

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102363633 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201110361927. 4

(22) 申请日 2011. 11. 16

(73) 专利权人 天津拓飞生物科技有限公司  
地址 300450 天津市塘沽区民和里  
13-2-302

(72) 发明人 李瑛

(74) 专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司 12108  
代理人 王晓红

(51) Int. Cl.

C07K 14/605(2006. 01)

A61K 38/26(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 3/04(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0199672 A1, 2003. 10. 23, 全文.

CN 1676163 A, 2005. 10. 05, 全文.

CN 1786031 A, 2006. 06. 14, 全文.

WO 2007/030519 A2, 2007. 03. 15, 全文.

CN 101041693 A, 2007. 09. 26, 全文.

CN 101056650 A, 2007. 10. 17, 全文.

CN 101273058 A, 2008. 09. 24, 说明书第 3 页第 4 段至第 4 页第 2 段, 第 20 页第 2 段, 第 21 页第 2 段, 第 22 页第 3 段, 第 23 页 - 第 24 页最后一段.

US 2008/0194486 A1, 2008. 08. 14, 全文.

JP 特表 2009-523177 A, 2009. 06. 18, 全文.

JP 特许第 4282485 号 B2, 2009. 06. 24, 全文.

EP 2261245 A1, 2010. 12. 15, 全文.

JP 特表 2011-509077 A, 2011. 03. 24, 全文.

CN 102180963 A, 2011. 09. 14, 全文.

CN 102229668 A, 2011. 11. 02, 全文.

CN 101337989 A, 2009. 01. 07, 全文.

US 2008/0045461 A1, 2008. 02. 21, 全文.

审查员 夏文静

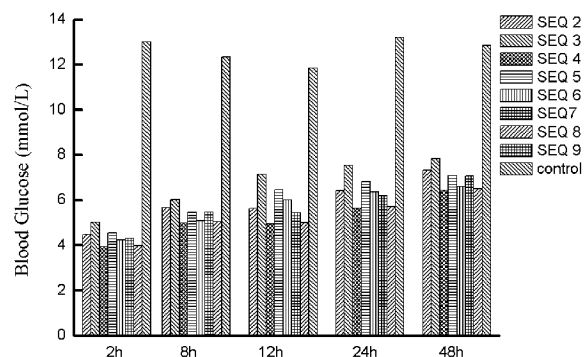
权利要求书1页 说明书7页  
序列表8页 附图1页

(54) 发明名称

胰高血糖素样肽-1 突变体多肽及其制备方法、药物组合物和其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种胰高血糖素样肽-1 突变体多肽及其制备方法、药物组合物和其应用, 所述突变多肽由胰高血糖素样肽-1 突变体N末端添加含有 Cys 的延长多肽而成, 并且所述突变多肽自身折叠成二硫键, 所述胰高血糖素样肽-1 突变多肽用于制备治疗糖尿病、治疗和 / 或预防肥胖症的药物组合物。针对临床上 GLP-1 类似物在体内存留时间较短, 需要每天注射给药的缺陷, 提供一种半衰期较长的 GLP-1 突变体多肽, 该 GLP-1 突变体多肽半衰期较长, 不需要每天给患者注射, 能够有效地提高患者的依从态度。



CN 102363633 B

1. 一种胰高血糖素样肽 -1 突变体多肽, 其特征在于, 所述的胰高血糖素样肽 -1 突变体多肽选自 SEQ ID NO4、SEQ ID NO5、SEQ ID NO6、SEQ ID NO7、SEQ ID NO8 或 SEQ ID NO9 中的任一种。

2. 一种权利要求 1 所述的胰高血糖素样肽 -1 突变体多肽的制备方法, 其特征在于, 该方法包括: 胰高血糖素样肽 -1 突变多肽经多肽合成仪固相制备后, 加入 50-100mM 的二巯基苏糖醇 DTT 或  $\beta$ -巯基乙醇进行变性, 而后于 4°C 缓慢氧化或通入氧气形成二硫键。

3. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述的组合物含有权利要求 1-2 中任一项所述的胰高血糖素样肽 -1 突变体多肽。

