



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109096387 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 30

(21) 申请号 201811001898.9

A61K 38/22 (2006.01)

(22) 申请日 2013.06.04

A61P 3/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109096387 A

(56) 对比文件

US 2006171920 A1, 2006.08.03

CN 101389648 A, 2009.03.18

(43) 申请公布日 2018.12.28

CN 101213209 A, 2008.07.02

(30) 优先权数据

CN 101878036 A, 2010.11.03

61/655,367 2012.06.04 US

WO 2012167251 A1, 2012.12.06

(62) 分案原申请数据
201380040700.7 2013.06.04

罗艳娜等. 胃泌酸调节素研究进展.《动物医学进展》.2009, (第04期),

(73) 专利权人 奥普科生物制品有限公司
地址 以色列水牛城

PROLOR BIOTECH. Long Acting Reversible PEGylated Oxyntomodulin - MOD - 6030.《5th Diabetes Drug Discovery & Development Conference》.2012,

(72) 发明人 U·E·菲马 O·赫什科维茨

汪林发等. 选择性聚乙二醇化赖氨酸的合成.《合成化学》.2010, 第18卷(第6期),

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

向莉等. 聚乳酸-b-聚(Nε-苄氧羰基-L-赖氨酸)-b-聚乙二醇的合成与表征.《高分子学报》.2010, (第6期),

代理人 左路 林晓红

审查员 贾麒

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)

权利要求书3页 说明书40页

C07K 1/04 (2006.01)

序列表1页 附图9页

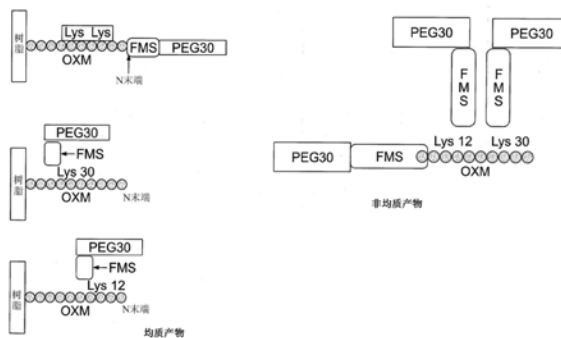
C07K 1/06 (2006.01)

(54) 发明名称

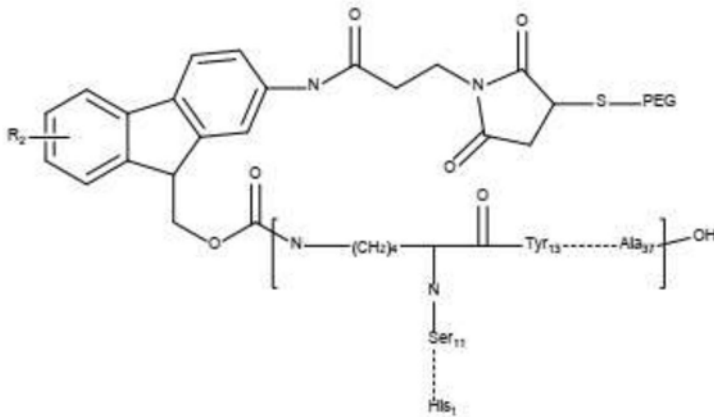
聚乙二醇化的OXM变体

(57) 摘要

公开了一种组合物,其包括经由可逆接头连接的胃泌酸调节素和聚乙二醇聚合物(PEG聚合物),所述可逆接头例如9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)。还公开了包含可逆聚乙二醇化胃泌酸调节素的药物组合物和其使用方法。



1. 制备具有以下结构的缀合物的方法：

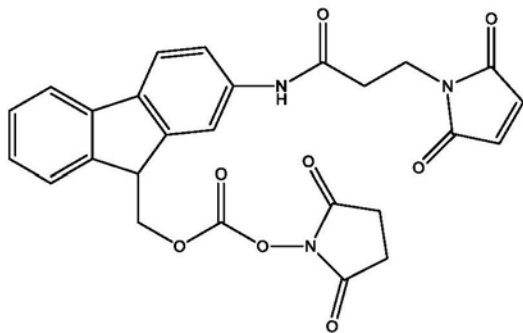


胃泌酸调节素

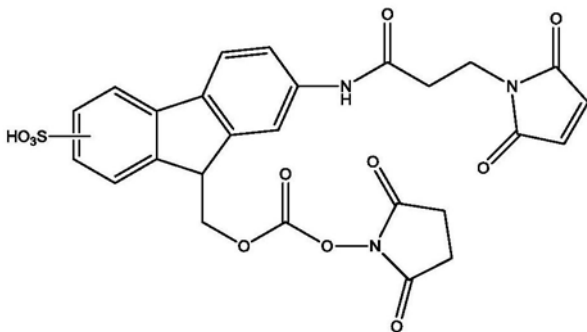
His¹ - Ser² - Gln³ - Gly⁴ - Thr⁵ - Phe⁶ - Thr⁷ - Ser⁸ - Asp⁹ - Tyr¹⁰ - Ser¹¹ - Lys¹² - Tyr¹³ - Leu¹⁴ - Asp¹⁵ - Ser¹⁶ - Arg¹⁷ - Arg¹⁸ - Ala¹⁹ - Gln²⁰ - Asp²¹ - Phe²² - Val²³ - Gln²⁴ - Trp²⁵ - Leu²⁶ - Met²⁷ - Asn²⁸ - Thr²⁹ - Lys³⁰ - Arg³¹ - Asn³² - Arg³³ - Asn³⁴ - Asn³⁵ - Ile³⁶ - Ala³⁷ (SEQ ID NO: 1)

其中所述胃泌酸调节素 (OXM, SEQ ID NO:1) 通过所述胃泌酸调节素的Lys¹²的氨基侧链连接；并且R₂是氢或SO₃H, 分别表示PEG-Fmoc-OXM (Lys¹²) 和PEG-FMS-OXM (Lys¹²) ;并且其中所述PEG的分子量在20,000Da到40,000Da范围内；以及

所述方法包括将MAL-Fmoc-NHS或MAL-FMS-NHS



MAL-Fmoc-NHS



MAL-FMS-NHS

与结合于树脂的SEQ ID NO:1的胃泌酸调节素反应,其中所述胃泌酸调节素的Lys³⁰的氨基侧链和His¹的氨基末端是分别被保护基团保护的,

以分别获得结合于树脂的MAL-Fmoc-被保护的OXM (Lys¹²) 或结合于树脂的MAL-FMS-被保护的OXM (Lys¹²),其中所述胃泌酸调节素的Lys³⁰的氨基侧链和His¹的氨基末端是分别被所述保护基团保护的；

然后

(a) 将所述结合于树脂的MAL-Fmoc-被保护的OXM(Lys¹²)或结合于树脂的MAL-FMS-被保护的OXM(Lys¹²)与巯基PEG聚合物(PEG-SH)反应,之后去除所述保护基团和所述树脂,或

(b) 去除所述树脂和所述保护基团以分别提供MAL-Fmoc-OXM(Lys¹²)或MAL-FMS-OXM(Lys¹²),之后将MAL-Fmoc-OXM(Lys¹²)或MAL-FMS-OXM(Lys¹²)与巯基PEG聚合物(PEG-SH)反应,

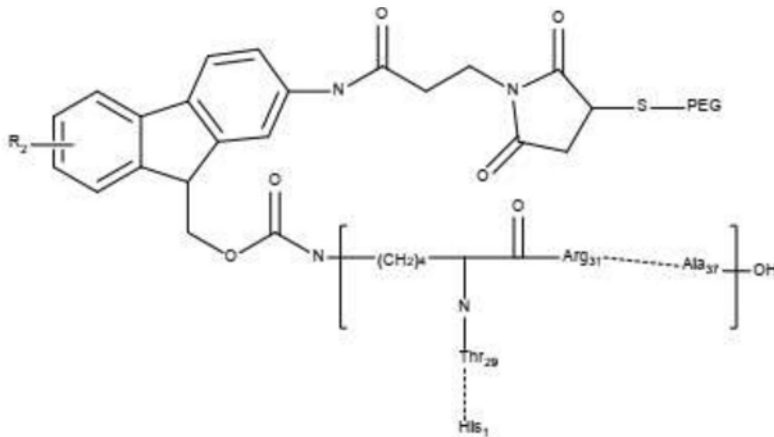
以分别获得PEG-Fmoc-OXM(Lys¹²)或PEG-FMS-OXM(Lys¹²)。

2. 权利要求1的方法,其中所述PEG是PEG₃₀。

3. 权利要求1的方法,其中所述R₂或SO₃H在位置2。

4. 权利要求1的方法,其中去除所述MAL-Fmoc-被保护的OXM(Lys¹²)和所述MAL-FMS-被保护的OXM(Lys¹²)的所述赖氨酸³⁰和组氨酸¹的所述氨基的所述保护基团以分别获得MAL-Fmoc-OXM(Lys¹²)和MAL-FMS-OXM(Lys¹²),并且进一步纯化所述MAL-Fmoc-OXM(Lys¹²)和MAL-FMS-OXM(Lys¹²)。

5. 制备具有以下结构的缀合物的方法:

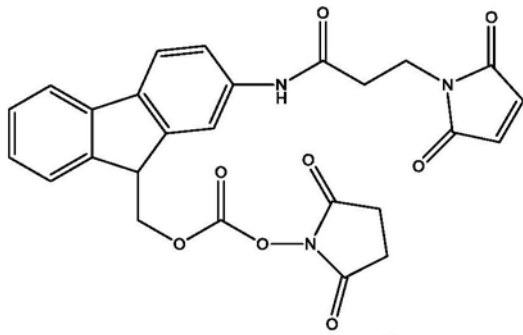


胃泌酸调节素

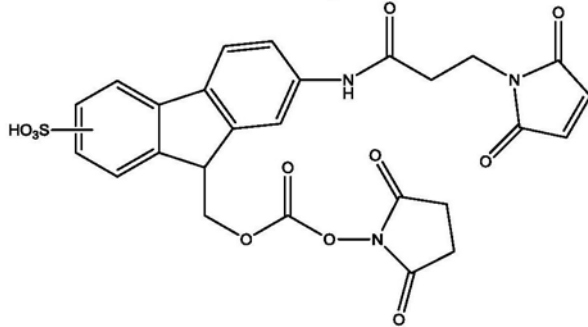
His¹ - Ser² - Gln³ - Gly⁴ - Thr⁵ - Phe⁶ - Thr⁷ - Ser⁸ - Asp⁹ - Tyr¹⁰ - Ser¹¹ - Lys¹² - Tyr¹³ - Leu¹⁴ - Asp¹⁵ - Ser¹⁶ - Arg¹⁷ - Arg¹⁸ - Ala¹⁹ - Gln²⁰ - Asp²¹ - Phe²² - Val²³ - Gln²⁴ - Trp²⁵ - Leu²⁶ - Met²⁷ - Asn²⁸ - Thr²⁹ - Lys³⁰ - Arg³¹ - Asn³² - Arg³³ - Asn³⁴ - Asn³⁵ - Ile³⁶ - Ala³⁷ (SEQ ID NO: 1)

其中所述胃泌酸调节素(OXM,SEQ ID NO:1)通过所述胃泌酸调节素的Lys³⁰的氨基侧链连接;并且R₂是氢或SO₃H,分别表示PEG-Fmoc-OXM(Lys³⁰)和PEG-FMS-OXM(Lys³⁰);并且其中所述PEG的分子量在20,000Da到40,000Da范围内;以及

所述方法包括将MAL-Fmoc-NHS或MAL-FMS-NHS



MAL-Fmoc-NHS



MAL-FMS-NHS

与结合于树脂的SEQ ID NO:1的胃泌酸调节素反应,其中所述胃泌酸调节素的Lys¹²的氨基侧链和His¹的氨基末端是分别被保护基团保护的,

以获得结合于树脂的MAL-Fmoc-被保护的OXM(Lys³⁰)或MAL-FMS-被保护的OXM(Lys³⁰),其中所述胃泌酸调节素的Lys¹²的氨基侧链和His¹的氨基末端是分别被保护基团保护的;

然后

(a) 将所述结合于树脂的MAL-Fmoc-被保护的OXM(Lys³⁰)或结合于树脂的MAL-FMS-被保护的OXM(Lys³⁰)与巯基PEG聚合物(PEG-SH)反应,之后去除所述保护基团和所述树脂,或

(b) 去除所述树脂和所述保护基团以分别提供MAL-Fmoc-OXM(Lys³⁰)或MAL-FMS-OXM(Lys³⁰),之后将MAL-Fmoc-OXM或MAL-FMS-OXM与巯基PEG聚合物(PEG-SH)反应,

以获得PEG-Fmoc-OXM(Lys³⁰)或PEG-FMS-OXM(Lys³⁰)。

6. 权利要求5的方法,其中所述PEG是PEG₃₀。

7. 权利要求5的方法,其中所述R₂或SO₃H在位置2。

8. 权利要求5的方法,其中去除所述MAL-Fmoc-被保护的OXM(Lys³⁰)和所述MAL-FMS-被保护的OXM(Lys³⁰)的所述Lys¹²和His¹的所述氨基的所述保护基团以分别获得MAL-Fmoc-OXM(Lys³⁰)和MAL-FMS-OXM(Lys³⁰),并且进一步纯化所述MAL-Fmoc-OXM(Lys³⁰)和MAL-FMS-OXM(Lys³⁰)。

9. 一种延长胃泌酸调节素的生物学半衰期的方法,所述方法包括根据权利要求1-8任一项的方法制备胃泌酸调节素缀合物。

10. 一种制备给药频率减少的胃泌酸调节素的方法,所述方法包括根据权利要求1-8任一项的方法制备胃泌酸调节素缀合物。

11. 根据权利要求1-8任一项的方法所制备的胃泌酸调节素缀合物在生产用于治疗肥胖症的药物中的用途。

聚乙二醇化的OXM变体

[0001] 本申请是申请日为2013年6月4日,申请号为201380040700.7,题目为“聚乙二醇化的OXM变体”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 公开了一种组合物,其包括经由可逆连接基团连接的胃泌酸调节素和聚乙二醇聚合物(PEG聚合物),所述可逆连接基团例如9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)。还公开了包含可逆聚乙二醇化胃泌酸调节素的药物组合物和其使用方法。

背景技术

[0003] 胃肠道负责合成和释放多种调控进食行为的肽激素,包括胰腺蛋白(PP)、胰高血糖素样肽1(GLP-1)、肽YY(PYY)和胃泌酸调节素(OXM)。OXM由肠道和CNS中的胰高血糖素原的组织特异性翻译后加工产生。它含有37个氨基酸,包括具有C末端碱性八肽延伸的完整胰高血糖素序列,所述碱性八肽延伸被证明体外和体内都有助于OXM的性质,但对于肽的作用而言,单独的所述碱性八肽延伸是不足够的。响应于食物摄入,OXM由肠道L细胞与膳食热量含量成比例地分泌到血流中。

[0004] OXM在口服和腹膜内施用之后经由刺激胰岛素分泌而增强葡萄糖清除。它还调控食物摄入的控制。将OXM脑室内(ICV)和核内注射到下丘脑的室旁核和弓状核(ARC)中抑制了空腹大鼠的再摄食。此抑制在自由摄食的大鼠中在黑暗期开始时也已经得到证实。此外,外周施用OXM剂量依赖性地抑制空腹诱导的和黑暗期的食物摄入。

[0005] 不利的药物动力学(例如短暂的血清半衰期)可以妨碍多种在其它方面有前景的候选药物的药学开发。血清半衰期是分子的经验特征,并且对于每种新的潜在药物必须以实验方式测定。举例来说,对较低分子量的蛋白质药物,例如肾过滤的生理清除机制可以使得维持药物的治疗水平因为所需给药方案的成本或频率而不可行。

[0006] 蛋白质,且尤其是短肽,在血液、肝脏或肾脏中易于变性或酶促降解。因此,蛋白质通常具有几小时的短暂循环半衰期。由于其低稳定性,肽类药物通常以持续频率传递以便维持活性肽的有效血浆浓度。此外,因为肽类药物通常通过输注来施用,频繁注射肽类药物对对象引起相当大的不适。因此,需要可以延长治疗性蛋白质和肽的半衰期同时维持其高药理学功效的技术。此类所要肽类药物应该还符合以下要求:血清稳定性增强、活性高并且当注射到对象中时诱导不希望的免疫应答的概率低。

[0007] 本发明涉及OXM衍生物,其中利用可逆聚乙二醇化技术来延长肽的半衰期。

发明内容

[0008] 在一种实施方式中,本发明涉及一种组合物,其由胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)组成,其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素的氨基末端连接。

[0009] 在一种实施方式中,本发明涉及一种组合物,其由胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物

(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)组成,其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的十二号位置上的赖氨酸残基(Lys₁₂)连接。

[0010] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种组合物,其由胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)组成,其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的三十号位置上的赖氨酸残基(Lys₃₀)连接。

[0011] 在一种实施方式中,本发明涉及一种改进胃泌酸调节素的曲线下面积(AUC)的方法,其由以下步骤组成:使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0012] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种降低胃泌酸调节素的给药频率的方法,其由以下步骤组成:使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0013] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种延长胃泌酸调节素的生物半衰期的方法,其由以下步骤组成:使胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)以1:1:1的摩尔比缀合,其中所述PEG聚合物经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0014] 通过以下详细描述实例和附图,本发明的其它特征和优势将是明显的。然而,应理解,当指明本发明的优选实施方式时,所述详细描述和特定实例示仅以说明方式给出,因为由此详细描述,本发明的精神和范围内的各种变化和修改对本领域技术人员将是明显的。

附图说明

[0015] 图1展示产生的PEG-FMS-OXM缀合物的不同变体。

[0016] 图2是展示非均质PEG₃₀-FMS-OXM和三种PEG₃₀-FMS-OXM变体(氨基、Lys12和Lys30)当与过表达GLP-1受体的CHO-K1细胞一起温育时的体外活性(cAMP定量)的图。

[0017] 图3是展示非均质PEG₃₀-FMS-OXM和三种PEG₃₀-FMS-OXM变体(氨基、Lys12和Lys30)在IPGTT模型中的体内活性的图。与运载工具(vehicle)组相比,所有化合物都诱导葡萄糖耐受性。

[0018] 图4展示非均质PEG₃₀-FMS-OXM和三种PEG₃₀-FMS-OXM变体(氨基、Lys12和Lys30)对于雄性ob/ob小鼠的体重的影响。

[0019] 图5展示非均质PEG₃₀-FMS-OXM和三种PEG₃₀-FMS-OXM变体(氨基、Lys12和Lys30)对于雄性ob/ob小鼠的食物摄入的影响。

[0020] 图6展示非均质PEG₃₀-FMS-OXM和三种PEG₃₀-FMS-OXM变体(氨基、Lys12和Lys30)对于雄性ob/ob小鼠的非空腹和空腹葡萄糖的影响。

[0021] 图7展示MOD-6031、OXM和利拉鲁肽(liraglutide)对于雄性ob/ob小鼠的累积食物摄入的影响。

[0022] 图8展示MOD-6031、OXM和利拉鲁肽对于雄性ob/ob小鼠的体重的影响。

[0023] 图9展示MOD-6031、OXM和利拉鲁肽对于雄性ob/ob小鼠的自由摄食和空腹血浆葡萄糖的影响。

[0024] 图10展示在研究第2天MOD-6031和配对喂养组对于雄性ob/ob小鼠的葡萄糖耐受性(2g/kg po)的影响。

[0025] 图11展示在研究第30天MOD-6031和配对喂养组对于雄性ob/ob小鼠的葡萄糖耐受性(2g/kg po)的影响。

[0026] 图12展示MOD-6031、OXM和利拉鲁肽对于雄性ob/ob小鼠的最终血浆胆固醇的影响。

[0027] 发明详述

[0028] 本文中提供一种长效胃泌酸调节素以及其生产和使用方法。在一个方面,本发明提供一种组合物,其包含或其组成为双重GLP-1/胰高血糖素受体激动剂、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)。在另一种实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含或其组成为胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)。在另一种实施方式中,所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的十二号位置上的赖氨酸残基(Lys₁₂)连接。在一种实施方式中,长效胃泌酸调节素是一种组合物,其包含或其组成为胃泌酸调节素和经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的十二号位置上的赖氨酸残基(Lys₁₂)连接的聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)。

[0029] 在另一个方面,本文中提供一种延长肽的血清半衰期的新方法。此方法基于聚乙二醇(PEG)链与所述肽通过化学接头(称为FMS或Fmoc)的可逆连接,使得原生肽缓慢释放到血流中。然后,所释放的肽还可以穿过血脑屏障以进入中枢神经系统(CNS)或任何其它靶器官。在一种实施方式中,FMS接头的独特化学结构产生特定肽释放速率。

[0030] 因此,在另一种实施方式中,本文中提供一种延长OXM肽的生物学半衰期的方法。在另一种实施方式中,本文中提供一种延长OXM在生物学液体中的循环时间的方法,其中通过缓慢释放完整OXM肽来延长所述循环时间。在另一种实施方式中,延长所述OXM肽的所述生物学半衰期或所述循环时间使得所述OXM可穿过血脑屏障并且靶向CNS。本领域技术人员应充分了解,所述生物学液体可以是血液、血清、脑脊液(CSF)等。

