

# (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

(43) 国际公布日  
2021 年 2 月 18 日 (18.02.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/027762 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C07K 14/575* (2006.01) *A61K 38/22* (2006.01)  
*C07K 1/107* (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/108127

(22) 国际申请日: 2020 年 8 月 10 日 (10.08.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910747519.9 2019年8月14日 (14.08.2019) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。

(72) 发明人: 高向东 (GAO, Xiangdong); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。田澍 (TIAN, Hong); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。陆玮晟 (LU, Weicheng); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。姚文兵 (YAO, Wenbing); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。赛文博 (SAI, Wenbo); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷24号, Jiangsu 210009 (CN)。

(74) 代理人: 南京艾普利德知识产权代理有限公司 (特殊普通合伙) (NANJING IPLEADER INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY FIRM); 中国江苏省南京市鼓楼区建宁路65号金川科技园17号楼6层607室, Jiangsu 210000 (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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

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: ORAL HYPOGLYCEMIC PEPTIDE, FATTY ACID DERIVATIVE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 口服降糖肽、其脂肪酸衍生物及用途

(57) Abstract: Provided are an oral hypoglycemic peptide, and a fatty acid derivative and use thereof. The sequence of the polypeptide is as shown in SEQ ID NO.1. The polypeptide or fatty acid derivative thereof may be used to prepare drugs or pharmaceutical compositions for preventing or treating diabetes, or may be used to prepare drugs or pharmaceutical compositions for lowering blood sugar. The polypeptide possesses enzymolysis resistance against a variety of proteases, may prevent failures caused by enzymolysis in the gastrointestinal tract, and is suitable as an oral hypoglycemic drug.

(57) 摘要: 提供了一种口服降糖肽、其脂肪酸衍生物及用途。该多肽的序列如SEQ ID NO.1所示。该多肽或其脂肪酸衍生物可用于制备预防或治疗糖尿病的药物或药物组合物, 或用于制备降血糖的药物或药物组合物。所述多肽具有针对多种蛋白酶的酶解抗性, 能避免在胃肠道中被酶解失效, 适宜作为口服降血糖药物。



WO 2021/027762 A1

## 口服降糖肽、其脂肪酸衍生物及用途

### 技术领域

本发明涉及一种口服降糖肽、其脂肪酸衍生物及用途，属于医药生物技术领域。

### 背景技术

糖尿病是一种多病因导致的以持续性高血糖为特征的代谢性疾病，其并发症涉及心脑血管组织、肾脏组织、眼部、足部等多种组织器官，且一旦发生，很难逆转。随着生活水平的提高和老龄化的加重，其发病率有逐年升高的趋势。据 WHO 统计目前糖尿病的发病率为 2.8%，预计到 2030 年将会增加至 4.8%。我国有近 10% 的成年人患有糖尿病，有权威数据预测，到 2030 年我国糖尿病患者的数量将位居全球第一位，每年在糖尿病及其并发症上的消费将达到 432 亿美元，这不仅为患者本人带来生理和心理的双重负担，甚至有可能引发严重的社会问题。

目前糖尿病的治疗药物除胰岛素外，还有胰岛素分泌促进剂、胰岛素增敏剂、葡萄糖苷酶抑制剂等十几种药物广泛应用于临床，但仍有大量糖尿病病人无法通过现有降糖药物将血糖值控制在安全范围之内，常常发生低血糖等不良反应。这主要是由于血糖代谢受多因素调节，目前的治疗方法尚不能涵盖该疾病所涉及的所有代谢性缺陷，开发更加安全有效的新型降糖药物是糖尿病临床治疗的迫切需求。

以艾塞那肽为代表的降糖多肽类药物一直是近年来降糖药物开发的热点。艾塞那肽与哺乳动物分泌的胰高血糖素样肽 1 具有 53% 的同源性，可以通过激活胰高血糖素样肽受体进而激活多种生理学功能：(1) 葡萄糖依赖性促胰岛素释放作用；(2) 刺激生长抑素释放来抑制胰高血糖素的分泌；(3) 抑制胃壁细胞分泌胃酸，延长胃的排空；(4) 增加饱足感，抑制食欲，降低能量的摄取；(5) 增强胰岛  $\beta$  细胞功能并促进其增殖。艾塞那肽的注射型药物百泌达已于 2005 年经美国 FDA 批准上市，长效型注射液已于 2012 年在美国上市。

由于艾塞那肽具有血糖依赖性降糖作用，诱发低血糖风险极低，同时对胰岛  $\beta$  细胞具有保护作用，是极为理想的一类降糖药物。但由于多肽类药物体内稳定性较差且不能口服，需要频繁注射给药。艾塞那肽需要每天注射两次，即使是降糖多肽的长效制剂——利拉鲁肽，也依然需要每天注射一次。长期重复注射，给病人带来了诸多不便和痛苦，降低了病人长期用药的依从性。因此，开发非注射途径给药的降糖多肽具有重要的临床意义。

口服给药作为目前应用最广，使用最方便的给药方式，已成为多肽、蛋白质类药物的持续努力方向。但由于多肽、蛋白质类药物口服利用度低，一直以来并未获得实用化的成果，目前仍未有可口服给药的相关多肽、蛋白质类药物上市，其主要原因在于两方面：1. 多肽、蛋白质类药物多为大分子，其分子量大，脂溶性较差，在肠道内难以吸收；2. 肠道内存在大量蛋白酶，会迅速降解进入肠道的生物大分子，以至于肠道内的药物无法维持在治疗需要的浓度。亟待研发出既具有抗酶解特性，又具有良好肠道通透性的艾塞那肽类似物。

发明人在该领域已经获得了一些研究成果，先于 2013 年 12 月 17 日申请了专利号

CN201310694475.0、授权公告号 CN103665148B 的中国发明专利，之后在此基础上，再于 2017 年 09 月 11 日申请了申请号 CN201710810530.6、申请公布号 CN 109485720A 的中国发明专利申请。目前发明人在进一步研究中已获得了新的成果。

## 发明内容

本发明的主要目的是：克服现有技术存在的问题，提供一种口服降糖肽，具有良好的抗酶解特性；同时还提供该多肽的脂肪酸衍生物，以及相应的用途。

本发明解决其技术问题的技术方案如下：

一种口服降糖肽，其特征是，具有如下氨基酸序列：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Xaa1-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Xaa2-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Xaa3-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys，其中，

Xaa1 为 Met、Val、Ile、Ser 或 Lys；

Xaa2 为 Leu、Arg、Tyr、Val 或 Lys；

Xaa3 为 Met、Ile、Val 或 Lys。

优选地，Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Met；或者，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Lys，且 Xaa3 为 Val；或者，Xaa1 为 Val，Xaa2 为 Tyr，且 Xaa3 为 Lys；或者，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Ile；或者，Xaa1 为 Ile，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Val；或者，Xaa1 为 Lys，Xaa2 为 Val，且 Xaa3 为 Met；或者，Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Met；或者，Xaa1 为 Val，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Met；或者，Xaa1 为 Ile，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Ile；或者，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Tyr，且 Xaa3 为 Lys；或者，Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Lys；或者，Xaa1 为 Lys，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Val。

本发明还提供：

一种口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物，其特征是，所述多肽为前文所述的口服降糖肽；所述脂肪酸的修饰位点为 Xaa1、Xaa2、Xaa3 之一或其任意组合；当 Xaa1 为修饰位点时 Xaa1 为 Lys，当 Xaa2 为修饰位点时 Xaa2 为 Lys，当 Xaa3 为修饰位点时 Xaa3 为 Lys。

优选地，所述脂肪酸为 10-(4-羧基苯氧基)癸酸或 17-羧基十七烷酸；所述脂肪酸经 [2-(2-{2-[2-(2-{2-[-4-羧基-4-(氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基]与修饰位点氨基酸的氨基氮原子相连。

本发明还提供：

前文所述口服降糖肽或前文所述口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物的用途，其特征是，所述用途为用于制备预防或治疗糖尿病的药物或药物组合物、或用于制备降血糖的药物或药物组合物。

优选地，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

本发明还提供：

一种药物组合物，其特征是，含有前文所述口服降糖肽或前文所述口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物。

优选地，所述药物组合物还含有促吸收剂。所述促吸收剂为低分子量壳聚糖或 SNAC。  
本发明还提供：

前文所述的药物组合物的用途，其特征是，所述用途为用于制备预防或治疗糖尿病的药剂、或用于制备降血糖的药剂。

优选地，所述药剂的剂型为经胃肠道给药剂型或非经胃肠道给药剂型。

优选地，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

发明人经研究发现，以 CN103665148B 多肽为基础，将其第 21 位氨基酸突变为 Glu 后，辅以第 12、20、27 位三个位点进行有选择地氨基酸突变，可以获得一系列可以口服给药的降血糖活性多肽（Oral hypoglycemic polypeptide OHP）。

与现有技术相比，本发明的多肽具有针对多种蛋白酶的酶解抗性，能很好地避免在胃肠道中被酶解失效。更重要的是，本发明提供的多肽具有多种跨膜转运途径，包括酪氨酸激酶参与的小窝蛋白介导转胞吞途径、能量代谢相关转胞吞途径等，更加适宜作为口服降血糖药物。

## 附图说明

图 1 为本发明实施例 3 中 OHP1 与 OHP2 激活 cAMP 含量的测定结果图。

图 2 为本发明实施例 4 中 OHP1 与 OHP2 在腹腔注射糖耐量实验中对血糖控制能力的检测结果图。

图 3 为本发明实施例 5 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠中对糖化血红蛋白水平的检测结果图。

图 4 为本发明实施例 6 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠中对胰岛素抵抗改善水平的检测结果图。

图 5 为本发明实施例 7 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠中对血清胰岛素水平影响检测结果图。

图 6 为本发明实施例 8 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠治疗结束后的胰脏、肾脏、肝脏切片观察图。

图 7 为本发明实施例 9 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠治疗过程中体重变化监测图。

图 8 为本发明实施例 9 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠治疗过程中进食量变化监测图。

图 9 为本发明实施例 10 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠治疗结束后血清脂类相关代谢指标监测结果图。

图 10 为本发明实施例 11 中 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠治疗结束后能量代谢相关指标监测结果图。

图 11 为本发明实施例 12 中通过荧光酶标仪检测内吞抑制剂对 OHP1 和 OHP2 内吞的抑制作用检测结果图。

图 12 为本发明实施例 13 中通过流式细胞术检测内吞抑制剂对 OHP1 和 OHP2 内吞的抑制作用检测结果图。

## 具体实施方式

下面参照附图并结合实施例对本发明作进一步详细描述。但是本发明不限于所给出的例子。

本发明多肽的通式如 SEQ ID NO. 1 所示，即

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Xaa1-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Xaa2-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Xaa3-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys，其中，

Xaa1 为 Met、Val、Ile、Ser 或 Lys；

Xaa2 为 Leu、Arg、Tyr、Val 或 Lys；

Xaa3 为 Met、Ile、Val 或 Lys。

在本发明具体实施的说明中，首先采用 OHP1、OHP2、OHP3、OHP4、OHP5、OHP6 作代表性阐述。

OHP1，Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Met，即 SEQ ID NO. 2：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Met-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys；

OHP2，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Lys，且 Xaa3 为 Val，即 SEQ ID NO. 3：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Ser-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Val-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys；

OHP3，Xaa1 为 Val，Xaa2 为 Tyr，且 Xaa3 为 Lys，即 SEQ ID NO. 4：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Val-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Tyr-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys；

OHP4，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Ile，即 SEQ ID NO. 5：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Ser-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Ile-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys；

OHP5，Xaa1 为 Ile，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Val，即 SEQ ID NO. 6：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Ile-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Leu-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Val-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys；

OHP6，Xaa1 为 Lys，Xaa2 为 Val，且 Xaa3 为 Met，即 SEQ ID NO. 7：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Val-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

采用的对照肽有 TSME1、TSME2、IPCM1，在此做统一说明：

TSME1 为 CN103665148B 中的多肽，其序列为：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Met-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Leu-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

TSME2 为 CN103665148B 中的多肽，其序列为：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Ser-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Gln-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Val-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM1 为 CN109485720A 中的多肽，其序列为：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Met-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Leu-Leu-Leu-Ile-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

实施例 1 OHP1-OHP6 的抗酶解能力测定

第一步：配置浓度分别为 0.005 mg/mL 的胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶溶液，将各蛋白酶溶液分别于 37 °C 孵育 15 min。

第二步：将 500 μL 0.5mg/mL 的 OHPX 溶液（OHPX 为 OHP1-OHP6 之一，下同）与等体积蛋白酶溶液分别进行混合，即每种蛋白酶：OHPX=1:100 (w/w)，于 37 °C 孵育 60 min，反应完之后取出 50 μL 反应液，向其中加入 50 μL 1% (v/v) TFA 溶液终止反应，室温 12000 rpm 离心 5 min 后，收集上清液，利用 RP-HPLC 对上清液进行检测。同时，采用 Exendin-4（即艾塞那肽）、TSME1、TSME2 作为对照样品，以相同体积和浓度进行处理并检测。

第三步：利用 RP-HPLC 检测：色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C18 反相色谱柱；流动相 A 相为含 0.05% TFA 的双蒸水，B 相为含 0.05% TFA 的乙腈溶液；进样量为 100 μL；泵流速为 1 mL/min；检测波长为 215 nm，检测程序如下：

| Time  | Pump A proportion % | Pump B proportion % |
|-------|---------------------|---------------------|
| 0.01  | 95                  | 5                   |
| 10.00 | 65                  | 35                  |
| 35.00 | 5                   | 95                  |
| 41.00 | 5                   | 95                  |
| 41.01 | 95                  | 5                   |
| 50.00 | 95                  | 5                   |

