



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102027005 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 200980116943. 8

C07K 14/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 05. 15

C07K 14/605 (2006. 01)

(30) 优先权数据

08156221. 7 2008. 05. 15 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/055908 2009. 05. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02009/138488 EN 2009. 11. 19

(71) 申请人 诺沃 - 诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 C · 科恩贝克 T · B · 汉森

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 李志东 刘健

(51) Int. Cl.

C07K 14/435 (2006. 01)

C07K 1/04 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 24 页 序列表 3 页
附图 3 页

(54) 发明名称

通过固相合成制备的肽的纯化

(57) 摘要

本发明涉及用于纯化已通过固相肽合成制备的肽的有效方法。本发明还包括的是包括用于所述方法的试剂的试剂盒和通过所述方法获得的纯化肽。

1. 一种用于纯化通过固相肽合成制备的肽的方法，其包括使通过固相肽合成制备的肽的粗提取物与固体载体接触的步骤。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述固相肽合成包括使用 Fmoc 作为氨基末端保护基团。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述方法包括用于从所述粗肽提取物中去除二苯富烯的方法。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述固体载体包括包含热塑性聚合物的包装材料。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中所述固体载体选自容器、粒状物、颗粒物和漏斗架。

6. 根据权利要求 4 或 5 的方法，其中所述热塑性聚合物是聚乙烯或聚丙烯。

7. 根据权利要求 4-6 中任一项的方法，其包括下述步骤：

(a) 将得自固相合成的所述粗肽提取物加入所述包装材料中；

(b) 使所述提取物在所述包装材料中温育；

(c) 从所述包装材料中取出所述提取物；和

(d) 对所述提取物实施标准肽分离。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中在步骤 (d) 中的所述标准肽分离是离子交换层析。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述固体载体包括离子交换层析柱。

10. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述固体载体包括阴离子交换层析柱。

11. 根据权利要求 9 或 10 中任一项的方法，其包括下述步骤：

(a) 在标准层析条件下，用得自固相合成的所述粗肽提取物或得自权利要求 7 的方法中步骤 (a)-(c) 的肽装载所述离子交换层析柱；

(b) 用醇执行第一个洗脱步骤；和

(c) 用一种或更多种缓冲剂执行第二个洗脱步骤。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中在步骤 (c) 中使用的缓冲剂包括 Tris(三(羟甲基)甲胺)、TAPS(3-{[三(羟甲基)甲基]氨基}丙磺酸)、Bicine(N, N-二(2-羟乙基)甘氨酸)、Tricine(N-三(羟甲基)甲基甘氨酸)、HEPES(4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸)、TES(2-{[三(羟甲基)甲基]氨基}乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)、PIPES(哌嗪-N, N'-双(2-乙磺酸))、Cacodylate(二甲基胂酸盐)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)或乙酸盐。

13. 根据权利要求 11 或 12 中任一项的方法，其中在步骤 (b) 中使用的所述醇是 C₁₋₅ 醇。

14. 根据任何前述权利要求的方法，其中所述多肽是胰高血糖素样肽。

15. 一种肽，其通过权利要求 1-14 中任一项中描述的方法获得。

通过固相合成制备的肽的纯化

发明领域

[0001] 本发明涉及用于纯化通过固相肽合成制备的肽的方法，包括用于所述方法的试剂的试剂盒和通过所述方法获得的纯化肽。

[0002] 发明背景

[0003] 多肽越来越多地用作药剂用于治疗在所有主要治疗领域内的疾病。用于治疗应用的多肽是待高度纯化的，以便有效且提供在施用于患者后不引起不利事件的确定性。

[0004] 获得治疗肽的一种方法是通过固相肽合成。固相合成的产物是与不溶性载体结合的肽。随后使以这种方式合成的肽与树脂切割开，并且分离经切割的肽。

[0005] 为了避免固相肽合成方法中的副反应，胺基团在偶联反应过程中用氨基末端保护基团（也称为 N 末端保护基团）掩蔽，其包括与氨基酸的 α 氨基偶联的化学部分。一般地，氨基末端保护基团在将下一个氨基酸加入生长中的肽链前在脱保护反应中去除，但当肽在固相合成过程中与载体切割开时可以维持。在洗涤或还以其他方式处理肽时，氨基末端基团可以维持。

[0006] 来自固相肽合成的粗肽混合物包括大量有机溶剂、试剂和方法相关杂质。通常，肽混合物显示出高 UV 吸收，这干扰在层析控制方法中的线内 UV 测量。此外，大部分杂质降低离子交换剂的能力并且难以完全去除。因此，即使在纯化后一般也存在杂质水平。

[0007] 9- 芴甲氧羰基 (Fmoc) 是优选 N 末端保护基团的例子。Fmoc 是碱敏感性 N 末端保护基团，其可以通过碱与氨基酸脱偶联。

[0008] 已知二苯富烯 (DBF) 在保护基团例如 Fmoc 的切割过程中产生，并且后续去除是复杂且昂贵的。因此，非常需要在固相肽合成后的有效纯化方法。

[0009] 发明概述

[0010] 根据本发明的第一个方面，提供了用于纯化通过固相肽合成制备的肽的方法，其包括使通过固相肽合成制备的肽的粗提取物与固体载体接触的步骤。

[0011] 根据本发明的第二个方面，提供了固相肽合成试剂盒，其包括用于固相肽合成的试剂、如本文定义的固体载体、和依照本文定义方法使用所述试剂盒的说明书。

[0012] 根据本发明的第三个方面，提供了通过本文所述方法获得的肽。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1。通过经由固相合成制备的肽的控制纯化获得的层析谱。

[0015] 图 2。在包括聚乙烯的容器中通过固相合成制备的肽贮存后获得的层析谱。

[0016] 图 3。在 100% 乙醇的存在下通过固相合成制备的肽层析分离后获得的层析谱。

[0017] 发明描述

[0018] 下述是说明书中使用的术语的详细定义。

[0019] 如本文使用的，术语“缓冲剂”指减少溶液例如层析溶液的 pH 随着时间过去改变的趋势的化学化合物，否则将发生所述改变。缓冲剂包括下述非限制性例子：乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸钠、甘氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、磷酸钠、硼酸盐、

三羟甲基氨基甲烷、乙醇胺及其混合物。

[0020] 如本文可互换使用的，术语“多肽”或“肽”意指由通过肽键连接的至少 5 个组成成分氨基酸组成的化合物。组成成分氨基酸可以来自由遗传密码编码的氨基酸组，并且它们可以是并非由遗传密码编码的天然氨基酸，以及合成氨基酸。22 种编码（也称为 proteogenic）氨基酸是：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、羟脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸。并非由遗传密码编码但可以经由肽键掺入肽内的天然氨基酸可以指定为天然非 proteogenic 氨基酸，并且是例如 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D-丙氨酸和 D-谷氨酰胺。合成非 proteogenic 氨基酸包括通过化学合成制造的氨基酸，即由遗传密码编码的氨基酸的 D-同分异构体，例如 D-丙氨酸和 D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、Abu(α -氨基丁酸)、Tle(叔丁基甘氨酸)、3-氨基甲基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、氨基酸的 β 类似物例如 β -丙氨酸等、D-组氨酸、去氨基-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、同组氨酸、N^ε-乙酰基-组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸、 α -甲基-组氨酸、3-吡啶基丙氨酸、2-吡啶基丙氨酸或 4-吡啶基丙氨酸、(1-氨基环丙基)羧酸、(1-氨基环丁基)羧酸、(1-氨基环戊基)羧酸、(1-氨基环己基)羧酸、(1-氨基环庚基)羧酸或(1-氨基环辛基)羧酸。

[0021] 多肽可以包括单条肽链，或它可以包括超过一条肽链，例如其中 2 条链通过二硫键连接的人胰岛素。

[0022] 如本文使用的，术语“胰高血糖素样肽”指促胰岛素分泌肽(exendins)例如促胰岛素分泌肽-3 和促胰岛素分泌肽-4，以及除衍生自胰高血糖素前原基因的胰高血糖素外的同源肽，即胰高血糖素样肽 1(GLP-1)、胰高血糖素样肽 2(GLP-2) 和胃泌酸调节素(OXM) 以及其类似物和衍生物。在吉拉毒蜥(Gila monster)中发现的促胰岛素分泌肽与 GLP-1 同源，并且也发挥促胰岛素效应。促胰岛素分泌肽的例子是促胰岛素分泌肽-4 和促胰岛素分泌肽-3。胰高血糖素样肽具有 SEQ IDNos.1-6 中所示序列：

[0023] 胰高血糖素 (SEQ ID NO : 1) ;

[0024] GLP-1 (SEQ ID NO : 2) ;

[0025] GLP-2 (SEQ ID NO : 3) ;

[0026] 促胰岛素分泌肽-4 (SEQ ID NO : 4) ;

[0027] 促胰岛素分泌肽-3 (SEQ ID NO : 5) ; 和

[0028] OXM (SEQ ID NO : 6)。

[0029] 如本文提及肽使用的术语“类似物”意指经修饰的肽，其中肽的一个或多个氨基酸残基已由其他氨基酸残基置换和/或其中一个或多个氨基酸残基已从肽中缺失，和或其中一个或多个氨基酸残基已加入肽中。氨基酸残基的此类加入或缺失可以在肽的 N 末端上和/或在肽的 C 末端上发生。2 种不同且简单的系统通常用于描述类似物：例如 Arg³⁴-GLP-1 (7-37) 或 K34R-GLP-1 (7-37) 指定 GLP-1 类似物，其中在第 34 位上天然存在的赖氨酸已由精氨酸置换（根据 IUPAC-IUB 命名法使用的关于氨基酸的标准单或三字母缩写）。关于其未陈述旋光异构体的所有氨基酸应理解为意指 L-同分异构体。

[0030] 在本发明的实施方案中，最大限度 17 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方

案中，最大限度 15 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 10 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 8 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 7 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 6 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 5 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 4 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 3 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 2 个氨基酸已进行修饰。在本发明的实施方案中，最大限度 1 个氨基酸已进行修饰。

