

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/435

C12N 15/63 C12N 15/12

A61K 38/17 A61P 3/10

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01112856.9

[43] 公开日 2002 年 8 月 14 日

[11] 公开号 CN 1363559A

[22] 申请日 2001.5.10 [21] 申请号 01112856.9

[71] 申请人 上海华谊生物技术有限公司

地址 200233 上海市漕宝路 36 号

[72] 发明人 孙玉昆 伍登熙 朱志勇

余刚 沈春娟 赵少凌

魏云静

[74] 专利代理机构 上海华工专利事务所

代理人 应云平

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 促胰岛素分泌肽衍生物

[57] 摘要

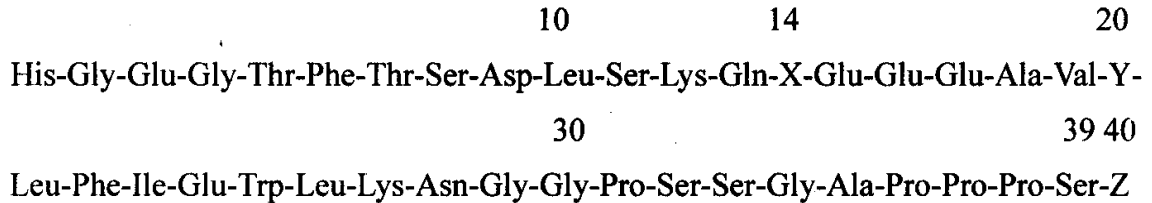
本发明涉及治疗 II 型糖尿病的促进胰岛素分泌的多肽化合物 Exendin-4 的衍生物和其适用于药用的盐,其结构如下: His - Gly - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Leu - Ser - Lys - Gln - X - Glu - Glu - Glu - Ala - Val - Y - Leu - Phe - Ile - Glu - Trp - Leu - Lys - Asn - Gly - Gly - Pro - Ser - Ser - Gly - Ala - Pro - Pro - Pro - Ser - Z。其中: X 是 Arg, Leu 或 Ile, Y 是 His, Arg 或 Lys, Z 是 Arg - OH, - OH, - NH₂ 或 Lys - OH。它们可以用化学合成方法制备,尤其易于用重组 DNA 方法制备,为商业化生产提供了可能。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1、一种如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物及其适用于药用的盐，



其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

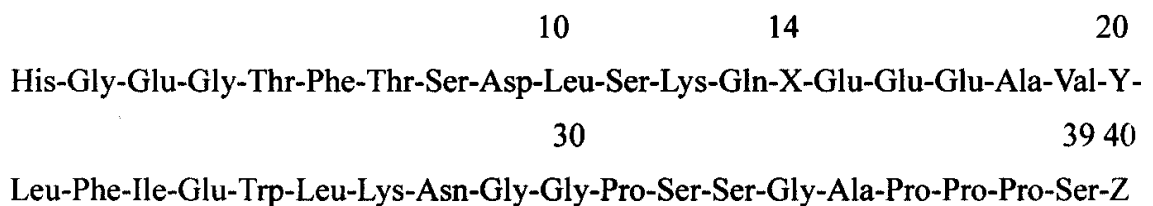
Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH。

2、根据权利要求 1 所述的促胰岛素分泌肽衍生物及其适用于药用的盐，其特征在于：所述促胰岛素分泌肽衍生物的结构式中 X 为 Arg, Y 为 Lys, Z 为 -OH。

3、根据权利要求 1 所述的促胰岛素分泌肽衍生物及其适用于药用的盐，其特征在于：所述促胰岛素分泌肽衍生物结构式中的 X 为 Leu, Y 为 Lys, Z 为 Arg-OH。