检测结果如表 1 所示。

表 1 OHP1-OHP6 抗酶解能力检测结果

| Retention rate % | 胰蛋白酶<br>Trypsin | 糜蛋白酶 Chymotrypsin | 弹性蛋白酶<br>Elastase |
|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Exendin-4        | 0.00 ± 0.00%    | 0.00 ± 0.00%      | 53.81±2.50%       |
| OHP1             | 90.67 ± 2.77 %  | 33.53 ± 0.71 %    | 62.90 ± 9.91 %    |
| OHP2             | 82.64 ± 2.46 %  | 16.77 ± 5.43 %    | 49.32 ± 8.24 %    |

| Retention rate % | 胰蛋白酶<br>Trypsin | 糜蛋白酶 Chymotrypsin | 弹性蛋白酶<br>Elastase |
|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| OHP3             | 78.40 ± 2.34 %  | 54.23 ± 6.57 %    | 70.28 ± 5.38 %    |
| OHP4             | 92.42 ± 0.06 %  | 4.38 ± 2.09 %     | 12.89 ± 7.86 %    |
| OHP5             | 60.65 ± 8.55 %  | 42.54 ± 6.93 %    | 40.90 ± 2.95 %    |
| OHP6             | 95.66 ± 4.02 %  | 7.99 ± 0.38 %     | 12.76 ± 2.03 %    |
| TSME1            | 88.77 ± 7.64 %  | 2.82 ± 0.85 %     | 9.41 ± 8.44 %     |
| TSME2            | 89.62 ± 3.11 %  | 0.94 ± 1.62 %     | 8.39 ± 9.22 %     |

由该结果可知，与 Exendin-4 相比，OHP1-OHP6 针对上述三种关键蛋白酶的抗性均有不同程度的提高，其中针对胰蛋白酶抗性的提高最为显著，OHP1、OHP2、OHP4、OHP6 的残余率均达 80% 以上。同时 OHP1-OHP6 针对弹性蛋白酶和糜蛋白酶的抗性也有不同程度的提高，其中针对糜蛋白酶抗性提高较为显著的为 OHP1、OHP3、OHP5；弹性蛋白酶抗性提高较为显著的为 OHP1、OHP2、OHP3 和 OHP5。

### 实施例 2 OHP1-OHP6 激活胰高血糖素样肽-1 受体能力的测定

第一步：利用本实验室前期构建的可于细胞膜表面稳定表达胰高血糖素样肽-1 受体并连接荧光素酶报告基因的 CHO 细胞株，在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养至第三代后使用荧光素酶报告基因法进行体外活性测定。

第二步：实验测定时，先用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，再加入含 0.25% 胎牛血清的完全培养基。以  $2 \times 10^5$  个细胞/mL 的浓度将细胞液接种于 96 孔板中，每孔接种 100  $\mu$ L，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 4 h。

第三步：取出 96 孔板，每孔加入 20  $\mu$ L 的 OHPX 溶液、TSME1 溶液、TSME2 溶液、或 Exendin-4 阳性对照。Exendin-4 采用 280 nmol/L 的初始浓度，4 倍倍比稀释，一共稀释 10 个梯度；OHPX、TSME1、TSME2 则分别采用 1750 nmol/L 的初始浓度，7 倍倍比稀释，一共稀释 10 个梯度。每种浓度的药物设置 3 个复孔。轻轻振荡混匀后于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中继续培养 4 h。

第四步：取出 96 孔板，向每孔中各加入 100  $\mu$ L 化学发光底物 (Steady-Glo) 试剂，室温下 350 rpm 振荡 15 分钟。

第五步：于化学发光酶标仪测定每孔的相关化学发光单位 (RLU)。

第六步：以样品浓度的常用对数值为横坐标，对应浓度的平均 RLU 为纵坐标，绘制量效曲线。通过非线性拟合方法计算各样品的 EC<sub>50</sub> 值，据此计算各候选分子及 Exendin-4 阳性对照的相对效价。结果如表 2 所示。

表 2 OHP1-OHP6 激活胰高血糖素样肽-1 受体能力测定结果

|           | EC <sub>50</sub> (nM) | Max Responses (% Ex4C Max) |
|-----------|-----------------------|----------------------------|
| Exendin-4 | 0.32                  | 101.37±2.46                |
| OHP1      | 0.28                  | 98.77±6.35                 |
| OHP2      | 1.04                  | 102.71±6.89                |
| OHP3      | 15.71                 | 94.62±3.11                 |
| OHP4      | 9.32                  | 87.70±2.93                 |
| OHP5      | 18.67                 | 89.02±9.06                 |
| OHP6      | 5.71                  | 93.18±5.73                 |

|       | EC <sub>50</sub> (nM) | Max Responses (% Ex4C Max) |
|-------|-----------------------|----------------------------|
| TSME1 | 0.34                  | 96.69±2.24                 |
| TSME2 | 0.92                  | 92.42±5.60                 |

实验结果从半数有效浓度 EC<sub>50</sub> 和相对效价 Max Response 两方面衡量, 表明与原型分子 Exendin-4 相比, OHP1-OHP6 均可以激活胰高血糖素样肽-1 受体, 可以认为这些候选分子均具有降低血糖、预防或治疗糖尿病的药用前景。

其中, OHP1 和 OHP2 的 EC<sub>50</sub> 分别为 0.28 nmol/L 和 1.04 nmol/L, 与 Exendin-4 处于同一数量级范围内, 最大反应值则分别为 98.77±6.35% 和 102.71±6.89%, 两者结果与 Exendin-4 相似, 说明 OHP1 和 OHP2 在提高关键蛋白酶抗性的同时最大程度地保留了原型分子的生物学活性。

### 实施例 3 OHP1 与 OHP2 激活胰高血糖素样肽-1 受体下游第二信使 cAMP 含量的测定

第一步: 利用本实验室前期构建的可于细胞膜表面稳定表达 GLP-1 受体并连接荧光素酶报告基因的 CHO 细胞株进行胰高血糖素样肽-1 受体下游第二信使分子 cAMP 激活含量的测定, 细胞培养条件如前所述。

第二步: 实验测定时, 先用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 再加入含 0.25% 胎牛血清和 0.5 mmol/L IBMX 的完全培养基。以  $2 \times 10^5$  个细胞/mL 的浓度将细胞液接种于 96 孔板中, 每孔接种 100  $\mu$ L, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 4 h。

第三步: 取出 96 孔板, 每孔加入一定量的 OHP1/OHP2 溶液或 Exendin-4 阳性对照。Exendin-4 采用 1  $\mu$ mol/L 的初始浓度, 10 倍倍比稀释, 一共稀释 8 个梯度; OHP1/OHP2 则采用 10  $\mu$ mol/L 的初始浓度, 10 倍倍比稀释, 一共稀释 8 个梯度。每种浓度的药物设置 3 个复孔。轻轻振荡混匀后于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中继续培养 4 h。

第四步: 取出 96 孔板, 于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱和 37  $^{\circ}$ C 培养箱中反复冻融, 破碎细胞。离心后收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒中的操作要求检测 cAMP 含量, 并对结果进行线性回归分析。

结果如图 1 所示, 原型分子 Exendin-4 激活 cAMP 的 EC<sub>50</sub> 为 4.50 nmol/L, 而 OHP1 和 OHP2 激活下游 cAMP 的 EC<sub>50</sub> 分别为 8.92 nmol/L 和 6.02 nmol/L, 三者均处于同一数量级内。这三种分子在刺激 cAMP 产生时的最大反应值分别为 Exendin-4:  $0.79 \pm 0.02$  mmol/L (n=3); OHP1:  $0.85 \pm 0.06$  mmol/L (n=3); OHP2:  $0.73 \pm 0.02$  mmol/L (n=3)。这说明 OHP1 和 OHP2 与对照组 Exendin-4 之间无显著性差异。

### 实施例 4 OHP1 与 OHP2 在腹腔注射糖耐量实验中对正常小鼠血糖控制能力的检测

第一步: 选取 6-8 周龄、雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 随机分为 5 组, Vehicle 对照组、Exendin-4 (0.10mg/kg) 皮下注射给药组、OHP1 (2.12mg/kg) 灌胃给药组、OHP2 (2.12mg/kg) 灌胃给药组, 每组 8 只小鼠。

第二步: 实验提前 18 小时对小鼠禁食不禁水操作。实验开始时测定各小组小鼠空腹血糖, 完成后开始按分组给药。

第三步: 30 分钟后对小鼠腹腔注射葡萄糖溶液 (2g/kg), 此时记为 0 时刻, 并通过

尾静脉取血测定各组小鼠血糖水平，然后于 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟处监测小鼠血糖水平。

第四步：绘制血糖-时间曲线并计算曲线下面积 (Area Under Curve, AUC) 并对 AUC 结果进行统计学分析。

实验结果如图 2 中 A 所示，各组小鼠的血糖水平均于 15 分钟时达到峰值，其中 Vehicle 对照组峰值显著高于其余各组小鼠，表明溶剂经灌胃给药不具有血糖控制的效果，而给予 OHP1 和 OHP2 灌胃给药的小鼠其血糖峰值显著低于 Vehicle 对照组，并在给予葡萄糖后 120 分钟内维持了显著的血糖控制效果。图 B 为 AUC 统计结果，结果表明口服给予 OHP1 和 OHP2 可以显著控制健康小鼠对于葡萄糖的耐受，血糖上升程度远低于 Vehicle 对照组，仅略高于 Exendin-4 阳性药治疗组小鼠。

#### 实施例 5 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠体内对糖化血红蛋白水平控制的检测

第一步：动物分组及给药方案。db/db 自发糖尿病小鼠，6-7 周龄，雄性，40 只，适应环境饲养 1 周后测定空腹血糖，平均分至 5 组：Vehicle 对照组、Exendin-4 (0.10mg/kg) 皮下给药组、Liraglutide (0.20mg/kg) 皮下给药组、OHP1 (2.12mg/kg) 灌胃给药组、OHP2 (2.12mg/kg) 灌胃给药组，每组 8 只。另设 db/m 非糖尿病对照组小鼠 8 只作为正常对照。各给药组小鼠每天早晚各给药一次。

第二步：连续给药 8 周结束后对每组小鼠进行眼眶静脉丛取血，置于预先处理的抗凝管中，取样后迅速低温离心，取上清按糖化血红蛋白试剂盒中的步骤测定各组动物的糖化血红蛋白水平。注：本实施例中采用糖化血红蛋白试剂盒。

实验结果如图 3 所示，至八周治疗结束时，db/m 组小鼠的糖化血红蛋白水平为  $3.45 \pm 0.38\%$  (n=8)，仍处于正常范围内。db/db 各组动物中，Vehicle 对照组小鼠的糖化血红蛋白水平达到  $10.96 \pm 1.65\%$  (n=8)，阳性药 Liraglutide 和 Exendin-4 皮下注射给药组小鼠的糖化血红蛋白水平则维持在  $7.54 \pm 1.18\%$  (n=8) 和  $8.01 \pm 1.61\%$  (n=8)，具有显著的治疗效果，OHP1 和 OHP2 灌胃给药组小鼠的糖化血红蛋白水平分别为  $8.90 \pm 0.71\%$  (n=8) 和  $8.95 \pm 1.33\%$  (n=8)。通过分析结果可知，OHP1 和 OHP2 对 db/db 小鼠的糖化血红蛋白水平具有显著的治疗效果，且治疗效果与阳性药组相当，二者间无显著性差异。

#### 实施例 6 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠体内对胰岛素抵抗改善水平的检测

第一步：动物分组及给药方案如实施例 5 所示。连续八周给药结束后，小鼠禁食 6 小时，每只动物腹腔注射 1.0 IU/kg 胰岛素，并开始计时。

第二步：给予胰岛素之后立刻通过尾静脉取血测定各组小鼠血糖水平，并于 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟处监测小鼠血糖水平。

第三步：以时间为横坐标，相比 0 时刻血糖的百分值为纵坐标，绘制时间-百分血糖曲线，并计算各只动物的曲线下面积 (AUC)，进一步对每组 AUC 结果进行显著性分析。

胰岛素耐量实验结果如图 4 所示，至八周治疗结束时，以各组小鼠正常状态下血糖水平为 100%。胰岛素注射 30 分钟后，各组小鼠血糖水平迅速下降；至 60 分钟时各组小鼠血糖水平达到最低值，其中 db/m 组小鼠为  $25.03 \pm 7.91\%$  (n=8)，各 db/db 组动物中，Vehicle

对照组为  $101.7 \pm 11.94\%$  ( $N=8$ )，阳性药 Liraglutide 和 Exendin-4 皮下注射组分别为  $76.08 \pm 16.4\%$  ( $n=8$ ) 和  $75.08 \pm 18.71\%$  ( $N=8$ )，结果表明二者均获得了较好的治疗效果。OHP1 与 OHP2 治疗组小鼠对胰岛素的响应与 Vehicle 组间均产生了显著性差异，分别为  $66.65 \pm 12.83\%$  ( $n=8$ ) 和  $74.98 \pm 9.43\%$  ( $n=8$ )，通过分析结果可知，OHP1 和 OHP2 对 db/db 小鼠的胰岛素抵抗情况具有显著的改善效果，且与阳性药组无显著性差异。60 分钟到 120 分钟时，各组小鼠血糖水平逐步恢复至胰岛素注射前水平。

#### 实施例 7 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠体内对血清胰岛素水平影响的检测

第一步：动物分组及给药方案如实施例 5 所示。连续八周给药结束后对各组小鼠进行眼眶静脉丛取血，并加入预先处理的抗凝管中，充分混匀后低温离心获取血浆样本。

第二步：按照胰岛素检测试剂盒说明书中的要求测定各样本血清胰岛素浓度。注：本实施例采用市售胰岛素检测试剂盒。

血清胰岛素水平检测实验结果如图 5 所示，至八周治疗结束时，db/m 小鼠血清中胰岛素水平为  $0.283 \pm 0.101$  ng/mL ( $n=8$ )，处于正常范围内。各组 db/db 小鼠中，Vehicle 对照组小鼠为  $6.91 \pm 2.81$  ng/mL ( $n=8$ )，其余各组均低于或显著低于这一水平：阳性药 Liraglutide 和 Exendin-4 皮下注射组分别为  $2.20 \pm 1.52$  ng/mL ( $n=8$ ) 和  $2.61 \pm 1.60$  ng/mL ( $n=8$ )，表明二者均获得了较好的治疗效果；OHP1 与 OHP2 治疗组小鼠对血清胰岛素水平分别为  $2.92 \pm 1.12$  ng/mL ( $n=8$ ) 和  $2.72 \pm 1.36$  ng/mL ( $n=8$ )，二者均接近阳性药结果且与阳性药治疗组无显著性差异。

#### 实施例 8 OHP1 与 OHP2 在 db/db 小鼠治疗结束后的胰脏、肾脏、肝脏化学染色结果

动物分组及给药方案如实施例 5 所示。连续给药八周后将小鼠处死，分离胰腺、肾脏、肝脏，分别储存于 4% 的中性甲醛中。经石蜡包埋固定后，利用组织切片机将各组织切成厚度为 6  $\mu$ m 的薄片，利用苏木精-伊红和油红染色方法染色后，用光学显微镜观察切片。