[0031] 如本文就肽而言使用的术语“衍生物”意指化学修饰的肽或其类似物，其中至少一个取代基不存在于未修饰的肽或其类似物中，即已进行共价修饰的肽。一般的修饰是酰胺、碳水化合物、烷基、酰基、酯、聚乙二醇化等。GLP-1(7-37) 衍生物的例子是 $N^{\epsilon 26}-(4S)-4-(十六酰氨基)-羧基-丁酰$ [Arg³⁴, Lys²⁶]GLP-1-(7-37)。

[0032] 如本文就肽而言使用的术语“其片段”意指具有亲本多肽至少 20% 氨基酸的肽的任何片段。因此，对于人血清白蛋白，片段将包括至少 117 个氨基酸，因为人血清白蛋白具有 585 个氨基酸。在一个实施方案中，片段具有亲本肽的至少 35% 氨基酸。在另一个实施方案中，片段具有亲本肽的至少 50% 氨基酸。在另一个实施方案中，片段具有亲本肽的至少 75% 氨基酸。

[0033] 如本文就肽而言使用的术语“变体”意指经修饰的肽，其是亲本肽的类似物、亲本肽的衍生物、或亲本肽类似物的衍生物。

[0034] 如本文使用的，术语“GLP-1 肽”意指 GLP-1(7-37)、GLP-1(7-37) 的类似物、GLP-1(7-37) 的衍生物、或 GLP-1(7-37) 类似物的衍生物。

[0035] 如本文使用的，术语“GLP-2 肽”意指 GLP-2(1-33)、GLP-2 的类似物、GLP-2(1-33) 的衍生物、或 GLP-2(1-33) 类似物的衍生物。

[0036] 如本文使用的，术语“促胰岛素分泌肽 -4 肽”意指促胰岛素分泌肽 -4(1-39)、促胰岛素分泌肽 -4 类似物、促胰岛素分泌肽 -4 衍生物、或促胰岛素分泌肽 -4 类似物的衍生物。

[0037] 如本文使用的，术语“血浆稳定的”胰高血糖素样肽例如 GLP-1、GLP-2、胰高血糖素、促胰岛素分泌肽 -3 或促胰岛素分泌肽 -4 意指化学修饰的胰高血糖素样肽，即例如 GLP-1、GLP-2、胰高血糖素、促胰岛素分泌肽 -3 或促胰岛素分泌肽 -4 的类似物或衍生物，其在人中显示出至少 10 小时的体内血浆清除半衰期，如通过下述方法测定的。用于测定胰高血糖素样肽在人的血浆清除半衰期的方法是：使化合物溶解于等渗缓冲液，pH 7.4，PBS 或任何其他合适缓冲液中。剂量外周地优选在腹部或大腿上部内注射。用于测定活性化合物的血样以频繁间隔并且以足够持续时间获得，以覆盖终末消除部分（例如剂量前、剂量后 1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24(天 2)、36(天 2)、48(天 3)、60(天 3)、72(天 4) 和 84(天 4) 小时）。活性化合物浓度的测定如 Wilken 等人，Diabetologia 43(51)：A143，2000 中所述执行。衍生的药代动力学参数通过使用非区室法由关于每个个别受试者的浓度时间数据计算，使用商购可得软件 WinNonlin 版本 2.1(Pharsight, Cary, NC, USA)。终末消除速率常数通过对浓度时间曲线的末端对数线性部分的对数线性回归进行估计，并且用于计算消除半衰期。

[0038] 如本文使用的，术语“促胰岛素试剂”意指其为人 GLP-1 受体的激动剂的化合

物，即在包含人 GLP-1 受体的合适培养基（一种此类培养基在下文公开）中刺激 cAMP 形成的化合物。促胰岛素试剂的效力通过如下所述根据剂量应答曲线计算 EC_{50} 值进行测定。

[0039] 表达克隆人 GLP-1 受体 (BHK-467-12A) 的幼仓鼠肾 (BHK) 细胞在 DMEM 培养基中生长，所述 DMEM 培养基添加有 100IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、5% 胎牛血清和 0.5mg/mL 遗传霉素 G-418 (Life Technologies)。细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤 2 次，并且用维尔烯 (Versene) 收获。通过用 Ultraturax 在缓冲液 1 (20mM HEPES-Na、10mM EDTA, pH 7.4) 中匀浆化由细胞制备质膜。使匀浆物在 48,000xg 下在 4°C 下离心 15 分钟。通过在缓冲液 2 (20mM HEPES-Na、0.1mMEDTA, pH 7.4) 中匀浆化使团块悬浮，随后在 48,000xg 下在 4°C 下离心 15 分钟。洗涤操作再重复一次。使最终团块悬浮于缓冲液 2 中，并且紧用于测定或贮存于 -80°C 下。

[0040] 功能受体测定通过测量作为响应经由促胰岛素试剂刺激的环状 AMP (cAMP) 来执行。所形成的 cAMP 通过 AlphaScreen™ cAMP Kit (Perkin Elmer Life Sciences) 进行定量。温育在一半面积 96 孔微量滴定板中在 50 μ L 缓冲液 3 (50mM Tris-HCl、5mM HEPES、10mM $MgCl_2$, pH 7.4) 总体积中执行且伴随下述添加：1mM ATP、1 μ M GTP、0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、0.01% Tween-20、0.1% BSA、6 μ g 膜制剂、15 μ g/mL 受体珠、与 6nM 生物素基-cAMP 预温育的 20 μ g/mL 供体珠。使待测试激动剂活性的化合物在缓冲液 3 中溶解且稀释。新鲜制备 GTP 用于每次实验。使板在黑暗中伴随缓慢搅拌在室温下温育 3 小时，随后为在 Fusion™ 仪器 (Perkin Elmer Life Sciences) 中计数。对于个别化合物描绘浓度应答曲线，并且使用 4 参数对数模型与 Prism v.4.0 (GraphPad, Carlsbad, CA) 估计 EC_{50} 值。

[0041] 如本文使用的，术语“DPP-IV 保护的胰高血糖素样肽”意指与天然肽比较进行化学修饰的胰高血糖素样肽，以使得所述胰高血糖素样肽对血浆肽酶二肽氨肽酶-4 (DPP-IV) 更有抵抗力。

[0042] 肽对经由二肽氨肽酶 IV 降解的抵抗力通过下述降解测定法进行测定：

[0043] 使等分试样的肽 (5nmol) 在 37°C 下和与 5mU 酶促活性对应的 1 μ L 纯化二肽氨肽酶 IV 在 100 μ L 0.1M 三乙胺-HCl 缓冲液，pH 7.4 中温育 10-180 分钟。酶促反应通过加入 5 μ L 10% 三氟乙酸得到终止，并且使用 HPLC 分析使肽降解产物分离且定量。用于执行这种分析的一种方法是：

[0044] 将混合物应用到 Vydac C18 大孔 (widepore) (30nm 孔，5 μ m 颗粒) 250x4.6mm 柱上，并且以 1ml/ 分钟的流速用在 0.1% 三氟乙酸中的乙腈线性阶式梯度洗脱 (0% 乙腈 3 分钟，0-24% 乙腈 17 分钟，24-48% 乙腈 1 分钟)，根据 Siegel 等人，Regul.Pept.1999；79：93-102 和 Mentlein 等人 Eur.J.Biochem.1993；214：829-35。肽及其降解产物可以通过其在 220nm (肽键) 或 280nm (芳香族氨基酸) 下的吸光度进行监控，并且通过其与标准那些相关的峰面积的积分进行定量。肽通过二肽氨肽酶 IV 的水解速率在导致小于 10% 的肽被水解的温育时间下进行估计。

[0045] 如本文使用的，术语“免疫调节的促胰岛素分泌肽-4 化合物”意指这样的促胰岛素分泌肽-4 肽，与促胰岛素分泌肽-4 (1-39) 比较，其是在人中具有减少的免疫应答的促胰岛素分泌肽-4 (1-39) 类似物或衍生物。用于评估免疫应答的方法是在患者治疗 4 周

后测量对促胰岛素分泌肽-4 化合物反应的抗体浓度。

[0046] 如本文使用的，术语“胰岛素肽”意指其为人胰岛素、人胰岛素类似物或化学修饰的人胰岛素的肽，即人胰岛素的衍生物或人胰岛素类似物。

[0047] 如本文使用的，术语“人胰岛素”意指其结构和性质众所周知的人激素。人胰岛素具有通过在半胱氨酸残基之间的二硫桥连接的 2 条多肽链，即 A 链和 B 链。A 链是 21 氨基酸肽，并且 B 链是 30 氨基酸肽，所述 2 条链通过 3 个二硫桥连接：一个在 A 链的第 6 和 11 位中的半胱氨酸之间，第二个在 A 链的第 7 位中的半胱氨酸和 B 链的第 7 位中的半胱氨酸之间，并且第三个在 A 链的第 20 位中的半胱氨酸和 B 链的第 19 位中的半胱氨酸之间。

[0048] 如本文使用的，术语“多肽产物”意指待用于制造药物组合物的纯化肽产物。因此，多肽产物通常作为来自最终纯化、干燥或条件处理步骤的产物获得。产物可以是晶体、沉淀物、溶液或悬浮液。多肽产物在本领域中也称为原料药，即活性药学成分。

[0049] 如本文使用的，术语“等电点”意指其中大分子例如多肽的净总电荷是零的 pH 值。在可能存在许多荷电基团的多肽中，并且在等电点下，所有这些电荷的总和是零。在高于等电点的 pH 下，多肽的净总电荷将是负的，而在低于等电点的 pH 值下，多肽的净总电荷将是正的。

[0050] 如本文使用的，术语“药学上可接受的”意指适合于正常药学应用，即在患者中不产生不利事件。

[0051] 如本文使用的，术语“赋形剂”意指通常加入药物组合物中的化学化合物，即缓冲剂、张度剂、防腐剂等。

[0052] 如本文使用的，术语“有效量”意指与不治疗比较，足以有效治疗患者的用量。

[0053] 如本文使用的，术语“药物组合物”意指包括活性化合物或其盐连同药学赋形剂例如缓冲剂、防腐剂和任选地张度改性剂和 / 或稳定剂的产物。因此，药物组合物在本领域中也称为药物制剂。

[0054] 如本文使用的，术语“疾病治疗”意指已发展疾病、病状或病症的患者的管理和照顾。治疗目的是对抗疾病、病状或病症。治疗包括施用活性化合物以消除或控制疾病、病状或病症，以及减轻与疾病、病状或病症相关的症状或并发症。

