

一种口服递送的多肽衍生物

技术领域

本申请涉及生物学或生物制药技术领域，更具体地涉及一种可以用于口服递送的多肽或其衍生物，用于多肽或其衍生物口服递送的组合物，及其用于治疗 and/或预防代谢相关的疾病。

背景技术

多肽/蛋白质不仅作为组成细胞的重要成分是生物体中必不可少的基本单元，同时，因其作为细胞或组织间信号传递的重要参与者在维持生命体正常的生理活动中发挥着重要作用。自 21 世纪初牛胰岛素和猪胰岛素首次用于糖尿病的治疗以来，随着现代分子生物学、有机化学等领域技术的不断发展，越来越多的多肽/蛋白被生产和应用在人类医药领域。相比于其他类型的药物，多肽/蛋白类药物以其对靶点的高特异性和良好的安全性、耐受性，在包括癌症、糖尿病、心脑血管病、自身免疫病、代谢类疾病等的治疗中显现出突出的优势。然而，由于人体对多肽/蛋白的吸收机制限制，绝大部分具有治疗活动的多肽/蛋白类药物通过口服的方式不具有良好的生物利用度，而需要以注射等方式用于疾病的治疗，限制了多肽/蛋白类药物的发展，同时，给患者的治疗带来了额外的痛苦和不便。

为了解决多肽的口服问题，人们尝试了多种办法增加多肽类药物的口服效果，例如 Fiona McCartney 等(Journal of Controlled Release, Volume 310, 28 September 2019, Pages 115-126)公开了一种非离子型表面活性赋形剂 Labrasol® ALF (Labrasol®)可用于增强胰岛素在肠道内的利用度；P. Uhl 等(Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Volume 24, February 2020, 102132)用富含精氨酸的环细胞穿透肽包覆 PLA 纳米颗粒使利拉鲁肽口服给药成为可能；Vivek Gupta 等(Journal of Controlled Release, Volume 172, Issue 3, 28 December 2013, Pages 753-762)公开了通过压缩含有卡波姆、果胶和羧甲基纤维素钠(1:1:2)的聚合物基质来制备粘膜粘附装置，并证明了其在体内对鲑鱼降钙素(sCT)的递送的提高效果。

然而，到目前为止，多肽类药物依旧存在口服效果差，生物利用度偏低，相应的口服给药方案对于多肽分子的递送效果难以预测，通用性差等

问题。

发明内容

因此，本申请提供了一种活性及稳定性更高，口服效果更好、生物利用率更优的多肽衍生物，其能够有效治疗和/或预防代谢相关的疾病，具体的，本申请采用如下技术方案，

1. 一种含脂肪酸侧链在提高多肽衍生物活性选择性方面的用途，多肽衍生物由含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得，其中所述含脂肪酸侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；

$Z2$ 选自 γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , Inp , Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；

$Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

2. 一种含脂肪酸侧链在提高多肽衍生物活性方面用途，多肽衍生物由含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得，其中所述含脂肪酸侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；

$Z2$ 选自 γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , Inp , Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；

$Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

3. 一种含脂肪酸侧链在多肽衍生物口服利用度提高方面的用途，多肽衍生物由含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得，其中所述含脂肪酸侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；

$Z2$ 选自 γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , Inp , Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；

$Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

4. 一种提高多肽衍生物活性选择性的方法，所述方法包括通过含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得多肽衍生物，其中所述含脂肪酸的侧链形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；

$Z2$ 选自 γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , Inp , Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；

$Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

5. 一种提高多肽衍生物活性的方法，所述方法包括通过含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得多肽衍生物，其中，所述含脂肪酸的侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；

$Z2$ 选自 γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , Inp , Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；

$Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

6. 一种提高多肽衍生物口服利用度的方法，所述方法包括通过含脂肪

酸侧链修饰多肽分子获得多肽衍生物，其中，所述含脂肪酸的侧链的形式为 Z1+Z2+Z3，其中，Z1 为 C16-C22 脂肪二酸；

Z2 选自 γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, Inp, Trx 中的任一种或 Z2 不存在；
Z3 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

7. 根据项 1-3 任一项所述的用途或项 4-6 所述的方法，其中，所述 Z1 为 C16、C17、C18、C19 或 C20 脂肪二酸。

8. 根据项 1-7 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z2 选自 γ Glu, β Asp, γ Glu, Inp, Trx 中的任一种，优选选自 β Asp 或 γ Glu。

9. 根据项 1-8 任一项所述的用途或方法，其中，所述 n 大于 0，优选 1-10，更优选 2-8，进一步优选 $n=2$ 。

10. 根据项 1-9 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z1 为 C16、C18 或 C20 脂肪二酸。

11. 根据项 1-10 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z2 为 Inp 或 Trx；所述 n 大于 0。

12. 根据项 1-11 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z1 为 C16、C17、C18、C19 或 C20 脂肪二酸；所述 Z2 为 γ Glu；所述 $n=2$ 。13. 根据项 1-12 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z1、Z2、Z3 之间依次通过酰胺键连接。

14. 根据项 1-13 任一项所述的用途或方法，其中，所述侧链修饰在多肽的 1-10 个氨基酸上，优选为 1-3 个氨基酸上，优选为 1 个氨基酸上。

15. 根据项 1-14 任一项所述的用途或方法，其中，所述侧链修饰在所述多肽序列的 N 末端、或者任意中间位置的氨基酸；所述氨基酸优选自谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺或天冬酰胺，进一步优选选自赖氨酸。

16. 根据项 1-15 任一项所述的用途或方法，其中所述多肽为天然多肽或人工合成多肽分子，可以是激动剂或拮抗剂；优选地，选自：GLP-1 受体激动剂、GIP 受体拮抗剂、胰岛素受体激动剂、肝素受体激动剂、生长激素、干扰素受体激动剂、白介素受体激动剂、促卵泡激素受体激动剂、促性腺激素受体激动剂、促红细胞生成素受体激动剂、PYY(酪酪肽)受体激动剂、氧合调节素受体激动剂、GLP-2（胰高血糖素样肽-2）受体激动剂、降钙素受体激动剂、PTH（甲状旁腺激素）受体激动剂、胃饥饿素（ghrelin）受体激动剂、内源性大麻素受体激动剂，瘦素（Leptin）受体激动剂，血清

素受体激动剂，成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 受体激动剂，胆囊收缩素 (CCK) 受体激动剂，胃酸调节素受体激动剂或胰高血糖素受体激动剂；优选是胰淀素受体激动剂；进一步优选地，是胰淀素类似物或降钙素类似物。

17. 根据项 1-16 任一项所述的用途或方法，其中，所述多肽包含如下氨基酸序列：

ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNT-PH₂。

优选地，所述多肽衍生物选自：N1 或 N2 或 M1-M30 中的任意一个或多个。或

优选地，所述多肽衍生物选自：N1、N2、N3 或 M1-M30 中的任意一个或多个。

18. 根据项 1 或项 7-17 所述的用途或根据项 4 或项 7-17 所述的方法，其中，所述提高多肽衍生物活性选择性为，相比于提高多肽衍生物对降钙素受体的活性，更倾向于选择提高多肽衍生物对胰淀素受体的活性。优选地，生物活性选择性指提高多肽衍生物对胰淀素受体与对降钙素受体的活性的比值；进一步优选地，还包括多肽衍生物对胰淀素受体的活性也提高。

19. 根据项 1 或项 7-18 所述的用途或根据项 4 或项 7-18 所述的方法，其中，所述提高多肽衍生物活性选择性为，提高胰淀素受体与对降钙素受体的细胞活性比的倍数大于 1.5 倍，优选地，所述倍数大于 2 倍；进一步优选地，所述倍数大于 5 倍；更优选地所述倍数大于 10 倍。

