

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380101244.9

[51] Int. Cl.

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100354306C

[22] 申请日 2003.10.10

[21] 申请号 200380101244.9

[30] 优先权

[32] 2002.10.11 [33] JP [31] 299283/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/013020 2003.10.10

[87] 国际公布 WO2004/037859 日 2004.5.6

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.11

[73] 专利权人 株式会社三和化学研究所

地址 日本国爱知县

[72] 发明人 林祐二 牧野充弘 幸崎敏之

武田基宏 城森孝仁

[56] 参考文献

WO0104156 A1 2001.1.18

WO9943706 A1 1999.9.2

审查员 汪波莉

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

司

代理人 龙 淳

权利要求书 2 页 说明书 29 页

[54] 发明名称

GLP-1 衍生物及其经粘膜吸收的制剂

[57] 摘要

本发明涉及一种 GLP 衍生物，该衍生物包括一个或者多个氨基酸缺失、取代和/或者加入的 GLP-1(7-35)的氨基酸序列，具有加入到所述肽的 C 末端的 Waa-(Xaa)_n-Yaa(其中 Waa 是精氨酸或者赖氨酸，Xaa 是精氨酸或者赖氨酸，n 是 0 到 14 的整数，并且 Yaa 是精氨酸、精氨酸-NH₂、赖氨酸、赖氨酸-NH₂或者高丝氨酸)，并且具有 GLP-1 活性。这些衍生物是可以经粘膜高效吸收的衍生物。在本发明中，GLP-1 衍生物可以通过用丝氨酸取代 GLP-1 氨基酸序列的 8 位，而具有对于二肽酶 IV 抗性，或者通过用谷氨酰胺和天冬酰胺分别取代 26 位和 34 位的氨基酸而对于胰蛋白酶具有抗性。本发明的 GLP-1 衍生物经粘膜吸收的效率可以进一步通过使用被调控为带负电荷的电荷-调控脂肪乳剂制备而进一步增强。

1. 一种肽，其特征在于，由 GLP-1(7-35)的氨基酸序列构成或者由一个或者几个氨基酸缺失、取代和/或者加入的 GLP-1(7-35)的氨基酸序列构成，并且具有 GLP-1 活性，所述肽的 C 末端具有 Waa-(Xaa)_n-Yaa，其中 Waa 和 Xaa 是赖氨酸，n 是 1 到 9 的整数，并且 Yaa 是精氨酸或精氨酸-NH₂。

2. 根据权利要求 1 所述的肽，其特征在于所述 GLP-1 的氨基酸序列的 8 位被丝氨酸取代。

3. 根据权利要求 1 所述的肽，其特征在于所述 GLP-1 的氨基酸序列的 26 位被谷氨酰胺取代，34 位被天冬酰胺取代。

4. 根据权利要求 1 所述的肽，其特征在于所述 GLP-1 的氨基酸序列的 8 位被丝氨酸取代，26 位被谷氨酰胺取代和 34 位被天冬酰胺取代。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的肽，其特征在于所述的 n 是 3 到 5 的整数。

6. 一种经膜施用的药物组合物，其特征在于含有由 GLP-1(7-35)的氨基酸序列构成或者由一个或者几个氨基酸缺失、取代和/或者加入的 GLP-1(7-35)的氨基酸序列构成、并且具有 GLP-1 活性的肽作为活性成分，所述肽的 C 末端具有 Waa-(Xaa)_n-Yaa，其中 Waa 和 Xaa 是赖氨酸，n 是 1 到 9 的整数，并且 Yaa 是精氨酸或精氨酸-NH₂。

7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于，作为活性成分含有的所述 GLP-1 肽的氨基酸序列的 8 位被丝氨酸取代。

8. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于，作为活性成分含有的所述 GLP-1 肽的氨基酸序列的 26 位被谷氨酰胺取代，34 位被天冬酰胺取代。

9. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于，作为活性成分含有的所述 GLP-1 肽的氨基酸序列的 8 位被丝氨酸取代，26 位被谷氨酰胺取代，34 位被天冬酰胺取代。

10. 根据权利要求 6-9 中任一项所述的药物组合物，其特征在于经膜施用为鼻腔施用。

11. 根据权利要求 6-9 中任一项所述的药物组合物，其特征在于其含有可以调控成带负电荷的脂肪乳剂。

12. 权利要求 1-4 中任一项所述的肽在用于治疗非胰岛素依赖的慢性糖尿病、治疗胰岛素依赖性的慢性糖尿病、治疗肥胖症和/或者食欲抑制症的药物组合物的制造中的用途。

13. 权利要求 1-4 中任一项所述的肽用于制造经膜施用的药物组合物的用途。

GLP-1 衍生物及其经粘膜吸收的制剂

技术领域

本发明涉及可经口腔、肺、鼻腔或者肠中粘膜高效吸收的新型人胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的衍生物, 其制备以及其使用方法。

背景技术

GLP-1 (胰高血糖素样肽-1) 是一种肠促胰岛素激素, 它是摄取食物导致消化道分泌的, 作用于胰腺, 刺激胰岛素的分泌。GIP (抑胃肽或者依赖葡萄糖的促胰岛素多肽) 是表现出相似作用的一种激素。与健康人群相比, 患有 2 型糖尿病的患者启示肠促胰岛素作用的缺乏或者下降, 并且认为这是引起高血糖的一个重要原因。例如, 据报导在 2 型糖尿病患者中, 血液中的 GLP-1 水平下降, 而同时血液 GIP 水平正常。对 2 型糖尿病患者施用肠促胰岛素激素的结果是, 在患者和健康人群中 GLP-1 刺激胰岛素分泌的活性没有差异, 然而在患者中 GIP 刺激胰岛素分泌的活性显著低于健康人群。因此, 糖尿病患者保持了对 GLP-1 的反应; 这样, GLP-1 制剂缺乏的补充能够预期作为治疗糖尿病的药物。