[0055] 应当理解固相肽合成是本领域技术人员众所周知的。此外，保护基团与肽的偶联和后续脱保护步骤也是本领域技术人员众所周知的。

[0056] 在一个实施方案中，固相肽合成包括使用 Fmoc 作为氨基末端保护基团。在一个进一步的实施方案中，本发明的纯化方法包括用于从粗肽提取物中去除二苯富烯的方法。在一个实施方案中，固相肽合成产物的脱保护步骤包括碱的使用。在一个进一步的实施方案中，碱选自仲胺和 / 或能够氢解的试剂。在一个再进一步的实施方案中，碱选自哌啶、二乙胺和哌嗪。

[0057] 在一个实施方案中，固相肽合成产物的脱保护步骤在溶剂例如 N- 甲基吡咯烷酮 (NMP)、二甲基甲酰胺 (DMF) 和二氯甲烷 (DCM) 中执行。

[0058] 在一个实施方案中，在脱保护步骤后获得的粗肽提取物的纯化包括将粗肽提取物应用于固体载体，随后从其中洗脱纯化产物。

[0059] 在一个实施方案中，固体载体包括离子交换层析柱。在一个进一步的实施方案中，固体载体包括阴离子树脂或阳离子树脂。在一个再进一步的实施方案中，固体载体包括选自 Source 30Q、Poros 50HQ、QSepharose HP、Q Ceramic HyperD F 的树脂。在一个再进一步的实施方案中，固体载体包括阴离子树脂（例如季铵树脂例如 Source 30Q）。

[0060] 在其中固体载体包括离子交换层析柱的本发明的一个实施方案中，本发明的纯化方法包括下述步骤：

[0061] (a) 在标准层析条件下，用得自固相合成的粗肽提取物装载离子交换层析柱；

[0062] (b) 用醇执行洗脱步骤；和

[0063] (c) 用一种或更多种缓冲剂执行层析分离。

[0064] 在一个实施方案中，在步骤 (b) 中的醇是 C_{1-5} 醇，即具有 1-5 个碳原子的醇。在另一个实施方案中，醇是 C_{1-3} 醇。在一个实施方案中，醇是选自下述的未分支或分支醇：甲醇、乙醇、1-丙醇（丙醇）、2-丙醇（异丙醇）、2-甲基-1-丙醇（异丁醇）、2-甲基-2-丙醇（叔丁醇）、1-丁醇（丁醇）、2-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-2-丁醇、3-甲基-2-丁醇、1-戊醇（戊醇）、2-戊醇和 3-戊醇。在一个进一步的实施方案中，醇选自乙醇和丙醇。在一个实施方案中，在步骤 (b) 中的醇选自：70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇（在水中）和 100%乙醇。在一个实施方案中，在步骤 (b) 中的醇是 100%乙醇。

[0065] 本发明的这个实施方案提供了洗脱步骤（步骤 (b)）有效去除来自离子交换柱的杂质的优点。例如，当 Fmoc 已在肽合成方法中用作 N 末端保护基团时，已惊奇地发现这个步骤选择性洗脱二苯富烯。层析分离步骤（步骤 (c)）随后在不存在任何残留杂质（例如二苯富烯）的情况下分离纯化肽，如本文证实的。

[0066] 在步骤 (c) 中可以使用的缓冲剂的例子包括 Tris（三（羟甲基）甲胺）、TAPS（3-[[三（羟甲基）甲基]氨基]丙磺酸、Bicine（N，N-二（2-羟乙基）甘氨酸）、Tricine（N-三（羟甲基）甲基甘氨酸）、HEPES（4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸）、TES（2-[[三（羟甲基）甲基]氨基]乙磺酸）、MOPS（3-（N-吗啉代）丙磺酸）、PIPES（哌嗪-N，N'-双（2-乙磺酸））、Cacodylate（二甲基膦酸盐）、MES（2-（N-吗啉代）乙磺酸）或乙酸盐。在一个实施方案中，在步骤 (c) 中使用的缓冲剂包括 Tris 缓冲剂（例如缓冲至 pH 8.0 的 0.02mol/kg Tris）。

[0067] 应当理解缓冲剂可以在步骤 (c) 中任选在一种或更多种溶剂（例如乙醇，例如 50%（w/w）乙醇）的存在下使用。还应当理解用于分离步骤 (c) 的条件一般是本领域技术人员已知的那些。例如，用第一种缓冲液平衡，随后通过应用从第一种缓冲液到第二种缓冲液（其一般将与第一种缓冲液相同，除一种或更多种盐（例如氯化钠，例如 0.0625mol/kg 氯化钠）的存在外）的线性梯度洗脱。

[0068] 在一个实施方案中，固体载体包括包含热塑性聚合物例如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯或相似材料的包装材料，例如容器、粒状物、颗粒物或漏斗架。在另一个实施方案中，固体载体包括包含聚乙烯、聚丙烯或聚苯乙烯的包装材料，例如容器、粒状物、颗粒物或漏斗架。在另外一个实施方案中，固体载体包括包含聚乙烯的包装材料，例如容器、粒状物、颗粒物或漏斗架。

[0069] 当在本文中使用时，术语“容器”应意指在纯化前或后用于包含待纯化肽的任

何装置。

[0070] 在其中固体载体包括包含热塑性聚合物的包装材料的本发明的实施方案中，本发明的纯化方法包括下述步骤：

[0071] (a) 将得自固相合成的粗肽提取物加入包装材料中；

[0072] (b) 使提取物在包装材料中温育；

[0073] (c) 从包装材料中取出提取物；和

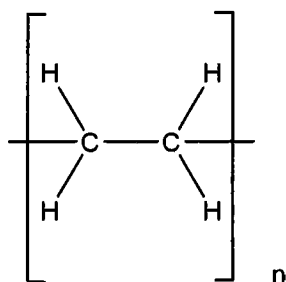
[0074] (d) 对提取物实施标准肽分离。

[0075] 当在本文中使用时，术语“标准肽分离”应意指适合于使肽与杂质分离的本领域已知的任何分离法，例如层析分离（例如离子交换层析、疏水作用层析或反相 HPLC（高效液相层析））、超滤（UF）、等电沉淀或任何其他合适分离法。

[0076] 在一个实施方案中，在步骤（d）中的标准肽分离是离子交换层析例如阴离子交换层析。

[0077] 提及“聚乙烯”、“聚丙烯”等包括提及由乙烯（IUPAC 名称 ethene）、丙烯（IUPAC 名称 propene）等多个（即超过一个）单体单位组成的聚合物。为了例示，聚乙烯的一般结构在下文作为式（I）的化合物显示，其中 n 是整数：

[0078]



(I)

[0079] 聚乙烯可以以高密度聚乙烯（HDPE）或低密度聚乙烯（LDPE）的形式。在一个实施方案中，聚乙烯是低密度聚乙烯（LDPE）。LDPE 具有低分支度，并且因此具有更强的分子间作用力和抗张强度，并且由大于或等于 0.941g/cm³ 的密度限定。LDPE 由 0.910-0.940g/cm³ 的强度范围限定。

[0080] 聚丙烯可以以高密度聚丙烯（HDPP）或低密度聚丙烯（LDPP）的形式。在一个实施方案中，聚丙烯是低密度聚丙烯（LDPP）。

[0081] 本发明的这个实施方案提供了给限定包装材料添加粗肽提取物导致杂质与包装材料表面附着的优点。因此，该方法有效去除来自粗肽提取物的杂质。例如，当 Fmoc 已在肽合成方法中用作 N 末端保护基团时，已惊奇地发现这个步骤使二苯富烯与聚乙烯包装材料表面选择性附着，如本文证实的。

[0082] 在一个实施方案中，温育步骤（b）一般包括在环境温度（例如室温）下温育 2 分钟 -10 小时的持续时间。在另一个实施方案中，持续时间是 2 分钟 -2 小时。在另外一个实施方案中，持续时间是 2 分钟 -30 分钟。

[0083] 在一个实施方案中，步骤（b）可以另外包括提取物的搅拌。

[0084] 在一个实施方案中，步骤（d）一般包括依照已知操作的层析分离，其可以包括

批吸附、填充柱或滤器。

[0085] 在一个实施方案中，步骤(d)包括层析分离，其中使用填充柱或滤器，并且其中停留时间是至少0.1分钟。在另一个实施方案中，停留时间是至少1分钟。在另外一个实施方案中，停留时间是0.1分钟-60分钟。在另外一个实施方案中，停留时间是0.1分钟-10分钟。

[0086] 当在本文中使用时，术语“停留时间”应理解为肽与包装材料接触的平均时间，即肽如何快速地移动通过包装材料。

[0087] 在本发明的一个实施方案中，多肽是胰高血糖素样肽。

[0088] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是DDP-IV保护的胰高血糖素样肽。

[0089] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是血浆稳定的胰高血糖素样肽。

[0090] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽具有赖氨酸残基，例如一个赖氨酸，其中亲脂取代基任选经由间隔物与所述赖氨酸的 ϵ 氨基附着。

[0091] 在一个实施方案中，亲脂取代基包括酰基基团。酰基基团具有式 $R(C=O)-$ 。

[0092] 在本发明的一个实施方案中，亲脂取代基具有8-40个碳原子，优选8-24个碳原子，例如12-18个碳原子。

[0093] 在一个实施方案中，本发明提供了包括亲脂取代基的胰高血糖素样肽的衍生物，其中所述亲脂取代基包括直链或分支烷烃 α, ω -二羧酸。

[0094] 在一个实施方案中，本发明提供了根据上述实施方案的胰高血糖素样肽，其中亲脂取代基是或包括选自下述的部分： $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_m-R-CO-$ 、 $(NH_2-CO)-(CH_2)_n-CO-$ 和 $HO-(CH_2)_n-CO-$ ；其中R是选自环戊基、环己基和环庚基的环烷基， $4 \leq n \leq 38$ 和 $0 \leq m \leq 4$ 。

[0095] 在一个实施方案中， $12 \leq n \leq 36$ 。在一个实施方案中， $12 \leq n \leq 20$ 。

[0096] 在一个实施方案中，亲脂取代基选自： $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_m-R-CO-$ 、 $(NH_2-CO)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $HO-(CH_2)_n-CO-$ ；其中R是选自环戊基、环己基和环庚基的环烷基， $4 \leq n \leq 38$ 和 $1 \leq m \leq 4$ 。

