

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 38/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199225.8

[43]公开日 1999年11月17日

[11]公开号 CN 1235553A

[22]申请日 97.8.26 [21]申请号 97199225.8

[30]优先权

[32]96.8.30 [33]US [31]60/024,980

[32]97.8.21 [33]US [31]08/915,918

[86]国际申请 PCT/US97/15044 97.8.26

[87]国际公布 WO98/08531 英 98.3.5

[85]进入国家阶段日期 99.4.28

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 S·埃芬迪

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 王其灏

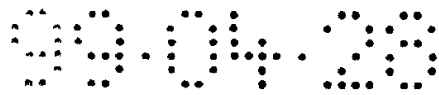
权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 GLP-1 或其类似物在治疗心肌梗死中的应用

[57]摘要

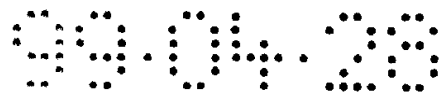
本发明提供了降低心肌梗死后死亡率和发病率的方法。以可使血糖正常的剂量使用 GLP-1, GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物。

ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 降低心肌梗死后死亡率和发病率的方法，包括在需要时以可使血糖正常的剂量向患者给予选自 GLP-1, GLP-1 类似物, GLP-1 衍生物及其可药用的盐的化合物。
- 5 2. 权利要求 1 的方法，其中的化合物是静脉内给药。
3. 权利要求 1 的方法，其中的化合物是皮下给药。
4. 权利要求 2 或 3 的方法，其中是给药连续的。
5. 权利要求 4 的方法，其中该化合物的给药速度是 0.25 ~ 6 pmol/kg/min.
- 10 6. 权利要求 5 的方法，其中该化合物的给药速度是 0.5 - 2.4 pmol/kg/min.
7. 权利要求 5 的方法，其中所述的速度为大约 0.5 ~ 1.2 pmol/kg/min.
8. 权利要求 2 的方法，其中的静脉内给药是间断性的。
- 15 9. 权利要求 2 的方法，其中的化合物可被静脉内给药，并且也可通过另一种非经肠道的途径给药。
10. 权利要求 9 的方法，其中的其它非经肠道途径是皮下途径。
11. 权利要求 1 的方法，其中被给予的化合物是 GLP (7-36) 酰胺，或者其药剂学允许的盐。
- 20 12. 降低心肌梗死后死亡率和发病率的方法，包括给予一种通过与某种或几种受体相互作用而发挥促胰岛素活性的化合物, GLP-1, GLP-1 类似物, GLP-1 衍生物与该受体相互作用而发挥其促胰岛素活性。
13. 降低心肌梗死后死亡率和发病率的方法，包括给予一种通过与某种或几种受体相互作用而提高胰岛素敏感性的化合物, GLP-1, GLP-1
- 25 类似物, GLP-1 衍生物与该受体相互作用而提高胰岛素敏感性。



说明书

GLP-1 或其类似物在治疗心肌梗死中的应用

发明背景

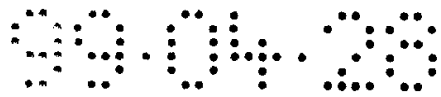
1. 发明领域。本发明涉及降低糖尿病患者心肌梗死后死亡率和发病
5 率的方法。

2. 背景资料。在明显的糖尿病或损伤的葡萄糖耐受患者中，心血管
疾病的发病率和死亡率要高于未患上上述疾病的人。因怀疑可能发生梗死
而进入冠心病监护室的患者中，糖尿病患者达 24%，而正常人群中，这
一比例仅占约 5% [Hamsten A., et al., J. Int. Med. 736:1-3(1994)236 增刊;
10 Malmberg K.和 Ryden L., Eur. Heart J. 9:256-264(1988)]。糖尿病患者的
发病率更高，在急性恢复期后死亡率更高，这很大程度上是由于致命的
再次梗死和充血性心力衰竭 (Malmberg 和 Ryden; Stone P., et al., J. Am.
Coll. Cardiol. 22:707-713(1993))。尽管在急性心肌梗死后的发病率和死
亡率下降，但糖尿病和非糖尿病患者中心肌梗死后的死亡率和发病率的
15 差异长期存在 [Granger C. B., et al., J. Am. Coll. Cardiol., 21(4):920-5
(1993); Grines C., et al., N. Engl. J. Med. 328:673-679(1993)]。

造成糖尿病患者中急性心肌梗死后预后不良的因素可能在急性发作
之前、期间或之后起作用。这些因素包括扩散性冠状动脉粥样硬化病以
及更晚期和发病率更高的冠状动脉病，它们与可能的糖尿病心肌病一
20 起，可能会对充血性心力衰竭的高发病率起作用。伴有痛觉感知损伤和
静息期心率波动的自主神经病可能也起重要作用。冠状动脉血栓是形成
中的梗死的基本因素，并且尤其令人注意的是，已发现在糖尿病患者中
血小板活性、凝结和纤维蛋白溶解功能存在障碍 [Davi G., et al., New
England. J. Med., 322:1769-1774(1990)]。

糖尿病患者中增加的代谢紊乱可能起重要作用。心肌梗死引起循环
胰岛素降低、肾上腺素能紧张性 (adrenergic tone) 的大幅度增加和可的
松、儿茶酚胺和胰高血糖素等应激激素的释放，它们共同促进高血糖并
刺激脂分解。释放的游离脂肪酸通过几种机制进一步损伤心肌，游离脂
肪酸的过量氧化可能会损伤心肌的非缺血部分 [Rodrigues B., et al.,
25 Cardiovascular Research, 26(10):913-922(1992)]。

使血糖正常和控制加剧糖尿病患者中梗死损伤的代谢级联反应的缓
和措施是必要的。在最近的一项试验中，在急性心肌梗死期间提高糖尿

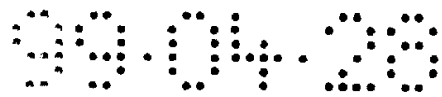


病患者的代谢监护，包括仔细监视胰岛素和葡萄糖输注，和急性期后通过皮下多剂量胰岛素处理严格控制血糖，与临床需要时才接受胰岛素处理的对照组相比，使心肌梗死后当年的死亡率降低了30%〔Malmberg, K, et al., J. Am. College Cardiology, 26:57-65(1995)〕。