GLP-1 对胰岛素分泌的作用是葡萄糖水平依赖的, 当血液葡萄糖水平为 110mg/dL 或者更低的情况下, GLP-1 并不刺激胰岛素的分泌。即, 施用 GLP-1 具有低血糖可能性较低的临床优点, 并且抑制胰岛素过量分泌, 因而避免了胰腺衰竭。而主要用于治疗 2 型糖尿病的磺酰脲, 是通过持续关闭 ATP 敏感的 K^+ 离子通道来促进胰岛素的分泌, 这会引起低血糖, 过度刺激 β 细胞导致的胰腺衰竭, 并且在长时间施用以后, 引起次级衰竭 (second failure)。因此, GLP-1 的药理学特征是非常有用的, 并且不同于传统用于糖尿病的药物。

GLP-1 也具有以下的特征: 抑制胰高血糖素的分泌、延长胃的排空时间、抑制胃酸分泌、作用于脑食欲抑制症、促进胰腺 β 细胞合成胰岛素以及胰腺 β 细胞的增殖。因此, 认为 GLP-1 不仅通过拮抗高血

糖的产生，如 2 型糖尿病患者血液中的高胰高血糖素 (hyperglucagonemia)，有效治疗糖尿病，而且可以有效的治疗肥胖症。

然而，由于 GLP-1 是由 30 或者 31 个氨基酸组成的多肽，通过口腔摄取则被消化道中的消化酶分解，因此不能吸收。通过静脉注射或者皮下注射施用 GLP-1 目前正在尝试。此外，已知 GLP-1 会被血液或者组织中的二肽肽酶 IV (dipeptidyl peptidase, DPPIV) 分解，其在活体内的半衰期短至 1 到 2 分钟，因此产生了它的临床应用上的障碍。

为了解决这些问题，已进行了一些研究和开发。试图开发例如 8 位上的氨基酸取代的衍生物，该衍生物由于不易降解而具有更长的半衰期 (Diabetologia 41: 271-278(1998)以及 Biochem 40: 2860-2869 (2001))，并且长效释放注射剂表现出长效的皮下吸收。同时开发了源于蜥蜴的合成 Exendin-4 的注射剂，其具有 GLP-1 样拮抗活性和长的血液半衰期 (Am J Physiol 281: E155-E161 (2001))。然而，作为糖尿病药物的 GLP-1，同时考虑到病人的负担和便利性，期望一种不同于注射的给药途径的广泛应用。

作为不使用侵入性方法，如注射剂或者口服制剂的给药方式，可以使用通过肺、口腔、鼻腔、阴道、眼、直肠等的粘膜吸收的剂型。Buta 肽如 GLP-1 在单独施用，其经粘膜的吸收很差。因此，如多肽的聚合物可以与其它吸收促进剂一起配制。为了保证化学制品的长效吸收，制剂使用水溶性或者水膨胀性粘合剂制备，并且形成可以粘附于皮肤表层的薄膜层含片 (buccal tablet)、药膏或片剂。多种吸收促进剂或者粘合剂已验证，并发现是便于化学制品经粘膜有效施用的。但是 Gutniak 等人 (“Diabetes Care” 20:1874-1879(1997)) 报导，含有 400 μ g 的 GLP-1 的 GLP-1 含片在人口腔粘膜的吸收速率，术语为生物利用率，即使是用上述最先进的技术，是其静脉注射剂吸收效率的 7%，是其皮下注射剂吸收效率的 47%，并且其吸收并不充分。

二肽肽酶 IV 是一种已知的降解 GLP-1 的酶，其分布广泛，不仅在肾脏、肝脏、小肠、唾液腺和各种相关组织中，还存在于体液中，如血液、尿液和唾液以及鼻腔的粘膜中，并且有可能在其它粘膜组织中也存在。

发明内容

经粘膜吸收 GLP-1，与注射剂的吸收相比，由于膜的渗透性低和吸收位点退化，被认为是无效的。可是通过鼻腔这样施用 GLP-1 并不能很大剂量地施用，达到足够的药理学效果。因此，从 GLP-1 肽的生产成本的角度来说，开发天然产生的 GLP-1 作为药理学制剂用于鼻腔施用是不现实的。对于 GLP-1 的临床应用，有必要开发 GLP-1 衍生物，其经粘膜的吸收率与注射剂的吸收率相当。因此，本发明者抢先研制了具有改善了经粘膜吸收率的新型 GLP-1 衍生物，并且做了开拓性研究来提供用于粘膜施用的制剂来取代注射剂。

结果本发明者得到了一个新的思路，GLP-1 经粘膜的吸收可以通过引入带正电荷的精氨酸或者赖氨酸来增加。另外，本发明者率先在其 C 末端引入了几个精氨酸和/赖氨酸残基，这是由于对于表达活性很重要的 N 末端必须保持完整，得到了以下所述的 GLP-1 衍生物。为了进一步增加通过粘膜的吸收效率，使用具有表面可调控带负电荷的电荷-调控的脂肪乳剂来设计 GLP-1 制剂，其具有显著改善的粘膜吸收。

即，本发明的 GLP-1 衍生物是包含一个或者几个氨基酸残基缺失、取代和/或者新增，并且具有 GLP-1 活性的 GLP-1(7-35)的氨基酸序列，在该肽的 C 末端，为 Waa-(Xaa) n -Yaa (其中 Waa 是精氨酸或者赖氨酸，Xaa 是精氨酸或者赖氨酸， n 是 0 到 14 的整数，并且 Yaa 是精氨酸、精氨酸-NH₂、赖氨酸、赖氨酸-NH₂ 或者高丝氨酸)。如上所述，新型的 GLP-1 衍生物表现出经粘膜的高吸收率，即通过粘膜的高生物利用效率，这可以通过在其 C 末端加入几个精氨酸和/或赖氨酸残基提供。

为了赋予其对于二肽酶 IV 的抗性，本发明的 GLP-1 衍生物 8 位的氨基酸优选是丝氨酸。这种肽通过以下通式表示：**【丝氨酸⁸】**-GLP-1 (7-35) -Waa- (Xaa) n -Yaa (其中 Waa 是精氨酸或赖氨酸，Xaa 是精氨酸或赖氨酸， n 是从 0 到 14 的整数，并且 Yaa 是精氨酸、精氨酸-NH₂、赖氨酸、赖氨酸-NH₂ 或者高丝氨酸)。