[0097] 在一个实施方案中，亲脂取代基选自： $CH_3-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $(COOH)-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_m-R-CO-$ 、 $(NH_2-CO)-(CH_2)_n-CO-$ 、 $HO-(CH_2)_n-CO-$ ；其中R是环己基， $12 \leq n \leq 20$ 和 $1 \leq m \leq 2$ 。

[0098] 一个或多个亲脂取代基可以直接或经由合适间隔物与活性组分连接。在一个实施方案中，亲脂组分经由合适间隔物附着。

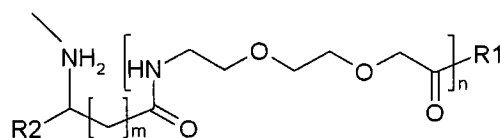
[0099] 在一个实施方案中，间隔物存在并且包括至少一个氨基酸残基。

[0100] 在本发明的一个实施方案中，间隔物存在并且选自氨基酸，例如 β -Ala、L-Glu或氨基丁酰基。

[0101] 在一个实施方案中，间隔物存在并且选自 γ -或 α -谷氨酰接头、 β -或 α -天冬氨酰接头、 α -酰氨基- γ -谷氨酰接头、或 α -酰氨基- β -天冬氨酰接头、或其组合。

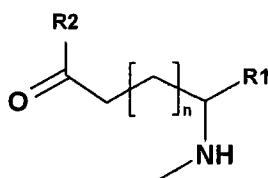
[0102] 在一个实施方案中，间隔物具有通式I

[0103]



式 I

- [0104] 其中
 [0105] n 是 0-4 ;
 [0106] m 是 1-2 ;
 [0107] R1 指定与活性组分的附着位点 ;
 [0108] R2 是 COR3 或 H ; 和
 [0109] R3 是 OH、NH₂ 或 C₁₋₁₂ 烷基和苯甲基。
 [0110] 在一个实施方案中, 间隔物具有通式 II
 [0111]



通式 II

- [0112] 其中
 [0113] n 是 0-8 ;
 [0114] R1 是 COOR3 ;
 [0115] R2 指定与活性组分的附着位点 ; 和
 [0116] R3 选自氢、C₁₋₁₂-烷基和苯甲基。
 [0117] 在本发明的一个实施方案中, 多肽是胰高血糖素、胰高血糖素类似物、胰高血糖素的衍生物、或胰高血糖素类似物的衍生物。
 [0118] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 的衍生物、或 GLP-1 类似物的衍生物。
 [0119] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是 GLP-1 肽, 其具有 22-40 个氨基酸残基、优选 26-36 个氨基酸残基、更加优选 29-33 个氨基酸残基。
 [0120] 在本发明的一个实施方案中, GLP-1 肽是 GLP-1 类似物。
 [0121] 在本发明的一个实施方案中, GLP-1 类似物选自 Arg³⁴-GLP-1(7-37)、Gly⁸-GLP-1(7-36)-酰胺、Gly⁸-GLP-1(7-37)、Val⁸-GLP-1(7-36)-酰胺、Val⁸-GLP-1(7-37)、Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-酰胺、Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-酰胺、Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-酰胺、Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-酰胺、Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37)、Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-酰胺、Val⁸His²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37)、Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37)、

Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37)、Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37)、Aib⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37)、Aib⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37)、[3-(4-咪唑基)丙酰基]⁷Arg³⁴GLP-1(7-37)、Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37)、Aib⁸Arg³⁴Pro³⁷-GLP-1(7-37)、Aib^{8, 22, 27, 30, 35}Arg³⁴Pro³⁷-GLP-1(7-37)酰胺、去氨基His⁷Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1(7-37)、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1(7-37)酰胺、去氨基His⁷Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Phe(m-CF₃)²⁸-GLP-1(7-37)酰胺、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Lys³⁰-GLP-1(7-37)、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Lys³¹-GLP-1(7-37)、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Lys³¹Arg³⁴-GLP-1(7-37)、去氨基His⁷Glu²²Arg²⁶Glu³⁰Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1(7-37)、Aib⁸Lys²⁰Glu²²Arg²⁶Glu³⁰Pro³⁷-GLP-1(7-37)酰胺、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Glu³⁰Pro³⁷-GLP-1(7-37)、去氨基His⁷Glu²²Arg²⁶Glu³⁰Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1(7-37)酰胺、去氨基His⁷Glu²²Arg²⁶Arg³⁴Lys³⁷-GLP-1(7-37)酰胺、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Glu³⁰Lys³⁶-GLP-1(7-37)Glu-酰胺、Aib⁸Glu²²Arg²⁶Lys³¹GLP-1(7-37)、其类似物和这些中的任何的衍生物。

[0122] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是 GLP-1 衍生物或 GLP-1 类似物的衍生物，其具有赖氨酸残基，例如一个赖氨酸，其中亲脂取代基任选经由间隔物与所述赖氨酸的 ε 氨基附着。

[0123] 在一个实施方案中，GLP-1 类似物或衍生物在 GLP-1(7-37) 肽或其类似物的第 7 和 8 位中的至少一个氨基酸残基中进行修饰，并且具有任选经由间隔物与所述 GLP-1 类似物的第 26 位中的赖氨酸残基上的 ε 氨基附着的亲脂取代基。

[0124] 在本发明的一个实施方案中，亲脂取代基具有 8-40 个碳原子，优选 8-24 个碳原子，例如 12-18 个碳原子。

[0125] 在一个实施方案中，本发明提供了包括亲脂取代基的 GLP-1 肽的衍生物，其中所述亲脂取代基包括直链或分支烷烃 α, ω-二羧酸。

[0126] 在一个实施方案中，本发明提供了根据上述实施方案的 GLP-1 肽，其中亲脂取代基是或包括选自下述的部分：CH₃-(CH₂)_n-CO-、(COOH)-(CH₂)_n-CO-、(COOH)-(CH₂)_n-CO-NH-(CH₂)_m-R-CO-、(NH₂-CO)-(CH₂)_n-CO- 和 HO-(CH₂)_n-CO-；其中 R 是选自环戊基、环己基和环庚基的环烷基，4≤n≤38 和 0≤m≤4。

[0127] 在一个实施方案中，12≤n≤36。在一个实施方案中，12≤n≤20。

[0128] 在一个实施方案中，亲脂取代基选自：CH₃-(CH₂)_n-CO-、(COOH)-(CH₂)_n-CO-、(COOH)-(CH₂)_n-CO-NH-(CH₂)_m-R-CO-、(NH₂-CO)-(CH₂)_n-CO-、HO-(CH₂)_n-CO-；其中 R 是选自环戊基、环己基和环庚基的环烷基，4≤n≤38 和 1≤m≤4。

[0129] 在一个实施方案中，亲脂取代基选自：CH₃-(CH₂)_n-CO-、(COOH)-(CH₂)_n-CO-、(COOH)-(CH₂)_n-CO-NH-(CH₂)_m-R-CO-、(NH₂-CO)-(CH₂)_n-CO-、HO-(CH₂)_n-CO-；其中 R 是环己基，12≤n≤20 和 1≤m≤2。

[0130] 一个或多个亲脂取代基可以直接或经由合适间隔物与活性组分连接。在一个实施方案中，亲脂组分经由合适间隔物附着。

[0131] 在一个实施方案中，间隔物存在并且包括至少一个氨基酸残基。

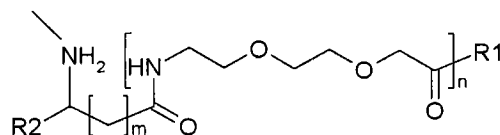
[0132] 在本发明的一个实施方案中，间隔物存在并且选自氨基酸，例如 β-Ala、L-Glu

或氨基丁酰基。

[0133] 在一个实施方案中, 间隔物存在并且选自 γ -或 α -谷氨酰接头、 β -或 α -天冬氨酰接头、 α -酰氨基- γ -谷氨酰接头、或 α -酰氨基- β -天冬氨酰接头、或其组合。

[0134] 在一个实施方案中, 间隔物具有通式 I

[0135]



通式 I

[0136] 其中

[0137] n 是 0-4 ;

[0138] m 是 1-2 ;

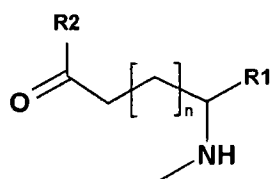
[0139] R1 指定与活性组分的附着位点 ;

[0140] R2 是 COR3 或 H ; 和

[0141] R3 是 OH、NH₂ 或 C₁₋₁₂ 烷基和苯甲基。

[0142] 在一个实施方案中, 间隔物具有通式 II

[0143]



通式 II

[0144] 其中

[0145] n 是 0-8 ;

[0146] R1 是 COOR3 ;

[0147] R2 指定与活性组分的附着位点 ; 和

[0148] R3 选自氢、C₁₋₁₂-烷基和苯甲基。

[0149] 在本发明的一个实施方案中, GLP-1 肽是 DDP-IV 保护的 GLP-1 肽。

[0150] 在本发明的一个实施方案中, GLP-1 肽是血浆稳定的 GLP-1 肽。

[0151] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是 GLP-1 类似物的衍生物, 其选自: Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(γ -Glu(N^α-十六酰)))-GLP-1(7-37)、N- ϵ ²⁶-(17-羧基十七酰)-[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-肽、N- ϵ ²⁶-(19-羧基十九酰)-[Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-肽、N- ϵ ²⁶-(4-{[N-(2-羧基乙基)-N-(15-羧基十五酰)氨基]甲基}苯甲酰基)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)、N- ϵ ²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七酰氨基)-4(S)-羧基丁酰氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙氧基][Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37) 肽,

[0152] $N-\epsilon^{37}-\{2-[2-(2-\{2-[2-(R)-3-羧基-3-\{[1-(19-羧基十九酰)哌啶-4-羰基]氨基\}丙酰氨基)乙氧基]乙氧基\}乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基\}$

[0153] 乙酰基[去氨基 His⁷, Glu²², Arg²⁶, Arg³⁴, Lys³⁷]GLP-1(7-37) 酰胺;

[0154] $N-\epsilon^{20}-\{2-[2-(2-\{2-[2-(R)-3-羧基-3-\{[1-(19-羧基十九酰)哌啶-4-羰基]氨基\}丙酰氨基)乙氧基]乙氧基\}乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基\}$