[0031] 在一种实施方式中,在将本发明的聚乙二醇化胃泌酸调节素组合物施用到对象中后,作为所述FMS或所述Fmoc接头从所述组合物化学水解的结果,胃泌酸调节素释放到对象的生物学液体中。在另一种实施方式中,所释放的胃泌酸调节素是完整的并且重新获得完全的GLP-1和胰高血糖素受体结合活性。在另一种实施方式中,使所述FMS或所述Fmoc化学水解延长了所述OXM肽在所述生物学液体中的循环时间。在另一种实施方式中,延长所述OXM的循环时间使得所述OXM可穿过血脑屏障并且靶向CNS。在另一种实施方式中,延长所述OXM的循环时间使得所述OXM可穿过血脑屏障并且靶向下丘脑。在另一种实施方式中,延长所述OXM的循环时间使得所述OXM可穿过血脑屏障并且靶向弓状核。

[0032] 在一个方面,PEG30-FMS-OXM的氨基变体(称为MOD-6031)是包含通过双官能接头(FMS或Fmoc)连接的OXM和mPEG(30)-SH的定点缀合物。在另一种实施方式中,通过其N末端侧的末端氨基连接所述OXM肽,所述末端氨基从一侧与接头上的N-琥珀酰亚胺酯(NHS)基反

应,而mPEG(30)-SH通过其硫醇基与FMS接头的马来酰亚胺部分连接(参见本文中实施例)。Lys12和Lys30变体通过其Lys残基的氨基与FMS接头缀合。在一种实施方式中,本文中利用可逆聚乙二醇化方法来产生本文中提供的长效胃泌酸调节素(OXM)肽(例如PEG30-FMS-OXM)。

[0033] 在一种实施方式中,术语“GLP-1/胰高血糖素受体激动剂”和“激动剂”两者在本文中可互换地使用。在另一种实施方式中,所述术语还包括本领域中已知的任何GLP-1/胰高血糖素受体激动剂。在另一种实施方式中,优选的激动剂是胃泌酸调节素或OXM或其功能性变体。

[0034] 在一种实施方式中,术语“功能性”是指本文中提供的激动剂或OXM具有生物学活性的能力,如本文中进一步提供,所述生物学活性包括但不限于减轻体重、增加胰岛素敏感性、降低胰岛素抗性、增加诱导葡萄糖耐受性的能量消耗、诱导血糖控制、改进胆固醇水平等。

[0035] 在一种实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS),其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素氨基酸序列的三十号位置上的赖氨酸残基(Lys₃₀)连接。在一种实施方式中,长效胃泌酸调节素是一种组合物,其包含或其组成为胃泌酸调节素和经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素氨基酸序列的十二号位置上的赖氨酸残基(Lys₃₀)连接的聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)。

[0036] 在一种实施方式中,本发明提供一种组合物,其由胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)组成,其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列三十号位置上的赖氨酸残基(Lys₃₀)连接。在一种实施方式中,长效胃泌酸调节素是一种组合物,其包含或其组成为胃泌酸调节素和经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的十二号位置上的赖氨酸残基(Lys₃₀)连接的聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)。

[0037] 在一种实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS),其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素的氨基末端连接。在一种实施方式中,长效胃泌酸调节素是一种组合物,其包含或其组成为胃泌酸调节素和经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的氨基末端连接的聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)。

[0038] 在一种实施方式中,本发明提供组合物,其由胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)组成,其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与所述胃泌酸调节素的氨基末端连接。在一种实施方式中,长效胃泌酸调节素是一种组合物,其包含或其组成为胃泌酸调节素和经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的氨基末端连接的聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)。

[0039] 在另一种实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含胃泌酸调节素肽以及经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)接头与胃泌酸调节素肽的位置十二上的赖氨酸氨基酸(Lys12)或位置30上的赖氨酸氨基酸(Lys30)或胃泌酸调节素肽的氨基末端缀合的聚乙二醇(PEG)聚合物。在另一种实施方式中,本发明提供一种经修饰的胃泌酸调节素肽,其由胃泌酸调节素肽和经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰

基 (FMS) 接头与胃泌酸调节素肽缀合聚乙二醇 (PEG) 聚合物组成, 所述聚乙二醇 (PEG) 聚合物与胃泌酸调节素肽的位置十二上的赖氨酸氨基酸 (Lys12) 或位置30上的赖氨酸氨基酸 (Lys30) 或胃泌酸调节素肽的氨基末端缀合。在另一种实施方式中, PEG在Lys12、Lys30处或在氨基末端处与胃泌酸调节素连接的组合物分别称为胃泌酸调节素的“Lys12变体”、“Lys30变体”或“氨基变体”。在一种实施方式中, 术语“氨基变体”与“N末端的变体”、“N’变体”或“N末端变体”同义。应理解, 本领域技术人员可以受本发明指导而容易地以位点特异性或随机方式将赖氨酸残基插入整个OXM序列中以便在这些赖氨酸残基处连接本文中提供的接头 (Fmoc或FMS) /PEG缀合物。在一种实施方式中, 其中一或多个赖氨酸残基位于整个OXM序列中的不同位置并且用于使OXM与PEG和可裂解接头 (例如FMS或Fmoc) 缀合的变体也涵盖于本发明中。

[0040] 在一种实施方式中, 本发明提供一种组合物, 其包含胃泌酸调节素肽以及经由9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS) 接头与胃泌酸调节素肽的位置十二上的赖氨酸氨基酸 (Lys12) 和位置30上的赖氨酸氨基酸 (Lys30) 缀合的聚乙二醇 (PEG) 聚合物。在另一种实施方式中, 本发明提供一种组合物, 其包含胃泌酸调节素肽以及经由9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS) 接头与胃泌酸调节素肽的位置十二上的赖氨酸氨基酸 (Lys12) 和氨基末端缀合的聚乙二醇 (PEG) 聚合物。在另一种实施方式中, 本发明提供一种组合物, 其包含胃泌酸调节素肽以及经由9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS) 接头与胃泌酸调节素肽的位置三十上的赖氨酸氨基酸 (Lys30) 和氨基末端缀合的聚乙二醇 (PEG) 聚合物。

[0041] 在另一种实施方式中, 长效胃泌酸调节素是聚乙二醇化胃泌酸调节素。在另一种实施方式中, 长效胃泌酸调节素是可逆聚乙二醇化的胃泌酸调节素。在另一种实施方式中, 短语“长效胃泌酸调节素”、“可逆聚乙二醇化的胃泌酸调节素”、“可逆聚乙二醇化的OXM”或“组合物, 其包含或其组成为胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物 (PEG聚合物) 以及9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS)”可互换地使用。在另一种实施方式中, 长效胃泌酸调节素是经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM。在另一种实施方式中, 所述长效OXM经由其Lys12残基或其Lys30残基或其氨基 (N’) 末端与Fmoc或FMS连接。

[0042] 在一种实施方式中, 本发明的长效胃泌酸调节素包含PEG聚合物。在另一种实施方式中, 本发明的长效胃泌酸调节素包含经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素肽的氨基末端缀合的PEG聚合物。在另一种实施方式中, 本发明的长效胃泌酸调节素包含经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素肽的赖氨酸残基12或30缀合的PEG聚合物。在另一种实施方式中, 本发明的长效胃泌酸调节素包含经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素肽的氨基末端以及胃泌酸调节素的赖氨酸残基12和30缀合的PEG聚合物。

[0043] 在另一种实施方式中, 长效胃泌酸调节素是一种组合物, 其包含或其组成为1:0.2-10:0.2-10摩尔比的胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物 (PEG聚合物) 以及9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS)。在另一种实施方式中, 长效胃泌酸调节素是一种组合物, 其包含或其组成为1:0.5-2:0.5-2摩尔比的胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物 (PEG聚合物) 以及9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS)。在另一种实施方式中, 长效胃泌酸调节素是一种组合物, 其包含或其组成为1:1:1摩尔比的胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物 (PEG聚合物) 以及9-苄基甲氧羰基 (Fmoc) 或2-磺基-9-苄基甲氧羰基 (FMS)。在另

一种实施方式中,长效胃泌酸调节素包括经由Fmoc或FMS结合到胃泌酸调节素的氨基末端的PEG聚合物。在另一种实施方式中,OXM-PEG-和接头的摩尔比是1:1:1-1:1:3.5。在另一种实施方式中,所述摩尔比是1:1:1-1:1:10.0。在另一种实施方式中,较高比率的接头使得所述组合物产率优化。

[0044] 在另一种实施方式中,长效胃泌酸调节素经由可逆接头与PEG连接,所述可逆接头例如但不限于Fmoc和FMS。在另一种实施方式中,Fmoc和FMS对碱敏感并且在生理条件下可去除。在另一种实施方式中,可逆接头是对碱敏感并且在生理条件下可去除的接头。在另一种实施方式中,可逆接头是对碱敏感并且在血液、血浆或淋巴液中的生理条件下可去除的接头。在另一种实施方式中,可逆接头是对碱敏感并且在体液中的生理条件下可去除的接头。在另一种实施方式中,可逆接头是在具有碱性pH的体液中可去除的接头。在另一种实施方式中,对碱敏感的接头在暴露于碱性环境后裂解,从而使OXM从接头和PEG释放。在另一种实施方式中,对温度敏感的接头在暴露于特定温度后裂解,所述温度允许发生所述裂解。在另一种实施方式中,使得接头能够裂解的温度在生理范围内。

[0045] 在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化的胃泌酸调节素是组合物,其中OXM经由可逆接头与PEG连接。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化胃泌酸调节素在暴露于碱性环境后释放游离OXM。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化胃泌酸调节素在暴露于血液或血浆后释放游离OXM。在另一种实施方式中,长效胃泌酸调节素包含PEG和胃泌酸调节素,其不像在标准聚乙二醇化程序中那样彼此直接连接,但两个残基与Fmoc或FMS的不同位置连接,所述Fmoc或FMS对碱非常敏感并且在常规生理条件下可去除。在另一种实施方式中,常规生理条件包括生理环境,例如血液或血浆。

[0046] 在另一种实施方式中,Fmoc和FMS的结构和制备方法描述于美国专利第7585837号中。美国专利第7585837号的公开内容特此以全文引用的方式并入本文中。

[0047] 在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化使得OXM成为长效OXM。在另一种实施方式中,长效胃泌酸调节素是具有延长的生物学半衰期的胃泌酸调节素。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化提供针对OXM降解的保护。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化实现OXM的 C_{max} 并且降低与施用本文中提供的组合物相关的副作用。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化延长OXM的 T_{max} 。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化延长OXM的循环半衰期。在另一种实施方式中,与未经修饰的OXM相比,可逆聚乙二醇化的OXM具有改进的生物利用度。在另一种实施方式中,与未经修饰的OXM相比,可逆聚乙二醇化的OXM具有改进的生物学活性。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化增强OXM的效能。

[0048] 在其它实施方式中,在生物化学量度方面,可逆聚乙二醇化OXM至少等效于未经修饰的OXM。在其它实施方式中,在药理学量度方面,可逆聚乙二醇化OXM至少等效于未经修饰的OXM。在其它实施方式中,在结合能力(Kd)方面,可逆聚乙二醇化OXM至少等效于未经修饰的OXM。在其它实施方式中,在通过消化系统吸收方面,可逆聚乙二醇化OXM至少等效于未经修饰的OXM。在其它实施方式中,在通过消化系统吸收期间,可逆聚乙二醇化OXM比未经修饰的OXM稳定。

[0049] 在另一种实施方式中,与游离OXM相比,可逆聚乙二醇化OXM展现改进的血液曲线下面积(AUC)水平。在另一种实施方式中,与游离OXM相比,可逆聚乙二醇化OXM展现改进的生物学活性和血液曲线下面积(AUC)水平。在另一种实施方式中,与游离OXM相比,可逆聚乙

二醇化OXM展现改进的血液保留时间($t_{1/2}$)。在另一种实施方式中,与游离OXM相比,可逆聚乙二醇化OXM展现改进的生物学活性和血液保留时间($t_{1/2}$)。在另一种实施方式中,与游离OXM相比,可逆聚乙二醇化OXM展现改进的血液 C_{max} 水平,其中在另一种实施方式中,其导致更慢的释放过程,所述更慢的释放过程减少与施用本文中提供的可逆聚乙二醇化组合物相关的副作用。在另一种实施方式中,与游离OXM相比,可逆聚乙二醇化OXM展现改进的生物学活性和血液 C_{max} 水平。在另一种实施方式中,本文中提供一种改进OXM的AUC、 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 、生物学活性或其任何组合的方法,其包含或其组成为使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与游离OXM的氨基末端缀合的步骤。

[0050] 在另一种实施方式中,通过使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与游离OXM的氨基末端缀合改进OXM的AUC、 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 、生物学活性或其任何组合,能够降低OXM的给药频率。在另一种实施方式中,本文中提供一种降低OXM的给药频率的方法,其包含或其组成为使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与OXM的氨基末端或赖氨酸残基缀合的步骤。在另一种实施方式中,OXM的可逆聚乙二醇化对于允许使用较低剂量是有利的。

[0051] 在另一种实施方式中,OXM包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在另一种实施方式中,OXM由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。在另一种实施方式中,SEQ ID NO:1包含或其组成为以下氨基酸(AA)序列:HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA (SEQ ID NO:1)。在另一种实施方式中,OXM包含或其组成为CAS第62340-29-8号中所描绘的氨基酸序列。

[0052] 在另一种实施方式中,OXM是人类OXM或任何哺乳动物OXM。在另一种实施方式中,OXM也称为胰高血糖素-37或生物活性的肠胰高血糖素。在另一种实施方式中,OXM是双重GLP-1/胰高血糖素受体激动剂。在另一种实施方式中,OXM是OXM的生物学活性片段。在另一种实施方式中,生物学活性的OXM从SEQ ID NO:1的氨基酸30延伸到氨基酸37。在另一种实施方式中,生物学活性OXM从SEQ ID NO:1的氨基酸19延伸到氨基酸37。在另一种实施方式中,本发明的OXM对应于其中缺失两个C末端氨基酸的八肽。在另一种实施方式中,本发明的OXM对应于SEQ ID NO:1的保持如本文中提供的OXM活性的任何片段。

[0053] 在一种实施方式中,OXM是指SEQ ID NO:1的肽的肽同源物。在一种实施方式中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数测定,本发明的OXM氨基酸序列与SEQ ID NO:1中阐述的OXM序列至少50%同源。在一种实施方式中,如使用NCBI的BlastP软件使用默认参数测定,本发明的OXM氨基酸序列与SEQ ID NO:1中阐述的OXM序列至少60%同源。在一种实施方式中,如使用NCBI的BlastP软件使用默认参数测定,本发明的OXM氨基酸序列与SEQ ID NO:1中阐述的OXM序列至少70%同源。在一种实施方式中,如使用NCBI的BlastP软件使用默认参数测定,本发明的OXM氨基酸序列与SEQ ID NO:1中阐述的OXM序列至少80%同源。在一种实施方式中,如使用NCBI的BlastP软件使用默认参数测定,本发明的OXM氨基酸序列与SEQ ID NO:1中阐述的OXM序列至少90%同源。在一种实施方式中,如使用NCBI的BlastP软件使用默认参数测定,本发明的OXM氨基酸序列与SEQ ID NO:1中阐述的OXM序列至少95%同源。

[0054] 在一种实施方式中,本发明的长效OXM维持未经修饰的OXM的生物学活性。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM包含OXM生物学活性。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含减少消化分泌。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活

性包含减少并且延迟胃排空。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含抑制小肠中的摄食能模式。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含抑制由五肽促胃酸激素刺激的酸分泌。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含增加胃生长激素抑制素释放。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含增强肽YY的作用。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含抑制胃饥饿素释放。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含刺激氨基比林累积和cAMP产生。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含结合GLP-1受体。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含结合胰高血糖素受体。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含通过活化腺苷酸环化酶刺激H⁺产生。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含抑制组胺刺激的胃酸分泌。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含抑制食物摄入。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含刺激胰岛素释放。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含抑制外分泌的胰腺的分泌。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含增加胰岛素敏感性。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含降低葡萄糖水平。

[0055] 在一种实施方式中,本发明进一步提供一种延长胃泌酸调节素的生物学半衰期的方法,其由使胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)以1:1:1的摩尔比缀合的步骤组成,其中在另一种实施方式中,PEG聚合物经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0056] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种延长胃泌酸调节素的生物学半衰期的方法,其由使胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)以1:1:1的摩尔比缀合的步骤组成,其中所述PEG聚合物经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基缀合。

[0057] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种延长胃泌酸调节素的生物半衰期的方法,其由使胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)以1:1:1的摩尔比缀合的步骤组成,其中所述PEG聚合物经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的30号位置上的赖氨酸残基缀合。

[0058] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种延长胃泌酸调节素的生物半衰期的方法,其由使胃泌酸调节素、聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)以及9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)以1:1:1的摩尔比缀合的步骤组成,其中所述PEG聚合物经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与所述胃泌酸调节素的氨基酸序列的氨基末端缀合。

[0059] 在另一种实施方式中,OXM-PEG-与接头的摩尔比是1:1:1-1:1:3.5。在另一种实施方式中,所述摩尔比是1:1:1-1:1:10.0。在另一种实施方式中,较高比率的接头提供优化的组合物产率。

[0060] 在一种实施方式中,本发明涉及一种改进胃泌酸调节素的曲线下面积(AUC)的方

法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合的步骤组成。

[0061] 在另一种实施方式中,本发明涉及一种改进胃泌酸调节素的曲线下面积(AUC)的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基缀合的步骤组成。

[0062] 在一种实施方式中,本发明涉及一种改进胃泌酸调节素的曲线下面积(AUC)的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的30号位置上的赖氨酸残基缀合的步骤组成。

[0063] 在一种实施方式中,本发明涉及一种改进胃泌酸调节素的曲线下面积(AUC)的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的氨基末端缀合的步骤组成。

[0064] 在一个方面,本文中提供一种降低胃泌酸调节素的给药频率的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合的步骤组成。

[0065] 在另一个方面,本文中提供一种降低胃泌酸调节素的给药频率的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基缀合的步骤组成。

[0066] 在另一个方面,本文中提供一种降低胃泌酸调节素的给药频率的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)结合到胃泌酸调节素的氨基酸序列的30号位置上的赖氨酸残基的步骤组成。

[0067] 在另一个方面,本文中提供一种降低胃泌酸调节素的给药频率的方法,其由使聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)经由9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS)与胃泌酸调节素的氨基酸序列的氨基末端缀合的步骤组成。

[0068] 在另一种实施方式中,本发明进一步提供一种在对象中减少食物摄入的方法,其包含给对象施用组合物的步骤,所述组合物由经由柔性接头与聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)缀合的胃泌酸调节素组成,其中所述柔性接头是9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS),并且其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0069] 在另一种实施方式中,本发明进一步提供一种在对象中减轻体重的方法,其包含给对象施用组合物的步骤,所述组合物由经由柔性接头与聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)缀合的胃泌酸调节素组成,其中所述柔性接头是9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS),并且其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0070] 在另一种实施方式中,本发明进一步提供一种在对象中诱导血糖控制的方法,其包含给对象施用组合物的步骤,所述组合物由经由柔性接头与聚乙二醇聚合物(PEG聚合物)缀合的胃泌酸调节素组成,其中所述柔性接头是9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或2-磺基-9-苄基甲氧羰基(FMS),并且其中所述PEG聚合物经由Fmoc或FMS与胃泌酸调节素的氨基酸序列

的12号位置上的赖氨酸残基或30号位置上的赖氨酸残基或氨基末端缀合。

[0071] 如本文中所示的(参见实施例5),本文中提供的氨基变体意外地实现了减少的食物摄入、体重控制和血糖控制。在一种实施方式中,本文中提供的OXM肽的PEG修饰意外地不干扰OXM功能。

[0072] 在另一种实施方式中,本发明提供一种在对象中改进胆固醇水平的方法,其包含给对象施用有效量的本文中提供的组合物的步骤。在另一种实施方式中,改进胆固醇水平包含在对象中减少LDL胆固醇同时增加HDL胆固醇。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到低于200mg/dL,但高于0mg/dL。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到约100-129mg/dL。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到低于100mg/dL,但高于0mg/dL。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到低于70mg/dL,但高于0mg/dL。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到低于5.2mmol/L,但高于0mmol/L。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到约2.6到3.3mmol/L。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到低于2.6mmol/L,但高于0mmol/L。在另一种实施方式中,LDL胆固醇水平降低到低于1.8mmol/L,但高于0mmol/L。

[0073] 在另一种实施方式中,本发明进一步提供一种在对象中降低胰岛素抗性的方法,其包含给对象施用有效量的本文中提供的组合物的步骤。

[0074] 在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含通过迷走神经间接机制抑制胰腺分泌。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含减少通过小肠的水溶矿物(hydromineral)输送。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含刺激葡萄糖摄入。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含控制/刺激生长激素抑制素分泌。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含食物摄入和体重增加都减少。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含减少肥胖症。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含食欲抑制。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含诱导厌食。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含在超重和肥胖的对象中减少体重。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性包含诱导脂肪激素瘦素和脂联素的水平的变化。在另一种实施方式中,本发明的长效OXM的生物学活性除了在超重和肥胖对象中减少能量摄入之外,还包含增加能量消耗。

[0075] 在另一种实施方式中,PEG聚合物经由Fmoc或FMS附着于胃泌酸调节素的氨基末端或赖氨酸残基。在另一种实施方式中,术语“附着(attached)”和“连接(linked)”可互换地使用。在另一种实施方式中,PEG聚合物与OXM的 α -氨基侧链连接。在另一种实施方式中,PEG聚合物与OXM的 ϵ -氨基侧链连接。在另一种实施方式中,PEG聚合物与OXM的一或多个 ϵ -氨基侧链连接。在另一种实施方式中,PEG聚合物包含巯基部分。

