



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103908657 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201210595101. 9

(22) 申请日 2012. 12. 31

(71) 申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200040 上海市乌鲁木齐中路 12 号

(72) 发明人 叶纹 张瑜 范毅超 肖以钦

张晓燕

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

A61P 25/02(2006. 01)

A61P 27/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

胰升糖素样肽 -1 类似物在制备眼科疾病药物中的用途

(57) 摘要

本发明属医药领域,涉及胰升糖素样肽 -1 类似物在制药中的用途,具体涉及胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 在制备眼科疾病药物中的用途,本发明采用外源性胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4,进行糖尿病性视网膜病变动物模型实验,结果表明 Exendin-4 能抑制胶质细胞活化所引起的视网膜炎症反应,对抗糖尿病等所引起的视网膜细胞凋亡,显著改善视功能,可作为眼科若干疾病的治疗药物,尤其使治疗眼部缺血性及视神经损伤疾病的药物,治疗包括糖尿病视网膜病变,高血压视网膜病变,视网膜静脉栓塞等眼科疾病。

1. 胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 在制备眼科疾病药物中的用途。
2. 按权利要求 1 所述的用途,其特征是,所述的眼科疾病是糖尿病性视网膜病变。
3. 按权利要求 2 所述的用途,其特征是,所述的糖尿病性视网膜病变是缺血性病变或神经损伤性病变。
4. 按权利要求 1 所述的用途,其特征是,所述的所述的药物是改善视功能药物。
5. 按权利要求 1 所述的用途,其特征是,所述的胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 减轻视网膜形态学损伤变化,维持神经节细胞及内丛状层及整个视网膜厚度。
6. 按权利要求 1 所述的用途,其特征是,所述的胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 减少视网膜神经节细胞丢失。
7. 按权利要求 1 所述的用途,其特征是,所述的胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 抑制胶质细胞活化所导致的视网膜损伤。
8. 按权利要求 1 所述的用途,其特征是,所述的胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 抑制视网膜细胞凋亡。

## 胰升糖素样肽 -1 类似物在制备眼科疾病药物中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属医药领域,涉及胰升糖素样肽 -1 类似物在制药中的用途,具体涉及胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 在制备眼科疾病药物中的用途,尤其涉及胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 在制备治疗缺血性或神经损伤性眼科疾病(如糖尿病性视网膜病变等)药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 现有技术公开了 Exendin-4 是一种从蜥蜴唾液腺中提取的 GLP-1(胰升糖素样肽 -1, glucagons-like peptide-1) 类似物,与哺乳动物 GLP-1 的氨基酸序列具有 53% 的同源性。其同时具有促进胰腺胰岛素的分泌、增加胰岛素敏感性及改善胰岛细胞功能的作用,且不被二肽基肽酶 IV(DPP-IV) 分解,血浆半衰期较长,据报道,目前已用于糖尿病的临床治疗。

[0003] 糖尿病(DM)作为我国继心血管疾病和肿瘤之后的第三大疾病,对人类健康的威胁和对社会的影响不言而喻。在糖尿病的诸多并发症中,糖尿病性视网膜病变(简称糖网病, diabetic retinopathy, DR) 具有特殊的重要地位,其病理改变从微血管瘤、硬性渗出、黄斑水肿、棉絮斑,到新生血管、玻璃体增殖甚至视网膜脱离,目前认为,糖网病的发病机理主要包括视网膜微血管病变和神经元病变及中低度的炎症反应。其发病非常普遍,是世界上主要的致盲眼病之一,统计显示,糖网病的全球发病率约为 4.8%,其发病率随 DM 病程的发展而增高,5 年内 DR 发生率为 44.4%,7 年后为 56%。预计到 2030 年美国将有 2500 万,全世界将有 3 亿 DR 患者。研究还显示,糖网病(DR) 是 DM 代谢紊乱和内分泌系统与血液系统损害在视网膜上的反映,已成为糖尿病(DM) 的最为常见和严重的微血管并发症之一。据调查,不论 1 型或 2 型糖尿病患者,其中 90% 以上的患者在病程较长时都存在发生可造成失明的糖网病的危险性,严重影响了患者的正常生活。临床实践中对糖网病及其引起的失明尚缺乏有效的治疗措施,目前主要采用的是玻璃体腔内注射激素、眼底激光及玻璃体切割手术等治疗方案。尽管这些治疗手段能在一定程度上延缓病情的进展或改善症状,但由于其中多是相对晚期的干预尚不能从根本上消除糖网病的发病原因,故预后不甚理想。