5 然而，胰岛素输注有可能引起低血糖，所谓低血糖是指血糖低于0.3 mM。低血糖增加了室性心律失常的危险，这是胰岛素输注的一种危险后果。为防止低血糖，提出了糖尿病患者胰岛素输注与心肌梗死的公式〔Hendra, T. J., et al., Diabetes Res. Clin. Pract., 16:213-220(1992)〕。但是，根据这种公式21%的患者会形成低血糖。在心梗死后葡萄糖控制的另一项研究中，输注胰岛素和葡萄糖时，18%的患者会形成低血糖
10 〔Malmberg, K.A., et al., Diabetes Care, 17:1007-1014(1994)〕。

胰岛素输注还要求频繁地监测血糖水平，以便能发觉低血糖的出现并尽可能早地纠正。在所引证的患者接受胰岛素输注的研究中
15 [Malmberg, 1994]，至少每2小时检测血糖一次，并据此调节输注速度。因此，对于心肌梗死患者胰岛素-葡萄糖输注治疗的安全和有效性，取决于能否方便迅速地得到血糖数据。这样一种对监测血糖的强制性需要，对医护专业人员是一个沉重的负担，并且会增加麻烦和治疗费用。因而，冠心病监护室通常不采取措施优化急性心肌梗死的糖尿病患者的血糖水平，例如可以通过静脉内给予胰岛素来调节。鉴于胰岛素输注的
20 固有危险性和负担，需要另一种方法用于控制糖尿病患者急性心肌梗死期间的血糖。

肠降血糖素激素，即类胰高血糖素肽-1，缩写为GLP-1，是在肠道中从胰高血糖素原产生的。可促进营养物诱发的胰岛素释放[Krcymann B., et al., Lancet 2: 1300 - 1303 (1987)]。已知GLP-1的不同剪截形式可刺激胰岛素分泌(促胰岛素作用)和cAMP生成[参见如Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research, 40: 333 - 343 (1992)]。已经确立了各种体外实验和哺乳动物，特别是人对外源性给予GLP-1, GLP-1(7-36)酰胺，和GLP-1(7-37)酸的促胰岛素反应之间的相互关系[参见如Nauck, M.A., et al., Diabetologia, 36: 741 - 744 (1993); Gutniak, M., et al., New England J. of Medicine, 326(20): 1316 - 1322 (1992);
30 Nauck, M.A., et al., J. Clin. Invest., 91: 301 - 307 (1993); 和Thorens, B., et al., Diabetes, 42: 1219 - 1225 (1993)]。对于胰岛素依赖性糖



尿病患者，GLP-1(7-36) 酰胺通过刺激胰岛素敏感性和通过在生理浓度下促进葡萄糖诱发的胰岛素释放，而发挥显著的抗糖尿病发生的作用[Gutniak M., et al., New England J. Med. 326: 1316-1322 (1992)]。如果对非胰岛素依赖性糖尿病患者给药，GLP-1(7-36) 酰胺则可刺激胰岛素释放，减少胰高血糖素分泌，抑制胃排空，并提高对葡萄糖的利用[Nauck, 1993; Gutniak, 1992; Nauck, 1993]。

将 GLP-1 类分子用于糖尿病的长效治疗是不可能的，因为这种肽的血清半衰期非常短。例如，GLP-1(7-37) 只有 3-5 分钟的血清半衰期。GLP-1(7-36) 酰胺皮下注射给药时具有约 50 分钟的半衰期。因此，为了达到长时间的作用，这些 GLP 分子必须以连续输注给药 [Gutniak M., et al., Diabetes Care 17: 1039-1044 (1994)]。对于本发明，GLP-1 的短半衰期以及因此而必须连续给药并不是不利条件，因为在心脏病监护室中患者通常都已卧床，并要连续地非肠道给予液体。

发明概述

本发明提供了降低心肌梗死后死亡率和发病率的方法，包括在需要时以可使患者血糖正常的剂量向患者给予 GLP-1, GLP-1 类似物, GLP-1 衍生物, 及其可药用的盐。

本发明具有降低急性心肌梗死期间以葡萄糖和胰岛素联合治疗时所见的心肌梗死后死亡率和发病率的优点，而省去了经常监测血糖、分析血糖结果和调节胰岛素输注速率带来的不便和昂贵费用，并消除了伴随胰岛素输注存在的低血糖的危险。

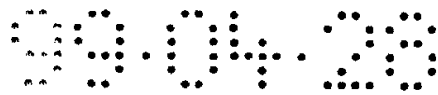
附图简述

图 1 显示 5 名非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM) 患者，在夜间连续输注 GLP-1(7-36) 酰胺对平均血糖浓度 (mM) (—■—) 的作用。此图还显示出，相同的这 5 名 NIDDM 患者，但在不同的一天夜间，连续输注胰岛素对平均血糖浓度 (—○—) 的作用。

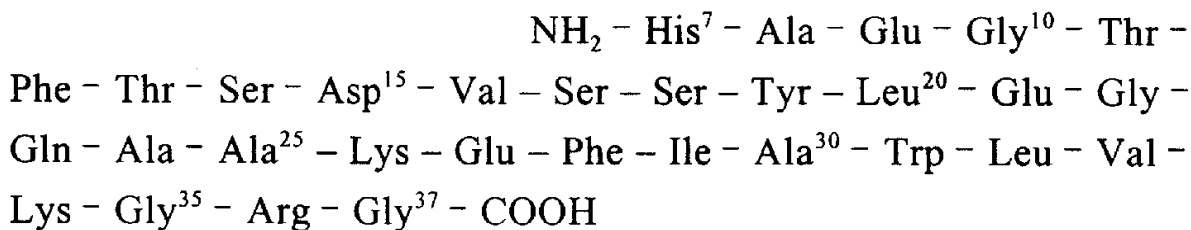
图 2 显示 5 名 NIDDM 患者，在一天内的 3 次用餐开始时，开始的 3 小时 GLP-1(7-36) 酰胺输注对平均血糖浓度 (mM) (—■—) 的作用。此图还显示相同的这 5 名 NIDDM 患者，但在不同的一天，在每次用餐之前短时间皮下注射胰岛素对平均血糖浓度 (—○—) 的作用。

