

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2019/201328 A1

(43) 国际公布日

2019 年 10 月 24 日 (24.10.2019)

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/605 (2006.01) A61K 38/26 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)

C07K 1/107 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/083383

(22) 国际申请日: 2019 年 4 月 19 日 (19.04.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

PCT/CN2018/083789

2018 年 4 月 19 日 (19.04.2018) CN

(71) 申请人: 杭州先为达生物科技有限公司 (HANGZHOU SCIWIND BIOSCIENCES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市经济技术开发区海达南路 555 号, Zhejiang 310018 (CN)。

(72) 发明人: 许峥 (XU, Zheng); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。李峰 (LI, Feng); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。宋瑞 (SONG, Rui); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。郭万军 (GUO, Wanjun); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。潘海 (PAN, Hai); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。林兆生 (LIN, Zhaosheng); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。邓建慧 (DENG, Jianhui); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。冯静 (FENG, Jing); 中国北京市亦庄经济技术开发区荣京东街 6 号, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: 北京彩和律师事务所 (BEI JING CAI HE LAW FIRM); 中国北京市海淀区大柳树路 17 号富海国际港 1602 室, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: ACYLATED GLP-1 DERIVATIVE

(54) 发明名称: 酰化的 GLP-1 衍生物

(57) Abstract: Provided are a GLP-1 (7-37) polypeptide analog, a fatty acid-modified derivative of the analog, and a drug comprising the derivative. Further, also provided are a preparation method of the derivative and a use of the same in preparing a drug.

(57) 摘要: 提供了 GLP-1(7-37) 多肽类似物、该类似物的脂肪酸修饰的衍生物和包含该衍生物的药物。另外, 还提供了该衍生物的制备方法以及该衍生物在制备药物中的用途。

WO 2019/201328 A1

酰化的 GLP-1 衍生物

技术领域

本发明属于多肽技术领域。具体而言，本发明涉及 GLP-1(7-37)多肽类似物的脂肪酸修饰的衍生物。另外，本发明还涉及该肽衍生物的制备方法、含该肽衍生物的药物以及在制备药物中的用途等。

背景技术

糖尿病是一种由遗传和环境等多种因素引起的糖代谢紊乱疾病，现已成为继肿瘤、心脑血管疾病之后威胁人类健康和生命安全的第三位重大疾病。糖尿病本身不一定造成危害，但长期血糖增高，大血管、微血管受损并危及心、脑、肾、周围神经、眼睛、足等，据世界卫生组织统计，糖尿病并发症高达 100 多种，是目前已知并发症最多的一种疾病。因糖尿病死亡者有一半以上是心脑血管所致，10%是肾病变所致。因糖尿病截肢是非糖尿病的 10~20 倍。为此治疗糖尿病进而预防其并发症是至关重要的社会问题。

糖尿病由于患病机理不同可分为几种类型。其中绝大部分属于二型糖尿病(约 90%)，主要是因体重过重和缺乏身体活动所致。II 型糖尿病患者多存在胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足两方面异常，在发病的中晚期往往出现胰岛 β 细胞凋亡。目前，临床使用的口服降糖药的作用机理多为增强胰岛素敏感性，或促进胰岛素分泌以稳定血糖，均无法解决 β 细胞凋亡这一难题。而胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 及其类似物药物由于具有减缓 β 细胞凋亡，增进其再生，促使胰岛 β 细胞分化和增殖的作用，使其成为治疗 II 型糖尿病的研究重点。

1983 年，BELL 等在分析胰高血糖素原(proglucagon, PG)的基因序列时发现了胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1)即 GLP-1 (BELL G I, SANCHEZ-PESCADOR R, LAYBOURN P J, et al. Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene[J]. Nature, 1983, 304(5924): 368-371)。PG 基因序列由 6 个外显子和 5 个内含子组成，包含 3 个主要的结构域：胰高血糖素(33~61)、GLP-1(72~108)和 GLP-2(126~158)。PG 的 mRNA 在胰腺 A 细胞、肠道 L 细胞和脑中均有表达，在这些组织细胞中进行特异性的翻译修饰，最终形成不同的终产物。

GLP 有两种亚型，GLP-1 类似物和 GLP-2 类似物，它们和胰高血糖素的氨基酸序列有近一半相同，二者之间也有约 35% 的同源性。GLP-1 类似物是由末端空肠、回肠和结肠的朗格汉斯细胞(Langerhans' scell)分泌的一种多肽激素，具有葡萄糖依赖性的促胰岛素分泌和生物合成、抑制胰高血糖素分泌及抑制胃排空等多种功能。GLP-2 类似物在肠道组织和中枢神经系统的脑干和视丘下部神经原细胞均有合成，主要促进正常小肠的生长和肠黏膜损伤的修复(付刚，龚珉，徐为人. 胰高血糖素样肽 1 及其受体激动剂研究进展[J]. 天津医药, 2012, 40(2):181-184.)。

GLP-1 是一种内源性促进胰岛素分泌的激素，主要是由肠内 L-细胞分泌，在平衡胰岛素和葡萄糖水平中发挥作用。

GLP-1 的一级结构为：组氨酸(His)-丙氨酸 (Ala) -谷氨酸(Glu)-苯丙氨酸(Phe)-谷氨酸(Glu)-精氨酸(Arg)-组氨酸(His)-丙氨酸(Ala)-谷氨酸(Glu)-甘氨酸(Gly)-苏氨酸(Thr)-苯丙氨酸(Phe)-苏氨酸(Thr)-丝氨酸(Ser)-天冬氨酸(Asp)-缬氨酸(Val)-丝氨酸(Ser)-丝氨酸(Ser)-酪氨酸(Tyr)-亮氨酸(Leu)-谷氨酸(Glu)-甘氨酸(Gly)-谷氨酰胺(Gln)-丙氨酸(Ala)-丙氨酸(Ala)-赖氨酸(Lys)-谷氨酸(Glu)-苯丙氨酸(Phe)-异亮氨酸(Ile)-丙氨酸(Ala)-色氨酸(Trp)-亮氨酸(Leu)-缬氨酸(Val)-赖氨酸(Lys)-甘氨酸(Gly)-精氨酸(Arg)-甘氨酸(Gly)。

DDP-IV 能够快速降解 N 端 7~8 位上的组氨酸(H)-丙氨酸(A)，DDP-IV 主要起肽链端水解酶作用，凡是第 8 位是丙氨酸或脯氨酸，该酶就会发挥降解作用，使 GLP-1 快速失去活性 (AERTGEERTS K, YE S, TENNANT M G, et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a dipeptide peptidase reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate [J]. Protein Sci, 2004, 13(2):412-421)。SARRAUSTE DE MENTHIERE 等建 GLP-1 模型，通过氨基酸替换后观察 GLP-1 类似物与受体亲和力和内在活性的变化，第 7 位上的组氨酸是亲和力和内在活性的决定因素，其上面芳环比色氨酸小，而且没有任何极性取代基；第 8 位上的丙氨酸侧链有极性基团会影响 GLP-1 的活性，侧链的体积不能过大，超过一定限度时，活性就会下降；第 9 位上的谷氨酸被某些氨基酸，如酸性、极性和疏水性氨基酸替换时，活性不发生变化，被碱性氨基酸替换时活性下降甚至失活；GLP-1 与受体呈结合状态，如果其中的氨基酸残基有离子键作用，那么就发生在 7~15 位氨基酸之间，形成环结构，Ala8-Glu9-Gly10-Thr11 会形成 β

转角,使得第7位上的组氨酸、第12位上的苯丙氨酸和第19位上的酪氨酸等3个芳香核发生相互作用,与受体上存在的芳香簇疏水口袋相对应,推测它们起到激活受体的作用;第22位上的甘氨酸为柔性氨基酸,起到柔性连接作用,维持螺旋卷曲状。破坏甘氨酸会使所有的芳香氨基酸簇集,但是与受体的亲和力却减少1/40(SARAUSTE DE MENTHIEREC, CHAVANIEUA, GRASSYG, et al. Structural requirements of the N-terminal region of GLP-1-[7-37]-NH₂ for receptor interaction and cAMP production [J]. Eur J Med Chem, 2004, 39(6):473-480)。

GLP-1 包括 GLP-1(1-37)、GLP-1(1-36)、GLP-1(7-37)甘氨酸衍生物和 GLP-1(7-36) NH₂ 等分子形式。一般认为,后两者具有相同的生物活性。肠粘膜L细胞分泌的GLP-1(1-37)无活性,需要进一步水解切除N端6个氨基酸,成为有活性的GLP-1(7-37)。GLP-1(7-37)在体内存在的时间较短,很快就被降解。因此,人们进行了各种关于具有抗DPP IV的GLP-1类似物的研究,例如,美国专利第5545618号描述了用烷基或酰基修饰N末端,并且 Gallwitz 等描述了第7位His进行N甲基化或 α 甲基化,或者用整个His用咪唑取代来增加对DPP-IV的抗性并保持生理活性。

除了这些修饰,从希拉毒蜥蜴的唾液腺纯化的GLP-1类似物艾塞那肽-4(exendin-4)(美国专利第5424686号)具有对DPP IV的抗性并比GLP-1具有更高的生理活性。因此,它具有比GLP-1的半衰期更长的2至4小时的体内半衰期。然而,仅适用增加DPP IV抗性的方法,生理活性不能被充分地保持,并且在使用商业可获得的艾塞那肽-4(exenatide)的情况下,它需要一天两次注射给病人,这对病人仍然是很痛苦的。

这些促胰岛素肽分子量很小,因此被很快从肾脏排出体外。有科学家使用化学方法在肽的表面添加高溶解度的聚合物例如聚乙二醇来抑制其在肾中的损失。例如美国专利第692464号描述了PEG结合到艾塞那肽-4的赖氨酸残基来增加其体内停留时间,然而,这种方法尽管增加了肽类药物在体内的停留时间,但同时随着分子量的增加,该肽类药物的浓度显著减少,对肽的反应性也降低了。

此外,还有一系列其它方法用于修饰胰高血糖素样肽-1化合物的结构试图延长其作用持续时间。例如WO96/29342公开了在亲本肽激素C-端氨基酸残基处或在N-端氨基酸残基处引入亲脂性取代物而修饰的肽激素衍生物。

WO98/08871 公开了其中亲本肽的至少一个氨基酸残基连接有亲脂性取代物的 GLP-1 衍生物 (liraglutide)。WO99/43708 公开了具有连接至 C-端氨基酸残基的亲脂性取代物 GLP-1 (7-35) 和 GLP-1 (7-36) 衍生物。WO00/34331 公开了双酰化的 GLP-1 类似物。WO 00/69911 公开了用于注射的活化的促胰
5 胰岛素肽, 据认为在患者体内, 它们与血液成分反应形成缀合物, 延长了体内作用持续时间。

WO2006/097537 公开了另一种酰化的 GLP-1 类似物 (semaglutide), 通过将第 8 位氨基酸突变为非天然氨基酸, 与 WO98/08871 的酰化的 GLP-1 (liraglutide) 相比, 具有更长的半衰期。

10 WO02/046227 公开了使用基因重组技术通过将 GLP-1, 艾塞那肽-4 或其类似物与人血清白蛋白或免疫球蛋白区 (Fc) 结合来制备融合蛋白, 这可以解决如聚乙二醇化产量低和非特异性的问题, 但是它们增加血液中半衰期的效果仍然不像期待中的那么显著, 在综合的降糖效果上, 并没有达到预期的效果, 甚至不如索玛鲁肽。为了使增加血液中半衰期的效果最大化, 人们试
15 图使用各种类型的肽连接器, 但是这种方法面临的问题是可能引起免疫反应。

CN107033234A 公开了 GLP-1 类似物的脂肪酸修饰的缀合物, 脂肪酸修饰位点是在 Lys²⁶ 上, 前期动物实验表明其在降糖效果上优于索玛鲁肽, 该方式可以适当地延长 GLP-1 类似物的体内作用时间, 但延长的时间仍然不理
20 想。

目前市场上获批的 GLP-1 药物主要有从蜥蜴唾液中分离出的艾塞那肽-4 (Exenatide-4), 以及采用脂肪酸, 抗体 Fc 段或血清白蛋白修饰的人源 GLP-1 类似物。艾塞那肽-4 半衰期太短, 仅 2-4 小时, 一天需要至少两次注射。诺和诺德公司的脂肪酸修饰的利拉鲁肽在降血红蛋白糖基化方面最有效
25 且副作用较少, 但其不足之处在于体内半衰期只有 13 小时, 需要每天给药。为了进一步延长体内半衰期, 减少给药频率, 近年来陆续开发了氨基酸序列突变体和 FC、脂肪酸或白蛋白等修饰的长效 GLP-1 类似物。如礼来公司的杜拉鲁肽和诺和诺德公司的索玛鲁肽 (Semaglutide)。这些长效化的 GLP-1 类似物在人体内的半衰期可被不同程度地延长, 最长可实现每周给药一次的
30 给药频率。

本申请的发明人经过长期研究,开发了一种新的 GLP-1 类似物及其衍生物,在相同实验条件下,与现有公认的最好的药物索玛鲁肽相比,体外活力与索玛鲁肽相当;在普通小鼠及糖尿病小鼠模型上,其体内降糖活性持续时间可提高 1 倍左右,意味着在人体内可实现至少每周间隔给药、甚至每两周间隔或更长时间间隔给药的给药频率。并且在剂量为索玛鲁肽 1/10 用量时,其降糖效果也不低于索玛鲁肽,具有更好的应用前景。

发明内容

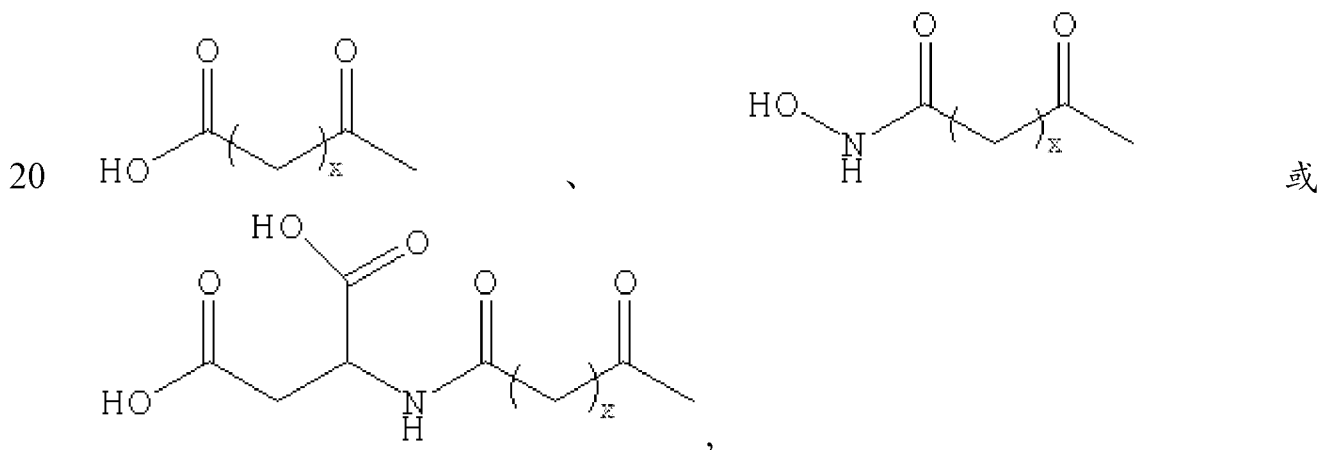
本发明的目的在于提供一种新的 GLP-1(7-37)类似物、该类似物的酰化衍生物。另外,本发明还提供了该类似物或衍生物的制备方法、包含该类似物或衍生物的药物组合物、制品以及它们在预防和治疗疾病中的用途。

具体而言,一方面,本发明提供了一种 GLP-1(7-37)类似物的衍生物或其药学上可接受的盐,其中所述 GLP-1 类似物包含以下式氨基酸序列组成的多肽:

15 HX₈EGTFTSDVSSX₁₉LEEX₂₃AARX₂₇FIX₃₀WLVX₃₄GX₃₆X₃₇

其中 X₈ 选自 V、T、I、L、G 或 S, X₁₉ 为 Y 或 K, X₂₃ 为 Q 或 K, X₂₇ 为 E 或 K, X₃₀ 为 A 或 K, X₃₄ 为 R 或 K, X₃₆ 为 R 或 K, X₃₇ 为 G 或 K,