本发明的 GLP-1 衍生物可以通过用谷氨酰胺取代 26 位的赖氨酸，用天冬酰胺取代 34 位的赖氨酸而赋予了对于胰蛋白酶的抗性。这种肽通过以下通式表示：**【谷氨酰胺²⁶，天冬酰胺³⁴】**-GLP-1 (7-35) -Waa- (Xaa) n -Yaa (其中 Waa 是精氨酸或赖氨酸，Xaa 是精氨酸或赖氨酸，

n 是从 0 到 14 的整数，并且 Yaa 是精氨酸、精氨酸-NH₂、赖氨酸、赖氨酸-NH₂ 或者高丝氨酸)。

自然，这些二肽酶 IV 抗性或者胰蛋白酶抗性的 GLP-1 衍生物也可以在 GLP-1 (7-35) 的氨基酸序列中具有一个或者更多个氨基酸残基缺失、取代和/或者增加。

在本发明的 GLP-1 衍生物中，n 优选的是 1 到 9 的整数，更优选的是 3 到 5 的整数。

本发明的 GLP-1 衍生物中最优选的肽通过以下通式来表示：【丝氨酸⁸，谷酰胺²⁶，天冬酰胺³⁴】-GLP-1 (7-35) -(精氨酸)_n-Yaa (其中 n 是从 4 到 6 的整数，并且 Yaa 是精氨酸或者精氨酸-NH₂)。

GLP-1 衍生物的吸收率通过经鼻子给予小鼠发明的 GLP-1 衍生物来检测，随后在口服葡萄糖耐受性测试中，测定小鼠血液中葡萄糖降低的活性以及其胰岛素分泌的刺激活性。结果，GLP-1 衍生物表现出高血糖降低作用以及胰岛素分泌促进作用，并且相当于天然产生的 GLP-1 剂量的 1/10 量的本发明 GLP-1 衍生物表现出与天然产生的 GLP-1 相似的效应，因此，可以评估为其经由鼻腔粘膜的吸收是天然产生的 GLP-1 的 10 倍。

为了增加本发明 GLP-1 衍生物的吸收效率，使用 JP-A8-27018 中描述的电荷调控脂肪乳剂 (charge-regulated fat emulsion) 来制备制剂。即，本发明也提供了包括可调控为带负电荷的脂肪乳剂，和本发明 GLP-1 衍生物的 GLP-1 制剂。

电荷调控脂肪乳剂是一种可调控为带负电荷的脂肪乳剂，认为其可以吸收肽和蛋白来增强这种肽和蛋白对于酶的稳定性，同时也增加了其药理学效应并且延长了药效期 (duration)。本发明的 GLP-1 衍生物，一方面，具有加入的带正电荷的精氨酸或者赖氨酸残基，并且因此易于粘附于电荷调控脂肪乳剂。因此，推测当本发明 GLP-1 衍生物是通过使用电荷调控脂肪乳剂制备时，其粘膜吸收增加了。当 GLP-1 衍生物的吸收效率实际上通过在小鼠葡萄糖耐受性测试中，组合施用含有 GLP-1 衍生物的制剂与电荷调控脂肪乳剂，随后测定小鼠中血糖的下降活性，本发明的 GLP-1 衍生物的用量相当于天然产生 GLP-1 量的 1/30 就表现出了与天然 GLP-1 类似的效应。即，认为当电荷调控脂

肪乳剂与本发明的 GLP-1 衍生联合使用时，经鼻腔粘膜的吸收是天然产生的 GLP-1 的 30 倍。

如上所述，本发明 GLP-1 衍生物是制备具有经粘膜高吸收率制剂的最合适多肽，特别是经由鼻腔粘膜。本发明 GLP-1 衍生物，在 8 位被丝氨酸取代，对于血液和组织中存在的二肽酶 IV 不易降解，这样就得到了在活体中具有较长半寿期的 GLP-1 衍生物。通过上述的方法赋予胰蛋白酶抗性，GLP-1 衍生物可以避免在组织中的胰蛋白酶或者胰蛋白酶等的降解，这样就更进一步增加了生物利用率。

通过与电荷调控脂肪乳剂联合使用，本发明的 GLP-1 衍生物可以增加粘膜的吸收而表现出如注射剂所用的低剂量的效果。即，本发明显著增加了对于粘膜吸收型 GLP-1 制剂的临床应用性，其可以没有痛苦地易于施用于患者，来增加糖尿病患者和肥胖患者的生活质量。

具体实施方式

在下文中，对本发明进行详细说明 GLP-1 (7-35) 是具有以下序列的肽：

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 (SEQ ID NO:1)。其中[Ser⁸]是指在该序列 2 位的氨基酸，即，在 8 位的 Ala 被 Ser 取代，并且，[Ser⁸]与 8S 同义。更进一步，-NH₂是指在该处的序列是酰胺化的，并且本发明的 GLP-1 衍生物可以在其 C 末端采用酰胺化的形式或者是采用未酰胺化的形式。

本发明的 GLP-1 衍生物可以通过化学合成或者是遗传重组技术制备。

化学合成多肽的原理在本发明的技术领域是已知的。对于这一原理可以参考以下的常用的文本：Dugas H. and Penney C., “Bioorganic Chemistry”(1981) Springer-Verlag, New York, 第 54-92 页; Merrifield JM, Chem. Soc.,85:2149(1962); 以及 Stewart and Yong, “Solid Phase Peptide Synthesis”, 第 24-66 页, Freeman (San Francisco, 1969)。例如，可以使用 430A 肽合成仪(PE-Applied Biosystems Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404) 和 PE-Applied Biosystems 提供的合成循环，通