[0004] 因此,深入了解糖网病的发病机制并寻找有效的治疗方法及药物,乃是目前国际眼科研究领域研究人员的关注热点和重要挑战课题之一。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供胰升糖素样肽 -1 类似物在制药中的新的用途,具体涉及胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 在制备眼科疾病药物中的用途,尤其涉及胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 在制备治疗缺血性或神经损伤性眼科疾病(如糖尿病性视网膜病变等)及视功能的保护药物中的用途。

[0006] 本发明采用外源性胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4,进行糖尿病性视网膜病变动物模型试验,通过眼内注射 Exendin-4 对大鼠血糖、体重的影响实验,结果显示,眼内注

射 E4 对大鼠的血糖和体重无影响 ; 通过 Exendin-4 保护 GK 大鼠闪光视网膜电图 (FERG) 实验, 结果显示, Exendin-4 眼内给药能显著减少 ERG b 波成分振幅下调, 实验结果还显示, Exendin-4 能抑制 GK 大鼠视网膜细胞凋亡, 增加 Bcl-x1/Bax 及 Bcl-2/Bax 基因的表达, 减少视网膜胶质细胞酸性蛋白的表达以及减少 GK 大鼠视网膜 Claudin-5、occludin、ICAM-1、PIGF 的表达, 实验结果表明, 所述的胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 具有 :

[0007] 1、减轻视网膜形态学损伤变化, 维持神经节细胞及内丛状层及整个视网膜厚度的作用 ;

[0008] 2、具有减少视网膜神经节细胞丢失的作用 ;

[0009] 3、具有保护视功能的作用, 对视觉电生理包括视网膜电图具有保护作用 ;

[0010] 4、具有抑制胶质细胞活化所导致的视网膜损伤的作用 ;

[0011] 5、具有抑制视网膜细胞凋亡的作用 ;

[0012] 6、具有保护血 - 视网膜屏障功能的作用。

[0013] 实验结果证明, 本发明所述的胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 可作为眼科疾病的治疗药物, 对视网膜形态学以及视功能具有保护作用, 尤其涉及糖尿病性视网膜病变的药物, 并可显著改善视功能, 抑制胶质细胞活化所引起的视网膜炎症反应, 对抗糖尿病所引起的视网膜细胞凋亡, 治疗包括糖尿病视网膜病变, 高血压视网膜病变等疾病, 并可改善视功能。

[0014] 本发明所述的外源性胰升糖素样肽 -1 类似物 Exendin-4 可通过市购的渠道获得。

#### 附图说明

[0015] 图 1 是眼内注射 Exendin-4 对大鼠血糖、体重的影响实验结果, 其中,

[0016] A 为空腹血糖, B 为餐后血糖, C 为体重, GK 和 GK+Exendin-4 治疗后的两组大鼠的空腹血糖和餐后血糖分别为 Wistar 组大鼠的 1.7-2.8 倍和 1.3-1.8 倍 ; 而两组的体重分别比 Wistar 大鼠轻 4.3% -9% ; GK 组和 GK+Exendin-4 组两者的空腹血糖、餐后血糖、体重之间均无统计学差异 (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, #P < 0.001, n = 12) ;

[0017] 图中, control : Wistar 大鼠 ;

[0018] G+NS : GK 大鼠 + 生理盐水眼内注射 ;

