

(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
2019 年 3 月 14 日 (14.03.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/047904 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/605 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/104501

(22) 国际申请日: 2018 年 9 月 7 日 (07.09.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710810530.6 2017 年 9 月 11 日 (11.09.2017) 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 号科研大楼, 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 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。 赛文博 (SAI, Wenbo); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。 姚文兵 (YAO, Wenbing); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。 杨康敏 (YANG, Kangmin); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。 魏青青 (WEI, Qingqing); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。 宋潇达 (SONG, Xiaoda); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。 田浚 (TIAN, Hong); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号科研大楼, Jiangsu 210009 (CN)。

(74) 代理人: 南京艾普利德知识产权代理事务所 (特殊普通合伙) (NANJING IPLEADER INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY FIRM); 中国江苏省南京市玄武大道 699-1 号徐庄管委会行政楼 618 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, 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)。

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))

(54) **Title:** ORAL HYPOGLYCEMIC POLYPEPTIDE, FATTY ACID MODIFIED DERIVATIVES THEREOF AND USES OF THE POLYPEPTIDE AND THE FATTY ACID MODIFIED DERIVATIVES THEREOF

(54) 发明名称: 口服降血糖多肽、其脂肪酸修饰衍生物以及用途

(57) **Abstract:** Provided in the present invention are an oral hypoglycemic polypeptide, fatty acid modified derivatives thereof, and uses of the polypeptide and the fatty acid modified derivatives thereof. The sequence of the polypeptide is shown in SEQ ID NO: 1. The modification site of the fatty acid modified derivatives is one of Xaa1, Xaa2, Xaa4 or a combination thereof. The polypeptide and the fatty acid modified derivatives thereof can be used in the preparation of a medicament or a pharmaceutical composition for preventing or treating diabetes and regulating blood sugar level. The polypeptide and the fatty acid modified derivatives thereof in the present invention have enzymatic resistance against more proteases, and are suitable to be used as oral hypoglycemic drugs.

(57) 摘要: 本发明提供了一种口服降血糖多肽、其脂肪酸修饰衍生物以及用途。所述多肽的序列如 SEQ ID NO: 1 所示。所述脂肪酸修饰衍生物的修饰位点为 Xaa1、Xaa2、Xaa4 之一或其组合。所述多肽及其脂肪酸修饰衍生物可用于制备预防或治疗糖尿病、降血糖的药物或药物组合物。本发明的多肽及其脂肪酸修饰衍生物具有针对更多种蛋白酶的酶解抗性, 适宜作为口服降血糖药物。

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))。

口服降血糖多肽、其脂肪酸修饰衍生物以及用途

技术领域

本发明涉及一种口服降血糖多肽、该多肽的脂肪酸修饰衍生物，还涉及它们的用途；该多肽及其脂肪酸修饰衍生物具有肠道主要蛋白酶酶解抗性，同时具有良好的肠道通透性；属于医药生物技术领域。

背景技术

糖尿病是一种由多病因所导致的以持续性高血糖为特征的终身性代谢类疾病，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。从病理上，糖尿病可以分为两种：表现为胰岛素分泌能力降低或彻底丧失的 I 型糖尿病，表现为机体无法有效利用胰岛素的 II 型糖尿病。其中，II 型糖尿病占目前患者总数的 90%。预计到 2025 年，全球糖尿病患者总数将达到 3 亿，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，传统的治疗模式一般包括饮食控制、小分子降糖药物以及外源性胰岛素摄入等阶梯式治疗。而胰高血糖素样肽-1 受体激动剂药物在减少低血糖危象、保护并促进胰岛组织再生、体重控制及给患者带来心血管收益方面具有无可比拟的优势，但此类药物目前唯一有效的给药途径为皮下注射，这不仅给患者带来困难和疼痛，需要适当的技术与设备等，而且会严重的影响患者的依从性。

例如，胰高血糖素样肽-1 受体激动剂药物艾塞那肽，它是一种从南美巨蜥蜴的唾液中分离发现、由 39 个氨基酸组成的直链多肽。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，它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 β 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。

如前所述，给药途径极大限制了艾塞那肽的临床应用及患者的依从性。因此，口服给药作为目前应用最广，使用最方便的给药方式，已成为生物技术药物的持续努力方向。但由于生物技术药物口服利用度低，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生物技术药物上市，其主要原因在于两方面：1. 生物技术药物多为多肽、蛋白等生物大分子，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，其中包括申请日 2013 年 12 月 17 日、专利号 CN201310694475.0、授权公告号 CN103665148B 的中国发明专利，该专利中涉及的可口服给药降血糖多肽是通过将 Exendin-4 氨基酸序列中第 12、20 和 27 位氨基酸进行非碱性氨基酸取代获得的。目前发明人在进一步研究中已获得了新的成果。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是：基于发明人的最新研究成果，提供一种口服降血糖多肽，具有良好的抗酶解特性。还提供该多肽的脂肪酸修饰衍生物，以及该多肽及其衍生物用途。

本发明的主要研究过程如下：在前文所述发明专利中多肽的基础上，发明人继续通过氨基酸突变来减少可被肠道中蛋白酶降解的氨基酸位点，并筛选出一类具有胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶抗性的多肽；之后，通过一系列检测证明此类多肽可以通过口服途径给药，且具有明显的降糖活性。

本发明的技术方案如下：

一种口服降血糖多肽，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-Xaa3-Leu-Ile-Glu-Trp-Leu-Xaa4-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys，其中，

Xaa1 为 Met、Val、Ser 或 Lys；

Xaa2 为 Leu、Tyr、Val 或 Lys；

Xaa3 为 Glu 或 Leu；

Xaa4 为 Met、Val 或 Lys。

优选地，所述氨基酸序列为以下序列之一：

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；

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

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

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

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

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

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

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

前文所述的口服降血糖多肽用于制备预防或治疗糖尿病药物或药物组合物、或用于制备降血糖药物或药物组合物的用途。

一种口服降血糖多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血糖多肽；脂肪酸的修饰位点为 Xaa1、Xaa2、Xaa4 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。

前文所述的口服降血糖多肽脂肪酸修饰衍生物用于制备预防或治疗糖尿病药物或药物组合物、或用于制备降血糖药物或药物组合物的用途。

一种药物组合物，其特征是，含有前文所述的口服降血糖多肽和/或前文所述的口服降血糖多肽脂肪酸修饰衍生物。

前文所述的药物组合物用于制备预防或治疗糖尿病药剂、或用于制备降血糖药剂的用途。

其中，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。

在前文所述的用途中，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

与现有技术相比，本发明的多肽及其脂肪酸修饰衍生物具有针对更多种蛋白酶的酶解抗性，能更好地避免在胃肠道中被酶解失效，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 5 中 IPCM1 与 IPCM5 激活 cAMP 含量的测定结果图。

图 2 为本发明实施例 6 中 IPCM1 与 IPCM5 在急性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 7 中 IPCM1 与 IPCM5 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 8 中 IPCM1 与 IPCM5 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 9 中 IPCM1 与 IPCM5 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 10 中 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠治疗结束后的胰脏切片观察图。

(A: 正常组; B: 生理盐水组; C: IPCM1 给药治疗组; D: IPCM5 给药治疗组)

图 7 为本发明实施例 11 中 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠治疗结束后的肾脏切片观察图。

(A: 正常组; B: 生理盐水组; C: IPCM1 给药治疗组; D: IPCM5 给药治疗组)

图 8 为本发明实施例 12 中 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠治疗结束后的肝脏切片观察图。