4. 根据权利要求 3 所述的药物组合物, 其特征在于, 还含有一种或多种药学上可接受的载体, 所述药学上可接受的载体选自: 水溶性填充剂、pH 调节剂、稳定剂、注射用水或渗透压调节剂。

5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述水溶性填充剂选自以下的一种或几种: 甘露醇、低分子右旋糖苷、山梨醇、聚乙二醇、葡萄糖、乳糖或半乳糖;

所述 pH 调节剂为生理可接受的酸、碱和 / 或盐;

所述稳定剂为选自以下的一种或几种: EDTA-2Na、硫代硫酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、磷酸氢二钾、碳酸氢钠、碳酸钠、精氨酸、谷氨酸、聚乙二醇 6000、聚乙二醇 4000、十二烷基硫酸钠或三羟甲基氨基甲烷;

所述渗透压调节剂选自氯化钠和 / 或氯化钾。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述 pH 调节剂选自以下的一种或几种:

非挥发性酸: 枸橼酸、磷酸、乳酸或酒石酸;

碱: 氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵;

盐: 碳酸钠、碳酸钾、碳酸铵盐、碳酸氢钠、碳酸氢钾或碳酸氢铵盐。

7. 根据权利要求 4 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物为注射剂。

8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述注射剂为冻干粉针或溶液注射剂。

## 胰高血糖素样肽 -1 突变体多肽及其制备方法、药物组合物 和其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种糖尿病相关的药物领域,具体而言,本发明涉及一种延长的胰高血糖素样肽 -1 的体内半衰期的胰高血糖素样肽 -1 突变体多肽及其制备方法、药物组合物和其应用。

### 背景技术

[0002] 糖尿病是一种遗传因素和多种环境因素相关联的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱综合症。由于糖尿病还伴随着诸多并发症,现已成为仅次于恶性肿瘤和心血管疾病之后的第三大健康杀手。1984年,胰高血糖素样肽 -1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) 被发现,它是一种具有 30 个氨基酸的肠降血糖素,具有促进胰岛素分泌和生物合成,抑制胰高血糖素的分泌,促进胰岛细胞增殖,抑制胰岛细胞凋亡,保存细胞对血糖的敏感性等多种生理功能。GLP-1 与其受体结合后能够增加细胞内 cAMP 浓度并激活蛋白激酶 A (PKA),通过 cAMP/PKA 激酶通路增强细胞内胰岛素基因的转录和翻译,并提高对葡萄糖刺激信号的敏感性,从而增加胰岛素分泌量。GLP-1 还通过与细胞上的胰高血糖素样肽 -1 受体 (GLP-1R) 作用抑制胰高血糖素的分泌,或者间接通过促进胰岛素和生长抑素的分泌来抑制胰高血糖素的分泌。GLP-1 作为降血糖药物受到限制的主要原因是 GLP-1 在体内能够迅速的被二肽基肽酶 - IV (DPP-IV) 所降解而失去活性。

[0003] 肠促胰岛素类似物 (Exendin-4) 是一条 39 个氨基酸组成的直链多肽,最初由南美巨蜥的唾液分离获得。它与人源 GLP-1 序列有 53% 的同源性。Exendin-4 同样能够和 GLP-1 受体结合,产生促进胰岛素分泌等生理作用,且 Exendin-4 的 N 端第二个氨基酸为甘氨酸,能够耐受血浆中 DPP-IV 的分解,故 Exendin-4 被吸收入血后的半衰期较长 ( $t_{1/2}=2.4$  小时);C 端比 GLP-1 多 9 个氨基酸,结构上形成了“色氨酸笼” (“Trp-cage”),能够和 GLP-1 受体更紧密的结合。

[0004] 由于 GLP-1 为人源多肽,没有 Exendin-4 的免疫源性问题,根据其设计的 GLP-1 类似物在临床试验中副作用较为轻微,已成为设计用于治疗 2 型糖尿病的 GLP-1 受体激动剂的理想原型,开发潜力巨大。2010 年,诺和诺德公司以 GLP-1 为原型设计的 Liraglutide (中文名利拉鲁肽,商品名 Victoza®) 在美国上市,因其良好的临床效果、较低的副作用以及更好的患者依从度 (一天注射一次) 赢得了广泛关注,从而掀起了 GLP-1 受体激动剂的开发热潮。