胰脏、肾脏和肝脏化学染色结果如图 6 所示。

结果表明 db/m 组小鼠胰岛大小正常，形态完整，胰岛  $\beta$  细胞均正常；db/db 小鼠中，Vehicle 对照组小鼠胰岛出现代偿性增大，多数胰岛  $\beta$  细胞消失。而 Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠胰岛均表现出一定的恢复，同样地 OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比，胰岛组织结构、胰岛  $\beta$  细胞病变均有所减轻，并且胰岛组织面积也恢复正常，说明 OHP1 和 OHP2 能够保护糖尿病模型小鼠胰岛  $\beta$  细胞，改善胰岛功能。

db/m 组小鼠的肾小球形态正常，肾小囊腔清晰；db/db 小鼠中，Vehicle 对照组小鼠肾小球出现明显增大现象，足细胞数量减少，并伴有一定程度的炎性浸润；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠肾小球形态均表现出一定的恢复，同样地 OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比，明显改善肾小球增大的现象，足细胞数量显著增多，说明 OHP1 和 OHP2 能够保护糖尿病小鼠肾脏病变，改善肾功能。

db/m 组小鼠的肝脏形态大小正常，肝脏中脂滴数量及大小均较小；db/db 小鼠中，Vehicle 对照组小鼠肝脏中脂肪区域显著增大，部分细胞形态受损；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠肝细胞形态均表现出一定的恢复，同样地 OHP1 和 OHP2 给药组

与 Vehicle 对照组相比,明显改善了肝脏脂肪堆积,几乎未观察到受损细胞,说明 OHP1 和 OHP2 能够保护糖尿病小鼠肝脏病变,改善肾功能。

#### 实施例 9 OHP1 和 OHP2 对 db/db 小鼠体重和进食量的影响结果

动物分组及给药方案如实施例 5 所示,并增加 TSME1 (2.12mg/kg) 灌胃给药组、IPCM1 (2.12mg/kg) 灌胃给药组。连续八周给药过程中持续监测小鼠体重和进食量变化,并进行统计学分析。

体重变化结果如图 7 所示,其中 db/m 组小鼠在整个给药周期中体重都显著低于 db/db 小鼠,8 周治疗结束后,Vehicle 对照组小鼠体重显著高于其余各给药组;Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠体重降低较为明显的降低,同样地 OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比明显抑制了体重增加的趋势,说明 OHP1 和 OHP2 能够有效降低糖尿病小鼠体重增加,缓解肥胖。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比,具有更好的体重控制效果。

进食量变化结果如图 8 所示,其中 db/m 组小鼠在整个给药周期中进食量都显著低于 db/db 小鼠,8 周治疗结束后,Vehicle 对照组小鼠进食量高于其余各给药组;Liraglutide 阳性药组的小鼠进食量出现了较为明显的降低而 Exendin-4 阳性药组进食量则无明显变化,OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比进食量显著降低,说明 OHP1 和 OHP2 能够有效降低糖尿病小鼠进食量,可能是体重控制的原因之一。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比,具有更好的进食量控制效果。

#### 实施例 10 OHP1 和 OHP2 对 db/db 小鼠脂代谢相关指标的影响结果

动物分组及给药方案与实施例 9 相同。连续给药八周后将小鼠处死,摘除眼球取全血,经离心分离取血清,根据试剂盒中的说明分别测定血清中总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、甘油三酯和游离脂肪酸含量。注:本实施例采用相应的市售试剂盒。

血清总胆固醇结果如图 9A 所示,其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后血清总胆固醇含量显著低于 db/db 小鼠,而 Vehicle 对照组小鼠血清总胆固醇含量则显著高于其余各给药组;Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠血清总胆固醇含量有所降低但与 Vehicle 组之间无显著性差异,OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比明显降低了血清总胆固醇含量,说明 OHP1 和 OHP2 能够有效降低糖尿病小鼠血清总胆固醇。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比,具有更好的血清总胆固醇降低效果。

血清低密度脂蛋白结果如图 9B 所示,其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后血清低密度脂蛋白含量显著低于 db/db 小鼠,而 Vehicle 对照组小鼠血清低密度脂蛋白含量则显著高于其余各给药组;Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠血清低密度脂蛋白含量有所降低但与 Exendin-4 给药组与 Vehicle 组之间无显著性差异,OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比显著降低了血清低密度脂蛋白含量,说明 OHP1 和 OHP2 能够有效降低糖尿病小鼠血清低密度脂蛋白。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比,具有更好的血清低密度脂蛋白降低效果。

血清高密度脂蛋白结果如图 9C 所示,其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后血清高密度脂蛋白含量高于 db/db 小鼠,而 Vehicle 对照组小鼠血清高密度脂蛋白含量则低于其余

各给药组；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠血清高密度脂蛋白含量有所升高但与 Vehicle 组之间无显著性差异，OHP1 和 OHP2 给药组血清高密度脂蛋白含量同样较 Vehicle 对照组高但无显著性差异，说明 OHP1 和 OHP2 对糖尿病小鼠血清高密度脂蛋白无显著影响。上述结果同 TSME1、IPCM1 相当。

血清甘油三酯结果如图 9D 所示，其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后血清甘油三酯含量低于 db/db 小鼠，而 Vehicle 对照组小鼠血清甘油三酯含量则高于其余各给药组；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠血清甘油三酯含量有所降低但与 Vehicle 组之间无显著性差异，OHP1 和 OHP2 给药组血清甘油三酯含量同样较 Vehicle 对照组低但无显著性差异，说明 OHP1 和 OHP2 对糖尿病小鼠血清甘油三酯无显著影响。上述结果同 TSME1、IPCM1 相当。

血清游离脂肪酸结果如图 9E 所示，其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后血清游离脂肪酸含量显著低于 db/db 小鼠，而 Vehicle 对照组小鼠血清游离脂肪酸含量则显著高于其余各给药组；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠血清游离脂肪酸含量显著低于 Vehicle 组，OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比同样显著降低了血清游离脂肪酸含量，说明 OHP1 和 OHP2 能够有效降低糖尿病小鼠血清游离脂肪酸。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比，具有更好的血清游离脂肪酸降低效果。

#### **实施例 11 OHP1 和 OHP2 对 db/db 小鼠能量代谢相关指标的影响结果**

动物分组及给药方案与实施例 9 相同。连续给药八周后将小鼠转移至代谢分析系统中，适应环境 3 天后，连续测定 3 天内小鼠的代谢水平变化，包括氧气消耗量、二氧化碳生成量、呼吸交换率和产热量。

氧气消耗量结果如图 10A 所示，其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后氧气消耗量显著高于 db/db 小鼠，而 Vehicle 对照组小鼠氧气消耗量则显著低于其余各给药组；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠氧气消耗量显著高于 Vehicle 组，OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比同样显著提高了氧气消耗量，说明 OHP1 和 OHP2 能够有效增加糖尿病小鼠氧气消耗量，可能与脂肪组织中线粒体修复有关，从而解释减重的可能机制。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比，具有更好的氧气消耗量改善效果。

二氧化碳生成量结果如图 10B 所示，其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后二氧化碳生成量显著高于 db/db 小鼠，而 Vehicle 对照组小鼠二氧化碳生成量则显著低于其余各给药组；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠二氧化碳生成量显著高于 Vehicle 组，OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比同样显著提高了二氧化碳生成量，说明 OHP1 和 OHP2 能够有效增加糖尿病小鼠二氧化碳生成量，与上述氧气消耗量一致。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比，具有更好的二氧化碳生成量改善效果。

呼吸交换率结果如图 10C 所示，其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后呼吸交换率显著高于 db/db 小鼠，而所有 db/db 之间呼吸交换率均无显著差异，说明 OHP1 和 OHP2 对糖尿病小鼠呼吸交换率无显著影响。上述结果同 TSME1、IPCM1 相当。

产热量结果如图 10D 所示，其中 db/m 组小鼠 8 周连续治疗结束后产热量显著高于

db/db 小鼠，而 Vehicle 对照组小鼠产热量则显著低于其余各给药组；Liraglutide 和 Exendin-4 阳性药组的小鼠产热量显著高于 Vehicle 组，OHP1 和 OHP2 给药组与 Vehicle 对照组相比同样显著提高了产热量，说明 OHP1 和 OHP2 能够有效增加糖尿病小鼠产热量，与上述氧气消耗量及二氧化碳生成量一致，间接说明了 OHP1 和 OHP2 的减重作用。上述结果同 TSME1、IPCM1 相比，具有更好的产热量改善效果。

### 实施例 12 荧光酶标仪检测细胞内吞抑制剂对 OHP1、OHP2、TSME1、IPCM1 在肠道上皮细胞水平上吸收的影响

第一步：结直肠癌上皮细胞（Caco-2 细胞）经复苏并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养至第三代后开始铺板测定内吞抑制剂对 OHP1、OHP2、TSME1、IPCM1 吸收的影响。

第二步：先用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，再加入含 10% 胎牛血清的完全培养基制备单细胞悬液。以  $2 \times 10^5$  个细胞/mL 的浓度将细胞液接种于 96 孔板中，每孔接种 100  $\mu$ L，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 2 天。

第三步：实验开始前先弃去孔中培养基，向每孔加入和一定浓度的内吞抑制剂并用 HBSS 缓冲液补足体积至 100  $\mu$ L，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 30min 后，再向每孔中加入 5  $\mu$ g FITC 标记的 OHP1 或 OHP2，继续置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 2 h。

第四步：从培养箱取出 96 孔板，弃去孔内缓冲液，向每孔中加入 30  $\mu$ L RAPI 裂解液，室温孵育 5 min 后，吸取 10  $\mu$ L 细胞裂解液置于 96 孔黑板中，再加入 90  $\mu$ L HBSS 缓冲液将其稀释 10 倍后经荧光酶标仪测定响应的荧光强度，同时再据 BCA 法测定各孔细胞裂解液中的总蛋白含量。

第五步：根据已知浓度的多肽计算各孔中 OHP1 或 OHP2 多肽含量，并根据总蛋白含量计算各内吞抑制剂对 OHP1 或 OHP2 内吞的抑制率。

内吞抑制剂对 OHP1、OHP2、TSME1、IPCM1 内吞的抑制作用检测实验结果如图 11 所示。

对于 OHP1 和 OHP2 而言，在 Amiloride、Chlorpromazine、Dynasore、Choroquine、Genisten 存在的条件下，OHP1 和 OHP2 均未表现出明显的内吞抑制，而 2-deoxy-D-glucose、Nystain、methly- $\beta$ -cyclodextrin 抑制剂均对 OHP1 和 OHP2 表现出显著的抑制作用，前者作用靶点为能量代谢相关转胞吞途径，而后两种抑制剂的作用靶点均为小窝蛋白介导的转胞吞作用，提示 OHP1 和 OHP2 均可通过能量代谢相关途径和小窝蛋白介导转运入胞内。

对于 TSME1 而言，只有 Nystain 和 methly- $\beta$ -cyclodextrin 抑制剂对其表现出显著的抑制作用，这两种抑制剂的作用靶点均为小窝蛋白介导的转胞吞作用，提示 TSME1 可能仅通过小窝蛋白介导转运入胞内。

对于 IPCM1 而言，只有 2-deoxy-D-glucose 抑制剂对其表现出显著的抑制作用，这种抑制剂的作用靶点为能量代谢相关转胞吞途径，提示 IPCM1 可能仅通过能量代谢相关途径转运入胞内。

综合上述结果可以看出，OHP1 和 OHP2 不论相较于 TSME1 还是 IPCM1 都具有更多的吸收途径，更加适合用于口服药物开发。

### 实施例 13 流式细胞术检测细胞内吞抑制剂对 OHP1、OHP2、TSME1、IPCM1 在肠道上皮细胞水平上吸收的影响

第一步：结直肠癌上皮细胞（Caco-2 细胞）经复苏并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养至第三代后开始铺板。

第二步：先用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，再加入含 10% 胎牛血清的完全培养基制备单细胞悬液。以  $1 \times 10^5$  个细胞/mL 的浓度将细胞液接种于 24 孔板中，每孔接种 1.0 mL，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 3 天。

第三步：实验开始前先弃去孔中培养基，向每孔加入和一定浓度的内吞抑制剂并用 HBSS 缓冲液补足体积至 1.0 mL，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 30 min 后，再向每孔中加入 5  $\mu$ g FITC 标记的 OHP1、OHP2、TSME1、或 IPCM1，继续置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育 2 h。

第四步：从培养箱取出 24 孔板，弃去孔内缓冲液，向每孔中加入 500  $\mu$ L 胰酶，37 °C 消化 2min 后，弃去孔内胰酶，再向每孔中加入 1.0 mL HBSS 缓冲液将细胞吹洗至 EP 管中，样品洗涤三次后经流式细胞术检测。

内吞抑制剂对 OHP1 和 OHP2 内吞的抑制作用检测实验结果分别如图 12A&B 所示，在 Amiloride、Chlorpromazine、Dynasore、Choroquine 存在的条件下，OHP1 和 OHP2 均未表现出明显的内吞抑制，而 2-deoxy-D-glucose、Genisten Nystain、methly- $\beta$ -cyclodextrin 抑制剂均对 OHP1 和 OHP2 表现出显著的抑制作用，结果与实施例 12 中一致，OHP1 和 OHP2 均可通过能量代谢相关途径和小窝蛋白介导转运入胞内。

内吞抑制剂对 TSME1 内吞的抑制作用检测实验结果如图 12C 所示，Nystain 和 methly- $\beta$ -cyclodextrin 这两种抑制剂均对 TSME1 表现出显著的抑制作用，结果与实施例 12 中一致，TSME1 可能仅通过小窝蛋白介导转运入胞内。

内吞抑制剂对 IPCM1 内吞的抑制作用检测实验结果如图 12D 所示，2-deoxy-D-glucose、这种抑制剂对 IPCM1 表现出显著的抑制作用，结果与实施例 12 中一致，IPCM1 可能仅通过能量代谢相关途径转运入胞内。

综合上述结果同样可以看出，OHP1 和 OHP2 不论相较于 TSME1 还是 IPCM1 都具有更多的吸收途径，更加适合于作为口服药物，与实施例 12 中结论一致。

### 实施例 14 OHP1 与 OHP2 其药物组合物在体外单细胞层模型中促进多肽吸收能力的测定

第一步：结直肠癌上皮细胞（Caco-2 细胞）经复苏并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养至第三代后开始铺板构建细胞模型。