(A: 正常组; B: 生理盐水组; C: IPCM1 给药治疗组; D: IPCM5 给药治疗组)

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。

在本发明具体实施的说明中，首先采用序列 IPCM1-8 作代表性阐述。

本发明多肽的通式如 SEQ ID NO.1 所示；IPCM1-8 的序列如下：

IPCM1，即 SEQ ID NO.2：

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。

IPCM2，即 SEQ ID NO.3：

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

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM3, 即 SEQ ID NO.4:

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

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

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM4, 即 SEQ ID NO.5:

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

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

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM5, 即 SEQ ID NO.6:

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

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

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM6, 即 SEQ ID NO.7:

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

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

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM7, 即 SEQ ID NO.8:

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

-Ala-Val-Lys-Glu-Leu-Ile-Glu-Trp-Leu-Met-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

IPCM8, 即 SEQ ID NO.9:

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

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

-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys。

实施例 1 IPCM1-8 抗酶解能力测定

采用高效液相色谱法来测定 IPCM1-8 的抗酶解能力:

第一步: 配制三种 0.005 mg/mL 的蛋白酶溶液, 三种蛋白酶分别为胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶, 将各蛋白酶溶液分别于 37°C 孵育, 孵育时间为 15 min。

第二步: 将 500 μ L 0.5 mg/mL 的 IPCM1-8 溶液与 500 μ L 各蛋白酶溶液分别进行混合,

即每种蛋白酶：IPCM1-8=1:100(w/w)，于 37℃进行反应，然后在各预定的时间点(0, 5, 15, 30, 60 min)取出 50 μL 反应液，加入 50 μL 1% TFA 溶液终止反应。12000 rpm 离心 5 min 后，收集上清液，利用 RP-HPLC 对上清检测。同时，采用 Exendin-4C（即艾塞那肽）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 0.065% TFA 的双蒸水，B 相为含 0.05% TFA 的乙腈溶液；进样量为 50 μL；泵流速为 1 mL/min；检测波长为 215 nm，检测程序如下：

Time	Unit	Command	Value
0.01	Pumps	Pump A B.Conc	5
10.00	Pumps	Pump A B.Conc	35
35.00	Pumps	Pump A B.Conc	95
41.00	Pumps	Pump A B.Conc	95
41.01	Pumps	Pump A B.Conc	5
50.00	Pumps	Pump A B.Conc	5
50.01	Controller	Stop	

检测结果如表 1 所示。

表 1 IPCM1-8 抗酶解能力检测结果

	胰蛋白酶	弹性蛋白酶	糜蛋白酶
Exendin-4C	0.00±0.00%	55.39±2.74%	0.00±0.00%
IPCM1	85.91±7.48%	62.48±2.96%	55.47±2.29%
IPCM2	80.52±9.69%	57.78±4.51%	9.27±1.86%
IPCM3	79.74±4.50%	70.46±4.68%	18.04±1.21%
IPCM4	75.76±5.14%	58.65±5.84%	9.24±1.35%
IPCM5	100.00±0.00%	92.03±2.69%	36.53±4.46%
IPCM6	94.24±2.93%	54.23±4.74%	7.57±2.23%
IPCM7	21.61±6.24%	66.51±4.21%	6.84±0.87%
IPCM8	88.56±6.07%	48.23±5.71%	14.48±8.71%

由该结果可知，与 Exendin-4C 相比，IPCM1-8 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，IPCM1、IPCM2、IPCM5、IPCM6 以及 IPCM8 的残余率均达 80%以上。同时 IPCM1-8 针对弹性蛋白酶和糜蛋白酶的抗性也有不同程度的提高，其中针对弹性蛋白酶抗性提高较为显著的为 IPCM1、IPCM3、IPCM5 以及 IPCM7；针对糜蛋白酶抗性提高较为显著的为 IPCM1 和 IPCM5。

实施例 2 IPCM1-8 激活胰高血糖素样肽-1 受体能力的测定

第一步：CHO/GLP-1R-CRE 化学发光细胞株复苏后，转入含 5 mL 细胞生长培养基的培养瓶中，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁生长至细胞贴壁面的 80%左右时，用 0.25%胰蛋白酶消化传代，每 3 天按 1: 3 比例传代 1 次。细胞传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，再加入分析培养基。以 2×10^5 个细胞/mL 的量将细胞液接种于 96 孔板，每孔接种 100 μ L，于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h。

第三步：取出 96 孔板，每孔加入 20 μ L 的 IPCM1-8 溶液/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；IPCM1-8 采用则 250 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 30 秒后放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h。

第四步：取出 96 孔板，加入化学发光底物（Steady-Glo）试剂，100 μ L/孔，室温下将 96 孔板放于振荡器上轻轻振荡 40 分钟。

第五步：利用化学发光酶标仪，测定每孔的相关化学发光单位（RLU）。

第六步：以样品的 log₁₀（浓度）为横坐标，每一浓度的平均 RLU 为纵坐标，绘制量效曲线。通过 Graphpad 5.0 非线性拟合求出各曲线的 EC₅₀ 值，计算候选分子以及 Exendin-4 阳性对照的相对效价。结果如表 2 所示。

表 2 IPCM1-8 激活胰高血糖素样肽-1 受体能力测定结果

	EC ₅₀ (nM)	Max Responses (% Ex4C Max)
Exendin-4	0.29	100.00±0.00
IPCM1	0.75	107.36±5.94
IPCM2	5.65	92.15±5.26
IPCM3	7.36	86.31±3.21
IPCM4	13.78	96.89±4.33
IPCM5	0.83	103.60±6.91
IPCM6	15.74	77.79±4.65
IPCM7	5.69	101.29±8.24
IPCM8	12.16	93.51±3.89

实验结果从半数有效浓度 EC₅₀ 和引起的最大反应值 Max Responses 两方面衡量，表明与原型分子 Exendin-4 相比，IPCM1-8 均具有激活胰高血糖素样肽-1 受体的能力，其中，IPCM1 和 IPCM5 的半数有效浓度分别为 0.75 nM 和 0.83 nM，与原型分子处于同一数量级范围内，最大反应值则分别为 107.36±5.94%和 103.60±6.91%，两者略高于原型分子，说明 IPCM1 和

IPCM5 在提高关键蛋白酶抗性的同时最大程度的保留了原型分子的生物学活性。

实施例 3 除 IPCM1-8 外其余序列的抗酶解能力和激活胰高血糖素样肽-1 受体能力

除 IPCM1-8 外, 本发明多肽通式所包括其余序列的各位点所取氨基酸如下表所示:

序号	Xaa1	Xaa2	Xaa3	Xaa4
IPCM9	Met	Leu	Glu	Met
IPCM10	Met	Leu	Glu	Val
IPCM11	Met	Leu	Glu	Lys
IPCM12	Met	Leu	Leu	Val
IPCM13	Met	Leu	Leu	Lys
IPCM14	Met	Tyr	Glu	Val
IPCM15	Met	Tyr	Glu	Lys
IPCM16	Met	Tyr	Leu	Met
IPCM17	Met	Tyr	Leu	Val
IPCM18	Met	Tyr	Leu	Lys
IPCM19	Met	Val	Glu	Met
IPCM20	Met	Val	Glu	Val
IPCM21	Met	Val	Glu	Lys
IPCM22	Met	Val	Leu	Met
IPCM23	Met	Val	Leu	Val
IPCM24	Met	Val	Leu	Lys
IPCM25	Met	Lys	Glu	Met
IPCM26	Met	Lys	Glu	Val
IPCM27	Met	Lys	Glu	Lys
IPCM28	Met	Lys	Leu	Met
IPCM29	Met	Lys	Leu	Val
IPCM30	Met	Lys	Leu	Lys
IPCM31	Val	Leu	Glu	Met
IPCM32	Val	Leu	Glu	Val
IPCM33	Val	Leu	Glu	Lys
IPCM34	Val	Leu	Leu	Met
IPCM35	Val	Leu	Leu	Val
IPCM36	Val	Leu	Leu	Lys
IPCM37	Val	Tyr	Glu	Met
IPCM38	Val	Tyr	Glu	Val
IPCM39	Val	Tyr	Glu	Lys