4、一种如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物的制备方法，



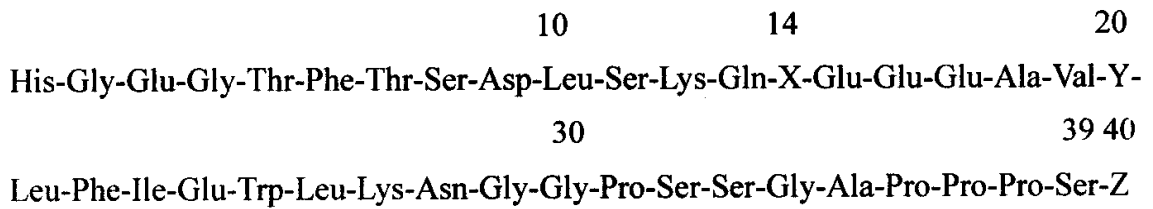
其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH。

所述方法为固相化学合成法，其步骤包括：以 HMP 树脂为固相载体，氨基酸的 α-氨基用 9-芴基甲氧羰基 (Fmoc) 基团保护，用多肽合成仪按促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列进行合成，再经分离纯化，冻干即得产品。

5、一种如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物的制备方法，



其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

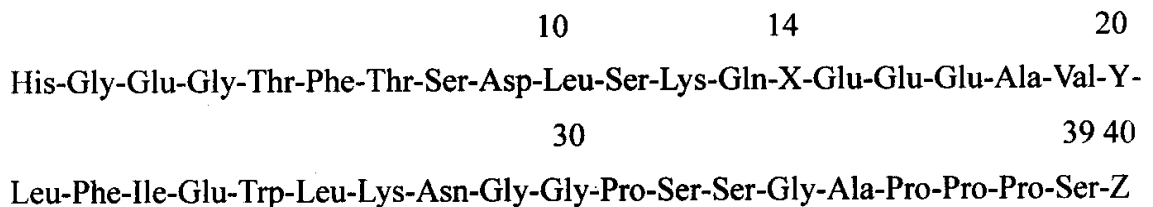
Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH。

所述方法为基因工程制备法，其步骤包括：

- a、按促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段；
- b、基因片段经连接，质粒构建，受菌体的培养，转化，克隆得到菌株；
- c、菌株经发酵，破壁，抽提得到包涵体；
- d、包涵体裂解、分离得粗品，经高效液相层析仪 HPLC 纯化，最后经冻干得产品。

6、一种如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物和其适用于药用的盐用作治疗 II 型糖尿病的药物，



其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH。

该药物中含有上述促胰岛素分泌肽衍生物及其适于药用的盐，或其组合物。

说明书

促胰岛素分泌肽衍生物

本发明涉及治疗 II 型糖尿病的活性多肽化合物，具体地说涉及促胰岛素分泌肽化合物 Exendin-4 的衍生物。

早期在对肠激研究时发现，同等数量的葡萄糖，口服比注射产生更多的胰岛素，究其原因，科研人员发现原来是肠道激素（Incretins）起的作用。肠道激素是一组多肽化合物，1985 年人们了解了在肠道激素中有强力肠抑胃肽 GIP（gastric inhibitory peptide）和胰高血糖素类多肽 GLP-1（glucagon-like peptide）。GLP-1 又有二种，一种为 GLP-1（7-36）-NH₂，由 30 个氨基酸残基组成，另一种为 GLP-1（7-37），由 31 个氨基酸残基组成，二者有相同的促胰岛素分泌作用。在对离体胰岛细胞（ $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-11}$ mol/L）作用时，GLP-1 促进了胰岛素的分泌。DNA 及氨基酸序列分析发现，这些促胰岛素分泌肽是由胰高血糖素原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。GLP-1 的特点是能促进胰岛 β -细胞合成胰岛素原信使 RNA 和胰岛素原，进而促进胰岛素的释放。GLP-1 对胰岛 β -细胞的作用依赖葡萄糖浓度，当血糖浓度高于 6mmol/L 时，其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。近年的临床实验也证明，GLP-1 对 II 型糖尿病患者有促进胰岛素分泌和降低血糖浓度的作用。