发明详述

GLP-1 意指 GLP-1(7-37)。按专业习惯，GLP-1(7-37) 的



氨基末端已被指定为序号 7，而羧基末端被指定为序号 37。本专业人员都熟知 GLP-1 (7-37) 的氨基酸序列，但为了方便读者，仍提供于下：

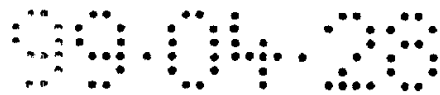


(SEQ ID NO: 1)

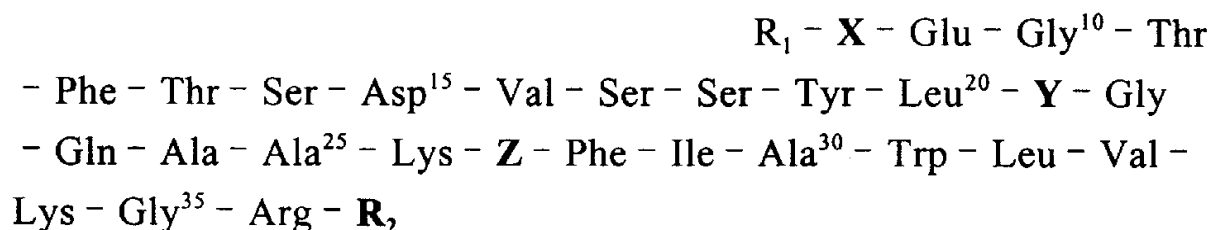
5 “GLP-1 类似物”被定义为，与 GLP-1 相比较，具有一个或几个氨基酸取代，删除，转换或增加的分子。本领域已知的 GLP-1 类似物包括例如，GLP-1 (7-34) 和 GLP-1 (7-35)，GLP-1 (7-36)，Gln⁹-GLP-1 (7-37)，D-Gln⁹-GLP-1 (7-37)，Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)，以及 Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)。优选的 GLP-1 类似物是 GLP-1 (7-34) 和 GLP-1 (7-35)，它们被公布在 U.S. Patent No: 5,118,666 中，在此引入此专利作为参考，还有 GLP-1 (7-36)，是 GLP-1 的生物学加工形式，具有促胰岛素特性。另一些 GLP-1 类似物被公布在 U.S. Patent No. 5,545,618 中，此专利在此也被引入作为参考。

15 “GLP-1 衍生物”被定义为如下一种分子，它具有 GLP-1 或 GLP-1 类似物氨基酸序列，但是另外还具有化学修饰的一个或几个氨基酸侧链基团， α -碳原子，末端氨基，或者末端羧酸基。化学修饰包括，但不局限于，增加部分化学结构，生成新键，和除去部分化学结构。对氨基酸侧链基团的修饰包括，但不局限于，赖氨酸 ϵ -氨基的酰基化，精氨酸，组氨酸或赖氨酸的 N-烷基化，谷氨酸或天冬氨酸羧酸基的烷基化，以及谷氨酰胺或天冬酰胺的脱酰氨基。末端氨基的修饰包括，但不局限于脱氨基，N-低级烷基修饰，N-二低级烷基修饰和 N-酰基修饰。对末端羧基的修饰包括但不局限于酰胺修饰，低级烷基酰胺修饰，二烷基酰胺修饰和低级烷基酯修饰。低级烷基是 C₁-C₄ 烷基。并且，还可以用蛋白质化学的普通技术人员熟知的保护基，保护一个或几个侧链基团或末端基团。还可以使氨基酸的 α -碳原子单甲基化或二甲基化。

25 用于本发明的一组优选的 GLP-1 类似物和衍生物，由如下结构式



的分子及其药剂学允许的盐组成:



(SEQ ID NO: 2)

其中: R_1 选自 L-组氨酸, D-组氨酸, 脱氨基组氨酸, 2-氨基组氨酸, β -羟基组氨酸, 高组氨酸, α -氟甲基组氨酸和 α -甲基组氨酸; X 选自
5 丙氨酸, 甘氨酸, 缬氨酸, 苏氨酸, 异亮氨酸和 α -甲基丙氨酸; Y 选自
谷氨酸, 谷氨酰胺, 丙氨酸, 苏氨酸, 丝氨酸和甘氨酸; Z 选自谷氨酸,
谷氨酰胺, 丙氨酸, 苏氨酸, 丝氨酸和甘氨酸; R_2 选自 NH_2 , 和甘氨酸
-OH; 还必须此化合物的等电点在大约 6.0-9.0 的范围内, 并且进一步
10 R_2 必须是 NH_2 .

已公开了许多具有此范围等电点的 GLP-1 类似物和衍生物, 包括
例如:

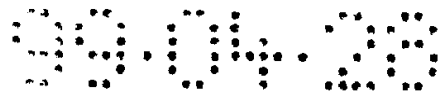




在 WO 91/11457 中还公开了另一组可用于本发明的优选活性化合物，基本上由 GLP-1(7-34)，GLP-1(7-35)，GLP-1(7-36)，或 GLP-1(7-37)，或者其酰胺形式，以及其药剂学允许的盐组成，此化合物具有至少一种选自如下的修饰：

