

(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
2007年5月24日 (24.05.2007)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2007/056907 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/47 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01) A61K 38/26 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2006/000562
- (22) 国际申请日: 2006年3月30日 (30.03.2006)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200510047801.4
2005年11月21日 (21.11.2005) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 大连帝恩生物工程有限公司(DALIAN D.N BIO-ENGINEERING CO., LTD) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市经济技术开发区松岚街17号, Liaoning 116600 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 李元(LI, Yuan) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市经济技术开发区松岚街17号, Liaoning 116600 (CN)。
- (74) 代理人: 大连东方专利代理有限责任公司(DALIAN EAST PATENT BROKERAGE CO., LTD); 中国辽宁省大连市西岗区黄河路263号, Liaoning 116011 (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 根据细则4.17的声明:
— 发明人资格(细则4.17(iv))
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。



WO 2007/056907 A1

(54) Title: TRUNCATED GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (sGLP-1) AND ITS PREPARING METHOD AND USE

(54) 发明名称: 截短胰高血糖素样肽1(sGLP-1)、制法及其应用

(57) Abstract: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs for promoting secretion of insulin, named as truncated glucagon-like peptide-1 (sGLP-1), is composed of 26 amino acid residues with the sequence of His-X1-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu. The sGLP-1 according to the present invention has marked merits compared with current GLP-1 analogs, as follows: a) stronger binding affinity to insulin cell receptor and enhanced capacity to stimulate insulin secretion; b) resistance to degradation of dipeptidyl peptidase because of the substitution of Gly or Ser for Ala at amino-acid position 2, resulting in longer in vivo half life and improved curative effect; c) lowering synthetic cost due to shorter sequence.

[见续页]



(57) 摘要:

本发明涉及促胰岛素分泌的胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 的类似物, 截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1), 其由 26 个氨基酸组成, 其序列如下:

His-X1-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu。发明所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 与目前 GLP-1 及其类似物相比, 具有突出的特点: 1. 截短肽链改构后与胰岛细胞受体结合力更强, 刺激更强的胰岛素分泌作用; 2. 通过第二位氨基酸序列的改变, 由 Ala 改为 Gly 或 Ser 使改构的模拟序列可抵抗二肽基肽酶降解作用, 从而使半衰期延长, 药效增强; 3. 通过截短肽链, 降低合成成本。

截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1)、制法及其应用

技术领域

本发明涉及促胰岛素分泌的胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 的类似物, 另外还涉及其制法及其应用。

背景技术

近年来对促胰岛素分泌肽 GLP-1 和 Exendin 4 的研究进展很快, 两者具有很高的同源性, 应用于治疗 II 型糖尿病取得较好的效果。GLP-1 是人肠道中分离纯化得到的多肽, Exendin 4 是从墨西哥巨蜥的毒液中分离得到的一种短肽。两者在很低浓度下即可促进胰脏合成和分泌胰岛素, 从而能帮助糖尿病人控制血糖。

GLP-1 是人体分泌的一种肠道激素, 由胰高血糖素原 (Proglucagon) 分子经肠道蛋白水解酶作用而产生, 因而称为胰高血糖素类多肽。当血糖浓度高于 6mmol/L 时, GLP-1 能显著促进胰岛素分泌; 而一旦血糖浓度恢复至正常值则不再继续作用, 这一点对 II 型糖尿病的治疗十分有用。人体内的 GLP-1 有两种形式, 一种为 GLP-1 (7-36) NH₂, 是由 30 个氨基酸残基组成的多肽, 即由胰高血糖素原中第 7 位至第 36 位氨基酸组成, 其 C 端是酰胺化了的; 另一种为 GLP-1 (7-37), 是由 31 个氨基酸残基组成的多肽, 即胰高血糖素原中第 7 位至第 37 位氨基酸, GLP-1 (7-36) NH₂ 和 GLP-1 (7-37) 有相同的促胰岛素分泌作用, 实验证明, 在 1×10^{-10} — 1×10^{-11} mol/L 浓度下, GLP-1 与离体胰岛细胞作用时, 可促进其分泌胰岛素, 故又称它们为促胰岛素分泌肽。美国专利 USP 05424286 公开了 Exendin 4 和 GLP-1 促胰岛素分泌的对比实验。与 GLP-1 相比, 产生胰岛素分泌作用所需的 Exendin 4 浓度更低, 而且 Exendin 4 在人体内的半衰期更长。这些研究表明, GLP-1 或 Exendin 4 可能成为一种较为理想的 II 型糖尿病治疗药物。

一个治疗 II 型糖尿病的理想药物应该是既能降低空腹血糖, 也能降低餐后血糖, 又不会导致低血糖, 还能减少心血管系统的并发症, 并且没有其它的副反应。GLP-1 是由 30 个氨基酸组成的肽, 其序列 His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-

Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg。虽然该序列用于治疗糖尿病优点是该序列为人体产生的天然序列，具有上述的多种特性，副反应少，比如它能象糖原那样抑制糖原的分泌，减慢胃肠排空，抑制食欲等；此外，GLP-1 受体的刺激还可以促进细胞增殖及更新，从而使胰岛素分泌增多，对糖的耐受性提高。但缺点是，头两个氨基酸 His-Ala 很快就被体内的二肽基肽酶降解而丧失活性，在体内的半衰期太短，只有 90 至 120 秒，几乎没有太大的临床实用价值。目前国内外进行 GLP-1 序列改构的研究和专利均有很多，但没有在 GLP-1 序列改构同时进行序列长度缩减的。

Exendin 4 在人体内的半衰期长，降血糖作用明显，但化学合成的 Exendin 4 是 39 个氨基酸组成的肽，成本高，而且作为异源多肽，长期使用有诱发人体产生对应抗体而失效的可能。

发明内容

本发明的目的是克服上述不足问题，提供一种截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1)，与胰岛细胞受体结合力更强，刺激胰岛素分泌作用更强；半衰期延长，另外还提供其制法，合成成本低，最后还提供其应用。

本发明为实现上述目的所采用的技术方案是：截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1)，其由 26 个氨基酸组成，其序列如下：

His-X1-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu

式中英文缩写表示：His(缩写为：H，以下相同。)组氨酸、Gly(G)甘氨酸、Glu(E)谷氨酸、Thr(T)苏氨酸、Phe(F)苯丙氨酸、Ser(S)丝氨酸、Asp(D)天冬氨酸、Val(V)缬氨酸、Tyr(Y)酪氨酸、Leu(L)亮氨酸、Gln(Q)谷氨酰胺、Lys(K)赖氨酸、Ile(I)异亮氨酸、Trp(W)色氨酸。

其中所述的 X1 为 Gly 或 Ser。

本发明所述截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 的制法：

第一步：sGLP-1 肽树脂的合成：

称取 0.5 克的多肽合成树脂倒入合成反应柱中，加入二甲基甲酰胺溶剂溶胀，

按照 sGLP-1 氨基酸序列依次称取 0.1 克的 9-芘甲氧羰基进行氨基酸 N 端(FMOC)保护的氨基酸于反应器的容器中，采用 Merrifield 发明的固相化学合成方法合

成，sGLP-1 的氨基酸序列从 C 端开始依次进行，在合成反应柱中，加入用二甲基甲酰胺溶解的 N,N 二异丙基碳二亚胺 (DIC)，4-二甲氨基吡啶 (DMAP)，C 端第一个氨基酸 (FMOC-Leu)，反应 2-3 小时中止，减压抽干反应液，洗树脂，分别用异丙醇洗 3 次，二氯甲烷洗 3 次，二甲基甲酰胺洗 3 次，加入含 20% (V/V) 6-氢吡啶的二甲基甲酰胺脱保护溶液，反应 30 分钟，抽干反应液，分别用异丙醇洗 3 次，二氯甲烷洗 3 次，二甲基甲酰胺 3 次，随后加入的第二个 FMOC 保护的氨基酸，和无水羟基苯丙三氮唑 (HOBT)，2-苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯 (HBTU)，N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA)，溶解活化 5 分钟，立即加入反应器中反应 2 小时，按上法洗树脂，脱保护，随后依照序列结构偶连反应直到序列完全，偶连完成后，用二甲基甲酰胺充分洗去残余的未偶连试剂，用惰性气体 N₂ 吹干肽树脂，备用。

第二步：sGLP-1 树脂的裂解：

取上述肽树脂于容器中，加入裂解液：9.5ml 三氟乙酸，0.4ml 硫代苯甲醚，0.4ml 苯甲醚，0.2ml-1,2-乙二硫醇，于室温避光反应 2 小时，过滤，滤液于室温浓缩后加入预先冷冻的无水乙醚中，冰冻过夜，离心，弃上清液，沉淀用水或冰醋酸溶解后，冷冻后置冷冻干燥机中干燥，得粗肽。

第三步：sGLP-1 肽纯化

取上述粗肽，加入无热源水溶解，得到样品溶液，过滤并收集样品滤液；将乙腈及无热源水用 0.45 μ 滤膜过滤，分别加入 0.1% 三氟乙酸，混匀，用 C18 反向柱分离纯化，分离条件采用：流动相 A：0.1% 三氟乙酸+100% H₂O；流动相 B：0.1% 三氟乙酸+100% 乙腈；0→90 分钟梯度洗脱纯化制备，收集纯化的 sGLP-1 洗脱液，冷冻后置冷冻干燥机中干燥，得到 sGLP-1 多肽纯品。

本发明所述截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 在治疗 II 型糖尿病药物中的应用。如在治疗 II 型糖尿病注射针剂、口服片剂或胶囊、喷雾剂中的应用。