[0005] 虽然现在上市的 Liraglutide 等 GLP-1 受体激动剂延长了半衰期,但仍需患者每天注射药物,在药物使用舒适度上仍有改进空间。因此有必要进一步提高 GLP-1 类多肽药物的体内半衰期,提高患者依从度。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种提衰期较长的胰高血糖素样肽 -1 突变

体多肽。

[0007] 本发明的另一个目的是提供上述多肽的制备方法,此外,还提供上述多肽在制备治疗糖尿病和肥胖症的药物中的应用。

[0008] 本发明的又一个目的是提供一种以 GLP-1 突变体多肽作为有效成分的药物组合物。

[0009] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种胰高血糖素样肽-1 突变体多肽,所述胰高血糖素样肽-1 突变体多肽是在 SEQ ID NO1 序列多肽的 N 端加入能形成二硫键的延长多肽形成的突变体,所述的突变体的结构通式如下:

[0010]  $X_1(n_1)-C-X_2(n_2)-C-X_3(n_3)$  SEQ ID NO1

[0011] 其中:

[0012] 上述序列氨基酸残基  $X_1$  指代甘氨酸(Glycine),丙氨酸(Alanine),缬氨酸(Valine),亮氨酸(Leucine)或异亮氨酸(Isoleucine), $n_1$  指代上述  $X_1$  氨基酸的数目, $n_1 = 1 \sim 5$ ;

[0013] 上述序列氨基酸残基  $X_2$  指代甘氨酸(Glycine),丙氨酸(Alanine),缬氨酸(Valine),亮氨酸(Leucine)或异亮氨酸(Isoleucine), $n_2$  指代上述  $X_2$  氨基酸的数目, $n_2 = 1 \sim 5$ ;

[0014] 上述序列氨基酸残基  $X_3$  指代甘氨酸(Glycine),丙氨酸(Alanine),缬氨酸(Valine),亮氨酸(Leucine)或异亮氨酸(Isoleucine), $n_3$  指代上述  $X_3$  氨基酸的数目, $n_2 = 1 \sim 5$ ;

[0015] 所述的胰高血糖素样肽-1 突变体,多肽内的两个半胱氨酸形成二硫键。

[0016] 所述的胰高血糖素样肽-1 突变体多肽选自 SEQ ID NO2、SEQ ID NO3、SEQ ID NO4、SEQ ID NO5、SEQ ID NO6、SEQ ID NO7、SEQ ID NO8 或 SEQ ID NO9 中的任一种。

[0017] 一种上述的胰高血糖素样肽-1 突变体多肽的制备方法,该方法包括:胰高血糖素样肽-1 突变多肽经多肽合成仪固相制备后,加入 50-100mM 的二巯基苏糖醇 DTT 或  $\beta$ -巯基乙醇进行变性,而后于 4°C 缓慢氧化或通入氧气形成二硫键。

[0018] 一种药物组合物,所述的组合物含有上述的胰高血糖素样肽-1 突变体多肽。

[0019] 还含有含一种或多种药学上可接受的载体,所述药学上可接受的载体选自:水溶性填充剂、pH 调节剂、稳定剂、注射用水或渗透压调节剂。

[0020] 所述水溶性填充剂选自以下的一种或几种:甘露醇、低分子右旋糖苷、山梨醇、聚乙二醇、葡萄糖、乳糖或半乳糖;

[0021] 所述 pH 调节剂为生理可接受的酸、碱和 / 或盐;

[0022] 所述稳定剂为选自以下的一种或几种:EDTA-2Na、硫代硫酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、磷酸氢二钾、碳酸氢钠、碳酸钠、精氨酸、谷氨酸、聚乙二醇 6000、聚乙二醇 4000、十二烷基硫酸钠或三羟甲基氨基甲烷;