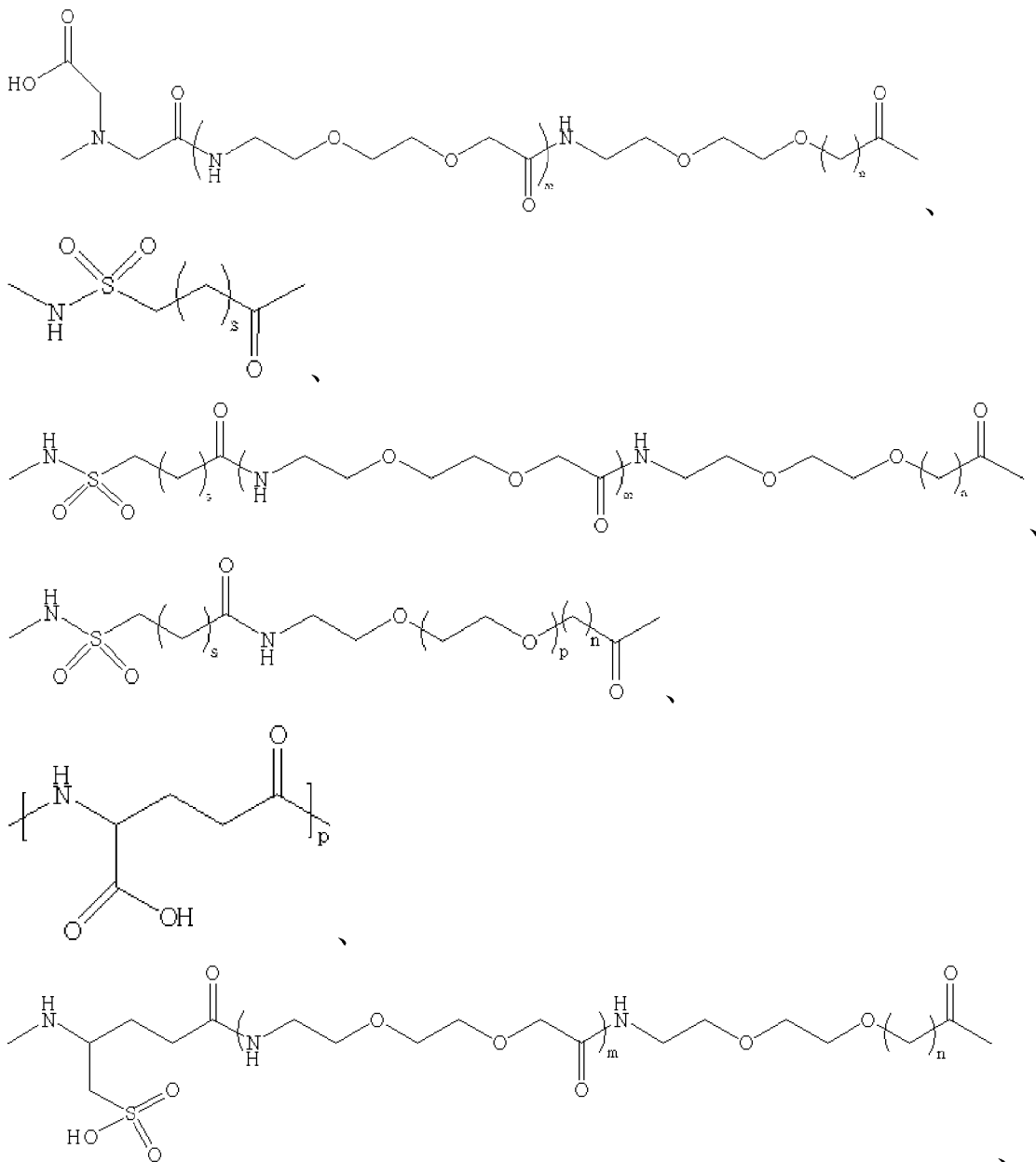
条件是,在 X₁₉、X₂₃、X₂₇、X₃₀、X₃₄、X₃₆ 或 X₃₇ 中只有一个是 K 残基,所述衍生物包含与所述 K 残基连接的延长部分,其中所述延长部分为



其中 x 是 4-38 的整数。

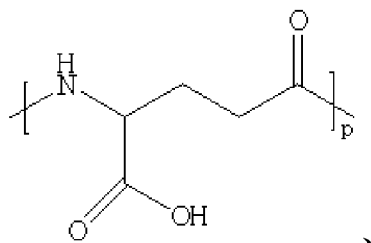
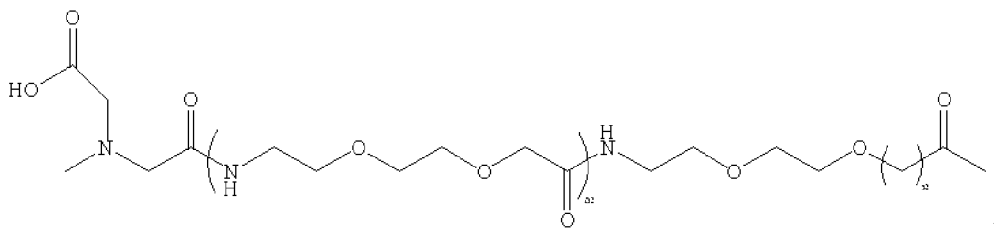
其中,延长部分优选为: HOOC(CH₂)₁₄CO-、HOOC(CH₂)₁₅CO-、HOOC(CH₂)₁₆CO-、HOOC(CH₂)₁₇CO-、HOOC(CH₂)₁₈CO-、HOOC(CH₂)₁₉CO-、HOOC(CH₂)₂₀CO-、HOOC(CH₂)₂₁CO- 和 HOOC(CH₂)₂₂CO-,更优选为 HOOC(CH₂)₁₆CO-。

在优选实施方案中,本发明所述 GLP-1 类似物的衍生物或其药学上可接受的盐的延长部分经一接头与 GLP-1 的 K 残基连接。所述接头可以是如下结构:

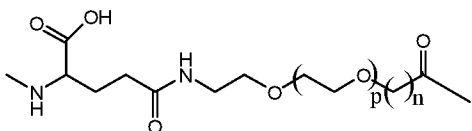
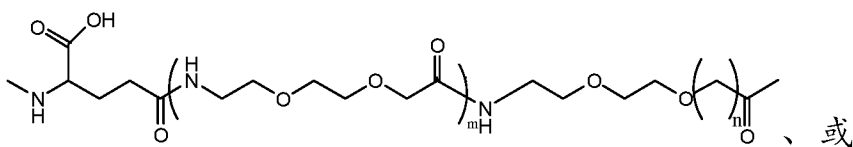


, 其中 m 是 0、1、2 或 3; n 是 1、2 或 3; s 是 0-6 的任意整数; p 是 1-8 的任意整数。

优选地, 接头为:



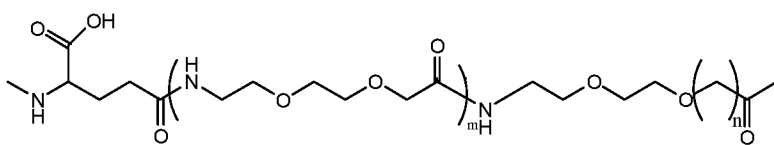
5



10

其中 m 是 1 或 2; n 是 1 或 2; p 是 1-5 的任意整数。

更优选: 接头为:



15 或 2。

本发明也涉及 GLP-1(7-37)类似物, 该类似物包含

H X₈EGTFTSDVSSX₁₉LEEX₂₃AARX₂₇FIX₃₀WLVX₃₄GX₃₆X₃₇ 序列, 该序列包含选自如下一个或多个位点的突变:

第 8 位、第 19 位、23 位、27 位、30 位、34 位、36 位和 37 位。在一个
20 优选的实施方案中, 第 8 位氨基酸残基选自 V、T、I、L、G 或 S, 第 19 位
氨基酸残基为 Y 或 K, 第 23 位氨基酸残基为 Q 或 K, 第 27 位氨基酸残基
为 E 或 K, 第 30 位氨基酸残基为 A 或 K, 第 34 位氨基酸残基为 R 或 K,

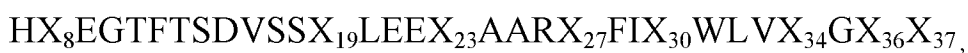
第 36 位氨基酸残基为 R 或 K, 第 37 位氨基酸残基为 G 或 K, 条件是, 第 19 位、23 位、27 位、30 位、34 位、36 位或 37 位只能有一位为 K 残基。

上述 GLP-1 类似物经过酰化后的衍生物, 体外结合活性表明, 与 GLP-1R 受体结合亲和力大于索玛鲁肽或 M0 (26 位为 Lys, CN107033234A 中公开)。

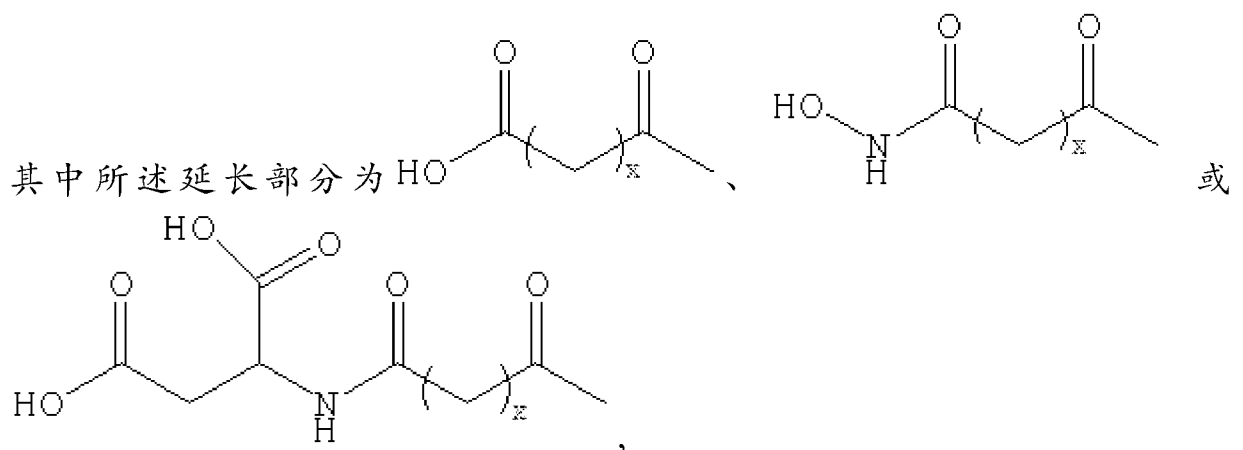
- 5 体内降糖实验也证明, 与同样为酰化的 GLP-1 产品索玛鲁肽相比, 上述 GLP-1 类似物经过酰化后的衍生物在正常小鼠体内可以获得更长的降糖活性持续时间; 在糖尿病鼠体内, 上述衍生物的降糖和提高糖耐量的效果显著优于索玛鲁肽, 并且, 在剂量仅为索玛鲁肽或 M0 的 1/10 剂量时, 其降糖效果也不低于索玛鲁肽或 M0。同时, 本发明的研究证明上述 GLP-1 (7-37)
- 10 类似物的衍生物与市售索玛鲁肽相比, 有更好的抗酶降解特性。

具体地, 本发明涉及:

1、一种 GLP-1(7-37)类似物的衍生物或其药学上可接受的盐, 其中 GLP-1(7-37)类似物包含下式的氨基酸序列:



- 15 其中 X_8 选自 V、T、I、L、G 或 S, X_{19} 为 Y 或 K, X_{23} 为 Q 或 K, X_{27} 为 E 或 K, X_{30} 为 A 或 K, X_{34} 为 R 或 K, X_{36} 为 R 或 K, X_{37} 为 G 或 K, 条件是, 在 X_{19} 、 X_{23} 、 X_{27} 、 X_{30} 、 X_{34} 、 X_{36} 或 X_{37} 中只有一个是 K 残基, 所述衍生物包含与所述 GLP-1(7-37)类似物的 K 残基连接的延长部分,



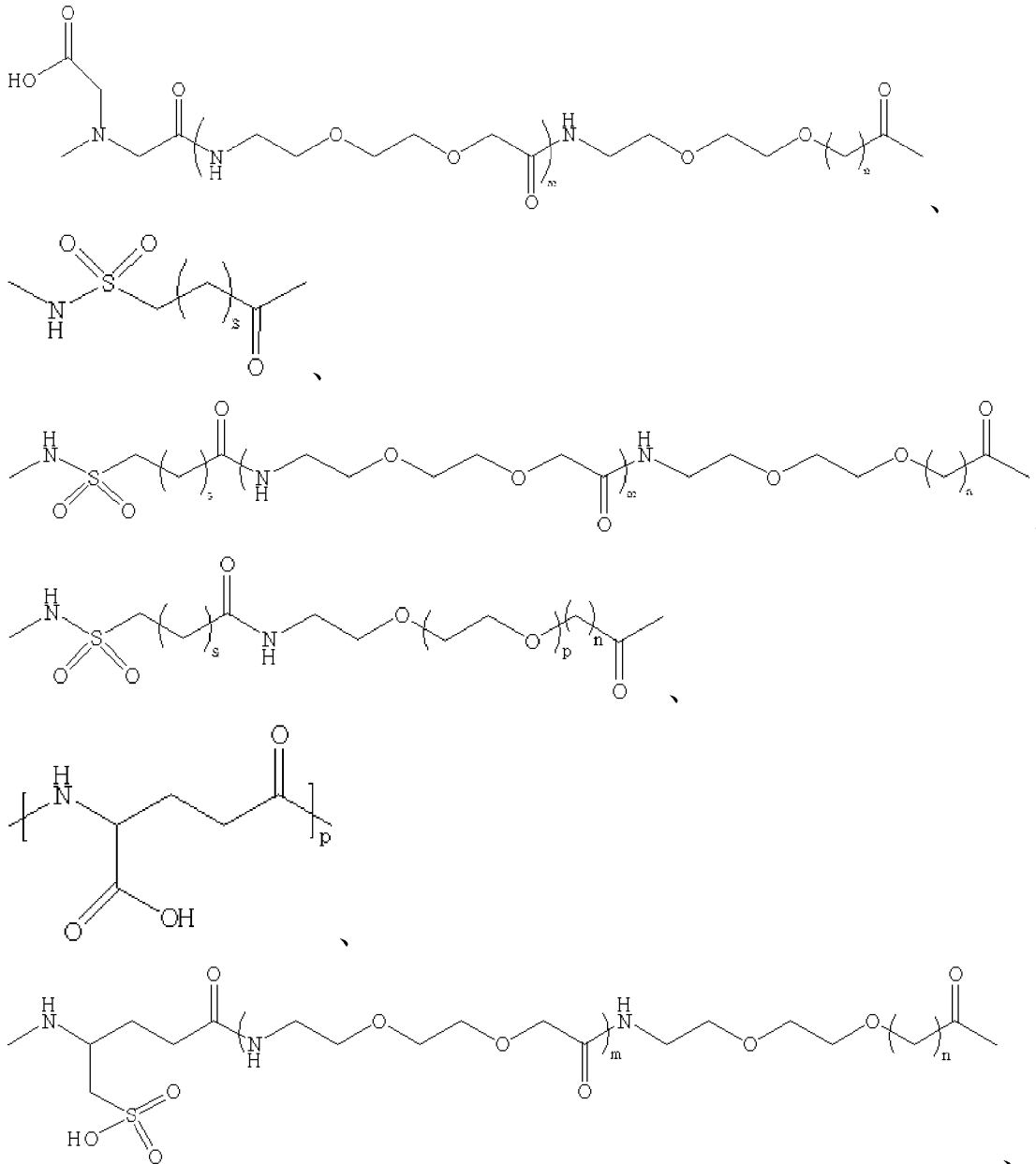
其中 x 是 4-38 的整数。

2、根据权利要求 1 所述的衍生物或其药学上可接受的盐, 其中所述延长部分选自:

- 25 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{15}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{17}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{19}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ 、 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{21}\text{CO}-$ 和 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$ 。