所述中成分除 sGLP-1 外，注射针剂包含 sGLP-1 及人体可接受的稀释液体，如注射用水、生理盐水和磷酸盐缓冲液等；口服片剂或胶囊包括 sGLP-1 及医药可接受的稳定剂、固型剂等。

本发明所述的截短胰高血糖素样肽-1 (sGLP-1) 与目前 GLP-1 及其类似物相比，具有突出的特点：1. 截短肽链改构后与胰岛细胞受体结合力更强，刺激

更强的胰岛素分泌作用；2. 通过第二位氨基酸序列的改变，由 Ala 改为 Gly 或 Ser 使改构的模拟序列可抵抗二肽基肽酶降解作用，从而使半衰期延长，药效增强；3. 通过截短肽链，降低合成成本。多肽的制备一般可采用化学合成和基因工程技术两种方法生产。但生产的成本很高，这成为其进入药品市场的障碍。本发明提供的合成方法，通过改变肽链中的少数若干个氨基酸可得到多肽的类似物，同时又可以大规模、低成本地进行生产。通过用 II 型糖尿病大鼠模型试验，进行 II 型糖尿病降血糖治疗试验，结果表明本发明 sGLP-1 降血糖作用优于 GLP-1 及其改构序列，动物试验表明降糖效果明显提高。用改构的缩短序列与胰岛细胞受体结合，具有更佳的刺激胰岛素分泌作用，具有较好的用于 II 型糖尿病病人的治疗药物的应用前景。

附图说明

图 1 为本发明 sGLP-1 液相色谱纯度鉴定图。

图 2 为本发明 sGLP-1 分子量质谱鉴定图。

具体实施方式

实施例 1

按下述方法合成 sGLP-1，其序列如下：

His- Gly -Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu

第一步：sGLP-1 肽树脂的合成：

称取 0.5 克的 Wang 树脂（或其他多肽合成树脂）倒入合成反应柱中，加入二甲基甲酰胺溶剂溶胀，按照本发明的降血糖肽的氨基酸序列依次称取 0.1 克的 Fmoc（9 芘甲氧羰基进行氨基酸 N 端保护的）氨基酸于反应器的容器中，按照 Merrifield 发明的固相化学合成方法（具体方法如下）依照本发明的 sGLP-1 的氨基酸序列从 C 端开始依次进行，在合成反应柱中，加入用 10ml 的二甲基甲酰胺溶解的 4ml N,N 二异丙基碳二亚胺（DIC），0.012 克 4-二甲氨基吡啶的 C 端第一个氨基酸（Fmoc-氨基酸），反应 2-3 小时中止，减压抽干反应液，洗树脂，分别用异丙醇洗 3 次，二氯甲烷洗 3 次，二甲基甲酰胺 3 次，加入含 20%（V/V）6-氢吡啶的二甲基甲酰胺脱保护溶液，反应 30 分钟，抽干反应液，分别用异丙醇洗 3 次，二氯甲烷洗 3 次，二甲基甲酰胺 3 次，随后加入的第二个 Fmoc 保护

的氨基酸，和 0.22 克无水羟基苯丙三氮唑，0.6 克 2-苯骈三氮唑-1, 1, 3, 3, -四甲基脲四氟硼酸酯 (HBTU)，0.35mlN,N-二异丙基乙胺，溶解活化 5 分钟，立即加入反应器中反应 2 小时，按上法洗树脂，脱保护，随后依照序列结构偶连反应直到序列完全，偶连完成后，用二甲基甲酰胺充分洗去残余的未偶连试剂，用惰性气体 N₂ 吹干肽树脂，备用。

第二步：sGLP-1 树脂的裂解：

取上述肽树脂于容器中，加入裂解液：9.5ml 三氟乙酸，0.4ml 硫代苯甲醚，0.4ml 苯甲醚，0.2ml-1, 2-乙二硫醇，于室温避光反应 2 小时，过滤，滤液与室温浓缩后加入预先冷冻的无水乙醚中，冰冻过夜，离心，弃上清液，沉淀用 200ml 水或冰醋酸溶解后，冷冻后置冷冻干燥机中干燥，得粗肽。

第三步：sGLP-1 肽纯化：

取粗肽，加入 200ml 无热源水溶解，得到样品溶液，过滤并收集样品滤液；将乙腈及无热源水用 0.45 μ 滤膜过滤，分别加入 0.1%三氟乙酸，混匀，用 C18 反向柱分离纯化，分离条件采用：流动相 A：0.1%三氟乙酸+100%H₂O；流动相 B：0.1%三氟乙酸+100%乙腈；0→90 分钟梯度洗脱纯化制备，收集纯化的 sGLP-1 洗脱液，冷冻后置冷冻干燥机中干燥，得到 sGLP-1 多肽纯品。