[0076] 在另一种实施方式中,PEG是线性的。在另一种实施方式中,PEG是分枝的。在另一种实施方式中,PEG的分子量在200到200,000Da范围内。在另一种实施方式中,PEG的分子量在5,000到80,000Da范围内。在另一种实施方式中,PEG的分子量在5,000到40,000Da范围内。在另一种实施方式中,PEG的分子量在20,000Da到40,000Da范围内。

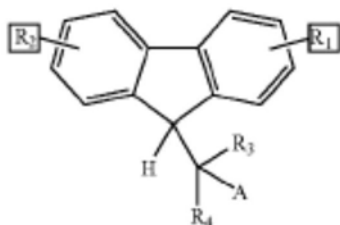
[0077] 在另一种实施方式中,使用聚乙二醇化剂制备长效OXM,所述聚乙二醇化剂意指能够与存在于Fmoc或FMS部分的苄环处的官能团反应的任何PEG衍生物,所述官能团例如但不

限于 NH_2 、 OH 、 SH 、 COOH 、 CHO 、 --N=C=O 、 --N=C=S 、 $\text{--SO}_2\text{Cl}$ 、 $\text{--SO}_2\text{CH=CH}_2$ 、 $\text{--PO}_2\text{Cl}$ 、 $\text{--(CH}_2\text{)}_x\text{Hal}$ 。在另一种实施方式中,所述聚乙二醇化剂通常以其单甲氧基化形式使用,其中仅PEG分子的一个末端处的一个羟基可用于结合。在另一种实施方式中,如果例如需要获得两个肽或蛋白质残基共价附着于单一PEG部分的缀合物,可以使用两个末端都可用于缀合的PEG双官能形式。

[0078] 在另一种实施方式中,分枝PEG表示为 R(PEG-OH)_m ,其中R表示中心核心部分,例如季戊四醇或甘油,并且m表示分枝臂的数目。分枝臂的数目(m)可以在三到一百或更多的范围内。在另一种实施方式中,羟基经历化学修饰。在另一种实施方式中,分枝PEG分子描述于美国专利第6,113,906号、第5,919,455号、第5,643,575号和第5,681,567号中,所述专利特此以全文引用的方式并入。

[0079] 在另一种实施方式中,本发明提供具有PEG部分的OXM,所述PEG部分不像在标准聚乙二醇化程序中一样直接附着于OXM,而是所述PEG部分通过例如Fmoc或FMS的接头附着。在另一种实施方式中,接头对碱非常敏感并且在弱碱性条件下可去除。在另一种实施方式中,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM与游离OXM具有相等活性。在另一种实施方式中,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM的活性大于游离OXM。在另一种实施方式中,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM包含与游离OXM不同的活性。在另一种实施方式中,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM不同于游离OXM,不具有中枢神经系统活性。在另一种实施方式中,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM不同于游离OXM,不能穿过血脑屏障进入脑中。在另一种实施方式中,与游离OXM相比,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM包含延长的循环半衰期。在另一种实施方式中,经由Fmoc或FMS与PEG连接的OXM连同Fmoc或FMS部分一起失去其PEG部分,因此恢复游离OXM。

[0080] 在另一种实施方式中,本发明提供下式的化合物: $(\text{X})_n\text{--Y}$,其中Y是OXM的带有游离氨基、羧基或羟基的部分,并且X是式(i)基团:



[0081]

[0082] 在另一种实施方式中, R_1 是含有蛋白质或聚合物载体部分聚乙二醇(PEG)部分的基团; R_2 选自氢、烷基、烷氧基、烷氧基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、卤素、硝基、 $\text{--SO}_3\text{H}$ 、 $\text{--SO}_2\text{NHR}$ 、氨基、铵、羧基、 PO_3H_2 和 OPO_3H_2 ;R选自氢、烷基和芳基; R_3 和 R_4 相同或不同,各自选自氢、烷基和芳基;当所述基团与OXM-Y的氨基或羟基连接时,A是共价键;n是至少为一的整数,和其药学上可接受的盐。

[0083] 在另一种实施方式中,术语“烷基”、“烷氧基”、“烷氧基烷基”、“芳基”、“烷芳基”和“芳烷基”用以表示具有1-8个、优选地1-4个碳原子的烷基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基和丁基;和具有6-10个碳原子的芳基,例如苯基和萘基。术语“卤素”包括溴、氟、氯和碘。

[0084] 在另一种实施方式中, R_2 、 R_3 和 R_4 各自是氢,并且A是 --OCO-- ,即9-芴基甲氧羰基(下文“Fmoc”)。在另一种实施方式中,R是在芴环的2位的 $\text{--SO}_3\text{H}$, R_3 和 R_4 各自是氢,并且A是 --OCO-- ,即2-磺基-9-芴基甲氧羰基(下文“FMS”)。

[0085] 在另一种实施方式中,OXM的聚乙二醇化和 $(\text{PEG-Fmoc})_n\text{-OXM}$ 或 $(\text{PEG-FMS})_n\text{-OXM}$ 缀

合物的制备分别包括使MAL-FMS-NHS或MAL-Fmoc-NHS附着于OXM的胺组分,从而获得MAL-FMS-OXM或MAL-Fmoc-OXM缀合物,并且然后用PEG-SH取代马来酰亚胺部分,分别产生(PEG-FMS)_n-OXM或(PEG-Fmoc)_n-OXM缀合物。

[0086] 在另一种实施方式中,OXM的聚乙二醇化分别包括使MAL-FMS-NHS或MAL-Fmoc-NHS与PEG-SH反应,从而形成PEG-FMS-NHS或PEG-Fmoc-NHS缀合物,并且然后使其与OXM的胺组分反应,产生所要的(PEG-FMS)_n-OXM或(PEG-Fmoc)_n-OXM缀合物。在另一种实施方式中,肽/蛋白质(例如OXM)的聚乙二醇化描述于美国专利第7585837号中,所述专利以全文引用的方式并入本文中。在另一种实施方式中,肽/蛋白质(例如具有Fmoc或FMS的OXM)的可逆聚乙二醇化描述于美国专利第7585837号中。

[0087] 在另一种实施方式中,短语“长效OXM”和“可逆聚乙二醇化OXM”可互换地使用。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM包括PEG-FMS-OXM和PEG-Fmoc-OXM,本文中由下式标识:(PEG-FMS)_n-OXM或(PEG-Fmoc)_n-OXM,其中n是至少为一的整数,并且OXM通过至少一个氨基与FMS或Fmoc基团连接。

[0088] 在另一种实施方式中,PEG-Fmoc或PEG-FMS与OXM的Lys12或Lys30或氨基末端缀合不使OXM失活。

[0089] 在一种实施方式中,Lys12变体在提供体重控制方面比本文中提供的其它变体更有效。在另一种实施方式中,本文中提供的Lys30变体在实现体重控制方面比本文中提供的其它变体更有效。在另一种实施方式中,本文中提供的氨基变体在实现体重控制方面比本文中提供的其它变体更有效。

[0090] 在一种实施方式中,Lys12变体在实现长期血糖控制方面比本文中提供的其它变体更有效。在另一种实施方式中,本文中提供的Lys30变体在实现长期血糖控制方面比本文中提供的其它变体更有效。在另一种实施方式中,本文中提供的氨基变体在实现血糖控制方面比本文中提供的其它变体更有效。

[0091] 治疗性用途

[0092] 在另一种实施方式中,PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM以及包含它们的药物组合物用于预防高血糖症,用于改进血糖控制,用于治疗糖尿病,所述糖尿病选自非胰岛素依赖型糖尿病(在一种实施方式中,2型糖尿病)、胰岛素依赖型糖尿病(在一种实施方式中,1型糖尿病)和妊娠期糖尿病,或其任何组合。在另一种实施方式中,PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM以及包含它们的药物组合物用于治疗2型糖尿病。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于增加对胰岛素的敏感性。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低胰岛素抗性。

[0093] 在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于抑制食欲。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于诱导饱腹感。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于减轻体重。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于减少体脂。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低身体质量指数。在另一种实施方式中,本文中提供

的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于减少食物食用。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于治疗肥胖。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于治疗与肥胖相关的糖尿病。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于提高心率。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于提高基础代谢率(BMR)。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于增加能量消耗。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于诱导葡萄糖耐受性。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于诱导血糖控制。在一种实施方式中,血糖控制是指非高和/或非波动的血糖水平和/或非高和/或非波动的糖基化血红蛋白水平。

[0094] 在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于抑制体重增加,其中在另一种实施方式中,体重增加是由于脂肪增加。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低血糖水平。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于减少热量摄入。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低食欲。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于体重控制。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于诱导或促进体重减轻。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于维持想要的体重、想要的身体质量指数、想要的外貌和良好的健康中的任一或多个。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于控制脂质谱。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低甘油三酯水平。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低甘油水平。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于提高脂联素水平。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低游离脂肪酸水平。

[0095] 在一种实施方式中,术语“降低……的水平”是指相对于初始、野生型、正常或对照水平降低约1-10%。在另一种实施方式中,降低约11-20%。在另一种实施方式中,降低约21-30%。在另一种实施方式中,降低约31-40%。在另一种实施方式中,降低约41-50%。在另一种实施方式中,降低约51-60%。在另一种实施方式中,降低约61-70%。在另一种实施方式中,降低约71-80%。在另一种实施方式中,降低约81-90%。在另一种实施方式中,降低约91-95%。在另一种实施方式中,降低约96-100%。

[0096] 在一种实施方式中,术语“提高……的水平”或“延长”是指相对于初始、野生型、正常或对照水平提高约1-10%。在另一种实施方式中,提高约11-20%。在另一种实施方式中,提高约21-30%。在另一种实施方式中,提高约31-40%。在另一种实施方式中,提高约41-

50%。在另一种实施方式中,提高约51-60%。在另一种实施方式中,提高约61-70%。在另一种实施方式中,提高约71-80%。在另一种实施方式中,提高约81-90%。在另一种实施方式中,提高约91-95%。在另一种实施方式中,提高约96-100%。

[0097] 在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于降低胆固醇水平。在一种实施方式中,胆固醇水平的降低大于在施用天然OXM之后所观测的降低。在一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物降低胆固醇水平60-70%。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物降低胆固醇水平50-100%。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物降低胆固醇水平25-90%。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物降低胆固醇水平50-80%。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物降低胆固醇水平40-90%。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物用于提高HDL胆固醇水平。

[0098] 在一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物可以用于本文中所描述的目的而不显著降低施用过程中的有效性。在一种实施方式中,PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM以及包含它们的药物组合物保持有效1天。在另一种实施方式中,PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM以及包含它们的药物组合物保持有效2-6天。在一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效1周。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效2周。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效3周。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效4周。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效6周。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效2个月。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效4个月。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效6个月。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物保持有效1年或更久。

[0099] 在一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物可以用于本文中所描述的目的并且可以在施用第一剂量后立即有效。在另一种实施方式中,本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物在施用两个或更多个剂量之后有效。

[0100] 在另一种实施方式中,将如上文所描述的利用本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物的方法应用于受疾病或病况折磨的人类对象,所述疾病或病况可以由OXM缓解、抑制和/或治疗的。在另一种实施方式中,如上文所描述的利用本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物的方法是兽医学方法。在另一种实施方式中,将如上文所描述的利用本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和

PEG-FMS-OXM变体以及包含它们的药物组合物的方法应用于动物,例如家畜、宠物和实验室动物。因此,在一种实施方式中,本发明的对象是猫科动物、犬科动物、牛科动物、猪科动物、鼠科动物、aquine等。

[0101] 在另一种实施方式中,本发明提供一种在对象中治疗或减轻通过OXM或包含其的药物配制品可治疗或可减轻的疾病的方法,所述方法包含给对象施用治疗有效量的本文中提供的PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体的步骤,从而在对象中治疗或减轻通过OXM可治疗或可减轻的疾病。

[0102] 在另一种实施方式中,如本文中所示, OXM、“肽”或“蛋白质”涵盖天然肽(降解产物、以合成方式合成的蛋白质或重组蛋白)和肽模拟物(通常是以合成方式合成的蛋白质),以及类肽和半类肽,它们是蛋白质类似物,在一些实施方式中具有使蛋白质在体内时更稳定或更能够穿透到细胞中的修饰。

[0103] 在另一种实施方式中,“PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体”是其中FMS或Fmoc在Lys12处结合到OXM的PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体。在另一种实施方式中,PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体是其中FMS或Fmoc在Lys30处结合到OXM的PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体。在另一种实施方式中,PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体是其中FMS或Fmoc在氨基末端处结合到OXM的PEG-Fmoc-OXM和/或PEG-FMS-OXM变体。

[0104] 在另一种实施方式中,修饰包括但不限于N末端修饰、C末端修饰、肽键修饰(包括但不限于CH₂-NH、CH₂-S、CH₂-S=O、O=C-NH、CH₂-O、CH₂-CH₂、S=C-NH、CH=CH或CF=CH)、骨架修饰和残基修饰。制备肽模拟化合物的方法在本领域中是熟知的并且于例如, Quantitative Drug Design, C.A.Ramsden Gd., Chapter 17.2, F.Choplin Pergamon Press (1992)

[0105] 中进行了说明,所述文献以引用的方式并入,就如同本文中充分阐述一般。下文提供关于这方面的其它细节。

[0106] 在另一种实施方式中,肽内的肽键(-CO-NH-)是经取代的。在一些实施方式中,肽键经N-甲基化键(-N(CH₃)-CO-)取代。在另一种实施方式中,肽键经酯键(-C(R)H-C-O-O-(R)-N-)取代。在另一种实施方式中,肽键经酮亚甲基键(-CO-CH₂-)取代。在另一种实施方式中,肽键经 α -氮杂键(-NH-N(R)-CO-,其中R是任何烷基,例如甲基)、carba键(-CH₂-NH-)取代。在另一种实施方式中,肽键经羟基乙烯键(-CH(OH)-CH₂-)取代。在另一种实施方式中,肽键经硫代酰胺键(-CS-NH-)取代。在一些实施方式中,肽键经烯烃双键(-CH=CH-)取代。在另一种实施方式中,肽键经逆酰胺键(-NH-CO-)取代。在另一种实施方式中,肽键经肽衍生物(-N(R)-CH₂-CO-)取代,其中R是碳原子上天然存在的“正常”侧链。在一些实施方式中,这些修饰出现在沿着肽链的任一键处并且甚至同时出现在若干个键(2-3个键)处。

[0107] 在一种实施方式中,用合成的非天然酸取代蛋白质的天然芳香族氨基酸(例如 Trp、Tyr 和 Phe),所述合成的非天然酸例如苯基甘氨酸、TIC、萘基丙氨酸(naphthylelanine, Nol)、Phe的环甲基化衍生物、Phe的卤化衍生物或邻甲基-Tyr。在另一种实施方式中,本发明的肽包括一或多个经修饰的氨基酸或一或多个非氨基酸单体(例如脂肪酸、复合碳水化合物等)。

[0108] 与野生型OXM相比,本发明的OXM衍生物或变体含有若干个氨基酸取代,和/或可以是聚乙二醇化的或另外修饰的(例如重组或化学)。

[0109] 本文中提供的OXM还涵盖具有以上OXM序列的任何类似物。序列中的任一或多个氨基酸残基可以独立地经在本领域中众所周知的保守置换而置换,即用具有类似化学类型的氨基酸置换氨基酸,例如用另一种疏水性氨基酸置换一种疏水性氨基酸。或者,可以进行非保守氨基酸突变,所述突变导致OXM的作用或生物学活性增强。在一种实施方式中,OXM被修饰成对通过二肽基肽酶IV (DPP-IV) 的裂解和失活具有抗性。OXM的衍生物和变体以及其产生方法公开于美国专利申请公开第2011/0152182号、美国专利申请公开第2011/0034374号、美国专利申请公开第2010/0144617号中,所述专利全部以引用的方式并入本文中。

[0110] 在一种实施方式中,本文中提供的双重GLP-1/胰高血糖素受体激动剂可以经化学修饰。在另一种实施方式中,本文中提供的OXM可以经化学修饰。具体来说,OXM的氨基酸侧链、氨基末端和/或羧酸末端可以经修饰。举例来说,OXM可以经历烷基化、二硫化物形成、金属络合、酰化、酯化、酰胺化、硝化、酸处理、碱处理、氧化或还原之一或多者。执行这些过程的方法在本领域中是熟知的。具体来说,OXM以其低级烷基酯、低级烷基酰胺、低级二烷基酰胺、酸加成盐、羧酸盐或碱加成盐形式提供。具体来说,OXM的氨基或羧酸末端可以通过例如酯化、酰胺化、酰化、氧化或还原而衍生。具体来说,OXM的羧酸末端可以经衍生以形成酰胺部分。

[0111] 在一种实施方式中,“氨基酸(amino acid或amino acids)”理解为包括20种天然存在的氨基酸;通常经体内翻译后修饰的那些氨基酸,包括例如羟基脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸;和其它非寻常氨基酸,包括但不限于2-氨基己二酸、羟基赖氨酸、异锁链素、正缬氨酸、正亮氨酸和鸟氨酸。在一种实施方式中,“氨基酸”包括D-和L-氨基酸。应理解,还可以使用其它合成或经修饰的氨基酸。

[0112] 在一种实施方式中,本发明的OXM用于需要OXM呈可溶形式的疗法中。在另一种实施方式中,本发明的OXM包括由于其含羟基侧链而能够提高蛋白质溶解度的一或多种非天然或天然极性氨基酸,包括但不限于丝氨酸和苏氨酸。

[0113] 在一种实施方式中,本发明的OXM是通过例如使用标准固相技术生物化学合成的。在另一种实施方式中,这些生物化学方法包括专一性固相合成、部分固相合成、片段缩合或经典溶液合成。

[0114] 在一种实施方式中,固相OXM合成程序为本领域技术人员所熟知并且由John Morrow Stewart和Janis Dillaha Young, *Solid Phase Protein Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984) 进一步描述。在另一种实施方式中,合成的蛋白质通过制备型高效液相色谱法纯化 [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.] 并且其组成可以通过本领域技术人员已知的方法经由氨基酸测序来证实。

[0115] 在另一种实施方式中,重组蛋白技术用于产生本发明的OXM。在一些实施方式中,重组蛋白技术用于产生大量本发明的OXM。在另一种实施方式中,重组技术由Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 和 Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 和 Weissbach 与 Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press,

NY, Section VIII, pp 421-463描述。

[0116] 在另一种实施方式中,本发明的OXM使用编码本发明的OXM的多核苷酸合成。在一些实施方式中,编码本发明的OXM的多核苷酸连接到表达载体中,所述载体包含顺式调控序列(例如启动子序列)的转录控制。在一些实施方式中,所述顺式调控序列适用于指导本发明的OXM的组成型表达。

[0117] 在一种实施方式中,短语“多核苷酸”是指以RNA序列、互补多核苷酸序列(cDNA)、基因组多核苷酸序列和/或复合多核苷酸序列(例如上述的组合)形式分离并且提供的单链或双链核酸序列。

[0118] 在一种实施方式中,“互补多核苷酸序列”是指由使用逆转录酶或任何其它RNA依赖型DNA聚合酶逆转录信使RNA产生的序列。在一种实施方式中,所述序列可以随后使用DNA聚合酶体内或体外扩增。

[0119] 在一种实施方式中,“基因组多核苷酸序列”是指由染色体来源(分离)的序列,因此其表示染色体的连续部分。

[0120] 在一种实施方式中,“复合多核苷酸序列”是指至少部分互补并且至少部分基因组的序列。在一种实施方式中,复合序列可以包括用于编码本发明的肽所需的一些外显子序列以及插入在其间的一些内含子序列。在一种实施方式中,内含子序列可以是任何来源,包括其它基因的,并且通常包括保守的拼接信号序列。在一种实施方式中,内含子序列包括顺式作用表达调控元件。参见

[0121] 在一种实施方式中,本发明的多核苷酸使用PCR技术或本领域技术人员已知的任何其它方法或程序制备。在一些实施方式中,所述程序涉及连接两个不同DNA序列(参见例如“Current Protocols in Molecular Biology”, eds Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992)。

[0122] 在一种实施方式中,多种原核或真核细胞可以用作宿主表达系统以表达本发明的OXM。在另一种实施方式中,这些宿主表达系统包括但不限于微生物,例如经含有蛋白质编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌;经含有蛋白质编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母;经重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV)感染或经含有蛋白质编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统。

[0123] 在一种实施方式中,使用非细菌表达系统(例如哺乳动物表达系统,例如CHO细胞)来表达本发明的OXM。在一种实施方式中,用于在哺乳动物细胞中表达本发明的多核苷酸的表达载体是包含CMV启动子和新霉素抗性基因的pCI-DHFR载体。

[0124] 在另一种实施方式中,在本发明的细菌系统中,有利地,可以根据所表达的蛋白质的预期用途来选择多种表达载体。在一种实施方式中,需要大量的OXM。在一种实施方式中,需要指导高水平的蛋白质产物表达的载体,所述蛋白质产物可能作为与疏水性信号序列的融合蛋白,所述疏水性信号序列指引表达的产物进入到细菌周质或培养基中,在那里容易纯化蛋白质产物。在一种实施方式中,某些融合蛋白经特定裂解位点工程化以帮助回收蛋白质。在一种实施方式中,适于这样的处理的载体包括但不限于pET系列的大肠杆菌(E. coli)表达载体[Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)]。