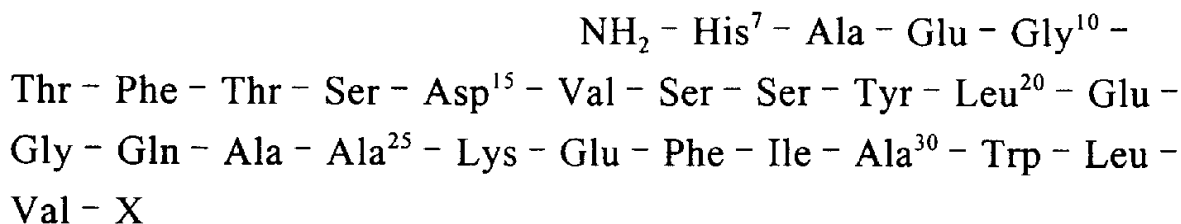
- 5 (a) 以如下氨基酸之一取代位置 26 和/或位置 34 的赖氨酸：甘氨酸，丝氨酸，半胱氨酸，苏氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丙氨酸，缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸，苯丙氨酸，精氨酸，或 D-赖氨酸；或者以如下氨基酸之一取代位置 36 的精氨酸：甘氨酸，丝氨酸，半胱氨酸，苏氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丙氨酸，缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸，苯丙氨酸，赖氨酸，或 D-精氨酸；
- 10 (b) 以氧化作用抗性氨基酸取代位置 31 的色氨酸；
- (c) 至少如下之一的取代：以酪氨酸取代位置 16 的缬氨酸；以赖氨酸取代位置 18 的丝氨酸；以天冬氨酸取代位置 21 的谷氨酸；以丝氨酸取代位置 22 的甘氨酸；以精氨酸取代位置 23 的谷氨酰胺；以精氨酸取代位置 24 的丙氨酸，以及以谷氨酰胺取代位置 26 的赖氨酸；和
- 15 (d) 至少如下之一的取代：以甘氨酸，丝氨酸，或半胱氨酸取代位置 8 的丙氨酸；以天冬氨酸，甘氨酸，丝氨酸，半胱氨酸，苏氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丙氨酸，缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸，或苯丙氨酸取代位置 9 的谷氨酸；以丝氨酸，半胱氨酸，苏氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丙氨酸，缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸，或苯丙氨酸取代位置 10 的甘氨酸；以及以谷氨酸取代位置 15 的天冬氨酸；和
- 20 (e) 以甘氨酸，丝氨酸，半胱氨酸，苏氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，酪氨酸，丙氨酸，缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，甲硫氨酸，或苯丙氨酸，或者组氨酸的 D-或 N-酰基化形式或烷基化形式取代位置 7 的组氨酸；其中取代作用是 (a)，(b)，(d) 和 (e) 时，被取代的氨基酸可任选地是 D-构型，并且，在位置 7 被取代的氨基酸可以任选地是 N-酰基化或 N-烷基化形式。

25 因为二肽基-肽酶 IV (DPP IV) 可能与所观察到的在体内给予的 GLP-1 迅速失活有关[参见例如 Mentlein, R., et al., Eur. J. Biochem., 214: 829-835(1993)], 所以优选的是给予能抵抗 DPP IV 活性的 GLP-1 类似物和衍生物，更优选的是给予 Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-



GLP-1 (7-37) OH, α -甲基-Ala⁸-GLP-1 (7-36) NH₂, 和 Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37) OH, 或者其药剂学允许的盐。

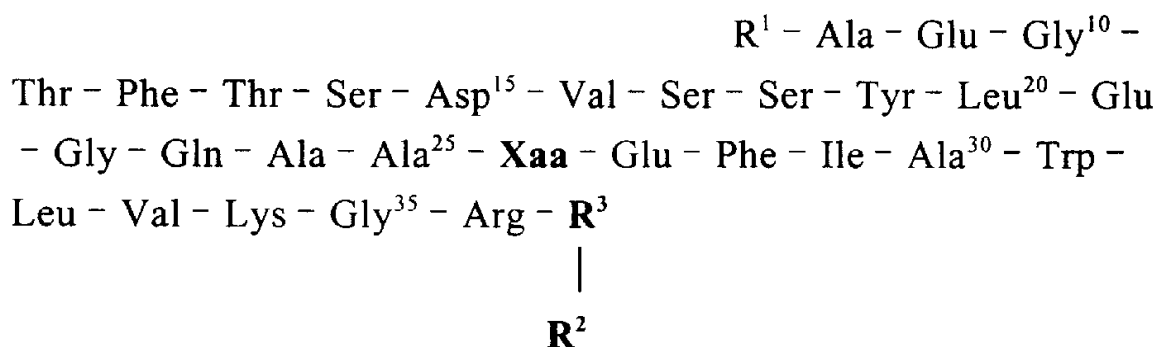
5 把在 U.S. Patent No. 5,188,666 中要求专利保护的分子用于本发明是优选的, 特别将此专利引入作为参考。这种分子是选自具有如下氨基酸序列的肽以及该肽的衍生物:



(SEQ ID NO: 3)

10 在此氨基酸序列中, X 是选自 Lys 和 Lys-Gly, 对于衍生物, 其中的肽选自: 该肽的药剂学允许的酸加成盐; 该肽的药剂学允许的羧酸盐; 该肽的药剂学允许的低级烷基酯; 以及该肽的药剂学允许的酰胺, 选自酰胺, 低级烷基酰胺, 和低级二烷基酰胺。

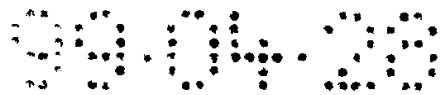
另一组用于本发明的优选分子, 由在 U.S. Patent No. 5,512,549 中要求专利保护的化合物及其药剂学允许的盐组成, 在此特将此专利引入作为参考, 这些化合物具有如下通式:



(SEQ ID NO: 4)

15

其中 R¹ 是选自 4-咪唑丙酰基, 4-咪唑乙酰基, 或 4-咪唑- α,α 二甲基-乙酰基; R² 是选自无分支链 C₆-C₁₀ 酰基, 或者不存在; R³ 是选自 Gly-OH 或 NH₂; Xaa 是 Lys 或 Arg, 这些化合物可用于本发明。



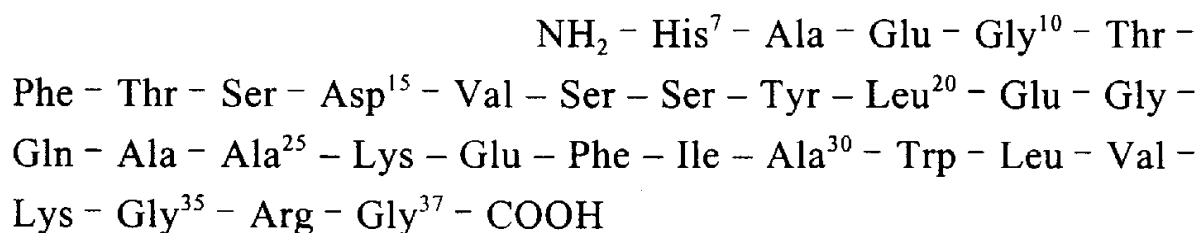
用于本发明更优选的 SEQ ID NO: 4 化合物, 是那些其中 Xaa 是 Arg, R² 是无分支链 C₆ - C₁₀ 酰基的化合物。

用于本发明高度优选的 SEQ ID NO: 4 化合物, 是那些其中 Xaa 是 Arg, R² 是无分支链 C₆ - C₁₀ 酰基, R³ 是 Gly - OH 的化合物。