20. 根据项 18 或 19 所述用途或方法，其中所述活性是指激动活性。

21. 根据项 1 或项 7-20 所述的用途或根据项 4 或项 7-20 所述的方法，其中，所述多肽衍生物为胰淀素受体激动剂；优选地，所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素衍生物；更优选地，所述多肽衍生物包含氨基酸序列：ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH₂ 或更优选地，所述多肽衍生物包含氨基酸序列：KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂。

22. 根据项 2 或项 7-17 所述的用途或根据项 5 或项 7-17 所述的方法，其中，所述多肽衍生物活性为其在减重和/或减少食物摄入方面的活性。

23. 根据项 2 或项 7-17 所述的用途或根据项 5 或项 7-17 所述的方法, 其中, 所述提高多肽衍生物活性为提高多肽衍生物对胰淀素受体和降钙素受体的细胞活性。

24. 根据项 2 或项 7-17 或项 22-23 所述的用途或根据项 5 或项 7-17 或项 22-23 所述的方法, 其中, 所述多肽衍生物为胰淀素受体激动剂; 优选地, 所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素衍生物; 更优选地, 所述多肽衍生物包含如下氨基酸序列:

KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂, 或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH₂。

25. 根据项 3 或项 7-17 所述的用途或根据项 6 或项 7-17 所述的方法, 其中, 含脂肪酸侧链在多肽衍生物通过与一种或多种口服递送剂共同施用; 优选地, 所述口服递送剂为 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸(NAC)盐; 更优选为 PNAC。

26. 根据项 3 或项 7-17 所述的用途或根据项 6 或项 7-17 所述的方法, 其中, 所述提高多肽衍生物口服利用度为比 Cagrilintide 多肽分子的口服利用度高。

27. 根据项 3 或项 7-17 所述的用途或根据项 6 或项 7-17 所述的方法, 其中, 所述多肽衍生物为胰淀素受体激动剂; 优选地, 所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素衍生物; 更优选地, 所述多肽衍生物包含如下氨基酸序列:

KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂, 或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH₂。

28. 一种多肽衍生物, 所述多肽衍生物包含多肽和与多肽连接的侧链, 所述侧链形式为 Z1+Z2+Z3, 其中, Z1 为 C16-C22 脂肪二酸;

Z2 选自 γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, Inp, Trx 中的任一种或 Z2 不存在; Z3 为 n 个 AEEA, 其中 $n \geq 0$ 。

29. 根据项 28 所述的衍生物, 其中, 所述 Z1 为 C16、C17、C18、C19 或 C20 脂肪二酸。

30. 根据项 28 或 29 所述的衍生物, 其中, 所述 Z2 选自 γ Glu, Inp, Trx 中的任一种或 Z2 不存在。

31. 根据项 28-30 中任一项所述的衍生物, 其中, 所述 n 大于 0。

32. 根据项 28-31 中任一项所述的衍生物, 其中, 所述 Z2 为 Inp 或 Trx;

所述 n 大于 0。

33. 根据项 28-32 中任一项所述的衍生物，其中，所述 Z2 不存在；所述 n 大于 0。

34. 根据项 28-33 中任一项所述的衍生物，其中，所述 Z2 为 γ Glu；所述 n=2。

35. 根据项 28-34 中任一项所述的衍生物，其中，所述多肽为胰淀素受体激动剂；优选地，所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素类生物；更优选地，所述多肽包含如下氨基酸序列：

ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH₂ 或
KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂ 或
KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH₂,

优先地，所述多肽衍生物选自：N1 或 N2 或 M1-M30 中的任意一个或多个。或

优先地，所述多肽衍生物选自：N1、N2、N3 或 M1-M30 中的任意一个或多个。

36. 一种药物组合物，其包括项 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料，优选地，所述组合物包括一种或多种口服递送剂；更优选地，所述口服递送剂为 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸(NAC)盐；进一步优选为 PNAC。

37. 项 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或项 36 所述组合物在制备多肽类药物中的用途；优选地，所述多肽类药物用于预防和/或治疗超重、肥胖症和/或 I 型或 II 型糖尿病和/或骨质疏松症和/或神经性疼痛。

38. 根据项 37 所述用途，其中多肽类药物是口服药物；优选地，所述口服药物包括一种或多种口服递送剂；更优选地，所述口服递送剂为 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸(NAC)盐；进一步优选为 PNAC。

39. 项 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或项 36 所述的药物组合物在减少食物摄入方面的用途。

40. 一种预防和/或治疗超重、肥胖症和/或 I 型或 II 型糖尿病和/或骨质疏松症和/或神经性疼痛的方法，包括给药受试者预防或治疗有效量的项 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或项 36 所述的药物组

合物。

41. 一种减少食物摄入的方法，包括给药受试者有效量的项 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或项 36 所述的药物组合物。

发明效果

本申请的多肽衍生物细胞活性较高，对胰淀素受体和降钙素受体的活力或效力较高，且性状稳定、浓度和纯度在长时间放置的情况下变化很小。

本申请的多肽衍生物在减重和减少食物摄入方面具有突出的效果，作为口服药物，效果更好，生物利用率更高。

附图说明

附图用于更好地理解本申请，不构成对本申请的不当限定。其中：

图 1 为各多肽衍生物对大鼠体重变化产生影响的趋势图；

图 2 为各多肽衍生物大鼠累积食物摄取量产生影响的趋势图；

图 3 为部分多肽衍生物对大鼠体重变化产生影响的趋势图；

图 4 为部分多肽衍生物大鼠累积食物摄取量产生影响的趋势图；

图 5 为 D1、N2 多肽衍生物在血浆中药物的含量；

图 6 为部分多肽衍生物口服片剂在血浆中药物的含量。

具体实施方式

以下对本申请的示范性实施例做出说明，其中包括本申请实施例的各种细节以助于理解，应当将它们认为仅仅是示范性的。因此，本领域普通技术人员应当认识到，可以对这里描述的实施例做出各种改变和修改，而不会背离本申请的范围和精神。同样，除非另外定义，为了清楚和简明，以下的描述中省略了对公知功能和结构的描述，本说明书中有关技术的和科学的术语与本领域内的技术人员所通常理解的意思相同。

术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且是指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可为直链或支链，其可包含天然氨基酸，并且其可间杂有非天然氨基酸。

术语“N 端”指在由多个氨基酸通过肽键形成线性多肽时，如果未经进一步修饰，该多肽两端的氨基酸会分别存在一个未成键的自由 α 氨基 ($-\text{NH}_2$) 和自由 α 羧基 ($-\text{COOH}$)，含有未成键的自由 α - NH_2 的一端即为所述多肽的 N 端或氨基末端。修饰位点位于 N 端或对 N 端进行修饰，表示对多肽的 N 端的氨基酸进行修饰。

本文所述“衍生物”是指生物大分子（如多肽、蛋白）的功能基团（如氨基酸残基）被某些化合物或分子修饰后所得到的产物。所述修饰包括但不限于酰基化、酰胺化、酯化、硫酸酯化。

在本文中，多肽或多肽衍生物的“活性选择性”是指多肽或多肽衍生物相对于其作用的一种受体而言，对于其作用的另一受体具有更强的作用效果，在本申请的一些实施方式中，所述效果是指激动活性。

在本申请的一些实施方式中，所述活性选择性可以进一步表示相比于提高多肽衍生物对降钙素受体的活性，更倾向于选择提高多肽衍生物对胰淀素受体的活性。优选地，生物活性选择性指提高多肽衍生物对胰淀素受体与对降钙素受体的活性的比值。