[0023] 所述渗透压调节剂选自氯化钠和 / 或氯化钾。

[0024] 所述 pH 调节剂选自以下的一种或几种:

[0025] 非挥发性酸:枸橼酸、磷酸、乳酸、酒石酸或盐酸;

[0026] 碱:氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵;

[0027] 盐:碳酸钠、碳酸钾、碳酸铵盐、碳酸氢钠、碳酸氢钾或碳酸氢铵盐;

[0028] 所述药物组合物为注射剂。

[0029] 所述注射剂为冻干粉针或溶液注射剂。

[0030] 所述的胰高血糖素样肽-1 突变体多肽用于治疗和 / 或预防糖尿病和 / 或肥胖症的药物组合物中的应用。

[0031] 本发明的有益效果是：针对临床上 GLP-1 类似物在体内存留时间较短，需要每天注射给药的缺陷，提供一种半衰期较长的 GLP-1 突变体多肽，该 GLP-1 突变体多肽半衰期较长，不需要每天给患者注射，能够有效地提高患者的依从态度。

#### 附图说明

[0032] 图 1 本发明所述的 GLP-1 突变多肽在小鼠体内的降血糖功能实验的结果示意图。

#### 具体实施方式

[0033] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明：

[0034] 本发明提供一种胰高血糖素样肽-1 突变体多肽，本发明中涉及的突变体的结构通式如下：

[0035]  $X_1(n_1)-C-X_2(n_2)-C-X_3(n_3)$  SEQ ID NO1

[0036] 即  $X_1(n_1)-C-X_2(n_2)-C-X_3(n_3)^7$ HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG<sup>36</sup>

[0037] 其中，上述序列氨基酸残基  $X_1$  指代甘氨酸(Glycine)，丙氨酸(Alanine)，缬氨酸(Valine)，亮氨酸(Leucine)或异亮氨酸(Isoleucine)。  $n_1$  指代上述  $X_1$  氨基酸的数目，  $n_1 = 1 \sim 5$ 。

[0038] 上述序列氨基酸残基  $X_2$  指代甘氨酸(Glycine)，丙氨酸(Alanine)，缬氨酸(Valine)，亮氨酸(Leucine)或异亮氨酸(Isoleucine)。  $n_2$  指代上述  $X_2$  氨基酸的数目，  $n_2 = 1 \sim 5$ 。

[0039] 上述序列氨基酸残基  $X_3$  指代甘氨酸(Glycine)，丙氨酸(Alanine)，缬氨酸(Valine)，亮氨酸(Leucine)或异亮氨酸(Isoleucine)。  $n_3$  指代上述  $X_3$  氨基酸的数目，  $n_3 = 1 \sim 5$ 。

[0040] 如上所述的胰高血糖素样肽-1 突变体，多肽内的两个半胱氨酸形成二硫键。

[0041] 再一方面，本发明提供如上所述的胰高血糖素样肽-1 突变体多肽在制备用于治疗 and / 或预防糖尿病和 / 或肥胖症的药物组合物中的应用；优选地，所述药物组合物为注射剂；更优选地，所述注射剂为冻干粉针或溶液注射剂。

