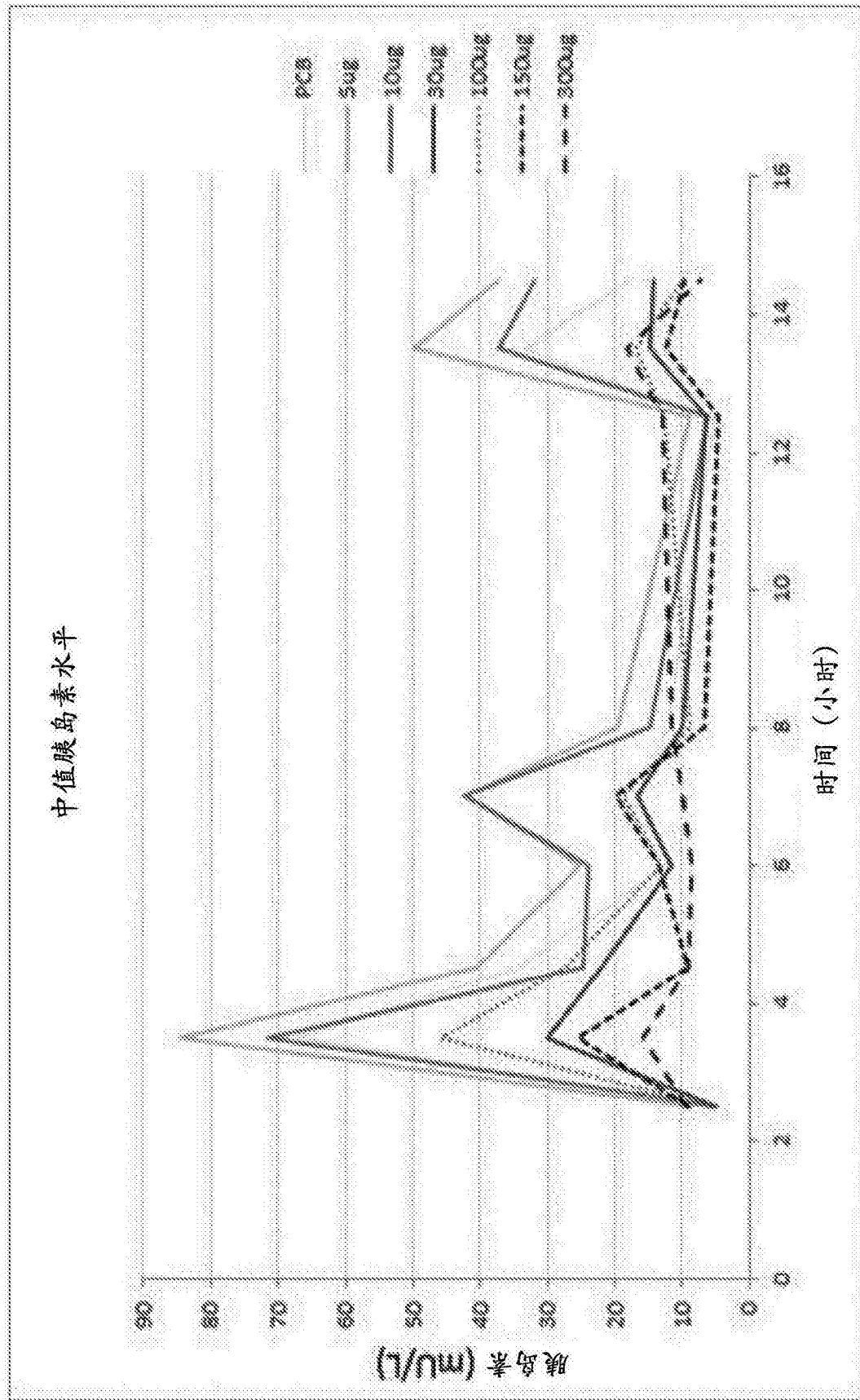


图12

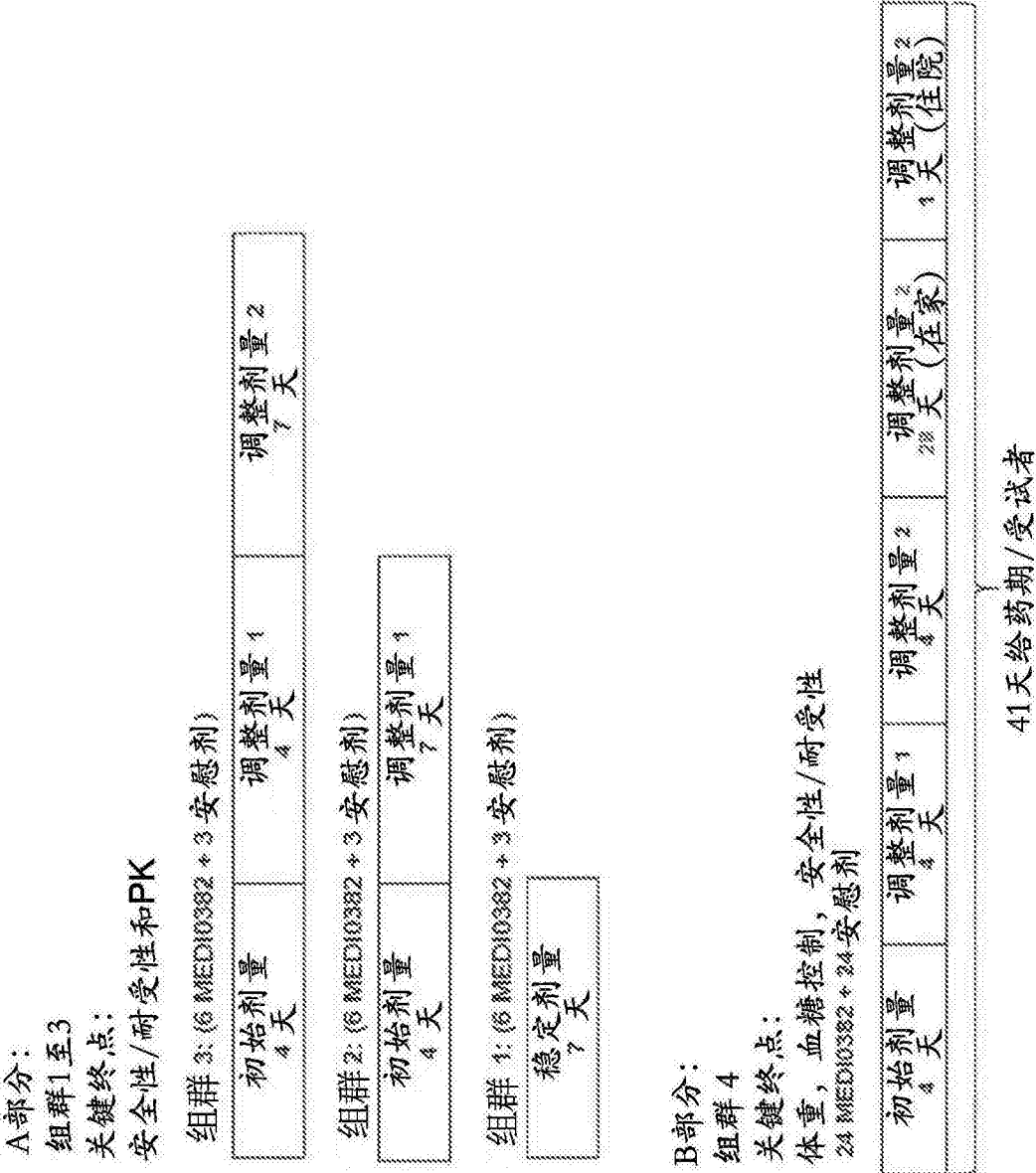


图13

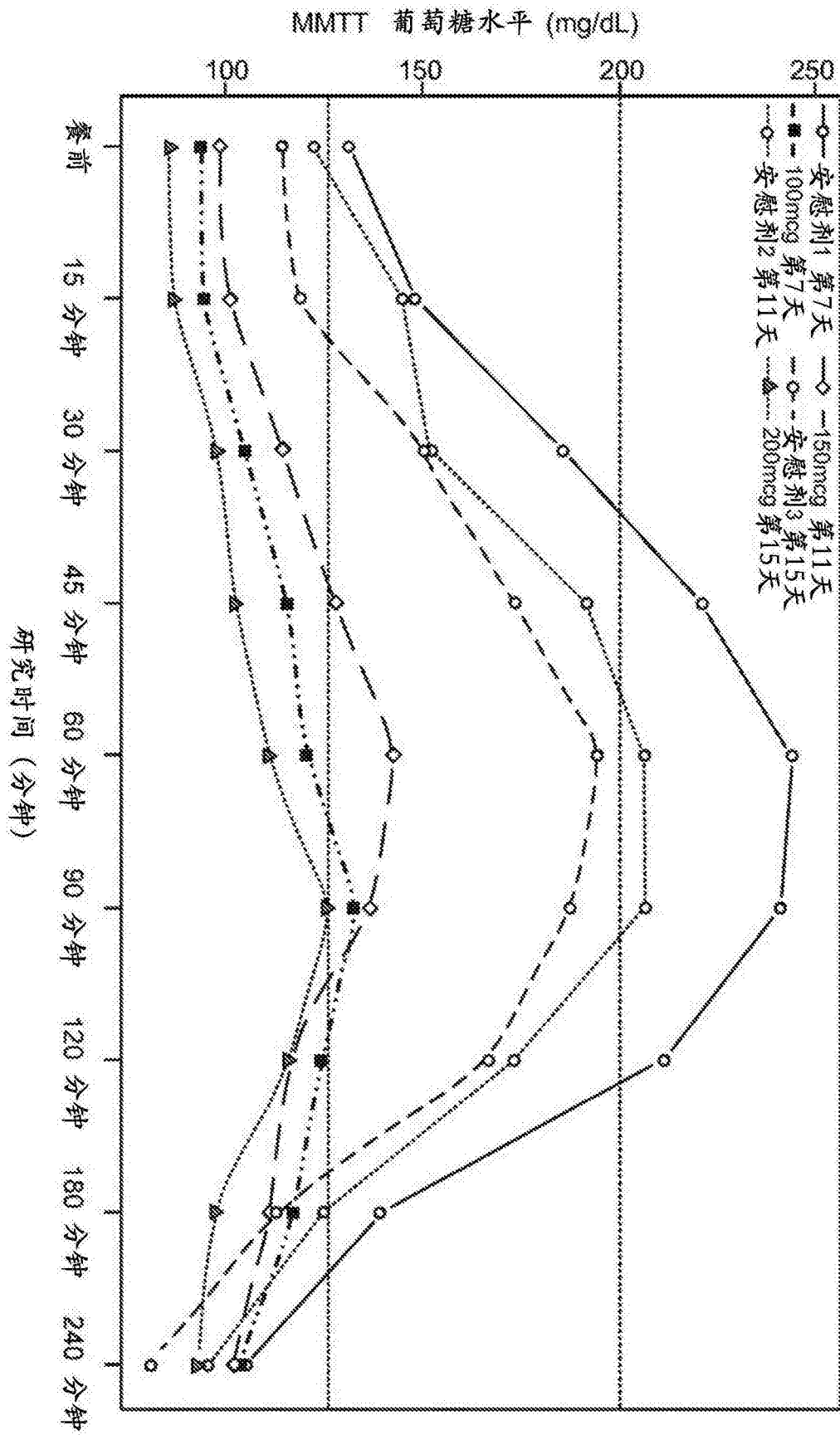


图14

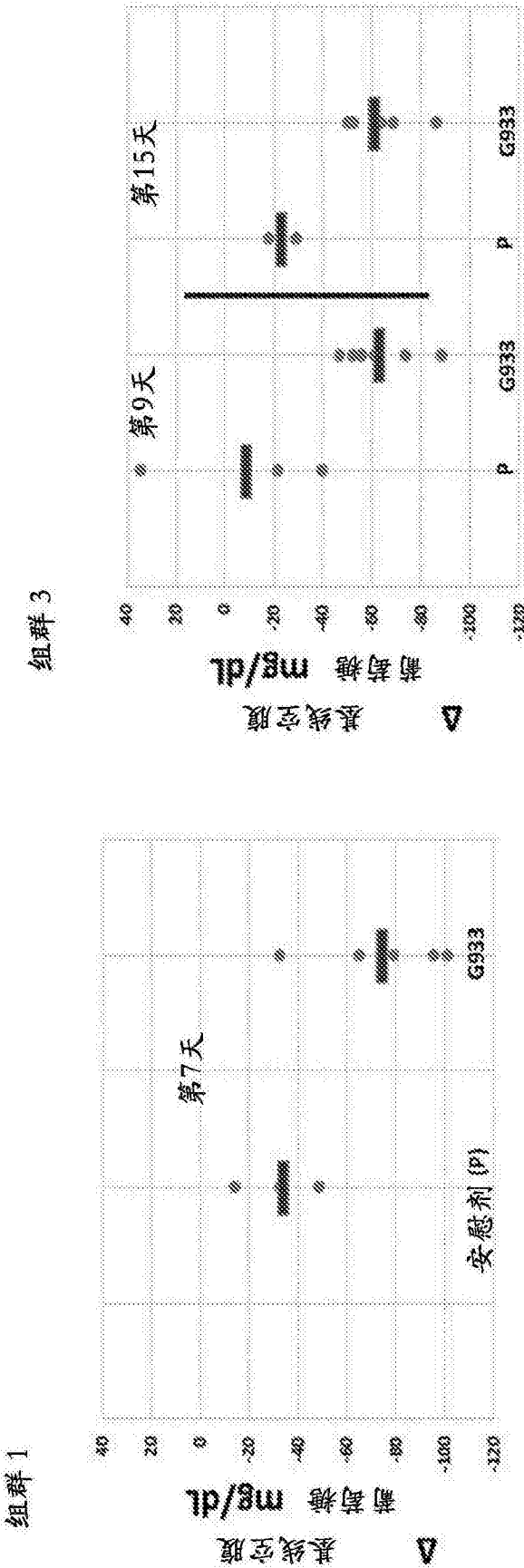


图15