[0019] G+E4 : GK 大鼠 + Exendin-4 眼内注射。

[0020] 图 2 为 Exendin-4 保护 GK 大鼠闪光视网膜电图 (FERG) 实验结果, 其中,

[0021] A 为三组大鼠 FERG 中 b 波振幅改变的比较 ; C 为 Ops 波振幅比较 ; B 和 D 是三组大鼠典型 ERG 的改变 ; 糖尿病组 b 波成分振幅较正常组显著下降 (P < 0.01) ; Exendin-4 眼内给药显著减少 ERG b 波成分振幅下调 (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, #P < 0.001, n = 12) ;

[0022] 图中 control : Wistar 大鼠 ;

[0023] G+NS : GK 大鼠 + 生理盐水眼内注射 ;

[0024] G+E4 : GK 大鼠 + Exendin-4 眼内注射。

[0025] 图 3 是 Exendin-4 抑制 GK 大鼠视网膜细胞凋亡, 增加 Bcl-x1/Bax 及 Bcl-2/Bax 基因的表达, 其中,

[0026] A 为各组视网膜细胞计数 ; B 为各组 GLP-1R 蛋白表达情况 ; C 为免疫组化法显示 GLP-1R 在视网膜中的表达情况 ; D 为 Bcl-x1、Bax、Bcl-2 基因在各组的表达 ; 其中, GCL : 节

细胞层 ;INL :内核层 ;ONL :外核层 ;

[0027] 图中 control :Wistar 大鼠 ;G+NS :GK 大鼠 + 生理盐水眼内注射 ;G+E4 :GK 大鼠 +Exendin-4 眼内注射 ;(\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, #P < 0.001, n = 12)。

[0028] 图 4 是 Exendin-4 减少视网膜胶质细胞酸性蛋白的表达,其中,

[0029] A 为各组视网膜 GFAP 的蛋白表达情况 ;B 为各组视网膜 Vimentin 的蛋白表达情况 ;C 为免疫组化法显示各组视网膜 GFAP 的蛋白表达情况 ;

[0030] 图中 control :Wistar 大鼠 ;G+NS :GK 大鼠 + 生理盐水眼内注射 ;G+E4 :GK 大鼠 +Exendin-4 眼内注射 ;(\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, #P < 0.001, n = 12)。

[0031] 图 5 是 Exendin-4 减少 GK 大鼠视网膜 Claudin-5、occludin、ICAM-1、PIGF 的表达,其中,

[0032] A 为各组视网膜 Claudin-5、occludin 的蛋白表达情况 ;B 为免疫组化法显示各组视网膜 Claudin-5、occludin 的表达情况 ;C 为各组视网膜 ICAM-1 的蛋白表达情况 ;D 为各组视网膜 PIGF 和 VEGF 的蛋白表达情况 ;

[0033] 图中 control :Wistar 大鼠 ;G+NS :GK 大鼠 + 生理盐水眼内注射 ;G+E4 :GK 大鼠 +Exendin-4 眼内注射 ;(\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, #P < 0.001, n = 12)。

## 具体实施方式

[0034] 建立实验动物糖尿病模型及玻璃体腔内注射 Exendin-4 :

[0035] 实验采用 8 周龄、体重约为 150 克的 Wistar 和 GK 大鼠,将大鼠分为 3 组 :正常对照组 (Wistar)、糖尿病组 (GK 大鼠) 和糖尿病 E4 (GK+E4) 治疗组 ;

[0036] (E4 溶于生理盐水, PH = 5), 每组 12 只 ;

[0037] 给药方法 :玻璃体腔内注射 E4 在 12 周时进行,按常规方法在实验动物模型颞侧角巩膜缘后进行玻璃体腔内 Exendin-4 干预,用药的体积量为 2  $\mu$  L/ 眼, E4 的剂量为 0.1MG/ 眼,对糖尿病组及正常对照组大鼠则给予等体积的生理盐水 ;注射前将动物全身麻醉 (2% 戊巴比妥钠, 50mg/Kg BW), 并配合眼局部麻醉 (利多卡因或丁卡因)。