在本文中，药物组合物可指用于疾病的治疗，也可用于细胞的体外培养实验。用于疾病的治疗时，术语药物组合物通常是指单位剂量形式，并且可以通过制药领域中熟知的方法的任何一种进行制备。所有的方法包括使活性成分与构成一种或多种附属成分的辅料相结合的步骤。通常，通过均匀并充分地使活性化合物与液体辅料、细碎固体辅料或这两者相结合，制备组合物。

在本文中，“药学上可接受的”是指物质或组合物必须与包含制剂的其它成分和/或用其治疗的哺乳动物化学上和/或毒理学上相容。

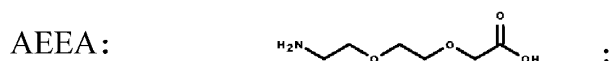
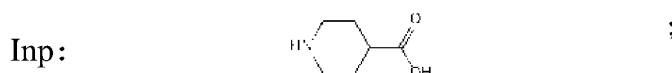
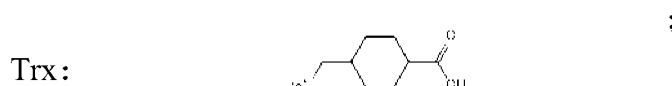
在本文中，术语“药学上可接受的辅料”均可包括任何溶剂、固体赋形剂、稀释剂或其他液体赋形剂等等，适合于特有的目标剂型。除了任何常规的辅料与本申请的化合物不相容的范围，例如所产生的任何不良的生物效应或与药学上可接受的组合物的任何其他组分以有害的方式产生的相互作用，它们的用途也是本申请所考虑的范围。

在本文中，“治疗”是指用于指获得期望的药理学和/或生理学效果。所述效果就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的，和/或就部分或完全治愈疾病和/或疾病导致的不良作用而言可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖哺乳动物、特别是人的疾病，包括：(a)在容易患病但是尚未确诊得病的个体中预防疾病或病症发生；(b)抑制疾病，例如阻滞疾病发展；或(c)缓解疾病，例如减轻与疾病相关的症状。本文使用的“治疗”涵盖将药物或化合物给予个体以治疗、治愈、缓解、改善、减轻或抑制个体的疾病的任何用药，包括但不限于将含本文所述化合物的药物给予有需要的个体。

在本文中,“预防”是指降低疾病、病症、疾患或相关症状(例如癌症)发作(或复发)的可能性。

缩写

本申请实施例中所用的一些缩写词对应名称或结构形式如下:



AA: Amino Acid, 氨基酸; Boc: t-Butyloxy carbonyl, 叔丁氧羰基; DCM: dichloromethane, 二氯甲烷; DMF: N,N-Dimethyl formamide, 二甲基甲酰胺; DIEA: N,N-Diisopropylethylamine, N,N-二异丙基乙胺; EDT: 1,2-Ethanedithiol, 乙二硫醇; Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, 9-芴基甲氧羰基; OtBu: 叔丁基酯基; Pbf: 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl chloride, 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基; Pip: Piperidine, 哌啶; TBTU: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N-tetramethyluronium Tetrafluoroborate, O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯; tBu: tertiary butyl, 叔丁基; TFA: Trifluoroacetic acid, 三氟乙酸; TIS: Triisopropylsilane, 三异丙基硅烷; Trt: Triphenylmethyl, 三苯基甲基; α Glu: α 谷氨酸; γ Glu: γ 谷氨酸; α Asp: α 天冬氨酸; β Asp: β 天冬氨酸;

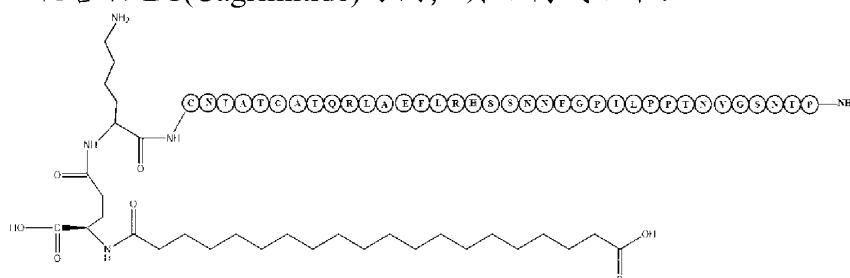
实施例

实施例 1 多肽衍生物的制备方法

本申请制备的多肽衍生物如表 2 所示。

采用固相有机合成法, 利用 Fmoc-保护氨基酸策略, SPPS 固相合成技术, 完成合成, 裂解, 氧化, 纯化既得表 2 中的目标产物。

以化合物 D1(Cagrilintide)为例, 其结构式如下:



合成过程如下：

1.1 固相合成

用 Fmoc-Linker MBHA Resin S=0.32mmol/g，采用 Fmoc/tBu 工艺，按所述肽序列，以表 1 方法从 C 端向 N 端(从右到左)依次缩合氨基酸连接：

表 1 合成程序列表

序号	溶剂	次数	时间 (min/次)
1	20%Pip/DMF	1	10
2	20%Pip/DMF	1	5
3	DMF	5	1
4	取样显色检测		
5	AA/DIEA/TBTU	1	60
6	DMF	4	1
7	取样显色检测		
程序说明	重复 1-7 至直线肽合成结束		

依次偶联下列氨基酸：

A-01Fmoc-Pro-OH,A-02Fmoc-Thr(tBu)-OH,A-03Fmoc-Asn(Trt)-OH,A-04Fmoc-Ser(tBu)-OH,A-05Fmoc-Gly-OH,A-06Fmoc-Val-OH,A-07Fmoc-Asn(Trt)-OH,A-08Fmoc-Thr(tBu)-OH,A-09Fmoc-Pro-OH,A-10Fmoc-Pro-OH,A-11Fmoc-Leu-OH,A-12Fmoc-Ile-OH,A-13Fmoc-Pro-OH,A-14Fmoc-Gly-OH,A-15Fmoc-Phe-OH,A-16Fmoc-Asn(Trt)-OH,A-17Fmoc-Asn(Trt)-OH,A-18Fmoc-Ser(tBu)-OH,A-19Fmoc-Ser(tBu)-OH,A-20Fmoc-His(Trt)-OH,A-21Fmoc-Arg(Pbf)-OH,A-22Fmoc-Leu-OH,A-23Fmoc-Phe-OH,A-24Fmoc-Glu(OtBu)-OH,A-25Fmoc-Ala-OH,A-26Fmoc-Leu-OH,A-27Fmoc-Arg(Pbf)-OH,A-28Fmoc-Gln(Trt)-OH,A-29Fmoc-Thr(tBu)-OH,A-30Fmoc-Ala-OH,A-31Fmoc-Cys(Trt)-OH,A-32Fmoc-Thr(tBu)-OH,A-33Fmoc-Ala-OH,A-34Fmoc-Thr(tBu)-OH,A-35Fmoc-Asn(Trt)-OH,A-36Fmoc-Cys(Trt)-OH,A-37Fmoc-Lys(Boc)-OH,A-38Fmoc-Glu-otbu,A-39C20 diacid;

最后形成此多肽衍生物树脂。

将多肽衍生物树脂洗涤转移出干燥至恒重,待裂解。

1.2 裂解

按 1g 多肽衍生物树脂使用 10mL±2mL 裂解试剂计算用量。裂解时依次将所需裂解试剂 H₂O，TFA，EDT，TIS 于裂解反应瓶，比例为 TFA:H₂O:EDT:TIS =95:1:2:2，裂解试剂温度控制在 0~10℃；裂解试剂在搅拌下加入树脂中，待体系温度稳定后；再温控在 25~30℃搅拌反应 2.5 小