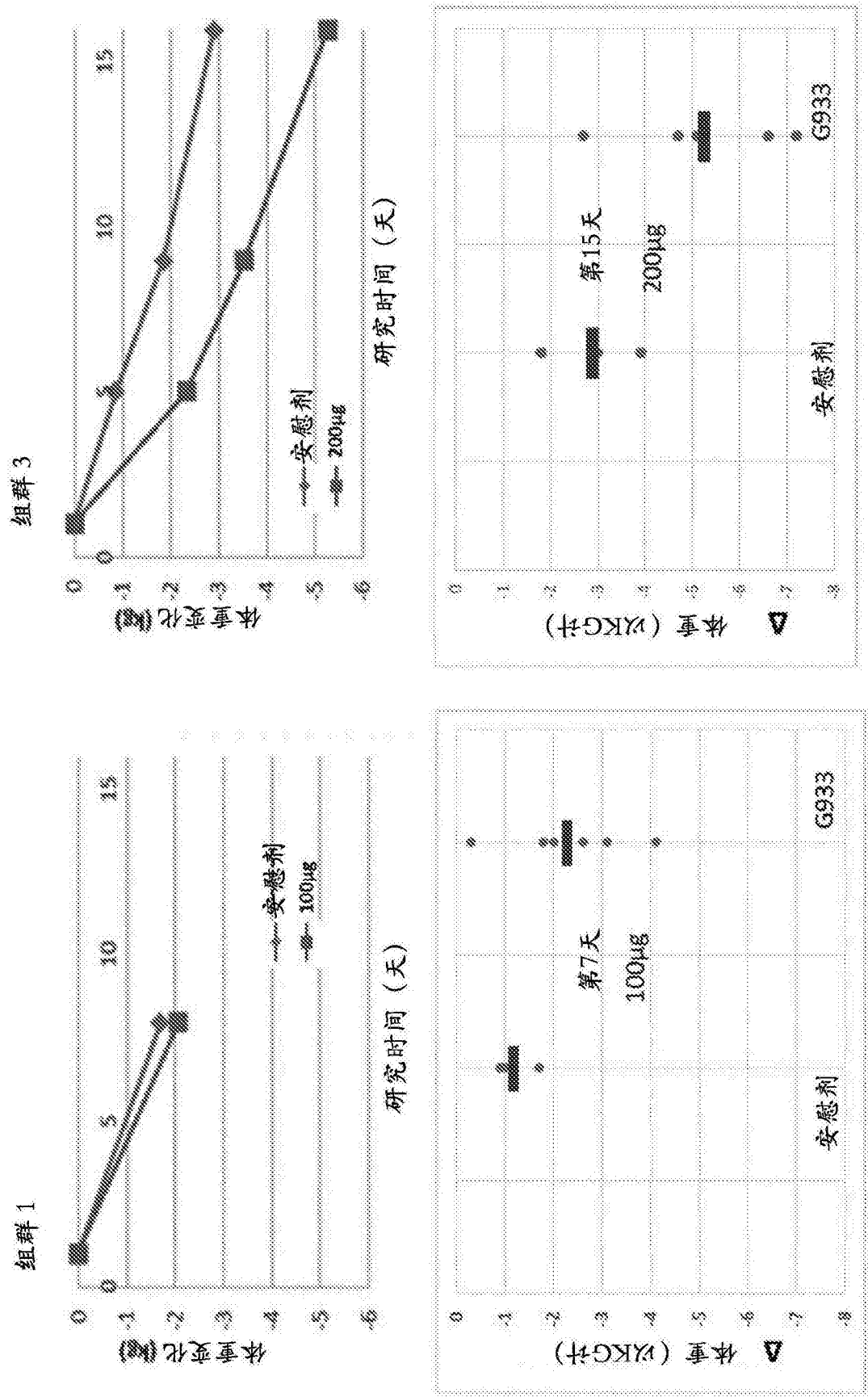


图16

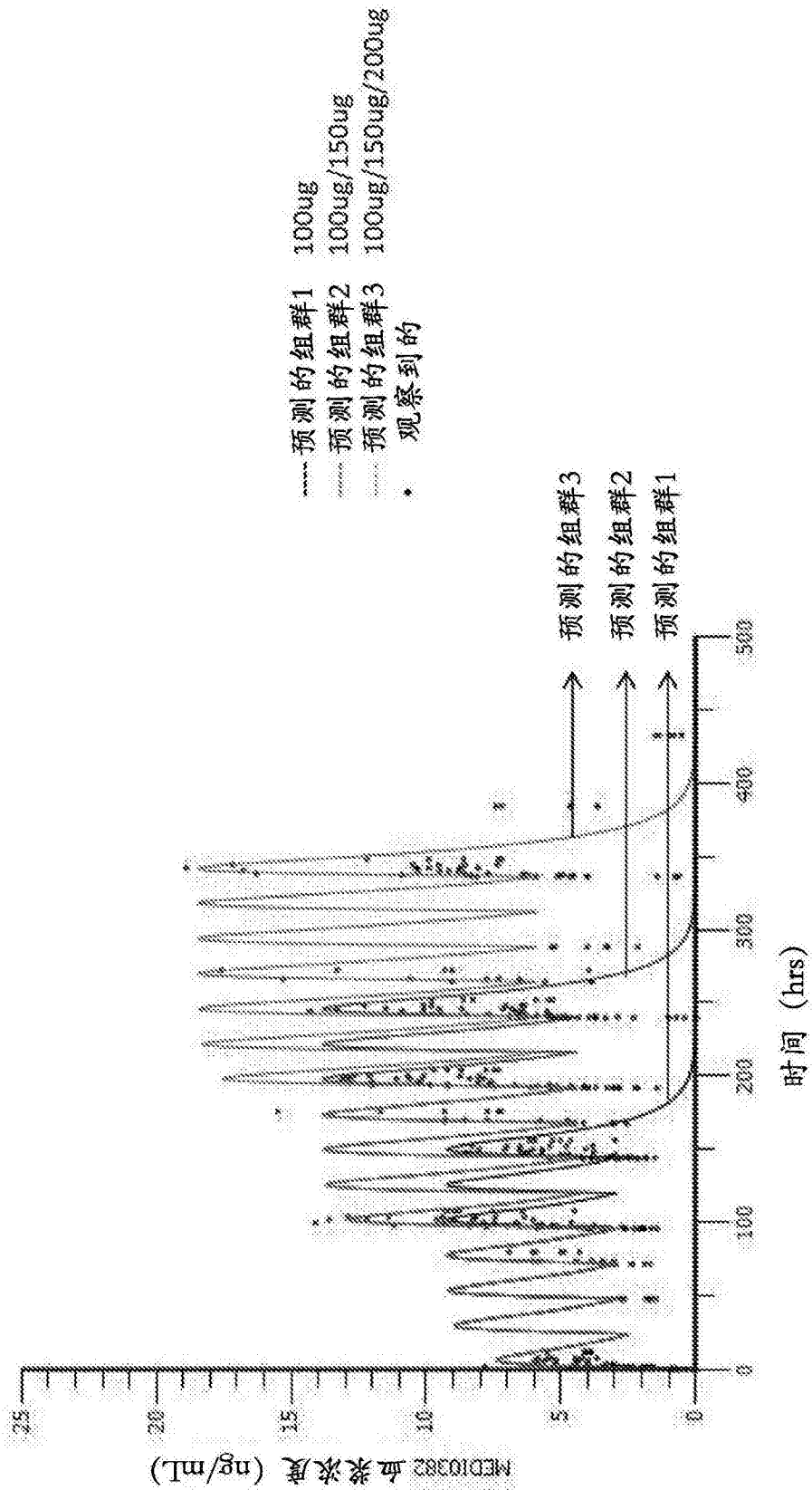


图17

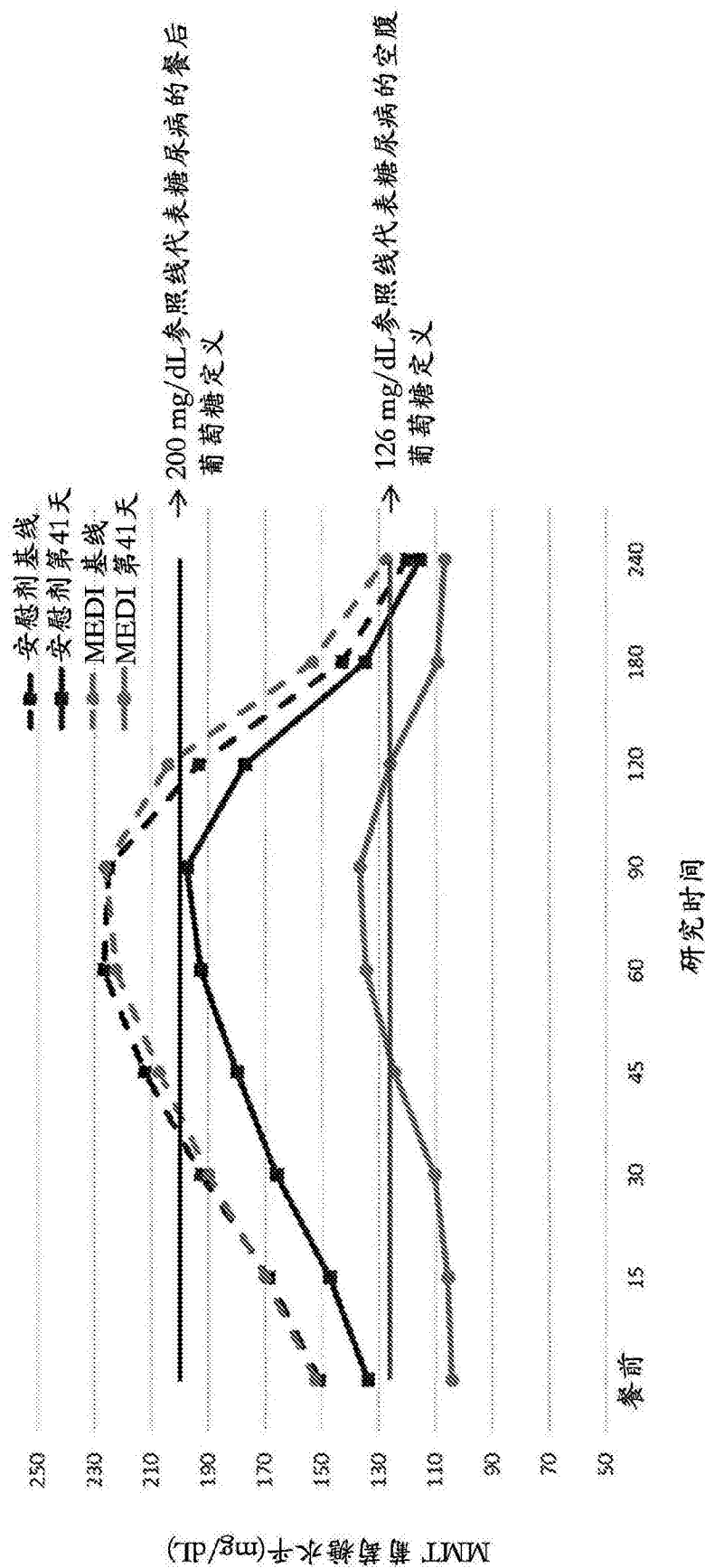


图18

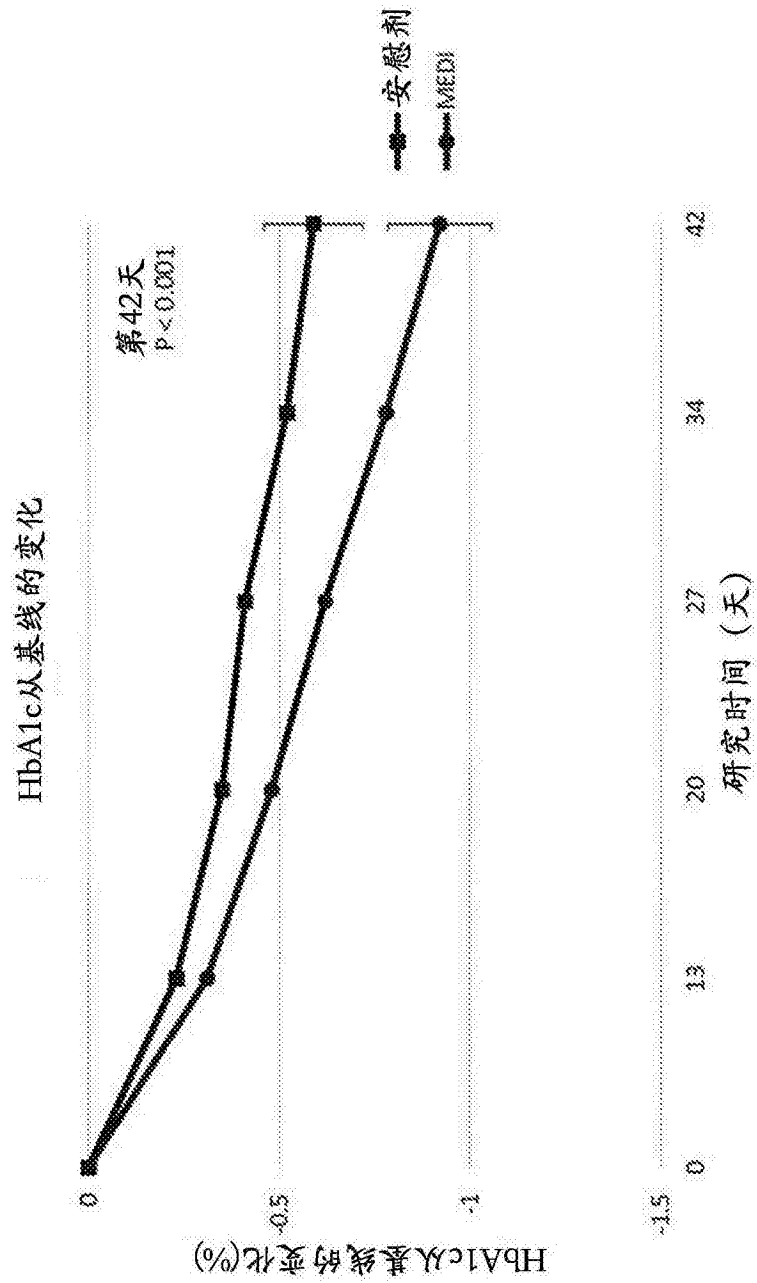


图19