过固相方法合成本发明的肽。Boc 氨基酸和其它试剂可以从 PE-Applied Biosystems 或者其它化学试剂供应商处购得。

此后，将详细说明通过遗传重组技术制备本发明的肽。

GLP-1 的 DNA 可以通过合成或者修饰编码较大的天然产生的胰高血糖素的 DNA 得到。编码前胰高血糖素的 DNA 序列参见 Lund 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 345-349(1982)), 并且可改变这种天然产生的序列来制备本发明的化合物。构建合成基因的方法在本发明的技术领域内是已知的, 并且可以参考, 例如, Brown 等人: “Methods in Enzymology”, 68: 109-151, Academic Press, NY。编码本发明肽的 DNA 序列基于该肽的氨基酸序列设计, 并且具有该 DNA 序列的 DNA 能够通过常用的 DNA 合成仪来产生, 如型号 380A 或者 380B 的 DNA 合成仪 (PE-Applied Biosystems Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404)。

用于制备本发明的 GLP-1 衍生物的 DNA 可以设计为增加其表达水平并且在宿主中稳定积累产物, 设计为产生后便于纯化的, 或者设计为产生融合蛋白, 其中的 GLP-1 衍生物可以很容易地切出。例如, 这种技术的例子是前后串连多个编码本发明的 GLP-1 衍生物的基因的技术来增加其表达水平, 以及包括使该基因与如 β -半乳糖苷酶、 β -内酰胺酶、蛋白 A 或者蛋白 TrpE 的基因相连接, 得到作为融合蛋白的 GLP-1 衍生物。在这些情况下, GLP-1 衍生物可以通过之前在每个基因间插入对应于氨基酸甲硫氨酸的基因, 然后通过溴化氰处理产物而得到单独的肽。在这一情况下, 产物的 C 末端是 Hse (高丝氨酸)。一些本发明的 GLP-1 衍生物在 C 末端只有精氨酸, 并且可以用精氨酰内肽酶的酶法处理而得到 GLP-1 衍生物作为单一的肽。

为了有效地表达 GLP-1 衍生物肽, 具有预先确定序列的合成 DNA 通过合适的限制性内切酶插入到合适的重组 DNA 表达载体中。通常, 可以参照以下文献, Maniatis 等人, (“Molecular Cloning”, A Laboratory Manual, 1-3 卷(1989), Cold Springs Harbor Laboratory Press, NY)。为了达到充分转录合成基因, 该基因可操作地连接于启动子/操纵子区域。合成的基因的启动子/操纵子区域以与合成基因的起始密码子 ATG 的方向同向排列。各种可以转化原核细胞和真核细胞的表达载体是已知

的,可以参考“The Promega Biological Research Products and catalogue”和“The Stratagene Cloning Systems Catalogue”。

GLP-1 衍生肽表达载体构建以后,用该载体转化合适的宿主细胞。对于宿主细胞,既可以用真核也可以用原核细胞。转化细胞的技术在该领域是已知的,并且能够在常用的参考文献中找到,如以上的 Maniatis 等人的文献。一般而言,原核宿主细胞以较高的速率产生蛋白并且可以很容易地进行培养。在高水平的微生物表达系统中表达的蛋白质会特别地聚集形成含有高水平过量表达的蛋白质的颗粒或者包涵体。这种特定的聚集蛋白质可以通过该领域已知的技术溶解、变性并且再折叠。对于这样的技术,可以参考“Protein folding(蛋白质折叠)”, Kreuger 等人, (1990),第 136-142 页, ed. Gierasch and King, American Association for Advancement of Science Publication。

本发明的 GLP-1 衍生物可以与药理学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂或者吸收促进剂组合来制备药物组合物。吸收增强剂包括,例如,螯合剂(例如,EDTA、柠檬酸、水杨酸盐)、表面活性剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS)),非表面活性剂(例如,不饱和的环状脲)和胆汁酸盐(例如,去氧胆酸钠、牛磺胆酸钠)。这种药物组合物可以通过药学制造领域已知的方法制备。这些药理学制剂适于经鼻腔等粘膜的方式来施用,并且可以单独应用,或者与其它治疗试剂组合使用。本发明的 GLP-1 衍生物也可以形成不同于粘膜施用的注射剂、口服制剂等。

应用本发明的技术领域已知的方法,本发明的组合物可以制成一种制剂,其可连续施用或者给予患者后立即持续释放活性成分。例如,为了制备表现出可控制释放的制剂,适合的大分子(例如,聚酯、聚氨基酸、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯醋酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素和鱼精蛋白硫酸盐),或者聚合物,如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、聚(乳酸)或者乙基乙烯基乙酸共聚物,可以用于形成本发明肽的复合物或者用于吸收本发明的肽。代替这些聚合物颗粒与肽的混合,本发明的肽可以用通过凝聚的技术或者界面聚合产生的微胶囊包被,微胶囊包括羟甲基纤维素或者明胶,在胶体药物传送系统(colloidal drug delivery system)中(例如,脂质体、白蛋白、微球、微乳剂、纳米颗

粒和纳米胶囊) 或者在微乳化作用 (microemulsion) 中产生。

在本发明中, 通过将本发明的肽吸附在根据 JP-A8-27018 制备的电荷调控脂肪乳剂上, 产生本发明的肽经粘膜的吸收进一步增强的制剂。作为电荷调控子, 使用选自不同的酸性磷脂及其盐、不同的脂肪酸及其盐、胆汁酸以及其盐中的至少一种物质。酸性磷脂及其盐包括, 但不限于, 磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸及其盐。对于脂肪酸及其盐, 并没有特定的限制, 但是优选的是 C6 或者更多碳的脂肪酸及其盐。胆汁酸及其盐包括, 但不限于, 脱氢胆汁酸, 脱氧胆汁酸, 牛磺胆汁酸及其盐。通过选择电荷调控子并且确定电荷调控脂肪乳剂的浓度, 可以制备适合于施用位点的本发明的药学组合物。

本发明的 GFP-1 衍生物可以有效地对抗不同的疾病, 这些病症中的 GLP-1 制剂是有效的。即, 本发明的 GFP-1 衍生物可以用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病、胰岛素依赖型糖尿病、肥胖症和/或者食欲抑制症。