[0155] 乙酰基[Aib², Leu¹⁴, Lys²⁰, Gln²⁸, Ser(邻苯甲基)³⁹]促胰岛素分泌肽-4(1-39) 酰胺;

[0156] $N-\epsilon^{26}-\{2-[2-(2-\{2-[2-(R)-3-羧基-3-\{[1-(19-羧基十九酰)哌啶-4-羰基]氨基\}丙酰氨基)乙氧基]乙氧基\}乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基\}乙酰基[去氨基 His⁷, Arg³⁴]GLP-1-(7-37);$

[0157] $N-\epsilon^{26}-[(S)-4-羧基-4-(\{反式-4-[19-羧基十九酰氨基)甲基]环己烷羰基\}氨基)丁酰]$

[0158] [Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-(7-37);

[0159] $N-\epsilon^{26}-\{4-[(S)-4-羧基-4-(\{反式-4-[19-羧基十九酰氨基)甲基]环己烷羰基\}氨基)丁酰氨基]丁酰\}[Aib^8, Arg^{34}]GLP-1-(7-37);$
 $N-\epsilon^{37}-[2-(2-\{2-[2-(2-\{2-[(S)-4-羧基-4-(\{反式-4-[19-羧基十九酰氨基)甲基]环己烷羰基\}氨基)丁酰氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基氨基]乙氧基\}乙氧基)乙酰基]$
[去氨基 His⁷, Glu²², Arg²⁶, Arg³⁴, Lys³⁷]GLP-1-(7-37) 和 [Aib⁸, Glu²², Arg²⁶, Glu³⁰, Pro³⁷]GLP-1-((7-37) Lys(2-(2-(3-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-[4-(S)-羧基-4-(4-(S)-羧基-4-(4-{4-[16-(四唑-5-yl)十六酰氨磺酰]丁酰基氨基\}丁酰基氨基)丁酰氨基)丁酰氨基]乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)丙酰氨基)乙氧基)乙氧基)肽。

[0160] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是 GLP-2、GLP-2 类似物、GLP-2 的衍生物、或 GLP-2 类似物的衍生物。

[0161] 在本发明的一个实施方案中, GLP-2 的衍生物或 GLP-2 类似物的衍生物具有赖氨酸残基, 例如一个赖氨酸, 其中亲脂取代基任选经由间隔物与所述赖氨酸的 ϵ 氨基附着。

[0162] 在本发明的一个实施方案中, 亲脂取代基具有 8-40 个碳原子, 优选 8-24 个碳原子, 例如 12-18 个碳原子。

[0163] 在本发明的一个实施方案中, 间隔物存在并且选自氨基酸, 例如 β -Ala、L-Glu 或氨基丁酰基。

[0164] 在本发明的一个实施方案中, GLP-2 肽具有 27-39 个氨基酸残基, 优选 29-37 个氨基酸残基, 更加优选 31-35 个氨基酸残基。

[0165] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是 Lys¹⁷Arg³⁰-GLP-2(1-33) 或 Arg³⁰Lys¹⁷(N ^{ϵ} -(β -Ala(N ^{α} -十六酰))) -GLP-2(1-33)。

[0166] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是 Gly²-GLP-2(1-33)。

[0167] 在本发明的一个实施方案中, 胰高血糖素样肽是促胰岛素分泌肽-4、促胰岛素分泌肽-4 类似物、促胰岛素分泌肽-4 的衍生物、或促胰岛素分泌肽-4 类似物的衍生物。

[0168] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是促胰岛素分泌肽 -4。

[0169] 在本发明的一个实施方案中，促胰岛素分泌肽 -4 的衍生物或促胰岛素分泌肽 -4 类似物的衍生物是酰化肽或聚乙二醇化肽。

[0170] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是稳定的促胰岛素分泌肽 -4 化合物。

[0171] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是 DPP-IV 保护的促胰岛素分泌肽 -4 化合物。

[0172] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是免疫调节的促胰岛素分泌肽 -4 化合物。

[0173] 在本发明的一个实施方案中，促胰岛素分泌肽 -4 的衍生物或促胰岛素分泌肽 -4 类似物的衍生物具有赖氨酸残基，例如一个赖氨酸，其中亲脂取代基任选经由间隔物与所述赖氨酸的 ϵ 氨基附着。

[0174] 在本发明的一个实施方案中，亲脂取代基具有 8-40 个碳原子，优选 8-24 个碳原子，例如 12-18 个碳原子。

[0175] 在本发明的一个实施方案中，间隔物存在并且选自氨基酸，例如 β -Ala、L-Glu 或氨基丁酰基。

[0176] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是促胰岛素分泌肽 -4 肽，其具有 30-48 个氨基酸残基、33-45 个氨基酸残基、优选 35-43 个氨基酸残基、更加优选 37-41 个氨基酸残基。

[0177] 在本发明的一个实施方案中，GLP-2 肽选自：

[0178] K30R-GLP-2(1-33)；S5K-GLP-2(1-33)；S7K-GLP-2(1-33)；D8K-GLP-2(1-33)；E9K-GLP-2(1-33)；M10K-GLP-2(1-33)；N11K-GLP-2(1-33)；T12K-GLP-2(1-33)；I13K-GLP-2(1-33)；L14KGLP-2(1-33)；D15K-GLP-2(1-33)；N16K-GLP-2(1-33)；L17K-GLP-2(1-33)；A18K-GLP-2(1-33)；D21K-GLP-2(1-33)；N24K-GLP-2(1-33)；Q28K-GLP-2(1-33)；S5K/K30R-GLP-2(1-33)；S7K/K30R-GLP-2(1-33)；D8K/K30R-GLP-2(1-33)；E9K/K30R-GLP-2(1-33)；M10K/K30R-GLP-2(1-33)；N11K/K30R-GLP-2(1-33)；T12K/K30R-GLP-2(1-33)；I13K/K30R-GLP-2(1-33)；L14K/K30R-GLP-2(1-33)；D15K/K30R-GLP-2(1-33)；N16K/K30R-GLP-2(1-33)；L17K/K30RGLP-2(1-33)；A18K/K30R-GLP-2(1-33)；D21K/K30R-GLP-2(1-33)；N24K/K30R-GLP-2(1-33)；

[0179] Q28K/K30R-GLP-2(1-33)；K30R/D33K-GLP-2(1-33)；D3E/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；D3E/S5K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；D3E/S7K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；

[0180] D3E/D8K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；D3E/E9K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；

[0181] D3E/M10K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；D3E/N11K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；

[0182] D3E/T12K/K30R/D33E-GLP-2(1-33)；D3E/I13K/K30R/

D33E-GLP-2(1-33) ;

[0183] D3E/L14K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ; D3E/D15K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0184] D3E/N16K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ; D3E/L17K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0185] D3E/A18K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ; D3E/D21K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0186] D3E/N24K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ; D3E/Q28K/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ; 及其衍生物。

[0187] 在本发明的一个实施方案中, GLP-2 衍生物选自

[0188] S5K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0189] S7K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0190] D8K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0191] E9K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0192] M10K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0193] N11K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0194] T12K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0195] I13K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0196] L14K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0197] D15K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0198] N16K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0199] L17K(3-(辛酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0200] L17K(3-(壬酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0201] L17K(3-(癸酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0202] L17K(3-(十一酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0203] L17K(3-(十二酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0204] L17K(3-(十三酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0205] L17K(3-(十四酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0206] L17K(3-(十五酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0207] L17K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0208] L17K(3-(十七酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0209] L17K(3-(十八酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0210] L17K(3-(十九酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0211] L17K(3-(二十酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;

[0212] L17K((S)-4-羧基-4-(辛酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;

[0213] L17K((S)-4-羧基-4-(壬酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;

[0214] L17K((S)-4-羧基-4-(癸酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;

[0215] L17K((S)-4-羧基-4-(十一酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;

[0216] L17K((S)-4-羧基-4-(十二酰氨基)丁酰基)-GLP-21(1-33) ;

- [0217] L17K((S)-4-羧基-4-(十三酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0218] L17K((S)-4-羧基-4-(十四酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0219] L17K((S)-4-羧基-4-(十五酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0220] L17K((S)-4-羧基-4-(十六酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0221] L17K((S)-4-羧基-4-(十七酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0222] L17K((S)-4-羧基-4-(十八酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0223] L17K((S)-4-羧基-4-(十九酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0224] L17K((S)-4-羧基-4-(二十酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0225] L17K(4-(辛酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0226] L17K(4-(壬酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0227] L17K(4-(癸酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0228] L17K(4-(十一酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0229] L17K(4-(十二酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0230] L17K(4-(十三酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0231] L17K(4-(十四酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0232] L17K(4-(十五酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0233] L17K(4-(十六酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0234] L17K(4-(十七酰 amirlo(疑为 amino, 氨基))丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0235] L17K(4-(十八酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0236] L17K(4-(十九酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0237] L17K(4-(二十酰氨基)丁酰基)-GLP-2(1-33) ;
- [0238] A18K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;
- [0239] D21K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;
- [0240] N24K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;
- [0241] Q28K(3-(十六酰氨基)丙酰)-GLP-2(1-33) ;
- [0242] S5K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0243] S7K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0244] D8K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0245] E9K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0246] M10K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0247] N11K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0248] T12K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0249] I13K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0250] L14K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0251] D15K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0252] N16K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0253] L17K(3-(辛酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0254] L17K(3-(壬酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0255] L17K(3-(癸酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;

- [0256] L17K(3-(十一酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0257] L17K(3-(十二酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0258] L17K(3-(十三酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0259] L17K(3-(十四酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0260] L17K(3-(十五酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0261] L17K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0262] L17K(3-(十七酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0263] L17K(3-(十八酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0264] L17K(3-(十九酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0265] L17K(3-(二十酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0266] L17K((S)-羧基-4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0267] L17K((S)-4-羧基-4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0268] L17K((S)-羧基-4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0269] L17K((S)-4-羧基-4-(十一酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0270] L17K((S)-羧基-4-(十二酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0271] L17K((S)-4-羧基-4-(十三酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0272] L17K((S)-4-羧基-4-(十四酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0273] L17K((S)-4-羧基-4-(十五酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0274] L17K((S)-4-羧基-4-(十六酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0275] L17K((S)-4-羧基-4-(十七酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0276] L17K((S)-4-羧基-4-(十八酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0277] L17K((S)-4-羧基-4-(十九酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0278] L17K((S)-4-羧基-4-(二十酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0279] L17K(4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0280] L17K(4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0281] L17K(4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0282] L17K(4-(十一酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0283] L17K(4-(十二酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0284] L17K(4-(十三酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0285] L17K(4-(十四酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0286] L17K(4-(十五酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0287] L17K(4-(十六酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0288] L17K(4-(十七酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0289] L17K(4-(十八酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0290] L17K(4-(十九酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0291] L17K(4-(二十酰氨基)丁酰基)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0292] A18K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0293] D21K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0294] N24K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;