[0038] 实施例 1 玻璃体腔内注射 Exendin-4 具有保护大鼠视网膜功能的作用,使 ERG b 波和 Ops 总振幅接近正常水平

[0039] 采用全视野闪光 ERG 的方法检测大鼠糖尿病性视网膜病变的程度及检测视网膜的功能状态,结果显示,16 周时, GK 生理盐水注射组的大鼠的 b 波和 Ops 波振幅明显下降,较 Wistar 大鼠分别下降了  $43.9 \pm 4.7\%$  (如图 2A、B 所示) 和  $37.4 \pm 6.8\%$  (如图 2C、D 所示), 而 GK 大鼠 E4 治疗组的振幅则明显提高, b 波振幅为  $206.7 \pm 21.5\text{mV}$  (GK 大鼠为  $121.2 \pm 12.9\text{mV}$ ,  $P < 0.05$ ), Ops 振幅为  $91.7 \pm 9.0\text{mV}$  (GK 大鼠为  $49.6 \pm 9.1\text{mV}$ ,  $P < 0.05$ ), GK 大鼠 E4 治疗组的 b 波和 Ops 振幅与 Wistar 大鼠之间无显著的统计学差异,提示 E4 对大鼠糖尿病性视网膜病变具有保护作用。

[0040] 实施例 2 玻璃体腔内注射 Exendin-4 可防止糖尿病视网膜厚度变薄及各核层的细胞丢失,使糖尿病大鼠视网膜厚度、外核层细胞计数等形态学指标接近正常水平。

[0041] HE 染色形态学检查结果显示,在 16 周大小的 GK 大鼠的视网膜中, GCL, INL, ONL 层较 Wistar 有显著减少,最初的细胞丢失出现在节细胞层 (是 Wistar 大鼠的  $61.3\% \pm 4.8\%$ ,  $n = 12$ ;  $p < 0.05$ , 如图 3A、B 所示) 和外核层 (是 Wistar 大鼠的  $72.5 \pm 1.8\%$ ,

$n = 12$ ;  $p < 0.05$ , 如图 3A 所示), 在视网膜内核层, 也存在明显的细胞丢失 (为 Wistar 大鼠的  $78.7 \pm 5.3\%$ ,  $n = 12$ ;  $p < 0.05$ , 如图 3A 所示), Exendin-4 可显著减少节细胞层、外核层的细胞减少量, Exendin-4 治疗组的节细胞计数和外核层细胞计数分别为 GK 生理盐水注射组的  $147.8 \pm 14.3\%$  和  $131.6 \pm 4.2\%$  (如图 3A 所示), 而内核层为 GK 生理盐水注射组的  $119.6 \pm 8.7\%$  ( $n = 12$ ;  $p < 0.05$ , 如图 3A 所示; Exendin-4 治疗组与 Wistar 大鼠视网膜的节细胞层、外核层、内核层计数无显著性差异。

[0042] 实施例 3 玻璃体腔内注射 Exendin-4 可增加 GLP-1R 的表达、增加抗凋亡基因 Bcl-xL Bcl-2 的表达从而具有抑制糖尿病性视网膜细胞凋亡的作用

[0043] GLP-1R 的表达在 16 周大小的 GK 大鼠较 Wistar 大鼠明显下调 (为 Wistar 大鼠的  $75.1 \pm 2.8\%$ , 如图 3B 所示), 但 Exendin-4 治疗组则有明显上调 (为 GK 大鼠的  $131.3 \pm 6.2\%$  如图 3B 所示), 视网膜 GLP-1R 的免疫染色和 Western blot 检测 GLP-1R 的表达情况相一致 (如图 3C 所示), 免疫组化显示 GLP-1R 主要表达在视网膜内层 (包括节细胞层、内丛状层、内核层) 及光感受器的内节 (如图 3C 所示);