本发明 GFP-1 衍生物的剂量可以通过本领域普通技术人员依赖于具有各种疾病的不同患者来进行确定。总的来说, 尽管一次施用的 GFP-1 衍生物的量被认为是在 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 到 $1\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内, 优选的是 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 到 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。在饭前, 施用 GLP-1 衍生物每天一次到三次或者更多次。

在下文中, 参考实施例和测试实施例来对本发明进行更详细的说明。然而, 本发明并不限于这些实施例的范围。

制备实施例: 合成 GLP-1 衍生物

GLP-1 衍生物的合成用型号为 430A 的多肽合成仪 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) 通过固相合成进行, 产物用 HPLC 纯化, 合成产物通过质谱确定。大多数样品的纯度是 95% 或者更多, 并且这些样品用于体内或者体外的测试。

在下文中, 说明了合成的化合物。GLP-1 (7-36) 的序列是

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 (SEQ ID NO: 2) (即, GLP-1(7-36) 与 GLP-1(7-35)-Arg 相同)。例如,

GLP-1(7-36)+Arg-NH₂ 是包含天然产生的 G-GLP-1(7-36)的化合物, 其中, 一个酰胺化的精氨酸残基加到了 C 末端。此外, [Ser⁸]-GLP-1(7-35) 化合物 2 位的 Ala (对应于位置 8) 被丝氨酸取代, 并且最后的精氨酸 (对应于 36 位) 缺失。对比制备实施例 1: GLP-1(7-36)-NH₂ 是天然产生的 GLP-1

对比制备实施例 2: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-NH₂(SEQ ID NO:3), 其缩写为 8S-GLP-1

制备实施例 1: GLP-1(7-36)+Arg-NH₂(SEQ ID NO:4), 其缩写为 GLP-1+1R

制备实施例 2: GLP-1(7-36)+Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:5), 其缩写为 GLP-1+2R

制备实施例 3: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:6), 其缩写为 8S-GLP-1+2R

制备实施例 4: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:7), 其缩写为 8S-GLP-1+3R

制备实施例 5: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:8), 其缩写为 8S-GLP-1+4R

制备实施例 6: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:9), 其缩写为 8S-GLP-1+5R

制备实施例 7: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:10), 其缩写为 8S-GLP-1+6R

制备实施例 8: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:11), 其缩写为 8S-GLP-1+8R

制备实施例 9: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Arg-NH₂(SEQ ID NO:12), 其缩写为 8S, des36R-GLP-1+1KR

制备实施例 10: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Arg-NH₂(SEQ ID NO:13), 其缩写为 8S, des36R-GLP-1+2KR

制备实施例 11: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂(SEQ ID NO:14), 其缩写为 8S, des36R-GLP-1+3KR

制备实施例 12: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:15), 其缩写为 8S, des36R-GLP-1+5KR

制备实施例 13: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂(SEQ ID NO:16), 其缩写为 8S, des36R-GLP-1+7KR

制 备 实 施 例 14 :
[Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂(SEQ ID NO:17), 其缩写为 8S, des36R-GLP-1+10KR

制备实施例 15: [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Lys-Lys-NH₂(SEQ ID NO:18), 其缩写为 8S-GLP-1+2K

参考制备实施例 1: [Ser⁸,Gln²⁶,Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg(SEQ ID NO:19), 其缩写为 8S26Q34N-GLP-1

参考制备实施例 2: [Gln²⁶,Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-NH₂(SEQ ID NO:20), 其缩写为 26Q34N-GLP-1

除了这些制备实施例, 认为 GLP-1 衍生物, 如制备实施例 16[Ser⁸,Gln²⁶,Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:21) (其缩写为 8S26Q34N-GLP-1+4R); 制备实施例 17[Ser⁸,Gln²⁶,Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂(SEQ ID NO:22) (其缩写为 8S26Q34N-GLP-1+6R); 和制备实施例 18[Ser⁸,Gln²⁶,Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂(SEQ ID NO:23) (其缩写为 8S26Q34N,des36R-GLP-1+5KR) 是优选的。

至于制备实施例 1 到 15 和制备实施例 16 到 18, C 末端是酰胺化的 (-NH₂), 但这样的衍生物也可以是非酰胺化 (-OH) 的衍生物。例如, 在制备实施例 5 中的非酰胺化 (-OH) 的衍生物可以生产制备实施例 19 中的衍生物, 即, [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg(SEQ ID NO:24), (其缩写为 8S-GLP-1+4R)。C-末端可以是高丝氨酸。这样的肽可以用制备实施例 20 的衍生物来示范, 即, [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Hse(SEQ ID NO:25), (其缩写为 8S-GLP-1+3RHse)。

测试实施例 1: GLP-1 衍生物中环 AMP-产生活性

GLP-1 受体的表达载体依据已经发表的人 GLP-1 受体的 DNA 序列来构建(Graziano 等人, Biochem Biophys Res Com 196: 141-146(1993))。用载体转化中国仓鼠卵巢 CHO-K1 细胞得到表达人 GLP-1 受体的重组

CHO-K1 细胞。

表达人 GLP-1 受体的细胞以 1×10^4 细胞/ml/孔的密度置于 24 孔板中。3 天后, 细胞用于分析并且与每一个 GLP-1 衍生物在缓冲液 (PBS, 5.6mM 葡萄糖, 1mM 的异丁基甲基黄嘌呤, $20 \mu\text{M}$ 的 Ro20-1724, 0.5% 的 BSA, pH 7.4) 中, 37°C 下共同孵育 30 分钟。加入 $10 \mu\text{l}$ 的 5N 的盐酸来终止孵育。

不同的 GLP-1 衍生物与 GLP-1 受体反应在细胞中形成的环 AMP 产物, 可以通过使用 cAMP-Screen™ 系统 (Applied Biosystems) 进行酶联免疫分析来测定。不同的 GLP-1 衍生物产生环 AMP 的活性, 以与天然产生的 GLP-1 产生的 cAMP 活性 (=100%) 的相对活性的形式表示, 结果列于表 1。