- [0295] Q28K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R-GLP-2(1-33) ;
- [0296] D3E/S5K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0297] D3E/S7K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0298] D3E/D8K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0299] D3E/E9K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0300] D3E/M10K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0301] D3E/N11K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0302] D3E/T12K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0303] D3E/I13K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0304] D3E/L14K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0305] D3E/D15K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0306] D3E/N16K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0307] D3E/L17K(3-(辛酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0308] D3E/L17K(3-(壬酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0309] D3E/L17K(3-(癸酰氨基)丙酰)/K30/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0310] D3E/L17K(3-(十一酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0311] D3E/L17K(3-(十二酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0312] D3E/L17K(3-(十三酰氨基)pr0pionyl(疑为 propionyl, 丙酰))/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0313] D3E/L17K(3-(十四酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0314] D3E/L17K(3-(十五酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0315] D3E/L17K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0316] D3E/L17K(3-(十七酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0317] D3E/L17K(3-(十八酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0318] D3E/L17K(3-(十九酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0319] D3E/L17K(3-(二十酰氨基)pr0pionyl(疑为 propionyl, 丙酰))/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0320] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0321] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0322] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0323] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十一酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0324] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十二酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0325] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十三酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0326] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十四酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;
- [0327] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十五酰氨基)丁酰基)/K30R/

D33E-GLP-2(1-33) ;

[0328] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十六酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0329] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十七酰氨基)丁酰基)/K30E/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0330] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十八酰氨基)丁酰基)/K30E/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0331] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(十九酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0332] D3E/L17K((S)-4-羧基-4-(二十酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0333] D3E/L17K(4-(辛酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0334] D3E/L17K(4-(壬酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0335] D3E/L17K(4-(癸酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0336] D3E/L17K(4-(十一酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0337] D3E/L17K(4-(十二酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0338] D3E/L17K(4-(十三酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0339] D3E/L17K(4-(十四酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0340] D3E/L17K(4-(十五酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0341] D3E/L17K(4-(十六酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0342] D3E/L17K(4-(十七酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0343] D3E/L17K(4-(十八酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0344] D3E/L17K(4-(十九酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0345] D3E/L17K(4-(二十酰氨基)丁酰基)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0346] D3E/A18K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0347] D3E/D21K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ;

[0348] D3E/N24K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33) ; 和

[0349] D3E/Q28K(3-(十六酰氨基)丙酰)/K30R/D33E-GLP-2(1-33)。

[0350] 用于制备 GLP-2、其类似物以及 GLP-2 衍生物的方法可以在例如 WO 99/43361 和 WO 00/55119 中找到。

[0351] 在本发明的一个进一步的实施方案中，胰高血糖素样肽是促胰岛素分泌肽-4(1-39)的促胰岛素类似物，例如 Ser²Asp³-促胰岛素分泌肽-4(1-39)，其中在第2和3位中的氨基酸残基已分别由丝氨酸和天冬氨酸替换（这种具体类似物在本领域中也称为促胰岛素分泌肽-3）。

[0352] 在本发明的一个进一步的实施方案中，胰高血糖素样肽是促胰岛素分泌肽-4衍生物，其中所引入的取代基选自酰胺、碳水化合物、烷基基团、酯和亲脂取代基。促胰岛素分泌肽-4(1-39)及其类似物的促胰岛素衍生物的例子是 Tyr³¹-促胰岛素分泌肽4(1-31)-酰胺。

[0353] 在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是稳定的促胰岛素分泌肽-4化合

物。在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是 DPP-IV 保护的促胰岛素分泌肽 -4 化合物。在本发明的一个实施方案中，胰高血糖素样肽是免疫调节的促胰岛素分泌肽 -4 化合物。

[0354] 用于制备促胰岛素分泌肽 -4 及其类似物以及促胰岛素分泌肽 -4 衍生物的方法可以在例如 WO 99/43708、WO 00/41546 和 WO 00/55119 中找到。

[0355] 包含根据本发明纯化的胰高血糖素样肽的药物组合物一般包含各种药学赋形剂，例如防腐剂、等渗剂和表面活性剂。药物组合物的制备是本领域技术人员众所周知的。为了方便起见，参考 Remington : The Science and Practice of Pharmacy, 19th 版，1995。

[0356] 包含根据本发明纯化的胰高血糖素样肽的药物组合物可以肠胃外施用于需要此类治疗的受试者。

[0357] 肠胃外施用可以借助于注射器任选地笔样注射器通过皮下注射、肌肉注射或静脉内注射进行。可替代地，施用可以例如通过使用输液泵经由输注进行。

[0358] 下述是根据本发明的实施方案的列表：

[0359] 1. 一种用于纯化通过固相肽合成制备的肽的方法，其包括使通过固相肽合成制备的肽的粗提取物与固体载体接触的步骤。

[0360] 2. 根据实施方案 1 的方法，其中所述固相肽合成包括使用 Fmoc 作为氨基末端保护基团。

[0361] 3. 根据实施方案 1 或 2 的方法，其中所述方法包括用于从粗肽提取物中去除二苯富烯的方法。

[0362] 4. 根据实施方案 1-3 中任一个的方法，其中所述固体载体包括包含热塑性聚合物的包装材料。

[0363] 5. 根据实施方案 4 的方法，其中所述固体载体选自容器、粒状物、颗粒物和漏斗架。

[0364] 6. 根据实施方案 4 或 5 的方法，其中所述热塑性聚合物是聚乙烯或聚丙烯。

[0365] 7. 根据实施方案 6 的方法，其中所述热塑性聚合物是聚乙烯。

[0366] 8. 根据实施方案 4-7 中任一个的方法，其包括下述步骤：

[0367] (a) 将得自固相合成的粗肽提取物加入包装材料中；

[0368] (b) 使提取物在包装材料中温育；

[0369] (c) 从包装材料中取出提取物；和

[0370] (d) 对提取物实施标准肽分离。

[0371] 9. 根据实施方案 8 的方法，其中所述聚乙烯是高密度聚乙烯 (HDPE)。

[0372] 10. 根据实施方案 8 或 9 的方法，其中所述温育步骤 (b) 包括在环境温度下温育 2 分钟 -10 小时的持续时间。

[0373] 11. 根据实施方案 8-10 中任一个的方法，其中所述温育步骤 (b) 包括在室温下温育。

[0374] 12. 根据实施方案 8-11 中任一个的方法，其中步骤 (b) 另外包括提取物的搅拌。

[0375] 13. 根据实施方案 8-12 中任一个的方法，其中在步骤 (d) 中的标准肽分离包括层析分离，其包括批吸附、填充柱或滤器。

[0376] 14. 根据实施方案 8-13 中任一个的方法, 其中在步骤 (d) 中的标准肽分离包括层析分离, 其中使用填充柱或滤器, 并且其中停留时间是至少 0.1 分钟。

[0377] 15. 根据实施方案 8-14 中任一个的方法, 其中在步骤 (d) 中的标准肽分离是离子交换层析。

[0378] 16. 根据实施方案 1-3 中任一个的方法, 其中所述固体载体包括离子交换层析柱。

[0379] 17. 根据实施方案 16 的方法, 其中所述固体载体包括阴离子树脂。

[0380] 18. 根据实施方案 17 的方法, 其中所述阴离子树脂是季铵树脂。

[0381] 19. 根据实施方案 16-18 中任一个的方法, 其包括下述步骤:

[0382] (a) 在标准层析条件下, 用得自固相合成的粗肽提取物或得自实施方案 8 的过程中步骤 (a)-(c) 的肽装载离子交换层析柱;

[0383] (b) 用醇执行第一个洗脱步骤; 和

[0384] (c) 用一种或更多种缓冲剂执行第二个洗脱步骤。

[0385] 20. 根据实施方案 19 的方法, 其中在步骤 (c) 中使用的缓冲剂包括 Tris(三(羟甲基)甲胺)、TAPS(3-[三(羟甲基)甲基]氨基)丙磺酸、Bicine(N, N-二(2-羟乙基)甘氨酸)、Tricine(N-三(羟甲基)甲基甘氨酸)、HEPES(4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸)、TES(2-[三(羟甲基)甲基]氨基)乙磺酸、MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)、PIPES(哌嗪-N, N'-双(2-乙磺酸))、Cacodylate(二甲基胂酸盐)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)或乙酸盐。

[0386] 21. 根据实施方案 20 的方法, 其中在步骤 (c) 中使用的缓冲剂是 Tris 缓冲剂。

[0387] 22. 根据实施方案 19-21 中任一个的方法, 其中在步骤 (b) 中使用的醇是 C₁₋₅ 醇。

[0388] 23. 根据实施方案 19-22 中任一个的方法, 其中在步骤 (b) 中使用的醇是选自下述的未分支或分支醇: 甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、2-甲基-1-丙醇、2-甲基-2-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-2-丁醇、3-甲基-2-丁醇、1-戊醇、2-戊醇和 3-戊醇。

[0389] 24. 根据实施方案 19-23 中任一个的方法, 其中在步骤 (b) 中使用的醇是乙醇或丙醇。

[0390] 25. 根据实施方案 19 或 24 中任一个的方法, 其中在步骤 (b) 中使用的醇选自 70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇或 100%乙醇。

[0391] 26. 根据实施方案 19 或 25 中任一个的方法, 其中在步骤 (b) 中使用的醇是 100%乙醇。

[0392] 27. 根据任何前述实施方案的方法, 其中所述多肽是胰高血糖素样肽。

[0393] 28. 根据实施方案 27 的方法, 其中所述多肽是胰高血糖素、胰高血糖素类似物、胰高血糖素的衍生物、或胰高血糖素类似物的衍生物。

[0394] 29. 根据实施方案 27 的方法, 其中所述胰高血糖素样肽是 GLP-1、GLP-1 类似物、GLP-1 的衍生物、或 GLP-1 类似物的衍生物。