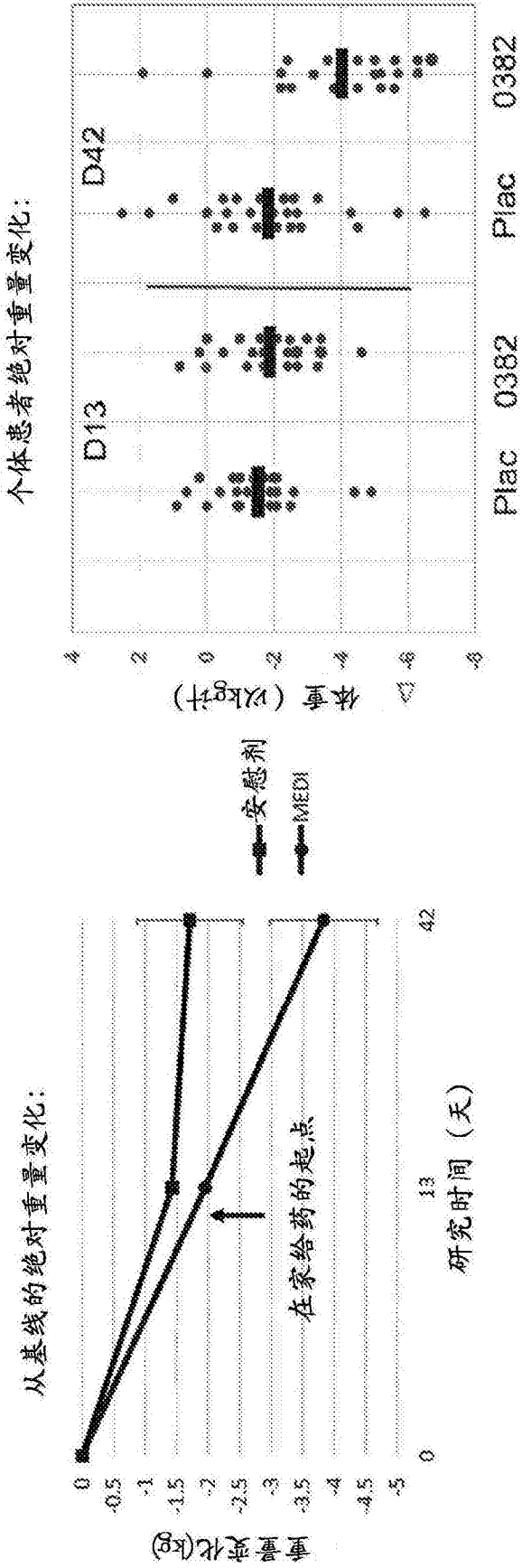


图20

具有从基线≥5%体重减轻的受试者

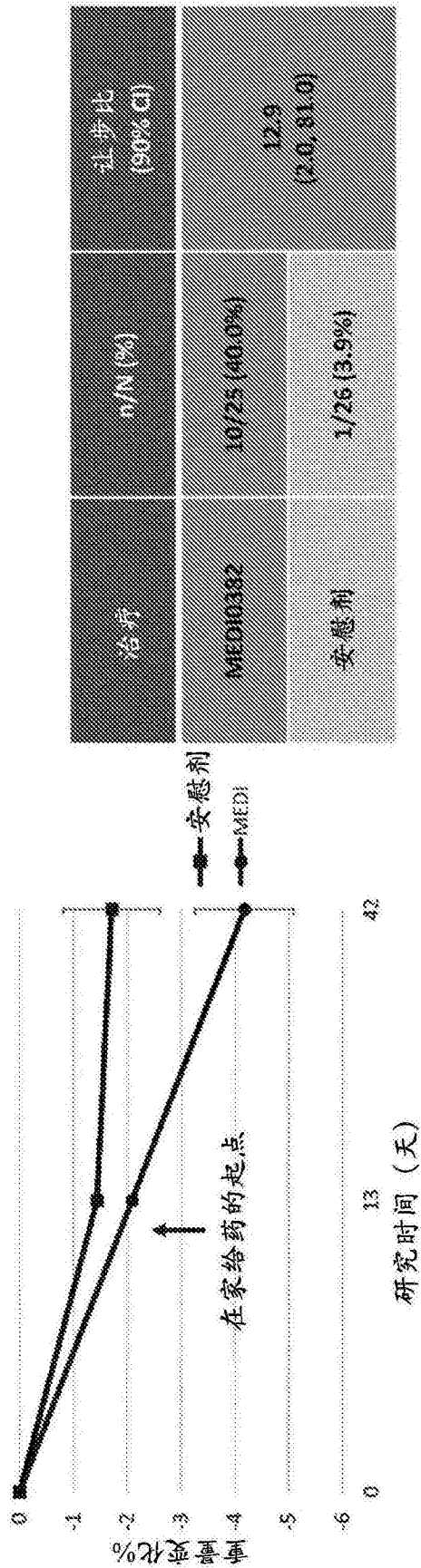


图21

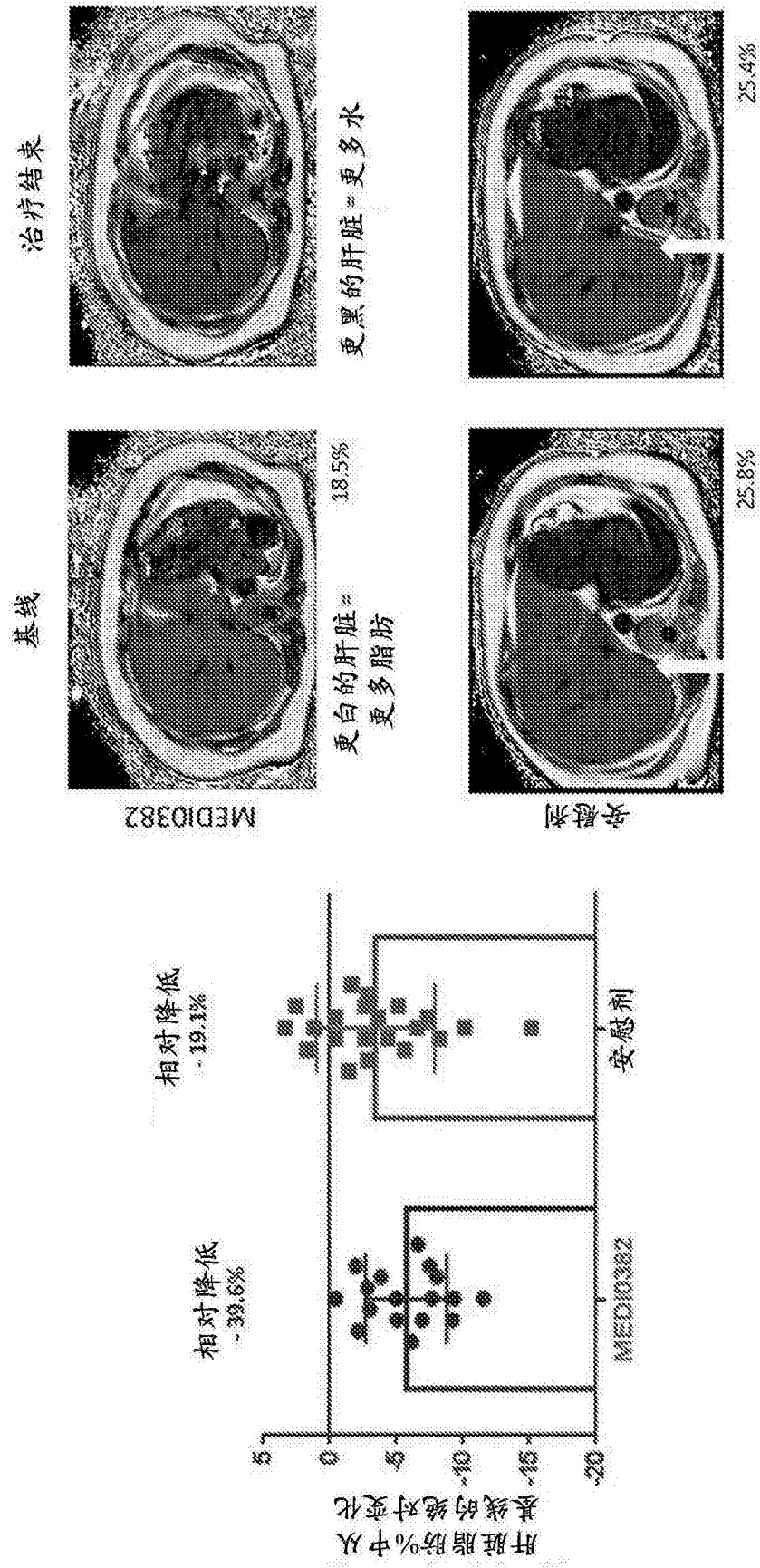
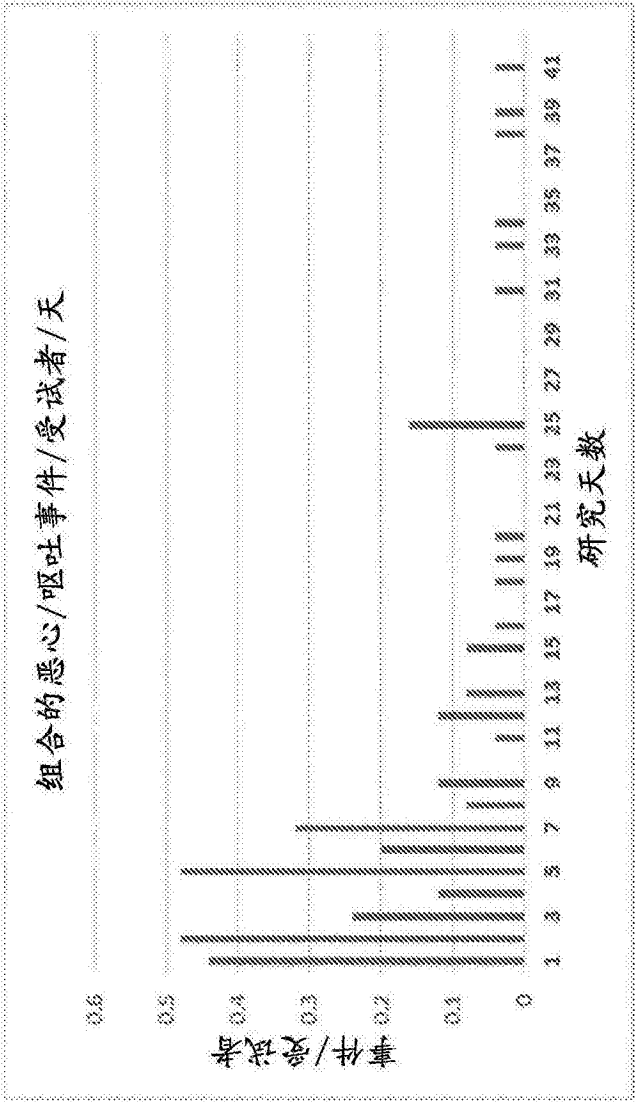


图22

VED100N22的剂量水平				
事件数量	100µg	150µg	200µg	安慰剂
恶心	22	14	15	7
呕吐	23	18	14	0



数据包括呕吐事件的总数量和发生率，其中每天第一次报告恶心

图23

组群 5 - 12 活性 + 4 安慰剂

100µg 5 天 3 住院	150µg 5 天 门诊	200µg 5 天 门诊	300µg 7 天 3+1 住院
----------------------	--------------------	--------------------	------------------------

组群 6 - 12 活性 + 4 安慰剂

100µg 5 天 3 住院	200µg 5 天 门诊	300µg 7 天 3+1 住院
----------------------	--------------------	------------------------