实施例 2

按照实施例 1 所述方法合成 sGLP-1，其序列如下：

His-Ser-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu。

动物实验：

1、降血糖效果实验：

材料和方法

GK 糖尿病大鼠（中国科学院上海动物中心提供）

sGLP-1 序列如下：

No1: HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

No2: HEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL

No3: HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL

No4: HSEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI

No5: HEGTFTSDVSSYLEGQAVRLFI

No6: HEGTFTSDVSSYMEEEEAVR

No7: HGE GTFTSDVSSYM

No8: HEGTFTSDVSS

上述 8 种序列多肽用 0.9%NaCl 溶液配置成 1mg/ml 溶液，备用。

大鼠随机分组，禁食过夜后，用刻度毛细管（注射前以肝素处理）从眼窦取血 20 微升，置入 300 微升生理盐水中混匀，3000 转/分离心除去红血球，血清用于空腹血糖浓度测定。然后各组分别注射不同多肽，用生理盐水作阴性对照，每只大鼠每天注射两次，每次 0.1mg，连续注射两周，禁食过夜后，再次按上法取血，测定空腹血糖。

结果见附表 1，No1~No5 均有降血糖作用，其中 No1 序列是第 2 位氨基酸由 A 改为 G 的全长 GLP-1 序列作为阳性对照；No2~No5 为不同截短长度的改构序列，而且 No2 和 No3 组降血糖作用明显高于 No1 组，为最终确定的本发明 sGLP-1 序列。

2、对 NOD 小鼠的降血糖作用

实验材料与方法：

NOD 小鼠禁食过夜（中国科学院上海动物中心提供）

40%葡萄糖、0.9%NaCl 溶液、sGLP-1 纯品（实施例 1 所得产品）、GLP-1 纯品、血糖测定试剂盒（中国卫生部上海生物制品所出品）

NOD 小鼠禁食过夜，分为三组。第一组腹腔注射 200 微升 40%葡萄糖和 10 微克 sGLP-1，第二组腹腔注射 200 微升 40%葡萄糖和 10 微克 GLP-1，第三组为对照组，只注射葡萄糖。立刻用刻度毛细管（注射前以肝素处理）从眼窦取血 20 微升，置入 300 微升生理盐水中混匀，3000 转/分离心除去红血球，血清用于血糖浓度测定。分别于 30，60，120 分钟按同样操作取血，分离血清。三组血清均按照试剂盒所述方法测定血糖浓度，以检验各组的降血糖作用。

结果如表 1 所示。

对照组血糖浓度大幅度升高后，逐渐回落到正常水平；而给药组血糖浓度未出现显著升高，一直保持在正常水平附近。这是由于给药后促进了胰岛素分泌，从而避免了血糖浓度的大幅波动。由此可证明 sGLP-1 和 GLP-1 的降血糖

作用。

表 1. sGLP-1 对 NOD 小鼠的降血糖作用

给药后时间	0min	30min	60min	120min
sGLP-1	4.08	4.34	4.28	3.98
GLP-1	4.11	5.12	4.87	4.03
对照组	4.09	8.07	6.30	5.16

注：表中血糖浓度值为：mmol/L

3、sGLP-1 的促胰岛素分泌作用

实验材料与方法：

NOD 小鼠（中国科学院上海动物中心提供）

0.9%NaCl 溶液、sGLP-1 纯品（实施例 1 所得产品）、GLP-1 纯品

放射免疫胰岛素测定试剂盒（中国卫生部上海生物制品所出品）

NOD 小鼠分成三组。首先用刻度毛细管（先以 1mg/mL 肝素润洗毛细管内壁并晾干）从眼窦取血 50 微升，然后三组小鼠分别腹腔注射 10 微克 sGLP-1、10 微克 GLP-1 和 200 微升生理盐水，并记此时为零时刻。然后分别于 5, 10, 20, 30 分钟按同样操作取血。取血后各血样立刻加入盛有 50 微升生理盐水的离心管中，混匀，3000 转/分离心除去红血球，按放射免疫试剂盒使用方法测定血清中胰岛素浓度，以检验 sGLP-1 的促胰岛素分泌作用。

实验结果如表 2 所示。该结果表明，腹腔注射 sGLP-1 能显著促进胰岛素的分泌，短时间刺激产生胰岛素能力与 GLP-1 相当，中长时间刺激产生胰岛素能力超过 GLP-1。

表 2. sGLP-1 的促胰岛素分泌作用

给药后时间	0min	5min	10min	20min	30min
sGLP-1	2.88	10.56	19.88	24.67	16.45
GLP-1	3.11	9.76	10.63	11.23	6.27
对照组	2.09	2.07	1.80	1.90	1.86