[0125] 在一种实施方式中,使用酵母表达系统。在一种实施方式中,如美国专利申请第5,

932,447号中所公开,可以在酵母中使用含有组成型或诱导型启动子的多种载体。在另一种实施方式中,使用促进外来DNA序列整合到酵母染色体中的载体。

[0126] 在一种实施方式中,本发明的表达载体可以进一步包括允许例如从单一mRNA翻译数种蛋白质的额外多核苷酸序列,例如内部核糖体进入位点(IRES)和用于启动子-嵌合蛋白质的基因组整合的序列。

[0127] 在一种实施方式中,哺乳动物表达载体包括但不限于可获自Invitrogen的pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81,可获自Promega的pCI,可获自Stratagene的pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV,;可获自Clontech的pTRES,和其衍生物。

[0128] 在另一种实施方式中,本发明使用含有来自真核病毒(例如逆转录病毒)的调控元件的表达载体。SV40载体包括pSVT7和pMT2。在另一种实施方式中,衍生自牛乳头瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA,并且衍生自Epstein Bar病毒的载体包括pHEB0和p205。其它例示性载体包括pMSG、pAV009/A⁺、pMT010/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE以及允许蛋白质在SV-40早期启动子、SV-40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或显示为对于在真核细胞中的表达有效的其它启动子的指导下表达的任何其它载体。

[0129] 参见

[0130] 在一种实施方式中,使用植物表达载体。在一种实施方式中,OXM编码序列的表达由多个启动子驱动。在另一种实施方式中,使用病毒启动子,例如CaMV的35S RNA和19S RNA启动子[Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)],或TMV的外壳蛋白启动子[Takamatsu et al., EMBO J.6:307-311 (1987)]。在另一种实施方式中,使用植物启动子,例如RUBISCO的小亚基[Coruzzi et al., EMBO J.3:1671-1680 (1984);和Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)]或热激启动子,例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B[Gurley et al., Mol. Cell. Biol.6:559-565 (1986)]。在一种实施方式中,构建体使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、显微注射、电穿孔和本领域技术人员熟知的其它技术引入植物细胞中。参见例如Weissbach与Weissbach[Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]。本发明还可以使用本领域中熟知的其它表达系统,例如昆虫和哺乳动物宿主细胞系统。

[0131] 应了解,除含有用于转录和翻译所插入的编码序列(编码蛋白质)的必需元件以外,本发明的表达构建体还可以包括经工程化以优化所表达的蛋白质的稳定性、产生、纯化、产率或活性的序列。

[0132] 在一些实施方式中,可以使用各种方法来将本发明的表达载体引入宿主细胞系统中。在一些实施方式中,所述方法一般来说描述于 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988);

和Gilboa et al. [Biotechniques 4(6):504-512, 1986]中,并且包括例如稳定或瞬时转染、脂质转染、电穿孔和重组病毒载体感染。另外,关于正-负选择方法,参见美国专利第5,464,764号和第5,487,992号。

[0133] 在一种实施方式中,经转化的细胞在允许高量重组OXM表达的有效条件下培养。在另一种实施方式中,有效培养条件包括但不限于允许蛋白质产生的有效培养基、生物反应器、温度、pH和氧气条件。在一种实施方式中,有效培养基是指其中细胞经培养以产生本发明的重组OXM的任何培养基。在另一种实施方式中,培养基通常包括具有可同化的碳、氮和磷酸根来源以及适当盐、矿物质、金属和其它营养素(例如维生素)的水性溶液。在一种实施方式中,本发明的细胞可以在常规发酵生物反应器、振荡烧瓶、试管、微量滴定盘和培养皿中进行培养。在另一种实施方式中,培养在适于重组细胞的温度、pH和氧含量下进行。在另一种实施方式中,培养条件在本领域的普通技术人员的专业知识内。

[0134] 在一种实施方式中,根据用于生产的载体和宿主系统,所得本发明的OXM保持在重组细胞内、分泌到发酵培养基中、分泌到两层细胞的膜之间的空间(例如大肠杆菌中的周质空间)中;或保留在细胞或病毒膜的外表面上。

[0135] 在一种实施方式中,在培养预定时间之后,进行重组OXM的回收。

[0136] 在一种实施方式中,本文中所用的短语“回收重组OXM”是指收集含有OXM的全部发酵培养基并且不需要隐含额外分离或纯化步骤。

[0137] 在一种实施方式中,本发明的OXM使用多种标准蛋白质纯化技术纯化,所述技术例如但不限于亲和色谱法、离子交换色谱法、过滤、电泳、疏水相互作用色谱法、凝胶过滤色谱法、逆相色谱法、伴刀豆球蛋白A色谱法、色谱聚焦和差示溶解(differential solubilization)。

[0138] 参见在一种实施方式中,为了有助于回收,所表达的编码序列可以经工程化以编码本发明的蛋白质和融合的可裂解部分。在一种实施方式中,融合蛋白可以被设计成使得蛋白质可以容易通过亲和色谱法,例如通过固定于对可裂解部分具有特异性的柱上,而分离。在一种实施方式中,在蛋白质与可裂解部分之间设计裂解位点,并且可以通过用在此位点处特异性地裂解融合蛋白的适当酶或试剂处理而从色谱柱释放所述蛋白质[例如参见Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); 和Gardella et al., J. Biol. Chem. 265: 15854-15859 (1990)]。在另一种实施方式中,本发明的OXM以“基本上纯的”形式回收。在另一种实施方式中,短语“基本上纯的”是指允许在本文中所描述的应用中有效使用OXM的纯度。

[0139] 在一种实施方式中,本发明的OXM还可以使用体外表达系统合成。在一种实施方式中,体外合成方法在本领域中是熟知的并且系统的组件是可商购的。

[0140] 在另一种实施方式中,体外结合活性通过测量如本文中所描述的天然、重组和/或可逆聚乙二醇化OXM以及包含其的药物组合物治疗或改善例如但不限于以下的疾病或病况的能力来确定:糖尿病、肥胖、进食障碍、代谢障碍等。在另一种实施方式中,体内活性通过所治疗的疾病的已知量度来推论。

[0141] 在另一种实施方式中,在可注射溶液中,一剂本发明的OXM肽包含0.005到0.1mg/kg。在另一种实施方式中,所述剂包含0.005到0.5mg/kg OXM肽。在另一种实施方式中,所述剂包含0.05到0.1微克OXM肽。在另一种实施方式中,在可注射溶液中,所述剂包含0.005到

0.1mg/kg OXM肽。

[0142] 在另一种实施方式中,一天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每36小时一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每48小时一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每60小时一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每72小时一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每84小时一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每96小时一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每5天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每6天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每7天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每8-10天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每10-12天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每12-15天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。在另一种实施方式中,每15-25天一次施用一剂可逆聚乙二醇化OXM。

[0143] 在另一种实施方式中,本发明的可逆聚乙二醇化OXM通过肌肉(IM)注射、皮下(SC)注射或静脉内(IV)注射一周施用一次。

[0144] 在另一种实施方式中,可以向个体提供本发明的可逆聚乙二醇化OXM本身。在一种实施方式中,可以作为药物组合物的一部分向个体提供本发明的可逆聚乙二醇化OXM,在所述药物组合物中,它与药学上可接受的载剂混合。

[0145] 在另一种实施方式中,“药物组合物”是指如本文中所描述的长效OXM与其它化学组分(例如生理学上合适的载剂和赋形剂)的制剂。药物组合物的目的是帮助向生物体施用化合物。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM可导致生物学效果。

[0146] 在另一种实施方式中,本发明的组合物中的任一者将至少包含可逆聚乙二醇化OXM。在一种实施方式中,本发明提供组合制剂。在一种实施方式中,“组合制剂”尤其定义“多部分试剂盒”,其含义在于如上文所定义的组合伴侣可以独立给药或通过使用与可分辨的量的组合伴侣的不同固定组合(即同步、同时、单独地或依序)给药。在一些实施方式中,多部分试剂盒的各部分然后可以例如同步施用或按时间顺序错开,也就是说对于多部分试剂盒的任一部分在不同时间点并且时间间隔相等或不同。在一些实施方式中,组合伴侣的总量的比率可以在组合制剂中施用。在一种实施方式中,如本领域的技术人员可以容易进行的,组合制剂可以变化,例如以便应对待治疗的患者亚群的需要或单一患者的需要,不同需要可以是由于特定疾病、疾病严重程度、年龄、性别或体重所致。

[0147] 在另一种实施方式中,可互换地使用的短语“生理学上可接受的载剂”和“药学上可接受的载剂”是指不会对生物体造成显著刺激并且不会消除所施用的化合物的生物学活性和性质的载剂或稀释剂。佐剂包括于这些短语下。在一种实施方式中,包括于药学上可接受的载剂中的成分之一可以是例如聚乙二醇(PEG),一种在有机和水性介质中都具有广泛范围的溶解度的生物相容性聚合物(Mutter et al. (1979))。

[0148] 在另一种实施方式中,“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步帮助长效OXN的施用的惰性物质。在一种实施方式中,赋形剂包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0149] 用于配制和施用药物的技术见于“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版,所述出版物以引用的方式并入本文中。

[0150] 在另一种实施方式中,本发明的肽的合适施用途径例如包括经口、经直肠、经粘膜、经鼻、经肠或不经肠传递,包括肌内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0151] 本发明还包括可逆聚乙二醇化OXM,其用于制造通过脑周边途径施用以用于上文所描述的治疗方法中的任一者的药剂。周边途径的实例包括经口、经直肠、不经肠(例如静脉内、肌内或腹膜内)、经粘膜(例如经颊、舌下、经鼻、皮下或透皮)施用,包括吸入施用。以下给出OXM用于药剂的优选剂量。

[0152] 本发明提供一种药物组合物,其包含可逆聚乙二醇化OXM和药学上合适的载剂,其呈适用于经口、经直肠、不经肠(例如静脉内、肌内或腹膜内)、经粘膜(例如经颊、舌下、经鼻、皮下或透皮)施用,包括吸入施用的形式。如果呈单位剂型,那么每单位的剂量可以是例如下文所描述的或基于以下给出的每千克剂量所计算的。

[0153] 在另一种实施方式中,制剂以局部而非全身性方式施用,例如将制剂直接注射到患者身体的特定部位。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM以鼻内剂型配制。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM以可注射剂型配制。

[0154] 本发明涵盖剂量范围的各种实施方式:可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每3天0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用(仅提供可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM的重量,因为PEG的大小可以实质上不同)。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每7天0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每10天0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每14天0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用。在另一种实施方式中,意外地,可逆聚乙二醇化OXM组合物中OXM的有效量是游离OXM的有效量的1/4-1/10。在另一种实施方式中,意外地,OXM的可逆聚乙二醇化使得与游离OXM相比能够将开给患者的OXM的量减少至少50%。在另一种实施方式中,意外地,OXM的可逆聚乙二醇化使得与游离OXM相比能够将开给患者的OXM的量减少至少70%。在另一种实施方式中,意外地,OXM的可逆聚乙二醇化使得与游离OXM相比能够将开给患者的OXM的量减少至少75%。在另一种实施方式中,意外地,OXM的可逆聚乙二醇化使得与游离OXM相比能够将开给患者的OXM的量减少至少80%。在另一种实施方式中,意外地,OXM的可逆聚乙二醇化使得与游离OXM相比能够将开给患者的OXM的量减少至少85%。在另一种实施方式中,意外地,OXM的可逆聚乙二醇化使得与游离OXM相比能够将开给患者的OXM的量减少至少90%。

[0155] 在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每3天一次0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用(仅提供可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM的重量,因为PEG的大小可以实质上不同)。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每7天一次0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每10天一次0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM组合物内的OXM肽组分以每14天一次0.01-0.5毫克/kg体重的范围施用。

[0156] 在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM与游离OXM相比降低有效给药频率至少2倍并且减少有效每周剂量至少2倍,从而限制不良事件的风险并且增加与OXM疗法使用的顺应性。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM与游离OXM相比降低有效给药频率至少3

倍并且减少有效每周剂量至少3倍,从而限制不良事件的风险并且增加与OXM疗法使用的顺应性。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM与游离OXM相比降低有效给药频率至少4倍并且减少有效每周剂量至少4倍,从而限制不良事件的风险并且增加与OXM疗法使用的顺应性。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM与游离OXM相比降低有效给药频率至少5倍并且减少有效每周剂量至少5倍,从而限制不良事件的风险并且增加与OXM疗法使用的顺应性。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM与游离OXM相比降低有效给药频率至少6倍并且减少有效每周剂量至少6倍,从而限制不良事件的风险并且增加与OXM疗法使用的顺应性。在另一种实施方式中,有效给药频率和有效每周剂量是基于:(1)可逆聚乙二醇化OXM组合体内的所施用的OXM组分的重量;和(2)游离OXM(未经修饰的OXM)组合体内的所施用的OXM组分的重量。

[0157] 在另一种实施方式中,本发明的方法包括增加受慢性疾病折磨的、需要OXM疗法的患者的顺应性。在另一种实施方式中,本发明的方法能够通过如上文所描述的可逆聚乙二醇化OXM来降低OXM的给药频率。在另一种实施方式中,本发明的方法包括通过降低OXM施用频率来增加需要OXM疗法的患者的顺应性。在另一种实施方式中,OXM施用频率的降低由于可逆聚乙二醇化而实现,所述可逆聚乙二醇化使得OXM更稳定并且更有效。在另一种实施方式中,OXM施用频率的降低作为增加OXM的T_{1/2}的结果而实现。在另一种实施方式中,OXM施用频率的降低作为减少OXM的血液清除的结果而实现。在另一种实施方式中,OXM施用频率的降低作为增加OXM的T_{1/2}的结果而实现。在另一种实施方式中,OXM施用频率的降低作为增加OXM的AUC量度的结果而实现。

[0158] 在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM一天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每两天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每三天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每四天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每五天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每六天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每七天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每7-14天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每10-20天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每5-15天给对象施用一次。在另一种实施方式中,可逆聚乙二醇化OXM每15-30天给对象施用一次。

[0159] 在一种实施方式中,经口施用包含单位剂型,其包含片剂、胶囊、口含片、咀嚼片剂、悬浮液、乳液等。所述单位剂型包含安全并且有效量的本发明OXM,在一种实施方式中,其中的每单位剂型是约0.7或3.5mg到约280mg/70kg,或在另一种实施方式中,是约0.5或10mg到约210mg/70kg。适用于制备用于经口施用的单位剂型的药学上可接受的载剂在本领域中是熟知的。在一些实施方式中,片剂通常包含常规药学上相容的作为惰性稀释剂的佐剂,例如碳酸钙、碳酸钠、甘露糖醇、乳糖和纤维素;粘合剂,例如淀粉、明胶和蔗糖;崩解剂,例如淀粉、海藻酸和交联羧甲纤维素;润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸和滑石。在一种实施方式中,助流剂,例如二氧化硅可以用以改进粉末混合物的流动特征。在一种实施方式中,可以为了外观而添加着色剂,例如FD&C染料。甜味剂和调味剂,例如阿斯巴甜、糖精、薄荷醇、胡椒薄荷和水果调味剂是适用于咀嚼片剂的佐剂。胶囊通常包含一或多种上文公开的固体稀释剂。在一些实施方式中,载剂组分的选择取决于次要考虑因素,如味道、成本和存放稳

定性,所述次要考虑因素对于本发明的目的并不关键,并且可以容易由本领域的技术人员作出。

[0160] 在一种实施方式中,经口剂型包含预定释放谱。在一种实施方式中,本发明的经口剂型包含延长释放的片剂、胶囊、口含片或咀嚼片剂。在一种实施方式中,本发明的经口剂型包含缓慢释放的片剂、胶囊、口含片或咀嚼片剂。在一种实施方式中,本发明的经口剂型包含立即释放的片剂、胶囊、口含片或咀嚼片剂。在一种实施方式中,经口剂型如本领域技术人员已知根据长效OXN的所要释放谱配制。

[0161] 在另一种实施方式中,适用于本发明的方法的组合物包含溶液或乳液,其在另一种实施方式中是水性溶液或乳液,其包含安全并且有效量的本发明化合物和任选地打算用于局部鼻内施用的其它化合物。在一些实施方式中,组合物包含约0.001%到约10.0%w/v本发明的化合物,更优选地约0.1%到约2.0%,其用于通过鼻内途径全身传递所述化合物。

[0162] 在另一种实施方式中,药物组合物通过静脉内、动脉内、皮下或肌内注射液体制剂而施用。在另一种实施方式中,液体配制品包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油剂等。在一种实施方式中,药物组合物静脉内施用,并且因此以适用于静脉内施用的形式配制。在另一种实施方式中,药物组合物动脉内施用,并且因此以适用于动脉内施用的形式配制。在另一种实施方式中,药物组合物肌内施用,并且因此以适用于肌内施用的形式配制。

[0163] 此外,在另一种实施方式中,药物组合物局部施用到身体表面,并且因此以适用于局部施用的形式配制。合适的局部配制品包括凝胶、软膏、乳膏、洗剂、滴剂等。为了局部施用,本发明的化合物与一或多种其它适当治疗剂组合,以于生理学上可接受的稀释剂中存在或不存在药物载剂下的溶液、悬浮液或乳液形式制备并且施用。

[0164] 在一种实施方式中,本发明的药物组合物通过本领域中熟知的方法而制造,例如通过常规混合、溶解、粒化、糖衣药丸制造、水磨、乳化、囊封、覆埋(entrapping)或冻干方法。

[0165] 在一种实施方式中,根据本发明适用的药物组合物使用一或多种生理学上可接受的载剂以常规方式配制,所述载剂包含赋形剂和助剂,帮助将OXM加工成可以药学上使用的制剂。在一种实施方式中,配制取决于所选施途径。

[0166] 在一种实施方式中,本发明的可注射剂以水性溶液形式配制。在一种实施方式中,本发明的可注射剂在生理学上相容的缓冲液中进行配制,所述缓冲液例如汉克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐缓冲液。在一些实施方式中,为了经粘膜施用,适于待渗透的屏障的渗透剂用于配制品中。所述渗透剂一般来说是本领域中已知的。

[0167] 在一种实施方式中,本文中所描述的制剂经配制用于不经肠施用,例如通过弹丸注射或连续输注。在另一种实施方式中,用于注射的配制品以单位剂型,例如以安瓿或以具有任选地添加的防腐剂的多剂量容器呈现。在另一种实施方式中,组合物是油性或水性运载工具中的悬浮液、溶液或乳液,并且含有配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0168] 在另一种实施方式中,组合物还包含防腐剂,例如苯扎氯铵和硫柳汞等;螯合剂,例如乙二胺四乙酸钠等;缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐;张力剂,例如氯化钠、氯化钾、甘油、甘露糖醇等;抗氧化剂,例如抗坏血酸、乙酰胱氨酸、焦亚硫酸钠等;芳香剂

(aromatic agent);粘度调节剂,例如聚合物,包括纤维素和其衍生物;和聚乙烯醇,以及按需要调节这些水性组合物的pH的酸和碱。在一些实施方式中,组合物还包含局部麻醉剂或其它活性剂。组合物可以按喷雾剂、雾剂、滴剂等形式使用。

[0169] 在一种实施方式中,用于不经肠施用的药物组合物包括呈水溶性形式的活性制剂的水性溶液。另外,在一些实施方式中,长效OXM的悬浮液以适当油性或水基注射悬浮液形式制备。在一些实施方式中,合适的亲脂性溶剂或运载工具包括脂肪油,例如芝麻油;或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯;甘油三酯;或脂质体。在一些实施方式中,水性注射悬浮液含有提高悬浮液的粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。在另一种实施方式中,悬浮液还含有合适的稳定剂或提高长效OXM的溶解度以允许制备高度浓缩的溶液的试剂。

[0170] 在另一种实施方式中,活性化合物可以在囊泡,特别是脂质体,中传递(参见Langer,Science 249:1527-1533(1990);Treat et al.,Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein and Fidler(eds.),Liss,New York,pp.353-365(1989);Lopez-Berestein,ibid,pp.317-327;一般来说参见同书)。

[0171] 在另一种实施方式中,配制受控制的释放系统中传递的药物组合物,用于静脉内输注、可植入渗透泵、透皮贴片、脂质体或其它施用模式。在一种实施方式中,使用泵(参见Langer,同前文献;Sefton,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201(1987);Buchwald et al.,Surgery 88:507(1980);Saudek et al.,N.Engl.J.Med.321:574(1989))。在另一种实施方式中,可以使用聚合材料。在另一种实施方式中,受控制的释放系统可以被放置得接近于治疗靶点,即脑,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release,supra,vol.2,pp.115-138(1984))。其它控制释放系统论述于Langer的综述(Science 249:1527-1533(1990))中。

[0172] 在一种实施方式中,长效OXM呈粉末形式以便在使用之前与合适的运载工具(例如无菌无热原质水基溶液)组合(constitution)。在一些实施方式中,组合物经配制以用于雾化和吸入施用。在另一种实施方式中,组合物含于连有雾化工具的容器中。

[0173] 在一种实施方式中,本发明的制剂使用例如常规栓剂基质(例如可可脂或其它甘油酯)以经直肠组合物(例如栓剂或保留灌肠剂)形式配制。

[0174] 在一种实施方式中,适用于本发明的药物组合物包括其中长效OXM以可有效实现预期目的的量包含在内的组合物。在另一种实施方式中,治疗有效量意味着长效OXM可有效预防、缓解或改善疾病症状或延长所治疗的对象的存活期的量。