表 1

在受体表达细胞中, 不同的 GLP-1 衍生物中环 AMP-产生活性, 以天然产生 GLP-1 为 100% 的相对活性形式表示

GLP-1 衍生物	GLP-1 衍生物的浓度 (M)		
	1×10^{-11}	1×10^{-10}	1×10^{-9}
GLP-1	100.0	100.0	100.0
GLP-1+1R	7.4	100.6	78.1
GLP-1+2R	72.3	91.9	112.4
8S-GLP-1	97.9	111.4	83.6
8S-GLP-1+2R	56.4	95.5	91.2
8S-GLP-1+3R	-17.0	75.6	101.9
8S-GLP-1+4R	34.0	64.7	105.5
8S-GLP-1+5R	54.3	48.6	75.6
8S-GLP-1+6R	64.9	81.1	80.6
8S-GLP-1+8R	74.5	87.4	95.9
8S,des36R-GLP-1+1KR	100.1	112.9	80.5
8S,des36R-GLP-1+2KR	36.2	88.9	81.6
8S,des36R-GLP-1+3KR	45.0	96.6	86.7
8S,des36R-GLP-1+5KR	7.9	55.3	63.4
8S,des36R-GLP-1+7KR	8.8	55.6	92.6
8S,des36R-GLP-1+10KR	7.5	20.8	55.4
8S-GLP-1+2K	53.2	103.8	88.8

结果, 任何 GLP-1 衍生物具有体外产生环 AMP 的活性。但是, 有一种倾向, 活性随着精氨酸或者赖氨酸残基数目的增加而减少。这一倾向对于赖氨酸特别明显。然而, 很可能是所增加的精氨酸或者赖氨酸残基会在经粘膜的吸收过程中被肽酶切去, 因此这一体外活性并

不能完全反应其在体内的活性，并且这一矛盾可能导致以下在体内进行的测试结果。

测试实施例 2：通过粘膜吸收的 GLP-1 衍生物降低的血糖活性以及刺激胰岛素分泌的活性

通过粘膜吸收的 GLP-1 衍生物的增加通过体内降低血糖的活性和刺激胰岛素分泌的活性的形式进行测定。即，通过小鼠鼻腔给予 GLP-1 衍生物，在口服葡萄糖忍受性测试（OGTT）中进行评估，其中测定小鼠葡萄糖耐受测试后血糖水平的变化。

GLP-1 衍生物溶解于蒸馏水中得到 1mM 的溶液，随后储存于-80℃。在测试的期间，溶液用生理盐水稀释到预期的浓度。

用乙醚对小鼠进行轻度麻醉。用微量加样器吸取 20 μ l 的 GLP-1 衍生物溶液，用枪头加入到每只小鼠的鼻腔中。GLP-1 衍生物溶液通过鼻腔的呼吸吸入到小鼠中。在鼻腔施用 GLP-1 衍生物 5 分钟以后，以 10ml/kg 的量通过探针口腔施用 5% 的葡萄糖溶液。

通过在测试前、施用葡萄糖 5、10 和 20 分钟后，在尾部切口处收集几个 μ l 的血液，用血糖水平测定仪器（Glutest Ace, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co.,Ltd.制造）来测定血液，进行血糖水平的测定。计算血液的浓度-时间曲线下方的面积（AUC 0-20 分钟），它是每个小鼠血液中葡萄糖水平从施用 GLP-1 衍生物前的增加。

血液中胰岛素水平的确定通过在施用葡萄糖 5 分钟后，用肝素处理过的玻璃毛细管从眼窝静脉丛中收集 75 μ l 的血液，然后对该血液进行离心，通过 EIA（Levis Mouse Insulin Kit, Shibayagi Co., Ltd., 制造）测定血浆中的胰岛素。

在给 GLP-1 衍生物的组中，血液中的葡萄糖水平和血液中的胰岛素水平以平均和标准偏差的形式列于表 2。

表 2

在 OGTT 测试中，对于施用 GLP-1 衍生物的血液葡萄糖水平和血液胰岛素水平

施用的样品	剂量(nmol/ 小鼠)	血液葡萄糖水平(血液浓 度-时间曲线下的面积 (AUC ₀₋₂₀ 分钟) (mg/dl 分钟)	血液中胰岛素水平(在施 用葡萄糖 5 分钟以后 (ng/mL)
生理盐水	0	712 ± 103	632 ± 107
天然产生的 GLP-1	1.07	697 ± 94	662 ± 91
天然产生的 GLP-1	10.7	399 ± 35	743 ± 147
8S-GLP-1	1.07	624 ± 89	1026 ± 199
8S-GLP-1	10.7	291 ± 66	1289 ± 165
8S-GLP-1+2R	1.07	535 ± 58	957 ± 86
8S-GLP-1+3R	1.07	509 ± 92	1359 ± 318
8S-GLP-1+4R	1.07	388 ± 54	1713 ± 430
8S-GLP-1+5R	1.07	483 ± 26	1504 ± 250
8S-GLP-1+6R	1.07	559 ± 27	1633 ± 449
8S-GLP-1-8R	1.07	487 ± 32	1882 ± 402
8S,des36R-GLP-1+1KR	1.07	611 ± 51	1349 ± 244
8S,des36R-GLP-1+2KR	1.07	564 ± 52	1243 ± 309
8S,des36R-GLP-1+3KR	1.07	557 ± 53	1176 ± 233
8S,des36R-GLP-1+5KR	1.07	404 ± 71	2229 ± 346
8S,des36R-GLP-1+7KR	1.07	457 ± 69	1604 ± 344
8S,des36R-GLP-1+10KR	1.07	492 ± 106	2379 ± 520
8S-GLP-1+2K	1.07	598 ± 63	862 ± 150

结果,发现 GLP-1 衍生物 8S-GLP-1+4R 和 8S,des36R-GLP-1+5KR 表现出最强的血液葡萄糖降低作用。具有精氨酸残基加入到 8S-GLP-1+4R 或更多的衍生物,或者具有赖氨酸残基加入到 8S、des36R-GLP-1+5KR 或更多的衍生物,表现出最强的刺激胰岛素分泌的活性。这些衍生物的量相对于天然产生的 GLP-1 的 1/10,就表现出与天然 GLP-1 相类似的效应,并这样认为这些 GLP-1 衍生物的吸收是天然产生 GLP-1 吸收的 10 倍。