注：表中胰岛素值为： 10^{-6} 国际单位

4. sGLP-1 的促 C-肽分泌作用

实验材料与方法：

健康 C₅₇/BL 小鼠（中国科学院上海动物中心提供）

0.9%NaCl 溶液、sGLP-1 纯品（实施例 1 所得产品）、GLP-1 纯品。

放射免疫 C-肽测定试剂盒（中国卫生部上海生物制品所出品）

健康 C₅₇/BL 小鼠分成三组。首先用刻度毛细管（先以 1mg/mL 肝素润洗毛细管内壁并晾干）从眼窦取血 50 微升，然后两组小鼠分别腹腔注射 10 微克 sGLP-1、10 微克 GLP-1 和 200 微升生理盐水，并记此时为零时刻。然后分别于 5，10，20，30 分钟按同样操作取血。取血后各血样立刻加入盛有 50 微升生理盐水的离心管中，混匀，3000 转/分离心除去红血球，按放射免疫试剂盒使用方法测定血清中 C 肽浓度，以检验 sGLP-1 的促 C 肽分泌作用。

实验结果如表 3 所示。该结果表明，腹腔注射 sGLP-1 能显著促进 c 肽的分泌，而且促进 c 肽的分泌能力高于 GLP-1。

表 3. sGLP-1 的促胰岛素分泌作用

给药后时间	0min	5min	10min	20min	30min
sGLP-1	0.07	0.08	0.20	0.16	0.15
GLP-1	0.07	0.08	0.15	0.11	0.09
对照组	0.07	0.06	0.08	0.06	0.06

注：表中 c 肽浓度为：pmol/mL

权 利 要 求

1、截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1), 其特征在于: 其由 26 个氨基酸组成, 其序列如下:

His-X1-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu。

2、根据权利要求 1 所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1), 其特征在于: 其中 X1 为 Gly 或 Ser。

3、根据权利要求 1 所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 的制法, 其特征在于:

第一步: sGLP-1 肽树脂的合成:

称取 0.5 克的多肽合成树脂倒入合成反应柱中, 加入二甲基甲酰胺溶剂溶胀, 按照 sGLP-1 氨基酸序列依次称取 0.1 克的 9 芘甲氧羰基进行氨基酸 N 端 (Fmoc) 保护的氨基酸于反应器的容器中, 采用 Merrifield 发明的固相化学合成方法合成, sGLP-1 的氨基酸序列从 C 端开始依次进行, 在合成反应柱中, 加入用二甲基甲酰胺溶解的 N,N 二异丙基碳二亚胺 (DIC), 4-二甲氨基吡啶 (DMAP), C 端第一个氨基酸 (Fmoc-Leu), 反应 2-3 小时中止, 减压抽干反应液, 洗树脂, 分别用异丙醇洗 3 次, 二氯甲烷洗 3 次, 二甲基甲酰胺洗 3 次, 加入含 20% (V/V) 6-氢吡啶的二甲基甲酰胺脱保护溶液, 反应 30 分钟, 抽干反应液, 分别用异丙醇洗 3 次, 二氯甲烷洗 3 次, 二甲基甲酰胺 3 次, 随后加入的第二个 Fmoc 保护的氨基酸, 和无水羟基苯丙三氮唑 (HOBT), 2-苯并三氮唑-1, 1, 3, 3, -四甲基脲四氟硼酸酯 (HBTU), N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA), 溶解活化 5 分钟, 立即加入反应器中反应 2 小时, 按上法洗树脂, 脱保护, 随后依照序列结构偶连反应直到序列完全, 偶连完成后, 用二甲基甲酰胺充分洗去残余的未偶连试剂, 用惰性气体 N₂ 吹干肽树脂, 备用;

第二步: sGLP-1 树脂的裂解:

取上述肽树脂于容器中, 加入裂解液: 9.5ml 三氟乙酸, 0.4ml 硫代苯甲醚, 0.4ml 苯甲醚, 0.2ml 1,2-乙二硫醇, 于室温避光反应 2 小时, 过滤, 滤液于室温浓缩后加入预先冷冻的无水乙醚中, 冰冻过夜, 离心, 弃上清液, 沉淀用水

或冰醋酸溶解后，冷冻后置冷冻干燥机中干燥，得粗肽；

第三步：sGLP-1 肽纯化

取上述粗肽，加入无热源水溶解，得到样品溶液，过滤并收集样品滤液；将乙腈及无热源水用 0.45 μ 滤膜过滤，分别加入 0.1%三氟乙酸，混匀，用 C18 反向柱分离纯化，分离条件采用：流动相 A：0.1%三氟乙酸+100% H_2O ；流动相 B：0.1%三氟乙酸+100%乙腈；0→90 分钟梯度洗脱纯化制备，收集纯化的 sGLP-1 洗脱液，冷冻后置冷冻干燥机中干燥，得到 sGLP-1 多肽纯品。

4、根据权利要求 1 所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 在治疗 II 型糖尿病药物中的应用。

5、根据权利要求 1 所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 在治疗 II 型糖尿病注射针剂、口服片剂或胶囊、喷雾剂中的应用。

6、根据权利要求 4 所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 在治疗 II 型糖尿病药物中的应用, 其特征在于：注射针剂包含 sGLP-1 及人体可接受的稀释液体，如注射用水、生理盐水和磷酸盐缓冲液。