[0175] 在一种实施方式中,治疗有效量的确定完全在本领域的技术人员的能力内。

[0176] 所述组合物还包含防腐剂,例如苯扎氯铵和硫柳汞等;螯合剂,例如乙二胺四乙酸钠等;缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐;张力剂,例如氯化钠、氯化钾、甘油、甘露糖醇等;抗氧化剂,例如抗坏血酸、乙酰胱氨酸、焦亚硫酸钠等;芳香剂;粘度调节剂,例如聚合物,包括纤维素和其衍生物;和聚乙烯醇,以及按需要调节这些水性组合物的pH的酸和碱。所述组合物还包含局部麻醉剂或其它活性剂。所述组合物可以按喷雾剂、雾剂、滴剂等形式使用。

[0177] 可以充当药学上可接受的载剂或其组分的物质的一些实例是糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙

基纤维素和甲基纤维素;粉末状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,例如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,例如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,例如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,例如TweenTM牌乳化剂;湿润剂,例如月桂基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂;稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原质水;等张盐水;和磷酸盐缓冲溶液。待与化合物结合使用的药学上可接受的载剂的选择基本上通过化合物待施用的方式来确定。在一种实施方式中,如果本发明的化合物要进行注射,那么药学上可接受的载剂是具有血液相容的悬浮剂的无菌生理盐水,其pH已经被调节到约7.4。

[0178] 另外,组合物进一步包含粘合剂(例如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆、乙基纤维素、瓜尔胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚维酮)、崩解剂(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、瓜尔胶、羟乙酸淀粉钠)、具有各种pH和离子强度的缓冲剂(例如Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、用以防止吸收到表面的添加剂(例如白蛋白或明胶)、清洁剂(例如吐温20、吐温80、普朗尼克F68、胆酸盐)、蛋白酶抑制剂、表面活性剂(例如月桂基硫酸钠)、渗透增强剂、增溶剂(例如甘油、聚乙烯甘油)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠、丁基化羟基苯甲醚)、稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)、粘度增加剂(例如卡波姆、胶态二氧化硅、乙基纤维素、瓜尔胶)、甜味剂(例如阿斯巴甜、柠檬酸)、防腐剂(例如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯)、润滑剂(例如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、月桂基硫酸钠)、流动助剂(例如胶态二氧化硅)、塑化剂(例如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯)、乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、月桂基硫酸钠)、聚合物涂层(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺(poloxamine))、涂层和膜形成剂(例如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或佐剂。

[0179] 用于糖浆、酏剂、乳液和悬浮液的载剂的典型组分包括乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、液体蔗糖、山梨糖醇和水。对于悬浮液来说,典型悬浮剂包括甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、纤维素(例如AvicelTM、RC-591)、黄蓍胶和海藻酸钠;典型湿润剂包括卵磷脂和聚氧化乙烯脱水山梨糖醇(例如聚山梨醇酯80)。典型防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠。在另一种实施方式中,经口液体组合物还含有一或多种组分,例如上文公开的甜味剂、调味剂和着色剂。

[0180] 组合物还包括将活性物质并入到聚合化合物(例如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等)的微粒状制剂之中或之上或并入到脂质体、微乳液、胶束、单层或多层囊泡、红细胞血影或原生质球上。所述组合物将影响物理状态、溶解度、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0181] 本发明还包括微粒状组合物,其涂布有聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺),并且化合物与针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体偶合或与组织特异性受体的配体偶合。

[0182] 在一种实施方式中,化合物通过共价连接水溶性聚合物而修饰,所述水溶性聚合物例如聚乙二醇、聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸。在另一种实施方式中,经修饰的化合物在静脉内注射之后展现出的血液中半衰期基本上长于相应的未经修饰的化合物。在一种实施方式中,修饰还提高化合物于水溶液中的溶解度,消除聚集,增强化合物的物理和化学稳定性,并且极大地降低化合物的免疫原性和反应性。在另一种实施方式中,想要的体内生物学活性通过与未经修饰的化合物相比更低频率或以更低剂量施用所述聚合物-化合物诱导物而获得。

[0183] 在另一种实施方式中,有效量或剂量的制备最初可以根据体外分析来估计。在一

种实施方式中,剂量可以在动物模型中进行配制并且所述信息可以用以更准确地确定人类中的适用剂量。

[0184] 在一种实施方式中,如本文中所描述的长效OXM的毒性和疗效可以在细胞培养物或实验动物中通过标准体外药理学程序测定。在一种实施方式中,获自这些体外和细胞培养物分析和动物研究的数据可以用以配制适用于人类的剂量范围。在一种实施方式中,剂量取决于所用剂型和所用施用途径而变化。在一种实施方式中,确切配制品、施用途径和剂量可以由个别医生鉴于患者的病况来进行选择。[参见例如Fingl et al., (1975) “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Ch.1p.1]。

[0185] 在一种实施方式中,取决于待治疗的病况的严重程度和反应性,给药可以是单一或多次投药,疗程持续数天到数周或直到实现治愈或实现疾病状态减弱为止。

[0186] 在一种实施方式中,待施用的组合物的量当然将取决于所治疗的对象、病痛的严重程度、施用方式、处方医生的判断等。

[0187] 在一种实施方式中,还制备包括本发明的制剂、于相容药物载剂中配制的组合物,将其放置于适当容器中,并且标记以用于治疗指定病况。

[0188] 在另一种实施方式中,如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM经由全身施用而施用。在另一种实施方式中,如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM通过静脉内、肌肉或皮下注射而施用。在另一种实施方式中,如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM是与复杂有机赋形剂和稳定剂组合的冻干(即冷冻干燥)制剂,所述赋形剂和稳定剂例如非离子表面活性剂(即表面活性剂)、各种糖、有机多元醇和/或人血清白蛋白。在另一种实施方式中,药物组合物包含如所描述的冻干可逆聚乙二醇化OXM于注射用无菌水中。在另一种实施方式中,药物组合物包含如所描述的冻干的OXM于注射用无菌PBS中。在另一种实施方式中,药物组合物包含如所描述的冻干的OXM于注射用无菌0.9%NaCl中。

[0189] 在另一种实施方式中,药物组合物包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM和复杂载剂,例如人血清白蛋白、多元醇、糖和阴离子表面活性稳定剂。参见例如WO 89/10756 (Hara等人,含有多元醇和对羟基苯甲酸酯)。在另一种实施方式中,药物组合物包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM以及乳糖酸和乙酸盐/甘氨酸缓冲液。在另一种实施方式中,药物组合物包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM和提高干扰素组合物于水中的溶解度的氨基酸,例如精氨酸或谷氨酸盐。在另一种实施方式中,药物组合物包含如本文中所描述的冻干的OXM以及甘氨酸或人血清白蛋白(HSA)、缓冲液(例如乙酸盐)和等张剂(例如NaCl)。在另一种实施方式中,药物组合物包含如本文中所描述的冻干的OXM以及磷酸盐缓冲液、甘氨酸和HSA。

[0190] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的聚乙二醇化或可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物当放置于pH在约4与7.2之间的缓冲溶液中时是稳定的。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物用氨基酸并且在一些情况下用盐(如果氨基酸不含带电侧链)作为稳定剂而稳定化。

[0191] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物是液体组合物,其包含约0.3重量%与5重量%之间的稳定剂,它是氨基酸。

[0192] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物提供给药准确性和产品安全性。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二

醇化OXM的药物组合物提供具有生物学活性的稳定液体配制品以用于可注射应用。在另一种实施方式中,药物组合物包含如本文中所描述的非冻干的可逆聚乙二醇化OXM。

[0193] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物提供液体配制品,其允许在液体状态下储存较长时间,有助于施用之前的储存和装运。

[0194] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含固体脂质作为基质材料。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的可注射药物组合物包含固体脂质作为基质材料。在另一种实施方式中,脂质微粒通过喷雾凝结产生,由Speiser (Speiser et al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) 描述,接着描述用于经口施用的脂质纳米丸粒 (Speiser EP 0167825 (1990))。在另一种实施方式中,所用的脂质为身体所充分耐受(例如甘油酯由存在于乳液中的脂肪酸组成用于肠外营养)。

[0195] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物呈脂质体形式 (J.E.Diederichs et al., Pharm. /nd. 56 (1994) 267-275)。

[0196] 在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含聚合微粒。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的可注射药物组合物包含聚合微粒。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含纳米粒子。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含脂质体。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含脂质乳液。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含微球体。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含脂质纳米粒子。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含包括两亲脂质的脂质纳米粒子。在另一种实施方式中,包含如本文中所描述的可逆聚乙二醇化OXM的药物组合物包含包括药物、脂质基质和表面活性剂的脂质纳米粒子。在另一种实施方式中,脂质基质的单甘油酯含量是至少50%w/w。

[0197] 在一种实施方式中,本发明的组合物存在于包装或分配器装置中,所述包装或分配器装置例如FDA批准的试剂盒,其含有一或多个含有长效OXM的单位剂型。在一种实施方式中,包装包含例如金属或塑料箔,例如泡罩包装。在一种实施方式中,包装或分配器装置附有施用说明书。在一种实施方式中,包装或分配器附有与容器相联的公告,其呈由管制药物制造、使用或销售的政府机构指定的形式,所述公告反映了所述机构批准所述组合物形式用于人类或兽医学施用。在一种实施方式中,所述公告是由美国食品与药物管理局批准以用于处方药物或批准的产品说明书的标签。

[0198] 在一种实施方式中,应了解,本发明的可逆聚乙二醇化OXM可以与其它活性剂一起提供给个体以实现与单独用每种药剂治疗相比改进的治疗效果。在另一种实施方式中,对与组合疗法相关的不良副作用采取措施(例如给药和选择补充药剂)。

[0199] 本领域的普通技术人员在参阅以下实例后将变得显而易知本发明的其它目标、优势和新颖特征,所述实例并不打算是限制性的。另外,如上文所描绘并且如以上权利要求书部分中所要求的本发明的各种实施方式和方面中的每一者在以下实例中找到实验支持。

实施例

[0200] 一般来说,本文中所用的术语和本发明中所用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。所述技术在文献中有充分解释。参见例如“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook et al.,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes I-III Ausubel R.M.,ed.(1994);Ausubel et al.,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland.(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson et al.,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren et al.(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,Vols.1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);如美国专利第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659号和第5,272,057号中阐述的方法;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,Volumes I-III Cellis,J.E.ed.(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”Freshney,Wiley-Liss,New York(1994),Third Edition;“Current Protocols in Immunology”Volumes I-III Coligan J.E.ed.(1994);Stites et al.(eds.),“Basic and Clinical Immunology”(8th edition),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell and Shiigi(eds.),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H.Freeman and Co.,New York(1980);可用免疫分析广泛描述于专利和科学文献中,参见例如美国专利第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号和第5,281,521号;“Oligonucleotide Synthesis”Gait,M.J.ed.(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames,B.D.and Higgins S.J.eds.(1985);“Transcription and Translation”Hames,B.D.and Higgins S.J.eds.(1984);“Animal Cell Culture”Freshney R.I.ed.(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal B.,(1984)和“Methods in Enzymology”Vol.1-317,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak et al.,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);所述文献全部以引用的方式并入。其它通用参考文献提供于整个本文档中。

[0201] 材料与方法

[0202] PEG30-FMS-OXM合成-非均质

[0203] 1.1阶段1:OXM合成

[0204] 合成胃酸调节素,其由以下肽序列组成:

[0205] HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA (SEQ ID NO:1)。

[0206] 在整个肽链组装中采用Fmoc策略通过固相方法合成肽(Almac Sciences, Scotland)。

[0207] 使用以下步骤组装肽序列:

[0208] 1.加帽

[0209] 使用0.5M于DMF (Rathburn) 中的乙酸酐(Fluka) 溶液对树脂进行加帽。

[0210] 2. 脱保护

[0211] 使用20%v/v哌啶 (Rathburn) 于DMF (Rathburn) 中的溶液从生长的肽链去除Fmoc保护基。

[0212] 3. 氨基酸偶合

[0213] 使用1M HOBt (Carbosynth) 于DMF (Rathburn) 中的溶液和1M DIC (Carbosynth) 于DMF (Rathburn) 中的溶液活化0.5M氨基酸 (Novabiochem) 于DMF (Rathburn) 中的溶液。每一偶合使用4当量的每种氨基酸。

[0214] 使粗肽从树脂裂解, 并且通过在三异丙基硅烷 (Fluka)、水、二甲硫 (Aldrich)、碘化铵 (Aldrich) 和TFA (Applied Biosystems) 的混合物中搅拌4小时来去除保护基。通过由冷乙醚沉淀而收集粗肽。

[0215] 肽纯化

[0216] 将粗肽溶解于乙腈 (Rathburn) /水 (MilliQ) (5:95) 中, 并且加载到制备型HPLC柱上。色谱参数如下:

[0217] 柱: Phenomenex Luna C18 250mm \times 15 μ m, 300A

[0218] 流动相A: 水+0.1%v/v TFA (Applied Biosystems)

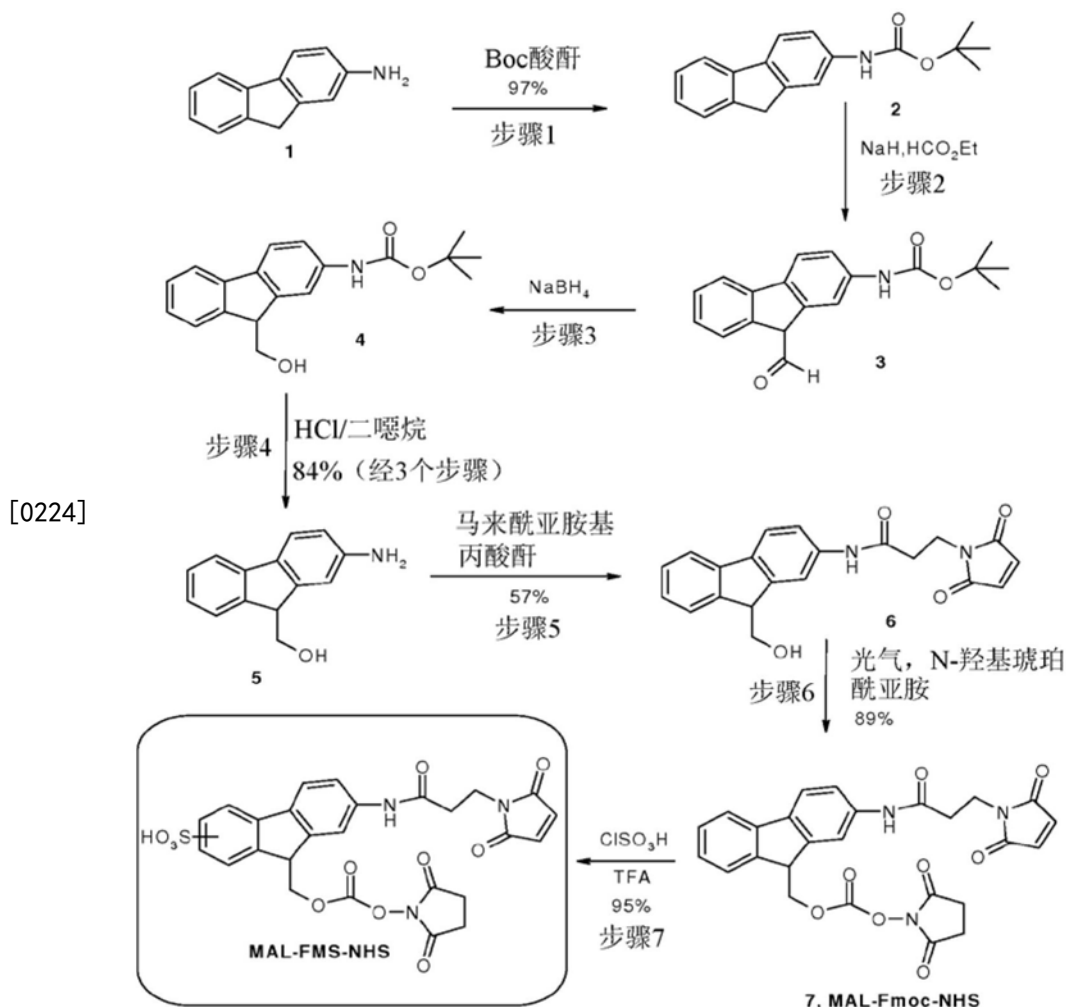
[0219] 流动相B: 乙腈 (Rathburn) +0.1%v/v TFA (Applied Biosystems)

[0220] UV检测: 214或220nm

[0221] 梯度: 25%B到31%B, 经4个柱体积

[0222] 流速: 43mL/min

[0223] 阶段2-接头合成



[0225] 方案1-合成MAL-FMS-NHS接头

[0226] 化合物2-5的合成是基于Albericio et al. Synthetic Communication, 2001, 31 (2), 225-232中所述的程序。

[0227] 2-(Boc-氨基)苻(2)：

[0228] 将2-氨基苻(18g, 99mmol)在磁力搅拌下悬浮于冰浴中的二噁烷:水(2:1)(200ml)与2N NaOH(60ml)的混合物中。然后添加Boc₂O(109mmol, 1.1当量),并且在室温下继续搅拌。通过TLC(Rf=0.5, 己烷/乙酸乙酯2:1)监测反应,并且通过添加2N NaOH将pH维持在9-10之间。在反应完成时,将悬浮液用1M KHSO₄酸化到pH=3。将固体过滤并且用冷水(50ml)、二噁烷-水(2:1)洗涤,并且然后与甲苯共沸两次,随后将其用于下一步骤中。

[0229] 9-甲酰基-2-(Boc-氨基)苻(3)：

[0230] 在3颈RBF中,将NaH(60%于油中;330mmol, 3.3当量)悬浮于无水THF(50ml)中,经20分钟逐滴添加步骤2中所述的-(Boc-氨基)苻(28g; 100mmol)于无水THF(230ml)中的溶液。观察到稠黄色浆料,并且在氮气下在室温下搅拌混合物10分钟。逐滴添加甲酸乙酯(20.1ml, 250mmol, 2.5当量)(注意:气体逸出)。浆料变为浅褐色溶液。搅拌溶液20分钟。通过TLC(Rf=0.5, 己烷/乙酸乙酯1:1)监测反应,并且当仅观察到痕量起始物质时,将其用冰水(300ml)淬灭。将混合物在减压下蒸发直到已经去除大部分THF为止。将所得混合物用乙酸处理到pH=5。将所获得的白色沉淀物溶解于乙酸乙酯中,并且分离有机层。用乙酸乙酯

萃取水性层,并且将所有有机层合并并且用饱和碳酸氢钠、盐水洗涤,并且经 $MgSO_4$ 干燥。在过滤和溶剂去除之后,获得黄色固体。将此物质用于下一步骤中。

[0231] 9-羟甲基-2-(Boc-氨基)苄(4):

[0232] 将来自以上的化合物3悬浮于MeOH(200ml)中,并且经15分钟逐份添加硼氢化钠。搅拌混合物30分钟(注意:放热反应和气体逸出)。通过TLC($R_f=0.5$,己烷/EtOAc 1:1)监测并且完成反应。添加水(500ml),并且用乙酸将pH调节到5。处理包括用乙酸乙酯萃取两次,用碳酸氢钠和盐水洗涤经合并的有机层,经 $MgSO_4$ 干燥,过滤,和浓缩到干燥。通过急骤色谱法使用庚烷/EtOAc(3:1)纯化所获得的粗物质,得到黄色泡沫(36g,97.5%纯度,在 ^1H-NMR 中观察到痕量乙酸乙酯和乙醚)。

[0233] MAL-Fmoc-NHS(7):

[0234] 在环境条件下向具有顶置式搅拌的清洁干燥500ml RBF中馈入含三光气(1.58g,0.35当量)的无水THF(55ml)以形成溶液。将其用冰/水浴冷却到 $0^\circ C$,并且在 $0^\circ C$ 下在氮气下经10分钟逐滴添加NHS(0.67g,0.38当量)于无水THF(19ml)中的溶液。搅拌所得溶液30分钟。在 $0^\circ C$ 下经10分钟逐滴添加另一份含NHS(1.34g,0.77当量)的无水THF(36ml),并且将其搅拌15分钟。

[0235] 将化合物6(5.5g,1当量)、无水THF(55ml)和吡啶(3.07ml,2.5当量)一起搅拌以形成悬浮液。在 $0-5^\circ C$ 下将其逐份添加到NHS溶液中,并且然后通过移开冰浴使其变到室温。

[0236] 在20小时之后,反应停止(起始物质仍存在,如果推动反应到完全,那么观察到较模糊的杂质)。

[0237] 过滤反应混合物,并且向滤液中添加4%盐水(200ml)和EtOAc(200ml)。在分离之后,将有机层用5%柠檬酸(220ml)和水(220ml)洗涤。然后浓缩有机层,得到7.67g粗MAL-Fmoc-NHS。通过柱色谱法使用梯度环己烷/EtOAc 70:30到40:60纯化所述物质。在真空下浓缩含有产物的洗脱份,得到3.47g(45%)MAL-Fmoc-NHS。

[0238] MAL-FMS-NHS

[0239] 向MAL-Fmoc-NHS(100mg,0.2mmol)于三氟乙酸(10ml)中的溶液中添加氯磺酸(0.5ml)。在15分钟之后,添加冰冷乙醚(90ml),并且使产物沉淀。将所述物质通过离心而收集,用乙醚洗涤,并且在真空下干燥。获得41.3mg(35%)米色固体。