5 用于本发明更高度优选的 SEQ ID NO: 4 化合物, 是那些其中 Xaa 是 Arg, R² 是无分支链 C₆ - C₁₀ 酰基, R³ 是 Gly - OH, 并且 R¹ 是 4 - 咪唑丙酰基的化合物。

用于本发明最优选的 SEQ ID NO: 4 化合物, 是其中 Xaa 为 Arg, R² 是无分支链 C₈ 酰基, R³ 是 Gly - OH, R¹ 是 4 - 咪唑丙酰基的化合物。

10 把在 U.S. Patent No. 5,120,712 中要求专利保护的分子用于本发明是高度优选的, 特将此专利引入作为参考。这种分子是选自具有如下氨基酸序列的肽, 以及该肽的衍生物:

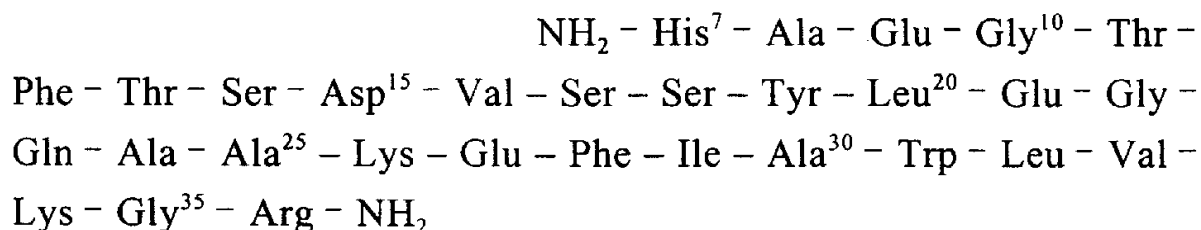


(SEQ ID NO: 1)

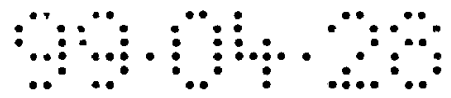
15 其中的肽是选自: 该肽的药剂学允许的酸加成盐, 该肽的药剂学允许的羧酸盐; 该肽的药剂学允许的低级烷基酯; 以及该肽的药剂学允许的酰胺, 选自酰胺, 低级烷基酰胺, 和低级二烷基酰胺。

将 GLP - 1 (7 - 36) 酰胺, 或其药剂学允许的盐用于本发明是最高度优选的。GLP - 1 (7 - 36) 的氨基酸序列是:

20



(SEQ ID NO: 5)



制备用于本发明的活性化合物的方法，即制备用于本发明的 GLP - 1, GLP - 1 类似物，或 GLP - 1 衍生物的方法是熟知的，并在 U.S. Patent Nos. 5,118,666, 5,120,712, 和 5,523,549 中描述了，这些专利被引入作为参考。

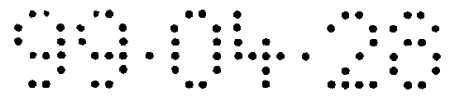
5 用于本发明的活性化合物的氨基酸部分，或者其前体部分，可通过如下几种方法制备：1) 固相化学合成法，2) 从天然来源的 GLP 分子纯化，或者 3) 采用重组 DNA 技术。

多肽的固相化学合成法是本领域熟知的，可以在一般教科书的范围内找到，例如 Dugas, H. and Penney, C., Bioorganic Chemistry, Springer, 10 Verlag, New York (1981), pp. 54 - 92, Merrifield, J.M., Chem. Soc., 85: 2149 (1962), 以及 Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Freeman, San Francisco (1969) pp. 24 - 66.

例如，氨基酸部分可使用 430A 肽合成仪 (PE - Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA94404)，通过固相法合成，合成循环由 PE - Applied Biosystems 提供。BOC - 氨基酸的其它试剂可从 PE - Applied Biosystems 和其它化学试剂商店购得。为了生成 C - 15 末端的氨甲酰，采用双偶联方案的顺序 Boc 化学法用于起始的对 - 甲基二苯甲基胺树脂。为了生成 C - 末端的酸，可使用相应的 PAM 树脂。使用预先形成的羟基苯并三唑酯，可偶联天冬酰胺，谷氨酰胺和精氨酸。20 可使用如下的侧链保护基：

精氨酸，甲苯磺酰基
天冬氨酸，环己基
谷氨酸，环己基
丝氨酸，苄基
苏氨酸，苄基
酪氨酸，4 - 溴苄氧羰基

Boc 去保护可在二氯甲烷中用三氟乙酸来实现。合成完成之后，可用含有 10% 间 - 甲酚的无水氢氟酸 (HF)，使肽去保护，并从树脂上断 25 裂下来。侧链保护基的断开，以及肽与树脂断开是在 - 5°C - 5°C 下进行，优选地是在冰浴上持续 60 分钟。除去 HF 之后，用乙醚洗肽和树脂，然



后用冰醋酸抽提出肽，并冷冻干燥。

还可采用重组 DNA 技术领域普通技术人员熟知的技术，制备用于本发明的活性化合物。实际上，由于其较高的产率，重组 DNA 法可能更优越。重组体生产过程的基本步骤是：

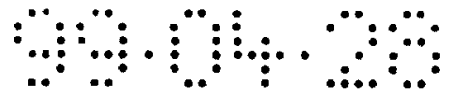
- a) . 分离天然的编码 GLP-1 分子的 DNA 序列，或者构建一个合成或半合成的 GLP-1 分子 DNA 编码序列，
- b) . 将此编码序列以适合于表达单独的蛋白质或融合蛋白质的方式放入一种表达载体中，
- c) . 用此表达载体转化适当的真核或原核宿主细胞，
- d) . 在将允许表达 GLP-1 分子条件下培养此转化的宿主细胞，以及
- e) . 回收和纯化重组产生的 GLP-1 分子。

5 如以前所述，此编码序列可能是全合成的，或者是较大的，天然编码胰高血糖素的 DNA 修饰产物。在 Lund, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 345 - 349 (1982) 中报导了编码前胰高血糖素原的 DNA 序列，通过将其天然序列改变成所需的序列，它可以被用作半合成产物的起始原料。

10 可以借助于本领域熟知的技术构建合成基因，使之在体外或体内转录和翻译，生成 GLP-1 分子产物。由于遗传密码的天然简并性，技术人员将意识到，可能需要构建相当大量而限定数量的 DNA 序列，它们全都能编码 GLP-1 分子。