[0044] Western blot 检测线粒体依赖的凋亡相关基因 (Bcl-2, Bcl-xL and Bax) 表达显示, 与 Wistar 大鼠比较, GK 大鼠的 Bcl-xL/Bax 和 Bcl-2/Bax 的表达比例均有下降 (为 Wistar 大鼠的  $72.3 \pm 2.7\%$  和  $54.7 \pm 6.1\%$ , 如图 3D 所示), 但 Exendin-4 治疗组则有显著提高 (为 GK 大鼠的  $131 \pm 3.1\%$  和  $150 \pm 9.5\%$ , 如图 3D 所示)。

[0045] 实施例 4 玻璃体腔内注射 Exendin-4 具有抑制视网膜胶质细胞活化的作用

[0046] 胶质细胞酸性蛋白 (GFAP) 是视网膜组织中 Muller 细胞和星形胶质细胞的重要标志物, 其作用为 RGC 提供代谢和营养支持, 并维持细胞外离子和神经递质的稳态, 在视网膜损伤时还可发挥吞噬细胞的作用, 诱发炎症和免疫应答, 在视网膜环境中充当免疫监视及调控的关键因素, 胶质细胞过度激活则会导致视网膜的损伤; 如图 4 所示, 损伤后, GFAP 的表达大幅上调, 在 Exendin-4 治疗组, 所述的药物 Exendin-4 在转录及翻译水平均有显著的抑制胶质细胞激活的作用。