IPCM40	Val	Tyr	Leu	Met
IPCM41	Val	Tyr	Leu	Val
IPCM42	Val	Tyr	Leu	Lys
IPCM43	Val	Val	Glu	Met
IPCM44	Val	Val	Glu	Val
IPCM45	Val	Val	Glu	Lys
IPCM46	Val	Val	Leu	Met
IPCM47	Val	Val	Leu	Lys
IPCM48	Val	Lys	Glu	Met
IPCM49	Val	Lys	Glu	Val
IPCM50	Val	Lys	Glu	Lys
IPCM51	Val	Lys	Leu	Met
IPCM52	Val	Lys	Leu	Val
IPCM53	Val	Lys	Leu	Lys
IPCM54	Ser	Leu	Glu	Met
IPCM55	Ser	Leu	Glu	Val
IPCM56	Ser	Leu	Glu	Lys
IPCM57	Ser	Leu	Leu	Met
IPCM58	Ser	Leu	Leu	Val
IPCM59	Ser	Leu	Leu	Lys
IPCM60	Ser	Tyr	Glu	Met
IPCM61	Ser	Tyr	Glu	Val
IPCM62	Ser	Tyr	Glu	Lys
IPCM63	Ser	Tyr	Leu	Met
IPCM64	Ser	Tyr	Leu	Val
IPCM65	Ser	Tyr	Leu	Lys
IPCM66	Ser	Val	Glu	Met
IPCM67	Ser	Val	Glu	Val
IPCM68	Ser	Val	Glu	Lys
IPCM69	Ser	Val	Leu	Met
IPCM70	Ser	Val	Leu	Val
IPCM71	Ser	Val	Leu	Lys
IPCM72	Ser	Lys	Leu	Met
IPCM73	Ser	Lys	Leu	Val
IPCM74	Ser	Lys	Leu	Lys
IPCM75	Lys	Leu	Glu	Met

IPCM76	Lys	Leu	Glu	Val
IPCM77	Lys	Leu	Glu	Lys
IPCM78	Lys	Leu	Leu	Met
IPCM79	Lys	Leu	Leu	Lys
IPCM80	Lys	Tyr	Glu	Met
IPCM81	Lys	Tyr	Glu	Val
IPCM82	Lys	Tyr	Glu	Lys
IPCM83	Lys	Tyr	Leu	Met
IPCM84	Lys	Tyr	Leu	Val
IPCM85	Lys	Tyr	Leu	Lys
IPCM86	Lys	Val	Glu	Met
IPCM87	Lys	Val	Glu	Val
IPCM88	Lys	Val	Glu	Lys
IPCM89	Lys	Val	Leu	Met
IPCM90	Lys	Val	Leu	Val
IPCM91	Lys	Val	Leu	Lys
IPCM92	Lys	Lys	Glu	Met
IPCM93	Lys	Lys	Glu	Lys
IPCM94	Lys	Lys	Leu	Met
IPCM95	Lys	Lys	Leu	Val
IPCM96	Lys	Lys	Leu	Lys

以上序列按实施例 1 方法测定抗酶解能力，不同之处仅在于：第二步中，与蛋白酶混合后仅于时间点 60 min 取出 50 μ L 反应液。

以上序列按实施例 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。结果表明：与 Exendin-4C 相比，IPCM9-96 针对三种蛋白酶的抗性均有不同程度的提高；同时，IPCM9-96 均具有激活胰高血糖素样肽-1 受体的能力。

实施例 4 IPCM1-96 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

IPCM1-96 脂肪酸修饰衍生物中，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，各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
EX1	IPCM4	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2

EX2	IPCM4	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX3	IPCM5	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX4	IPCM5	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX5	IPCM5	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa2
EX6	IPCM5	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX7	IPCM5	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX8	IPCM5	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa2
EX9	IPCM6	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX10	IPCM6	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX11	IPCM6	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX12	IPCM6	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX13	IPCM6	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX14	IPCM6	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX15	IPCM7	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX16	IPCM7	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX17	IPCM8	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX18	IPCM8	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX19	IPCM11	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX20	IPCM11	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX21	IPCM13	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX22	IPCM13	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX23	IPCM15	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX24	IPCM15	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX25	IPCM18	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX26	IPCM18	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX27	IPCM21	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX28	IPCM21	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX29	IPCM24	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX30	IPCM24	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX31	IPCM25	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX32	IPCM25	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX33	IPCM26	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX34	IPCM26	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX35	IPCM27	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX36	IPCM27	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX37	IPCM27	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4

EX38	IPCM27	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX39	IPCM27	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX40	IPCM27	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX41	IPCM28	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX42	IPCM28	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX43	IPCM29	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX44	IPCM29	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX45	IPCM30	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX46	IPCM30	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX47	IPCM30	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX48	IPCM30	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX49	IPCM30	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX50	IPCM30	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX51	IPCM33	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX52	IPCM33	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX53	IPCM36	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX54	IPCM36	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX55	IPCM39	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX56	IPCM39	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX57	IPCM42	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX58	IPCM42	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX59	IPCM45	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX60	IPCM45	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX61	IPCM47	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX62	IPCM47	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX63	IPCM48	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX64	IPCM48	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX65	IPCM49	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX66	IPCM49	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX67	IPCM50	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX68	IPCM50	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX69	IPCM50	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX70	IPCM50	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX71	IPCM50	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX72	IPCM50	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX73	IPCM51	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2

EX74	IPCM51	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX75	IPCM52	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX76	IPCM52	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX77	IPCM53	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX78	IPCM53	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX79	IPCM53	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX80	IPCM53	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX81	IPCM53	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX82	IPCM53	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX83	IPCM56	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX84	IPCM56	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX85	IPCM59	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX86	IPCM59	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX87	IPCM62	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX88	IPCM62	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX89	IPCM65	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX90	IPCM65	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX91	IPCM68	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX92	IPCM68	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX93	IPCM71	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX94	IPCM71	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX95	IPCM72	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX96	IPCM72	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX97	IPCM73	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX98	IPCM73	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX99	IPCM74	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX100	IPCM74	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX101	IPCM74	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX102	IPCM74	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX103	IPCM74	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX104	IPCM74	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX105	IPCM75	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX106	IPCM75	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX107	IPCM76	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX108	IPCM76	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX109	IPCM77	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1

EX110	IPCM77	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX111	IPCM77	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX112	IPCM77	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX113	IPCM77	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX114	IPCM77	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX115	IPCM78	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX116	IPCM78	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX117	IPCM79	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX118	IPCM79	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX119	IPCM79	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX120	IPCM79	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX121	IPCM79	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX122	IPCM79	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX123	IPCM80	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX124	IPCM80	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX125	IPCM81	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX126	IPCM81	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX127	IPCM82	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX128	IPCM82	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX129	IPCM82	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX130	IPCM82	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX131	IPCM82	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX132	IPCM82	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX133	IPCM83	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX134	IPCM83	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX135	IPCM84	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX136	IPCM84	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX137	IPCM85	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX138	IPCM85	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX139	IPCM85	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX140	IPCM85	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX141	IPCM85	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX142	IPCM85	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX143	IPCM86	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX144	IPCM86	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX145	IPCM87	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1