测试实施例 3: 电荷-调控的脂肪乳剂对经粘膜吸收 GLP-1 衍生物的作用

用与测试实施例 2 相同的方式,测定口服葡萄糖耐受测试中 GLP-1 衍生物与电荷调控脂肪乳剂联合使用的降低血糖的活性以及刺激胰岛素分泌的活性。使用的电荷调控脂肪乳剂根据 JP-A-27018 制备;即,

用 2% (w/w) 磷脂酰甘油 (钠盐), 8% 的中性油和 90% 的 (w/w) 水得到终浓度为 8% 的电荷调控脂肪乳剂。

50 μ l 的 8% 的电荷调控脂肪乳剂与 3.56 μ l 的 1mM 的 8S-GLP-1+5R 溶液和 146.4 μ l 蒸馏水混合, 得到含有终浓度为 0.0178mM 的 8S-GLP-1+5R 的 2% 的电荷调控脂肪乳剂。对于用于对比的空白, 分别使用不含有 2% 电荷调控脂肪乳剂的 0.534mM 天然产生的 GLP-1 溶液 (其浓度是 8S-GLP-1+5R 的 30 倍高), 和不含有 2% 的电荷调控脂肪乳剂的 0.0178mM 的 8S-GLP-1+5R 溶液以及生理盐水。

小鼠用乙醚轻度麻醉, 用微量加样器吸取 20 μ l 的 GLP-1 衍生物, 用枪头加入到每只小鼠的鼻腔中。GLP-1 衍生物溶液通过鼻腔的呼吸吸入到小鼠中。在鼻腔施用 GLP-1 衍生物 5 分钟以后, 以 10ml/kg 的量通过探针口腔施用 5% 的葡萄糖溶液。

通过在测试前、施用葡萄糖 5、10 和 20 分钟后, 在尾部切口处收集几个 μ l 的血液, 用血糖水平测定仪器 (Glutest Ace, Sanwa Kagaku Kenkyusho Co.,Ltd.制造) 来测定血液, 进行血糖水平的测定。计算血液的浓度-时间曲线下方的面积 (AUC 0-20 分钟), 它是每个小鼠血液中葡萄糖水平从施用 GLP-1 衍生物前的增加。

血液胰岛素水平的确定通过在施用葡萄糖 10 分钟后, 用肝素预处理的玻璃毛细管从眼窝静脉丛中收集 75 μ l 的血液, 然后离心血液, 用 ETA (Levis Mouse Insulin Kit, Shibayagi Co.,Ltd.制造) 测定血浆中胰岛素的量。

在施用 GLP-1 衍生物的组的血液中葡萄糖水平和血液中胰岛素水平, 以平均和标准偏差的形式列于表 3 中。

表 3

GLP-1 衍生物与电荷调控脂肪乳剂组合施用进行的 OGTT 测试中
血糖水平和血液中的胰岛素水平

施药样本	剂量 (nmol/小鼠)	血糖水平(血液浓度-时间曲线下的面积 (AUC _{0-30 分钟}) (ng/dl min))	血液胰岛素水平(葡萄糖施用 10 分钟后) (ng/mL)
生理盐水	0	2122±198	251±12
天然产生的 GLP-1	10.7	1533±111	377±41
与电荷调控脂肪乳剂联合使用的 8S-GLP-1+5R	0.357	2025±176	506±34
8S-GLP-1+5R	0.357	1526±354	560±81

结果, 与电荷-调控脂肪乳剂联合使用的 8S-GLP-1+5R, 以相对于不含有电荷-调控脂肪乳剂的天然产生的 GLP-1 量的 1/30, 表现出与天然产生的 GLP-1 相似的血糖降低活性。即, 通过使用电荷调控脂肪乳剂, 8S-GLP-1+5R 的作用可以在较低的浓度水平下表现。

测试实施例 4: 评价 GLP-1 衍生物 8S26Q34N-GLP-1 的活性

在产生环 AMP 的 GLP-1 衍生物 8S26Q34N-GLP-1 在体外的活性测定按照测试实施例 1 中的方法进行。氨基酸取代后, 活性仍然保持良好 (表 4)

表 4

8S26Q34N-GLP-1 产生环 AMP 的活性

8S26Q34N-GLP-1 的浓度 (log M)	CAMP 的产生量 (pmol/10 ⁵ 细胞/30 分钟)
-12	0.6
-11	4.7
-10	24.2
-9	76.1
-8	79.2

当应用小鼠胰岛 (Langerhans islet) 检测在 16.7mM 的葡萄糖 (高血糖条件) 存在下刺激胰岛素分泌的活性 30 分钟, GLP-1 衍生物 S26Q34N-GLP-1 表现出比天然产生的 GLP-1 强的刺激胰岛素分泌的活性 (表 5)。

表 5

使用小鼠胰岛检测 16.7mM 的葡萄糖存在下 8S26Q34N-GLP-1 的刺激胰岛素分泌的活性

分析浓度 (log M)	胰岛素分泌的量 (ng/胰岛/30 分钟)	
	天然产生的 GLP-1	8S26Q34N-GLP-1
0	2.61	
-10	4.11	3.64
-9	5.11	6.61
-8	6.71	9.85

通过皮下施用 GLP-1 衍生物, 以及在施用 GLP-1 衍生物 5 分钟后以 0.5g/kg 葡萄糖的量通过尾部静脉给予小鼠, 检测小鼠降低的血糖活性。GLP-1 衍生物 8S26Q34N-GLP-1 表现出浓度-依赖的降低血液中的葡萄糖水平, 并且这一活性强于天然产生的 GLP-1 (表 6)

表 6

8S26Q34N-GLP-1 衍生物对于小鼠血液中的葡萄糖水平的活性

剂量 (μ g/kg)	在葡萄糖耐受 20 分钟后的血糖水平 (mg/dl)	
	天然产生的 GLP-1	8S26Q34N-GLP-1
0	123	
5	119	110
10	103	95
20	75	21