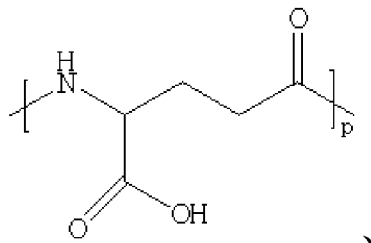
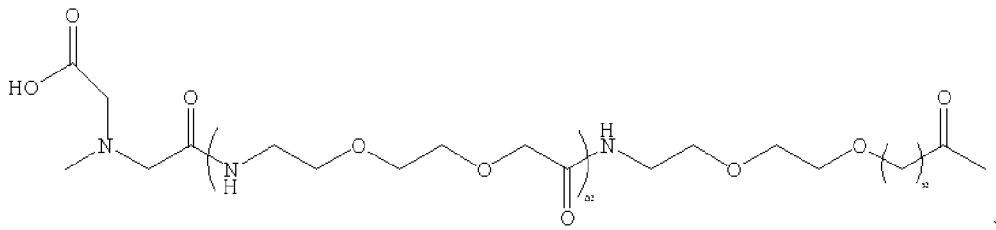
3、根据权利要求1或2所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中所述延长部分通过接头与 GLP-1(7-37)类似物的 K 残基连接。

4、根据权利要求3所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中接头为：

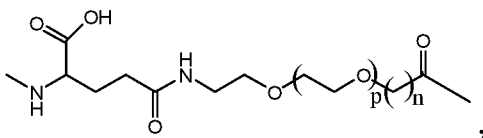
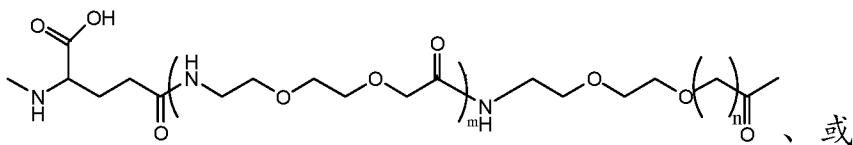


，其中 m 是 0、1、2 或 3； n 是 1、2 或 3； s 是 0-6 的任意整数； p 是 1-8 的任意整数。

优选地，接头为：



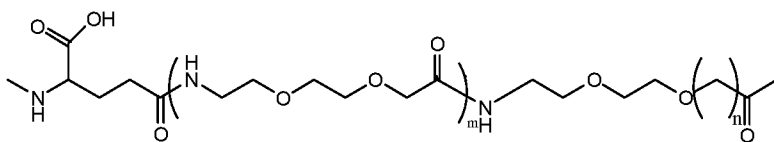
5



10

其中 m 是 1 或 2; n 是 1 或 2; p 是 1-5 的任意整数。

5、根据权利要求4所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中接头为：



或 2。6、权利要求 1-5 任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其为选自如下的任一衍生物或其药学上可接受的盐：N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)(Val⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽(M2)、N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)(Val⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽(M4)、N- ϵ^{34} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)(Val⁸Glu²²Arg²⁶Lys³⁴-GLP-1(7-37))肽(M5)、N- ϵ^{37} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)

基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基)(Val⁸Glu²²Arg^{26,34}Lys³⁷-GLP-1(7-37))肽(M7)、N-ε²³-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Ile⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M9) \

5 N-ε³⁰-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Thr⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M13) \

10 基)(Ile⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M14)。

7、制备权利要求 1-6 中任意一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐的方法，包括：

(1) 将溶解有上述权利要求任一项中所述的 GLP-1 类似物的溶液与溶解有上述权利要求任一项所述的延长部分的溶液混合；

15 (2) 调节 pH 至 4-5 终止反应，静置，至沉淀产生，取沉淀；和

(3) 向沉淀中加入 TFA，调节 pH 至 7.5-8.5 终止反应。

8、权利要求 7 的方法，还包括在与溶解有上述权利要求任一项所述延长部分的溶液混合前，向溶解有 GLP-1 类似物的溶液中加入三乙胺。

9、权利要求 7 或 8 的方法，其中上述权利要求任一项所述的延长部分

20 的溶液是乙腈溶解的。

10、一种药物组合物，其包括权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料。

11、权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防和/或治疗糖尿病（包括 I 型糖尿病和 II 型糖尿病）或糖尿病

25 并发症的药物中的用途。

12、权利要求 11 的用途，其中所述糖尿病并发症为糖尿病性肾病。

13、权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐在制备减低血糖、提高糖耐量、减少胰岛 β-细胞凋亡、增强胰岛 β-细胞功能、增加胰岛 β-细胞数量和/或恢复胰岛 β-细胞的葡萄糖敏感性的药物中

30 的用途。

14、权利要求 13 的用途，其中所述降低血糖包括降低空腹血糖和/或餐后血糖。

15、一种预防和/或治疗糖尿病（包括 I 型糖尿病和 II 型糖尿病）或糖尿病并发症的方法，包括给药受试者预防或治疗有效量的权利要求 1-6 中任意一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐。

16、权利要求 15 的方法，其中所述糖尿病并发症为糖尿病性肾病。

5 17、一种降低血糖、提高糖耐量、减少胰岛 β -细胞凋亡、增强胰岛 β -细胞功能、增加胰岛 β -细胞数量和/或恢复胰岛 β -细胞的葡萄糖敏感性的方法，包括给药受试者治疗有效量的权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐。

10 18、权利要求 17 的用途，其中所述降低血糖包括降低空腹血糖和/或餐后血糖。

19、一种 GLP-1(7-37)类似物，包含由如下氨基酸序列组成的多肽：

H X₈EGTFTSDVSSX₁₉LEEX₂₃AARX₂₇FIX₃₀WLVX₃₄GX₃₆X₃₇

15 其中 X₈ 选自 V、T、I、L、G 或 S，X₁₉ 为 Y 或 K，X₂₃ 为 Q 或 K，X₂₇ 为 E 或 K，X₃₀ 为 A 或 K，X₃₄ 为 R 或 K，X₃₆ 为 R 或 K，X₃₇ 为 G 或 K，并且，在 X₁₉、X₂₃、X₂₆、X₂₇、X₃₀、X₃₄、X₃₆ 或 X₃₇ 中只有一个是 K。

20、包含权利要求 19 的类似物的药物组合物。

21、权利要求 19 的类似物在制备预防或治疗糖尿病、糖尿病并发症的药物中的用途。

20 22、一种制品，包括其中装有权利要求 10 或权利要求 20 的药物组合物的容器和包装插页，其中该包装插页载有所述药物组合物的使用说明。

23、权利要求 22 的制品，还包含装有一种或多种其它药物的容器。

24、权利要求 23 的制品，其中所述一种或多种其它药物为治疗糖尿病或糖尿病并发症的其它药物。

25 “空腹血糖”指受试者（例如人）空腹时测定的血糖值，例如隔夜空腹、禁食（未进任何食物，饮水除外）至少 6 个小时，例如 6-8 小时、8~10 小时后检测的血糖值。

“餐后血糖”指进餐之后测定的血糖值，例如进餐后 15 分钟-2 小时、30 分钟-2 小时、1 小时-2 小时、2 小时测定的血糖值。

30 本发明一个方面涉及 GLP-1(7-37)类似物的制备方法，包括在允许肽表达的条件下，在宿主细胞中表达编码该多肽的 DNA 序列，然后回收产生的肽。

用来培养细胞的培养基可以是用于培养该宿主细胞的任何常规培养基，如基本培养基或含有适宜添加物的复合培养基。可以通过市售得到适宜的培养基，或根据已公开的制法制备适宜的培养基。然后通过常规方法从培养基中回收由所述宿主细胞产生的多肽，例如用盐如硫酸铵沉淀上清液或滤液中的蛋白质成分，根据目的肽的种类而选用各种层析方法如例子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等进行进一步纯化。

可以将上述编码 DNA 序列插入任何适当的载体中。通常，载体的选择常常取决于该载体将要被引入的宿主细胞，因此，载体可以是一种自主复制型载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制不依赖于染色体复制，如质粒。或者，载体可以是这样一种类型，当将其引入宿主细胞时，它将整合到宿主细胞基因组中，并与它所整合入的染色体一起复制。

载体优选是一种表达载体，其内编码所述肽的 DNA 序列与该 DNA 转录所需的其它区段（如启动子）有效相连。本领域熟知适合于在多种宿主细胞中指导编码本发明肽的 DNA 进行转录的启动子例子，参见例如 Sambrook, J, Fritsch, EF 和 Maniatis, T, 分子克隆：实验操作指南，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 纽约，1989 中所述。

载体还可以含有选择标记，如可以是这样的一种基因，其基因产物将弥补宿主细胞内的一个缺陷，或者能赋予对药物如氨苄青霉素、阿霉素、四环素、氯霉素、新霉素、链霉素或氨甲喋呤等的抗性。

为将本发明表达的肽引入宿主细胞的分泌途径，可以在重组载体中提供分泌信号序列（也称之为前导序列）。分泌信号序列以正确读框与编码该肽的 DNA 序列连接。分泌信号序列通常位于编码该肽的 DNA 序列的 5' 侧。分泌信号序列可以是正常地与该肽连接的分泌信号序列，或可以源于编码另一种分泌蛋白质的基因。

用于分别连接编码本发明肽的 DNA 序列，启动子和可选择的终止子和/或分泌信号肽序列，并将其插入到适宜的含有复制所必需的信息的载体中的方法，对本领域的技术人员是已知的。

将导入 DNA 序列或重组载体的宿主细胞可以是能够产生本发明肽的任何细胞，包括细菌、酵母、真菌和高等真核生物细胞。本领域技术人员熟知并使用的适宜的宿主细胞的例子包括但不限于：大肠杆菌、酿酒酵母、或哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系。

本发明涉及包含上述 GLP-1(7-37)类似物的药物或药物组合物，还涉及该类似物在制备药物中的用途，例如在制备预防或治疗糖尿病（优选 2 型糖尿病）、糖尿病并发症（例如糖尿病肾病，糖尿病心脏病）、降低血糖或提高糖耐量的药物中的用途。

- 5 另一方面，本发明也涉及通过给药受试者上述 GLP-1(7-37)类似物或上述 GLP-1(7-37)类似物的衍生物预防或治疗糖尿病（例如 I 型和 II 型糖尿病）、糖尿病并发症（例如糖尿病血管病变、糖尿病神经病变、糖尿病眼病、糖尿病肾病，糖尿病心脏病）、降低血糖（例如空腹血糖和餐后血糖）或提高糖耐量的方法。另一方面，本发明也涉及上述 GLP-1(7-37)类似物或上述
- 10 GLP-1(7-37)类似物的衍生物在制备预防或治疗糖尿病（例如 I 型和 II 型糖尿病）、糖尿病并发症（例如糖尿病血管病变、糖尿病神经病变、糖尿病眼病、糖尿病肾病，糖尿病心脏病）、降低血糖或提高糖耐量的药物中的用途。

另一方面，本发明涉及包含上述 GLP-1(7-37)类似物的药物组合物，制品或试剂盒。

- 15 本发明还涉及包含上述 GLP-1(7-37)类似物的衍生物的药物组合物，制品或试剂盒。

- 本发明所述的药物组合物除包含活性成分 GLP-1(7-37)类似物或 GLP-1(7-37)类似物的衍生物或其盐外，还包含药学上可接受的辅料。本领域技术人员熟知药学上可接受的辅料，例如无毒的填充剂、稳定剂、稀释剂、
- 20 载体、溶剂或其他制剂辅料。例如，稀释剂、赋形剂，如微晶纤维素、甘露醇等；填充剂，如淀粉、蔗糖等；粘合剂，如淀粉、纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和/或聚乙烯吡咯烷酮；崩解剂，如碳酸钙和/或碳酸氢钠；吸收促进剂，如季铵化合物；表面活性剂，如十六烷醇；载体、溶剂，如水、生理盐水、高岭土、皂粘土等；润滑剂，如滑石粉、硬脂酸钙/镁、聚乙二醇等。另外，
- 25 本发明的药物组合物优选为注射剂。

本发明还涉及一种减少胰岛 β -细胞凋亡、增强胰岛 β -细胞功能、增加胰岛 β -细胞数量和/或恢复胰岛 β -细胞的葡萄糖敏感性的方法，包括给药有需要的受试者有效量的上述类似物、衍生物或药物、药物组合物。

- 本发明还涉及上述类似物、衍生物或药物、药物组合物在制备减少胰岛
- 30 β -细胞凋亡、增强胰岛 β -细胞功能、增加胰岛 β -细胞数量和/或恢复胰岛 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物中的用途。

在本发明中，GLP-1(7-37)多肽、GLP-1(7-37)多肽类似物、GLP-1(7-37)类似物可以互换使用，表示含有氨基酸序列：H X₈EGTFTSDVSSX₁₉LEEX₂₃AARX₂₇FIX₃₀WLVX₃₄GX₃₆X₃₇的多肽，其中 X₈选自 V、T、I、L、G 或 S，X₁₉为 Y 或 K，X₂₃为 Q 或 K，X₂₇为 E 或 K，
5 X₃₀为 A 或 K，X₃₄为 R 或 K，X₃₆为 R 或 K，X₃₇为 G 或 K。该 GLP-1(7-37)多肽类似物通过与延长部分连接，形成该 GLP-1(7-37)多肽类似物的衍生物。具体地，本发明涉及 GLP-1(7-37)类似物的酰化衍生物。该酰化衍生物不但具有显著的治疗效果，而且与现有公认的最好的药物索玛鲁肽相比，其体内活性持续时间可提高 1 倍左右，意味着在人体内可实现至少每周间隔给药、
10 甚至每两周间隔或更长时间间隔给药的给药频率。

本发明 GLP-1(7-37)类似物的衍生物、GLP-1(7-37)类似物的酰化衍生物，GLP-1(7-37)衍生物、GLP-1 衍生物可以互换使用。

另一方面，本发明还涉及制备上述衍生物或其药学上可接受的盐的方法，包括：

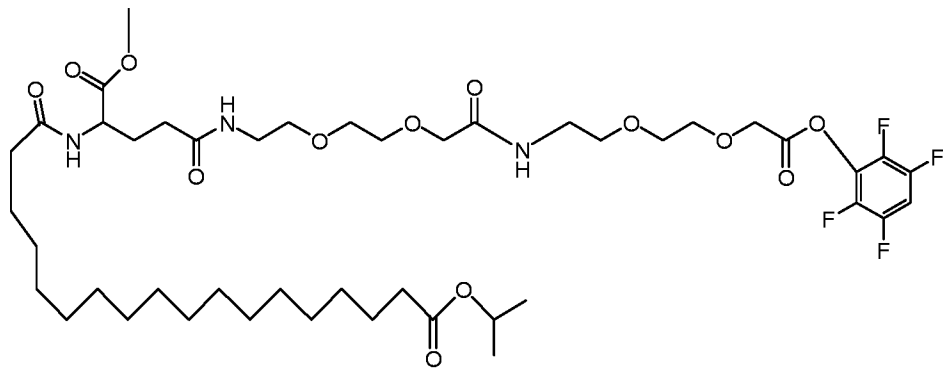
- 15 (1) 将溶解有上述的 GLP-1 类似物的溶液与溶解有延长部分（例如脂肪酸）的溶液混合；
(2) 调节 pH 至 4-5 终止反应，静置，至沉淀产生，取沉淀；和
(3) 向沉淀中加入 TFA，调节 pH 至 7.5-8.5 终止反应。

在一个优选实施方案中，上述方法包括向 GLP-1 类似物的溶液中加入三
20 乙胺。

在一个优选实施方案中，上述延长部分（例如脂肪酸）是乙腈溶解的溶液。

本发明例示性的制备方法包括 (1) 提供 GLP-1(7-37)类似物溶液，调整 pH 至 9-12；

- 25 (2) 然后向步骤 (1) 获得的溶液中加入三乙胺；
(3) 称取不低于该 GLP-1 类似物 2 倍量（摩尔比）的如下结构的脂肪酸，优选为不低于 3 倍量的 GLP-1 类似物，溶于乙腈中；



(4) 将步骤 (2) 获得的 GLP-1 类似物溶液与步骤 (3) 获得的脂肪酸溶液混合，低温静置，例如一小时；

(5) 调节 pH 至 4-5 终止反应，低温静置酸沉，收取沉淀；

5 (6) 向步骤 (5) 获得的酸沉样品中加入 TFA 至多肽终浓度 5-15 mg/ml，静置 0.5-2 小时，向反应液中滴入碱性溶液，例如 NaOH，调节 pH 至 7.5-8.5 终止反应；