[0042] 又一方面，本发明提供一种药物组合物，所述的组合物含有如上所述的胰高血糖素样肽-1 突变体多肽。

[0043] 如上所述的药物组合物，其还含有还包含一种或多种药学上可接受的载体；

[0044] 优选地，所述药学上可接受的载体选自：水溶性填充剂、pH 调节剂、稳定剂、注射用水和渗透压调节剂；

[0045] 更优选地，所述水溶性填充剂选自以下的一种或几种：甘露醇、低分子右旋糖苷、山梨醇、聚乙二醇、葡萄糖、乳糖或半乳糖；

[0046] 更优选地，所述 pH 调节剂为生理可接受的酸、碱和 / 或盐，优选选自以下的一种或几种：

- [0047] 非挥发性酸如枸橼酸、磷酸、乳酸、酒石酸或盐酸，
- [0048] 碱如氢氧化钾、氢氧化钠或氢氧化钾或氢氧化铵，
- [0049] 盐如碳酸钠或碳酸钾或碳酸铵盐，碳酸氢钠或碳酸氢钾或碳酸氢铵盐；
- [0050] 更优选地，所述稳定剂为选自以下的一种或几种：EDTA-2Na、硫代硫酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、磷酸氢二钾、碳酸氢钠、碳酸钠、精氨酸、谷氨酸、聚乙二醇 6000、聚乙二醇 4000、十二烷基硫酸钠或三羟甲基氨基甲烷等，进一步优选自：焦亚硫酸钠、磷酸氢二钾、精氨酸、聚乙二醇 6000、三羟甲基氨基甲烷中的一种或几种；
- [0051] 更优选地，所述渗透压调节剂选自氯化钠和 / 或氯化钾。
- [0052] 本发明又一方面还提供上述 GLP-1 突变多肽的制备方法，该方法包括：GLP-1 突变多肽经多肽合成仪固相制备后，加入 50-100mM 的 DTT（二巯基苏糖醇）或  $\beta$ -巯基乙醇进行变性，而后于 4℃ 缓慢氧化或通入氧气形成二硫键，即得。
- [0053] 本发明再一方面还提供上述 GLP-1 突变多肽在制备治疗糖尿病的药物中的应用，以及该多肽复合物在制备治疗和 / 或预防肥胖症的药物中的应用。
- [0054] 并且，所述药物组合物优选为注射剂，更优选地为冻干粉针或溶液注射剂。
- [0055] 本发明的又一方面还提供一种药物组合物，包含上述所述的 GLP-1 突变多肽。
- [0056] 优选地，还包含可接受的辅料成分。
- [0057] 现结合本发明的目的对本发明逐一加以描述。
- [0058] (1) GLP-1 多肽
- [0059] 本发明所述的 GLP-1 多肽序列如下：SEQ ID NO1，即 <sup>7</sup>HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG<sup>36</sup>
- [0060] (2) GLP-1 突变多肽
- [0061] 本发明所述的 GLP-1 突变多肽序列如下序列 (SEQ ID NO2-9)，即：
- [0062] SEQ ID NO2：GCGCGHAEGTFTSCVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGC
- [0063] SEQ ID NO3：GGCGGCGGHAEGTFTSDVSSYLECQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0064] SEQ ID NO4：GGGCGGGCGGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0065] SEQ ID NO5：GCGGCGGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0066] SEQ ID NO6：GCGGGCGGGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0067] SEQ ID NO7：GGCGGCGGGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0068] SEQ ID NO8：GGGCGGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0069] SEQ ID NO9：GGGCGGCGGHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLCKGRGC
- [0070] (3) 本发明的药物组合物
- [0071] 本发明的具二硫键的 GLP-1 突变多肽可以与一种或多种药学上可接受的辅料共同制成药物组合物，这些辅料包括：水溶性填充剂、pH 调节剂、稳定剂、注射用水、渗透压调节剂等等。
- [0072] 本发明所述的水溶性填充剂辅料为选自以下的一种或多种：甘露醇、低分子右旋糖苷、山梨醇、聚乙二醇、葡萄糖、乳糖、半乳糖等。
- [0073] 所述 pH 调节剂选自以下的一种或多种：枸橼酸、磷酸、乳酸、酒石酸、盐酸等非挥发性的酸，以及氢氧化钾、氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵、碳酸钠、碳酸钾、碳酸铵盐、碳酸氢钠、碳酸氢钾或碳酸氢铵盐等生理可接受的有机或无机酸、碱或盐等。

[0074] 所述稳定剂选自以下的一种或多种:EDTA-2Na、硫代硫酸钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、磷酸氢二钾、碳酸氢钠、碳酸钠、精氨酸、谷氨酸、聚乙二醇 6000、聚乙二醇 4000、十二烷基硫酸钠或三羟甲基氨基甲烷等。优选为焦亚硫酸钠、磷酸氢二钾、精氨酸、聚乙二醇 6000、三羟甲基氨基甲烷。