时。将裂解液滤出，采用 5 倍液体积量的冰乙醚将其沉淀，滤出沉淀物并采用 3 倍液体积量的冰乙醚洗涤 3 次后，室温减压干燥，得固体粗品。

1.3 氧化

将粗品研细，准备纯化水，在搅拌下缓慢加入研细粗品，同时滴加乙腈水溶液，待粗品加完并溶解完全后，加入碘甲醇溶液搅拌半小时。

1.4 纯化冻干

将上述氧化后液体，用 0.45μm 的微孔滤膜过滤；粗品纯化采用 C-18 柱填料制备柱，在常温下用合适梯度进行分离纯化，收集目标产物，分析检测，归类。纯度要求≥90%，将不合格目标物收集，用合适梯度再次对其进行分离纯化，收集合格液体峰。将上述合格的液体样品减压冷冻干燥，得到粉末状精制多肽衍生物冻干粉。

本申请制备的多肽衍生物如表 2 所示，可以通过使用本实施例类似方法制备，区别在于固相合成中使用的氨基酸序列不同或/和脂肪酸侧链不同。

表 2 多肽及其衍生物氨基酸序列及修饰情况

编号	序列号	氨基酸序列	修饰位点	脂肪酸
D1	SEQ ID NO.1	KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + γGlu
D2	SEQ ID NO.5	CSNLS TCVLG KLSQE LHKLQ TYPRT NTGSG TP-NH ₂	无	无
N1	SEQ ID NO.2	KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH ₂	N 末端	C20 diacid +2*AEEA
N2	SEQ ID NO.2	KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH ₂	N 末端	C20 diacid +βAsp +2*AEEA
N3	SEQ ID NO.2	KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH ₂	N 末端	C18 diacid +βAsp +2*AEEA
M1	SEQ ID NO.1	KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH ₂	N 末端	C18 diacid +γGlu
M2	SEQ ID NO.1	KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH ₂	N 末端	C20 diacid +2*AEEA+γGlu
M3	SEQ ID NO.1	KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH ₂	N 末端	C18 diacid +2*AEEA+γGlu
M5	SEQ ID NO.3	ASQLS TAVLG RLSQE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	无	无
M6	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + γGlu
M7	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C22 diacid + γGlu
M8	SEQ ID	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT	N 末	C18 diacid + γGlu

	NO.4	DVGSG SP-NH ₂	端	
M9	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C16 diacid + γ Glu
M10	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + α Glu
M11	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + α Glu
M12	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + β Asp
M13	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + α Asp
M14	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + Trx
M15	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + Trx
M16	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + Inp
M17	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + Inp
M18	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + γ Glu+2AEEA
M19	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + γ Glu+4AEEA
M20	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + γ Glu+6AEEA
M21	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + γ Glu+8AEEA
M22	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + γ Glu+2AEEA
M23	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + α Glu+2AEEA
M24	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + α Glu+2AEEA
M25	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + β Asp+2AEEA
M26	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + α Asp+2AEEA
M27	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + Trx+2AEEA
M28	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + Trx+2AEEA
M29	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C20 diacid + Inp+2AEEA
M30	SEQ ID NO.4	ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH ₂	N 末端	C18 diacid + Inp+2AEEA

N1-N3 或 M1-M30 表示用表 2 中对应含脂肪酸的侧链修饰 SEQ ID No.1-SEQ ID No.5 所示氨基酸后得到的衍生物(如无脂肪酸修饰,则为多肽)。所述含脂肪酸的侧链形式为 Z1+Z2+Z3,其中,Z1 为 C16-C22 脂肪二酸;Z2 选自 γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, Inp, Trx 中的任一种或 Z2 不存在;Z3 为 0-8 个 AEEA,例如可以为 0、1、2、3、4、5、6 个;所述 Z1、Z2、Z3 之间依次通过酰胺键连接,C16-C22 脂肪二酸部分相对于氨基酸序列位于用于修饰的含脂肪酸侧链的外侧,处于侧链与氨基酸序列连接的远端。例如,M1 表示含脂肪酸的侧链“C18 diacid+ γ Glu”修饰 SEQ ID No.1 所示氨基酸后得到的衍生物,其中,侧链的 γ Glu 端与氨基酸通过肽键连接,C18 脂肪二酸端处于侧链与氨基酸序列连接的远端。

实施例 2 多肽衍生物体外活性检测

本实验目的在于采用荧光素酶测定法在体外检测本申请中多肽衍生物对胰淀素受体和降钙素受体的效力。

2.1. 胰淀素受体激动性检测

使用标准方法构建胰淀素受体/CRE-luc 细胞系。用含有多拷贝 cAMP 应答元件(CRE)驱动的荧光素酶表达框的质粒转染 CHO-K1/Ga15/AMY3 细胞(降钙素受体与受体激活修饰性肽 RAMP 已构建完成,购自金斯瑞),在含有吉欧霉素(Zeocin)200ug/mL,嘌呤霉素(2ug/mL)、潮霉素(100ug/mL)和 G418(400ug/mL)的 F12 培养基中培养,以获得具有稳定转染的胰淀素受体/CRE-luc 细胞系。

胰淀素荧光素酶测定中,将按照实施例 1 所述方法所得冻干粉用 pH7.0 的 20 mM 磷酸缓冲液溶解,并用生长培养基(含 10%FBS 的 F12 培养基)稀释获得初始浓度 10nM 的衍生物样品,然后用生长培养基梯度稀释衍生物样品,以获得 10nM 到 2nM-0.4nM 之间浓度依次相差 5 倍的 7 个浓度的样品,在白色 96 孔板中每孔中加入相应浓度的样品测定液 50 μ L。

将稳定转染胰淀素/CRE-luc 的 CHO 细胞以一定密度重悬于生长培养基中,在已加入样品测定液的白色 96 孔板中以约 20000 个细胞/孔的密度加入 50 μ L 细胞重悬液,在 37°C 和 5% CO₂ 条件下孵育 24 小时后每孔加入 Luciferase 底物 100 μ L,孵育 3 分钟,最后在 SpectraMax L(Molecular Devices)上以 SoftMax Pro 7.0.3 GxP 软件测定发光情况,并通过荧光值绘制

标准曲线，计算 EC50。

采取上述相同方法对化合物 N2 和 N3 样品进行测定，区别在于样品测定液与 CHO 细胞的是在“37℃和 5% CO₂ 孵育 4 小时后每孔加入 Luciferase 底物 100 μL”条件下完成的。

结果如表 3 所示。

表 3 胰淀素受体细胞活性结果

编号	EC50/nM	编号	EC50/nM
D1	0.036	M21	0.044
M5	0.033	M22	0.015
M6	0.017	M23	0.017
M7	0.022	M24	0.007
M8	0.016	M25	0.017
M9	0.002	M26	0.008
M10	0.069	M27	0.004
M11	0.016	M28	0.002
M12	0.017	M29	0.006
M13	0.016	M30	0.001
M14	0.456	N1	0.016
M15	0.119	N2	0.04
M16	0.082	/	/
M17	0.063	/	/

编号	EC50/nM	编号	EC50/nM
N2	0.009	N3	0.001

从表 3 中的数据可以看出，本申请中多肽衍生物细胞活性较高，对胰淀素受体均具有良好的激动活性。

2.2 降钙素受体激动性

2.2.1 构建降钙素受体/CRE-luc 细胞系

使用标准方法，用含有多拷贝 cAMP 应答元件（CRE）驱动的荧光素酶表达框的质粒转染 CHO-K1/CALCR/Gα15 细胞（降钙素受体已构建完成，购自金斯瑞），在含有吉欧霉素（Zeocin）200ug/mL，嘌呤霉素（2ug/mL）、潮霉素（100ug/mL）的 F12 培养基中培养，以获得具有稳定转染的降钙素受体/CRE-luc 细胞系。