(7) 分离纯化所得产物。

10 本发明涉及包含 GLP-1(7-37)类似物的衍生物或其药学上可接受的盐的药物组合物的制剂。在一些实施方案中，本发明的包含 GLP-1(7-37)类似物的衍生物或其药学上可接受的盐以 0.1mg/ml 至 25mg/ml 的浓度存在，优选以 0.1mg/ml 至 10.0mg/ml 的浓度存在。在优选实施方案中，所述药物组合物具有 3.0 至 9.0 的 pH。在优选实施方案中，所述药物组合物可进一步包含缓冲系统、防腐剂、表面张力剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在 15 一些实施方案中，本发明所述的药物或制剂是含水药物或制剂，例如，他们通常可以是溶液或悬浮液。在本发明的具体实施方案中，所述的药物或制剂是稳定的含水溶液。在本发明的另一些具体实施方案中，所述药物或制剂是一种冻干制剂，在使用前将溶剂和/或稀释液加入其中。

20 本发明还涉及包含上述药物组合物、制剂、药物的药盒或试剂盒。在该药盒或试剂盒中，除包含上述药物或制剂外，还包括可以与该药物组合物、制剂、药物联合使用的其它药物、药物化合物或组合物，例如，所述其它药物、药物化合物或组合物可以选自抗糖尿病药物、用于治疗 and/或预防由糖尿病引发或与其相关的并发症的药物。这些药物的实例包括：胰岛素、磺脲类、双胍、氯茴苯酸类、葡萄糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、涉及刺激糖异生和/或糖原分解的肝脏酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、NPY 拮抗剂、PYY 25 激动剂、PYY2 激动剂、PYY4 激动剂、TNF 激动剂、促皮质素释放因子激

动剂、5HT、蛙皮素激动剂、神经节肽拮抗剂、生长激素、促甲状腺激素释放激素激动剂、TR β 激动剂；组胺 H3 拮抗剂、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、胃抑制性多肽激动剂或拮抗剂、胃泌素和胃泌素类似物等。在一些实施方案中，本发明所述的药物组合物、制剂、药物与其它的药物、药物化合物或组合物
5 分别放置在不同的容器中。

本发明也涉及一种预防或治疗糖尿病（例如 I 型和 II 型糖尿病）、糖尿病并发症（例如糖尿病血管病变、糖尿病神经病变、糖尿病眼病、糖尿病肾病，糖尿病心脏病）、降低血糖（例如空腹血糖和餐后血糖）、的方法，包括给药有需要的受试者上述类似物、衍生物或药物、药物组合物，其中所述
10 类似物、衍生物或药物、药物组合物与其它药物、药物化合物或组合物联合使用，例如，所述其它药物、药物化合物或组合物可以选自抗糖尿病药物、用于治疗 and/or 预防由糖尿病引发或与其相关的并发症的药物。这些药物的实例包括：胰岛素、磺脲类、双胍、氯茴苯酸类、葡萄糖苷酶抑制剂、胰高血糖素拮抗剂、涉及刺激糖异生和/或糖原分解的肝脏酶的抑制剂、葡萄糖摄取
15 调节剂；CART 激动剂、NPY 拮抗剂、PYY 激动剂、PYY2 激动剂、PYY4 激动剂、TNF 激动剂、促皮质素释放因子激动剂、5HT、蛙皮素激动剂、神经节肽拮抗剂、生长激素、促甲状腺激素释放激素激动剂、TR β 激动剂；组胺 H3 拮抗剂、脂肪酶/淀粉酶抑制剂、胃抑制性多肽激动剂或拮抗剂、胃泌素和胃泌素类似物等。在优选实施方案中，所述糖尿病为 2 型糖尿病或糖尿病肾病。
20 病肾病。

本发明所述的“糖尿病并发症”是指由糖尿病过程中血糖控制不良导致的身体其他器官或组织的损害或功能障碍性疾病，其中包括肝脏、肾脏、心脏、视网膜、神经系统的损害或功能障碍等。糖尿病的并发症可分为五个方面：1.心血管病变：包括心脏和大血管上的微血管病变、心肌病变、心脏自主神经病变，引起糖尿病患者死亡的首要病因。2.脑血管病变：是指由糖尿病所引起的颅内大血管和微血管病变，主要表现为脑动脉硬化、缺血性脑血管病、脑出血、脑萎缩等。3.肾血管病变：主要表现为糖尿病肾病，是糖尿病患者最重要的合并症之一。4.下肢动脉病变：主要表现为糖尿病足。5.眼底微血管病变：主要表现为糖尿病性视网膜病变。
25 微血管病变：主要表现为糖尿病性视网膜病变。

30 本发明通过下面实施例来进一步阐述，然而，所述的实施例不应理解为限制本专利的保护范围，在前面描述和下列实施例中公开的特征（个别地和

它们的任何组合)，可以是用于以基本不同形式实现本发明的材料，他们可以任意组合。另外，本发明引用了公开文献，这些文献是为了更清楚地描述本发明，它们的全文内容均纳入本文进行参考，就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。

5

附图简述

图 1 显示不同酰化的 GLP-1 衍生物分子对 II 型糖尿病 db/db 小鼠的降糖效果。

图 2 显示不同剂量的 M0、M4 和索玛鲁肽对糖尿病小鼠空腹血糖影响的趋势图。

图 3 显示不同剂量的 M0、M4 和索玛鲁肽对糖尿病小鼠随机血糖的影响。

图 4 显示不同剂量的 M0、M4 和索玛鲁肽对糖尿病小鼠血糖曲线下面积的影响。

图 5 显示 M4 及索玛鲁肽分子抗胃蛋白酶降解的趋势图。

图 6 显示 M4 及索玛鲁肽分子抗胰蛋白酶降解的趋势图。

实施例

以下本文将通过具体的实施例来描述发明。如未特别指明之处，可根据本领域技术人员所熟悉的《分子克隆实验指南》、《细胞实验指南》等实验手册以及 CFDA 的试验指引等所列方法来实施。其中，所用的试剂原料均为市售品，可以通过公开渠道购买获得。

实施例 1 GLP-1 类似物表达质粒的构建

构建 Val⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)的 DNA

将 6-His 标签、SUMO 标签和 Val⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)编码基因序列 (SEQ ID NO: 7) 依次串联融合，并使用化学合成的方式获得基因片段 (SEQ ID NO: 18)。通过 BamHI 和 XhoI 位点，将上述片段插入原核表达质粒 pET-24(+)中并测序验证。得到的用于转化测定的表达质粒，称作 pET-24(+)-His-SUMO-Val⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)。

依据上述方法，依次构建 Val⁸Glu²²Lys²⁶Arg³⁴-GLP-1(7-37)(编码基因为 SEQ ID NO: 3)、Val⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)(编码基因为 SEQ ID NO: 11)、Val⁸Glu²²Lys¹⁹Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO: 5)、

- Val⁸Glu²²Lys²⁷Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO: 9)、
 Val⁸Glu²²Lys³⁴Arg²⁶-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO: 13)、
 Val⁸Glu²²Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:15)、
 Val⁸Glu²²Arg^{26,34}Lys³⁷-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:17)、
 5 Thr⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:20)、
 Ile⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:22)、
 Leu⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:24)、
 Gly⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:26)、
 Ser⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:28)、
 10 Thr⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:30)、
 Ile⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:32)、
 Leu⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:34)、
 Gly⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:36)、
 Ser⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37) (编码基因为 SEQ ID NO:38) 的相应表
 15 达质粒。

实施例 2 融合蛋白表达

- 使用实施例 1 中所述 DNA 构建进行融合蛋白的表达, 通过表达细胞 BL21 (TrabsGenBiotech., catalog # CD601) 获得目的蛋白。将 BL21 感受态细胞 50μl 置于冰浴上融化, 加入目的 DNA, 轻轻摇匀, 并在冰浴中放置 30
 20 分钟。继而 42℃ 水浴热激 30 秒, 然后快速将离心管转移到冰浴中放置 2 分钟, 该过程不要摇动离心管。向离心管中加入 500μl 无菌的 LB 培养基 (不含抗生素), 混匀后置于 37℃, 180rpm 培养 1 小时, 使细菌复苏。吸取 200μl 已转化的感受态细胞加到含有卡那霉素抗性的 LB 琼脂培养基平板上, 将细胞均匀涂开。将平板置于 37℃ 至液体被吸收, 倒置平板, 37℃ 过夜培养。次
 25 日, 使用接种环挑取转化皿中的单克隆菌落, 并接种于 15ml 的无菌 LB 培养基 (含抗生素), 30℃ 过夜培养。

实施例 3 重组 GLP-1 类似物的发酵

- 向 50ml 的 LB 培养基中加入 50μl 菌液 (表达 GLP-1 菌液), 同时加入 50μl 卡那霉素, 混匀后放 30℃ 恒温振荡器中, 接种过夜。取过夜接种的菌液 10ml 加入 1000ml 的 LB 培养基中, 同时加入 1000μl 卡那霉素。摇匀后放
 30 于 37℃ 摇床内, 200rpm, 接种 4h 后向培养基中接入终浓度为 0.1mol/L 的

IPTG, 摇匀后放于 30℃摇床内, 180rpm, 过夜诱导表达。将过夜表达的菌液以 13000g 离心 60min。菌体收率约为 4g 菌/L 发酵液, SDS-PAGE 测定目的蛋白表达量约可达 40%。

实施例 4 重组 GLP-1 类似物的纯化

5 称取 100g 细胞浆重悬于 500ml 的 50mM Tris-HCl、pH8.0, 50mM NaCl 中, 用超声波细胞粉碎机中超声 30min, 以使细胞破碎。所述匀浆在 4℃下以 13000g 离心 60min, 离心完成后收集上清即为 Ni 柱层析样品。

将所得上清液经事先用 50mM Tris-HCl、pH8.0, 500mM NaCl, 10mM 咪唑 (平衡液 1) 平衡过的 Chelating Sepharose FF 浓缩。平衡液 1 淋洗后, 10 再用 50mM Tris-HCl、pH8.0, 50mM NaCl, 0.3M 咪唑 (洗脱液) 洗脱。经 SDS-PAGE 分析, 由上述纯化过程生成 GLP-1 中间产物纯度高于 70%。

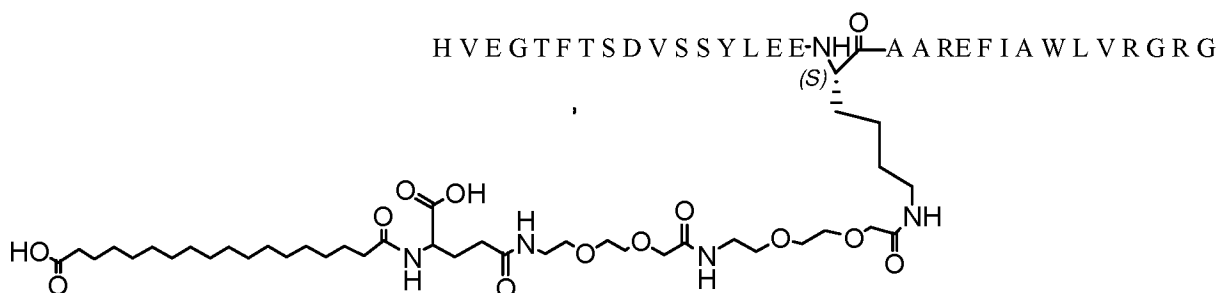
使用 ULP 酶将 Sumo 标签序列切除: 中间产物中加入 20mM PB、pH7.4 缓冲液使其稀释三倍, 4℃条件下按照 ULP 酶: 中间产物为 1:150 加入 ULP 混匀后酶切过夜。经 SDS-PAGE 分析酶切率近 100%。

15 GLP-1 类似物的精纯: 将酶切后所得产物经事先用 20mM Na₂HPO₄, 0.7M NaCl (平衡液 2) 平衡过的东曹 Butyl 550C 介质浓缩。平衡液 2 淋洗后, 再用 20%乙醇洗脱, 经 SDS-PAGE 纯度约为 90%。

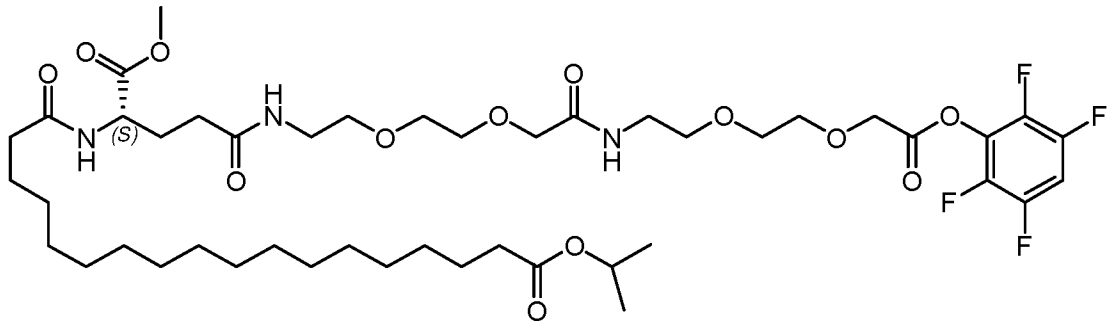
洗脱样品中加入 0.2M Na₂HPO₄ 使其终浓度为 20mM Na₂HPO₄, 用 1M 柠檬酸调节 pH 至 4.8-5.0, 4℃酸沉过夜。SDS-PAGE 检测收率 90%以上。4℃ 20 下以 13000g 离心 30min, 收取沉淀放于 -20℃保存。

实施例 5 GLP-1 类似物的衍生物的制备

如下所示的 GLP-1 类似物的衍生物, N-ε²³-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Val⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (简称 M2) 的制备



1. **脂肪酸修饰**：向上述实施例制备、收集的 Val⁸Glu²²Lys²³Arg²⁶,
³⁴-GLP-1(7-37)沉淀中加水，配制为 4~6mg/ml 溶解液，加入 1M 氢氧化钠调
 整 pH 至 11.0-11.5，摇匀使蛋白完全溶解，HPLC 定量多肽浓度。按多肽与
 脂肪酸（结构如下）摩尔比 1:4 称取脂肪酸粉末溶于乙腈中。向该多肽溶液
 5 中加入体积为千分之二三乙胺，并与脂肪酸溶液混合，将混合液于 4℃ 静
 置一小时。



样品加水稀释 5 倍，用 1M 柠檬酸（或 10% 乙酸）调 pH 至 4.8 终止反
 应，放于 4 度静置酸沉 10min，酸沉后离心 13000g，4℃ 离心 30min，将沉
 10 淀放于 -80℃ 保存。

2. **脂肪酸脱保护与纯化**：向酸沉样品中加入 TFA 至多肽终浓度约
 10mg/ml，震荡使沉淀溶解，置于室温静置脱保护 30min，向反应液中滴入
 4M NaOH 调节 pH 至 7.5-8.5 终止反应。

用制备液相仪（岛津 LC-8A）将终止后反应液按 4ml/min 流速，泵入事
 15 先用 10mM 乙酸铵，20% 乙醇（平衡液 3）平衡过的 UniSil 10-120 C18（购
 自苏州纳微科技有限公司）进行浓缩。平衡液 3 淋洗后，再按 0-100% 洗脱
 液（10mM 乙酸铵，80% 乙醇）梯度洗脱，收集洗脱峰经 RP-HPLC 检测纯
 度约为 90%。

洗脱峰用水稀释 3 倍，酸沉调整 pH 至 4.80，4℃ 酸沉 30min。离心后沉
 20 淀中加入 PBST 缓冲液（pH7.0）复溶后 -80℃ 冻存。

依据上述方法，依次制备 N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2 [4-(17-羧基十七烷酰氨
 基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰
 基]Val⁸Glu²²Lys²⁶Arg³⁴-GLP-1(7-37) (M0) 肽，N-ε³⁰-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-
 羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]
 25 乙氧基)乙酰基](Val⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)) 肽 (M4)、
 N-ε¹⁹-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧
 基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Val⁸Lys¹⁹Glu²²Arg²⁶,

- 34-GLP-1(7-37))肽 (M1)、N- ϵ^{27} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Val⁸Glu²²Lys²⁷Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽(M3)、N- ϵ^{34} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Val⁸Glu²²Arg²⁶Lys³⁴-GLP-1(7-37))肽 (M5)、
- 5 N- ϵ^{36} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Val⁸Glu²²Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37))肽(M6)、N- ϵ^{37} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基]乙酰基](Val⁸Glu²²Arg^{26,34}Lys³⁷-GLP-1(7-37))肽 (M7) ;
- 10 N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Thr⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽(M8)、N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基]乙酰基](Ile⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M9)、
- 15 N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Leu⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M10)、
- 20 N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Gly⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M11)、
- N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Ser⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M12) ;
- 25 N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Thr⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M13)、
- N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Ile⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M14)、
- 30 N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基