[0075] 所述渗透压调节剂为氯化钠和 / 或氯化钾。

[0076] (4) 注射剂的制备方法

[0077] 本发明的药物组合物可以通过肌肉、静脉内、皮下注射途径进行给药, 优选的剂型为冻干粉或溶液注射剂。

[0078] 冷冻干燥注射剂的制备方法: 取多肽溶液适量, 加入水溶性填充剂、稳定剂、渗透压调节剂等, 加入注射用水适量, 调节 pH 值至 4-8 使其溶解, 加水稀释至适当浓度, 加入 0.1-0.5% 活性炭, 在 0-10℃ 下搅拌 10-20 分钟, 脱碳, 采用微孔滤膜过滤除菌, 滤液进行分装, 采用冷冻干燥法, 制得白色疏松块状物, 封口即得, 每个规格含有 GLP-1 突变多肽在 5 μg-1mg。

[0079] 注射液的制备方法: 取串肽溶液或冻干粉适量, 加入水溶性填充剂、稳定剂、渗透压调节剂等, 加入注射用水适量, 调节 pH 值至 4-8 使其溶解, 加水稀释至适当浓度, 加入 0.1-0.5% 活性炭, 在 0-10℃ 下搅拌 10-20 分钟, 脱碳, 采用微孔滤膜过滤除菌, 滤液进行分装, 封口即得, 每个规格含有 GLP-1 突变多肽在 5 μg-1mg。

[0080] 本发明的药物组合物可以通过肌肉、静脉内、皮下注射途径进行给药, 优选的剂型为冻干粉或溶液注射剂。虽然剂量依治疗对象、给药方式、症状及其它因素而改变, 本发明的组合物在相当宽的剂量范围内是有效的。在成人的治疗中, 剂量范围在 5 μg/人-1mg/人, 每日一次或每几日一次给药。实际剂量应该由医生根据有关的情况来决定, 这些情况包括被治疗者的身体状况、给药途径、年龄、体重、患者对药物的个体反应, 患者症状的严重程度等等, 因此上述剂量范围并不是以任何方式限制本发明的范围。

[0081] 本发明利用二硫键, 在 GLP-1 的 N 末端形成发夹结构, 保护了易受 DPPIV 降解的多肽 N 端, 克服了半衰期短的问题。所提供的突变多肽中, 体内的半衰期均可达到 24 小时以上, 较单独给药的 GLP-1 的半衰期明显延长, 极大地便利了 GLP-1 (半衰期仅为 2 分钟) 的临床推广和应用。

[0082] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述, 给出的实施例仅为了阐明本发明, 而不是为了限制本发明的范围。

[0083] 在以下的实施例中, 未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

[0084] 实施例 1 GLP-1 突变多肽体外 GLP-1 受体结合实验

[0085] 受体结合实验利用 GLP-1 受体高表达细胞系 INS-1 (大鼠胰岛细胞 -1, 购自上海中科院动物中心) 进行。首先将 INS-1 细胞接种于 12 孔板上, 并于实验前 2 小时用 PBS 缓冲液冲洗细胞, 而后用 4% 多聚甲醛室温下固定细胞 10 分钟。细胞计数后, 10<sup>5</sup> 个细胞 / 孔分别于 GLP-1 突变多肽 (SEQ ID2, SEQ ID3, SEQ ID4, SEQ ID5, SEQ ID6, SEQ ID7, SEQ ID8 及 SEQ ID9) 及天然 GLP-1 (SEQ ID N01) 共同孵育 2 小时。PBS 将未与细胞结合的多肽冲洗后, 使用 GLP-1 ELISA 试剂盒进行检测。从表 1 可看出, GLP-1 突变多肽较大提高了其与 GLP-1 受体的结合能力, 相比 GLP-1 而言。

[0086] 表 1、GLP-1 突变多肽及 GLP-1 多肽与体外 GLP-1 受体结合的结合常数

[0087]