[0240] 阶段3-缀合

[0241] OXM肽中的3个胺位点(Lys₁₂、Lys₃₀和氨基末端)的非均质缀合以“一锅反应”形式进行,其中以下每种组分各1当量在pH 7.2下一起混合30分钟:OXM、mPEG-SH和FMS接头。通过添加乙酸以将pH降低到4来中止反应。

[0242] PEG30-FMS-OXM合成-均质

[0243] 阶段1:间隔基MAL-FMS-NHS(FMS)合成:如关于非均质缀合物所述。

[0244] 阶段2:胃泌酸调节素(OXM)合成:

[0245] N末端定点OXM:如上文关于非均质缀合物所述。

[0246] Lys₁₂或Lys₃₀定点OXM:使用相同策略,不同之处在于在赖氨酸的位置12或30使用Fmoc-Lys(ivDde)-OH并且使用Boc-His(Boc)-OH作为最后一个待偶合的氨基酸。

[0247] 阶段3:均质结合

[0248] FMS与OXM的偶合:

[0249] 添加MAL-FMS-NHS接头溶液(0.746ml, 10mg/ml于DMF中, 2当量)到OXM树脂(1当量, 200mg树脂, 31.998 μ mol/g游离胺)中。添加DMF直到树脂刚好自由流动为止, 并且然后声处理19小时。将树脂用DMF和甲醇洗涤, 随后在真空干燥器中干燥过夜。裂解混合物含有TFA/TIS/H₂O。在室温下进行裂解3.5小时。在过滤树脂之后, 在冷乙醚中沉淀FMS-OXM。在裂解阶段结束时获得42.1mg粗FMS-OXM(36%纯)。

[0250] FMS与Lys₁₂定点OXM的偶合:

[0251] 添加MAL-FMS-NHS接头溶液(10mg/ml于DMF中, 2.5当量)到(Lys12) OXM树脂(1当量)中, 添加DIEA(5当量)。添加DMF直到树脂刚好自由流动为止, 并且然后声处理过夜。将树脂用DMF和甲醇洗涤, 随后在真空干燥器中干燥过夜。如关于N末端定点所述进行裂解和沉淀。

[0252] FMS与Lys₃₀定点OXM的偶合:

[0253] 将MAL-FMS-NHS接头(2.5当量)溶解于DCM中, 添加DIEA(5当量)。添加此接头/DIEA溶液到(Lys30) OXM树脂中, 然后声处理过夜。将树脂用DCM和甲醇洗涤, 随后在真空干燥器中干燥过夜。如关于N末端定点所述进行裂解和沉淀。

[0254] 纯化

[0255] 以一份方式纯化所得粗FMS-OXM。

[0256] 样品稀释剂: 含10%乙腈的水

[0257] 柱:Luna C18(2), 100 Å, 250×21.2mm

[0258] 注射流速: 9ml/min

[0259] 运行流速: 9ml/min

[0260] 缓冲液A: 水(0.1% TFA)

[0261] 缓冲液B: 乙腈(0.1% TFA)

[0262] 梯度: 10-45%B, 经32分钟

[0263] 监测: 230nm

[0264] PEG30与FMS-OXM的结合

[0265] 制备FMS-OXM溶液(1当量, 15.1mg于1.5ml DMF中)。添加PEG30(1当量, 9.2ml 10mg/ml于pH 6.5磷酸盐缓冲液中)到FMS-OXM溶液中。然后在室温下搅拌反应混合物30分钟, 随后添加冰乙酸(200 μ l)以通过降低pH而淬灭反应。

[0266] 然后使用RP-HPLC纯化所得反应混合物。

[0267] 柱:Luna C18(2), 100 Å, 250×21.2mm

[0268] 注射流速: 5ml/min

[0269] 运行流速: 20ml/min

[0270] 缓冲液A: 水与0.1% TFA

[0271] 缓冲液B: 乙腈/水(75:25)与0.1% TFA

[0272] 梯度: 10-65%B, 经41分钟

[0273] 监测: 220、240、280nm

[0274] IP葡萄糖耐受性测试

[0275] 使C57BL/6雄性小鼠空腹过夜, 然后称重, 并且使用手持式血糖仪通过尾静脉取样测量血糖水平。向小鼠IP注射PEG-SH(运载工具)、PEG30-FMS-OXM(非均质)以及PEG30-FMS-

OXM的三种均质变体(氨基、Lys12和Lys30)。在测试物品施用之后15分钟,IP施用葡萄糖(1.5gr/kg)。在葡萄糖施用之前以及葡萄糖施用之后10、20、30、60、90、120和180分钟,使用手持式血糖仪通过尾静脉取样测量血糖水平。

[0276] GLP-1受体活化的体外表征

[0277] 使用两种不同细胞系评估GLP-1受体的活化:HTS163C2 (Millipore) 和cAMP Hunter™CHO-K1 GLP1R (Discoverx),两者都过表达GLP-1受体。将HTS163C2 (Millipore) 以100,000个细胞/毫升的密度接种于96孔白色半区板(格雷内尔(Greiner))中,并且在37°C下温育24小时。将细胞与递增浓度的非均质PEG30-FMS-OXM和3种均质PEG30-FMS-OXM变体(氨基、Lys12和Lys30)一起温育。通过HTRF分析(Cisbio 62AM4PEB)定量细胞cAMP浓度,并且通过PRISM软件分析EC50参数。cAMP Hunter™CHO-K1 GLP1R在配体与受体结合后分泌cAMP。将细胞以500000个细胞/毫升的密度接种于96孔板中,并且在37°C下在5%CO₂下温育24小时。将配体在含有IBMX的稀释剂中稀释,并且在37°C下在5%CO₂下一式两份地添加到培养孔中,持续30分钟。PEG30-FMS-OXM的浓度范围是 1.5×10^{-10} 到 1.2×10^{-6} M。添加溶解缓冲液和检测试剂到孔中,并且使用化学发光信号检测cAMP浓度。建立剂量依赖性曲线,并且使用PRISM软件通过应用最佳拟合剂量反应模型(四个参数)计算各种配体的结合亲和力(EC50)。

[0278] 胰高血糖素受体活化的体外表征

[0279] 使用cAMP Hunter™CHO-K1 GCGR细胞系评估胰高血糖素受体的活化,所述细胞系过表达胰高血糖素受体。此细胞系在配体与胰高血糖素受体结合后分泌cAMP。将细胞以500000个细胞/毫升的密度接种于96孔板中,并且在37°C下在5%CO₂下温育24小时。将配体在含有IBMX的稀释剂中稀释,并且在37°C下在5%CO₂下一式两份地添加到培养孔中,持续30分钟。MOD-6031的浓度范围是 5.8×10^{-11} 到 2.7×10^{-7} M。添加溶解缓冲液和检测试剂到孔中,并且使用化学发光信号检测cAMP浓度。建立剂量依赖性曲线,并且使用PRISM软件通过应用最佳拟合剂量反应模型(四个参数)计算各种配体的结合亲和力(EC50)。

[0280] 肥胖(ob/ob)小鼠模型

[0281] 研究1:使二十五只雄性ob/ob小鼠(雄性,B6.V-Lep^{ob}/OlaHsd,5-6周龄,Harlan)适应设施(10天),接着进行处置方案,其中将动物处置得好似被给药但实际上不称重或给药(10天)。随后,动物经历基线期7天,其中一周两次通过皮下途径以20ml/kg的体积向其给予适当运载工具。每天记录体重、食物和水摄入,并且获取样品用于非空腹和空腹葡萄糖测量以及非空腹和空腹胰岛素测量。随后基于体重和血糖谱将动物分配为五个处理组(N=5)。如表1中所述每四天(第1、5、9、13和16天)向动物给药。在处理期期间,每天在给药之前测量并且记录食物摄入、水摄入和体重。已经进行若干个程序和取样:在第2、6、14和17天的非空腹和空腹葡萄糖(在第17天仅测量非空腹葡萄糖),空腹和非空腹胰岛素(在第2、6和14天)。分析第19天的最终样品的胆固醇。

[0282] 表1:研究设计

[0283]

组别	处理(sc)	频率	n
1	PEG-SH(142.86mg/ml)	第1、5、9、13和16天	5
2	PEG-FMS-OXM Hetero (MOD-6030), 2000nmol/kg	第1、5、9、13和16天	5
3	氨基PEG-FMS-OXM 2000nmol/kg	第1、5、9、13和16天	5

4	Lys12 PEG-FMS-OXM 2000nmol/kg	第1、5、9、13和16天	5
5	Lys30 PEG-FMS-OXM 2000nmol/kg	第1、5、9、13和16天	5

[0284] 研究2:

[0285] 使一百只雄性ob/ob小鼠(5-6周龄,Charles River)适应设施(3天),接着进行处置方案,其中将动物处置得好似被给药但实际上不称重或给药(7天)。随后,动物经历基线期7天,其中一周两次通过皮下途径以20ml/kg的体积向其给予PEG30-SH运载工具(146mg/ml)。每天记录体重、食物和水摄入。随后将动物分配为8个处理、对照和配对喂养组(第A-H组,N=8)(表2)。将配对喂养组与MOD-6031的高剂量(6000nmol/kg)组配对喂养,并且向其给予的每天食物定量与前一天D组中的其配对对应者所食用的食物定量相等。以1000、3000和6000nmol/kg给3个附加组(第I-K组,N=12)施用MOD-6031,并且对其进行取样用于PK分析。一周两次向PEG-SH运载工具(292mg/ml)组、1000、3000和6000nmol/kg的MOD-6031组以及配对喂养组投药32天,同时每天两次施用OXM、Liraglutide®和PBS。每天测量体重、食物和水摄入。一周一次测量非空腹和空腹葡萄糖,第2和30天进行OGTT。分析最终血液样品(第33天)的葡萄糖、胰岛素、胆固醇以及MOD-6031、PEG-FMS和OXM浓度。PK组中的小鼠接受单一剂量的MOD-6031并且在4、8、24、36、48、72、96和120小时(每时间点n=3)获取血液样品用于PK分析,允许通过LC-MS/MS法定量MOD-6031和其化合物浓度。

[0286] 表2:研究设计

组别	处理(sc)	n	频率
A	PEG30-SH 运载工具(292 mg/kg; 20 ml/kg)	8	一周两次, 第 1、4、8、11、15、18、22、25、29 和 32 天
B	MOD-6031 1000 nmol/kg	8	
C	MOD-6031 3000 nmol/kg	8	
D	MOD-6031 6000 nmol/kg	8	
E	PEG30-SH 运载工具(292 mg/kg)与 D 组配对喂养	8	每天两次, 持续 32 天
F	PBSbid (10 ml/kg)	8	
G	OXM 6000 nmol/kg 每天两次(10 ml/kg)	8	
H	利拉鲁肽 0.1 mg/kg 每天两次(10 ml/kg)	8	
I	MOD-6031 1000 nmol/kg PK 组	12	在第 1 天单次注射
J	MOD-6031 3000 nmol/kg PK 组	12	
K	MOD-6031 6000 nmol/kg PK 组	12	

[0289] 结果

[0290] 实施例1

[0291] 制造和开发合成

[0292] PEG-FMS-OXM缀合物的组成取决于其合成程序。产生PEG-FMS-OXM缀合物的不同变体(图1)。

[0293] 非均质缀合物:

[0294] MOD-6030 (PEG₃₀-FMS-OXM)的合成如下进行:将FMS间隔基(spacer)与OXM和PEG(30)-SH混合(以一锅反应形式)。FMS间隔基在一侧上通过其NHS活性酯与OXM偶合并且同步在另一侧上通过PEG-SH与马来酰亚胺基连接。以此方式,PEG-FMS-OXM结合物的非均质混合物由通过OXM肽的3种胺(N末端、Lys₁₂和Lys₃₀)之一连接的三种变体组成。

[0295] 均质结合物:

[0296] 结合程序进一步发展成两步骤过程,其中与FMS间隔基的连接以受控制并且定点

的方式执行。在第一步中，FMS间隔基与OXM(在树脂部分保护的OXM上)偶合，然后裂解，接着脱保护并且纯化FMS-OXM(通过RP-HPLC)。第二步是使PEG₃₀-SH与经纯化的均质FMS-OXM连接。通过RP-HPLC进一步纯化最终结合产物。可以应用其它纯化步骤，例如离子交换或SEC-HPLC或任何其它纯化步骤。

[0297] 使用Fmoc固相策略合成树脂上的三种肽。为了合成通过OXM的位置12或30的氨基酸赖氨酸连接的均质结合物，对于OXM的Lys₁₂或Lys₃₀应用ivDde(1-[(4,4-二甲基-2,6-二氧环己-1-亚基) 乙基])形式的选择性保护基，它可以在碱性条件下去除，而肽的其余部分仍与其它保护基一起在树脂上。

[0298] 因此，合成三种树脂结合的OXM:N末端，使用适用于用Fmoc策略固相合成的保护基(通常Boc保护基用于ε胺)，并且Lys₁₂或Lys₃₀，用ivDde保护基。这些OXM肽预期与FMS接头进一步选择性偶合。

[0299] 均质结合物以‘树脂上合成’形式进行。结合物在两个步骤中合成：1. 在OXM与FMS之间偶合，裂解，并且纯化；2. 用PEG₃₀-SH使OXM-FMS聚乙二醇化。在此程序中，进行FMS接头与OXM的偶合，同时OXM与树脂结合。充分保护OXM，使得OXM上的特定未经保护的所要氨基位点与NHS部分反应。使经纯化的FMS-OXM与PEG-SH连接。使用HPLC(RP或阳离子交换或两者都用)纯化粗结合物。

[0300] 实施例2

[0301] GLP-1受体活化的体外表征

[0302] 使用以下两种过表达GLP-1受体的不同细胞系评估PEG-FMS-OXM(MOD-6030;非均质)以及PEG-FMS-OXM的3种不同均质变体氨基(MOD-6031)、Lys₁₂和Lys₃₀的GLP-1受体结合活化: Millipore HTS163C2细胞系和cAMP HunterTM CHO-K1 GLP1R。效能通过以下方式来测定: 计算每种变体的EC₅₀，接着计算每种变体与非均质(MOD-6030)形式的相对效能(用每种均质变体的EC₅₀除以非均质形式的EC₅₀并且将其乘以100)。EC₅₀值和所计算的相对效能呈现于表3中。为了比较，测量OXM和GLP-1与cAMP Hunter CHO-K1 GLP1R细胞系的GLP-1受体的结合亲和力。

[0303] 表3: GLP-1和胰高血糖素受体结合活化

	Millipore HTS163C2		cAMP Hunter TM CHO-K1 GLP1R		cAMP Hunter TM CHO-K1 GCGR	
	EC ₅₀ (nM)	与非均质的相对效能(%)	EC ₅₀ (nM)	与非均质的相对效能(%)	EC ₅₀ (nM)	与非均质的相对效能(%)
Hetero PEG ₃₀ -FMS-OXM	76.2	100	8.14±1.35	100	11.32±3.26	100
[0304] PEG ₃₀ -FMS-OXM 氨基	55.2	72.24	8.07±0.21	99.1	10.31±2.87	91.1
PEG ₃₀ -FMS-OXM Lys ₁₂	179	234.9	9.42±1.77	115.7	20.21±4.12	178.5
PEG ₃₀ -FMS-OXM Lys ₃₀	307	402.9	17.34±2.37	213.0	6.12±1.75	54.1
胃酸调节素(OXM)			1.38±0.68		1.02±0.32	
GLP-1			0.016±0.006		NA	
胰高血糖素			NA		0.04±0.011	

[0305] 将均质变体的相对效能与非均质形式相比,并且概述于表3中。使用Millipore HTS163C2和cAMP Hunter™CHO-K1 GLP1R测量,氨基变体与非均质变体的相当的生物学活性展现出分别为72.2%和99.1%的相对效能。

[0306] Lys12和Lys30变体使用Millipore HTS163C2细胞系分别展示出GLP-1受体结合活化的2倍和4倍降低,而使用cAMP Hunter™CHO-K1 GLP1R细胞系分别仅展示出是微小和2倍的降低。氨基变体与其它变体相比展现优越结合活性的事实是出人意料的,因为OXM的N末端据报道参与OXM与GLP-1受体的结合(Druce et al., 2008)。总的来说,氨基变体与非均质变体展示出相当的生物学活性。测量OXM和GLP-1肽的GLP-1受体结合活化。发现OXM和GLP-1所展示的受体结合活化高出非均质PEG30-FMS-OXM 5.9和508.7倍。

[0307] 实施例3

[0308] 胰高血糖素受体活化的体外表征

[0309] 使用过表达胰高血糖素受体的cAMP Hunter™CHO-K1 GCGR细胞系测定PEG-FMS-OXM变体与胰高血糖素受体的结合亲和力。此细胞系用以表征非均质PEG-FMS-OXM (MOD-6030) 以及PEG-FMS-OXM的3种不同均质变体:氨基 (MOD-6031)、Lys12和Lys30。效能通过以下方式来测定:计算每种变体的EC50,接着计算每种变体与非均质形式的相对效能(用每种均质变体的EC50除以非均质形式的EC50并且将所述值乘以100)。EC50值和所计算的相对效能呈现于表3中。氨基变体展示出与非均质形式相当的结合活性。Lys30变体展示最高生物学活性并且Lys12展示出1.8倍降低。测量OXM和胰高血糖素肽的胰高血糖素受体结合活化。发现OXM和胰高血糖素所展示的受体结合活化高出非均质PEG30-FMS-OXM 11.1和283倍。

[0310] 实施例4

[0311] 通过PEG30-FMS-OXM变体诱导葡萄糖耐受性

[0312] 为了评估非均质PEG₃₀-FMS-OXM和三种PEG₃₀-FMS-OXM变体(氨基、Lys₁₂和Lys₃₀)的体内活性,应用IPGTT模型。向过夜空腹的C57BL/6小鼠IP注射不同化合物和运载工具(PEG-SH),接着IP注射葡萄糖,并且使用血糖仪从尾静脉测量血糖水平。在葡萄糖IP注射(1.5gr/kg)之前15分钟,IP施用PEG-SH(238.10nmol/kg)、非均质和均质PEG₃₀-FMS-OXM(100nmol/kg肽含量)。所有化合物与运载工具组相比都诱导葡萄糖耐受性。出人意料地,通过与其它变体相比稍高的葡萄糖AUC反映,均质氨基变体与两种其它变体和非均质PEG₃₀-FMS-OXM相比效能稍低(表4图3),这与体外活性结果相反。然而,所有变体与运载工具PEG-SH对照相比都显著改进葡萄糖耐受性。

[0313] 表4:C57BL/6小鼠的葡萄糖耐受性

	AUC(-60-180)	与对照相比的 AUC %	AUC(0-180)	与对照相比的 AUC %
PEG-SH	26857	100	22522	100
[0314] 非均质 PEG ₃₀ -FMS-OXM	18200	67.8	13541	60.1
PEG30-FMS-OXM 氨基变体	19891	74.1	15781	70.1
PEG30-FMS-OXM Lys12 变体	17652	65.7	13953	62.0
PEG30-FMS-OXM Lys30 变体	17818	66.3	13159	58.4

[0315] 可逆PEG₃₀-FMS-OXM的非均质和均质变体展示为在体外和IPGTT模型体内都具有活性。出人意料地,体外结果与文献中提出的以下事实不匹配:天然OXM的N末端参与GLP-1受体的肽结合;因此预期氨基末端变体在体外和体内都将展示最低效能。然而,PEG₃₀-FMS-OXM

的均质氨基变体与两种其它均质变体相比在使用两种不同细胞系时展现出改进的GLP-1受体活化(表3),而在IPGTT体内模型中展现出相当功效。IPGTT体内模型似乎呈现相当活性(考虑动物之间的变异性)。尽管在不同PEG30-FMS-OXM变体之间观测到与GLP-1R和GCGR不同的体外结合活化,但展示出相当的诱导葡萄糖耐受性的能力(表3和4)。意外地,均质氨基PEG₃₀-FMS-OXM的如cAMP诱导分析中所示的优越体外活性在体内IP葡萄糖耐受性测试中并没有反映出来。均质氨基变体PEG₃₀-FMS-OXM与两种其它变体和非均质PEG₃₀-FMS-OXM相比展示出最低葡萄糖耐受性谱。然而,其与运载工具相比仍展示出显著的葡萄糖耐受性效果(图3)。

[0316] 实施例5

[0317] ob/ob小鼠模型中体重、血糖和脂质谱通过PEG30-FMS-OXM变体的改进

[0318] ob/ob小鼠模型展现出ob基因的突变,以使得它们不能产生瘦素并且发展以高胰岛素血症、肥胖、摄食过量、胰岛素抗性和随后高血糖症为特征的表型。这些小鼠在两个不同研究中用作糖尿病的遗传模型,以便评估PEG30-FMS-OXM(非均质)和PEG30-FMS-OXM的三种均质变体(氨基、Lys12和Lys30)的功效。