GLP-1(7-36)-NH₂ 的化学结构如下：

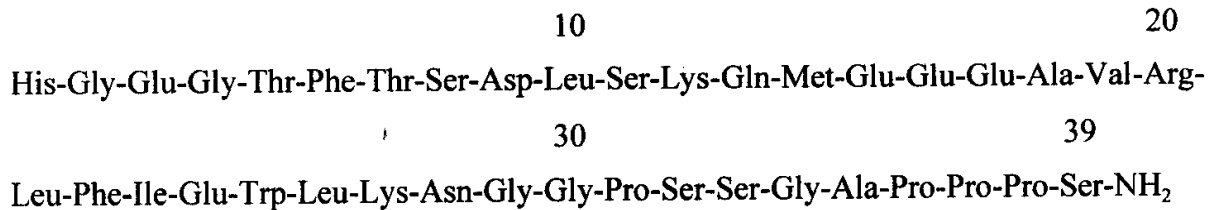
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂

式中英文缩写表示：

His 组氨酸，Ala 丙氨酸，Glu 谷氨酸，Gly 甘氨酸，Thr 苏氨酸，Phe 苯丙氨酸，Ser 丝氨酸，Asp 天冬氨酸，Val 缬氨酸，Tyr 酪氨酸，Leu 亮氨酸，Gln 谷氨酰胺，Lys 赖氨酸，Ile 异亮氨酸，Arg 精氨酸

世界专利申请 WO 91/11457 号公开了用于治疗 II 型糖尿病的一类胰高血糖素类多肽 GLP-I (7-34)、(7-35)、(7-36) 和 (7-37) 的类似物。

1996 年 Jean-Pierre Ranfman 在《Regulatory Peptides》杂志上向人们介绍了一种从墨西哥巨蜥蜴 beaded lizard(Heloderma horridum) 的毒液中发现分离得到的含 39 个氨基酸的多肽化合物 Exendin-4, 其 C 末端为酰胺, 化学结构如下:



式中英文缩写表示:

Met 甲硫氨酸, Asn 天冬酰胺, Pro 脯氨酸

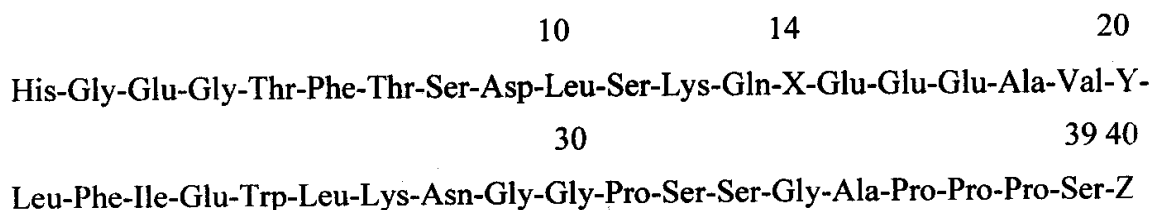
Exendin-4 在氨基酸序列上与 GLP-1 有 53% 的同源性, 并且可与 GLP-1 的受体相结合, 亦有促进胰岛素分泌的作用, 因此也是一种促胰岛素分泌肽。

美国专利 USP 05424286 公开了 Exendin-4 与 GLP-1 促进胰岛素分泌作用的对比实验, 实验证明其促进胰岛素的分泌作用比 GLP-1 强, 产生促胰岛素分泌作用所需浓度比 GLP-1 低, 而且在体内的半衰期比 GLP-1 长。鉴于这些特点, Exendin-4 可能成为一种较为理想的治疗 II 型糖尿病的药物。

Exendin-4 可采用化学合成方法, 例如用多肽合成仪来制备, 但用此种方法制备, 产品成本高, 导致售价高, 无法使其成为一个商业化药品, 为此人们试图采用基因工程方法来大规模低成本生产以达到商业化目的。

本发明目的在于提供一类多肽化合物 Exendin-4 的衍生物, 它们具有促进胰岛素分泌的生物活性和降低血糖的作用, 可用于治疗 II 型糖尿病。它们不仅可以用化学合成方法制备, 还易于用重组 DNA 方法制备, 从而为降低生产成本提供了可能。