15 合成基因的构建法是本领域熟知的。参见 Brown, et al., (1979), 酶学方法, Academic Press, N.Y., 68: 109 - 151. 可应用遗传密码，根据所需要的氨基酸序列设计这种 DNA 序列。普通的生物学技术人员都易探明这种设计。一旦设计完成，此序列本身可用常规的 DNA 合成仪如 380A 型或 380B 型 DNA 合成仪 (PE - Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) 来产生。

20 为了表达用于本发明的化合物的氨基酸部分，可通过使用适当的限制性内切核酸酶，将所设计的合成 DNA 序列插入多种适当的重组 DNA 表达载体中的任何一种。一般可参见 Maniatis et al., (1989) 分子克隆 - 实验室手册, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1 - 3. 可将限制性内切核酸酶的作用位点，设计在编码 GLP-1 分子的 DNA 的



二端，以便于分离，并便于整合进入，扩增和表达本领域熟知的载体。所采用的特定内切核酸酶将由限制性内切核酸酶对使用的原代表达载体的切割方式来确定。选择限制性位点，以便使此编码序列与各调控序列正确定向，从而达到适当的框内读码，并表达所需要的蛋白质。必须使此编码序列定位在适当的读框内，此读框带有表达载体的启动子和核糖体结合位点，它们二者在表达此蛋白质的宿主细胞内都具有功能。

为了使此合成基因实现有效的转录，必须使它与启动子操纵基因区有效地相结合。因此，可将此合成基因的启动子-操纵基因区置于与合成基因的 ATG 起始密码子相同顺序的取向。

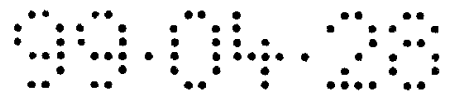
本领域已熟知多种可用于转化原核细胞和真核细胞的表达载体。可参阅 Promega 生物学研究产品目录 (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399); 和 Stratagene 克隆系统目录 (1992) (Stratagene Corp. 11011 North Torrey Pines Road, La. Jolla, CA, 92037)。还有 U.S. Patent No. 4,710,473 描述了几种可用于在 *E. coli* 中高水平表达外源性基因的环形 DNA 质粒转化载体。这些质粒可在重组 DNA 程序中用作转化载体，并且

- (a) 可使此质粒具有在宿主细胞内自主复制的能力，
- (b) 可在维持宿主细胞培养物的温度下控制质粒自主复制，
- (c) 可使此质粒稳定地保留在宿主细胞群内，
- (d) 可指导合成指示质粒在宿主细胞群内保存的蛋白质产物，
- (e) 可顺序地提供该质粒单一的限制性内切核酸酶识别位点，以及
- (f) 可终止 mRNA 转录。

这些环形 DNA 质粒可在为获得高水平外源性基因表达的重组 DNA 程序中用作载体。

在完成构建用于本发明化合物的氨基酸部分的表达载体之后，下一步是将此载体置于适当的细胞中，从而构建一种可用于表达多肽的重组宿主细胞。用于以重组 DNA 载体转化细胞的技术是本领域熟知的，可以如 Maniatis, et al., 同上的这样一些综合文献中找到。宿主细胞可由真核细胞或原核细胞构建。

原核宿主细胞通常以较高的速度产生蛋白质，并较易培养。在高水平细菌表达系统中表达的蛋白质，特征性地凝聚成颗粒或包涵体，其中含有高浓度超量表达蛋白质。对这种蛋白质凝集物，一般都必须用本领域



域熟知的技术回收，溶解，变性和重折叠，参阅 Kreuger, et al., (1990) Protein Folding, Gierasch and King, eds., pgs 136 - 142, American Association for the Advancement of Science Publication No. 89 - 18S, Washington, D.C.; 和 U.S. Patent No. 4,923,967.

5 为了产生所需的 GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物，对前体 GLP-1 或 GLP-1 类似物氨基酸序列的改变可通过已知的方法制备：GLP-1 前体的化学修饰，酶修饰，或者化学和酶修饰的组合。经典的溶液相技术和半合成技术对于制备用于本发明的 GLP-1 分子，也可能是有用的。制备本发明 GLP-1 分子的方法，对于普通的肽化学技术人员是熟知的。

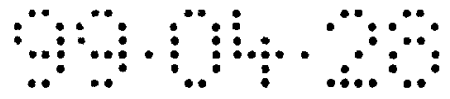
10 用本领域已知的多种方法中的任何一种，可实现将酰基加入 Lys³⁴ 的 ϵ -氨基。参见 Bioconjugate Chem. “蛋白质的化学修饰：历史和应用” pages 1, 2 - 12 (1990)，和 Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. 6 (2): 171 - 176 (1989)。

15 例如，使用在硼酸盐缓冲液中配制的 50% 乙腈，可将辛酸的 N-羧基-琥珀酰亚胺酯，加到赖氨酰- ϵ -胺中。可在加入咪唑基之前，或加入之后将此肽酰化。而且，如此肽是通过重组技术制备的，就可能在酶促断裂之前酰化。如在 WO 96-29342 中所描述的，GLP-1 衍生物中的赖氨酸也可以被酰化，在此将此专利引入作为参考。

20 本领域对多种被保护、未被保护和部分被保护的，天然的和非天然的 GLP-1 (7-36) 酰胺和 GLP-1 (7-37) 分子的功能性类似物和衍生物的存在和制备法已有论述[参见例如 U.S. Pat. No. 5,120,712 和 5,118,666, 此专利被引入作为参考，以及 Orskov, C., et al., J. Biol. Chem., 264 (22): 12826 - 12829 (1989) 和 WO 91/11457 (Buckley, D.I., et al., 1991.8.8 公布)]。

25 任选地，可以保护 GLP-1 衍生物的氨基端和羧基端氨基酸残基，或者任选地仅保护其中一端。在权威著作中论述了形成和除去这种保护基的反应，例如“有机化学中的保护基”，Plenum Press, London and New York (1973)；Green, T.H., “有机合成中的保护基”，Wiley, New York (1981)；以及“肽”，Vol. I, Schroder and Lubke, Academic Press London and New York (1965)。代表性的氨基保护基包括例如：甲酰基，乙酰基，异丙基，丁氧羰基，苄基甲氧羰基，苄氧羰基等。代表性的羧基保护基包括例如：苄基酯，甲基酯，乙基酯，叔-丁基酯，对-硝基苯基