第二步：先用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞，再加入含 10% 胎牛血清的完全培养基制备单细胞悬液。以  $2 \times 10^5$  个细胞/mL 的浓度将细胞液接种于 Transwell 小室中，每室接种 250  $\mu$ L，于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 21 天，每隔 2 天换液一次。

第三步：Transwell 模型建立成功后，向每个 Transwell 小室上室中加入 200  $\mu$ L HBSS 溶液和 40  $\mu$ g OHP1 或 OHP2 或二者的药物复合物，向下室加入 1.3mL HBSS 溶液，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养，并记为 0 时刻，在第 1h、2h、3h、4h 和 8h 时间点从下室取

样 100  $\mu$ L 保存于黑板中。

第四步：于荧光酶标仪测定每孔的荧光发光强度，并根据已知浓度的多肽计算各下室的多肽浓度，在此基础上根据 OHP1 与 OHP2 及其药物组合物在 8h 时下室多肽转运量的差异计算药物组合物的促吸收效率。

结果如下所示。

| OHP1 药物组合物                 | 药物组合物中药物占比 | 促吸收效率 |
|----------------------------|------------|-------|
| OHP1+低分子量壳聚糖               | 28.6 %     | 5.54  |
| OHP1+EDTA                  | 40.7 %     | 0.88  |
| OHP1+脱氧胆酸钠                 | 70.9 %     | 1.78  |
| OHP1+SDS                   | 93.4 %     | 0.92  |
| OHP1+十六烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷 | 87.0 %     | 1.04  |
| OHP1+SNAC                  | 7.41 %     | 3.79  |

| OHP2 药物组合物                 | 药物组合物中药物占比 | 促吸收效率 |
|----------------------------|------------|-------|
| OHP2+低分子量壳聚糖               | 28.6 %     | 5.88  |
| OHP2+EDTA                  | 40.7 %     | 0.99  |
| OHP2+脱氧胆酸钠                 | 70.9 %     | 1.25  |
| OHP2+SDS                   | 93.4 %     | 0.97  |
| OHP2+十六烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷 | 87.0 %     | 0.90  |
| OHP2+SNAC                  | 7.41 %     | 3.54  |

由上述结果可知，OHP1 与 OHP2 在形成药物组合物后，在体外 Transwell 模型上的吸收会存在一定的增加，具体表现为当 OHP1 和 OHP2 与低分子量壳聚糖（sigma）或 SNAC 构成药物组合物时，二者的吸收均有明显的提高，而与 EDTA、脱氧胆酸钠、SDS、十六烷基- $\beta$ -D-麦芽糖苷构成药物组合物时，二者的吸收则无明显的增强，提示 OHP1 和 OHP2 与低分子量壳聚糖（sigma）或 SNAC 组成的药物组合物具有较高的吸收效率。

#### 实施例 15 其他多肽的抗酶解能力测定和激活胰高血糖素样肽-1 受体能力测定

发明人在研究中涉及的多肽如下表所示：

| 编号    | Xaa1 | Xaa2 | Xaa3 |
|-------|------|------|------|
| OHP1  | Met  | Arg  | Met  |
| OHP2  | Ser  | Lys  | Val  |
| OHP3  | Val  | Tyr  | Lys  |
| OHP4  | Ser  | Arg  | Ile  |
| OHP5  | Ile  | Leu  | Val  |
| OHP6  | Lys  | Val  | Met  |
| OHP7  | Met  | Leu  | Met  |
| OHP8  | Val  | Arg  | Met  |
| OHP9  | Ile  | Leu  | Ile  |
| OHP10 | Ser  | Tyr  | Lys  |
| OHP11 | Met  | Arg  | Lys  |
| OHP12 | Lys  | Arg  | Val  |
| OHP13 | Met  | Tyr  | Met  |
| OHP14 | Met  | Tyr  | Ile  |
| OHP15 | Met  | Tyr  | Val  |
| OHP16 | Met  | Val  | Met  |
| OHP17 | Met  | Val  | Ile  |
| OHP18 | Met  | Val  | Val  |
| OHP19 | Met  | Val  | Lys  |

| 编号    | Xaa1 | Xaa2 | Xaa3 |
|-------|------|------|------|
| OHP20 | Met  | Lys  | Met  |
| OHP21 | Met  | Lys  | Ile  |
| OHP22 | Met  | Lys  | Val  |
| OHP23 | Met  | Lys  | Lys  |
| OHP24 | Met  | Leu  | Ile  |
| OHP25 | Val  | Leu  | Ile  |
| OHP26 | Val  | Leu  | Val  |
| OHP27 | Val  | Leu  | Lys  |
| OHP28 | Val  | Leu  | Met  |
| OHP29 | Val  | Arg  | Ile  |
| OHP30 | Val  | Arg  | Val  |
| OHP31 | Val  | Arg  | Lys  |
| OHP32 | Val  | Tyr  | Met  |
| OHP33 | Val  | Tyr  | Ile  |
| OHP34 | Val  | Tyr  | Val  |
| OHP35 | Lys  | Lys  | Val  |
| OHP36 | Val  | Val  | Met  |
| OHP37 | Val  | Val  | Ile  |
| OHP38 | Val  | Val  | Val  |
| OHP39 | Val  | Val  | Lys  |
| OHP40 | Val  | Lys  | Met  |
| OHP41 | Val  | Lys  | Ile  |
| OHP42 | Val  | Lys  | Val  |
| OHP43 | Val  | Lys  | Lys  |
| OHP44 | Ile  | Leu  | Met  |
| OHP45 | Met  | Leu  | Lys  |
| OHP46 | Met  | Leu  | Val  |
| OHP47 | Ile  | Leu  | Lys  |
| OHP48 | Ile  | Arg  | Met  |
| OHP49 | Ile  | Arg  | Ile  |
| OHP50 | Ile  | Arg  | Val  |
| OHP51 | Ile  | Arg  | Lys  |
| OHP52 | Ile  | Tyr  | Met  |
| OHP53 | Ile  | Tyr  | Ile  |
| OHP54 | Ile  | Tyr  | Val  |
| OHP55 | Ile  | Tyr  | Lys  |
| OHP56 | Ile  | Val  | Met  |
| OHP57 | Ile  | Val  | Ile  |
| OHP58 | Ile  | Val  | Val  |
| OHP59 | Ile  | Val  | Lys  |
| OHP60 | Ile  | Lys  | Met  |
| OHP61 | Ile  | Lys  | Ile  |
| OHP62 | Ile  | Lys  | Val  |
| OHP63 | Ile  | Lys  | Lys  |
| OHP64 | Met  | Arg  | Ile  |
| OHP65 | Ser  | Leu  | Ile  |
| OHP66 | Ser  | Leu  | Val  |
| OHP67 | Ser  | Leu  | Lys  |
| OHP68 | Ser  | Arg  | Met  |
| OHP69 | Ser  | Lys  | Met  |
| OHP70 | Ser  | Arg  | Val  |
| OHP71 | Ser  | Arg  | Lys  |
| OHP72 | Ser  | Tyr  | Met  |
| OHP73 | Ser  | Tyr  | Ile  |
| OHP74 | Ser  | Tyr  | Val  |
| OHP75 | Ser  | Leu  | Met  |

| 编号     | Xaa1 | Xaa2 | Xaa3 |
|--------|------|------|------|
| OHP76  | Ser  | Val  | Met  |
| OHP77  | Ser  | Val  | Ile  |
| OHP78  | Ser  | Val  | Val  |
| OHP79  | Ser  | Val  | Lys  |
| OHP80  | Ser  | Lys  | Ile  |
| OHP81  | Ser  | Lys  | Lys  |
| OHP82  | Met  | Arg  | Val  |
| OHP83  | Lys  | Leu  | Ile  |
| OHP84  | Lys  | Leu  | Val  |
| OHP85  | Lys  | Leu  | Lys  |
| OHP86  | Lys  | Arg  | Met  |
| OHP87  | Lys  | Arg  | Ile  |
| OHP88  | Lys  | Leu  | Met  |
| OHP89  | Lys  | Arg  | Lys  |
| OHP90  | Lys  | Tyr  | Met  |
| OHP91  | Lys  | Tyr  | Ile  |
| OHP92  | Lys  | Tyr  | Val  |
| OHP93  | Lys  | Tyr  | Lys  |
| OHP94  | Met  | Tyr  | Lys  |
| OHP95  | Lys  | Val  | Ile  |
| OHP96  | Lys  | Val  | Val  |
| OHP97  | Lys  | Val  | Lys  |
| OHP98  | Lys  | Lys  | Met  |
| OHP99  | Lys  | Lys  | Ile  |
| OHP100 | Lys  | Lys  | Lys  |

| Retention rate % | Trypsin       | Chymotrypsin  | Elastase      |
|------------------|---------------|---------------|---------------|
| OHP7             | 87.22 ± 5.49% | 4.17 ± 1.57%  | 67.13 ± 4.81% |
| OHP8             | 79.28 ± 8.39% | 10.24 ± 3.91% | 9.04 ± 4.18%  |
| OHP9             | 75.70 ± 1.65% | 32.56 ± 4.58% | 37.5 ± 0.37%  |
| OHP10            | 89.10 ± 2.39% | 51.79 ± 6.43% | 9.73 ± 9.29%  |
| OHP11            | 57.50 ± 1.51% | 2.82 ± 0.85%  | 59.40 ± 5.88% |
| OHP12            | 82.21 ± 8.76% | 39.75 ± 5.33% | 46.47 ± 9.82% |

上表序列除 OHP1-OHP6 外, 分别按实施例 1 方法测定抗酶解能力, 部分结果如下所示。

上表序列除 OHP1-OHP6 外, 分别按实施例 2 方法测定激活胰高血糖素样肽-1 受体能力, 部分结果如下所示。

|       | EC <sub>50</sub> (nmol/L) | Max Responses (% Exendin-4 Max) |
|-------|---------------------------|---------------------------------|
| OHP7  | 9.32                      | 96.20 ± 9.88                    |
| OHP8  | 6.36                      | 83.35 ± 5.65                    |
| OHP9  | 3.87                      | 87.20 ± 3.83                    |
| OHP10 | 25.3                      | 66.22 ± 2.88                    |
| OHP11 | 12.5                      | 80.88 ± 3.76                    |
| OHP12 | 22.8                      | 73.40 ± 7.68                    |

受篇幅所限, 此处不再一一列出其余化合物的具体实验数据。总而言之, 实验结果表明: 与 Exendin-4 相比, OHP7 至 OHP100 针对三种蛋白酶的抗性均有不同程度的提高; 同时, OHP7 至 OHP100 均具有激活胰高血糖素样肽-1 受体的能力, 可以认为这些候选分子均具有预防或治疗糖尿病、降血糖的药用前景。

#### 实施例 16 脂肪酸修饰衍生物的抗酶解能力和激活胰高血糖素样肽-1 受体能力

从 OHP1 至 OHP100 中选取符合条件的多肽(即 Xaa1、Xaa2、Xaa3 中至少一个为 Lys), 对这些多肽分别进行脂肪酸修饰(采用的脂肪酸为: 10-(4-羧基苯氧基)癸酸、或 17-羧基十七烷酸), 修饰过程中, 脂肪酸与修饰位点氨基酸的氨基氮原子通过 [2-(2-{2-[2-(2-{2-[-4-羧基-4-(氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基]相连, 所得各脂肪酸衍生物中具体脂肪酸和修饰位点如下表所示。

| 衍生物编号 | 多肽序号  | 具体脂肪酸          | 修饰位点        |
|-------|-------|----------------|-------------|
| FAD1  | OHP2  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2        |
| FAD2  | OHP2  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD3  | OHP3  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD4  | OHP3  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD5  | OHP6  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1        |
| FAD6  | OHP6  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1        |
| FAD7  | OHP9  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD8  | OHP9  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD9  | OHP12 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD10 | OHP19 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD11 | OHP20 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD12 | OHP21 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD13 | OHP22 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2        |
| FAD14 | OHP23 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2        |
| FAD15 | OHP23 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD16 | OHP23 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2 和 Xaa3 |
| FAD17 | OHP27 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD18 | OHP31 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD19 | OHP35 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1 和 Xaa2 |
| FAD20 | OHP39 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD21 | OHP40 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD22 | OHP41 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD23 | OHP42 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD24 | OHP43 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2 和 Xaa3 |
| FAD25 | OHP47 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD26 | OHP51 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD27 | OHP55 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD28 | OHP59 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD29 | OHP60 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD30 | OHP61 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2        |
| FAD31 | OHP62 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2        |
| FAD32 | OHP63 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2 和 Xaa3 |
| FAD33 | OHP67 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD34 | OHP69 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2        |
| FAD35 | OHP71 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD36 | OHP75 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3        |
| FAD37 | OHP79 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3        |
| FAD38 | OHP80 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2        |
| FAD39 | OHP81 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa2 和 Xaa3 |
| FAD40 | OHP82 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1        |
| FAD41 | OHP83 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1        |

| 衍生物编号 | 多肽序号   | 具体脂肪酸          | 修饰位点             |
|-------|--------|----------------|------------------|
| FAD42 | OHP84  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1             |
| FAD43 | OHP85  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1 和 Xaa3      |
| FAD44 | OHP86  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1             |
| FAD45 | OHP87  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1             |
| FAD46 | OHP88  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1             |
| FAD47 | OHP89  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1 和 Xaa3      |
| FAD48 | OHP90  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1             |
| FAD49 | OHP91  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1             |
| FAD50 | OHP92  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1             |
| FAD51 | OHP93  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1 和 Xaa3      |
| FAD52 | OHP94  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa3             |
| FAD53 | OHP95  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1             |
| FAD54 | OHP96  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1             |
| FAD55 | OHP97  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1 和 Xaa3      |
| FAD56 | OHP98  | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1 和 Xaa2      |
| FAD57 | OHP99  | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1 和 Xaa2      |
| FAD58 | OHP100 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1             |
| FAD59 | OHP100 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2             |
| FAD60 | OHP100 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa3             |
| FAD61 | OHP100 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa1 和 Xaa2      |
| FAD62 | OHP100 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1 和 Xaa3      |
| FAD63 | OHP100 | 10-(4-羧基苯氧基)癸酸 | Xaa2 和 Xaa3      |
| FAD64 | OHP100 | 17-羧基十七烷酸      | Xaa1、Xaa2 和 Xaa3 |