EX146	IPCM87	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX147	IPCM88	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX148	IPCM88	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX149	IPCM88	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX150	IPCM88	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX151	IPCM88	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX152	IPCM88	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX153	IPCM89	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX154	IPCM89	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX155	IPCM90	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX156	IPCM90	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX157	IPCM91	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX158	IPCM91	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX159	IPCM91	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX160	IPCM91	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX161	IPCM91	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX162	IPCM91	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX163	IPCM92	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX164	IPCM92	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX165	IPCM92	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa2
EX166	IPCM92	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX167	IPCM92	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX168	IPCM92	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa2
EX169	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX170	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX171	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX172	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa2
EX173	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX174	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX175	IPCM93	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1, Xaa2 及 Xaa4
EX176	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX177	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX178	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX179	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa2
EX180	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX181	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4

EX182	IPCM93	17-羧基十七烷酸	Xaa1, Xaa2 及 Xaa4
EX183	IPCM94	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX184	IPCM94	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX185	IPCM94	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa2
EX186	IPCM94	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX187	IPCM94	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX188	IPCM94	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa2
EX189	IPCM95	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX190	IPCM95	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX191	IPCM95	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa2
EX192	IPCM95	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX193	IPCM95	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX194	IPCM95	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa2
EX195	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1
EX196	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2
EX197	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa4
EX198	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa2
EX199	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1 和 Xaa4
EX200	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa2 和 Xaa4
EX201	IPCM96	10-(4-羧基苯氧基)癸酸	Xaa1, Xaa2 及 Xaa4
EX202	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa1
EX203	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa2
EX204	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa4
EX205	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa2
EX206	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa1 和 Xaa4
EX207	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa2 和 Xaa4
EX208	IPCM96	17-羧基十七烷酸	Xaa1, Xaa2 及 Xaa4

以上脂肪酸修饰衍生物按实施例 1 方法测定抗酶解能力，不同之处仅在于：第二步中，与蛋白酶混合后仅于时间点 60 min 取出 50 μ L 反应液。

以上脂肪酸修饰衍生物按实施例 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。结果表明：与 Exendin-4C 相比，EX1-208 针对三种蛋白酶的抗性均有不同程度的提高；同时，EX1-208 均具有激活胰高血糖素样肽-1 受体的能力。

由此可见，对于如 SEQ ID NO.1 所示通式，当 Xaa1、Xaa2、Xaa4 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。

实施例 5 IPCM1 与 IPCM5 激活 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 GLP-1 受体下游信号分子 cAMP 激活含量的测定。细胞复苏及培养条件如前所述。

第二步:测定时,先使用消化液消化细胞,再按细胞生长状况,加入适量含 0.25%胎牛血清和 0.5 mM IBMX 的分析培养基,使细胞浓度达到 2×10^5 个/mL。向 96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞液,置于上述条件培养箱中培养 4 小时。

第三步:向每孔加入不同浓度梯度的类似物溶液及阳性药 Exendin-4 溶液。类似物采用 10 μ M 的初始浓度,10 倍倍比稀释 7 个梯度浓度,Exendin-4 采用 1 μ M 的初始浓度,10 倍倍比稀释 7 个梯度浓度。每个浓度的药物设置 3 个复孔。轻轻振荡混匀 30 秒后放入培养箱中继续培养 4 小时。

第四步:结束后取出 96 孔板,于 -80℃ 冰箱和 37℃ 培养箱中反复冻融,破碎细胞。离心后取上清,按照 ELISA 试剂盒中的操作要求检测 cAMP 含量,并对结果进行非线性回归分析。

结果如图 1 所示,原型分子 Exendin-4 激活 cAMP 的 $EC_{50}=4.03$ nM,而 IPCM1 和 IPCM5 激活下游 cAMP 的 EC_{50} 分别为 6.43 nM 和 9.48 nM,三者均处于同一数量级范围内。这三种分子在刺激 cAMP 产生时的最大反应值分别为 Exendin-4: 0.74 ± 0.04 mM ($n=3$); IPCM1: 0.78 ± 0.04 mM ($n=3$, $P>0.05$); IPCM5: 0.70 ± 0.02 mM ($n=3$, $P>0.05$)。这说明 IPCM1 和 IPCM5 与对照组 Exendin-4 无显著性差异。

实施例 6 IPCM1 与 IPCM5 在急性腹腔注射糖耐量实验中对血糖控制能力的检测

第一步:实验选取 8-12 周龄、雄性的 C57 小鼠 32 只,随机分为 4 组,PBS 对照组、Exendin-4 (0.10 mg/kg)皮下注射给药组和 IPCM1 高剂量 (2.11 mg/kg)灌胃给药组,IPCM5 高剂量 (2.82 mg/kg)灌胃给药组,每组 8 只小鼠。

第二步:实验提前 12 小时对小鼠禁食,饮水自由摄取。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 分钟后利用尾静脉取血测定各组小鼠血糖水平,测量完成后对小鼠腹腔注射葡萄糖溶液 (2 g/kg),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:绘制血糖一时间曲线并计算曲线下面积(Area Under the Curve, AUC)。

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 PBS 组峰值显著高于另外三组小鼠, 表明 PBS 经灌胃给药不具有血糖控制的效果, 而 IPCM1 和 IPCM5 经灌胃给药的小鼠血糖峰值显著低于前者且接近与阳性药 Exendin-4 皮下注射组, 并在 120 分钟内维持的显著的血糖控制效果。B 为 AUC 统计结果, 结果表明阳性药 Exendin-4 皮下注射组小鼠获得最好血糖控制效果, IPCM1 和 IPCM5 则显著优于 PBS 对照组, 略高于阳性药治疗组小鼠。

实施例 7 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠中对糖化血红蛋白水平的检测

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, 35 只, 适应环境饲养 2 周后测定空腹血糖, 并平均分至 4 组: PBS 对照组、Exendin-4 皮下注射组、IPCM1 (2.11 mg/kg) 灌胃给药组、IPCM5 (2.82 mg/kg) 灌胃给药组, 每组 7 只。另设 db/m 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: 分别于第一周、第四周及第八周对各组小鼠进行眼眶静脉丛取血, 加入预先处理的抗凝管中, 取样后迅速低温离心, 取上清按以下步骤分别测定血红蛋白总数和糖化血红蛋白水平, 并计算比例。

第三步: 使用试剂盒对小鼠总血红蛋白的检测。将初始浓度为 480 pg/mL 的标准品按比例分别稀释至 240 pg/mL、120 pg/mL、60 pg/mL 和 30 pg/mL。

第四步: 分别设空白孔 (不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品精确加样 50 μ L, 待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L, 再加入待测样品 10 μ L。加样时尽量将样品加于酶标板孔底部, 不可触及孔壁, 轻轻晃动摇匀。

第五步: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。此时将浓缩洗涤液稀释 30 倍后备用。

第六步: 轻轻揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 重复 5 次并拍干。

第七步: 除空白孔外, 每孔中加入酶标试剂 50 μ L 后重复步骤 3 温育和步骤 4 洗涤。

第八步: 每孔加入显色剂 A 50 μ L, 再加入显色液 B 50 μ L, 轻轻震荡摇匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。