2.2.2 降钙素荧光素酶测定

将 1 所得冻干粉用 pH7.0 的 20 mM 磷酸缓冲液溶解，并用生长培养基（含 10%FBS 的 F12 培养基）稀释获得初始浓度 10nM 的衍生物样品，然后用生长培养基梯度稀释衍生物样品，以获得 10nM 到 2nM-0.4nM 之间浓

度依次相差 5 倍的 7 个浓度的样品，在白色 96 孔板中每孔中加入相应浓度的样品测定液 50 μ L。

将稳定转染降钙素/CRE-luc 的 CHO 细胞以一定密度重悬于生长培养基中，在已加入样品测定液的白色 96 孔板中以约 20000 个细胞/孔的密度加入 50 μ L 细胞重悬液，在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下孵育 24 小时后每孔加入 Luciferase 底物 100 μ L，孵育 3 分钟，最后在 SpectraMax L（Molecular Devices）上以 SoftMax Pro 7.0.3 GxP 软件测定发光情况，并通过荧光值绘制标准曲线，计算 EC50。结果如下表所示。

表 4 降钙素受体细胞活性结果

编号	EC50/nM	编号	EC50/nM	编号	EC50/nM
D1	0.086	M12	0.073	M18	0.069
M6	0.028	M13	0.085	M25	0.138
M7	0.194	M14	0.587	M24	0.081
M8	0.165	M15	0.469	M26	0.024
M9	0.120	M16	0.376		
M11	0.071	M17	0.259		

从表 4 中的数据可以看出，本申请中多肽衍生物细胞活性较高，对降钙素受体具有激动活性。

本申请中部分多肽衍生物的胰淀素受体(hAMY3R)和降钙素受体(hCTR)的细胞活性数据综合分析如表 5 所示，令人意外的是，以 D1 分子对 hAMY3R 和 hCTR 细胞活性为基准，相比于本申请的多肽衍生物含有的脂肪酸的侧链形式为 Z1+Z2（即脂肪二酸+氨基酸的形式），当含有的脂肪酸的侧链形式为 Z1+Z2+Z3（即脂肪二酸+氨基酸+AEEA 的形式）时，分子对胰淀素受体和降钙素受体的细胞活性能力发生明显差异，相比于 hCTR 的激活能力，体现出了更高的 hAMY3R 的活性/相对活性，尤其是当 Z2 为 Trx 或者 Inp 时，细胞活性提升的更加突出；如，相比于以 C18 diacid + Inp 修饰 SEQ ID NO.4 的 M17,以 C18 diacid + Inp +2AEEA 修饰 SEQ ID NO.4 的 M30，胰淀素受体激动活性提高了近 70 倍，且相对于降钙素受体的激动活性，胰淀素受体活性也从原来的 1.7 倍差距提升至约 42.5 倍，表现出了更高的胰淀素受体激动倾向。

同样的，在含有的脂肪酸的侧链形式为 Z1+Z2+Z3（即脂肪二酸+氨基酸+AEEA 的形式）修饰的另一组氨基酸序列（SEQ ID NO.2）的衍生物 N3 中，也表现出了对胰淀素受体的高激动活性。

表 5 胰淀素受体和降钙素受体的细胞活性数据

编号	脂肪酸	hAMY3R EC50/nM	hCTR EC50/nM	hAMY3R 活 性提高倍数	hCTR 活 性提高倍数
D1	C20 diacid + γ Glu	0.036	0.086	1.000	1.000
M6	C20 diacid + γ Glu	0.017	0.028	2.118	3.071
M18	C20 diacid + γ Glu+2AEEA	0.016	0.069	2.25	1.246
M12	C20 diacid + β Asp	0.017	0.073	2.118	1.178
M25	C20 diacid + β Asp+2AEEA	0.017	0.138	2.118	0.623
M14	C20 diacid + Trx	0.456	0.587	0.079	0.147
M27	C20 diacid + Trx+2AEEA	0.004	0.533	9.000	0.161
M16	C20 diacid + Inp	0.082	0.376	0.439	0.229
M29	C20 diacid + Inp+2AEEA	0.006	0.156	6.000	0.551
M11	C18 diacid + α Glu	0.016	0.071	2.250	1.211
M24	C18 diacid + α Glu+2AEEA	0.007	0.081	5.143	1.061
M15	C18 diacid + Trx	0.119	0.469	0.303	0.183
M28	C18 diacid + Trx+2AEEA	0.002	0.089	18.000	0.966
M17	C18 diacid + Inp	0.063	0.259	0.571	0.332
M30	C18 diacid + Inp+2AEEA	0.001	0.101	36.000	0.848

实施例 3 多肽衍生物稳定性研究

3.1 材料和设备

稳定性试验箱(BINDER GmbH)、十万分之一天平(梅特勒-托利多)、pH 计(梅特勒-托利多)、生物安全柜(ESCO)、T2G-II小型电动压盖机(长沙中亚制药设备有限公司)、高速冷冻离心机(Eppendorf)、灭菌柜(新华医疗)、Agilent 1260 高效液相色谱仪、Sepax Bio-C18 4.6*250mm 3 μ m 200Å 反相色谱柱。

试剂及耗材 超纯水(18.2M Ω 自制超纯水)、乙腈(HPLC 级)、三氟乙酸(HPLC 级)、磷酸二氢钠(药用级/湖南九典宏阳)、盐酸(药用级/湖南尔康)、氢氧化钠(分析纯/国药沪试)、西林瓶、胶塞、一次性注射器、无菌过滤器。

3.2 实验方法

将按照实施例 1 方法制备所得多肽衍生物冻干粉按 1mg/ml 质量体积比与磷酸二氢钠(1.42mg/ml)混合, 溶解于超纯水中, 用盐酸/氢氧化钠调节 pH 至 7.4 左右, 之后在超净工作台中用 0.22 μ m 无菌滤器过滤溶液至已灭菌西林瓶中。西林瓶压盖后置于 40°C 稳定性试验箱中。分别于第 7 天(7d) 和第 26 天(26d) 进行检测, 在实验过程中, 观察并记录多肽的性状变化, 然后将样品于 10000rpm、4°C、3min 条件下离心, 取上清液至液相进样瓶, 并用如下液相色谱方法检测多肽的浓度及纯度。多肽浓度=峰面积/上样量/消光系数/60 $\times$ 流速, 多肽纯度=目的峰面积/所有峰峰面积 $\times$ 100%。

反相色谱条件 流速：1.0ml/min；自动进样器温度：15℃；柱温：25℃；检测波长：280nm 和 214nm，流动相 A：100% H₂O+0.05%TFA，流动相 B：100%ACN，洗脱梯度见下表 6：

表 6 液相色谱洗脱梯度列表

时间(min)	0	3	8	13	14	20
B%	25	25	70	70	25	25

3.3 实验结果

在热加速稳定性实验中，通过观察，本申请各多肽衍生物在第 7 天的热加速中溶液均保持澄清，和 D1 分子溶液在热加速第 26 天的观察中明显出现可见异物相比，本申请各多肽衍生物溶液均保持了更明显的高澄清度。

从表 7 中可以看出，本申请提供的多肽衍生物，在中性条件下的热加速稳定性的浓度变化并不明显，相比分子 D2 在加速实验的第 7 天浓度变化达到-40%，本申请各多肽衍生物保持了非常低的浓度变化，甚至部分多肽衍生物如 M6、M19、M22、M23、M24、M27、M29、M30 等浓度变化已经均在 1%以下(标示为无变化)，即使在热加速第 26 天，本申请的多肽衍生物溶液中浓度变化仍维持在 10%以下，部分溶液衍生物浓度变化甚至低于 3%。