图24

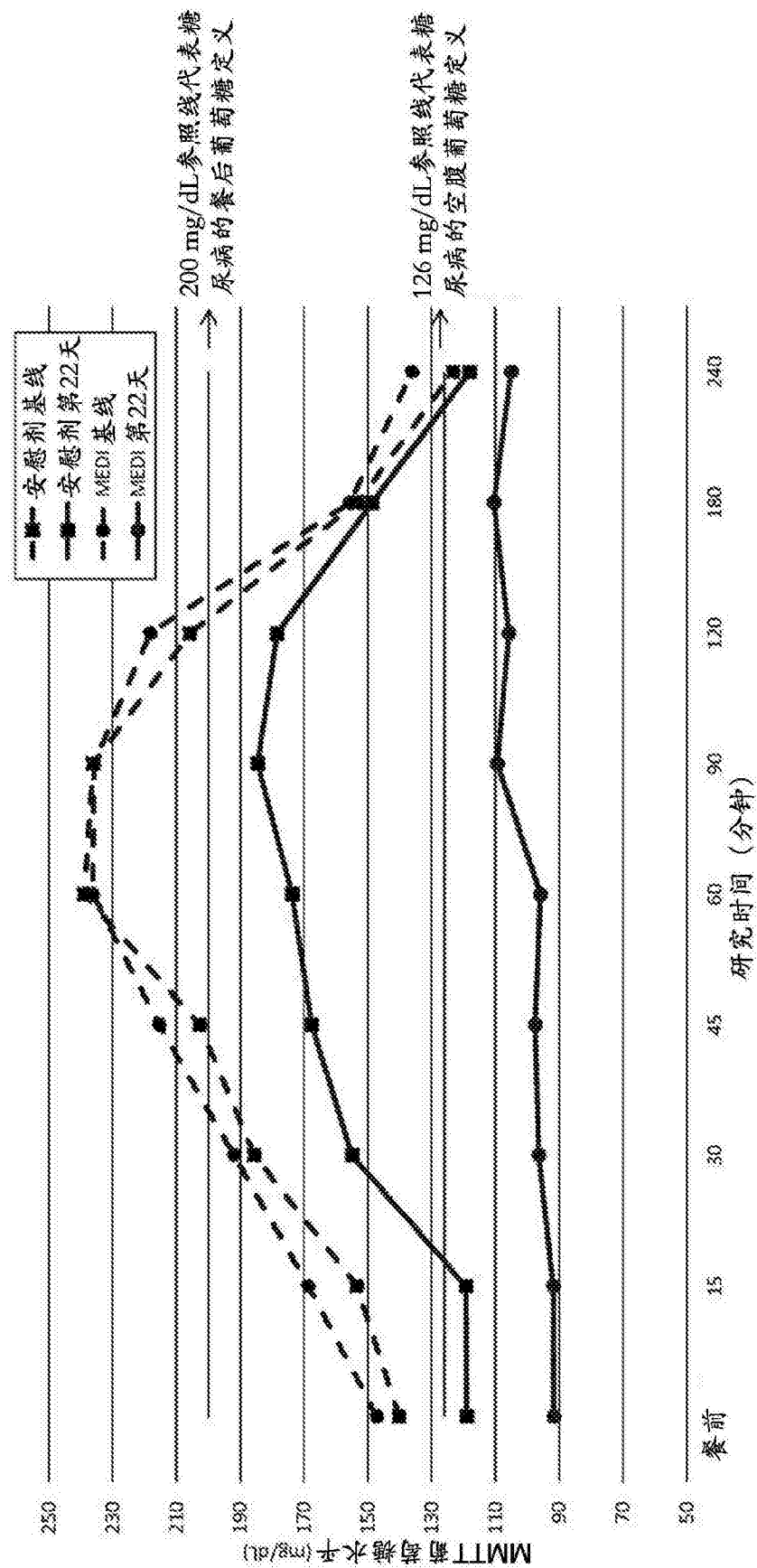


图25

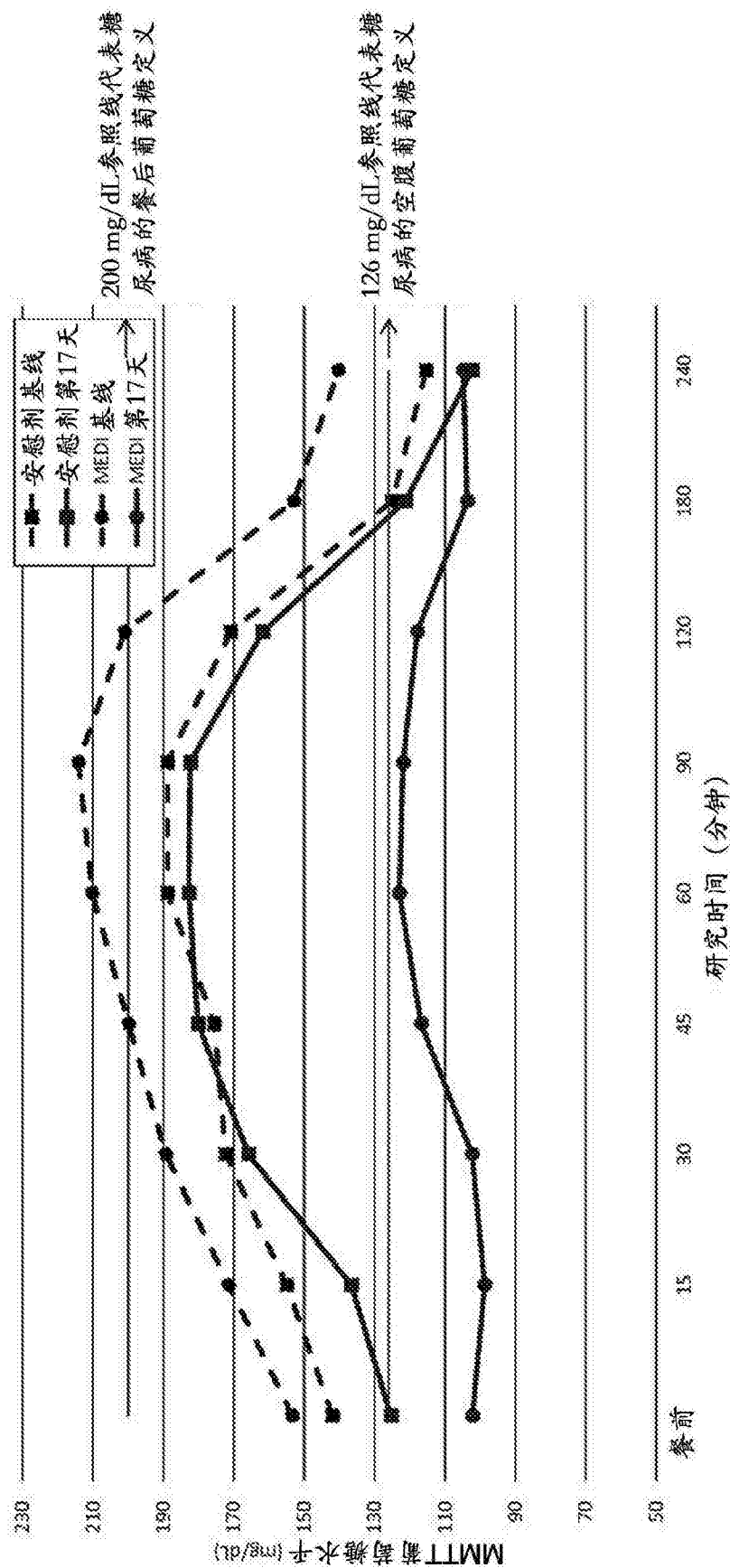