第九步: 每孔加入终止液 50 μ L, 立即终止反应。15 分钟内将样品板放入多功能读板仪, 以空白孔调零, 检测 450 nm 波长处吸光值。

第十步: 以标准品浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据样品的吸光值由标准曲线计算出相应浓度并乘以稀释倍数。

第十一步: 使用试剂盒对小鼠糖化血红蛋白进行检测。使用糖化血红蛋白 ELISA 检测试

剂盒，重复以上 1-8 步骤，计算不同样品的糖化血红蛋白浓度并除以总血红蛋白浓度。

至八周治疗结束时，db/m 组小鼠 $6.29 \pm 0.42\%$ ($n=7$)，仍处于正常范围内。PBS 对照组小鼠达到 $11.10 \pm 0.56\%$ ($n=7$)。阳性药 Exendin-4 皮下注射给药组小鼠为 $8.22 \pm 0.89\%$ ($n=7$, $P=2.32 \times 10^{-2}$)，具有极显著的治疗效果。IPCM1 和 IPCM5 灌胃给药组小鼠治糖化血红蛋白水平分别为 $8.90 \pm 0.66\%$ ($n=7$, $P=2.95 \times 10^{-2}$)和 $8.50 \pm 0.68\%$ ($n=7$, $P=1.51 \times 10^{-2}$)。分析结果可知，只有高剂量给药条件下 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一致，两组间无显著性差异。

实施例 8 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠中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 7 所示。实验前，小鼠禁食 6 小时，腹腔注射 1 U/kg 胰岛素。

第二步：于 0、15、30、60、90、120 分钟处对小鼠进行眼眶静脉丛取血后迅速低温离心，取上清并按葡萄糖氧化酶偶联比色法要求测定血糖水平，绘制血糖浓度-时间曲线。

八周治疗结束后胰岛素耐量实验结果如图 4 所示。以各组小鼠正常状态下血糖水平为 100%。胰岛素注射后 30 分钟，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，db/m 组小鼠为 $30.62 \pm 5.71\%$ ($n=7$)，PBS 对照组为 $91.76 \pm 7.63\%$ ($n=7$)，阳性药 Exendin-4 皮下注射组为： $64.39 \pm 5.63\%$ ($n=7$, $P=1.43 \times 10^{-3}$)，获得了较好的治疗效果。IPCM1 和 IPCM5 治疗组小鼠对胰岛素的响应与 PBS 组间产生显著性差异前者达到 $69.50 \pm 7.39\%$ ($n=7$, $P=4.01 \times 10^{-2}$)和 $65.74 \pm 7.66\%$ ($n=7$, $P=4.09 \times 10^{-2}$)。60 分钟至 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 9 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠中对血清胰岛素水平影响检测

第一步：动物分组及给药方案如实施例 7 所示。对各组小鼠进行眼眶静脉丛取血，加入预先处理的抗凝管中，取样后迅速低温离心。

第二步：先将试剂盒在室温下平衡 30 min。将初始浓度为 172.8 mIU/L 的标准品按比例分别稀释至 86.4 mIU/L、43.2 mIU/L、21.6 mIU/L、10.8 mIU/L 和 5.4 mIU/L。

第三步：分别设空白孔（不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品精确加样 50 μ L（标准品中已事先整合好生物素抗体，故不加），待测样品孔中先加待测样品 40 μ L，再加入抗-INS 抗体 10 μ L，再在每孔中加入链霉素-HRP 50 μ L。加样时尽量将样品加于酶标板孔底部，不可触及孔壁，轻轻晃动摇匀。

第四步：用封板膜封板后置 37℃ 孵育 60 分钟。此时将浓缩洗涤液稀释后备用。

第五步：轻轻揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，重

复 5 次并拍干。

第六步：每孔加入显色剂 A 50 μL ，再加入显色液 B 50 μL ，轻轻震荡摇匀，37℃避光显色 10 分钟。

第七步：每孔加入终止液 50 μL ，立即终止反应。10 分钟内将样品板放入多功能读板仪，以空白孔调零，检测 450 nm 波长处吸光值。

第八步：以标准品浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线，根据样品的吸光值由标准曲线计算出相应样品中的胰岛素浓度。

八周给药治疗结束后血清胰岛素水平检测结果如图 5 所示。db/m 小鼠血清中胰岛素含量为 $13.59 \pm 1.14 \text{ mIU/L}$ ($n=7$)，各组 db/db 小鼠血清胰岛素水平均稍低于或显著低于这一水平。其中 PBS 对照组小鼠为 $8.10 \pm 0.75 \text{ mIU/L}$ ($n=7$, $P=6.08 \times 10^{-3}$)；阳性药 Exendin-4 皮下注射组为 $11.58 \pm 0.36 \text{ mIU/L}$ ($n=7$, $P=0.16$)，已接近 db/m 组小鼠且与后者无组间显著性差异；IPCM1 和 IPCM5 治疗组小鼠血清胰岛素水平分别为 $11.17 \pm 0.82 \text{ mIU/L}$ ($n=7$, $P=0.15$)和 $12.18 \pm 0.43 \text{ mIU/L}$ ($n=7$, $P=0.36$)，两者均已接近 db/m 组小鼠且与后者无显著性差异，具有极显著的治疗效果。

实施例 10 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠治疗结束后的胰脏切片

动物分组及给药方案如实施例 7 所示。将小鼠处死后，切除胰腺，储存于 10%的中性甲醛中。组织切片厚度为 6 μm ，然后按照标准步骤用苏木精-伊红染色法进行染色，并用光学显微镜观察切片。其中分组情况为 A：正常组；B：生理盐水组；C：IPCM1 给药治疗组；D：IPCM5 给药治疗组。

结果如图 6 所示，正常对照组小鼠的胰岛大小正常，形态完整，胰岛 β 细胞均正常；PBS 对照组小鼠可见胰岛组织出现萎缩，大多数胰岛 β 细胞消失或仅有少数残留。IPCM1 及 IPCM5 给药组与 PBS 组相比胰岛组织结构、胰岛 β 细胞病变均有所减轻，并且胰岛组织面积也较大，说明 IPCM1 与 IPCM5 能够保护糖尿病小鼠胰腺 β 细胞，改善胰岛功能。

实施例 11 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠治疗结束后的肾脏切片

动物分组及给药方案如实施例 7 所示。将小鼠处死后，切除肾脏，储存于 10%的中性甲醛中。组织切片厚度为 6 μm ，然后按照标准步骤用苏木精-伊红染色法进行染色，并用光学显微镜观察切片。其中分组情况为 A：正常组；B：生理盐水组；C：IPCM1 给药治疗组；D：IPCM5 给药治疗组。

结果如图 7 所示，正常对照组小鼠的肾小球形态正常，肾小囊腔清晰；PBS 组中肾小囊腔有所缩小，肾小管上皮细胞出现细胞水肿，并伴有明显的炎细胞浸润；IPCM1 与 IPCM5

给药组肾小球形态良好，肾小囊腔清晰。说明两个月的给药周期对 db/db 小鼠的肾功能没有明显的损害，且其通过降低血糖从而减轻肾负荷的途径改善了肾小球的形态。

实施例 12 IPCM1 与 IPCM5 在 db/db 小鼠治疗结束后的肝脏切片

动物分组及给药方案如实施例 7 所示。将小鼠处死后，切除肝脏，储存于 10%的中性甲醛中。组织切片厚度为 6 μm ，然后按照标准步骤用苏木精-伊红染色法进行染色，并用光学显微镜观察切片。其中分组情况为 A：正常组；B：生理盐水组；C：IPCM1 给药治疗组；D：IPCM5 给药治疗组。