本发明的内容涉及一种如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物和其适用于药用的盐,



其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

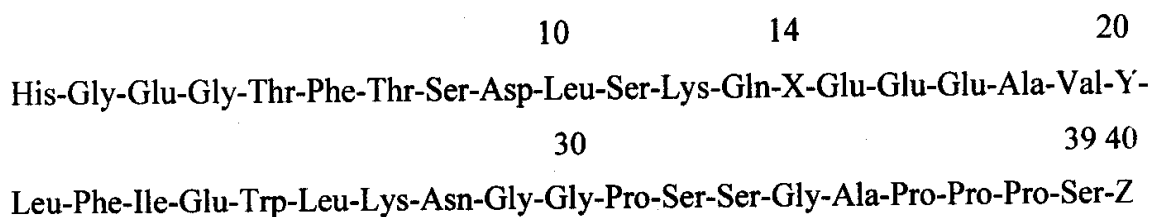
Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH.

本发明中所述的促胰岛素分泌肽衍生物结构式中的 X 为 Arg, Y 为 Lys, Z 为 -OH.

本发明中所述的促胰岛素分泌肽衍生物结构式中的 X 为 Leu, Y 为 Lys, Z 为 Arg-OH.

本发明中所述如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物的制备方法,



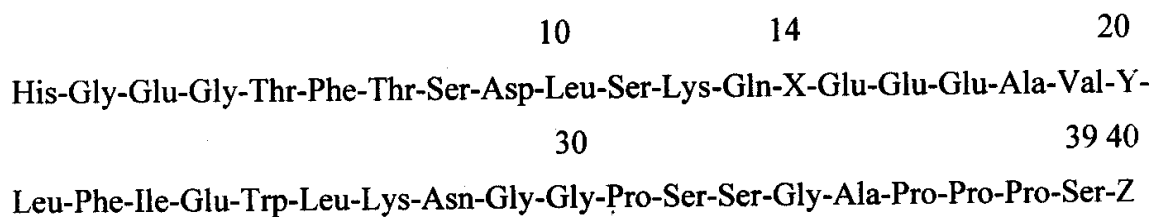
其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH.

此制备方法为固相化学合成法, 其步骤包括: 以 HMP 树脂为固相载体, 氨基酸的 α -氨基用 9-芴基甲氧羰基 (Fmoc) 基团保护, 用多肽合成仪按促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列进行合成, 再经分离纯化, 冻干即得产品.

本发明中所述如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物的制备方法,



其中：X 是 Arg, Leu 或 Ile,

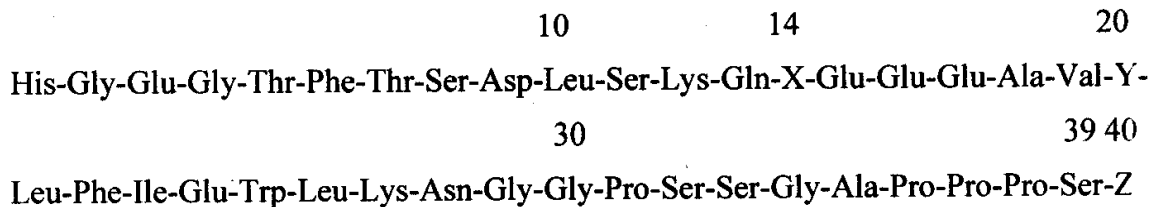
Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH。

此制备方法为基因工程制备法, 其步骤包括:

- 按促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列合成基因片段;
- 基因片段经连接, 质粒构建, 受菌体的培养, 转化, 克隆得到菌株;
- 菌株经发酵, 破壁, 抽提得到包涵体;
- 包涵体裂解、分离得粗品, 经高效液相层析仪 HPLC 纯化, 最后经冻干得产品。

本发明中所述如下结构的促胰岛素分泌肽衍生物和其适用于药用的盐用作治疗 II 型糖尿病的药物。



其中: X 是 Arg, Leu 或 Ile,

Y 是 His, Arg 或 Lys,

Z 是 Arg-OH, -OH, -NH₂ 或 Lys-OH。

该药物中含有上述促胰岛素分泌肽衍生物及其适于药用的盐, 或其组合物。

本发明提供了一类新的多肽化合物 Exendin-4 的衍生物, 扩大了多肽化合物 Exendin-4 衍生物的种类, 它们具有促进胰岛素分泌的生物活性和降血糖作用, 可用于治疗 II 型糖尿病。它们不仅可以用化学合成方法制备, 还易于用重组 DNA 方法制备, 从而为降低生产成本提供了可能。药效实验证明, 在非肥胖型糖尿病小鼠 (NOD 小鼠) 腹腔内注射含 0.1 μg 本发明的促胰岛素分泌肽衍生物, 有明显的促进胰岛素分泌和降血糖作用。