上表序列分别按实施例 1 方法测定抗酶解能力,并分别按实施例 2 方法测定激活胰高血糖素样肽-1 受体能力。

受篇幅所限,此处不再一一列出具体实验数据。总而言之,实验结果表明:与 Exendin-4 相比,FAD1 至 FAD64 针对三种蛋白酶的抗性均有不同程度的提高;同时,FAD1 至 FAD64 均具有激活胰高血糖素样肽-1 受体的能力,可以认为这些候选分子均具有预防或治疗糖尿病、降血糖的药用前景。

由此可见,对于如 SEQ ID NO.1 所示通式,当 Xaa1、Xaa2、Xaa3 之一或其任意组合为 Lys 时,以 10-(4-羧基苯氧基)癸酸或 17-羧基十七烷酸对其进行修饰,所得脂肪酸修饰衍生物仍然具备蛋白酶抗性和激活胰高血糖素样肽-1 受体的能力。

除上述实施例外,本发明还可以有其他实施方式。凡采用等同替换或等效变换形成的技术方案,均落在本发明要求的保护范围。

### 序列表

<110> 中国药科大学

<120> 口服降糖肽、其脂肪酸衍生物及用途

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (12).. (12)

<223> Xaa 为 Met、Val、Ile、Ser 或 Lys

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (20).. (20)

<223> Xaa 为 Leu、Arg、Tyr、Val 或 Lys

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (27).. (27)

<223> Xaa 为 Met、Ile、Val 或 Lys

<400> 1

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

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Glu Phe Ile Glu Trp Leu Xaa Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35 40

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Met Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Glu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35 40

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35 40

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Val Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Tyr Glu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35 40

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 5

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ser Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Glu Phe Ile Glu Trp Leu Ile Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35 40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 6

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ile Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Leu Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Asn Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35

40

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

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

1

5

10

15

Glu Ala Val Val Glu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys

35

40

## 权 利 要 求 书

1. 一种口服降糖肽，其特征是，具有如下氨基酸序列：

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Xaa1-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Xaa2-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Xaa3-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys，其中，

Xaa1 为 Met、Val、Ile、Ser 或 Lys；

Xaa2 为 Leu、Arg、Tyr、Val 或 Lys；

Xaa3 为 Met、Ile、Val 或 Lys。

2. 根据权利要求 1 所述的口服降糖肽，其特征是，

Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Met；

或者，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Lys，且 Xaa3 为 Val；

或者，Xaa1 为 Val，Xaa2 为 Tyr，且 Xaa3 为 Lys；

或者，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Ile；

或者，Xaa1 为 Ile，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Val；

或者，Xaa1 为 Lys，Xaa2 为 Val，且 Xaa3 为 Met；

或者，Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Met；

或者，Xaa1 为 Val，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Met；

或者，Xaa1 为 Ile，Xaa2 为 Leu，且 Xaa3 为 Ile；

或者，Xaa1 为 Ser，Xaa2 为 Tyr，且 Xaa3 为 Lys；

或者，Xaa1 为 Met，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Lys；

或者，Xaa1 为 Lys，Xaa2 为 Arg，且 Xaa3 为 Val。

3. 一种口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物，其特征是，所述多肽为权利要求 1 或 2 所述的口服降糖肽；所述脂肪酸的修饰位点为 Xaa1、Xaa2、Xaa3 之一或其任意组合；当 Xaa1 为修饰位点时 Xaa1 为 Lys，当 Xaa2 为修饰位点时 Xaa2 为 Lys，当 Xaa3 为修饰位点时 Xaa3 为 Lys。

4. 根据权利要求 3 所述的口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物，其特征是，所述脂肪酸为 10-(4-羧基苯氧基)癸酸或 17-羧基十七烷酸；所述脂肪酸经[2-(2-{2-[2-(2-{2-[-4-羧基-4-(氨基)丁酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基}乙氧基)乙酰基]与修饰位点氨基酸的氨基氮原子相连。

5. 权利要求 1 或 2 所述口服降糖肽、或者权利要求 3 或 4 所述口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物用途，其特征是，所述用途为用于制备预防或治疗糖尿病的药物或药物组合物、或用于制备降血糖的药物或药物组合物。

6. 一种药物组合物，其特征是，含有权利要求 1 或 2 所述口服降糖肽、或者权利要求 3 或 4 所述口服降糖肽脂肪酸修饰衍生物。
7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征是，所述药物组合物还含有促吸收剂。
8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物，其特征是，所述促吸收剂为低分子量壳聚糖或 SNAC。
9. 权利要求 6 或 7 或 8 所述的药物组合物的用途，其特征是，所述用途为用于制备预防或治疗糖尿病的药剂、或用于制备降血糖的药剂。
10. 根据权利要求 9 所述的用途，其特征是，所述药剂的剂型为经胃肠道给药剂型或非经胃肠道给药剂型。
11. 根据权利要求 5 或 9 或 10 所述的用途，其特征是，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