结果如图 8 所示，正常对照组小鼠肝脏细胞形态大小正常，细胞核致密，索状结构清晰；PBS 组肝细胞失去正常的索状结构，肝窦消失，肝细胞显著肿胀，胞浆几乎完全透明，普遍发生明显的气球样变及脂肪变性；IPCM1 与 IPCM5 给药组肝脏细胞呈现轻微的细胞肿大及胞浆疏松化，但索状结构仍较清晰。

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。

权 利 要 求 书

1. 一种口服降血糖多肽，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-Xaa3-Leu-Ile-Glu-Trp-Leu-Xaa4-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys，其中，

Xaa1 为 Met、Val、Ser 或 Lys；

Xaa2 为 Leu、Tyr、Val 或 Lys；

Xaa3 为 Glu 或 Leu；

Xaa4 为 Met、Val 或 Lys。

2. 根据权利要求 1 述及的口服降血糖多肽，其特征是，所述氨基酸序列为以下序列之一：

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；

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

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

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

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

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

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

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

3. 权利要求 1 或 2 述及的口服降血糖多肽用于制备预防或治疗糖尿病药物或药物组合物、或用于制备降血糖药物或药物组合物的用途，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

4. 一种口服降血糖多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 述及的口服降血糖多肽；脂肪酸的修饰位点为 Xaa1、Xaa2、Xaa4 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。

5. 根据权利要求 4 述及的多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。

6. 权利要求 4 或 5 述及的口服降血糖多肽脂肪酸修饰衍生物用于制备预防或治疗糖尿病药物或药物组合物、或用于制备降血糖药物或药物组合物的用途，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