[0319] 研究1:此研究比较当以2000nmol/kg施用,均质变体(氨基、Lys12和Lys30)与非均质MOD-6030的功效。所有测试物品与运载工具(PEG-SH)组相比都获得体重减轻,Lys12、MOD-6030、氨基和Lys30变体最终(在第18天)分别减轻3.1%、4.7%、4.9%和6.5%(图4)。在药物注射之后在第1、5、13和16天观测到体重减轻(图4)。所有处理组在药物施用之后(除第9天外)都观测到食物摄入减少(图5)。在研究期间对血糖参数的测量已经展示出氨基和Lys12处理组的非空腹葡萄糖的改进(图6a)以及所有处理组的空腹葡萄糖的改进(图6b)。所有处理组与对照相比都展示出显著更低的胰岛素水平。注意,在此研究中,所施用的剂量是2000nmol/kg,这是MOD-6030的较低有效剂量,并且因此体重、食物摄入和血糖谱的改进是相对中等的。意外地,氨基变体是在减轻体重、抑制食物摄入和改进血糖控制的能力方面展示优越功效的唯一变体。从制造视角来说,考虑到固相合成中的肽从氨基末端延伸,树脂上合成氨基变体是最直接的程序。末端胺具有比位置12和30处的赖氨酸的内部胺基团优选的耦合可用性。此可行性反映在氨基变体与Lys12和Lys30变体相比更高的制造产率方面。另一个益处在于,向氨基变体的合成相对于非均质变体的OXM合成保持无变化,而Lys12和Lys30变体的合成通过改变用于肽合成的Lys和通过添加选择性裂解步骤(选择性去除Lys的保护基)而修改。如先前关于非均质开发的OXM合成已经被优化以实现更佳的产率和稳固性。总的来说,从制造视角来说,氨基变体的树脂上合成是直接的并且具有优于替代性变体的优势。作为均质变体,其还具有的优于非均质变体的优势在于,其更适用于药物开发和药物处理。

[0320] 研究2:此研究探究了一周两次以1000、3000和6000nmol/kg施用MOD-6031(氨基变体)对于ob/ob小鼠模型的药理学和药物动力学参数的长期影响,同时OXM和利拉鲁肽(长效GLP-1受体激动剂)作为参考化合物进行评估。所测量的药理学参数是体重、食物和水摄入、葡萄糖控制以及脂质谱。一周两次施用高剂量的MOD-6031(6000nmol/kg)显著减少食物摄入和体重(图7、8),而较低剂量(3000和1000nmol/kg)展示较低效果。在研究结束(第33天)时,1000、3000和6000nmol/kg的动物分别展示出5.2%、12.3%和28.3%的体重减轻。与高剂量组配对并且食用等量食物(除空腹那几天外)的配对喂养组具有12.7%的体重减轻,但

经历类似食物摄入。此现象可以归因于PEG30-FMS-OXM的氨基变体增加能量消耗的能力,并且因此用6000nmol/kg的氨基变体处理的动物的体重减轻与其配对喂养组的体重减轻相比有所增加。在研究中,OXM和利拉鲁肽两者分别显著减轻体重10.3%和8.3%。在第1、5、12、19、26和29天监测非空腹葡萄糖并且在第2、9、16、23和30天监测空腹葡萄糖的血糖谱测量结果展示出这些参数的显著改进,尤其对于6000nmol/kg来说(图9a、9b)。在第2天和第30天进行经口葡萄糖耐受性测试(OGTT)研究(分别是图10和11)。结果显示,MOD-6031(氨基变体)显著并且剂量依赖性地改进葡萄糖耐受性,在1000、3000和6000nmol/kg组中血浆葡萄糖显著减少。与最高MOD-6031剂量配对喂养的动物展现出葡萄糖给药后葡萄糖漂移,这在所测试的任何时间点都未与对照显著不同。在OGTT研究的第2天,改进的葡萄糖谱与胰岛素应答延迟相关,其对于AUC 0-120分钟稍微延迟并且提供更高刺激(图10)。这可能是由于由MOD-6031的药理学活性所诱导的对胃排空的抑制,其导致延迟葡萄糖向血液中的释放以及第二胰岛素分泌期。OGTT研究的第30天与相比于对照减少的胰岛素应答相关,显示所述化合物改进胰岛素敏感性(图11)。另外,MOD-6031剂量依赖性地减少最终胆固醇;6000nmol/kg剂量MOD-6031的情况下所观测的减少显著大于配对喂养的对应动物的减少(图12)。体重、食物摄入、血糖和脂质谱的所有这些药理学改进不仅大于每天用OXM或利拉鲁肽处理两次的动物,而且其还显著大于配对喂养的对应动物中所观测的效果。

[0321] 使用LC-MS/MS定性方法测量MOD-6031(PEG-FMS-OXM)和其水解化合物(PEG-FMS和OXM)的最终血液水平。结果展示MOD-6031处理组的剂量依赖性浓度(表5)。此数据与第2天(单次投药之后)的化合物水平的比较显示,当一周施用两次时,OXM肽在研究期间期间不积聚。在研究中,PEG-FMS和PEG-FMS-OXM展示中等积聚(表5)。在最后一次注射后24小时(第33天),最高剂量的MOD-6031的MOD-6031和OXM肽的实际浓度分别是490 μ g/ml和0.37 μ g/ml。对照动物的所有样品都低于分析的下限。

[0322] 表5:单次剂量之后24小时(第2天)与重复MOD-6031给药方案的最后一次注射之后24小时(第33天)的血浆浓度的比较。

	剂量:	化合物:	第 2 天	第 33 天	增加
[0323]	1000	PEG-FMS-OXM	51.57	67.51	1.31
	3000	PEG-FMS-OXM	183.33	266.75	1.46
	6000	PEG-FMS-OXM	296.33	493.60	1.67

	剂量:	化合物:	第 2 天	第 33 天	增加
[0324]	1000	OXM	0.07	0.09	1.29
	3000	OXM	0.23	0.23	1.00
	6000	OXM	0.38	0.37	0.97

	剂量*:	化合物:	第 2 天	第 33 天	增加
[0325]	1000	PEG-FMS	65.73	78.04	1.19
	3000	PEG-FMS	211.67	295.75	1.40
	6000	PEG-FMS	359.33	740.00	2.06

[0326] *包括杂质的剂量是1515、4545和9090nmol/kg

[0327] 实施例6

[0328] ob/ob小鼠模型的药物动力学参数通过MOD-6031变体的改进

[0329] 给三组(n=12)ob/ob小鼠单次施用1000、3000和6000nmol/kg的MOD-6031,并且在施用后4、8、24、36、48、72、96和120小时(每时间点n=3)抽血用于PK分析,并且通过LC-MS/

MS法测定MOD-6031的量和其化合物浓度。计算MOD-6031 (PEG-FMS-OXM) 以及其水解产物PEG-FMS和OXM的药物动力学参数,例如C_{max}、T_{max}、AUC、T_{1/2}和V_z,这些参数分别呈现于表6a、6b和6c中。对于所有组分在所有剂量下,AUC_{0-∞}都在AUC_{0-t}的15%内,表明取样时程足以表征每种组分的药物动力学谱。对于所有三种组分来说,暴露似乎都是与剂量成比例的。一般来说,C_{max}和AUC_{0-t}随剂量而增加并且与剂量增加大致成相同比例。

[0330] 在表7中每种组分的参数都以摩尔浓度表示。C_{max}值对于PEG-FMS-OXM和PEG-FMS大致相等并且对于OXM较低。PEG-FMS-OXM和OXM的所观测的T_{1/2}分别是约9和12小时。PEG-FMS的最终T_{1/2}长得多,是约30小时。对照动物的所有样品和在给药之前收集的所有样品都低于分析的下限。

[0331] 药物动力学和药理学数据证实MOD-6031的长效性质。一周两次给予3000nmol/kg的MOD-6031显著减少体重和食物消耗,这与一天两次以6000nmol/kg剂量施用的OXM肽处理组相当,还导致显著药物负荷减少。

[0332] 表6a: SC注射1000、3000或6000nmol/kg之后的PEG-FMS-OXM药物动力学参数

参数	单位	1000 nmol/kg, 34.9 mg/kg	3000 nmol/kg, 105 mg/kg	6000 nmol/kg, 210 mg/kg
C _{max}	μg/mL	70.2	224	311
T _{max}	hr	8.00	8.00	8.00
AUC _{0-t}	hr×μg/mL	1840	6330	10700
[0333] AUC _{0-∞}	hr×μg/mL	1850	6330	10700
T _{1/2}	hr	8.57	8.80	12.3
CL/F	mL/hr/kg	18.9	16.5	19.5
V _z /F	mL/kg	234	210	346
C _{max} /D	(μg/mL)/(mg/kg)	2.01	2.14	1.48
AUC _{0-∞} /D	(hr×μg/mL)/(mg/kg)	52.9	60.5	51.3

[0334] 表6b: SC注射1000、3000或6000nmol/kg的MOD-6031之后的PEG-FMS药物动力学参数

参数	单位	1000 nmol/kg, 34.9 mg/kg	3000 nmol/kg, 105 mg/kg	6000 nmol/kg, 210 mg/kg
C _{max}	μg/mL	65.7	212	407
T _{max}	hr	24.0	24.0	36.0
AUC _{0-t}	hr×μg/mL	3060	10700	22800
[0335] AUC _{0-∞}	hr×μg/mL	3280	11200	25800
T _{1/2}	hr	33.5	22.8	35.0
CL/F	mL/hr/kg	14.0	12.4	10.8
V _z /F	mL/kg	678	408	544
C _{max} /D	(μg/mL)/(mg/kg)	1.43	1.52	1.46
AUC _{0-∞} /D	(hr×μg/mL)/(mg/kg)	71.3	80.5	92.8

[0336] 注意: 由于给药溶液中的PEG-FMS杂质,所施用的PEG-FMS (MOD-6031加PEG-FMS杂质)的剂量分别是1515、4545和9090nmol/kg而非1000、3000和6000nmol/kg。

[0337] 表6c: SC注射1000、3000或6000nmol/kg的MOD-6031之后的OXM药物动力学参数

参数	单位	1000 nmol/kg, 34.9 mg/kg	3000 nmol/kg, 105 mg/kg	6000 nmol/kg, 210 mg/kg
C _{max}	μg/ml	0.159	0.365	0.749
T _{max}	hr	8.00	8.00	8.00
AUC _{0-t}	hr×μg/mL	3.19	9.29	18.5
AUC _{0-∞}	hr×μg/mL	NC	9.42	18.5
T _{1/2}	hr	NC	11.7	11.8
CL/F	mL/hr/kg	NC	1420	1440
V _z /F	mL/kg	NC	23900	24400
C _{max} /D	(μg/mL)/(mg/kg)	0.0357	0.0274	0.0280
AUC _{0-∞} /D	(hr×μg/mL)/(mg/kg)	NC	0.705	0.694

[0339] NC=由于浓度相较于时间谱的形状,可以不计算参数

[0340] 表7:在摩尔基础上比较三种组分的药物动力学参数

剂量 ^a	组分	C _{max}	C _{max} /D	AUC _{0-t}	AUC _{0-t} /D	T _{1/2}
nmol/kg		nmol/mL	(nmol/mL)/ (μmol/kg)	hr×nmol/mL	(hr×nmol/mL)/ (μmol/kg)	hr
1000	PEG-FMS-OXM	2.01	2.01	52.6	52.6	8.57
1515	PEG-FMS ^a	2.16	1.43	100	66.0	33.5
1000	OXM	0.0357	0.0357	0.716	0.716	NC
3000	PEG-FMS-OXM	6.42	2.14	181	60.3	8.80
4545	PEG-FMS ^a	6.96	1.53	353	77.7	22.8
3000	OXM	0.0821	0.0273	2.09	0.697	11.7
6000	PEG-FMS-OXM	8.90	1.48	307	51.2	12.3
9090	PEG-FMS ^a	13.4	1.47	750	82.5	35.0
6000	OXM	0.168	0.0280	4.15	0.692	11.8

[0342] ^a考虑了杂质的PEG-FMS (MOD-6031加PEG-FMS杂质)的剂量。

[0343] 虽然已经在本文中说明和描述了本发明的某些特征,但本领域普通技术人员现在将想到许多修改、取代、改变和等效物。因此,应理解,所附权利要求书旨在涵盖属于本发明的真实精神内的所有此类修改和改变。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 奥普科生物制品有限公司
 [0003] U·E·菲马
 [0004] O·赫什科维茨
 [0005] <120> 聚乙二醇化的OXM变体
 [0006] <130> P-76093-PC
 [0007] <150> 61/655,367
 [0008] <151> 2012-06-04
 [0009] <160> 1
 [0010] <170> PatentIn version 3.5
 [0011] <210> 1
 [0012] <211> 37
 [0013] <212> PRT
 [0014] <213> Homo sapiens
 [0015] <400> 1
 [0016] His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 [0019] 20 25 30
 [0020] Arg Asn Asn Ile Ala
 [0021] 35