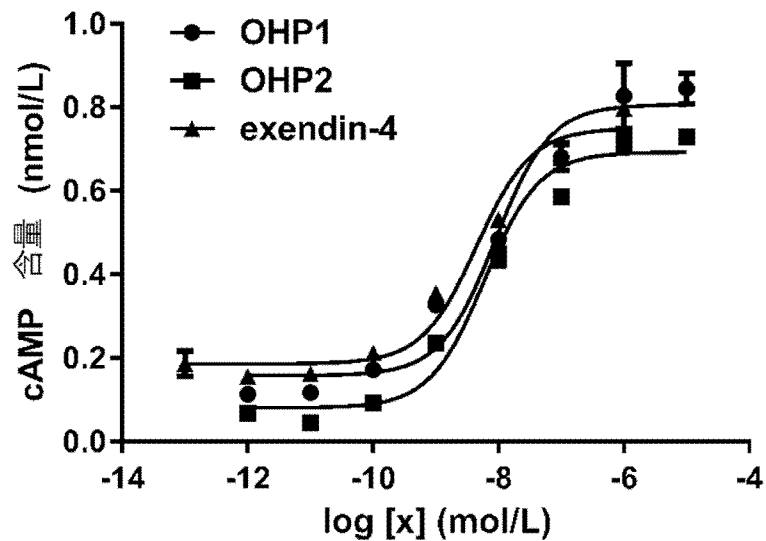


图 1

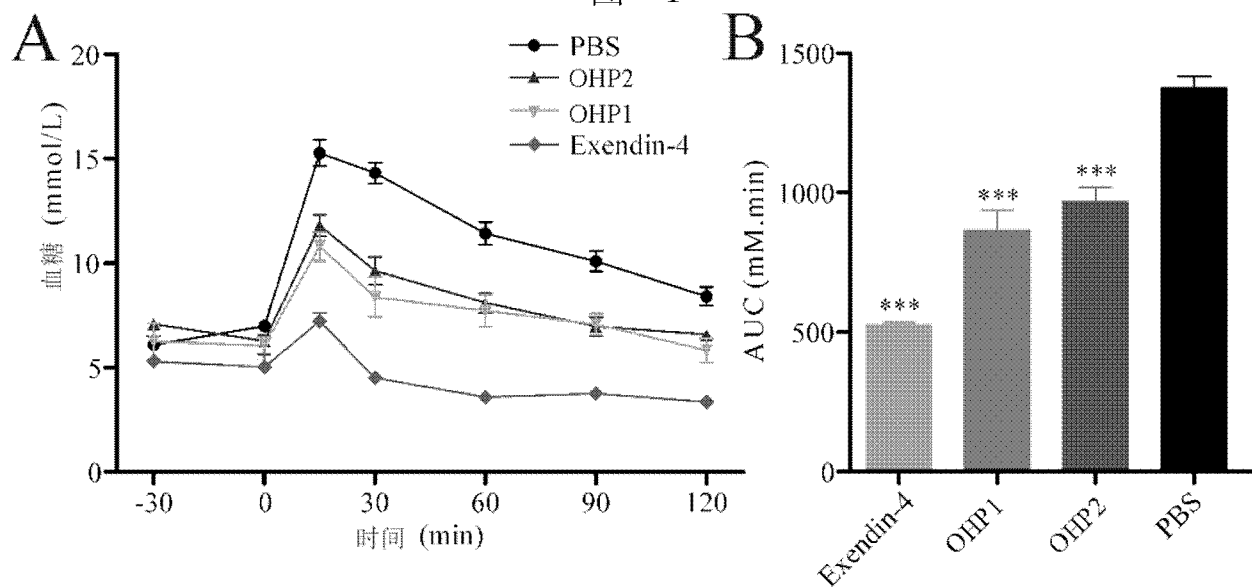


图 2

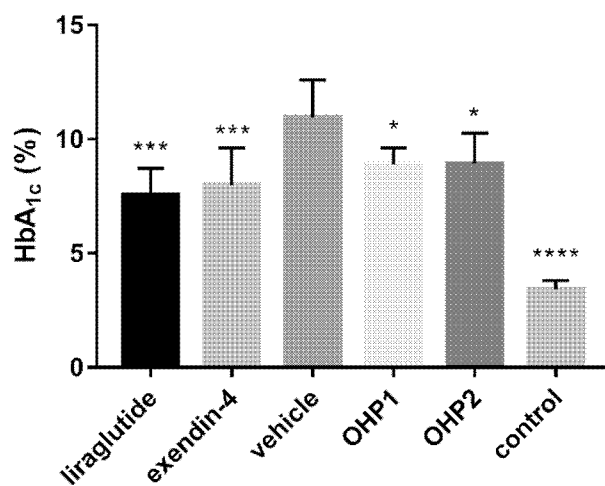


图 3

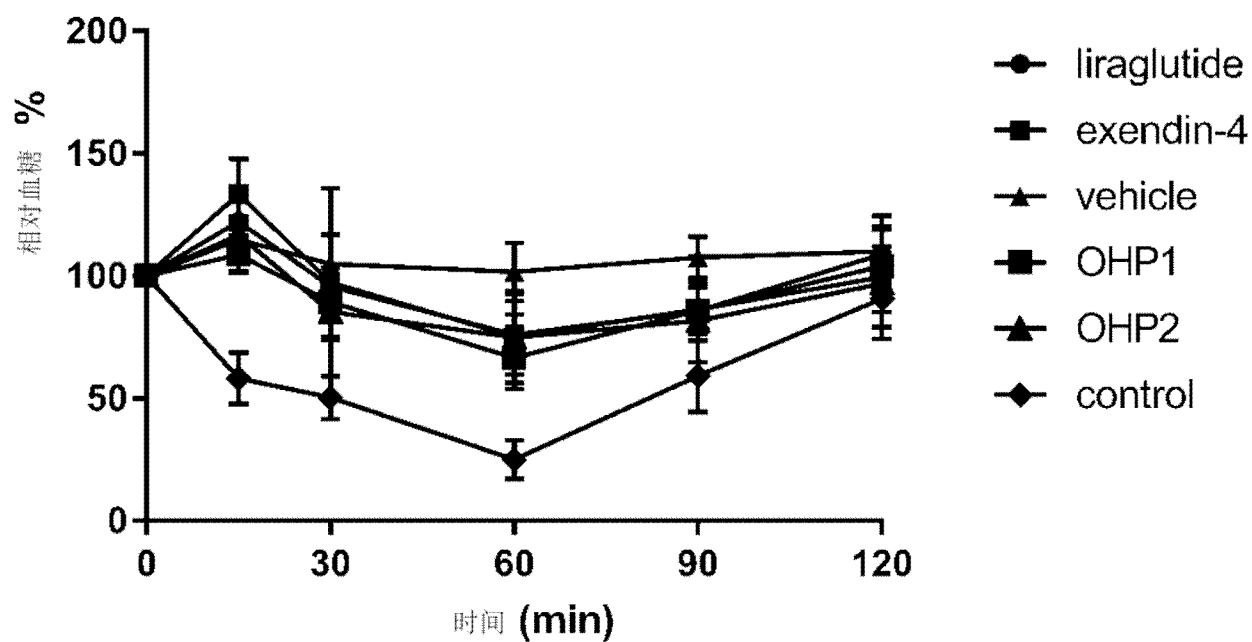


图 4

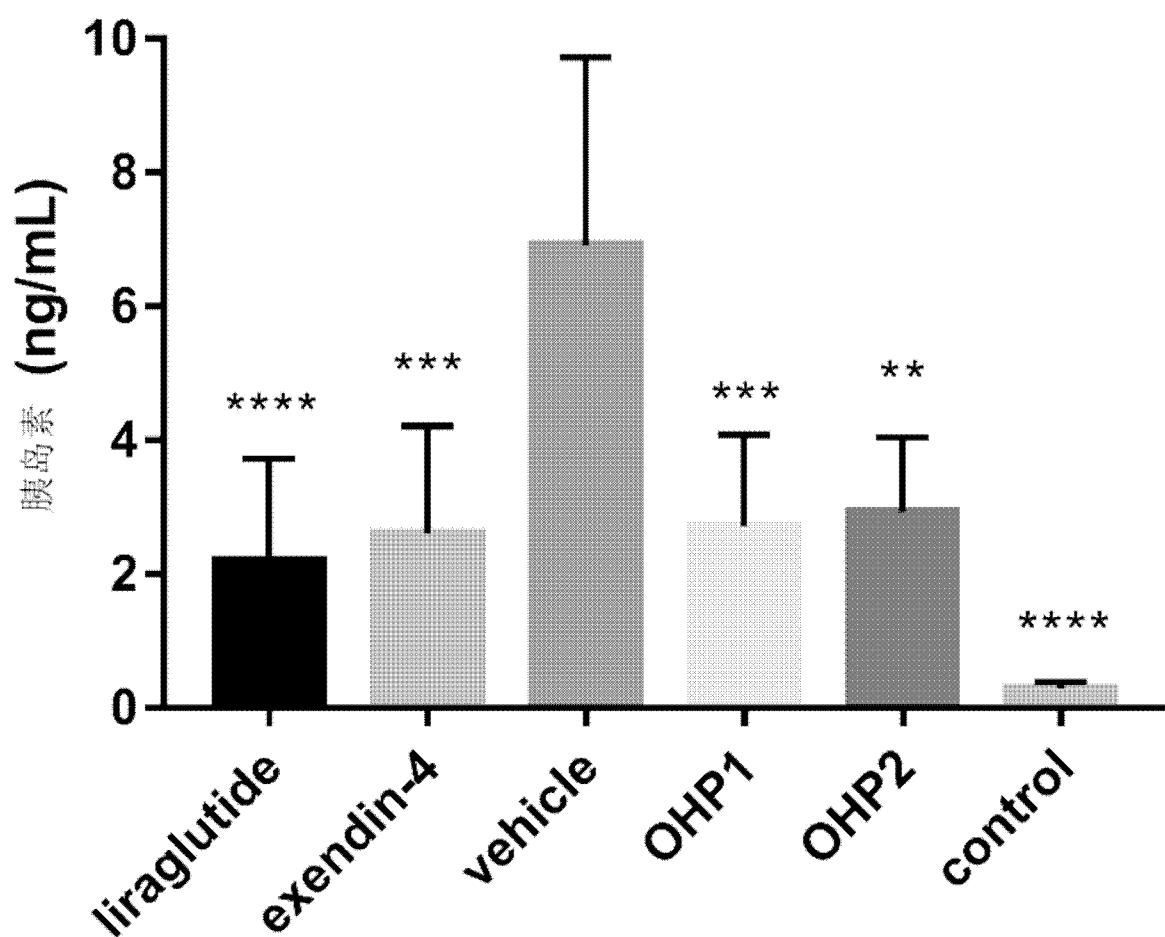


图 5

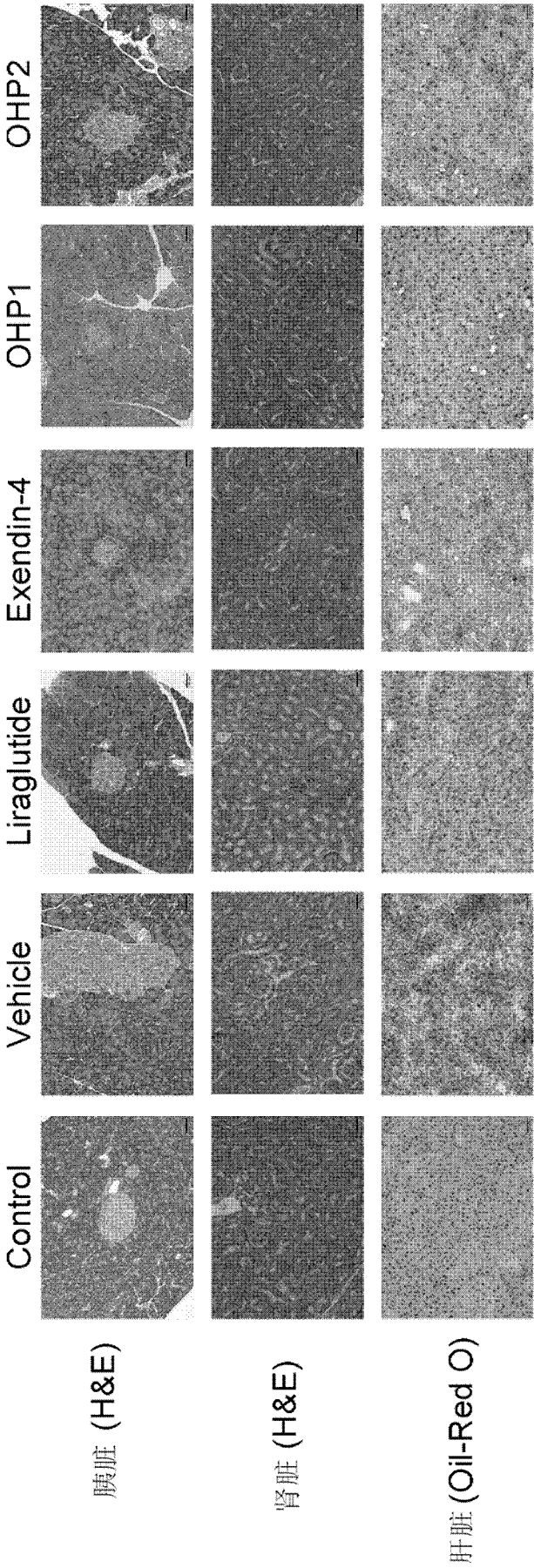


图 6

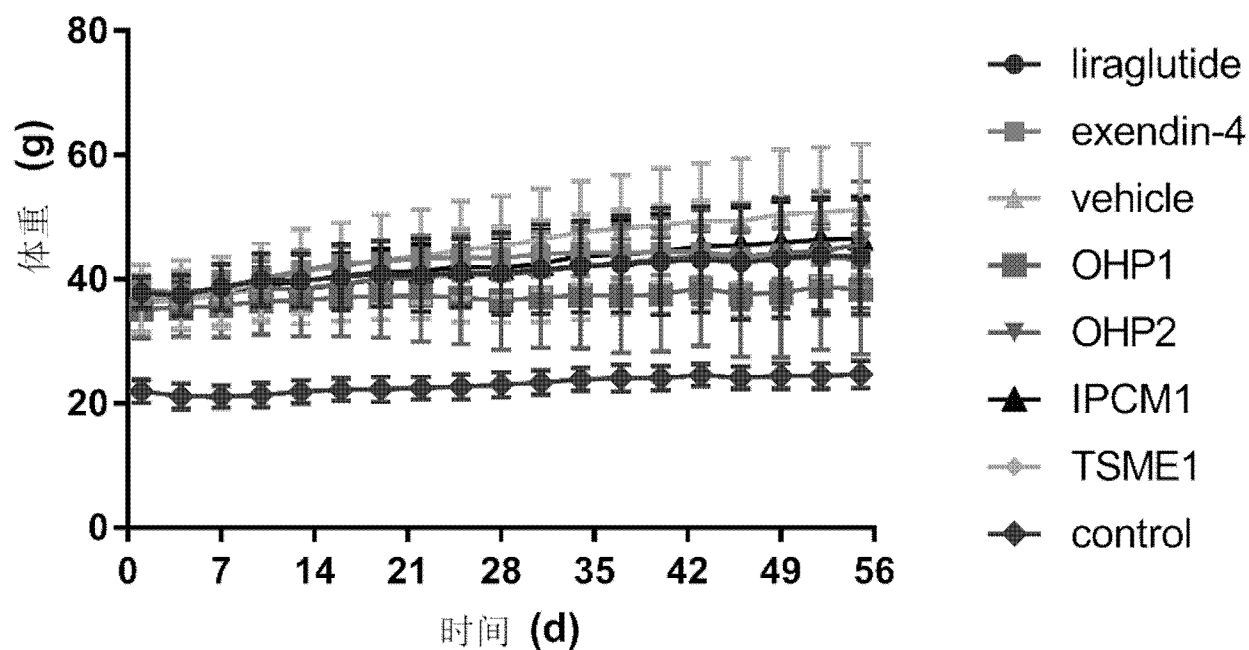


图 7

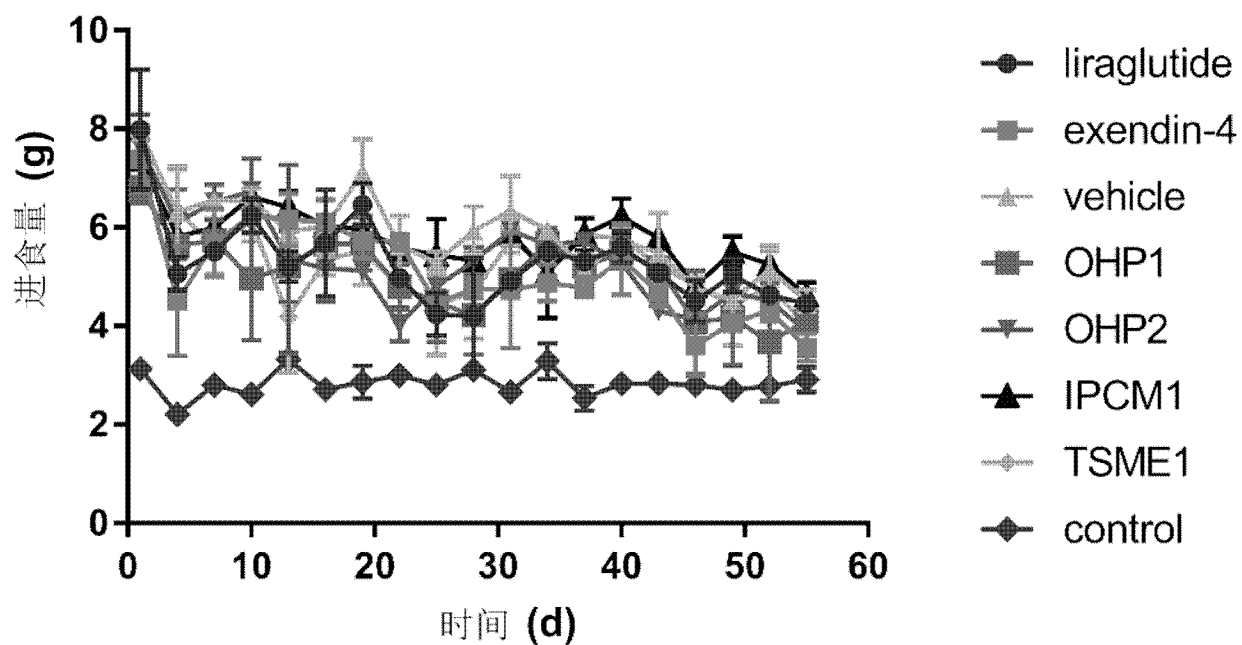


图 8

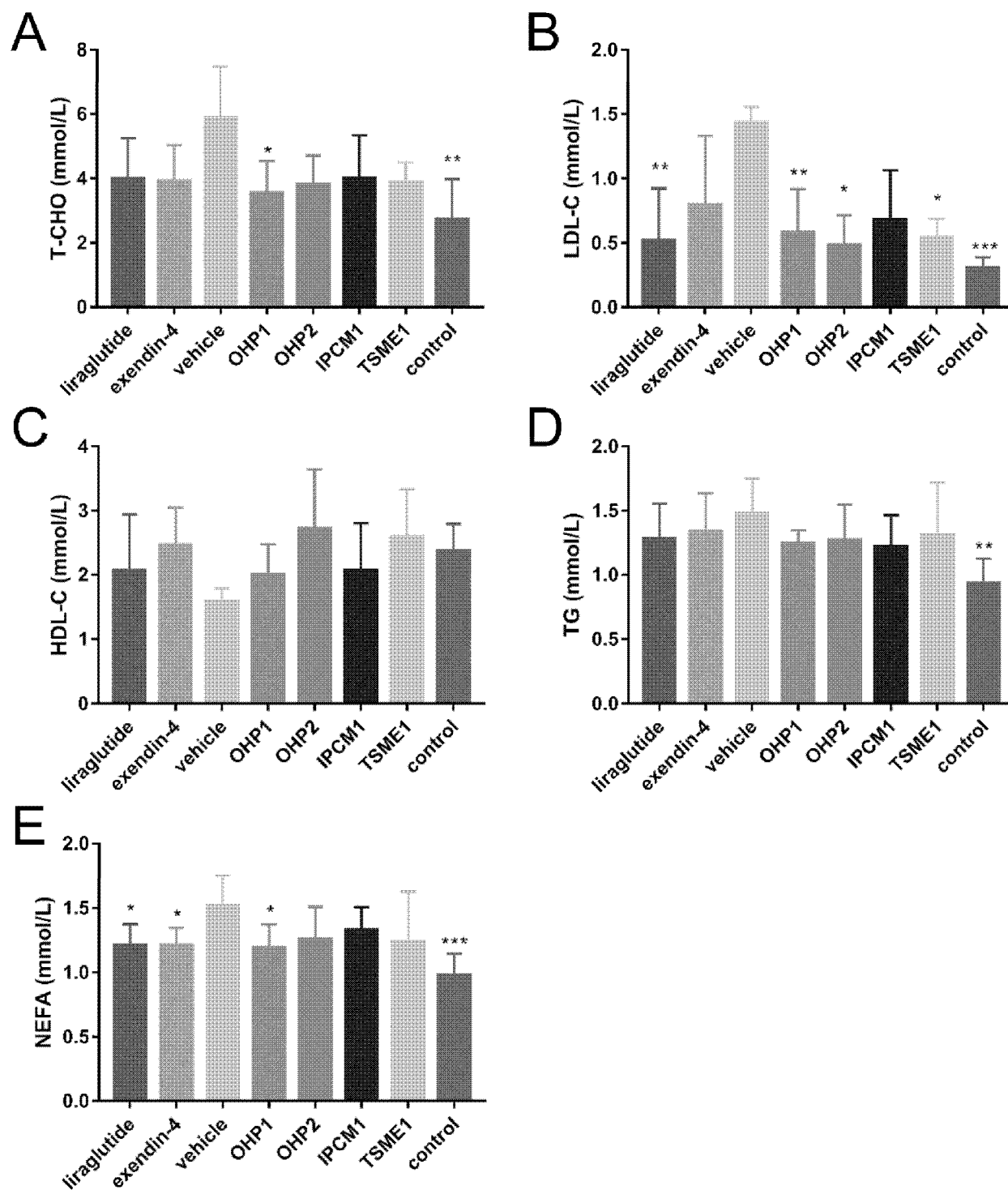
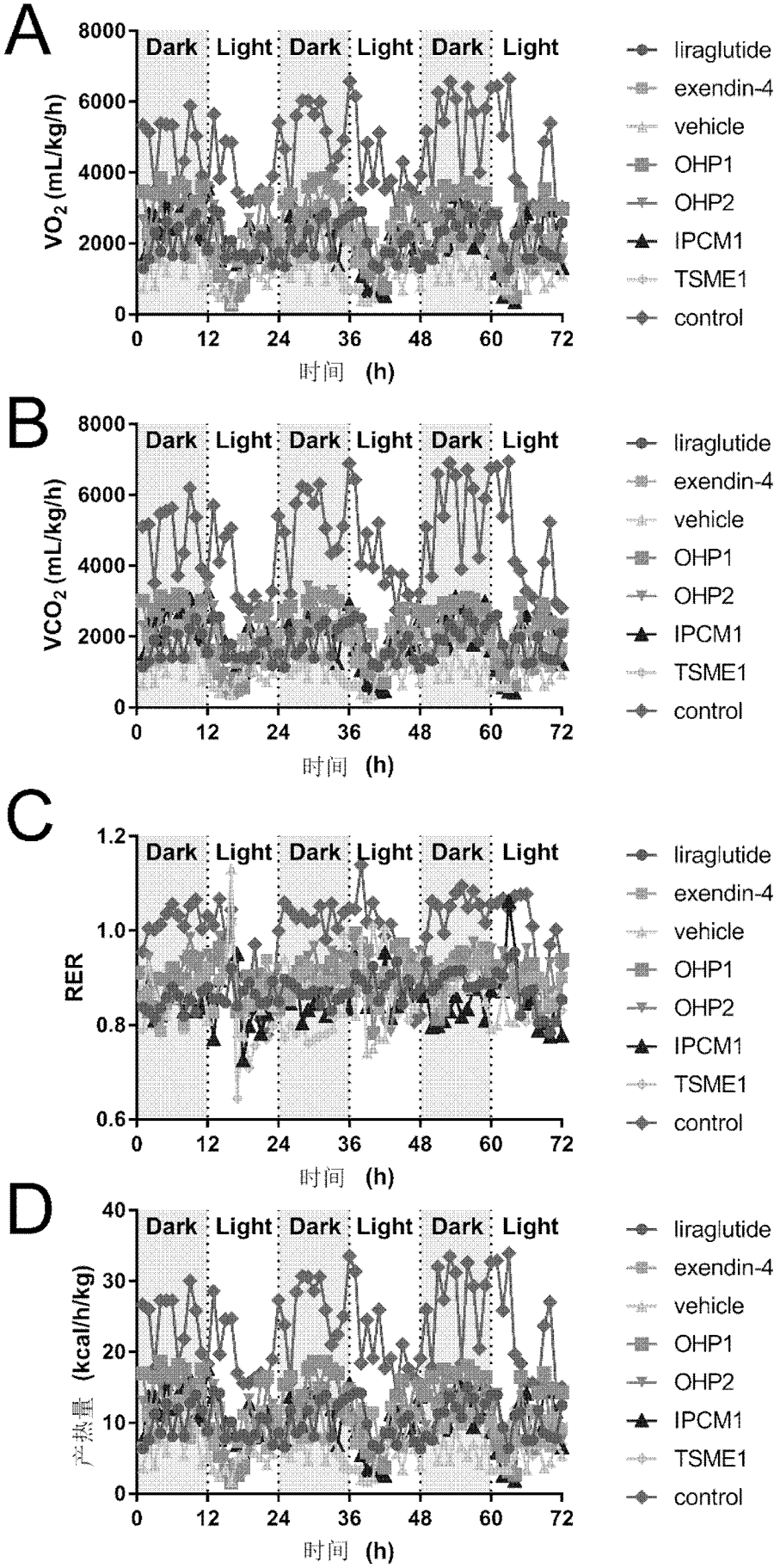