图26

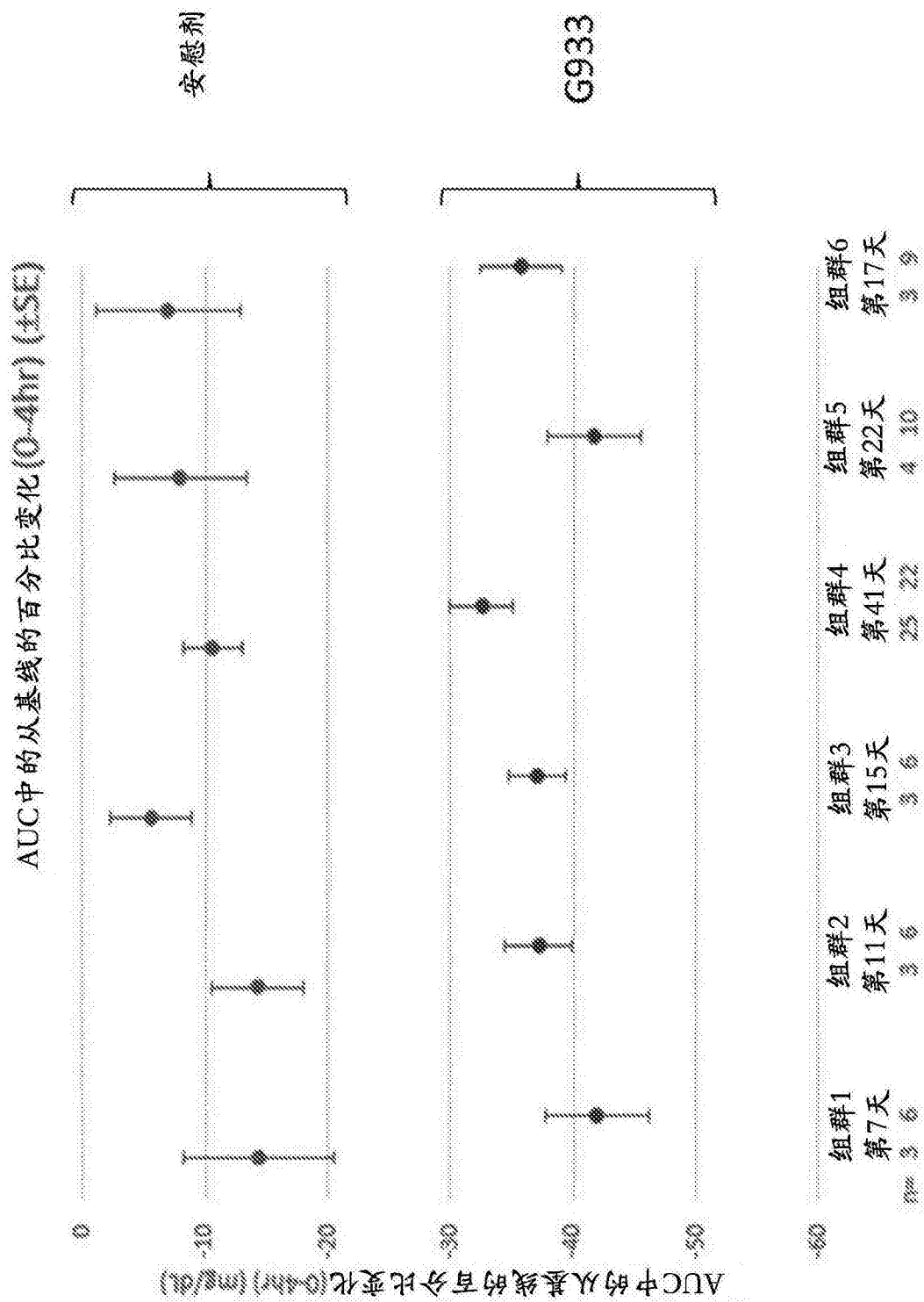
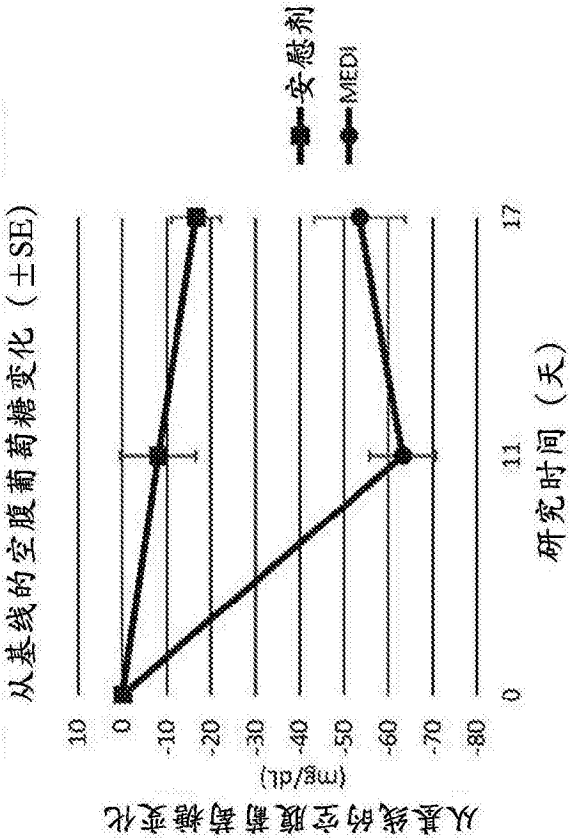