现结合附图和实施例对本发明的内容作进一步的说明。

附图 1 是本发明促胰岛素分泌肽衍生物的药效实验图。

附图 2 是实施例 1 所得产品的质谱图, 该衍生物分子量理论值为 4300.6,

实测值为 4316.7。

下面实施例是对本发明的进一步阐述，而不是对本发明的限制。

实施例 1: 固相化学合成法制备本发明结构的蛙皮抗菌促胰岛素分泌肽衍生物，其中 X 为 Arg, Y 为 Lys, Z 为 -OH。

(1) 所采用的氨基酸单体:

Fmoc-L-Ala-OH	Fmoc-L-Lys (Boc) -OH
Fmoc-L-Asn (Trt) -OH	Fmoc-L-Met-OH
Fmoc-L-Asp (OtBu) -OH	Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Gln (Trt) -OH	Fmoc-L-Pro-OH
Fmoc-L-Glu (OtBu) -OH	Fmoc-L-Ser (tBu) -OH
Fmoc-L-Gly-OH	Fmoc-L-Thr (tBu) -OH
Fmoc-L-His (Trt) -OH	Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Ile-OH	Fmoc-L-Tyr (tBu) -OH
Fmoc-L-Leu-OH	Fmoc-L-Val-OH

上式中缩写表示:

Fmoc: 9-芴基甲氧羰基

BOC: 叔丁氧羰基 (tert-butyloxycarbonyl)

Trt: 三苯甲基 (trityl)

OtBu: 叔丁基酯

tBu: 叔丁基 (tert-butyl)

(2) 合成所采用的仪器设备及试剂:

仪器为: Applied Biosystem 多肽合成仪, 433A 型, 美国

试剂有: N-甲基吡咯烷酮, 二氯甲烷, 六氢吡啶, 甲醇, 二甲氨基吡啶 (Dimethylaminopyridine) / DMF, N,N-二异丙基乙胺 (N,N-diisopropylethylamine) / NMP, HBTU 100 mmole / 0.5 M HOBT in DMF, N,N-二环己基碳二亚胺 (N,N-Dicyclohexylcarbodiimide) / NMP

其中：DMF 为 N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide)

NMP 为 N-甲基吡咯烷酮 (N-methylpyrrolidone)

HOBt 为 1-羟基苯并三唑 (1-Hydroxybenzotriazole)

HBTU 为 2-(1-氢-苯并三唑基)-四甲基脲六氟磷酸盐 (2-(1H-benzotriazole-yl-1,1,3,3-tetramethyl-Uronium hexafluorophosphate)

(3) 操作:

a、 合成

以 0.25mmol 规模为例，称取 HMP 树脂 0.25g，置入多肽合成仪上的反应器中，将各种带保护基氨基酸称取 1mmol 装瓶，按该促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列从 C-端向 N-端排列在合成仪中，于 25℃ 室温条件下，由计算机程序控制自动进行脱 Fmoc 保护、活化、连结，然后再进行下一轮循环，如此完成合成。合成结束后，将得到的带侧链保护基的多肽树脂在多肽合成仪上吹干后称重即可。

b、 脱保护基及切断树脂:

将带保护基的该促胰岛素分泌肽衍生物多肽树脂置于具塞三角烧瓶，加入裂解试剂如下表:

试剂	用量
水	0.50 ml
苯甲醚	0.50 ml
苯酚	0.75 g
巯基乙醇	0.20 ml
三氟乙酸	10.0 ml

然后在恒温 30℃ 条件下，电磁搅拌反应 6 小时；过滤、收集滤液，树脂用少量三氟乙酸洗涤；合并收集液与洗涤液，加入乙醚产生沉淀，过滤，沉淀用少量乙醚洗涤后放入干燥器中干燥，得到粗品。

c、 HPLC 分离纯化、冻干

将得到的粗品用制备型 HPLC 进行分离、提纯，最后经冷冻干燥后得到产

品。经色质联用检测,该衍生物分子量理论值为 4300.6,实测值为 4316.7。

实施例 2: 基因工程法制备本发明的促胰岛素分泌肽衍生物,其中 X 为 Leu, Y 为 Lys, Z 为 Arg-OH。

A、按此促胰岛素分泌肽衍生物的氨基酸序列,合成基因片段:

- (1) 5' AAT TCC ATG CAC GGC GAA GGC ACC TTC ACC AGC GAT CTG AGC AAA CAG CTG GAA GAA GAA GCG GTT AA
- (2) 5' ACTG TTC ATC GAA TGG CTG AAA AAC GGC GGC CCG AGC AGC GGC GCG CCG CCG CCG AGC CGT TAG A
- (3) 5' AGCTT CTA ACG GCT CGG CGG CGG CGC GCC GCT GCT CGG GCC GCC GTT TTT CAG CCA TTC GAT GA
- (4) 5' ACAG TTT AAC CGC TTC TTC TTC CAG CTG TTT GCT CAG ATC GCT GGT GAA GGT GCC TTC GCC GTG CAT GG

B、克隆

连接: 取二支试管,一支加入光密度值为 0.1 (A_{260nm}) 的片段(1)和片段(4),另一支试管中加入光密度值为 (A_{260nm}) 的片段(2)和片段(3),再将聚核苷酸激酶缓冲液 (Polynucleotide Kinase Buffer), 聚核苷酸激酶

(Polynucleotide Kinase) 及三磷酸腺苷 (ATP) 分别加入该二支试管中,于 37°C 保温 60 分钟,使基因片段 5'-端磷酸化。然后,将二支试管转移至 95 °C 水浴中保温 10 分钟,停止加温,自然冷却退火降至室温。再将 T4 连接酶缓冲液和 T4 连接酶分别加入该二支试管中,16°C 左右保温。过夜,使基因片段连接。

质粒: 另取一支试管将含有乳糖启动子 Lac (或温控启动子 P_L , 色氨酸-乳糖混合启动子 Tac) 的质粒用限制性内切酶 EcoR I 和 HindIII 双酶酶切后用酚/氯仿抽提,离心取水层部分,再用氯仿将水层洗涤 3 次,离心,将水层用异丙醇沉淀,离心,干燥。

将上述酶切质粒与连接后的基因片段混合,加 T4 连接酶缓冲液 和 T4 连接酶,室温连接 3-4 小时。

受体菌的培养：克隆菌大肠杆菌（E. Coli）JM103 于每升含蛋白胨 10g、酵母抽提粉 5g、氯化钠 5g 的培养液（LB 培养液）中 37℃ 振荡培养 4 小时，离心收集菌体，经 CaCl_2 溶液处理后，4℃ 保存备用。

转化：将克隆的质粒转化至受体菌大肠杆菌 JM103 细胞中，冰浴维持 30 分钟，升温至 42℃，维持 2 分钟后，转移至含氨苄青霉素的琼脂糖平板，37℃ 过夜，进行集落筛选，得克隆阳性质粒。

C、发酵

将筛选的含该种衍生物质粒的寄主菌菌株于 LB 培养液中振荡培养，加 0.5mM 异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）诱导，过夜后，离心收集菌体，以十二烷基磺酸钠=12% 的丙烯酰胺凝胶（PAGE）电泳，鉴定表达的蛋白。

D、包涵体

按上述条件，300ml × 10 瓶，摇床培养，诱导，收集的菌体加裂解液（1% NaCl，磷酸缓冲液 pH7.5，20mM）及溶菌酶，30℃ 保温 30 分钟，离心收集沉淀，加 6M 盐酸胍（Gu · HCl）抽提包涵体，离心，将上清液透析，除去 Gu · HCl，再用组成为 1% NaCl，0.1% 吐温 80（Tween 80）的磷酸缓冲液（20mM，pH7.5）洗涤沉淀三次，即得包涵体。