7、根据权利要求 4 所述的截短胰高血糖素样肽 1 (sGLP-1) 在治疗 II 型糖尿病药物中的应用, 其特征在于：口服片剂或胶囊包括 sGLP-1 及医药可接受的稳定剂、固型剂。

C040831004 LY 6P

实验时间: 2004-09-18, 5: 22: 18

实验者: WJ

谱图文件: D:\N2000\8月订单\纯品\C\C040831004 LY6PA5-720040918050323. org

报告时间: 2004-10-08, 11: 02: 16

积分方法: 面积归一法

使用仪器类型: 液相色谱

梯度方式: 高压梯度

检测仪: 紫外

仪器型号: Waters

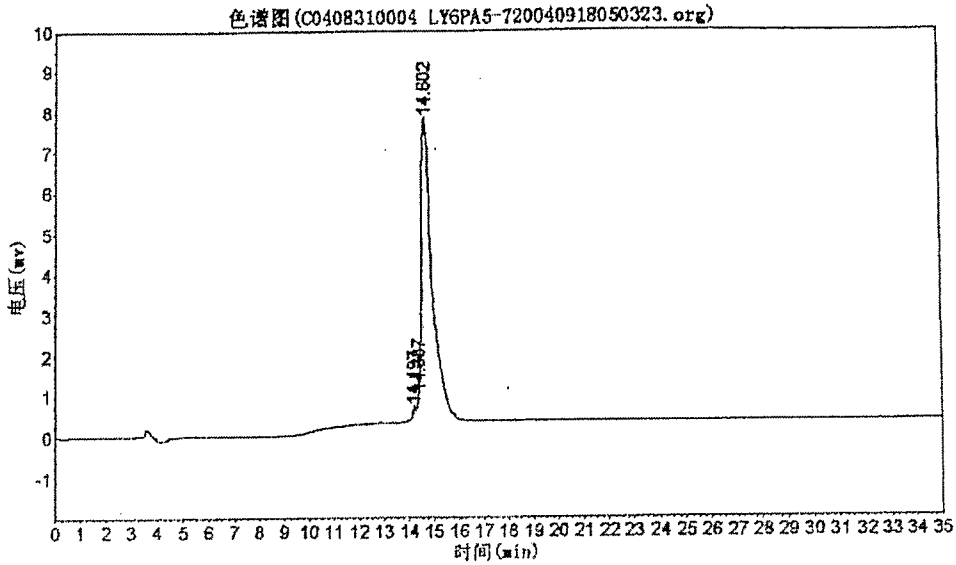
波长 (nm): 215

柱温 (°C): 室温

柱型号: C18

实验内容简介:

B 10-90% 30min



分析结果表

峰号	峰名	保留时间	峰高	峰面积	含量
1		14. 197	281. 310	2298. 333	0. 9875
2		14. 387	567. 292	3062. 078	0. 9875
3		14. 602	7375. 989	227377. 500	97. 6968
总计			8233. 590	232737. 911	100. 0000

图 1

美联 (西安) 生物科技有限公司

检测单位: 西北大学现代分离科学研究所
样品编号: C0504020007 26P A14
数据编号: 美联 50001.J12
检测时间: 2005年5月12日15时28分, 2005年5月12日14时51分线性校正
仪器型号与参数: Kratos PC Axima CFRplus V2.3.2a:Mode linear,Power 66,P.Ext.@2843(bin84)
%Int. 973mV(sum=48661mV) Profiles 1-50 Unsmoothed