30



酯等。

用于本发明的羧基末端低级烷基酯 GLP-1 衍生物，可通过在催化性酸如盐酸存在下，使所需的 ($C_1 - C_4$) 链烷醇与所需的多肽反应来制备。这种烷基酯形成的适当条件包括约 50°C 的反应温度，以及大约 1-3 小时的反应时间。相似条件下，可形成天冬氨酸和/或谷氨酸残基的烷基酯衍生物。

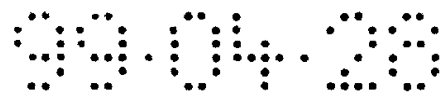
例如，按 Stewart, J. M., et al., “固相肽合成法”，Pierce Chemical Company Press, 1984 中所述的方法，可制备用于本发明化合物的氯甲酰衍生物。

10 GLP-1, GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物的药剂学允许的盐形式可用于本发明。通常用于形成酸加成盐的酸可以是无机酸如盐酸，氢溴酸，氢碘酸，硫酸，磷酸等，以及有机酸如对-甲苯磺酸，甲磺酸，草酸，对-溴苯磺酸，碳酸，琥珀酸，柠檬酸，苯甲酸，乙酸等。这类盐的实例包括：硫酸盐，焦硫酸盐，硫酸氢盐，亚硫酸盐，亚硫酸氢盐，
15 磷酸盐，一氢磷酸盐，二氢磷酸盐，偏磷酸盐，焦磷酸盐，氯化物，溴化物，碘化物，乙酸盐，丙酸盐，癸酸盐，辛酸盐，丙烯酸盐，甲酸盐，异丁酸盐，己酸盐，康酸盐，丙炔酸盐，草酸盐，丙二酸盐，琥珀酸盐，辛二酸盐，癸二酸盐，富马酸盐，马来酸盐，丁炔-1,4-二酸盐，乙烯-1,6-二酸盐，苯甲酸盐，氯苯甲酸盐，甲基苯甲酸盐，二硝基苯甲酸
20 盐，羟基苯甲酸盐，甲氧基苯甲酸盐，邻苯二甲酸盐，磺酸盐，二甲苯磺酸盐，苯乙酸盐，苯丙酸盐，苯丁酸盐，柠檬酸盐，乳酸盐， γ -羟基丁酸盐，乙醇酸盐，酒石酸盐，甲磺酸盐，丙磺酸盐，萘-1-磺酸盐，萘-2-磺酸盐，扁桃酸盐等。优选的酸加成盐是那些与无机酸如盐酸和氢溴酸，特别是盐酸形成的盐。

25 碱加成盐包括那些从无机碱生成的盐如铵或者碱金属或碱土金属的氢氧化物，碳酸盐，碳酸氢盐等。因此，可用于制备本发明盐的碱包括氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化铵，碳酸钾等。这类盐形式是特别优选的。

用于本发明的 GLP-1, GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物，在用于本发明之前，可以用一种或几种赋形剂形成制剂。例如，可将用于本发明的活性化合物，通过熟知的方法与二价金属阳离子络合。此类金属阳离子包括例如 Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , 等。

任选地，用于本发明的活性化合物还可以用药剂学允许的缓冲剂混



合，调节 pH 以便提供必要的稳定性，以及使其 pH 适合于非经肠道给药。

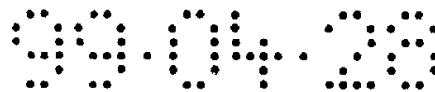
还可任选地加入一种或几种药剂学允许的抗微生物剂。偏 - 甲氧甲酚和苯酚是优选的药剂学允许的抗微生物剂。还可以加入一种或几种药剂学允许的盐，以便调节其离子强度或张力。并可加入一种或几种赋形剂，以便进一步调节本制剂的等张性。甘油是等张性调节赋形剂的一个实例。

可以通过普通医生认为有效的任何途径给药。优选的是非经肠道给药。在医学文献中非经肠道给药通常理解为，借助于无菌注射器或某种其它医疗设备如输注泵，将一种剂型的药剂注射进入体内。非经肠道给药途径包括：静脉内、肌肉、皮下、腹膜内、椎管内、鞘内、脑室内、动脉内、蛛网膜下、和硬膜外给药。对用于本发明的化合物，较优选的是静脉内，肌肉和皮下给药途径。对用于本发明的化合物，更高度优选的是静脉内和皮下给药途径。为了非经肠道给药，优选的是将用于本发明的活性化合物，与适当 pH 的蒸馏水组合。

另一些药剂学方法可用于控制作用的持续时间。通过使用聚合物混合或吸附用于本发明的活性化合物，可获得控制释放的制剂。为了延长释放时间，通过选择适当的大分子，并选择大分子的浓度，以及掺入的方法，可得到适当的持续时间，适当的大分子包括例如，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，或硫酸精蛋白。另一种通过控制释放制剂而延长作用持续时间的可能方法是，将用于本发明的活性化合物掺入聚合物材料如聚酯，聚氨基酸，水凝胶，聚（乳酸）或乙烯醋酸乙烯酯共聚体的微粒中。另一种方法不是将化合物掺入这些聚合物微粒，可能是将用于本发明的化合物捕获进入例如通过凝聚技术或通过界面聚合作用制备的微囊中，例如分别进入羧甲基纤维素或明胶微囊中，或者捕获进入胶体药物投递系统例如脂质体，白蛋白微球，微乳剂粒，毫微颗粒，及毫微小囊中，或者捕获进入大乳剂粒中。在 Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 中公开了这些技术。