表 7 热加速稳定性的浓度变化

编号	7d 浓度变化 /%	26d 浓度变化	编号	7d 浓度变化	26d 浓度变化
D2	-40.064	/	M18	无变化	-1.148
M6	无变化	-1.865	M19	无变化	-1.589
M7	无变化	无变化	M20	无变化	-3.662
M8	无变化	-6.190	M21	-1.388	-4.522
M9	-2.280	-7.796	M22	1.314	-5.493
M10	-2.290	-10.562	M23	-4.443	-7.782
M11	-3.472	-9.840	M24	无变化	-3.954
M12	无变化	-8.378	M25	-1.222	-2.645
M13	-1.895	-5.520	M26	-2.402	-2.235
M14	-3.464	-8.377	M27	无变化	-2.286
M15	无变化	-10.824	M29	无变化	无变化
M16	-2.883	-3.036	M30	-1.805	-5.268
M17	-1.927	-5.985			

注：浓度变化=（7d 或 26d 的浓度-0d 的浓度）/0d 的浓度×100%

通过反相色谱测定纯度，从表 8 中可以看出，本申请提供的多肽衍生物，在中性条件下的热加速稳定性的纯度变化并不明显，在加速实验的第 7 天时，大部分多肽溶液的反相纯度变化都低于 1%，甚至未见浓度降低，相比现有技术中的分子 D1 热加速 7 天纯度降低 12.73%，本申请各多肽衍生物的纯度仍保持很高水平。而且，在实验过程中发现，M7、M18、M19、M23 等分子在加速实验的第 26 天纯度也几乎没有明显的变化，纯度稳定性非常好。

表 8 热加速稳定性的纯度变化(反相纯度-214nm)

编号	7d 纯度变化	26d 纯度变化	编号	7d 纯度变化	26d 纯度变化
D1	-12.73	/	M18	无变化	无变化
M6	1.64	无变化	M19	无变化	无变化
M7	无变化	无变化	M20	无变化	-1.59
M8	无变化	-3.3	M21	-1.66	-2.01
M9	-1.67	-4.82	M22	2.59	-2.19
M10	-1.66	-5.98	M23	无变化	无变化
M11	1.01	-2.93	M24	-1.59	-7.24
M12	1.12	-1.96	M25	-2.45	-5.24
M13	-1.15	-3.76	M26	-2.39	-2.68
M14	无变化	-1.77	M27	无变化	-1.27
M15	无变化	-5.67	M29	无变化	-1.2
M16	3.42	2.18	M30	无变化	-4.34
M17	-1	-3.9			

注：纯度变化=7d 或 26d 的纯度-0d 的纯度

实施例 4 动物实验结果

选择体重为 200-250g 的 SD(Sprague Dawley)大鼠用于本实验研究。实验开始前，大鼠到达至少 10-14 天，使其适应实验环境。在这一期间，大鼠到达后在反转的光照 / 黑暗阶段(意思是光照在白天期间关闭并且在夜间打开)下饲养两周，且到达的第一周单独饲养，以确保数据准确和高的测试灵敏度，在整个适应期和实验期内大鼠自由获取食物和水。各衍生物测试组 5-8 只大鼠，经皮下给予各组大鼠 10 nmol/kg 剂量的衍生物或溶媒（20mM 磷酸缓冲溶液，PB，pH7.0）。记录每组的给药时间。给药后，将大鼠放回它们的居住笼，然后在其中它们可以获取食物和水。通过在线记录或手动记录，每 24 小时记录食物消耗和大鼠体重变化。体重变化率= (BWTn - BWT₀) / BWT₀*100%，BW 代表体重值，T₀ 和 Tn 分别代表给药时和给药后 n 小时。图中各点采用平均值±标准误差 (standard error of the mean, SEM)

方法表示。

如图 1-4 所示，相比于对照组（溶媒或 D1 组），本申请所述多肽衍生物在降低 SD 大鼠的体重和累积摄食量方面的均体现出明显更优的效果，更重要的是，相比于以单氨基酸为 linker 的分子，在同样的多肽结构下，linker 中增加 AEEA 在降低 SD 大鼠的体重和累积摄食量方面得到了明显进一步提高，如多肽衍生物 M18、M23、M25、M27、M29。

实施例 5 SD 大鼠的药效实验-剂量依赖性研究

采用 SPF 级雄性 SD 大鼠（7-8 周，220-230g），经检疫期后用于本实验研究。实验动物饲养条件室温 20℃~23℃，相对湿度 40%~50%；动物检疫期间和实验过程中，饲料采用 Co60 鼠繁殖饲料 1035，饮水为纯化水，用饮水瓶供应，自由饮水。

在对化合物 D1 与 N3 的药效比较中，实验动物按体重平均原则分 5 组，每组动物数量 n=5，按照溶媒组（20mM 磷酸缓冲溶液，PB，pH7.0）、D1 化合物 30nmol/kg、100nmol/kg 剂量组、N3 化合物 30nmol/kg、100 nmol/kg 剂量组进行实验。

在对化合物 N2 与 N3 的药效比较中，实验动物按体重平均原则分 7 组，每组动物数量 n=5，按照溶媒组（20mM 磷酸缓冲溶液，PB，pH7.0）、N2 化合物 5nmol/kg、25nmol/kg、125nmol/kg 剂量组、N3 化合物 5nmol/kg、25nmol/kg、125nmol/kg 剂量组进行实验。

实验时，均采用皮下注射方式，单次给药，给药当天记为 Day1/Time0 (T0)，其中 Day0 记录动物初始体重及添加初始饲料，每天记录实验动物体重及剩余食物，并计算体重变化率及食物摄入量，同时记录并汇报任何异常情况。大鼠在实验过程中状态均良好，未观察到大鼠异常现象。体重变化率= (BWTn -BWT₀) / BWT₀*100%，BW 代表体重值，T₀和 Tn 分别代表给药时和给药后 n 小时。图中各点采用平均值±标准误差 (standard error of the mean, SEM)方法表示。摄食量是每个动物每天摄入的食物量。

表 9

组别	24h 体重变化 (%)	24h 摄食量(g)
溶媒	2.095	25.000

D1, 30nmol/kg 剂量组	-6.416	5.250
D1, 100nmol/kg 剂量组	-9.103	2.100
N3, 30nmol/kg 剂量组	-8.422	2.100
N3, 100nmol/kg 剂量组	-11.276	0.500

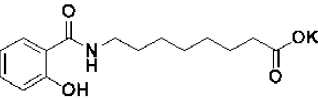
表 10

组别	24h 体重变化 (%)	24h 摄食量(g)
溶媒	4.712	25.610
N2, 5nmol/kg 剂量组	0.688	18.595
N2, 25nmol/kg 剂量组	-3.188	9.280
N2,125nmol/kg 剂量组	-7.110	1.585
N3, 5nmol/kg 剂量组	-0.316	11.920
N3, 25nmol/kg 剂量组	-3.822	6.735
N3,125nmol/kg 剂量组	-9.000	0.120

相比于 D1，化合物 N2 具有明显更优的降低体重效果（参见 CN 202310614769.1 实施例 3），而由表 9 可以发现，N3 在降低 SD 大鼠的体重和累积摄食量方面相比于 D1 也表现出了明显剂量依赖性地效果提高，而 N2、N3 均是含有的脂肪酸的侧链形式为 Z1+Z2+Z3（即脂肪二酸+氨基酸+AEEA 的形式）修饰的另一组氨基酸序列（SEQ ID NO.2）的衍生物。并且意想不到的，在与 N2 的比较中，N3 显示出了更强的降低动物体重和摄食量的效果（表 10）。