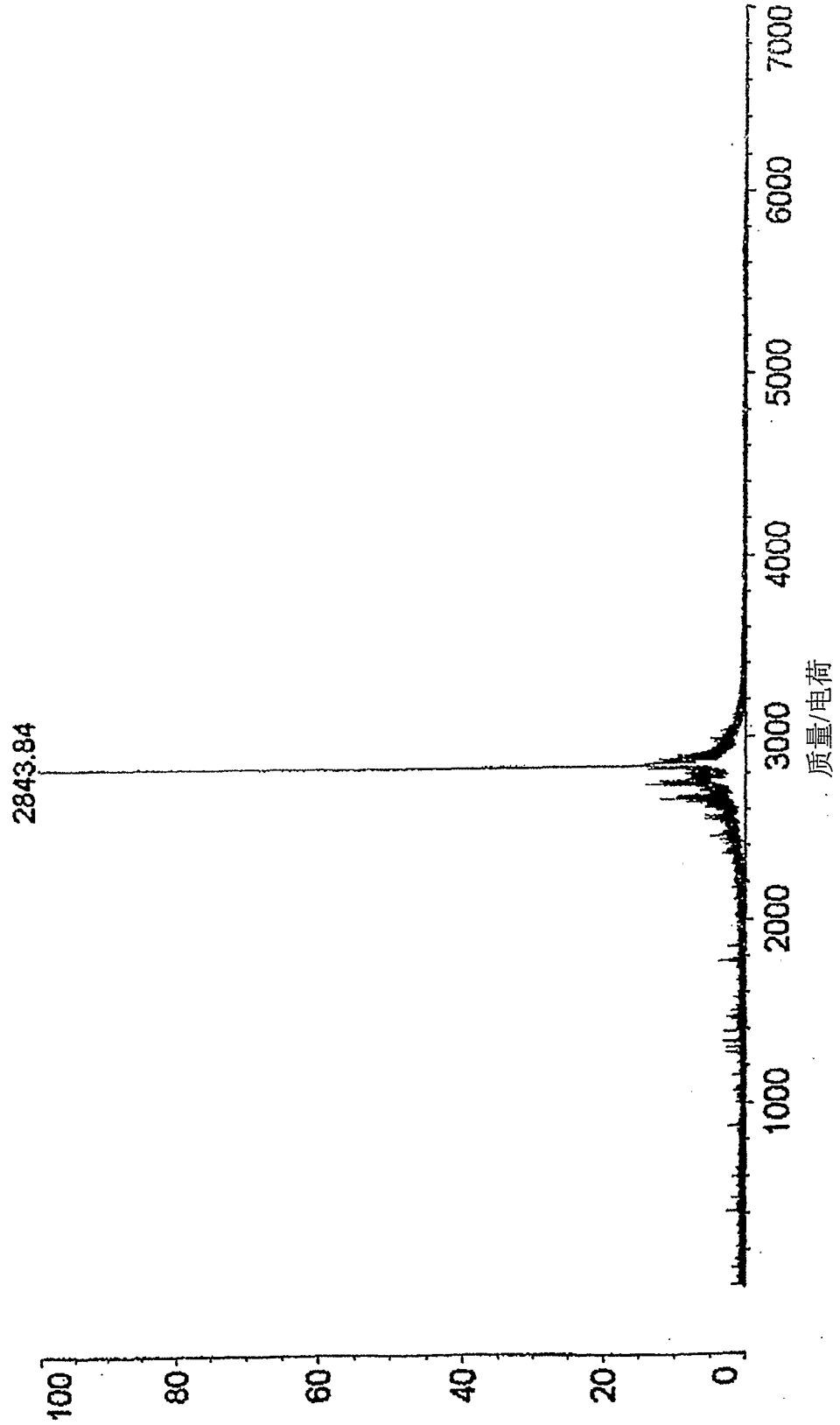


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/000562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC⁸ 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)

WPI, EPODOC, PAJ, CPRS, CNKI, CA, MEDLINE, +glucagon+, like, secret+, peptide,
GLP, truncated+, short+, insulin, substitut+, diabetes

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,5545618 (BUCKLEY D I. et al.) 13. Aug. 1996 (13.08.1996), abstract, claims 1, 5, 8 and 12, and columns 12 -13 of the description	1-6
X	WO,A1,9111457 (BUCKLEY D I. et al.) 08. Aug.1991 (08.08.1991), abstract, claims 1, 5, 7, 8, 12 and 13, and from page 24, line 11 to page 29, line 17 of the description	1-6
A	US,A,5118666 (GEN HOSPITAL CORP) 02. Jun. 1992 (02.06.1992), claims 1-21 and columns 2-9 of the description	1-6
A	CN,A,1490333(ZHONGKE YAGUANG BIOTECH CO LTD BEIJING)21. Apr. 2004 (21.04.2004), abstract, claims 1-16 and examples 1- 4	1-6
A	CN,A,1363559 (HUAYI BIO TECHNOLOGY CO LTD SHANGHAI) 14.Aug .2002 (14.08.2002), claims 1-6 and example 1	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&”document member of the same patent family</p>
--	--

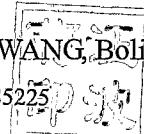
Date of the actual completion of the international search
15.Aug.2006 (15.08.2006)

Date of mailing of the international search report

07 · SEP 2006 (07 · 09 · 2006)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