[0395] 30. 一种固相肽合成试剂盒, 其包括用于固相肽合成的试剂、如实施方案 1-29 中任一个中定义的固体载体、和依照如实施方案 1-29 中任一个中定义的方法使用所述试剂盒的说明书。

[0396] 31. 一种肽，其通过实施方案 1-29 中任一个中描述的方法获得。

[0397] 本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请和专利在此引入作为参考，其程度与每个参考文献个别且特别指出引入作为参考并且在本文中整体阐述相同。

[0398] 所有标题和小标题在本文中仅为了方便起见而使用，并且不应解释为以任何方式限制本发明。

[0399] 上述元件以其所有可能变化的任何组合由本发明包括，除非本文另有说明或与上下文另有明显冲突。

[0400] 如在描述本发明的背景中使用的，术语“a”和“an”和“the”以及相似指示物应解释为涵盖单数和复数，除非本文另有说明或与上下文明显冲突。

[0401] 本文值范围的叙述仅意欲充当个别提及归入范围内的每个分开值的速记法，除非本文另有说明，并且每个分开值引入说明书内，如同其在本文中个别叙述一样。除非另有说明，本文提供的所有精确值代表相应近似值（例如，合适时，就具体因子或测量而言提供的所有精确示例性值可以被视为也提供相应由“约”修饰的近似测量）。

[0402] 本文描述的所有方法可以以任何合适次序执行，除非本文另有说明或与上下文另有明显冲突。

[0403] 本文提供的任何和所有实例或示例性语言（例如，“例如”）的使用仅意欲更好地举例说明本发明，并且不对本发明的范围造成限制，除非另有说明。说明书中的语言不应解释为指示任何元件是本发明实践必需的，除非这样明确陈述。

[0404] 专利文件在本文中的引用和引入仅为了方便起见而进行，并且不反映此类专利文件的有效性、专利性和/或强制性的任何观点。

[0405] 就一种或更多种元件而言使用术语例如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”在本文中描述的本发明任何方面或实施方案意欲提供关于“由……组成”、“基本上由……组成”或“基本上包含”那一种或更多种具体元件的本发明相似方面或实施方案的支持，除非另有说明或与上下文明显冲突（例如，本文描述为包含具体元件的制剂应理解为还描述由那种元件组成的制剂，除非另有说明或与上下文明显冲突）。

[0406] 本发明包括本文呈现的方面或权利要求中叙述的主题的所有修饰和等价物至由适用法律允许的最大程度。

[0407] 本发明通过下述实施例进一步举例说明，然而，所述实施例不应解释为限制本发明的范围。前述说明书和下述实施例中公开的特征分别地且以其任何组合可以是用于以其不同形式实现本发明的材料。

[0408] 实施例

[0409] 设备：

[0410] 在室温下的 ÄKTA Explorer100。

[0411] 缓冲液：

[0412] 缓冲液 A：50% (w/w) EtOH、0.02mol/kg Tris, pH 8.0

[0413] 缓冲液 B：50% (w/w) EtOH、0.02mol/kg Tris、0.0625mol/kg NaCl, pH 8.0

[0414] 再生 1：1M NaOH

[0415] 再生 2：2M NaCl、50mM CH₃COOH, pH 3.0

[0416] 乙醇：100%乙醇

[0417] 树脂：

[0418] Source 30Q

[0419] 原材料：

[0420] 通过固相合成和酰化产生的 N- ϵ 26-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七酰氨基)-4(S)-羧基丁酰氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib⁸, Arg³⁴]GLP-1-[7-37]。

[0421] 实施例 1

[0422] 控制纯化操作

[0423] 原材料制备

[0424] 原材料用 H₂O(WFI) 稀释 1+9，随后通过 0.6/0.2 μ m 滤器过滤。

[0425] 原材料贮存

[0426] 原材料在装载前贮存于玻璃容器中。

[0427] 方法：

[0428] 柱：HR10/10(3.5 • 1.0cm) 2.8mL

[0429] 流动：15CV/ 小时 (0.7mL/ 分钟)

[0430]

区段	体积和缓冲液
平衡	10 CV 缓冲液 A
装载	2 CV (5.6 ml) ~ 2 g N- ϵ ²⁶ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-羧基十七酰氨基)-4(S)-羧基丁酰氨基]乙氧基)乙氧基]乙酰基氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基][Aib ⁸ , Arg ³⁴]GLP-1-(7-37) 肽 /L 树脂
洗涤	7 CV 缓冲液 A
洗脱 1	在 20 CV 下从 100 % 缓冲液 A 和 0 % 缓冲液 B 到 50 % 缓冲液 A 和 50 % 缓冲液 B 的线性梯度
洗脱 2	5 CV 缓冲液 B
再生 1	5 CV 再生 1
再生 2	5 CV 再生 2

[0431] 标准分离的结果显示于图 1 的层析谱中，其中所述层析谱指示在 280nm 下的吸光度、在 254nm 下的吸光度、理论梯度和导电性。来自图 1 的结果显示 DBF 峰在产物前洗脱，但在产物下“拖尾”并且因此难以去除。

[0432] 实施例 2

[0433] 在 PE 处理后通过阴离子交换纯化（包括从 PE 容器中洗脱 DBF）

[0434] 原材料制备

[0435] 原材料如实施例 1 中所述进行制备。

[0436] 原材料贮存

[0437] 原材料在装载前贮存于 HDPE(高密度聚乙烯)容器(得自 Emballator 的“Mellerud 容器”)中。

[0438] 方法：

[0439] 该方法如实施例 1 中所述进行，并且结果显示于图 2 中，其中层析谱指示在 280nm 下的吸光度、在 254nm 下的吸光度、理论梯度和导电性。考虑到除样品贮存条件外，该实验与实施例 1 等同的事实，由于原材料在装载前贮存于 HDPE 容器中，DBF 峰看起来不存在。

[0440] 在原材料去除后，Mellerud 容器用 100%乙醇洗涤，因为假定 DBF 与 PE 疏水结合，并且因此可以用疏水液体去除 DBF。洗涤溶液的吸光度测量明确显示 DBF 已与容器结合，并且可以用 100%乙醇与容器 desorped(疑为 desorbed，解吸)或“洗脱”。

[0441] 实施例 3

[0442] 在装载后用乙醇洗涤的阴离子交换纯化

[0443] 原材料制备

[0444] 在 H₂O 中稀释 10 倍(从 10g 原材料到 1g 原材料)随后为用 NaOH 从 pH 6 到 pH 8.0 的 pH 调整。原材料随后使用 0.22 μm 滤器进行过滤。

[0445] 原材料贮存

[0446] 原材料在装载前贮存于玻璃容器中。

[0447] 方法：

[0448] 柱：15 • 1.0cm) 11.8mL

[0449] 流动：15CV/ 小时(0.7mL/ 分钟)

[0450]

区段	体积和缓冲液
平衡	3 CV 缓冲液 A
装载	3 CV (5.6 ml) ~ 2.5 g N- ϵ^{26} -[2- (2-[2- (2-[2- (2-[4- (17-羧基十七酰氨基) -4 (S) -羧基丁酰氨基]乙氧基) 乙氧基]乙酰基氨基) 乙氧基]乙氧基) 乙酰基][Aib ⁸ ,Arg ³⁴]GLP-1- (7-37) 肽 /L 树脂
洗涤 1	2 CV 缓冲液 A
洗涤 2	3 CV 乙醇
洗涤 3	2 CV 缓冲液 A
洗脱 1	在 16 CV 下从 100 % 缓冲液 A 和 0 % 缓冲液 B 到 60 % 缓冲液 A 和 40 % 缓冲液 B 的线性梯度
洗脱 2	在 2 CV 下从 60 % 缓冲液 A 和 40 % 缓冲液 B 到 0 % 缓冲液 A 和 100 % 缓冲液 B 的线性梯度
洗脱 3	10 CV 缓冲液 B
再生 1	3 CV 再生 1
再生 2	3 CV 再生 2

[0451] 标准分离的结果显示于图 3 中, 其中层析谱指示在 280nm 下的吸光度、在 254nm 下的吸光度、理论梯度和导电性。 结果指示 DBF 峰在乙醇洗涤过程中洗脱。

[0001]

序列表

<110> NOVO NORDISK A/S

<120> 通过固相合成制备的肽的纯化

<130> 7686.204-WO

<150> EP 08156221.7

<151> 2008-05-15

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa是NH2

<400> 1

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Xaa
20 25 30

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

[0002]

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 4
<211> 40
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Xaa是NH2

<400> 4

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa
35 40

<210> 5
<211> 40
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Xaa是NH2

<400> 5

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

[0003]

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa
35 40

<210> 6
<211> 37
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Lys Asn Asn Ile Ala
35