该测试结果表明参考制备实施例 1 的 GLP-1 衍生物保持了 GLP-1 活性。当同时参考表 1 的测试结果, 可以得出结论, 甚至加入到 GLP-1 衍生物的 C 末端的只有几个精氨酸残基和/或者/赖氨酸残基, GLP-1 活性仍然可以保持的结论。

测试实施例 5: 测定 GLP-1 衍生物 8S-GLP-1 对于二肽肽酶 IV (DPPIV) 的抗性

500pM 的 GLP-1 衍生物 8S-GLP-1 与 40 μ U/ μ l 二肽肽酶 IV 混合, 并且在 37°C 温育 60 分钟。随后, 样品用 2 倍体积过量的乙醇抽提, 离心并且用蒸发器蒸发干燥。得到的干燥产物溶解于含有 1% BSA 的蒸馏水中, 并且其环 cAMP 的产生活性根据测试实施例 1 测定, 来计算残余的活性 (%)。

结果, 不管其是否用二肽肽酶 IV 处理, 衍生物的活性没有变化, 这就说明了 GLP-1 衍生物对于二肽肽酶 IV 具有抗性。

因此, GLP-1 衍生物可以通过用丝氨酸取代 8 位, 获得对于二肽肽酶 IV 的抗性 (表 7)。

表 7

肽	残余活性 (%)	
	DPPIV	
	-	+
8S-GLP-1	100%	101%
天然产生的 GLP-1	100%	25%

测试实施例 6: GLP-1 衍生物 26Q34N-GLP-1 对于胰蛋白酶的抗性
参考制备实施例 2 中, pH 为 7.8 的 GLP-1 衍生物 26Q34N-GLP-1 溶解于 50mM 的碳酸铵 (pH7.8), 浓度为 500 μ g/ml。然后, 加入 5 μ l 的 500 μ g/ml 的胰蛋白酶(Promega Cat. No. V5113)至 100 μ l 溶液中, 然后混合物在 37°C 下温育 1 小时。反应通过加入 1200 μ l 的 71.5% (终浓度 65%) 的乙醇终止, 并且反应溶液在 4°C 下 15,000rpm 离心 5 分钟, 回收上清液, 随后进行真空干燥。干燥产物溶解于蒸馏水中, 并且通过测试实施例 1 的方法测定 cAMP 的活性, 来确定其残余活性 (%)。

结果, 不管是否用胰蛋白酶处理, 衍生物的活性没有区别, 这就表明, GLP-1 衍生物对于胰蛋白酶具有抗性 (表 8)。

表 8

肽	残余活性 (%)	
	胰蛋白酶	
	-	+
26Q34N-GLP-1	100%	94.8%

这一结果说明, GLP-1 衍生物通过分别用谷氨酸和天冬氨酸取代 26 位和 34 位的氨基酸而对胰蛋白酶具有抗性, 这样, 可以得出结论, 具有几个精氨酸和/或者赖氨酸残基加入到其 C-末端的 GLP-1 衍生物, 同时对胰蛋白酶具有抗性。

工业实用性

通过皮下注射临床应用 GLP-1 到目前还在改进。这是因为 GLP-1 是不能通过口服施用吸收的肽。本发明的产物解决了这一问题, 并且使得可以用非注射的方式施用。因为用 GLP-1 治疗糖尿病将持续很长一段时间, 无需重复注射的治疗对于病人是非常有优势的。

序列表

<110> 株式会社三和化学研究所
<120> GLP-1 衍生物及其经粘膜吸收的制剂
<130> CPJPL50444
<150> JP 2002-299283
<151> 2002-10-11
<160> 25
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> GLP1(7-35)

<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

20 25

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> GLP1(7-36)

<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
           20           25           30

```

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1

<400> 3

```

His Ser 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
           20           25           30

```

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GLP1+1R

<400> 4

```

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 Arg
           20           25           30

```

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GLP1+2R

<400> 5

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	Arg	Arg
			20					25					30		

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1+2R

<400> 6

His	Ser	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	Arg	Arg
			20					25					30		

<210> 7

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1+3R

<400> 7

His Ser 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 Arg Arg
 20 25 30

Arg

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1-4R

<400> 8

His Ser 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 Arg Arg
 20 25 30

Arg Arg

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1+5R

<400> 9

```

His Ser 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 Arg Arg
           20           25           30
Arg Arg Arg
           35

```

<210> 10

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1+6R

<400> 10

```

His Ser 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 Arg Arg
           20           25           30
Arg Arg Arg Arg
           35

```

<210> 11

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1-8R

<400> 11

His Ser 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 Arg Arg
 20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 35

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+1KR

<400> 12

His Ser 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 Lys Arg
 20 25 30

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+2KR

<400> 13

His Ser 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 Lys Lys Arg
 20 25 30

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+3KR

<400> 14

His Ser 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 Lys Lys Lys
 20 25 30

Arg

<210> 15

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+5KR

<400> 15

His Ser 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 Lys Lys Lys
 20 25 30

Lys Lys Arg

35

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+7KR

<400> 16

His	Ser	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	Lys	Lys	Lys
			20					25						30	

Lys Lys Lys Lys Arg

35

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+10KR

<400> 17

His	Ser	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	Lys	Lys	Lys
			20					25						30	

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Arg

35

40

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1+2K

<400> 18

His	Ser	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	Lys	Lys
			20					25					30		

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1

<400> 19

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Arg		
			20					25					30		

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 26Q34N-GLP1

<400> 20

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

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

<210> 21

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1+4R

<400> 21

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

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

Arg Arg

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1-6R

<400> 22

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

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

Arg Arg Arg Arg

35

<210> 23

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S26Q34N-des36R-GLP1-5KR

<400> 23

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Lys	Lys	Lys
			20					25					30		
Lys	Lys	Arg													
			35												

<210> 24

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1-4R

<400> 24

His	Ser	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	Arg	Arg
			20					25					30		
Arg	Arg														

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 8S-GLP1+3RHse

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa is Homoserine.

<400> 25

```
His Ser 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 Arg Arg
           20           25           30
Arg Xaa
```