图 9



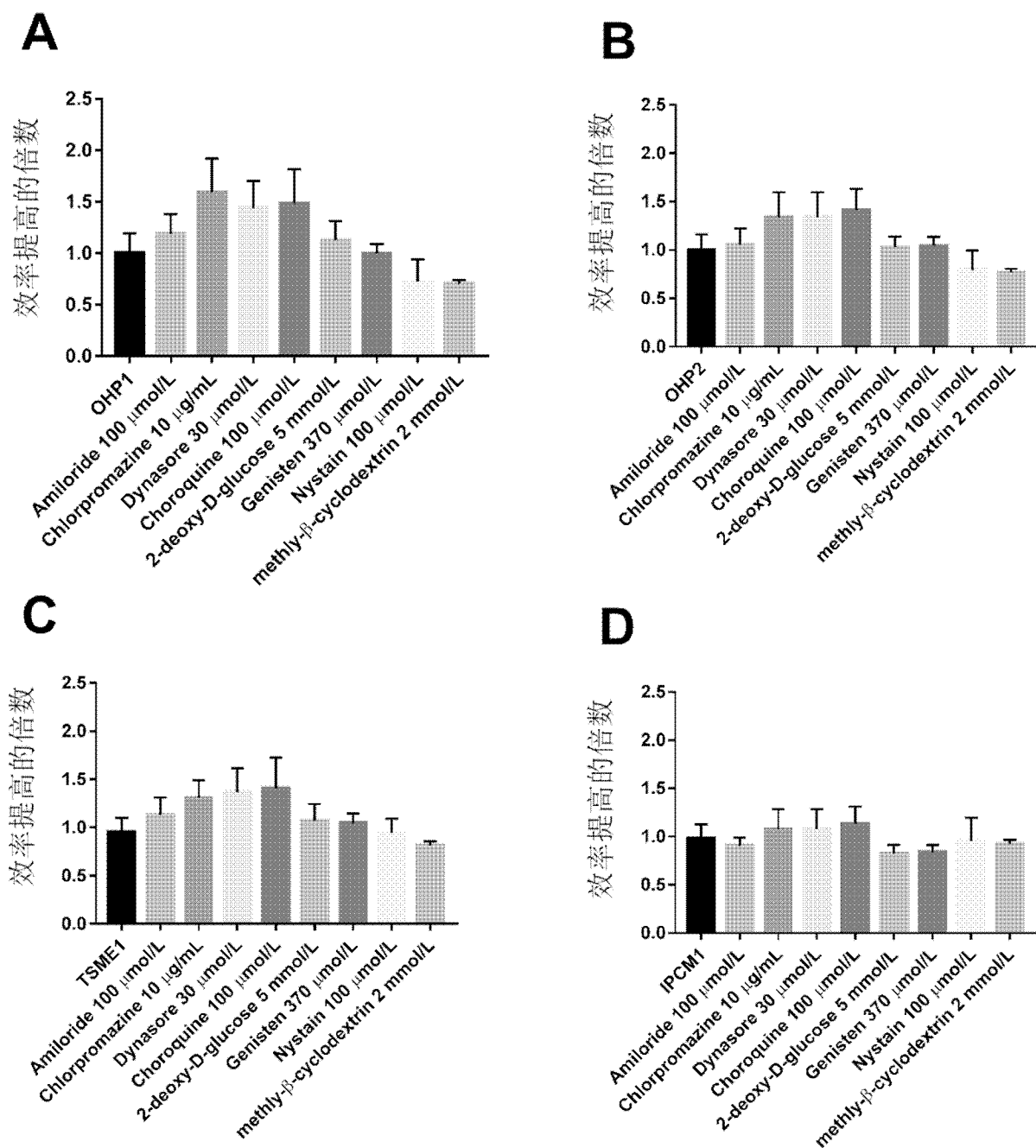
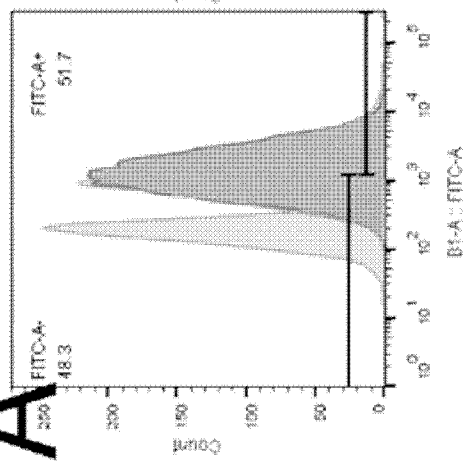
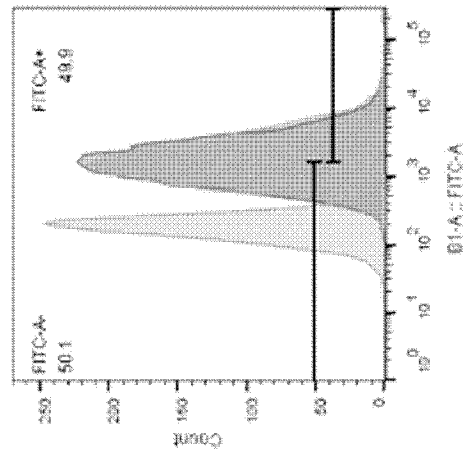