图27

组群6



组群5

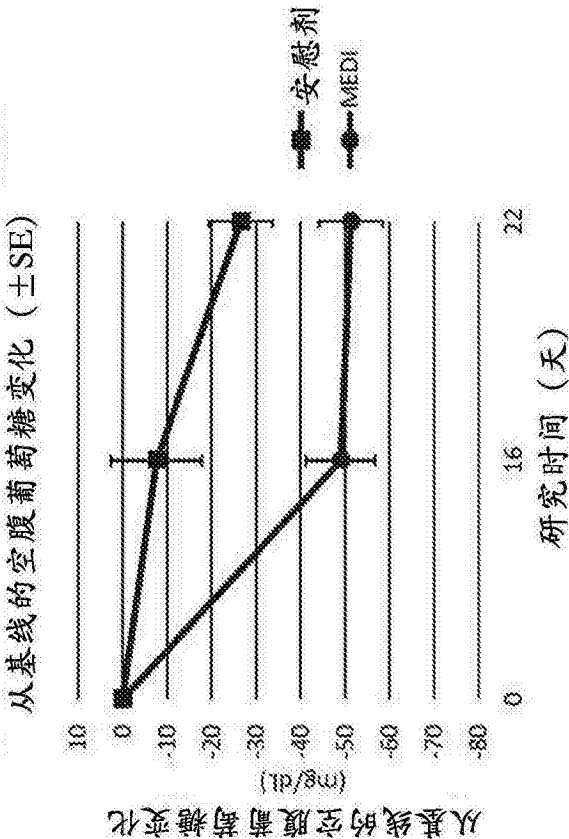


图28

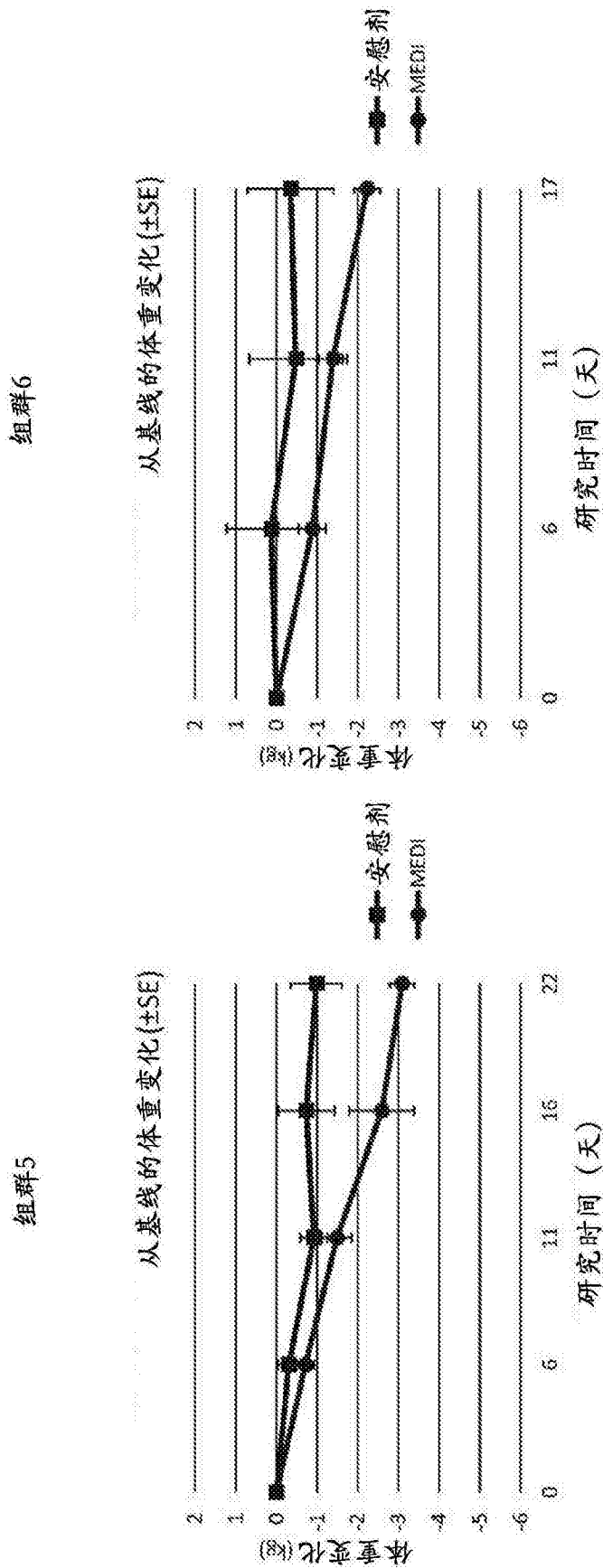


图29

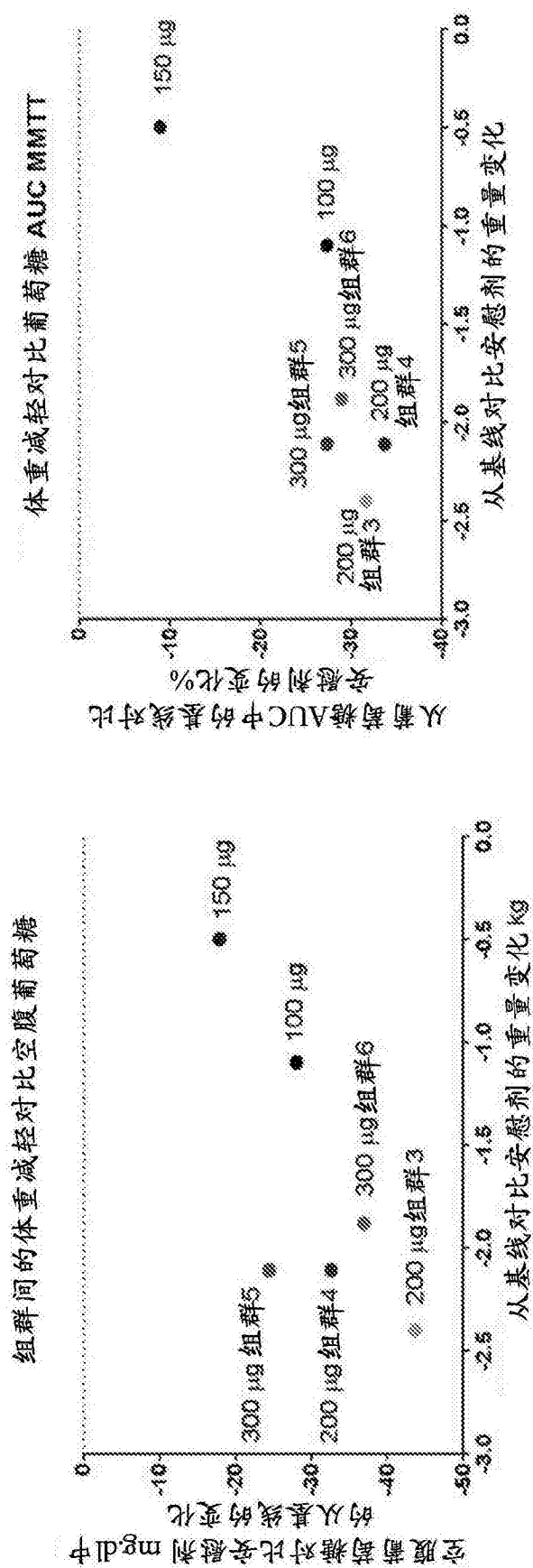


图30

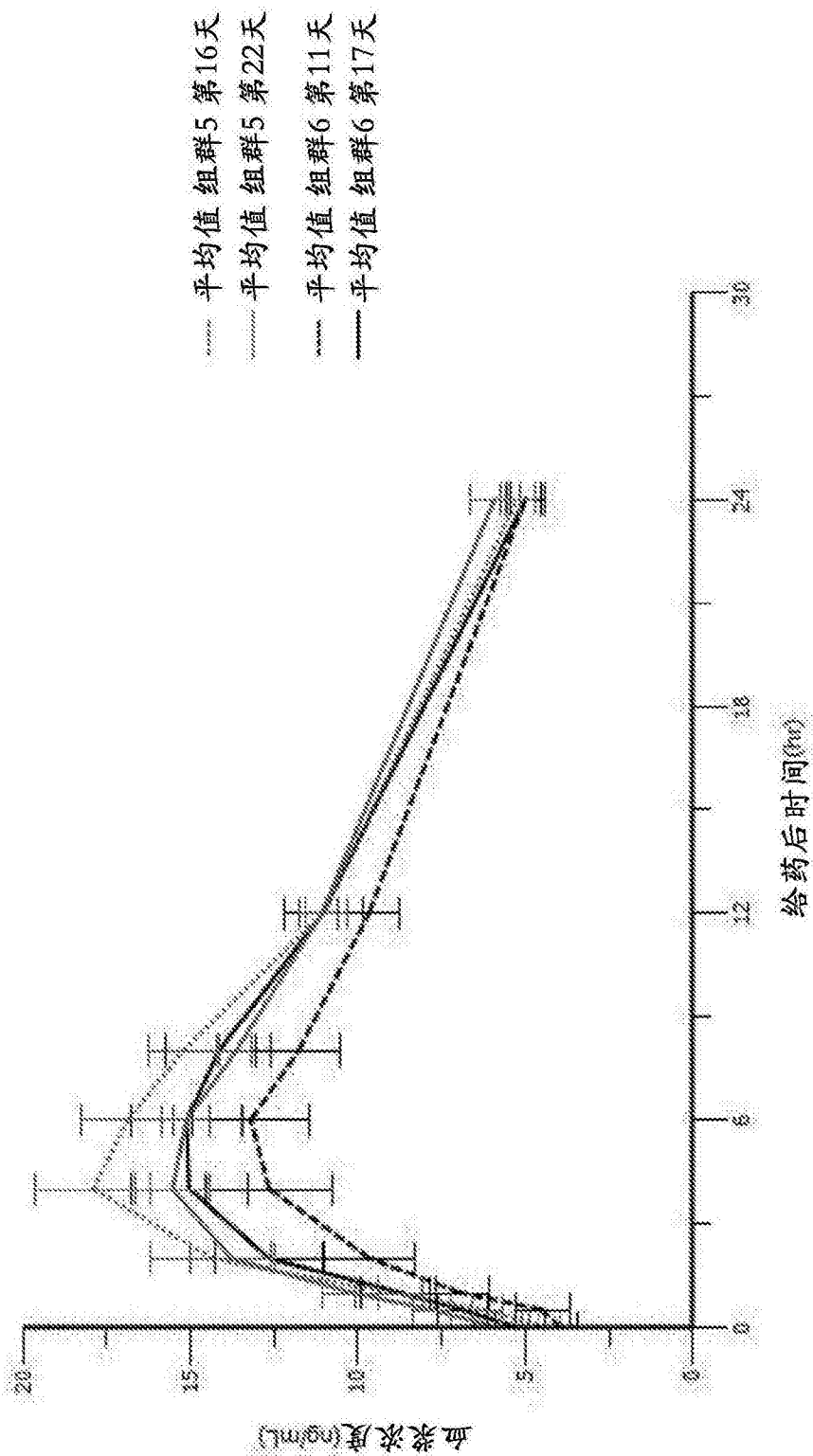


图31