7. 一种药物组合物，其特征是，含有权利要求 1 或 2 述及的口服降血糖多肽和/或权利要求 4 或 5 述及的口服降血糖多肽脂肪酸修饰衍生物。

8. 权利要求 7 述及的药物组合物用于制备预防或治疗糖尿病药剂、或用于制备降血糖药剂的用途，所述糖尿病为 I 型或 II 型糖尿病。

9. 根据权利要求 8 述及的用途，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。

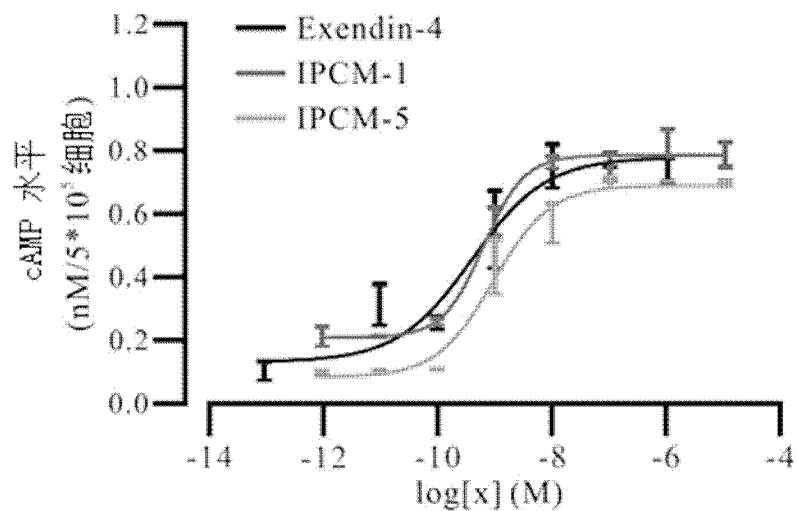


图 1

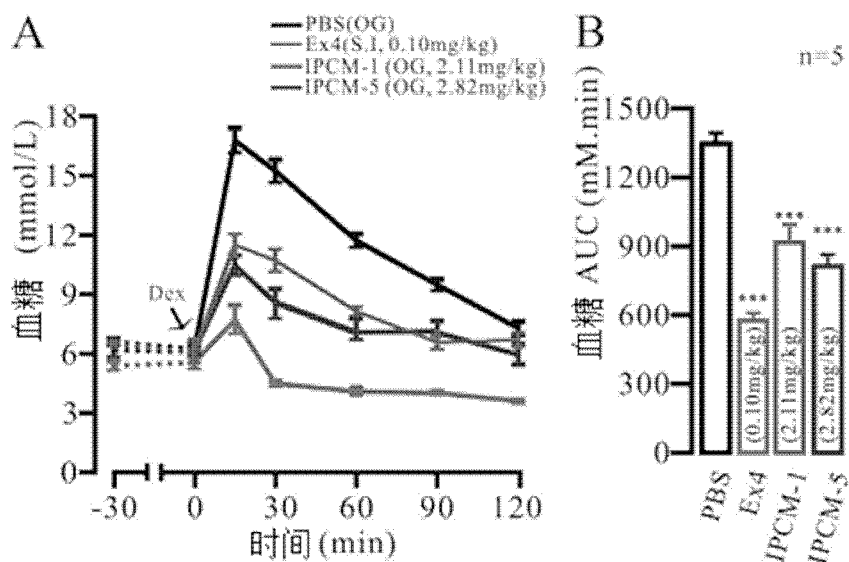


图 2

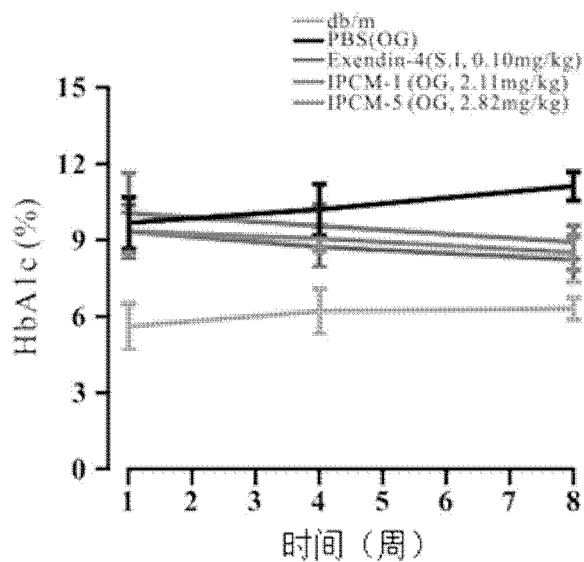


图 3

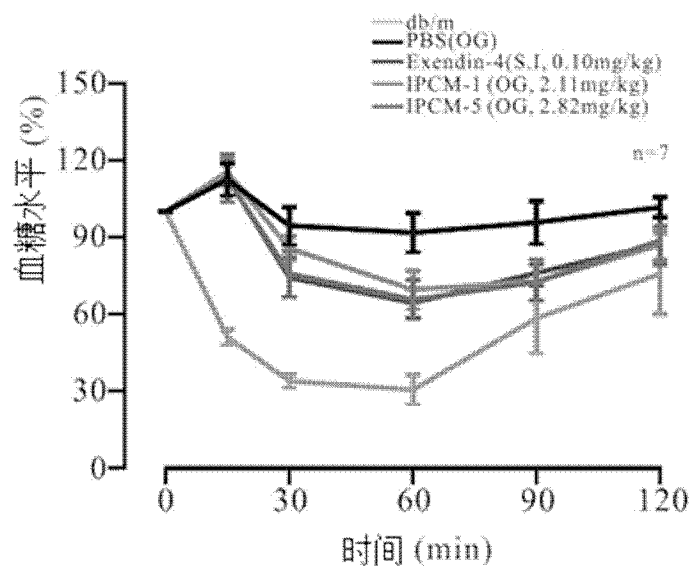


图 4

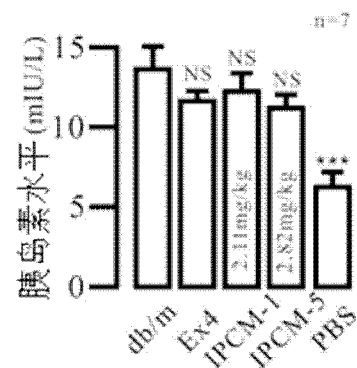


图 5

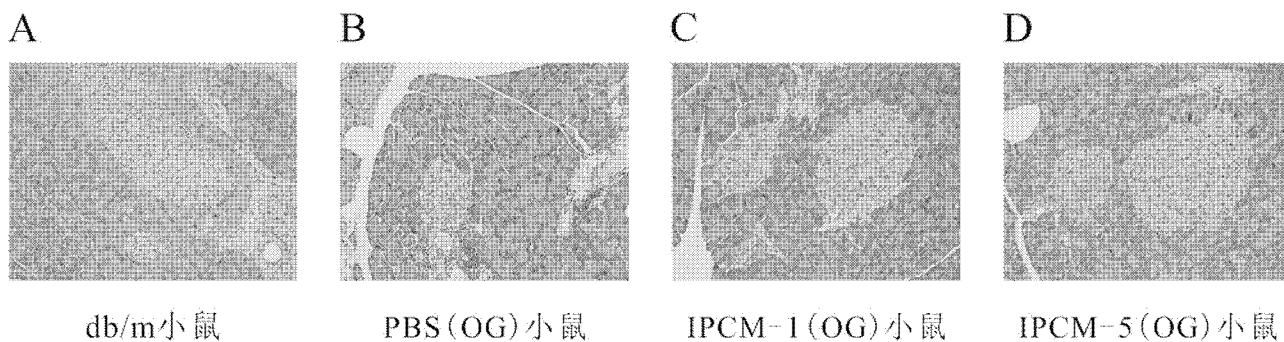


图 6

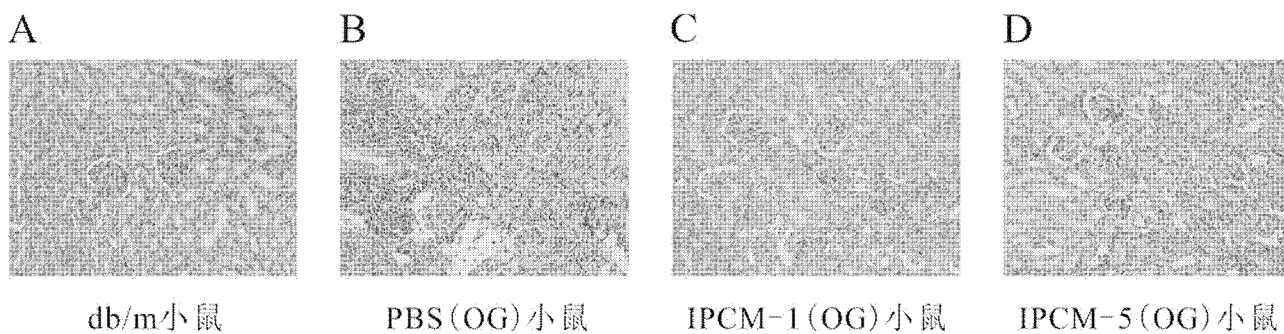


图 7

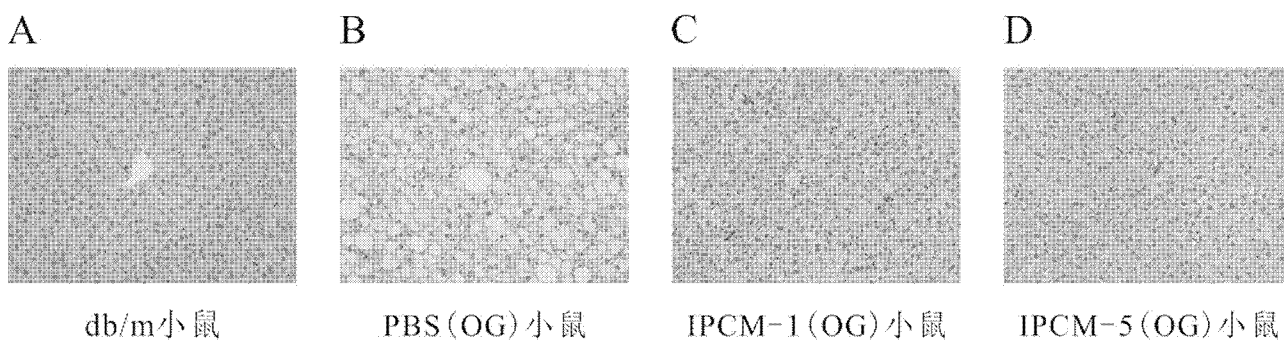


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/104501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/605(2006.01)i; A61K 38/26(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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE and Keyterms: 多肽, 血糖, 糖尿病, 口服, 抗酶解, 胰高血糖素样肽-1受体激动剂, 艾塞那肽, GLP-1类似物, 脂肪酸, SEQ ID NO: 2-9, peptide, blood sugar, oral, resistance to digestion, enzyme resistance, anti-enzymatic hydrolysis, glucagon-like peptide-1 receptor agonist, GLP-1 analogues, fatty acid, Exendin-4, EX4 et al.; 中国专利生物序列检索系统, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; GenBank, and search sequences: SEQ ID NOS: 2-9.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103665148 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 26 March 2014 (2014-03-26) see claims 1-10	1-9
A	CN 107129538 A (ZEALAND PHARMA A/S) 05 September 2017 (2017-09-05) see claims 1-49	1-9
A	CN 105753963 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 13 July 2016 (2016-07-13) see claims 1-5	1-9
A	EP 1799711 B1 (NOVO NORDISK AS) 20 June 2012 (2012-06-20) see claims 1-13	1-9
A	CN 1227567 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 01 September 1999 (1999-09-01) see claims 1-11	1-9

☐ 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

25 November 2018

Date of mailing of the international search report

05 December 2018

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/104501

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103665148	A	26 March 2014	CN	103665148	B	11 May 2016
CN	107129538	A	05 September 2017	EP	2563808	B1	07 December 2016
				MX	343360	B	03 November 2016
				SG	184988	A1	29 November 2012
				IL	222619	D0	31 December 2012
				TW	201138811	A	16 November 2011
				AU	2011247452	A1	15 November 2012
				WO	2011134471	A1	03 November 2011
				EA	023925	B1	29 July 2016
				US	2013143793	A1	06 June 2013
				JP	2013525387	A	20 June 2013
				EA	201290964	A1	30 May 2013
				CA	2797133	A1	03 November 2011
				US	2016184400	A1	30 June 2016
				TW	I523659	B	01 March 2016
				EP	2563808	A1	06 March 2013
				AU	2011247452	B2	17 March 2016
				NZ	603169	A	27 February 2015
				AR	081339	A1	08 August 2012
				CN	103003300	B	09 June 2017
				KR	20130098873	A	05 September 2013
				US	9089538	B2	28 July 2015
				CN	103003300	A	27 March 2013
				EP	2563808	A4	30 October 2013
				US	2017281709	A1	05 October 2017
				MX	2012012461	A	30 November 2012
				US	9649362	B2	16 May 2017
				JP	5969461	B2	17 August 2016
CN	105753963	A	13 July 2016	None			
EP	1799711	B1	20 June 2012	US	2011301084	A1	08 December 2011
				JP	5107713	B2	26 December 2012
				EP	2330126	A1	08 June 2011
				US	8772232	B2	08 July 2014
				WO	2006037811	A2	13 April 2006
				WO	2006037811	A3	07 December 2006
				US	8030273	B2	04 October 2011
				JP	2008515857	A	15 May 2008
				EP	2330126	B1	23 December 2015
				US	2008249007	A1	09 October 2008
				EP	1799711	A2	27 June 2007
CN	1227567	A	01 September 1999	EP	0915910	B1	18 January 2006
				DE	59712555	D1	06 April 2006
				DK	0915910	T3	22 May 2006
				US	6767887	B1	27 July 2004
				KR	20000016389	A	25 March 2000
				JP	2006176532	A	06 July 2006
				PT	915910	T	31 May 2006
				JP	3878653	B2	07 February 2007
				AT	316100	T	15 February 2006
				TR	199802789	T2	22 March 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/104501