E、裂解

将包涵体溶于 8M 尿素溶液中，加盐酸至 50mM，加溴化氰，避光，氮气保护条件下搅拌，裂解 2 小时，以 HPLC 跟踪分析。

F、纯化

裂解完成，通过琼脂糖凝胶分子筛 G-25 分离得粗品，再经 HPLC 纯化，得产品，与化学合成品相同，质谱分析结果表明所得衍生物分子量与理论值相吻合。

实施例 3：药效实验

实验动物：非肥胖型糖尿病小鼠（NOD小鼠），体重 $17\text{g} \pm 2\text{g}$ ，禁食 2 小时

对照组 1：腹腔注射胰岛素 $2\ \mu\text{g}$

对照组 2：腹腔注射胰岛素 $4\ \mu\text{g}$

实验组：腹腔注射含 $0.1\ \mu\text{g}$ 实例一所得促胰岛素分泌肽衍生物

不同时间采集的血样，使用卫生部上海生物制品所出品的血糖测定试剂盒进行测定。实验结果如附图。此实验表明本发明所得促胰岛素分泌肽衍生物的降血糖作用十分明显。

说明书附图

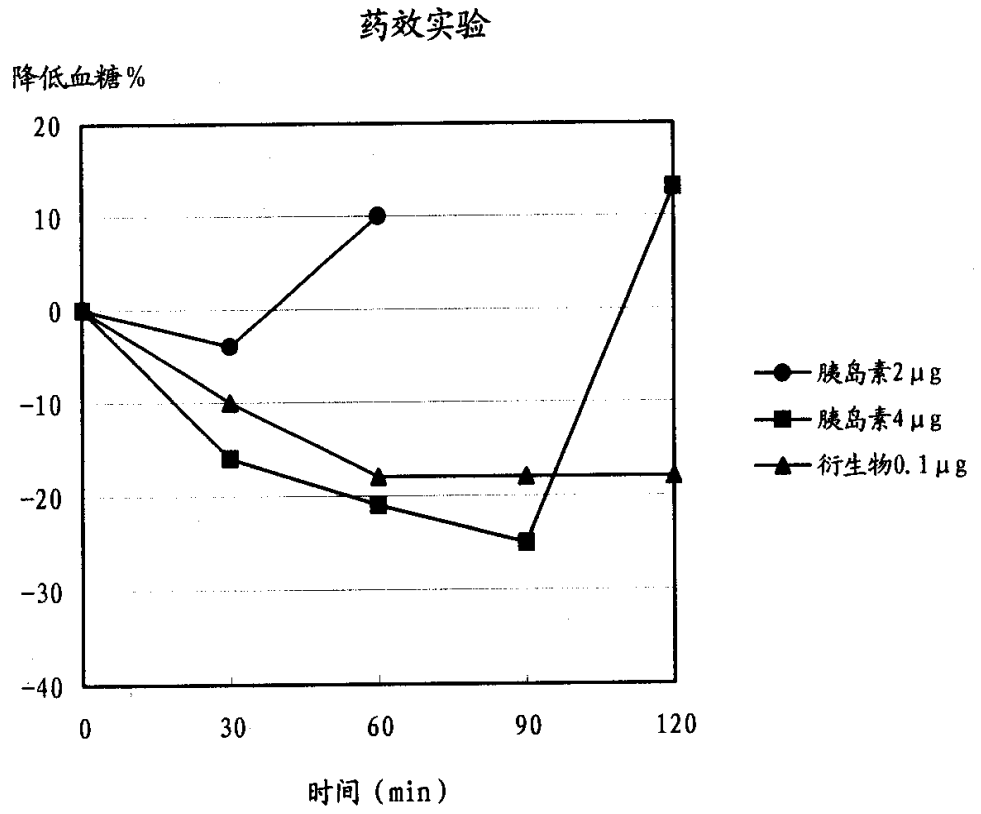


图 1