多肽(序列)	结合常数 (nM)
SEQ ID N01	16.64±1.75
SEQ ID N02	12.46±2.21
SEQ ID N03	16.88±1.86
SEQ ID N04	8.75±1.65
SEQ ID N05	9.26±2.53
SEQ ID N06	12.64±2.86
SEQ ID N07	9.15±1.75
SEQ ID N08	13.24±2.65
SEQ ID N09	9.26±1.22

[0088] 实施例 2 GLP-1 突变多肽在小鼠体内的降血糖功能实验

[0089] 给小鼠静脉注射本发明所述的 8 种不同的 GLP-1 突变多肽(注射剂量为 100  $\mu$ g/kg),以 Exendin-4 为阳性对照,分别于给药后 0.5、4、6、8、12、24 和 48 小时注射葡萄糖 (2g/kg),测定注射后半小时的血糖含量,从图 1 可以看出,Exendin-4 在 4 小时后完全丧失其降血糖功能,但是 8 种 GLP-1 突变多肽却在给药 48 小时后依然存在降血糖功能。

[0090] 实施例 3 GLP-1 突变多肽在大鼠体内的半衰期实验

[0091] 大鼠注射 8 种 GLP-1 突变多肽(注射剂量为 100  $\mu$ g/kg),分别于注射前及注射后 0.5、1、3、6、9、12、24、36、48、72、96 和 120 小时后,于眼丛静脉取血约 0.2mL,制备血清备用。

[0092] GLP-1 及类似物浓度测定方法:采用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测大鼠血清中多肽复合物的浓度,操作如下:4 $^{\circ}$ C 离心分离血浆。用 GLP-1EIA 试剂盒(Phoenix Pharmaceuticals, INC)对鼠血浆中的 GLP-1 的浓度进行测定。将稀释后的鼠血浆样品加入 96 孔板 (50  $\mu$ L),加入 25  $\mu$ L Exendin-4 的羊抗鼠一抗后,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。使用洗液清洗 96 孔板 4 次,加入 100  $\mu$ L SA-HRP 后孵育 1 小时。同样的方法对 96 孔板进行清洗,然后加入 100  $\mu$ L TMB,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 2N 盐酸中止反应后 20 分钟内测定 OD450 值,并与标准浓度的 GLP-1 进行比对及根据 ELISA 结果计算药代动力学参数。

[0093] 8 种 GLP-1 突变多肽及阳性对照的体内药代动力学结果见表 2,结果显示本发明的突变串联多肽在体内的半衰期较单独的 GLP-1 明显延长,具有长效特性。

[0094] 表 2、GLP-1 突变多肽及 Exendin-4 在大鼠体内的半衰期

[0095]



多肽(序列)	半衰期(小时)
Exendin-4	<4.0
SEQ ID N02	24
SEQ ID N03	30
SEQ ID N04	33
SEQ ID N05	25
SEQ ID N06	30
SEQ ID N07	35
SEQ ID N08	35
SEQ ID N09	40

**[0096] 实施例 4 冻干粉型药物组合物的制备**

**[0097]** 取适量的容器加泊洛沙姆 0.05g、甘露醇 0.2g、乳糖 0.1g、注射用水 3mL，搅拌使溶解，加 1mol/L 的枸橼酸或氢氧化钠调节 pH 至 6.0，冷却至 5℃，取具二硫键的多肽溶液 5mL 加入其中，继续调补 pH 至 6.0，加水至 10mL。加入 20mg 活性炭，在 5℃ 下搅拌 20 分钟，脱碳，采用微孔滤膜过滤除菌，滤液按每支 0.2mL 进行分装，预冻 2 小时后，冷冻下减压干燥 12 小时，至样品温度到 5℃ 后，再干燥 2 小时，制得白色疏松块状物，封口即得 GLP-1 突变多肽的药物组合物，置于预充式的注射器中，规格为 100 μg/支，4℃ 以下保存，注射前以 200 μL 注射用水溶解后给药。