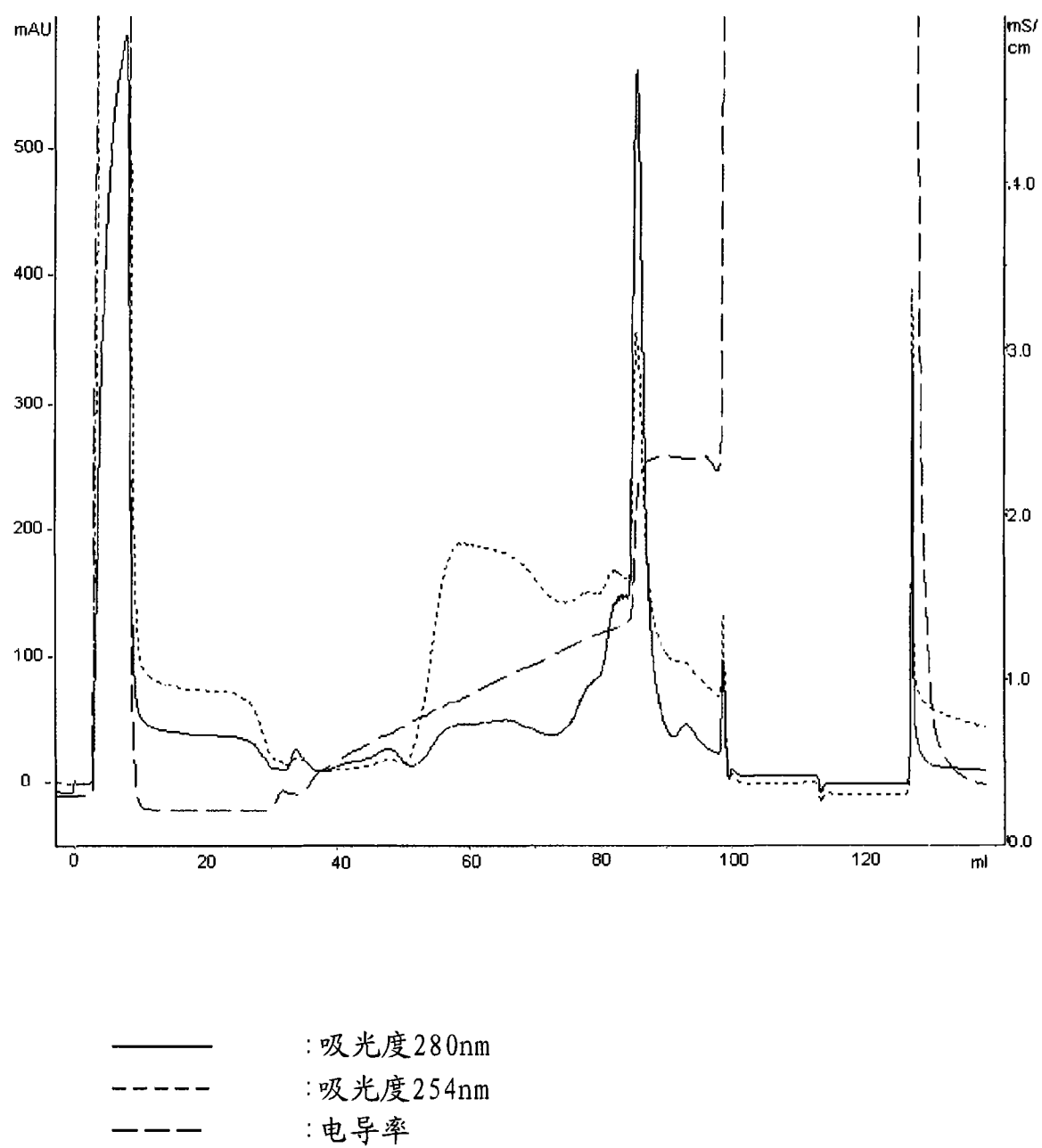


图 1

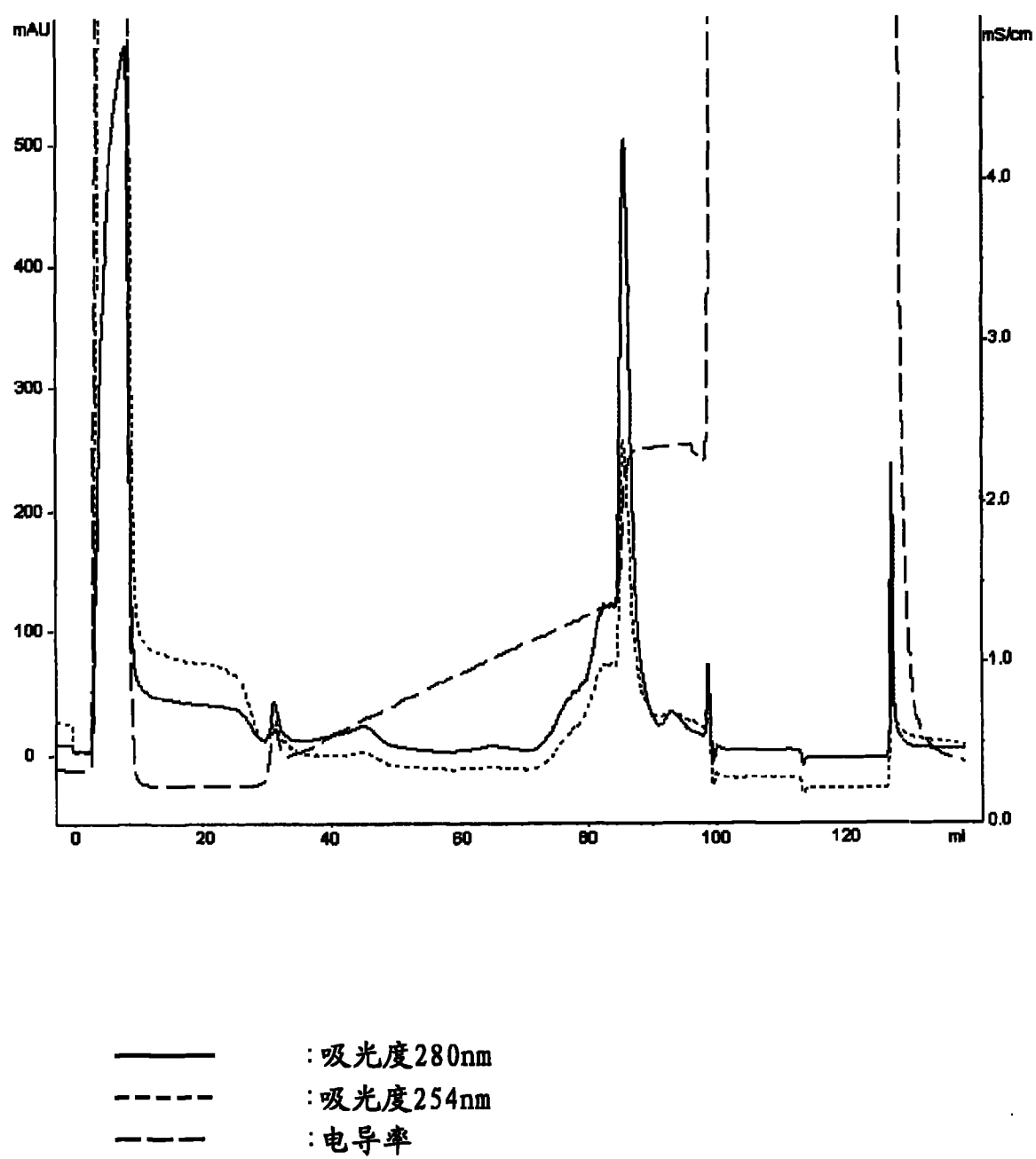


图 2

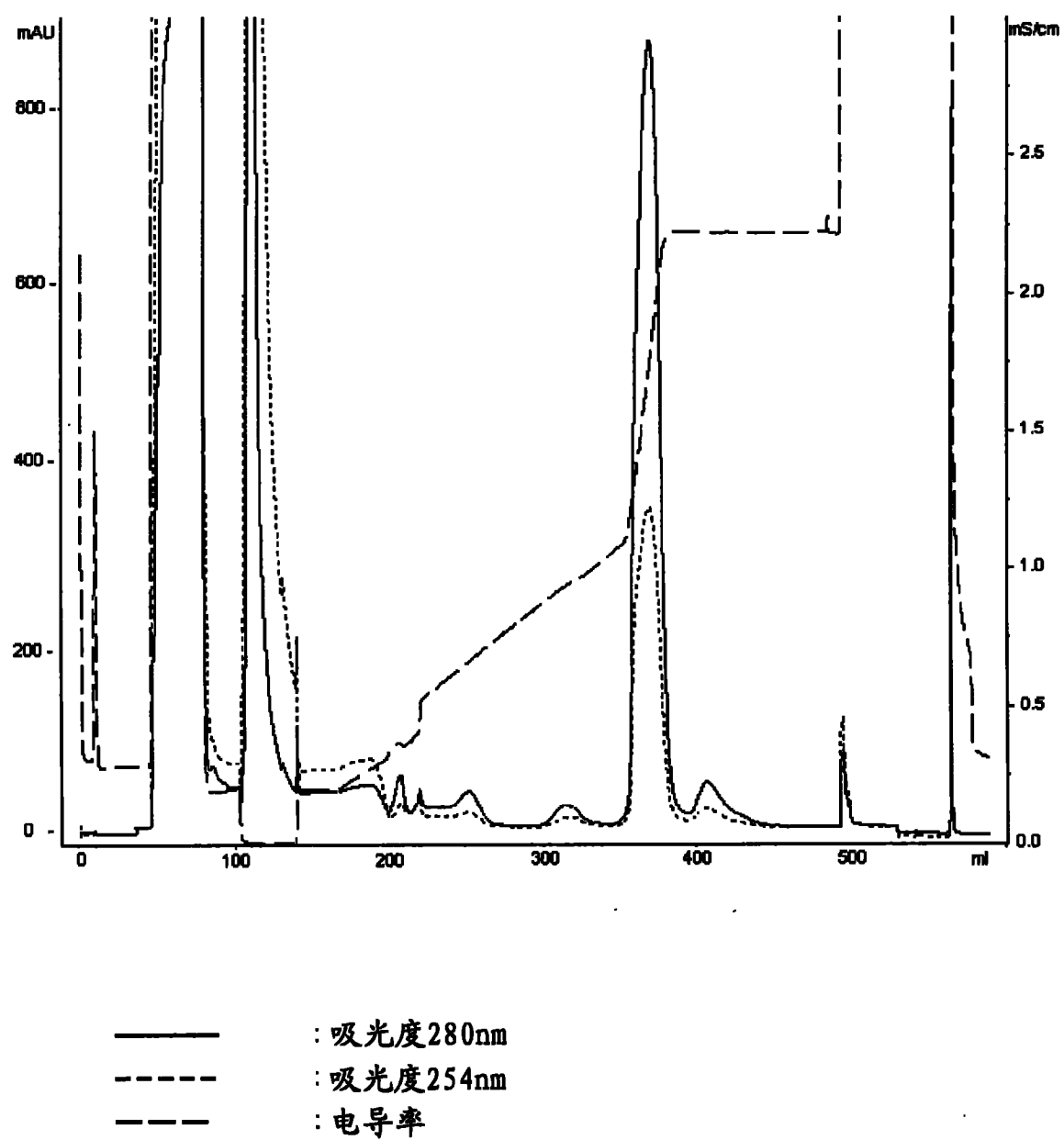


图 3