WANG, Boli


Telephone No. 86-10-62085225

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000562

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/47(2006.01) i

C07K14/605(2006.01) i

C07K 1/04(2006.01) i

C07K 1/06(2006.01) i

C07K 1/14(2006.01) i

A61K38/26(2006.01) i

A61P 3/10(2006.01) i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000562

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US, A, 5545618	13. Aug. 1996 (13.08.1996)	NONE	
WO, A1, 9111457	08. Aug. 1991 (08.08.1991)	JP, A, 2005132848	26. May 2005 (26.05.2005)
		EP, A1, 0512042	11. Nov. 1992 (11.11.1992)
		JP, T, 5506427T	22. Sept. 1993 (22.09.1993)
		EP, A4, 0512042	17. Feb. 1993(17.02.1993)
		EP, B1, 0512042	08. Apr. 1998(08.04.1998)
		DE, E, 69129226E	14. May 1998(14.05.1998)
		ES, T3, 2113879T	16. May 1998(16.05.1998)
		JP, A, 2001151798	05. Jun. 2001 (05.06.2001)
		JP, B2, 3262329B2	04. Mar. 2002(04.03.2002)
		CA, C, 2073856	03.Dec. 2002(03.12.2002)
		JP, A, 2003192698	09. Jul. 2003 (09.7.2003)
JP, A, 2004196825	15. Jul. 2004 (15.07.2004)		
US, A, 5118666	02. Jun. 1992 (02.06.1992)	NONE	
CN, A, 1490333	21. Apr. 2004 (21.04.2004)	NONE	
CN, A, 1363559	14. Aug. 2002(14.08.2002)	JP, T, 2005502595T	27. Jan. 2005(27.01.2005)
		WO, A1, 02090388	14. Nov. 2002(14.11.2002)
		EP, A1, 1386930	04. Feb. 2004 (04.02.2004)
		KR, A, 2003094386	11. Dec. 2003(11.12.2003)
		BR, A, 200209685	13. Jul. 2004 (13.07.2004)
		US, A1, 2004142866	22. Jul. 2004 (22.07.2004)
		AU, A1,2002257497	18. Nov. 2002(18.11.2002)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/000562

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(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)

IPC⁸ 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))

WPI, EPODOC, PAJ, CPRS, 清华同方数据库, CA, MEDLINE, 促胰岛素, 截短, 分泌, 肽, 胰高血糖素, +glucagon+, like, secret+, peptide, GLP, truncated+, short+, insulin, substitut+等

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US,A,5545618 (BUCKLEY D I等) 13. 8 月 1996 (13.08.1996), 摘要, 权利要求 1、5、8 和 12, 说明书第 12 和 13 栏	1-6
X	WO,A1,9111457 (BUCKLEY D I等) 08. 8 月 1991 (08.08.1991), 摘要, 权利要求 1、5、7、8 和 12-13, 说明书第 24 页第 11 行-第 29 页第 17 行	1-6
A	US,A,5118666 (GEN HOSPITAL CORP) 02. 6 月 1992 (02.06.1992), 权利要求 1-21, 说明书第 2-9 栏	1-6
A	CN,A,1490333 (北京中科亚光生物科技有限公司) 21. 4 月 2004 (21.04.2004), 摘要, 权利要求 1-16 和实施例 1-4	1-6
A	CN,A,1363559 (上海华谊生物技术有限公司) 14. 8 月 2002 (14.08.2002), 权利要求 1-6 和实施例 1	1-6

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

“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

15. 8 月 2006 (15.08.2006)

国际检索报告邮寄日期

07. 9 月 2006 (07. 09. 2006)

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



电话号码: (86-10)62085225

主题的分类

C07K14/47(2006.01) i

C07K14/605(2006.01) i

C07K 1/04(2006.01) i

C07K 1/06(2006.01) i

C07K 1/14(2006.01) i

A61K38/26(2006.01) i

A61P 3/10(2006.01) i

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/000562

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US, A, 5545618	13. 8 月 1996 (13.08.1996)	无	
WO, A1, 9111457	08. 8 月 1991 (08.08.1991)	JP, A, 2005132848 EP, A1, 0512042 JP, T, 5506427T EP, A4, 0512042 EP, B1, 0512042 DE, E, 69129226E ES, T3, 2113879T JP, A, 2001151798 JP, B2, 3262329B2 CA, C, 2073856 JP, A, 2003192698 JP, A, 2004196825	26. 5 月 2005 (26.05.2005) 11. 11 月 1992(11.11.1992) 22. 9 月 1993 (22.09.1993) 17. 2 月 1993(17.02.1993) 08. 4 月 1998(08.04.1998) 14. 5 月 1998(14.05.1998) 16. 5 月 1998(16.05.1998) 05. 6 月 2001 (05.06.2001) 04. 3 月 2002 (04.03.2002) 03. 12 月 2002 (03.12.2002) 09. 7 月 2003 (09.7.2003) 15. 7 月 2004 (15.07.2004)
US, A, 5118666	02. 6 月 1992 (02.06.1992)	无	
CN, A, 1490333	21. 4 月 2004 (21.04.2004)	无	
CN, A, 1363559	14. 8 月 2002(14.08.2002)	JP, T, 2005502595T WO, A1, 02090388 EP, A1, 1386930 KR, A, 2003094386 BR, A, 200209685 US, A1, 2004142866 AU, A1,2002257497	27. 1 月 2005 (27.01.2005) 14. 11 月 2002(14.11.2002) 04. 2 月 2004 (04.02.2004) 11. 12 月 2003 (11.12.2003) 13. 7 月 2004 (13.07.2004) 22. 7 月 2004 (22.07.2004) 18. 11 月 2002(18.11.2002)