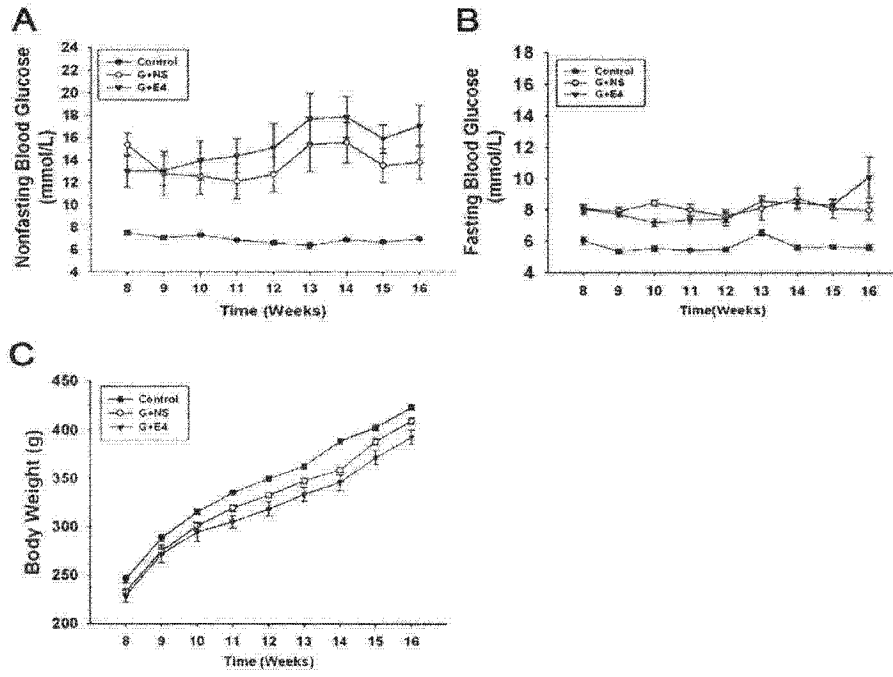


图 1

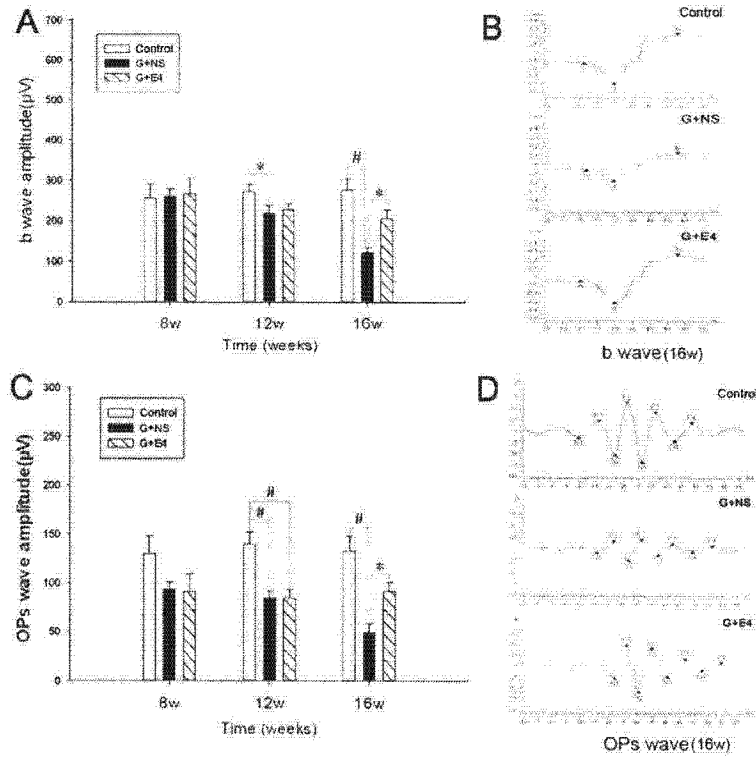


图 2

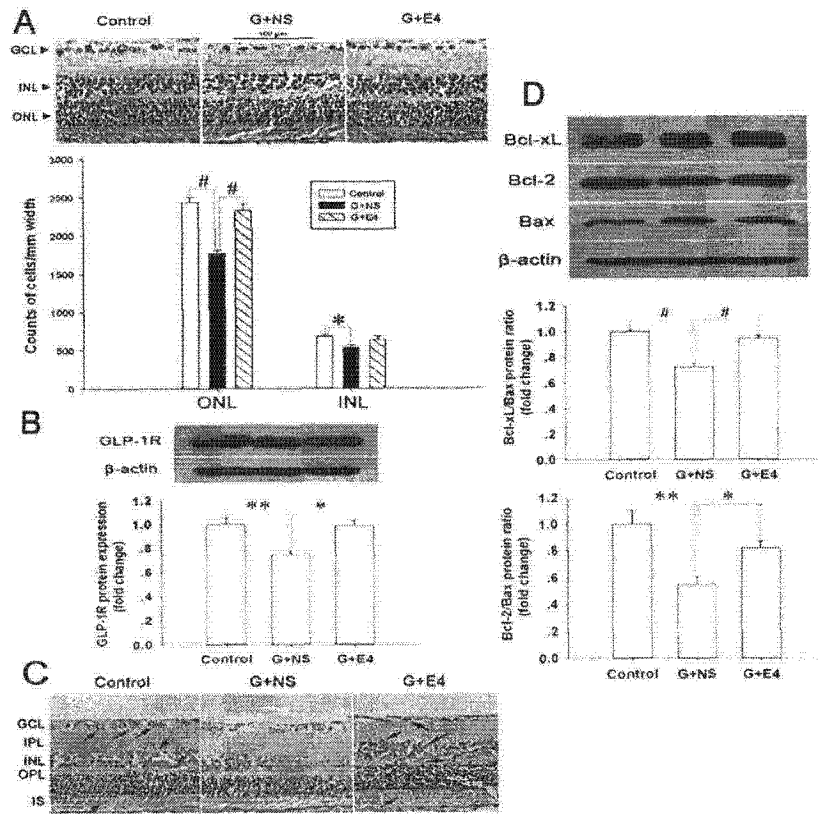