图 11

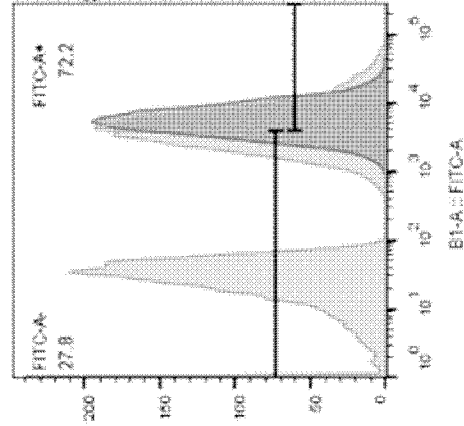
**A**



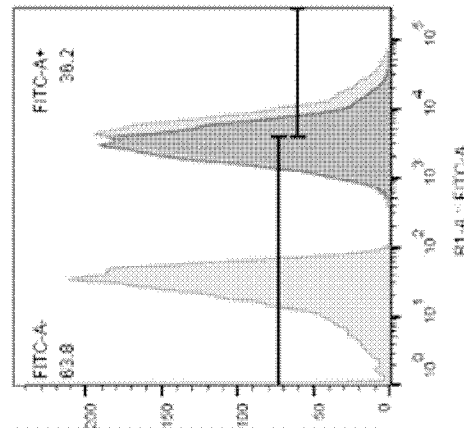
Amiloride



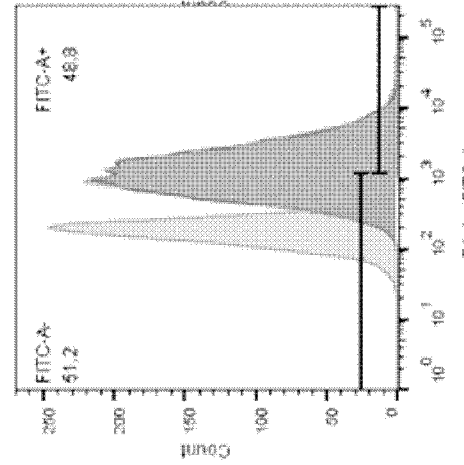
Chlorpromazine



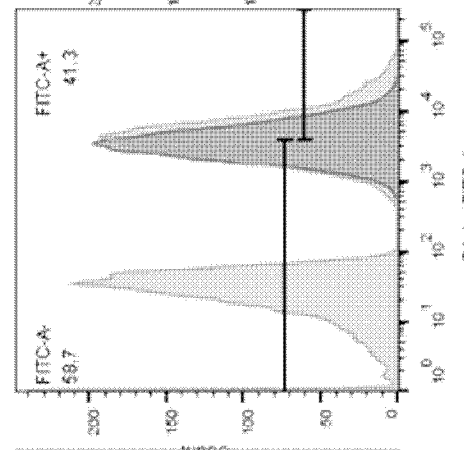
Dynasore



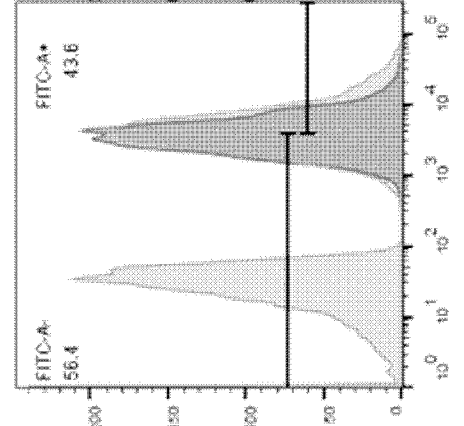
2-deoxy-D-glucose



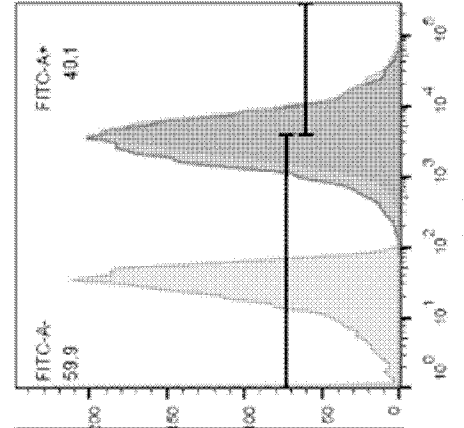
Choroquine



Genisten

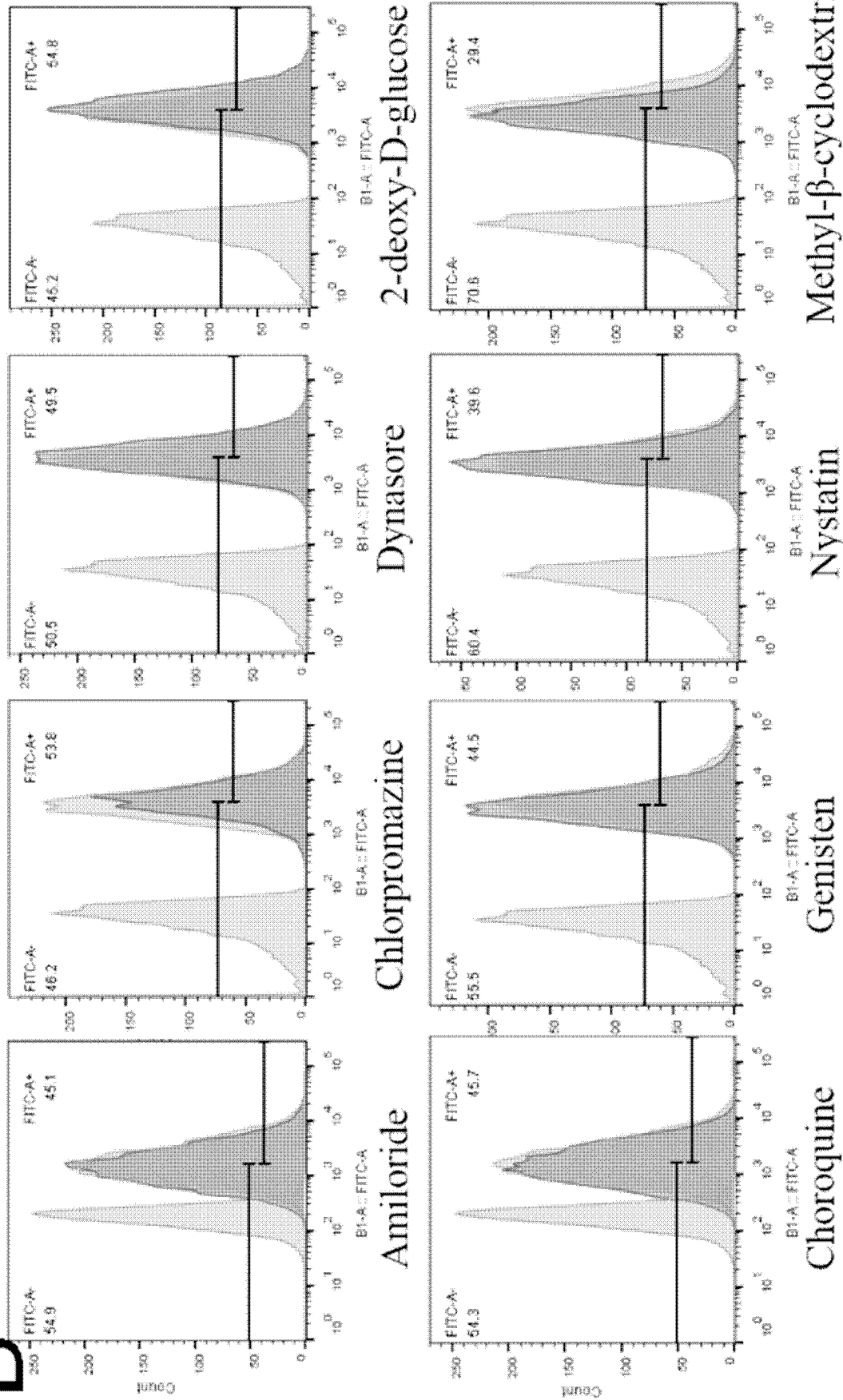


Nystatin

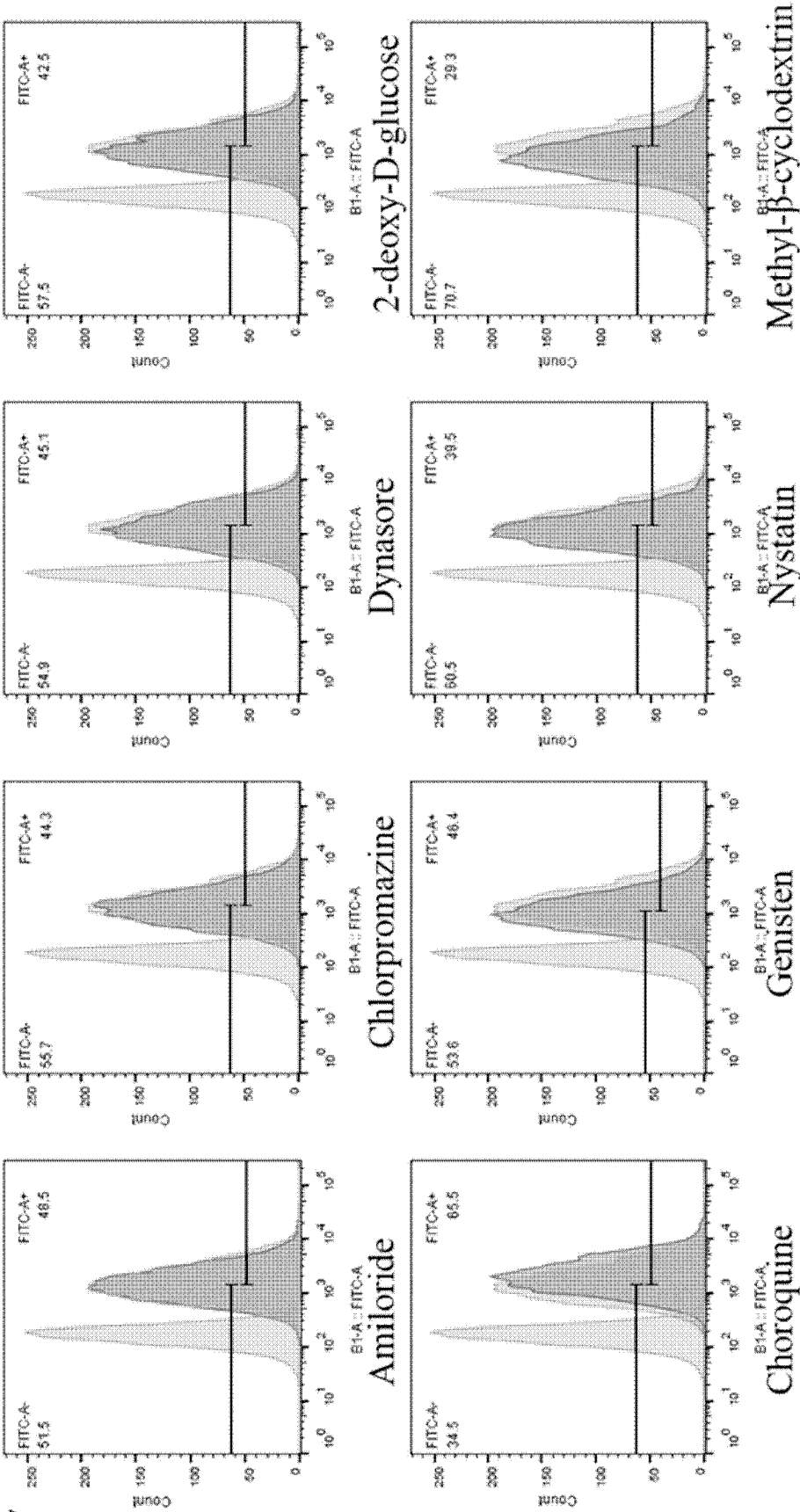


Methyl-β-cyclodextrin

**B**



C



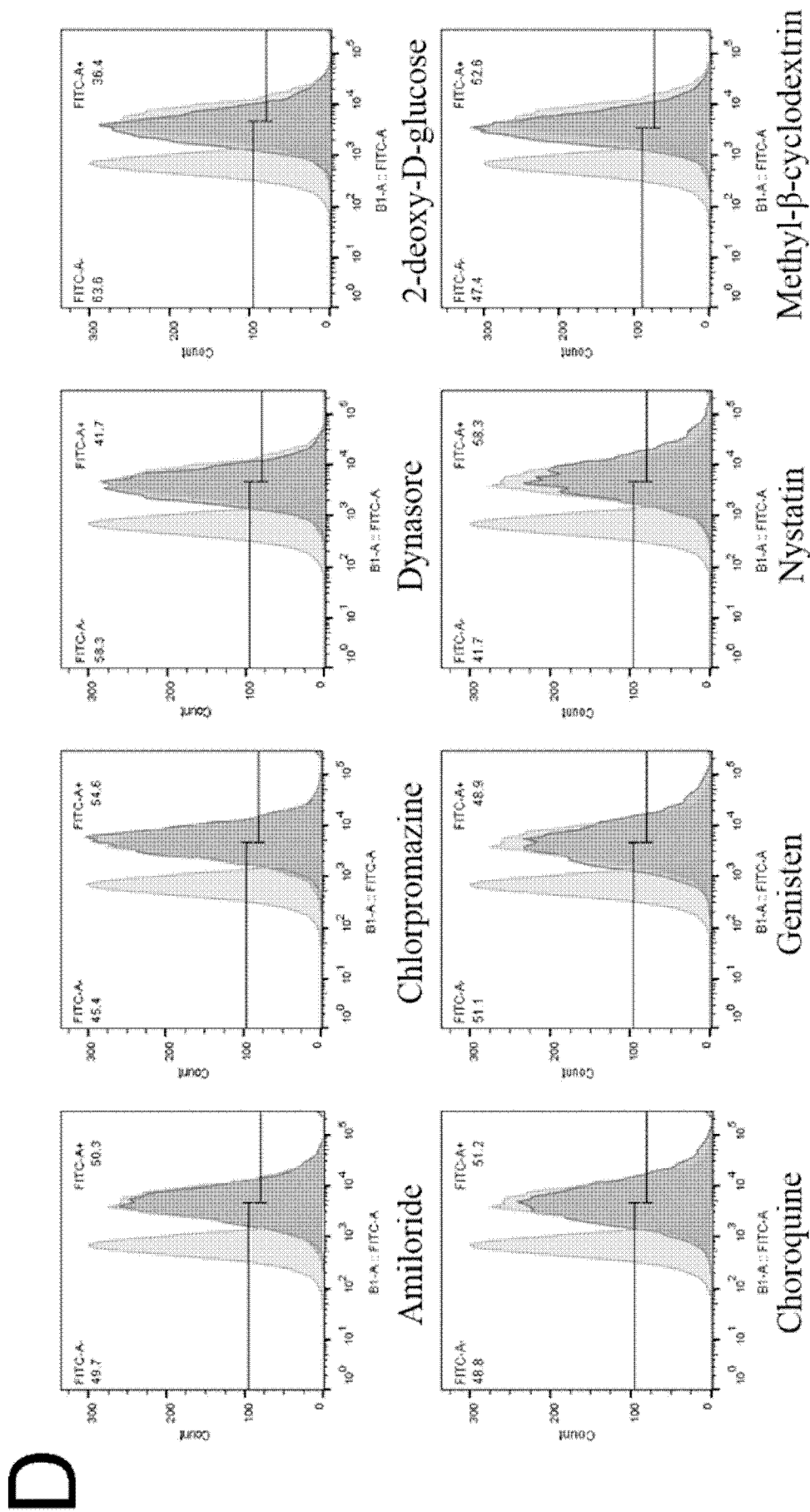


图 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/108127

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 14/575(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; A61K 38/22(2006.01)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)

C07K; A61K; A61P

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, GenBank, EBI-EMBL, PubMed, Patents, Incopat, ISI Web of Knowledge, 万方数据资源系统, Wanfang Data Resource System, CNKI: 申请人/发明人, applicant/inventor, EX-4, Exendin-4, 艾塞丁, 艾塞那肽, 口服, oral administration, P.O., L21E, Glu21, Cys40, 糖尿病, GLP-1, diabetes, SEQ ID Nos: 1-7

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 110437329 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 12 November 2019 (2019-11-12)<br>claims 1-11                                                                                                                      | 1-11                  |
| Y         | CN 103665148 B (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 11 May 2016 (2016-05-11)<br>the abstract, and description, paragraphs [0007]-[0012]                                                                               | 1-11                  |
| Y         | CN 109485720 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 19 March 2019 (2019-03-19)<br>claims 1-9, and description, paragraphs [0007]-[0032]                                                                               | 1-11                  |
| A         | CN 106117370 A (ANYUAN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 16 November 2016 (2016-11-16)<br>entire document                                                                                            | 1-11                  |
| A         | MANANDHAR, B. et al. "Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Analogs: Recent Advances, New Possibilities, and Therapeutic Implications"<br><i>J. Med. Chem.</i> , Vol. 58, 28 October 2014 (2014-10-28),<br>pp. 1020-1037 | 1-11                  |



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

27 October 2020

Date of mailing of the international search report

12 November 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
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/CN2020/108127

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | YUE, X.Y. et al. "Development of a new thiol site-specific prosthetic group and its conjugation with [cys40]-exendin-4 for in vivo targeting of insulinomas"<br><i>Bioconjug. Chem.</i> , Vol. 24, No. 7, 17 July 2013 (2013-07-17),<br>pp. 1191-1200 | 1-11                  |
| A         | ROVÓ, P. et al. "Rational Design of $\alpha$ -Helix-Stabilized Exendin-4 Analogues"<br><i>Biochemistry</i> , Vol. 53, 14 May 2014 (2014-05-14),<br>pp. 3540-3552                                                                                      | 1-11                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/108127

**Box No. I**      **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a. ☒ forming part of the international application as filed:
    - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - ☐ on paper or in the form of an image file.
  - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
    - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/108127**

| Patent document<br>cited in search report |           |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |            |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|---|--------------------------------------|-------------------------|------------|----|--------------------------------------|
| CN                                        | 110437329 | A | 12 November 2019                     | None                    |            |    |                                      |
| CN                                        | 103665148 | B | 11 May 2016                          | CN                      | 103665148  | A  | 26 March 2014                        |
| CN                                        | 109485720 | A | 19 March 2019                        | WO                      | 2019047904 | A1 | 14 March 2019                        |
| CN                                        | 106117370 | A | 16 November 2016                     | CN                      | 106117370  | B  | 17 May 2017                          |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/108127

## A. 主题的分类

C07K 14/575(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; A61K 38/22(2006.01)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)

C07K; A61K; A61P

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, 中国专利生物序列检索系统, GenBank, EBI-EMBL, PubMed, Patents, Incopat, ISI Web of Knowledge, 万方数据资源系统, CNKI; 申请人/发明人, EX-4, Exendin-4, 艾塞丁, 艾塞那肽, 口服, oral administration, P.O., L21E, Glu21, Cys40, 糖尿病, GLP-1, diabetes, SEQ ID NOs: 1-7

## 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 |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PX   | CN 110437329 A (中国药科大学) 2019年 11月 12日 (2019 - 11 - 12)<br>权利要求1-11                                                                                                                                  | 1-11    |
| Y    | CN 103665148 B (中国药科大学) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11)<br>摘要, 说明书第0007-0012段                                                                                                                         | 1-11    |
| Y    | CN 109485720 A (中国药科大学) 2019年 3月 19日 (2019 - 03 - 19)<br>权利要求1-9, 说明书第0007-0032段                                                                                                                    | 1-11    |
| A    | CN 106117370 A (安源医药科技上海有限公司) 2016年 11月 16日 (2016 - 11 - 16)<br>全文                                                                                                                                  | 1-11    |
| A    | MANANDHAR, B. 等. "Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Analogs: Recent Advances, New Possibilities, and Therapeutic Implications"<br>J. Med. Chem., 第58卷, 2014年 10月 28日 (2014 - 10 - 28),<br>第1020-1037页 | 1-11    |

☒ 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

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 10月 27日

国际检索报告邮寄日期

2020年 11月 12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

杨佳倩

电话号码 86-(10)-53961939

## 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    | YUE, X.Y. 等. "Development of a new thiol site-specific prosthetic group and its conjugation with [cys40]-exendin-4 for in vivo targeting of insulinomas" Bioconjug. Chem., 第24卷, 第7期, 2013年 7月 17日 (2013 - 07 - 17), 第1191-1200页 | 1-11    |
| A    | ROVÓ, P. 等. "Rational Design of $\alpha$ -Helix-Stabilized Exendin-4 Analogues" Biochemistry, 第53卷, 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14), 第3540-3552页                                                                                   | 1-11    |

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/108127

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利          | 公布日<br>(年/月/日)  |
|-------------|-----------|---|----------------|---------------|-----------------|
| CN          | 110437329 | A | 2019年 11月 12日  | 无             |                 |
| CN          | 103665148 | B | 2016年 5月 11日   | CN 103665148  | A 2014年 3月 26日  |
| CN          | 109485720 | A | 2019年 3月 19日   | W0 2019047904 | A1 2019年 3月 14日 |
| CN          | 106117370 | A | 2016年 11月 16日  | CN 106117370  | B 2017年 5月 17日  |