实施例 6 胰淀素衍生物片剂 PK 特性研究

将胰淀素衍生物制作为口服片剂，该片剂包含相同含量的口服递送剂 PNAC。本申请所述 PNAC 的结构如下所示：



参照国际专利申请 WO2008/028859 实施例 1 中的方法制备 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸 NAC。向 50 L 反应釜中加入异丙醇(22070.0 ml, 4.0 vol)，开启搅拌，加入 NAC(5518 g, 1.0 eq)。将体系升温至 50℃，向体系中滴加配制好的 50%氢氧化钾溶液(1304.0 g, 1.0 eq)。滴毕，体系变为澄清透明的黄色溶液，保温 50℃反应 1 h。将反应液 40℃下分批浓缩，得到粗

品的颜色为浅橙黄色。

将粗品合批加入异丙醇(19310.0 ml, 3.5 vol)进行打浆, 打浆 1 h。对体系进行抽滤, 滤饼以异丙醇(2760.0 ml, 0.5 vol)进行淋洗。将滤饼转移至真空干燥箱中, 干燥体系氮气平压, 60℃条件下干燥 16 h, 再次转移至真空干燥箱在 100℃条件下, 干燥 24 h。干燥完成, 共得到产品 4.52 kg, 收率 72.8 %, 性状为类白色粉末状固体, 即 PNAC。

所述含脂肪酸侧链的多肽衍生物片剂中某些主要成分的含量如表 9 所示:

表 11: 本申请制备的多肽衍生物片剂的示例

处方组成	API(多肽)	递送剂(PNAC)	润滑剂(例如硬脂酸镁)	总重
	质量(mg/片)	质量(mg/片)	质量(mg/片)	质量(mg/片)
1	7	300	8	315

所述含脂肪酸侧链的多肽衍生物片剂的制备方法如下: 将多肽衍生物与 PNAC 过筛, 与辅料混合均匀直接压片。10-15 月龄雄性 Beagle 犬(9-12kg)连续 5 天, 每天一次口服给予 7mg/只剂量的胰淀素衍生物(分别为 D1, N2)(n=5), 首次口服给予药物蛋白分子记为 Day1, 末次口服给予药物蛋白分子记为 Day5。给药 Day1 收集动物给药前(-10min)及给药后 2h、4h、8h 时全血并制备血浆(肝素钠作为抗凝剂), 给药 Day2-Day4 收集动物给药前(-10min)及给药后 2h、4h 时全血并制备血浆(肝素钠作为抗凝剂), 给药 Day5 收集动物给药前(-10min)及给药后 2h、4h、8h、24h、48h、72h 时全血并制备血浆(肝素钠作为抗凝剂)。血浆存储于-80oC 并用于后续分析。利用 LC-MS/MS (Waters ACQUITY I Class Premier UPLC tandem with Sciex 6500+QQQ)分析血浆中药物的含量。其中 D1 选用的离子对荷质比是 1102.9/1074.5, N2 选用的离子对荷质比是 945.6/ 919.8。实验数据由 GraphPad Prism9.3.1 绘制。

结果如图 5 所示, 相比于含有化合物 D1 的片剂组, 化合物 N2 分子在递送剂 PNAC 的片剂中显示出了特别的协同效果, 展现极高的口服生物利用效果。

在对 D1 和 N3 的口服生物利用度比较中, N3 同样展现出了在递送剂 PNAC 的片剂中生物利用度明显提高的协同效果。

实施例 7 侧链修饰对多肽衍生物口服片剂 PK 特性研究

换用 Amylin 多肽类似物的序列进一步验证侧链修饰对多肽衍生物的口服影响,采用与实施例 6 相似的实验方法,对表 1 中所示的仅存在侧链差异的多肽衍生物 D1 及 M2、M3 的口服片剂 PK 特性进行检测。

结果如图 6 所示,相比于 D1 分子,多肽衍生物 M2、M3 显示出了明显更高的口服吸收效果。这与实施例 6 中研究结果相似,进一步说明了本申请提供的侧链结构的修饰能够有效促进多肽衍生物的口服利用效果的提升,并且脂肪酸中含有 C18 的 M3 的口服利用效果好于脂肪酸中含有 C20 的 M2。

尽管以上结合对本申请的实施方案进行了描述,但本申请并不局限于上述的具体实施方案和应用领域,上述的具体实施方案仅仅是示意性的、指导性的,而不是限制性的。本领域的普通技术人员在本说明书的启示下和在不脱离本申请权利要求所保护的范围的情况下,还可以做出很多种的形式,这些均属于本申请保护之列。

权利要求书

1. 一种含脂肪酸侧链在提高多肽衍生物活性选择性方面的用途，多肽衍生物由含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得，其中所述含脂肪酸侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；
 $Z2$ 选自 γGlu ， αGlu ， βAsp ， αAsp ， Inp ， Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；
 $Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。
2. 一种含脂肪酸侧链在提高多肽衍生物活性方面用途，多肽衍生物由含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得，其中所述含脂肪酸侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；
 $Z2$ 选自 γGlu ， αGlu ， βAsp ， αAsp ， Inp ， Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；
 $Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。
3. 一种含脂肪酸侧链在多肽衍生物口服利用度提高方面的用途，多肽衍生物由含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得，其中所述含脂肪酸侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；
 $Z2$ 选自 γGlu ， αGlu ， βAsp ， αAsp ， Inp ， Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；
 $Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。
4. 一种提高多肽衍生物活性选择性的方法，所述方法包括通过含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得多肽衍生物，其中所述含脂肪酸的侧链形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；
 $Z2$ 选自 γGlu ， αGlu ， βAsp ， αAsp ， Inp ， Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；
 $Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。
5. 一种提高多肽衍生物活性的方法，所述方法包括通过含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得多肽衍生物，其中，所述含脂肪酸的侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；
 $Z2$ 选自 γGlu ， αGlu ， βAsp ， αAsp ， Inp ， Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；
 $Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。
6. 一种提高多肽衍生物口服利用度的方法，所述方法包括通过含脂肪酸侧链修饰多肽分子获得多肽衍生物，其中，所述含脂肪酸的侧链的形式为 $Z1+Z2+Z3$ ，其中， $Z1$ 为 C16-C22 脂肪二酸；
 $Z2$ 选自 γGlu ， αGlu ， βAsp ， αAsp ， Inp ， Trx 中的任一种或 $Z2$ 不存在；
 $Z3$ 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

7. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途或权利要求 4-6 所述的方法，其中，所述 Z1 为 C16、C17、C18、C19 或 C20 脂肪二酸。
8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z2 选自 γ Glu, β Asp, γ Glu, Inp, Trx 中的任一种，优选选自 β Asp 或 γ Glu。
9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的用途或方法，其中，所述 n 大于 0，优选 1-10，更优选 2-8，进一步优选 n=2。
10. 根据权利要求 1-9 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z1 为 C16、C18 或 C20 脂肪二酸。
11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z2 为 Inp 或 Trx；所述 n 大于 0。
12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z1 为 C16、C17、C18、C19 或 C20 脂肪二酸；所述 Z2 为 γ Glu；所述 n=2。
13. 根据权利要求 1-12 任一项所述的用途或方法，其中，所述 Z1、Z2、Z3 之间依次通过酰胺键连接。
14. 根据权利要求 1-13 任一项所述的用途或方法，其中，所述侧链修饰在多肽的 1-10 个氨基酸上，优选为 1-3 个氨基酸上，优选为 1 个氨基酸上。
15. 根据权利要求 1-14 任一项所述的用途或方法，其中，所述侧链修饰在所述多肽序列的 N 末端、或者任意中间位置的氨基酸；所述氨基酸优选自谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺或天冬酰胺，进一步优选选自赖氨酸。
16. 根据权利要求 1-15 任一项所述的用途或方法，其中所述多肽为天然多肽或人工合成多肽分子，可以是激动剂或拮抗剂；优选地，所述蛋白或多肽类药物选自：GLP-1 受体激动剂、GIP 受体拮抗剂、胰岛素受体激动剂、肝素受体激动剂、生长激素、干扰素受体激动剂、白介素受体激动剂、促卵泡激素受体激动剂、促性腺激素受体激动剂、促红细胞生成素受体激动剂、PYY(酪酪肽)受体激动剂、氧合调节素受体激动剂、GLP-2（胰高血糖素样肽-2）受体激动剂、降钙素受体激动剂、PTH（甲状旁腺激素）受体激动剂、胃饥饿素（ghrelin）受体激动剂、内源性大麻素受体激动剂，瘦素（Leptin）受体激动剂，血清素受体激动剂，成纤维细胞生长因子 21（FGF21）受体激动剂，胆囊收缩素（CCK）受体激动剂，胃酸调节素受体激动剂或胰高血糖素受体激动剂；优选是胰淀素受体激动剂；进一步

优选地，是胰淀素类似物或降钙素类似物。

17. 根据权利要求 1-16 任一项所述的用途或方法，其中，所述多肽包含如下氨基酸序列：ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂，优选地，所述多肽衍生物选自：N1、N2、N3 或 M1-M30 中的任意一个或多个。

18. 根据权利要求 1 或权利要求 7-17 所述的用途或根据权利要求 4 或权利要求 7-17 所述的方法，其中，所述提高多肽衍生物活性选择性为，相比于提高多肽衍生物对降钙素受体的活性，更倾向于选择提高多肽衍生物对胰淀素受体的活性，优选地，生物活性选择性指提高多肽衍生物对胰淀素受体与对降钙素受体的活性的比值；进一步优选地，还包括多肽衍生物对胰淀素受体的活性也提高。

19. 根据权利要求 1 或权利要求 7-18 所述的用途或根据权利要求 4 或权利要求 7-18 所述的方法，其中，所述提高多肽衍生物活性选择性为，提高胰淀素受体与对降钙素受体的细胞活性比的倍数大于 1.5 倍，优选地，所述倍数大于 2 倍；进一步优选地，所述倍数大于 5 倍；更优选地所述倍数大于 10 倍。

20. 根据权利要求 18 或权利要求 19 所述用途或方法，其中所述活性是指激动活性。

21. 根据权利要求 1 或权利要求 7-20 所述的用途或根据权利要求 4 或权利要求 7-20 所述的方法，其中，所述多肽衍生物为胰淀素受体激动剂；优选地，所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素衍生物；更优选地，所述多肽衍生物包含如下氨基酸序列：ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂。

22. 根据权利要求 2 所述的用途或根据权利要求 5 所述的方法，其中，所述多肽衍生物活性为在减重和/或减少食物摄入方面的活性。

23. 根据权利要求 2 或权利要求 7-17 所述的用途或根据权利要求 5 或权利要求 7-17 所述的方法，其中，所述提高多肽衍生物活性为提高多肽衍生物对胰淀素受体和降钙素受体的细胞活性。

24. 根据权利要求 2 或权利要求 7-17 或权利要求 22-23 所述的用途或根

据权利要求 5 或权利要求 7-17 或权利要求 22-23 所述的方法，其中，所述多肽衍生物为胰淀素受体激动剂；优选地，所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素衍生物；更优选地，所述多肽衍生物包含如下氨基酸序列：

KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂，
或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH₂。

25. 根据权利要求 3 或权利要求 7-17 所述的用途或根据权利要求 6 或权利要求 7-17 所述的方法，其中，含脂肪酸侧链在多肽衍生物通过与一种或多种口服递送剂共同施用；优选地，所述口服递送剂为 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸(NAC)盐；更优选为 PNAC。

26. 根据权利要求 3 或权利要求 7-17 所述的用途或根据权利要求 6 或权利要求 7-17 所述的方法，其中，所述提高多肽衍生物口服利用度为比 Cagrilintide 多肽分子的口服利用度高。

27. 根据权利要求 3 或权利要求 7-17 所述的用途或根据权利要求 6 或权利要求 7-17 所述的方法，其中，所述多肽衍生物为胰淀素受体激动剂；优选地，所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素衍生物；更优选地，所述多肽衍生物包含如下氨基酸序列：

KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂，
或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH₂。

28. 一种多肽衍生物，所述多肽衍生物包含多肽和与多肽连接的侧链，所述侧链形式为 Z1+Z2+Z3，其中，Z1 为 C16-C22 脂肪二酸；

Z2 选自 γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, Inp, Trx 中的任一种或 Z2 不存在；
Z3 为 n 个 AEEA，其中 $n \geq 0$ 。

29. 根据权利要求 28 所述的衍生物，其中，所述 Z1 为 C16、C17、C18、C19 或 C20 脂肪二酸。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的衍生物，其中，所述 Z2 选自 γ Glu, Inp, Trx 中的任一种或 Z2 不存在。

31. 根据权利要求 28-30 中任一项所述的衍生物，其中，所述 n 大于 0。

32. 根据权利要求 28-31 中任一项所述的衍生物，其中，所述 Z2 为 Inp 或 Trx；所述 n 大于 0。

33. 根据权利要求 28-32 中任一项所述的衍生物，其中，所述 Z2 不存在；所述 n 大于 0。

34. 根据权利要求 28-33 中任一项所述的衍生物，其中，所述 Z2 为 γ Glu；所述 $n=2$ 。

35. 根据权利要求 28-34 中任一项所述的衍生物，其中，所述多肽为胰淀素受体激动剂；优选地，所述多肽衍生物为胰淀素或降钙素类生物；更优选地，所述多肽包含如下氨基酸序列：ASQLS TAVLG RLSDE LHRLQ DYPRT DVGSG SP-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLADFLRHSS NNLKPILPPT NVGSNT-trans-Hyp-NH₂ 或 KCNTATCATQ RLAEFLRHSS NNFGPILPPT NVGSNTP-NH₂，优选地，所述多肽衍生物选自：N1、N2、N3 或 M1-M30 中的任意一个或多个。

36. 一种药物组合物，其包括权利要求 18-25 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料，优选地，所述组合物包括一种或多种口服递送剂；更优选地，所述口服递送剂为 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸(NAC)盐；进一步优选为 PNAC。

37. 权利要求 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或权利要求 36 所述组合物在制备多肽类药物中的用途；优选地，所述多肽类药物用于预防和/或治疗超重、肥胖症和/或 I 型或 II 型糖尿病和/或骨质疏松症和/或神经性疼痛。

38. 根据权利要求 37 所述用途，其中多肽类药物是口服药物；优选地，所述口服药物包括一种或多种口服递送剂；更优选地，所述口服递送剂为 N-[8-(2-羟基苯甲酰基)氨基]辛酸(NAC)盐；进一步优选为 PNAC。

39. 权利要求 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或权利要求 36 所述的药物组合物在减少食物摄入方面的用途。

40. 一种预防和/或治疗超重、肥胖症和/或 I 型或 II 型糖尿病和/或骨质疏松症和/或神经性疼痛的方法，包括给药受试者预防或治疗有效量的权利要求 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或权利要求 36 所述的药物组合物。

41. 一种减少食物摄入的方法，包括给药受试者有效量的权利要求 28-35 中任一项所述的衍生物或其药学上可接受的盐或权利要求 36 所述的药物组合物。