图 3

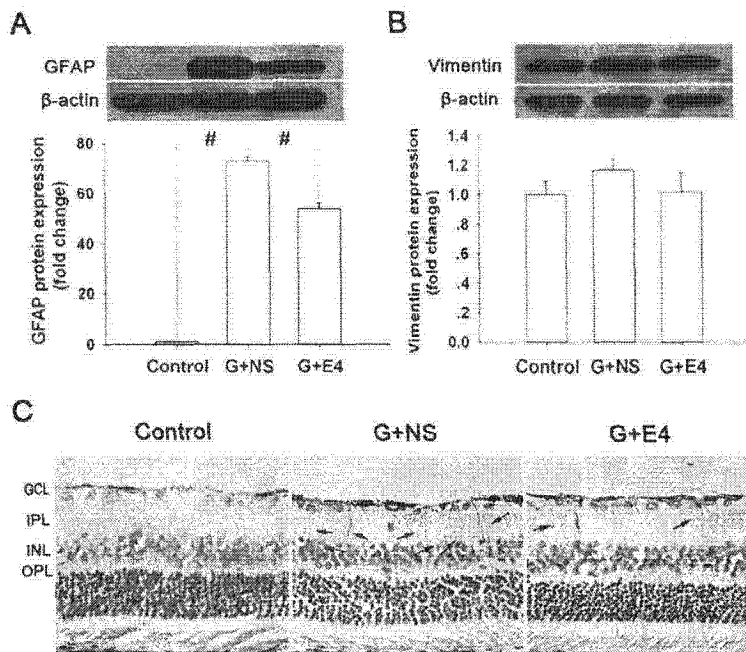


图 4



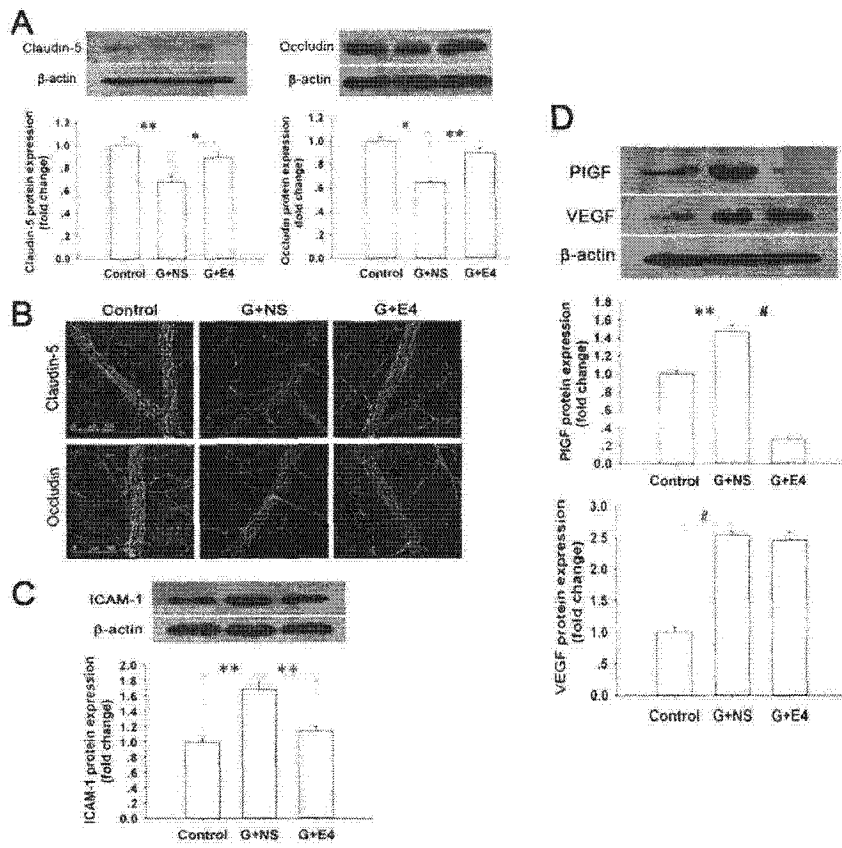


图 5