**[0098] 实施例 5 溶液注射剂型药物组合物的制备**

**[0099]** 取适量的容器加山梨醇 0.1g、乳糖 0.1g、NaCl 20mg、枸橼酸 10mg、注射用水 7mL，搅拌使溶解，加 1mol/L 的枸橼酸或氢氧化钠调节 pH 至 6.5，冷却至 0℃，取以实施例 5 方法制备的具二硫键的多肽粉末 5mg 加入其中，继续搅拌溶解，调补 pH 至 6.5，加水至 10mL。加入 10mg 活性炭，在 0—4℃ 下搅拌 20 分钟，脱碳，采用微孔滤膜过滤除菌，滤液按每支 100 μL 分装入预充式注射器，样品温度到 5℃ 以下保存，规格为 50 μg/支。

**[0100]** 综上所述，本发明的内容并不局限在上述的实施例中，相同领域内的有识之士可以在本发明的技术指导思想之内可以轻易提出其他的实施例，但这种实施例都包括在本发明的范围之内。

[0001]

说明书核苷酸和氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110>

<120> 胰高血糖素样肽-1 突变体多肽及其制备方法、药物组合物和其应用

<130> 天津拓飞生物科技有限公司

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (31)

<400> 1

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

[0002]

<210> 2  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1).. (37)

<400> 2

Gly Cys Gly Cys Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Cys Val Ser  
 1                    5                    10                    15

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

Lys Gly Arg Gly Cys  
                   35

<210> 3  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

[0003]

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (40)

<400> 3

Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser  
 1                    5                    10                    15

Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Cys Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala  
                   20                    25                    30

Trp Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
                   35                    40

<210> 4

<211> 43

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (43)

[0004]

<400> 4

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly His Ala Glu Gly Thr  
1                    5                    10                    15

Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu  
                  20                    25                    30

Phe Ile Ala Trp Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
                  35                    40

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (39)

<400> 5

Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp  
1                    5                    10                    15

[0005]

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

Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
 35

<210> 6

<211> 41

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (41)

<400> 6

Gly Cys Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr  
 1 5 10 15

Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile  
 20 25 30

Ala Trp Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
 35 40

[0006]

<210> 7  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(41)

<400> 7

Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr  
 1                    5                                    10                                    15

Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile  
                   20                                    25                                    30

Ala Trp Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
                   35                                    40

<210> 8  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人类 (Homo sapiens)

[0007]

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (39)

<400> 8

Gly Gly Gly Cys Gly Cys Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp  
1                    5                    10                    15

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

Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
                  35

<210> 9

<211> 41

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1).. (41)

[0008]



<400> 9

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly His Ala Glu Gly Thr Phe Thr  
1                    5                    10                    15

Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile  
                  20                    25                    30

Ala Trp Leu Cys Lys Gly Arg Gly Cys  
                  35                    40

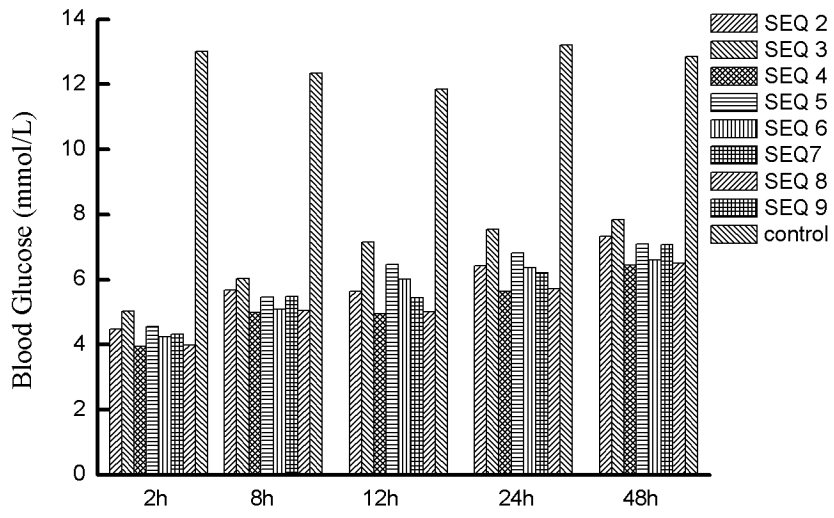


图 1