基) 乙 氧 基] 乙 酰 氨 基) 乙 氧 基] 乙 氧 基) 乙 酰
基](Leu⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)) 肽 (M15) 、
N-ε³⁰-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧
基) 乙 氧 基] 乙 酰 氨 基) 乙 氧 基] 乙 氧 基) 乙 酰
5 基](Gly⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37)) 肽 (M16) 、
N-ε³⁰-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧
基) 乙 氧 基] 乙 酰 氨 基) 乙 氧 基] 乙 氧 基) 乙 酰
基](Ser⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M17) 。

表 1 GLP-1(7-37)类似物及其相应衍生物对照表

衍生物 简称	GLP-1 类似物简写	GLP-1 类似物氨基酸序列
	GLP-1(7-37)	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEF IAWLVKGRG (SEQ ID NO: 1)
索玛鲁肽 (Aib)	Aib ⁸ Lys ²⁶ Arg ³⁴ -GLP-1(7-37	H-Aib-EGTFTSDVSSYLEGQAA KEFIAWLVRGRG
M0	Val ⁸ Glu ²² Lys ²⁶ Arg ³⁴ -G LP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEF IAWLVRGRG (SEQ ID NO: 2)
M1	Val ⁸ Lys ¹⁹ Glu ²² Arg ²⁶ , ³⁴ -GLP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSKLEEQAAREF IAWLVRGRG (SEQ ID NO:4)
M2	Val ⁸ Glu ²² Lys ²³ Arg ²⁶ , ³⁴ -GLP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEKAAREF IAWLVRGRG (SEQ ID NO: 6)
M3	Val ⁸ Glu ²² Lys ²⁷ Arg ²⁶ , ³⁴ -GLP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEQAARK FIAWLVRGRG (SEQ ID NO: 8)
M4	Val ⁸ Glu ²² Lys ³⁰ Arg ²⁶ , ³⁴ -GLP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAAREF IKWLVRGRG (SEQ ID NO: 10)
M5	Val ⁸ Glu ²² Arg ²⁶ Lys ³⁴ -G LP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAAREF IAWLVKGRG (SEQ ID NO:12)
M6	Val ⁸ Glu ²² Arg ²⁶ , ³⁴ Lys ³⁶ -GLP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAAREF IAWLVRGKG (SEQ ID NO: 14)
M7	Val ⁸ Glu ²² Arg ²⁶ , ³⁴ Lys ³⁷ -GLP-1(7-37)	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAAREF IAWLVRGRK (SEQ ID NO: 16)

M8	Thr ⁸ Glu ²² Lys ²³ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HTEGTFTSDVSSYLEE KA AREF IAWLVRGRG (SEQ ID NO:19)
M9	Ile ⁸ Glu ²² Lys ²³ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HIEGTFTSDVSSYLEE KA AREFI AWLVRGRG (SEQ ID NO:21)
M10	Leu ⁸ Glu ²² Lys ²³ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HLEGTFTSDVSSYLEE KA AREF IAWLVRGRG (SEQ ID NO:23)
M11	Gly ⁸ Glu ²² Lys ²³ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HGEGTFTSDVSSYLEE KA ARE FIAWLVRGRG (SEQ ID NO:25)
M12	Ser ⁸ Glu ²² Lys ²³ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HSEGTFTSDVSSYLEE KA AREF IAWLVRGRG (SEQ ID NO:27)
M13	Thr ⁸ Glu ²² Lys ³⁰ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HTEGTFTSDVSSYLEE QA AREF IKWLVRGRG (SEQ ID NO:29)
M14	Ile ⁸ Glu ²² Lys ³⁰ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HIEGTFTSDVSSYLEE QA AREFI K WLVRGRG (SEQ ID NO:31)
M15	Leu ⁸ Glu ²² Lys ³⁰ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HLEGTFTSDVSSYLEE QA AREF IKWLVRGRG (SEQ ID NO:33)
M16	Gly ⁸ Glu ²² Lys ³⁰ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HGEGTFTSDVSSYLEE QA AREF IKWLVRGRG (SEQ ID NO:35)
M17	Ser ⁸ Glu ²² Lys ³⁰ Arg ²⁶ , 34-GLP-1(7-37)	HSEGTFTSDVSSYLEE QA AREF IKWLVRGRG (SEQ ID NO:37)

实施例6 RIN-m5F 细胞中 GLP-1 类似物的衍生物体外活性测定

选取培养状态良好的 RIN-m5F 细胞。收集细胞，计数，用 RPMI1640 基础培养液配成 1×10^5 个细胞/ml 的细胞悬液。接种细胞悬液于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μ l，37℃、5%CO₂ 条件下培养过夜。利用 cAMP 检测试剂盒 (Promega) 检测 GLP-1 类似物的衍生物的体外活性：配制测定培养液稀

5 释样品 (Aib、M0、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7) 至 300ng/ml，之后在 96 孔板中进行 3 倍梯度稀释，共 8 个浓度，每个稀释度做 2 个复孔，其中 M0、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7 如上所述制备，Aib 为

N- ϵ ²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2 [4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰氨基]

10 乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙氧基][Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)

肽（参见 CN101133082B 实施例 4），商品名为索玛鲁肽，依据专利 CN101133082B 所公开的方法制备。

取出已制备好的细胞板，弃掉培养基，滤纸上吸干。将样品溶液对应移入细胞板中，40 μ l/孔。于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下开盖处理 15min。从培养箱内取出细胞培养板，在各孔加入 10 μ l CD 溶液（cAMP 检测试剂盒（Promega）），将细胞板放在 22 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C、500rpm 水平振荡放置 20min。各孔加入 50 μ l KG 溶液（cAMP 检测试剂盒（Promega）），22 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C、500rpm 水平振荡避光放置 10min。用 Molecular Devices SpectraMax L 化学发光仪读取化学发光数值，30min 完成检测。利用 softmax Pro software 软件中的四参数回归计算样品 EC50。

表 2 体外活性实验结果

样品	Aib	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
EC50	2.437	10.68	5.386	1.996	5.387	2.322	3.043	7.650	3.208

RIN-m5F 细胞体外药效学表明，索玛鲁肽、M2、M4、M5 和 M7 的体外活性相当，总体上略高于 M0、M1、M3 和 M6。

15 实施例 7 HEK293/CRE-Luc/GLP1R 细胞中 GLP-1 类似物的衍生物体外活性测定

根据 GLP-1 可与细胞膜上的受体结合，构建了 HEK293/CRE-Luc/GLP1R 细胞系，通过一系列信号转导，激活 cAMP 反应元件(CRE)，启动下游荧光素酶的表达，表达量与 GLP-1 的生物学活性成正相关，加入荧光素酶底物后，进行化学发光检测测定其发光强度，以此测定 GLP-1 生物学活性。

20 实验材料

96 孔细胞培养板（白色不透明）、DMEM 培养基（GIBCO）、0.05% TRYPSIN-EDTA（GIBCO）、胎牛血清（GIBCO）、G418、潮霉素 B、Bright-GloTM Luciferase Assay System 试剂盒（Promega）、HEK293/CRE-luc/GLP1R 细胞。

25 实验操作

（1）细胞制备：细胞培养至生长状态旺盛，且足够量。弃去培养瓶中的培养液，加入 3ml Versene 液摇洗 1 次，加入 0.05% TRYPSIN-EDTA 消化液 2ml，盖上瓶盖平放静置 1 分钟，然后加入 6ml 测定培养液终止消化，

1000r/min 离心 3min 后, 倒掉上清, 用 5ml 测定培养基重悬细胞并用血球计数板计数。用 DMEM 测定培养液调整细胞密度到合适范围后, 待用。

(2) 样品制备: 将表 1 不同 GLP-1 类似物的衍生物用测定培养液稀释至 20ng/ml, 之后在 96 孔板中梯度稀释 8 个浓度, 并用测定培养液代替样品
5 作为细胞空白对照, 每个稀释浓度做 2 个复孔。

(3) 加样培养: 将制备好的对照品和供试品溶液移入 96 孔细胞培养板(白板)中, 每孔加入 50 μ l, 再加入配制好的细胞悬液, 每孔加入 50 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养一定时间。

(4) 化学发光检测: 加入底物, 取出 96 孔细胞培养板, 每孔加入 100 μ l
10 Bright Glo 试剂, 避光放置 3 min。

(5) 读数: 用化学发光酶标仪 SpectraMax L 进行测定, 30min 内读板, 记录测定结果。

表 3 HEK293/CRE-Luc/GLP1R 细胞体外活性实验结果

实验板 1		实验板 2		实验板 3	
样品	EC50	样品	EC50	样品	EC50
索玛鲁肽	0.14	索玛鲁肽	0.138	索玛鲁肽	0.111
利拉鲁肽	0.206	利拉鲁肽	0.211	利拉鲁肽	0.142
M2	0.134	M4	0.184	M4	0.137
M9	0.177	M13	0.454	M16	0.13
M11	0.183	M14	0.232	M17	0.15

HEK293/CRE-Luc/GLP1R 细胞药效学表明, 索玛鲁肽、M2、M4、M9、
15 M11、M14、M16 和 M17 的体外活性相当, 总体上略高于 M13。

实施例 8 GLP-1 类似物的脂肪酸修饰的衍生物在正常小鼠体内的降糖研究

选用 28 只周龄 4~6 周的健康 CD-1 雌性小鼠, 分为 4 组, 分别皮下注射 M2、M4、M0 和索玛鲁肽 (Aib), 剂量分别为 0.15mg/kg 体重。按照给药
20 前, 给药后 6h、1 天、2 天、3 天、4 天的时间间隔灌胃 20%葡萄糖, 剂量为 2g/kg 体重, 给糖前禁食 6h, 并在给糖后 0、0.5、1、2h 分别尾尖取血并使用罗氏血糖试纸实时检测血糖值, 并计算出 0~120 分钟内的血糖 AUC (血糖~时间曲线下面积), 算出血糖抑制率 (表 4)。

$$\text{血糖抑制率} = \frac{\text{给药前小鼠血糖 AUC} - \text{给药后小鼠血糖 AUC}}{\text{给药前小鼠血糖 AUC}} \times 100\%$$

表4 正常小鼠体内降糖效果比较

		6h	30h	54h	78h	102h
索玛鲁肽 0.15mg/kg	抑制率	35.95%	30.87%	21.00%	1.68%	
	P	0.0000	0.0000	0.0010	0.7728	
M2 0.15mg/kg	抑制率	34.29%	29.51%	27.23%	21.97%	10.15%
	P	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0408
M4 0.15mg/kg	抑制率	36.11%	34.19%	31.51%	24.82%	15.00%
	P	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0064
M0 0.15mg/kg	抑制率	38.47%	33.79%	25.18%	13.43%	-1.05%
	P	0.0000	0.0000	0.0002	0.0180	0.7909

P 值：与给药前血糖比较

从表4中可以看出,索玛鲁肽在正常小鼠体内的降糖活性持续大约2天,
5 M0 在正常小鼠体内的降糖活性持续大约3天,而M2及M4在正常小鼠体内的降糖活性在第4天仍然表现出明显活性,体内维持持续降糖活性的时间明显长于索玛鲁肽或M0,并且在给药第3天后的各个时间点,M2及M4的降糖效果也都明显强于索玛鲁肽或M0。

10 选用28只周龄4~6周的健康CD-1雌性小鼠,分为4组,分别皮下注射M4、M5、M7和M0,剂量分别为0.15mg/kg体重。按照给药前,给药后6h、1天、2天、3天、4天的时间间隔灌胃20%葡萄糖,剂量为2g/kg体重,灌胃20%葡萄糖前禁食6h,并在给糖后0、0.5、1、2h分别尾尖取血并使用罗氏血糖试纸实时检测血糖值,并计算出0~120分钟内的血糖AUC(血糖~时间曲线下面积),算出血糖抑制率(表5)。

15
$$\text{血糖抑制率} = \frac{\text{给药前小鼠血糖 AUC} - \text{给药后小鼠血糖 AUC}}{\text{给药前小鼠血糖 AUC}} \times 100\%$$

表5 正常小鼠体内降糖效果比较

		6h	30h	54h	78h	102h
M0	抑制率	26.71%	33.57%	17.32%	8.97%	-12.89%

0.15mg/kg	<i>P</i>	0.0018	0.0004	0.0210	0.2329	0.2792
M4 0.15mg/kg	抑制率	26.26%	32.92%	22.22%	24.07%	16.55%
	<i>P</i>	0.0045	0.0004	0.0066	0.0049	0.0706
M5 0.15mg/kg	抑制率	29.59%	39.47%	30.11%	27.07%	15.38%
	<i>P</i>	0.0041	0.0006	0.0046	0.0156	0.1144
M7 0.15mg/kg	抑制率	27.22%	38.82%	22.56%	22.48%	11.60%
	<i>P</i>	0.0049	0.0006	0.0142	0.0084	0.1389

从表 4 和表 5 结果看, M2、M4 效果优于 M0 及索玛鲁肽, M2、M4、M5、M7 之间效果相当, 无显著差异。

实施例 9 使用 ICR 小鼠的降糖效果研究

ICR 小鼠 OGTT 试验: 选用 30 只周龄 4~6 周的 ICR 小鼠, 分为 6 组, 5 只/组, 分别皮下注射 M0、索玛鲁肽、M2、M4、M5 和 M7, 剂量分别为 0.15mg/kg 体重, 单次给药。按照 4h、1d、2d、3d、4d、5d 的时间, 每天灌胃 20%葡萄糖, 剂量为 2g/kg 体重, 给糖前禁食 6h, 并在灌胃 20%葡萄糖后 0、0.5、1、2 小时分别尾尖取血并使用罗氏血糖试纸实时检测血糖值。尾尖取血并使用罗氏血糖试纸实时检测血糖值, 并计算出 0~120 分钟内的血糖 AUC (血糖~时间曲线下面积), 算出血糖抑制率 (表 6)。

$$\text{血糖抑制率} = \frac{\text{给药前小鼠血糖 AUC} - \text{给药后小鼠血糖 AUC}}{\text{给药前小鼠血糖 AUC}} \times 100\%$$

表 6 ICR 小鼠体内降糖效果比较

组别		0h	4h	1d	2d	3d	4d	5d
M0 0.15mg/kg	G-AUC	18.0±1.9	11.1±1.2	11.9±0.7	13.5±1.1	15.6±1.3	18.2±1.1	/
	抑制率	/	38.47%	33.79%	25.18%	13.43%	0.60%	/
索玛鲁肽 0.15mg/kg	G-AUC	18.3±2.1	11.7±1.2	12.7±0.7	14.5±1.1	18.0±1.8	/	/
	抑制率	/	35.95%	30.87%	21.00%	1.68%	/	/
M2 0.15mg/kg	G-AUC	17.8±1.9	11.7±0.6	12.5±0.6	13.0±0.7	13.9±0.6	16.0±1.0	18.3±0.6
	抑制率	/	34.29%	29.51%	27.23%	21.97%	12.61%	0.08%
M4	G-AUC	18.0±1.8	11.5±1.0	11.8±0.9	12.3±0.9	13.5±0.9	15.3±1.1	17.3±1.0

0.15mg/kg	抑制率	/	36.11%	34.19%	31.51%	24.82%	16.39%	5.68%
M5	G-AUC	16.3±2.5	11.5±1.0	9.9±0.7	11.4±1.3	11.9±2.0	13.8±1.9	14.4±2.2
0.15mg/kg	抑制率	/	29.59%	39.47%	30.11%	27.07%	15.38%	11.66%
M7	G-AUC	16.3±2.7	11.8±1.4	10.0±1.6	12.6±1.5	12.6±0.7	14.4±1.1	15.2±1.0
0.15mg/kg	抑制率	/	27.22%	38.82%	22.56%	22.48%	11.60%	6.76%

从表 6 结果可以看出，降糖维持作用：M4、M5、M2、M7 的降糖作用均可维持至少 4 天，远优于 M0(仅维持 3 天)和索玛鲁肽(仅维持 2 天)，均有统计学意义。