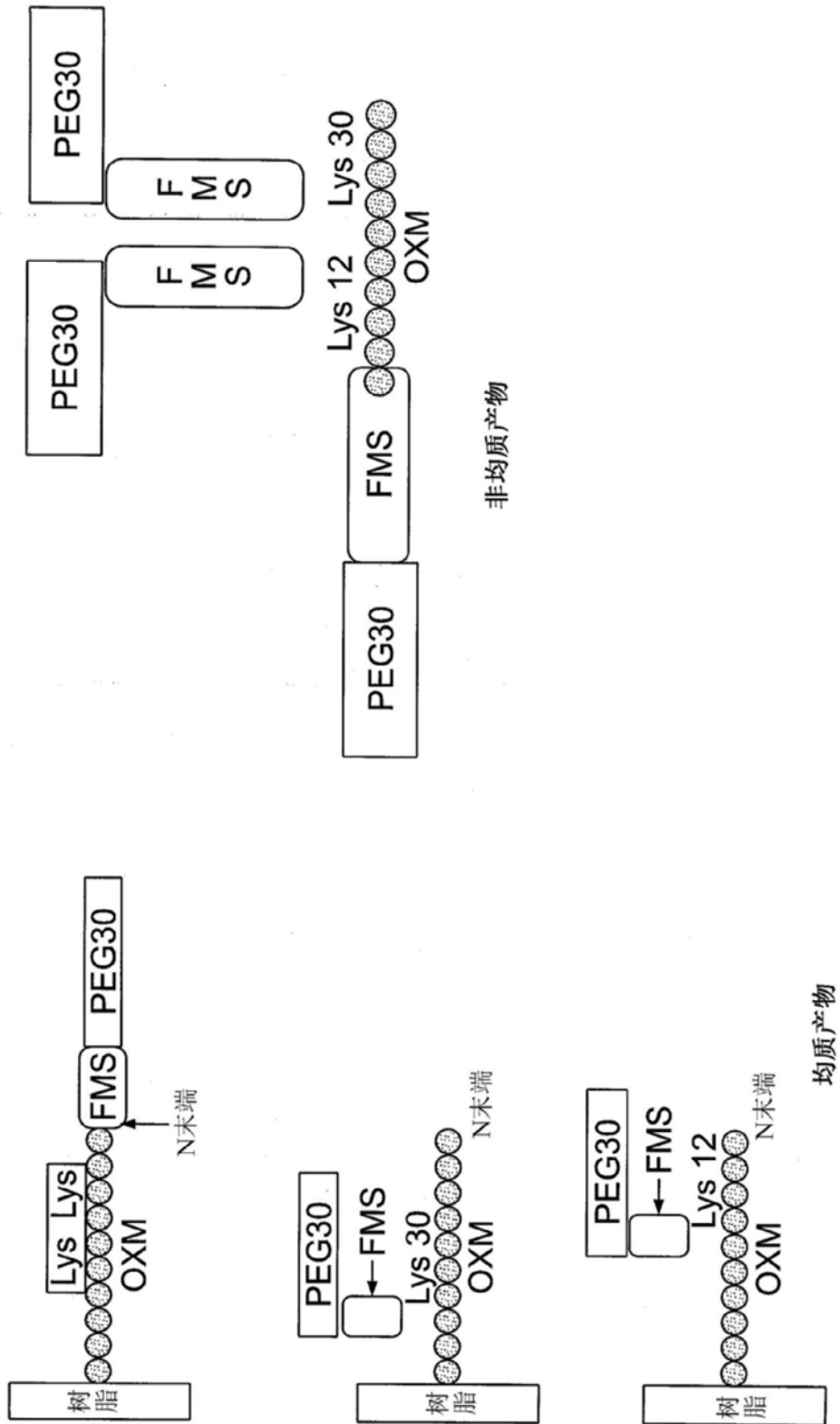


图1

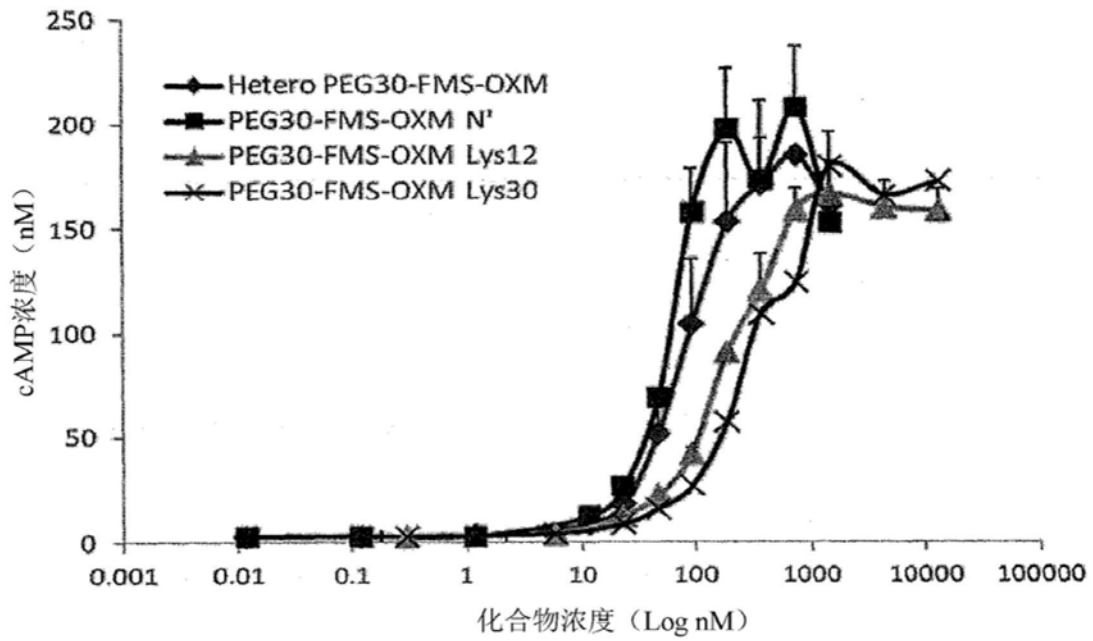


图2

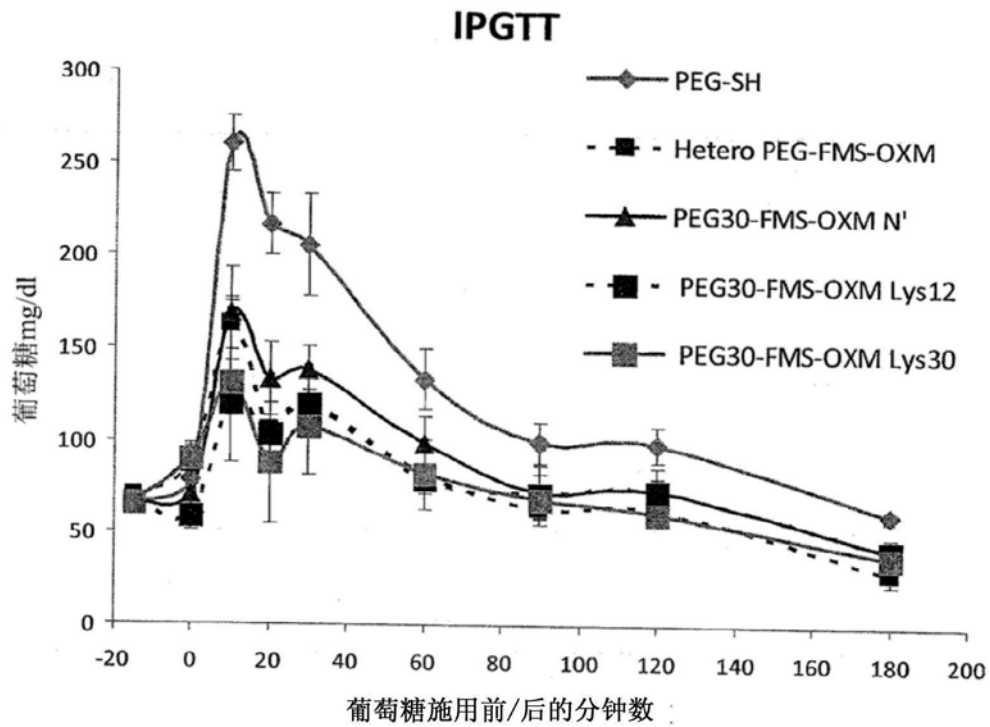


图3

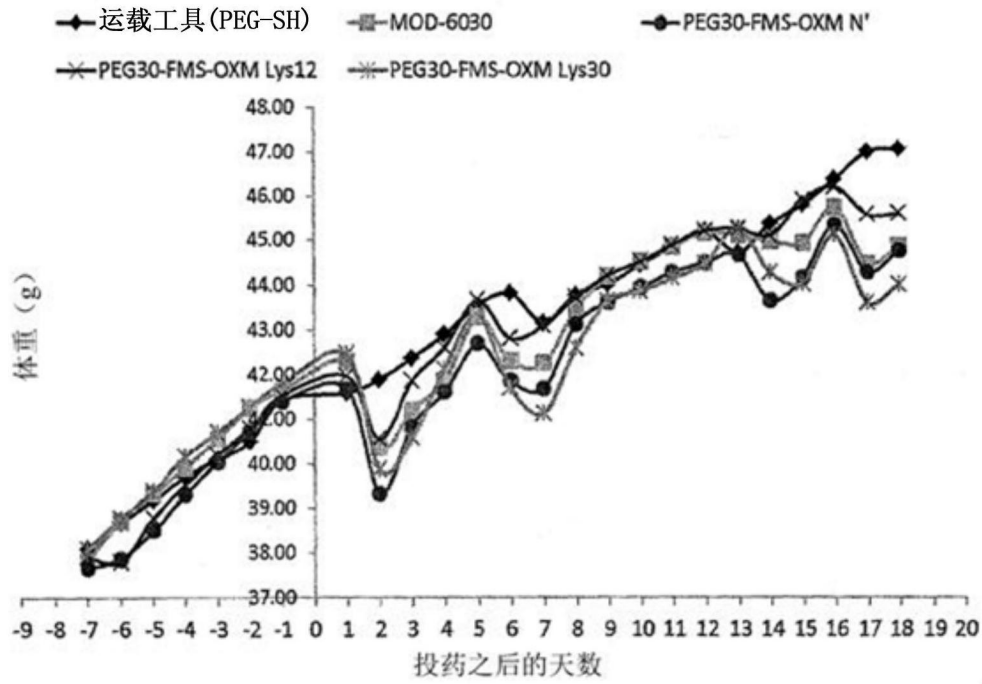


图4

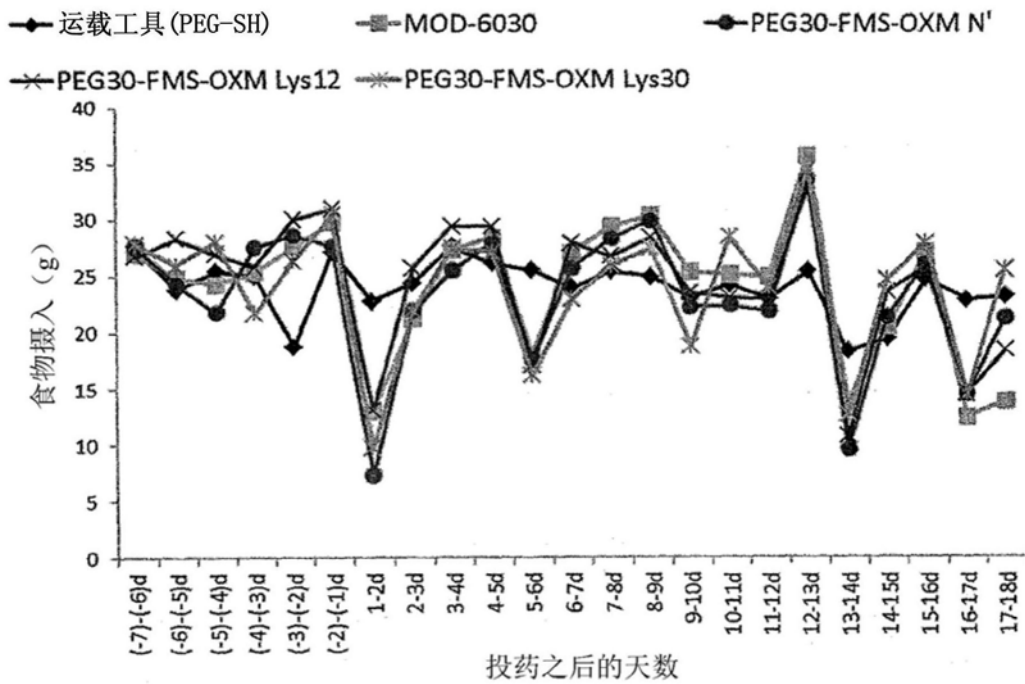


图5

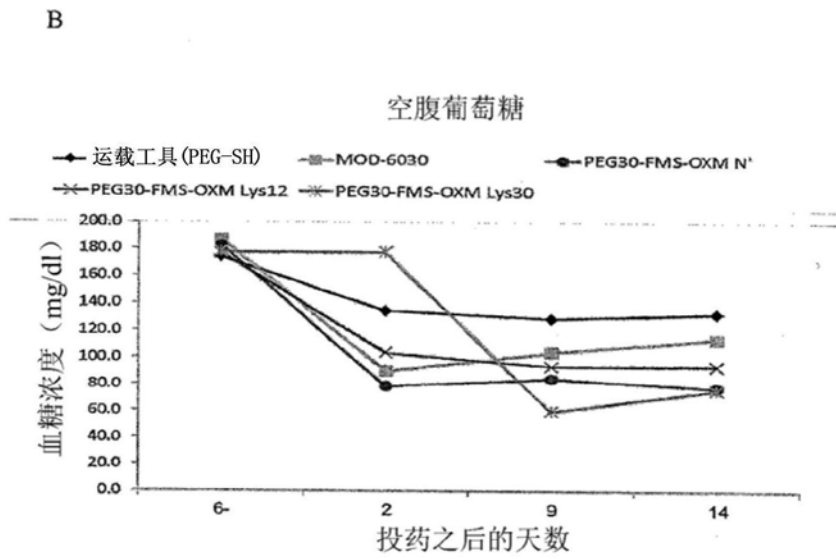
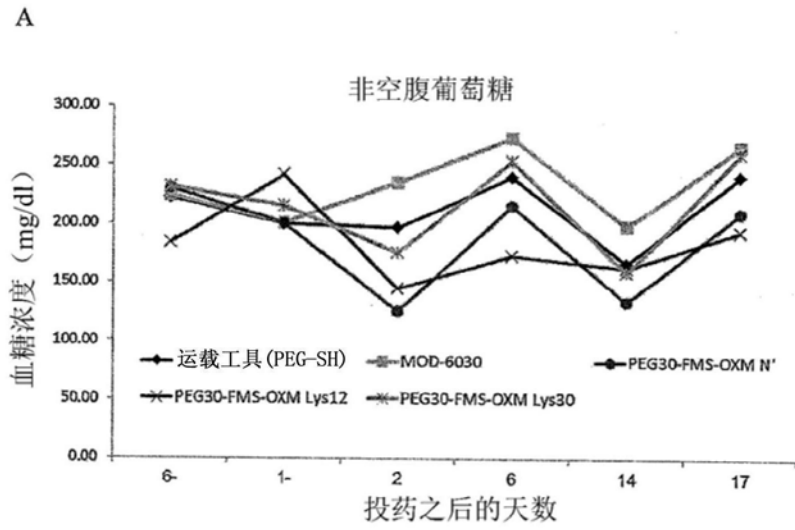


图6

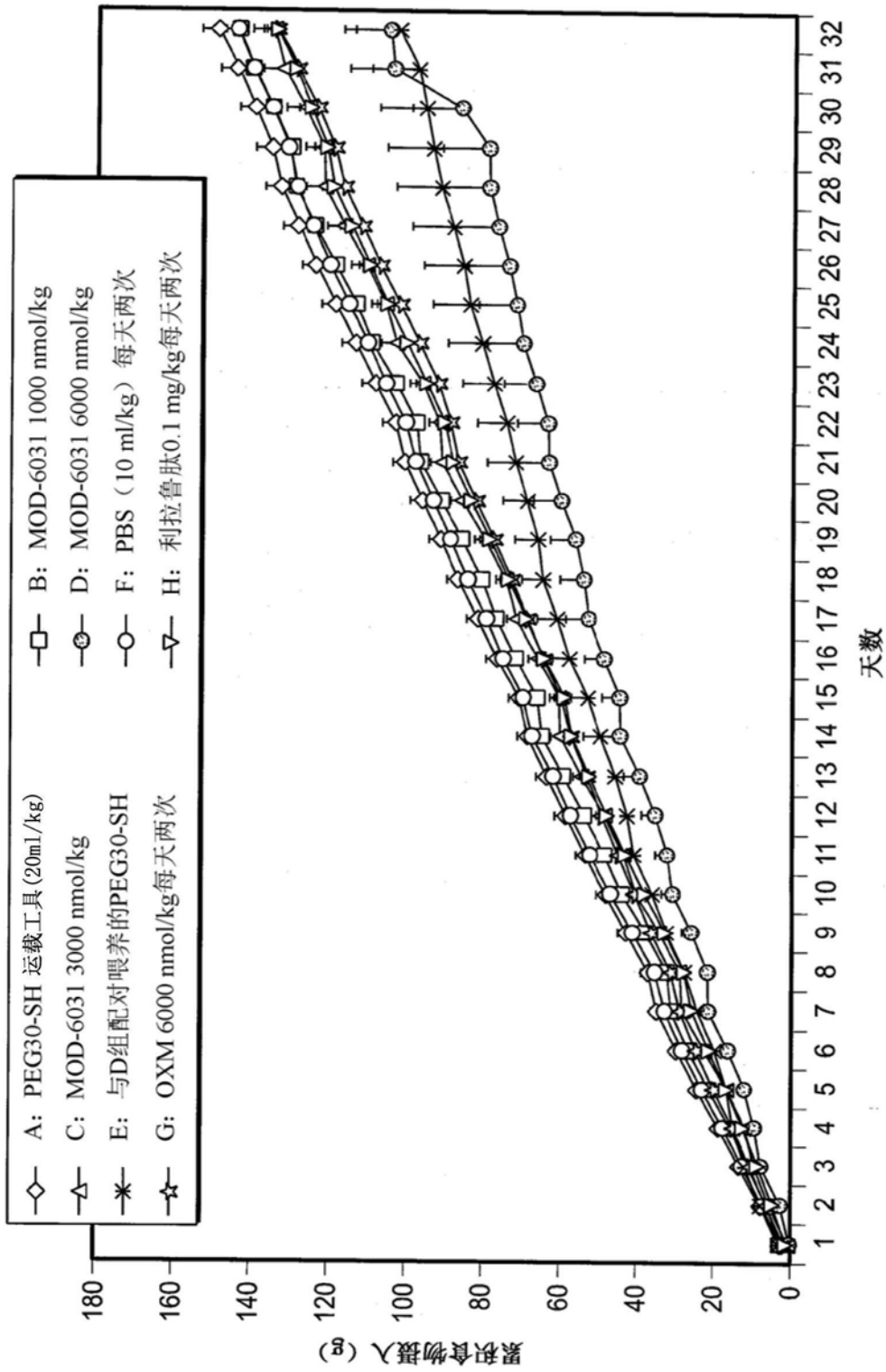


图7

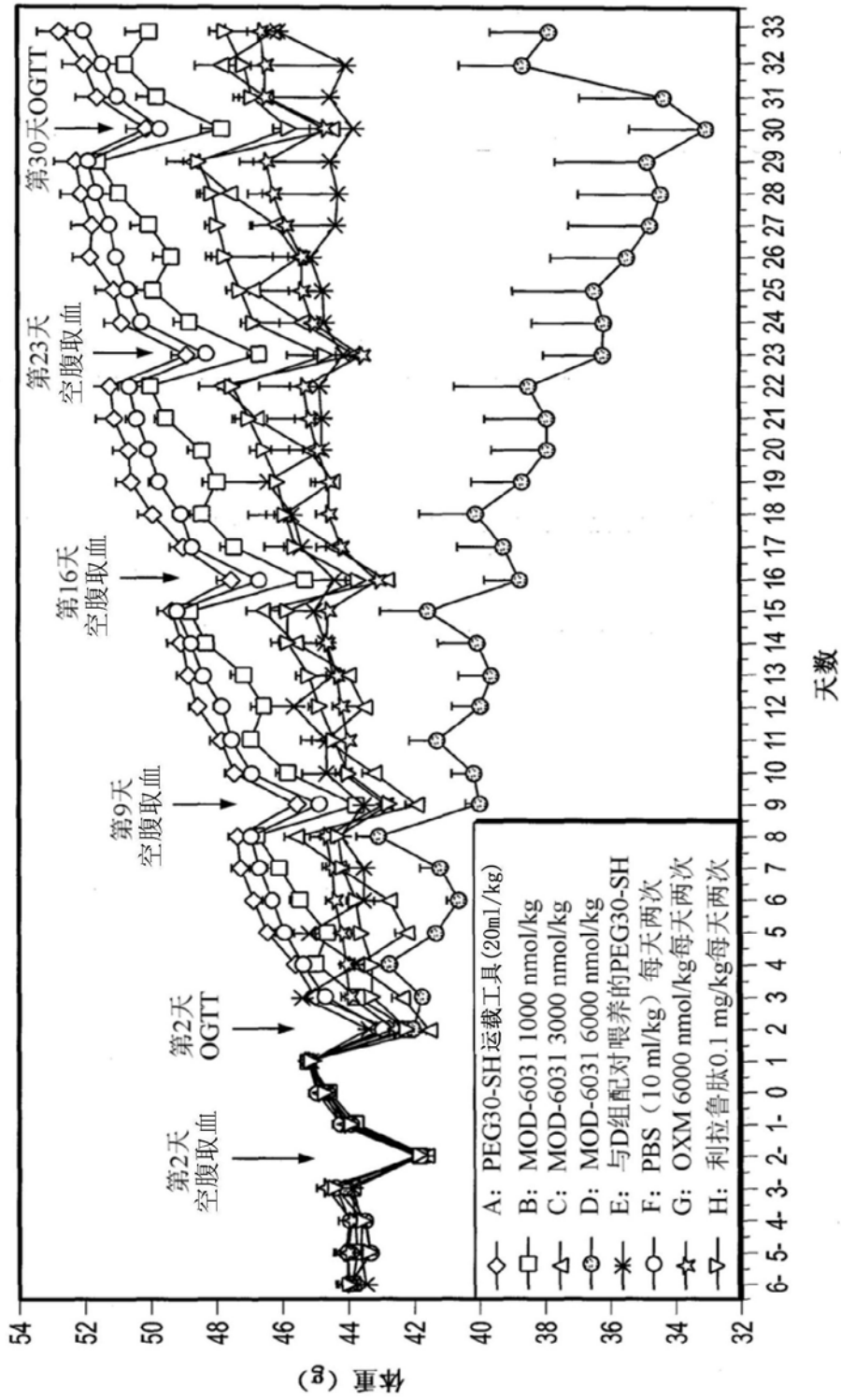


图8

○ PEG30-SH 运载工具 ■ MOD-6031 1000 nmol/kg ■ MOD-6031 3000 nmol/kg
■ MOD-6031 6000 nmol/kg ◆ PEG30-SH运载工具-与D组
配对喂养

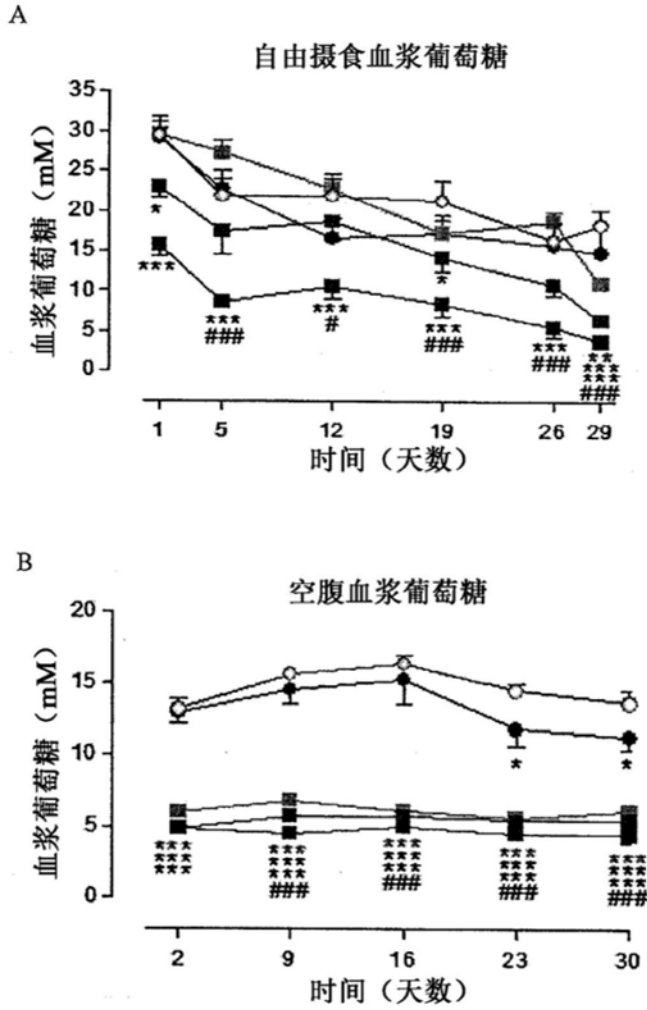
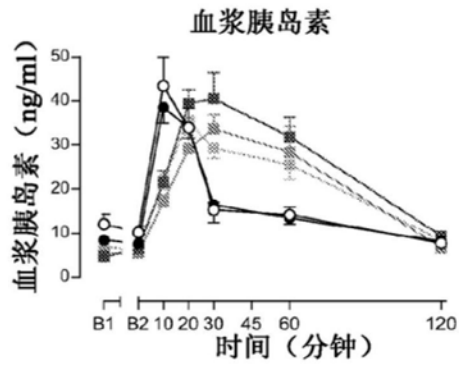
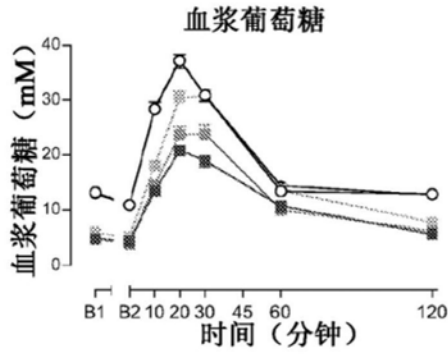


图9

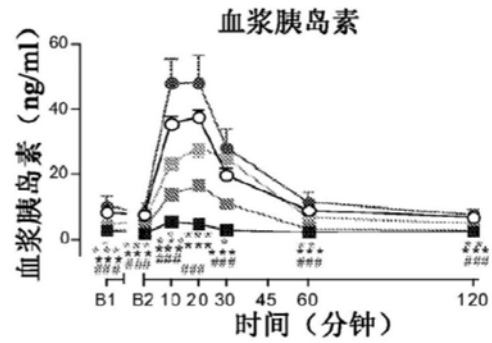
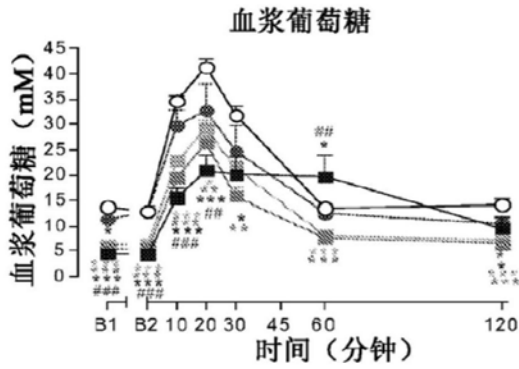
第2天OGTT



○ A: PEG30-SH 运载工具 * B: MOD-6031 1000 nmol/kg * C: MOD-6031 3000 nmol/kg
 * D: MOD-6031 6000 nmol/kg ● E: PEG30-SH 运载工具-与D组
 配对喂养*

图10

第30天OGTT



○ A: PEG30-SH 运载工具 * B: MOD-6031 1000 nmol/kg * C: MOD-6031 3000 nmol/kg
 * D: MOD-6031 6000 nmol/kg ● E: PEG30-SH 运载工具-配对喂养

图11

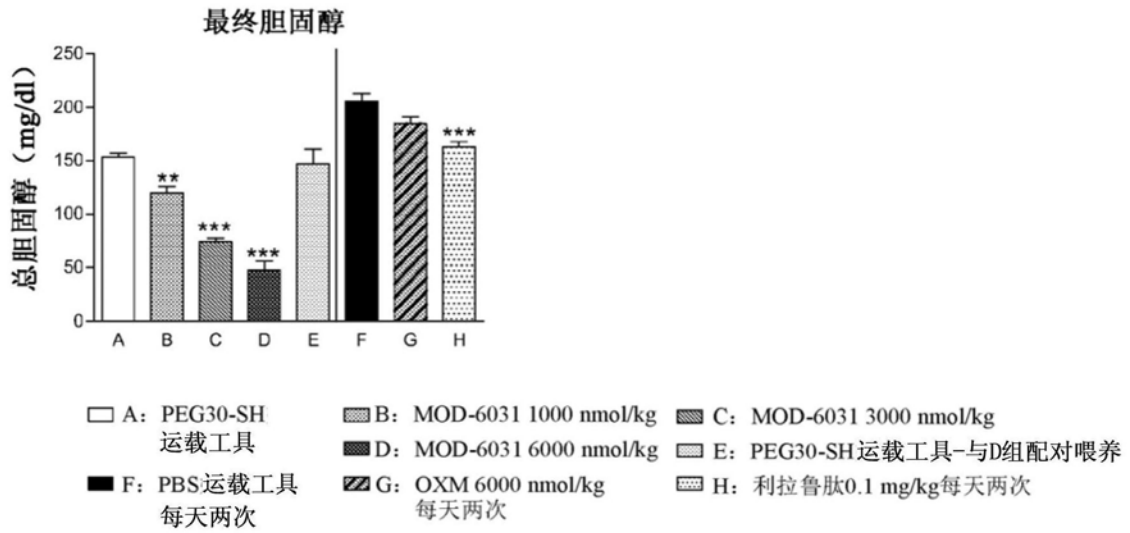


图12