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 20050085920 A	29 August 2005
		AU 723694 B2	31 August 2000
		PT 915910 E	31 May 2006
		HK 1022701 A1	12 August 2005
		TR 9802789 T2	22 March 1999
		KR 100600457 B1	13 July 2006
		EP 0915910 A1	19 May 1999
		ES 2256888 T3	16 July 2006
		WO 9746584 A1	11 December 1997
		BR 9710452 A	17 August 1999
		CN 1183158 C	05 January 2005
		AU 3173297 A	05 January 1998
		JP 2000516912 A	19 December 2000
		CA 2257119 A1	11 December 1997

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/104501

A. 主题的分类 C07K 14/605(2006.01)i; A61K 38/26(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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; WEB OF SCIENCE 和关键词: 多肽, 血糖, 糖尿病, 口服, 抗酶解, 胰高血糖素样肽-1受体激动剂, 艾塞那肽, GLP-1类似物, 脂肪酸, SEQ ID NO:2-9, peptide, blood sugar, oral, resistance to digestion, enzyme resistance, anti-enzymatic hydrolysis, glucagon-like peptide-1 receptor agonist, GLP-1 analogues, fatty acid, Exendin-4, EX4等; 中国专利生物序列检索系统; GenBank和检索的序列: SEQ ID NOs:2-9。																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 103665148 A (中国药科大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 见权利要求1-10</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107129538 A (西兰制药公司) 2017年 9月 5日 (2017 - 09 - 05) 见权利要求1-49</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105753963 A (中国药科大学) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 见权利要求1-5</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 1799711 B1 (NOVO NORDISK AS) 2012年 6月 20日 (2012 - 06 - 20) 见权利要求1-13</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1227567 A (曼海姆泊灵格股份公司) 1999年 9月 1日 (1999 - 09 - 01) 见权利要求1-11</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 103665148 A (中国药科大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 见权利要求1-10	1-9	A	CN 107129538 A (西兰制药公司) 2017年 9月 5日 (2017 - 09 - 05) 见权利要求1-49	1-9	A	CN 105753963 A (中国药科大学) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 见权利要求1-5	1-9	A	EP 1799711 B1 (NOVO NORDISK AS) 2012年 6月 20日 (2012 - 06 - 20) 见权利要求1-13	1-9	A	CN 1227567 A (曼海姆泊灵格股份公司) 1999年 9月 1日 (1999 - 09 - 01) 见权利要求1-11	1-9
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 103665148 A (中国药科大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 见权利要求1-10	1-9																		
A	CN 107129538 A (西兰制药公司) 2017年 9月 5日 (2017 - 09 - 05) 见权利要求1-49	1-9																		
A	CN 105753963 A (中国药科大学) 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13) 见权利要求1-5	1-9																		
A	EP 1799711 B1 (NOVO NORDISK AS) 2012年 6月 20日 (2012 - 06 - 20) 见权利要求1-13	1-9																		
A	CN 1227567 A (曼海姆泊灵格股份公司) 1999年 9月 1日 (1999 - 09 - 01) 见权利要求1-11	1-9																		
☐ 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 2018年 11月 25日		国际检索报告邮寄日期 2018年 12月 5日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(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 王颖 电话号码 86-(10)-62412197																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/104501

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	103665148	A	2014年 3月 26日	CN	103665148	B	2016年 5月 11日
CN	107129538	A	2017年 9月 5日	EP	2563808	B1	2016年 12月 7日
				MX	343360	B	2016年 11月 3日
				SG	184988	A1	2012年 11月 29日
				IL	222619	D0	2012年 12月 31日
				TW	201138811	A	2011年 11月 16日
				AU	2011247452	A1	2012年 11月 15日
				WO	2011134471	A1	2011年 11月 3日
				EA	023925	B1	2016年 7月 29日
				US	2013143793	A1	2013年 6月 6日
				JP	2013525387	A	2013年 6月 20日
				EA	201290964	A1	2013年 5月 30日
				CA	2797133	A1	2011年 11月 3日
				US	2016184400	A1	2016年 6月 30日
				TW	1523659	B	2016年 3月 1日
				EP	2563808	A1	2013年 3月 6日
				AU	2011247452	B2	2016年 3月 17日
				NZ	603169	A	2015年 2月 27日
				AR	081339	A1	2012年 8月 8日
				CN	103003300	B	2017年 6月 9日
				KR	20130098873	A	2013年 9月 5日
				US	9089538	B2	2015年 7月 28日
				CN	103003300	A	2013年 3月 27日
				EP	2563808	A4	2013年 10月 30日
				US	2017281709	A1	2017年 10月 5日
				MX	2012012461	A	2012年 11月 30日
				US	9649362	B2	2017年 5月 16日
				JP	5969461	B2	2016年 8月 17日
CN	105753963	A	2016年 7月 13日	无			
EP	1799711	B1	2012年 6月 20日	US	2011301084	A1	2011年 12月 8日
				JP	5107713	B2	2012年 12月 26日
				EP	2330126	A1	2011年 6月 8日
				US	8772232	B2	2014年 7月 8日
				WO	2006037811	A2	2006年 4月 13日
				WO	2006037811	A3	2006年 12月 7日
				US	8030273	B2	2011年 10月 4日
				JP	2008515857	A	2008年 5月 15日
				EP	2330126	B1	2015年 12月 23日
				US	2008249007	A1	2008年 10月 9日
				EP	1799711	A2	2007年 6月 27日
CN	1227567	A	1999年 9月 1日	EP	0915910	B1	2006年 1月 18日
				DE	59712555	D1	2006年 4月 6日
				DK	0915910	T3	2006年 5月 22日
				US	6767887	B1	2004年 7月 27日
				KR	20000016389	A	2000年 3月 25日
				JP	2006176532	A	2006年 7月 6日
				PT	915910	T	2006年 5月 31日
				JP	3878653	B2	2007年 2月 7日
				AT	316100	T	2006年 2月 15日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/104501

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)
		TR 199802789 T2	1999年 3月 22日
		KR 20050085920 A	2005年 8月 29日
		AU 723694 B2	2000年 8月 31日
		PT 915910 E	2006年 5月 31日
		HK 1022701 A1	2005年 8月 12日
		TR 9802789 T2	1999年 3月 22日
		KR 100600457 B1	2006年 7月 13日
		EP 0915910 A1	1999年 5月 19日
		ES 2256888 T3	2006年 7月 16日
		WO 9746584 A1	1997年 12月 11日
		BR 9710452 A	1999年 8月 17日
		CN 1183158 C	2005年 1月 5日
		AU 3173297 A	1998年 1月 5日
		JP 2000516912 A	2000年 12月 19日
		CA 2257119 A1	1997年 12月 11日