实施例 10 对 II 型糖尿病 db/db 小鼠降糖药效试验

- 5 50 只 db/db 小鼠，雌性，8-9 周龄，根据给药前体重、空腹血糖值 (FBG) 平均分为 10 组，5 只/组，分别单次皮下注射溶媒，M2、M4、索玛鲁肽、M9、M11、M13、M14、M16 和 M17，按照 10ml/kg 给药，给药剂量均为 0.05mg/kg，给药时间定为 0h。小鼠每天禁食 6-8h 后检测空腹血糖，给药后每天均检测空腹血糖，直至各受试组动物空腹血糖恢复至给药前结束。给药
- 10 前检测的血糖值称为基础血糖值，设定为 0。

空腹血糖变化值 (Δ : delta) = 给药后血糖值 - 给药前基础血糖值。

结果如图 1 所示，从第 4 天和第 5 天可以看出，M9，M13，M14，降糖效果优于索玛鲁肽，也不低于 M2，而 M11，M16 及 M17 在第 2 天表现出低于索玛鲁肽的降糖效果。

- 15 **实施例 11 不同剂量索玛鲁肽、M0 及 M4 对 II 型糖尿病 db/db 小鼠的降糖效果**

- 35 只 db/db 小鼠，雌性，8-9 周龄，根据给药前体重、血糖曲线下面积 (G-AUC) 平均分为 7 组，5 只/组，分别单次皮下注射溶媒、M4 (0.15、0.015 mg/kg)、索玛鲁肽 (0.15、0.015 mg/kg) 和 M0 (0.15、0.015 mg/kg)，
- 20 按照 10ml/kg 给药。给药时间定为 0h，小鼠每天禁食 7-8h 后，测定空腹血糖和 OGTT (口服糖耐量测定)，之后以 1g/kg 体重的量灌胃 10%葡萄糖，然后于糖负荷后 0、0.5、1、2h 分别尾尖取血实时检测血糖值。给药后每天禁食前测量血糖称随机血糖，直至各受试组动物血糖恢复至给药前水平结

束。给药前测定的基础血糖值、随机血糖值和血糖曲线下面积 (G-AUC) 值均为衡量药效的基数, 均设定为 0。

血糖变化量 (Δ : delta) = 给药后血糖值 - 给药前基础血糖值;

血糖曲线下面积变化量 (Δ : delta) = 给药后血糖曲线下面积 - 给药前血

5 糖曲线下面积。

结果见表 7、8 和 9 及图 2、3 和 4。

表 7 各供试组小鼠空腹血糖变化表

组别	给药剂量 (mg/kg)	给药后平均空腹血糖变化值 (mM)							
		-21h	3h	27h	51h	75h	99h	123h	147h
溶媒对照组	--	0.0	3.8	4.2	6.1	3.4	6.8	8.9	8.7
M4	0.15	0.0	-4.2	-4.5	-3.8	-2.5	-2.0	0.0	1.1
	0.015	0.0	-4.4	-3.3	-3.2	-2.6	0.4	0.6	2.3
索玛鲁肽	0.15	0.0	-3.6	-3.3	-3.0	3.0	3.6	3.0	4.7
	0.015	0.0	-4.2	-2.0	0.0	1.0	3.9	/	/
M0	0.15	0.0	-4.1	-3.0	-3.2	-0.7	1.4	4.4	6.7
	0.015	0.0	-3.5	-2.7	-2.4	2.5	3.9	3.7	9.8

注: “-21h” 代表给药前空腹血糖基数。

表 8 各供试组小鼠平均随机血糖变化表

组别	给药剂量 (mg/kg)	给药后平均随机血糖变化值 (mM)							
		-5h	6h	19h	43h	67h	91h	115h	139h
Vehicle 对照组	--	0	-1.7	-0.8	0.9	1.9	3.7	5.2	4.8
M4	0.15	0	-17.3	-17.5	-17.0	-16.8	-13.5	-1.8	2.8
	0.015	0	-16.6	-15.4	-14.1	-12.9	-9.2	-1.3	3.0
索玛鲁肽	0.15	0	-17.6	-17.5	-16.1	-10.0	0.4	5.2	3.6
	0.015	0	-17.9	-17.5	-14.6	-11.3	-0.6	/	/
M0	0.15	0	-15.7	-14.8	-14.1	-7.1	1.7	4.5	7.8
	0.015	0	-15.7	-13.5	-10.1	-3.1	-0.1	4.9	5.9

注: “-5h” 代表给药前 5h 的随机血糖基数。

表 9 各供试组小鼠血糖曲线下面积 (G-AUC) 变化表

组别	给药剂量 (mg/kg)	给药后平均血糖曲线下面积变化值 (mmol/L·h)							
		-21h	3h	27h	51h	75h	99h	123h	147h
溶媒对照组	--	0	13.1	23.1	24.9	16.6	18.7	22.9	22.2
M4	0.15	0	-9.6	-8.0	-8.6	-7.7	-4.3	2.4	-0.8
	0.015	0	-12.2	-10.6	-8.4	-9.6	-3.9	-0.4	7.5
索玛鲁肽	0.15	0	-10.4	-10.6	-8.4	1.3	7.7	6.8	12.8
	0.015	0	-9.1	-1.3	-2.6	10.0	18.6	/	/
M0	0.15	0	-10.3	-10.2	-7.1	1.5	3.9	9.9	16.0
	0.015	0	-9.0	-5.2	1.1	8.2	7.9	13.0	21.9

注: “-21h” 代表给药前血糖曲线下面积基数。

表 7-9 及图 2-4 的结果表明:

空腹血糖：M4 0.15mg/kg 剂量组在给药后 123h 恢复至给药前基础血糖基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 99h 恢复至给药前基础血糖基数；索玛鲁肽 0.15mg/kg 剂量组在给药后 51h 恢复至给药前基础血糖基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 27h 恢复至给药前基础血糖基数；M0 0.15mg/kg 剂量组在给药后 75h 恢复至给药前基础血糖基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 51h 恢复至给药前基础血糖基数；其中，M4 的 0.015mg/kg 剂量组各检测时间点空腹血糖降低值均不低于索玛鲁肽或 M0 的 0.15kg/kg 剂量组。

随机血糖：M4 0.15mg/kg 剂量组在给药后 115h 恢复至给药前随机血糖基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 115h 恢复至给药前随机血糖基数；索玛鲁肽 0.15mg/kg 剂量组在给药后 67h 恢复至给药前随机血糖基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 67h 恢复至给药前随机血糖基数；M0 0.15mg/kg 剂量组在给药后 67h 恢复至给药前随机血糖基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 67h 恢复至给药前随机血糖基数；其中，M4 的 0.015mg/kg 剂量组各检测时间点对随机血糖的抑制作用均不低于索玛鲁肽或 M0 的 0.15kg/kg 剂量组。

血糖曲线下面积 (G-AUC)：M4 0.15mg/kg 剂量组在给药后 99h 恢复给药前血糖曲线下面积基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 99h 恢复给药前血糖曲线下面积基数；索玛鲁肽 0.15mg/kg 剂量组在给药后 51h 恢复给药前血糖曲线下面积基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 51h 恢复给药前血糖曲线下面积基数；M0 0.15mg/kg 剂量组在给药后 51h 恢复给药前血糖曲线下面积基数，0.015 mg/kg 剂量组在给药后 27h 恢复给药前血糖曲线下面积基数；其中，M4 的 0.015mg/kg 剂量组各检测时间点血糖曲线下面积均不低于索玛鲁肽或 M0 的 0.15kg/kg 剂量组。

这些降糖方面的结果说明，单次皮下注射 M4 或索玛鲁肽或 M0 后，各组均显示出明显的降糖作用，但 M4 降糖效果最好。M4 的 0.015mg/kg 剂量降糖效果相当于索玛鲁肽的 0.15mg/kg 剂量或 M0 的 0.15mg/kg 剂量的降糖效果。

实施例 12 M4 及索玛鲁肽的抗酶降解稳定性研究

胃蛋白酶 (3200-4500U/mg 蛋白，来源于 sigma，货号 P6887)，胰蛋白酶 (约 10000AEE U/mg 蛋白，来源 Sigma，货号 T8003)。

(1) 反应溶液

A: 胃蛋白酶反应缓存液: 配制三个不同 pH (2.6、4.0、7.4) 的 20mM 柠檬酸-磷酸盐缓存液, 并加入 0.005%Tween 20 及 0.001%BSA 作为胃蛋白酶反应缓冲液。

5 B: 胰蛋白酶反应缓存液: 配置三个不同 pH (4.0、6.8、8.0) 的 20mM 柠檬酸-磷酸盐缓存液, 并加入 0.005%Tween 20 及 0.001%BSA 作为胃蛋白酶反应缓冲液。

C: 含胃蛋白酶模拟胃液 (SGF): 取 0.1M 盐酸 5ml, 加入 0.019g 胃蛋白酶使之溶解即得。

10 D: 含有胰蛋白酶的模拟肠液 (SIF): 取磷酸二氢钾 0.0684g, 加水 2.5ml 使其溶解, 加 0.2M 氢氧化钠溶液 0.77ml 和水 5ml, 再加胰蛋白酶 0.1001g 使其溶解后, 测 pH 为 6.82, 再加水稀释至 10ml, 即得。

(2) 样品配置

取 M4 及索玛鲁肽样品, 用 pH7.4 的 PB 缓冲液稀释到 1.33mg/ml, 作为供试品母液。

15 (3) 胃蛋白酶降解实验

分别取适量供试品母液, 用不同 pH 胃蛋白酶反应缓存液稀释至 0.06mg/ml, 将每组反应溶液分成 1ml/管, 总共 7 管, 混匀后置于 37°C 水浴孵育 30min。取出 1 管不加 SGF 作为无酶反应 0 点 (记为 -5min 点), 再取出 6 管分别加入 SGF 混匀, 其中一管立即加入适量体积的 1M NaOH 终止反应, 作为加酶后的 0 点 (记为 0min 点), 其余 5 管继续置于 37°C 反应, 并
20 分别于 5min、10min、20min、35min、50min 各取出一组加适量体积的 1M NaOH 终止反应。所有实验组各管保证终止反应后的总体积一致。

(4) 胰蛋白酶降解实验

分别取适量供试品母液, 用不同 pH 胰蛋白酶反应缓存液稀释至
25 0.06mg/ml, 将每组反应溶液分成 1ml/管, 总共 7 管, 混匀后置于 37°C 水浴孵育 30min。取出 1 管不加 SIF 作为无酶反应 0 点 (记为 -5min 点), 再取出 6 管分别加入 SIF 混匀, 其中一管立即加入适量体积的 6M HCl 终止反应, 作为加酶后的 0 点 (记为 0min 点), 其余 5 管继续置于 37°C 反应, 并分别于 5min、10min、20min、35min、50min 各取出一组加适量体积的 6M HCl
30 终止反应。所有实验组各管保证终止反应后的总体积一致。

对酶降解实验取样进行 HPLC 检测，以无酶反应 0 点（记为-5min 点）的样品主峰峰面积为基础峰面积，计算加酶后获得的不同时间点的主峰峰面积剩余的百分比。

胃蛋白酶降解实验数据（n=3）显示（图 5），M4 及索玛鲁肽分子在酸性条件下（pH2.6）的降解速率相当，这是由于在该 pH 下胃蛋白酶活性最高；在中性 pH7.4 时，两个分子基本都未被降解，此时胃蛋白活性最低；而在 pH4.0 时，索玛鲁肽被降解的速率明显高于 M4，前者的 t1/2 约为 10min，后者 t1/2 约为 45min，说明 M4 抵抗胃蛋白酶降解的能力明显优于索玛鲁肽。

胰蛋白酶降解实验数据（n=4）显示（图 6），pH6.8 及 8.0 条件下两者降解的速率基本一致，原因是该 pH 范围为胰蛋白酶的最高活性范围；在 pH4.0 条件下，M4 及索玛鲁肽也表现出了抵抗胰蛋白酶降解的能力，两者也基本无差异。

15

20

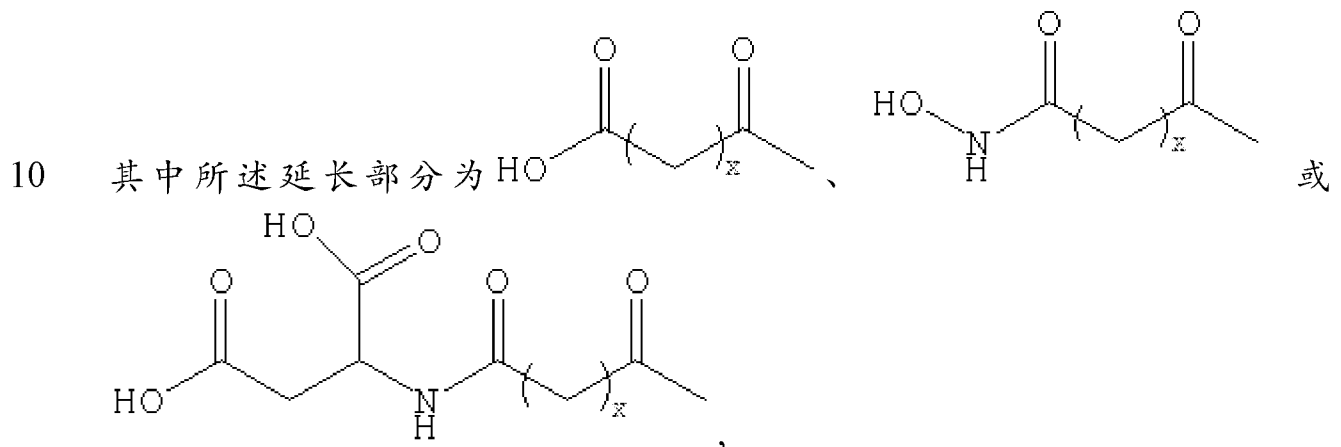
权 利 要 求

1、一种 GLP-1(7-37)类似物的衍生物或其药学上可接受的盐，其中 GLP-1(7-37)类似物包含下式的氨基酸序列：

5 HX₈EGTFTSDVSSX₁₉LEEX₂₃AARX₂₇FIX₃₀WLVX₃₄GX₃₆X₃₇,

其中 X₈ 选自 V、T、I、L、G 或 S，X₁₉ 为 Y 或 K，X₂₃ 为 Q 或 K，X₂₇ 为 E 或 K，X₃₀ 为 A 或 K，X₃₄ 为 R 或 K，X₃₆ 为 R 或 K，X₃₇ 为 G 或 K，

条件是，在 X₁₉、X₂₃、X₂₇、X₃₀、X₃₄、X₃₆ 或 X₃₇ 中只有一个是 K 残基，所述衍生物包含与所述 GLP-1(7-37)类似物的 K 残基连接的延长部分，



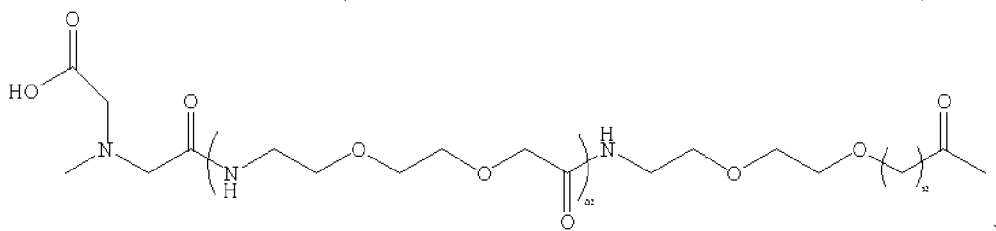
其中 x 是 4-38 的整数。

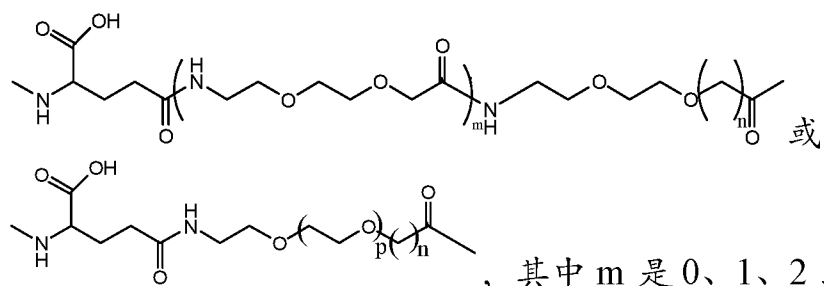
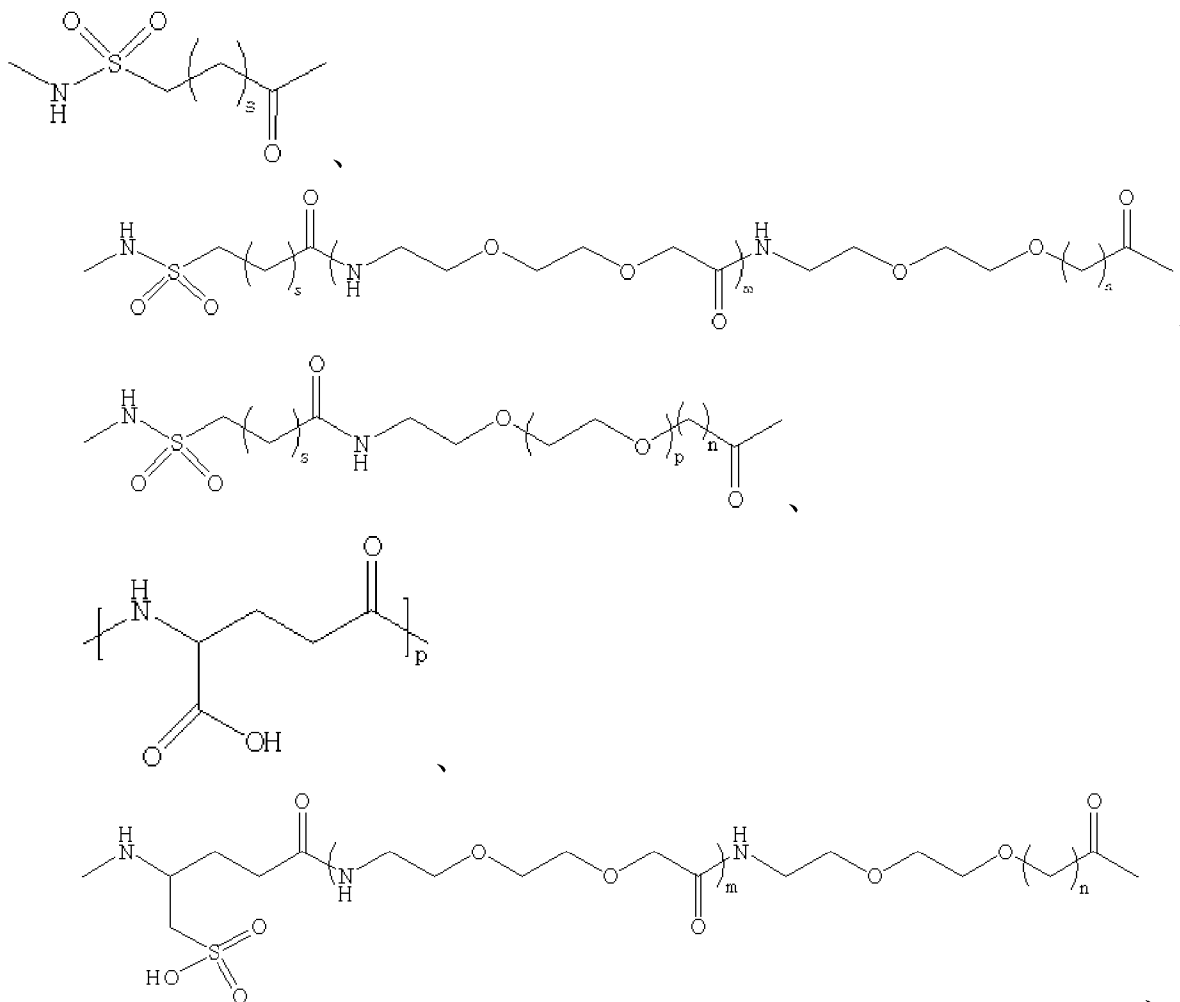
2、根据权利要求 1 所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中所述延长部分选自：

15 HOOC(CH₂)₁₄CO-、HOOC(CH₂)₁₅CO-、HOOC(CH₂)₁₆CO-、HOOC(CH₂)₁₇CO-、HOOC(CH₂)₁₈CO-、HOOC(CH₂)₁₉CO-、HOOC(CH₂)₂₀CO-、HOOC(CH₂)₂₁CO-和 HOOC(CH₂)₂₂CO-。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中所述延长部分通过接头与 GLP-1(7-37)类似物的 K 残基连接。

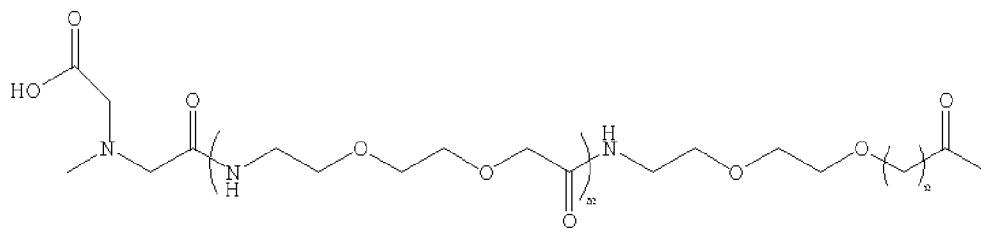
20 4、根据权利要求 3 所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中接头为：

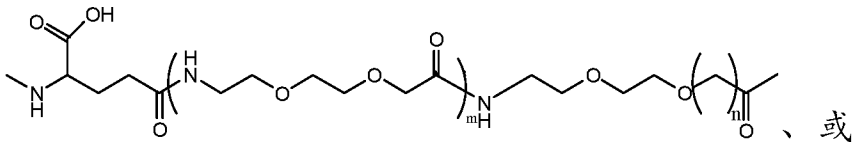
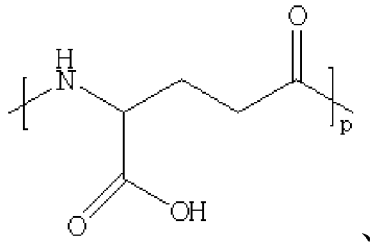




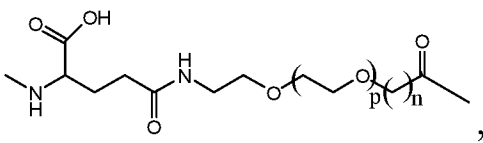
，其中 m 是 0、1、2 或 3； n 是 1、2 或 3； s 是 0-6 的任意整数； p 是 1-8 的任意整数。

优选地，接头为：



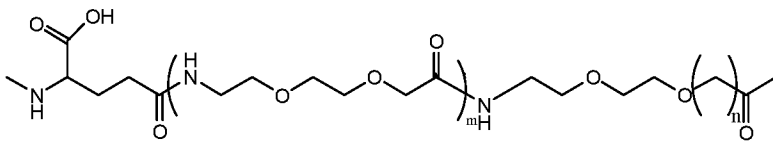


5



其中 m 是 1 或 2; n 是 1 或 2; p 是 1-5 的任意整数。

10 5、根据权利要求 4 所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其中接头为：



或 2。

6、权利要求 1-5 任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐，其为选自如下的任一衍生物或其药学上可接受的盐：N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)(Val⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M2)、N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基)(Val⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽(M4)、N- ϵ^{34} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基)(Val⁸Glu²²Arg²⁶Lys³⁴-GLP-1(7-37))肽 (M5)、N- ϵ^{37} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基)(Val⁸Glu²²Arg^{26,34}Lys³⁷-GLP-1(7-37))肽(M7)、N- ϵ^{23} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基]乙氧基)乙氧基)(Ile⁸Glu²²Lys²³Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M9) \

N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Thr⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M13) \

5 N- ϵ^{30} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七烷酰氨基)-4(s)-羧基丁酰基氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基](Ile⁸Glu²²Lys³⁰Arg^{26,34}-GLP-1(7-37))肽 (M14)。

7、制备权利要求 1-6 中任意一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐的方法，包括：

10 (1) 将溶解有上述权利要求任一项中所述的 GLP-1 类似物的溶液与溶解有上述权利要求任一项所述的延长部分的溶液混合；

(2) 调节 pH 至 4-5 终止反应，静置，至沉淀产生，取沉淀；和

(3) 向沉淀中加入 TFA，调节 pH 至 7.5-8.5 终止反应。

8、权利要求 7 的方法，还包括在与溶解有上述权利要求任一项所述延长部分的溶液混合前，向溶解有 GLP-1 类似物的溶液中加入三乙胺。

15 9、权利要求 7 或 8 的方法，其中上述权利要求任一项所述的延长部分的溶液是乙腈溶解的。

10、一种药物组合物，其包括权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料。

20 11、权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐在制备预防和/或治疗糖尿病或糖尿病并发症的药物中的用途。

12、权利要求 11 的用途，其中所述糖尿病并发症为糖尿病性肾病。

25 13、权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐在制备减低血糖、提高糖耐量、减少胰岛 β -细胞凋亡、增强胰岛 β -细胞功能、增加胰岛 β -细胞数量和/或恢复胰岛 β -细胞的葡萄糖敏感性的药物中的用途。

14、权利要求 13 的用途，其中所述降低血糖包括降低空腹血糖和/或餐后血糖。

30 15、一种预防和/或治疗糖尿病或糖尿病并发症的方法，包括给药受试者预防或治疗有效量的权利要求 1-6 中任意一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐。

16、权利要求 15 的方法，其中所述糖尿病并发症为糖尿病性肾病。

17、一种降低血糖、提高糖耐量、减少胰岛 β -细胞凋亡、增强胰岛 β -细胞功能、增加胰岛 β -细胞数量和/或恢复胰岛 β -细胞的葡萄糖敏感性的方法，包括给药受试者治疗有效量的权利要求 1-6 中任意一项权利要求所述的衍生物或其药学上可接受的盐。

5 18、权利要求 17 的用途，其中所述降低血糖包括降低空腹血糖和/或餐后血糖。

19、一种 GLP-1(7-37)类似物，包含由如下氨基酸序列组成的多肽：

H X₈EGTFTSDVSSX₁₉LEEX₂₃AARX₂₇FIX₃₀WLVX₃₄GX₃₆X₃₇

10 其中 X₈ 选自 V、T、I、L、G 或 S，X₁₉ 为 Y 或 K，X₂₃ 为 Q 或 K，X₂₇ 为 E 或 K，X₃₀ 为 A 或 K，X₃₄ 为 R 或 K，X₃₆ 为 R 或 K，X₃₇ 为 G 或 K，并且，在 X₁₉、X₂₃、X₂₆、X₂₇、X₃₀、X₃₄、X₃₆ 或 X₃₇ 中只有一个是 K。

20、包含权利要求 19 的类似物的药物组合物。

21、权利要求 19 的类似物在制备预防或治疗糖尿病、糖尿病并发症的药物中的用途。

15 22、一种制品，包括其中装有权利要求 10 或权利要求 20 的药物组合物的容器和包装插页，其中该包装插页载有所述药物组合物的使用说明。

23、权利要求 22 的制品，还包含装有一种或多种其它药物的容器。

24、权利要求 23 的制品，其中所述一种或多种其它药物为治疗糖尿病或糖尿病并发症的其它药物。

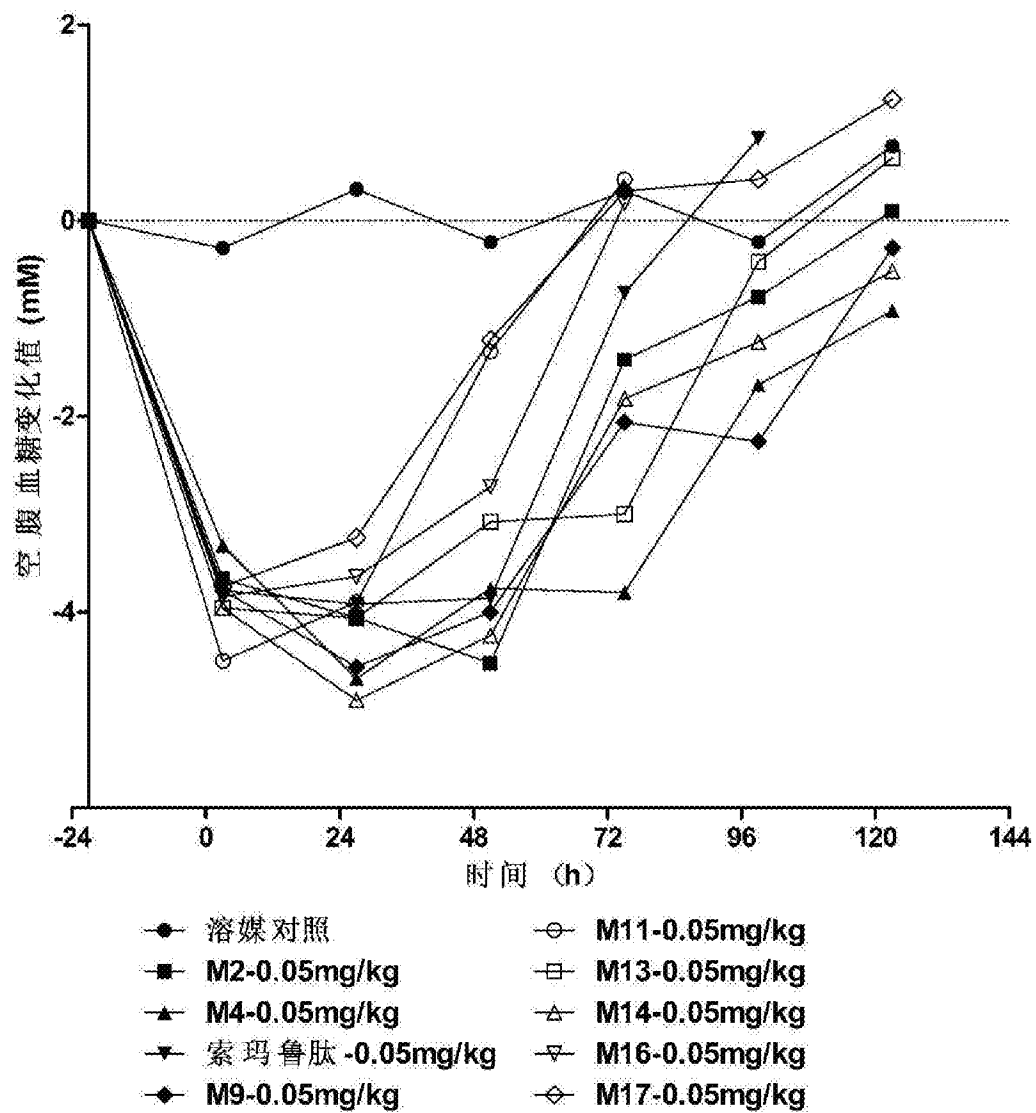


图 1

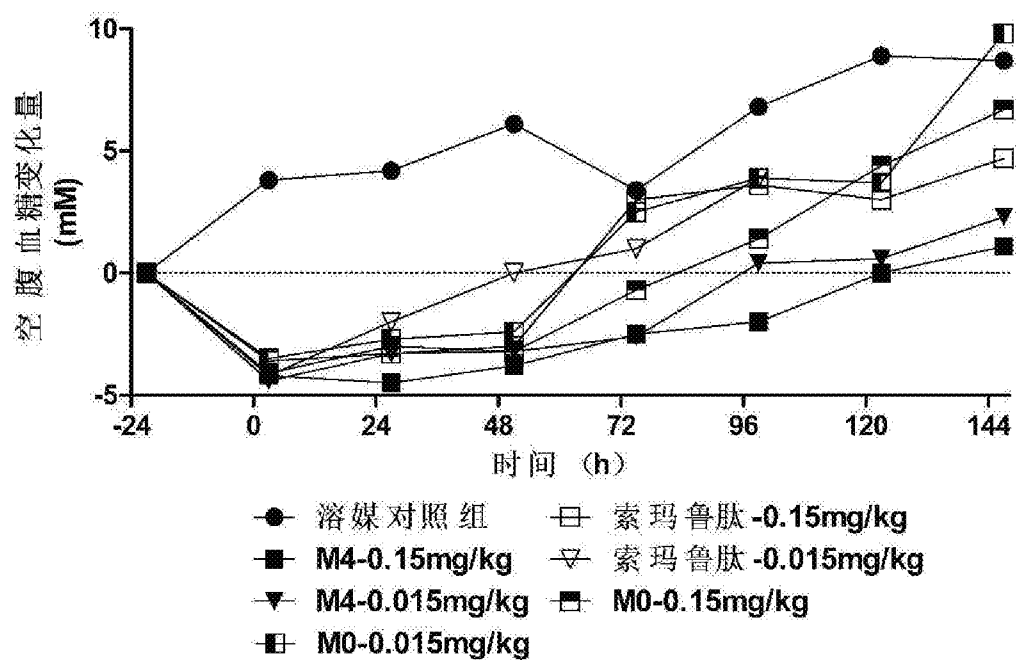


图 2

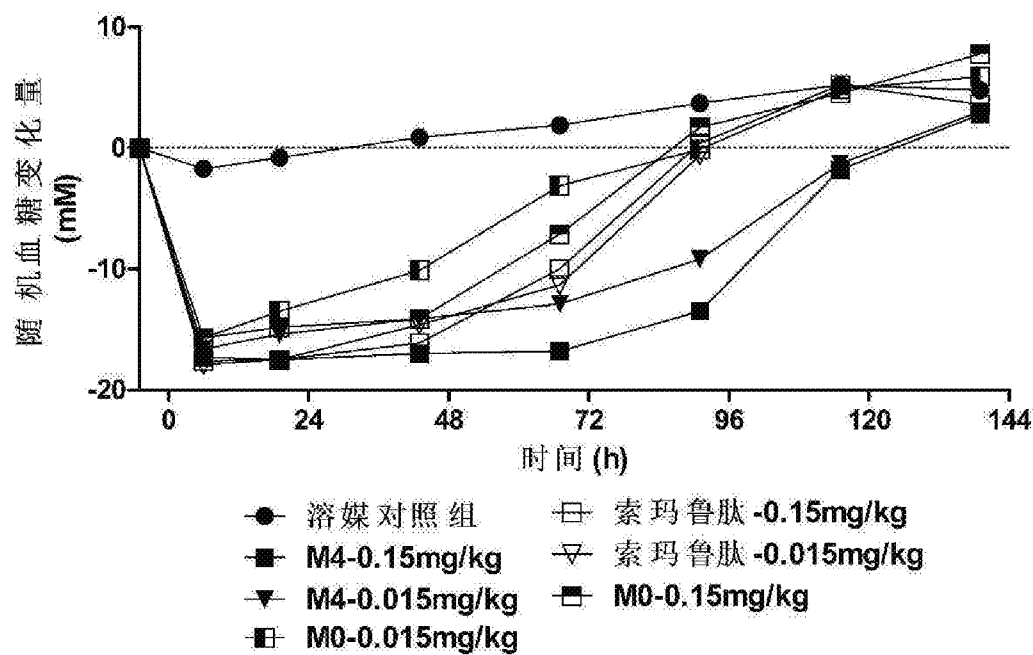


图 3

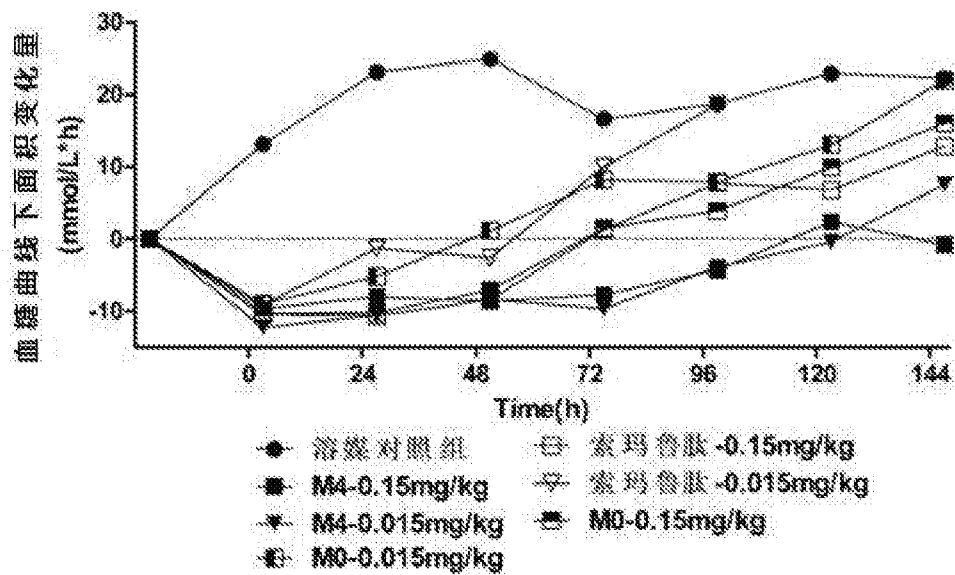


图 4

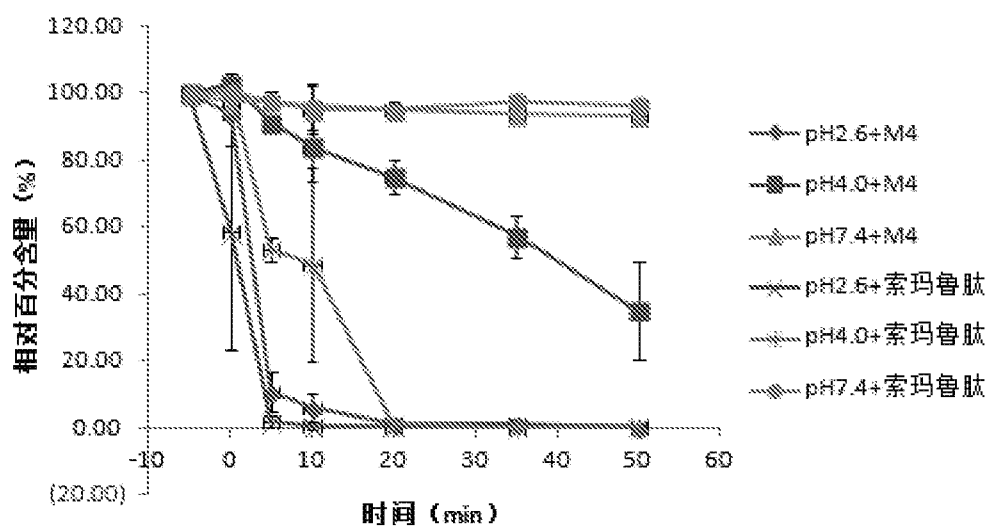


图 5

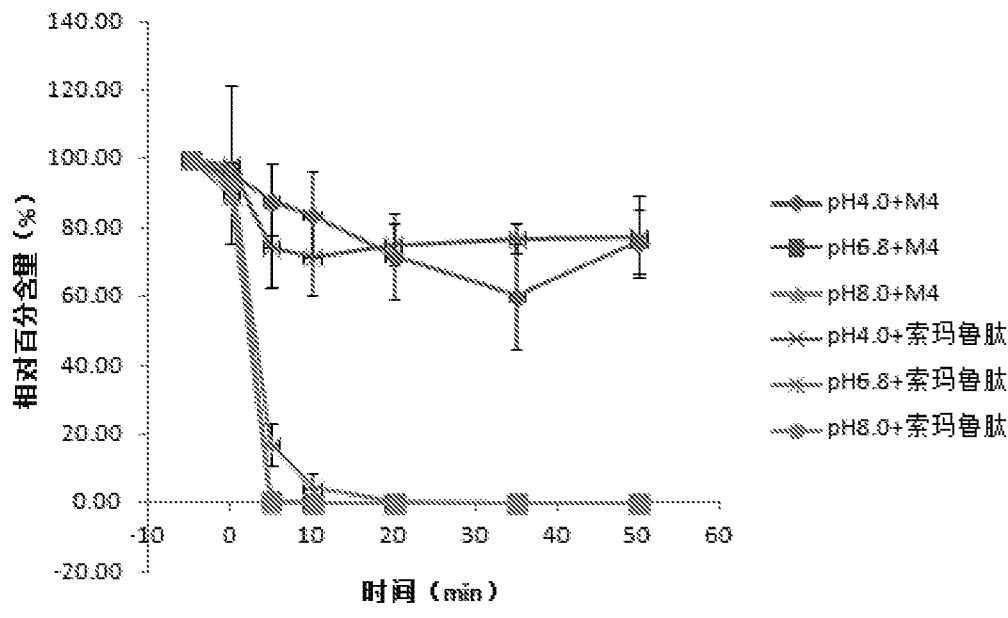


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/083383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/605(2006.01)i; C07K 1/02(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; C07K 1/30(2006.01)i; A61K 38/26(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/- C07K1/- A61K38/- A61K47/- A61P3/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, WANFANG, PUBMED, 中国专利生物序列检索系统, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM, STN: 凯因科技, 先为达生物科技, 诺和诺德, 胰高血糖素样肽, 酰化, 酰胺, 糖尿病, GLP-1, 7-37, acylation, amide, diabetes, 根据MO-M17的序列进行了序列检索, search according to sequences of MO-M17

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107033234 A (BEIJING KAWIN TECHNOLOGY SHARE-HOLDING CO., LTD.) 11 August 2017 (2017-08-11) claims 1-8, and embodiment 5	1-24
A	CN 101133082 A (NOVO NORDISK A/S) 27 February 2008 (2008-02-27) claims 1-36	1-24
A	WO 2013167454 A1 (NOVO NORDISK A/S) 14 November 2013 (2013-11-14) entire document	1-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 2019

Date of mailing of the international search report

27 June 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/083383

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 15-18 relate to a method for treatment of diseases, and this written opinion is made on the basis of a use of a compound or a pharmaceutically acceptable salt thereof in preparing a drug for the treatment of diseases.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107033234	A	11 August 2017	CN	107033234	B	26 June 2018
CN	101133082	A	27 February 2008	KR	101205272	B1	11 January 2013
				HU	E028194	T2	28 December 2016
				ZA	200707261	B	28 May 2008
				US	8129343	B2	06 March 2012
				AU	2006224536	B2	05 April 2012
				IL	184051	A	31 August 2015
				RU	2007134156	A	27 April 2009
				DE	602006015928	D1	16 September 2010
				PT	1863839	E	10 November 2010
				EP	1863839	B1	04 August 2010
				IL	184051	D0	31 October 2007
				AT	476446	T	15 August 2010
				JP	2010116407	A	27 May 2010
				RU	2434019	C2	20 November 2011
				CN	104402989	A	11 March 2015
				MX	2007011220	A	17 October 2007
				NO	337946	B1	18 July 2016
				JP	4585037	B2	24 November 2010
				US	2009156478	A1	18 June 2009
				AU	2006224536	A1	21 September 2006
				JP	2013063984	A	11 April 2013
				KR	20070120089	A	21 December 2007
				ES	2557313	T3	25 January 2016
				EP	2322546	A1	18 May 2011
				ES	2350051	T3	17 January 2011
				NO	20075342	L	18 December 2007
				CN	101133082	B	13 January 2016
				DK	2322546	T3	14 December 2015
				US	2012295847	A1	22 November 2012
				NO	20075342	A	18 December 2007
				HU	S1800019	I1	28 June 2018
				PT	2322546	E	22 January 2016
				AU	2006224536	B9	10 May 2012
				NL	300936	I2	07 August 2018
				WO	2006097537	A2	21 September 2006
				EP	1863839	A2	12 December 2007
				JP	2008533105	A	21 August 2008
				CA	2601784	A1	21 September 2006
				CN	104017062	A	03 September 2014
				TW	I372629	B	21 September 2012
				WO	2006097537	A3	25 January 2007
				EP	2322546	B1	30 September 2015
				BR	PI0607762	A2	23 March 2010
				DK	1863839	T3	22 November 2010
				TW	200700433	A	01 January 2007
				ZA	200707261	A	28 May 2008
				TW	I362392	B	21 April 2012
				CA	2601784	C	24 December 2013
				US	8536122	B2	17 September 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/083383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2013167454	A1	14 November 2013	JP	6250034	B2	20 December 2017
				JP	2015517477	A	22 June 2015
				EP	2846823	A1	18 March 2015
				US	10000542	B2	19 June 2018
				US	2015133374	A1	14 May 2015
				CN	104519902	A	15 April 2015
				US	2018244742	A1	30 August 2018
				CN	104519902	B	27 October 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/083383

A. 主题的分类

C07K 14/605(2006.01)i; C07K 1/02(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; C07K 1/30(2006.01)i; A61K 38/26(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K14/- C07K1/- A61K38/- A61K47/- A61P3/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 万方, PUBMED, 中国专利生物序列检索系统, STN: 凯因科技, 先为达生物科技, 诺和诺德, 胰高血糖素样肽, 酰化, 酰胺, 糖尿病, GLP-1, 7-37, acylation, amide, diabetes, 根据M0-M17的序列进行了序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107033234 A (北京凯因科技股份有限公司) 2017年 8月 11日 (2017 - 08 - 11) 权利要求1-8, 实施例5	1-24
A	CN 101133082 A (诺和诺德公司) 2008年 2月 27日 (2008 - 02 - 27) 权利要求1-36	1-24
A	WO 2013167454 A1 (NOVO NORDISK A/S) 2013年 11月 14日 (2013 - 11 - 14) 全文	1-24

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 6月 17日

国际检索报告邮寄日期

2019年 6月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

秦雪

电话号码 86-(10)-53962164

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 15-18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求15-18涉及疾病的治疗方法，本书面意见是以化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗疾病的药物中的用途为基础做出的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/083383

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107033234	A	2017年 8月 11日	CN	107033234	B	2018年 6月 26日
CN	101133082	A	2008年 2月 27日	KR	101205272	B1	2013年 1月 11日
				HU	E028194	T2	2016年 12月 28日
				ZA	200707261	B	2008年 5月 28日
				US	8129343	B2	2012年 3月 6日
				AU	2006224536	B2	2012年 4月 5日
				IL	184051	A	2015年 8月 31日
				RU	2007134156	A	2009年 4月 27日
				DE	602006015928	D1	2010年 9月 16日
				PT	1863839	E	2010年 11月 10日
				EP	1863839	B1	2010年 8月 4日
				IL	184051	D0	2007年 10月 31日
				AT	476446	T	2010年 8月 15日
				JP	2010116407	A	2010年 5月 27日
				RU	2434019	C2	2011年 11月 20日
				CN	104402989	A	2015年 3月 11日
				MX	2007011220	A	2007年 10月 17日
				NO	337946	B1	2016年 7月 18日
				JP	4585037	B2	2010年 11月 24日
				US	2009156478	A1	2009年 6月 18日
				AU	2006224536	A1	2006年 9月 21日
				JP	2013063984	A	2013年 4月 11日
				KR	20070120089	A	2007年 12月 21日
				ES	2557313	T3	2016年 1月 25日
				EP	2322546	A1	2011年 5月 18日
				ES	2350051	T3	2011年 1月 17日
				NO	20075342	L	2007年 12月 18日
				CN	101133082	B	2016年 1月 13日
				DK	2322546	T3	2015年 12月 14日
				US	2012295847	A1	2012年 11月 22日
				NO	20075342	A	2007年 12月 18日
				HU	S1800019	I1	2018年 6月 28日
				PT	2322546	E	2016年 1月 22日
				AU	2006224536	B9	2012年 5月 10日
				NL	300936	I2	2018年 8月 7日
				WO	2006097537	A2	2006年 9月 21日
				EP	1863839	A2	2007年 12月 12日
				JP	2008533105	A	2008年 8月 21日
				CA	2601784	A1	2006年 9月 21日
				CN	104017062	A	2014年 9月 3日
				TW	I372629	B	2012年 9月 21日
				WO	2006097537	A3	2007年 1月 25日
				EP	2322546	B1	2015年 9月 30日
				BR	P10607762	A2	2010年 3月 23日
				DK	1863839	T3	2010年 11月 22日
				TW	200700433	A	2007年 1月 1日
				ZA	200707261	A	2008年 5月 28日
				TW	I362392	B	2012年 4月 21日
				CA	2601784	C	2013年 12月 24日
				US	8536122	B2	2013年 9月 17日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际申请号	PCT/CN2019/083383
-------	-------------------

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
W0	2013167454	A1	2013年 11月 14日	JP	6250034	B2	2017年 12月 20日
				JP	2015517477	A	2015年 6月 22日
				EP	2846823	A1	2015年 3月 18日
				US	10000542	B2	2018年 6月 19日
				US	2015133374	A1	2015年 5月 14日
				CN	104519902	A	2015年 4月 15日
				US	2018244742	A1	2018年 8月 30日
				CN	104519902	B	2017年 10月 27日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)