“心肌梗死”的诊断涉及医学判断，通常要出现至少两种以下症状和症候：

- 1) 持续至少 15 分钟的胸痛；
- 2) 症状出现后 10 - 16 小时血清肌酸激酶和血清肌酸激酶 B 的至少



两个值高于正常范围至少两个标准偏差；

3) 症状出现后 48 - 72 小时之内血清乳酸脱氢酶水平有两个或两个以上高于正常范围至少两个标准偏差，包括心肌梗死典型的同工酶图谱；

5 4) 在 12 个标准 ECG 导程 (lead) 的至少两个中形成新的 Q 波和/或出现 ST 升高，随后是 T 波倒转。

出现上述症状或症候之后 72 小时之内进入心肌梗死的急性期。作为本发明主题的治疗是在心肌梗死的急性期进行，即在急性心肌梗死期间进行。

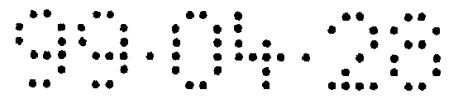
10 需要接受用于本发明化合物的患者是处于心肌梗死急性期的患者，并且该患者能够自主调节血糖。患者能够自主调节血糖是指患者：1) 根据国家糖尿病数据小组的定义 (Diabetes, 28:1039-1057(1979)) 已被诊断患有胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 或非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM)；
15 2) 即使原来未被诊断患有糖尿病血糖水平也高于 11mmol/l；或 3) 具有异常的血糖耐受。

对于使患者血糖水平正常化有效的 GLP-1, GLP-1 类似物, 或 GLP-1 衍生物的剂量, 将取决于多种因素, 其中包括, 但不局限于, 患者的性别, 体重和年龄, 不能调节血糖的严重程度, 不能调节血糖的根本原因, 是否同时给予了葡萄糖或另一种碳水化合物来源, 给药途径和生物
20 有效度, 在体内保持时间, 制剂, 以及药效。在持续给药的情况下, 适当的剂量速度为 0.25 - 6 pmol/kg 体重/分钟, 优选地为约 0.5 - 1.2 pmol/kg/分钟。在断续给药的情况下, 每次给药的剂量应该考虑到给药的间隔时间, GLP-1, GLP-1 类似物, 或 GLP-1 衍生物的生物有效度, 以及达到正常血糖需要调节的水平。确定 GLP-1, GLP-1 类似物, 或
25 GLP-1 衍生物的给药剂量和速度, 以获得理想的临床效果, 这应该在普通医生的技能范围之内。

通过参考具体的实施例, 将会更容易地理解本发明, 提供这些实施例, 仅为了说明, 而不是限制本发明。

实施例 1

30 对 5 名患有非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM) 的患者, 在夜间通过皮下渗入法以 1.2 pmol/kg/hr 的剂量速度, 给予 GLP-1 (7-36) 酰胺 10 小时。对同样的这 5 名患者, 在与 GLP-1 (7-36) 酰胺渗注不同的一



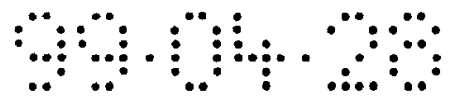
天，以胰岛素连续输注作为对照。每 2 小时调整胰岛素输注的速度以得到最佳控制并避免低血糖。如表 II 和图 2 中的数据所示，皮下渗入 GLP-1 (7-36) 酰胺，几乎使血糖正常化了，没有对任何患者诱发了低血糖。以 GLP-1 (7-36) 酰胺达到的代谢控制，比通过胰岛素的更好，与对照相比较，GLP-1 (7-36) 酰胺治疗的平均血糖较低，在 23:00, 0:00 和 1:00 的差异量具有统计学显著性。

表 1. 对 5 名 NIDDM 患者在晚间以 GLP-1 (7-36) 酰胺，连续渗注 10 小时的平均血糖水平。在不同的一天对相同的这些患者的对照试验中，以胰岛素连续输注给药。

时间	GLP-1 渗注		胰岛素输注(对照)	
	平均血糖 (mM)	标准误 (mM)	平均血糖 (mM)	标准误 (mM)
21:00	7.5	0.45	6.9	0.68
22:00	5.4	0.76	6.6	0.55
23:00	4.1	0.16	5.9	0.98
0:00	4.4	0.23	5.6	0.90
1:00	4.4	0.29	5.1	0.58
2:00	4.8	0.34	5.2	0.58
3:00	5.2	0.41	5.4	0.30
4:00	5.4	0.41	5.7	0.25
5:00	5.8	0.41	6.0	0.30
6:00	6.0	0.45	6.1	0.38
7:00	6.2	0.45	6.1	0.33

实施例 2

10 在一天内，对 5 名 NIDDM 患者在早餐，午餐和晚餐时分别渗注 3 小时 GLP-1 (7-36) 酰胺。渗注时间是 7:30-10:30 (早餐)，10:30-1:30 (午餐)，和 4:30-7:30 (晚餐)，如图 3 中所示。对照实验是对相同的这 5 名 NIDDM 患者在不同的一天进行，正好在用餐开始之



前皮下注射胰岛素，如图 3 中所示。当渗注 GLP-1 时，由注射胰岛素所见到的用餐后血糖变化被消除了，保持了正常血糖水平。每次 GLP-1 (7-36) 酰胺渗注终止之后，血糖水平立即显著地上升。未观察到 GLP-1 (7-36) 酰胺的任何不良副作用。这些数据表明，与注射胰岛素相比，GLP-1 (7-36) 酰胺渗注能更有效控制用餐后的血糖水平，并且只要 GLP-1 (7-36) 酰胺渗注继续进行，这种控制就有效。

表 2. 对 5 名 NIDDM 患者，在每次开始进餐时，以 GLP-1 (7-36) 酰胺渗注 3 小时的平均血糖水平。在不同的一天对相同的这些患者的对照试验中，在正好每次用餐前皮下注射给予胰岛素。用餐开始在 7: 30, 10: 30, 和 4: 30。

时间	GLP-1 渗注		胰岛素皮下注射	
	平均血糖 (mM)	标准误 (mM)	平均血糖 (mM)	标准误 (mM)
7: 00	5.4	0.35	6.1	0.41
8: 00	4.9	0.38	7.0	0.51
9: 00	5.7	0.59	9.1	0.74
10: 00	5.8	1.06	9.9	0.78
11: 00	8.1	0.94	8.2	0.76
12: 00	9.4	0.59	6.5	0.74
13: 00	7.2	1.18	9.1	0.90
14: 00	5.3	1.21	8.1	0.91
15: 00	7.2	0.71	7.0	0.87
16: 00	10.4	0.26	7.2	0.57
17: 00	9.2	1.06	6.5	0.59
18: 00	5.7	1.59	7.3	0.65
19: 00	6.6	0.94	6.1	0.59
20: 00	8.3	0.71	6.0	0.41
21: 00	9.3	0.71	6.4	0.44

说明书附图

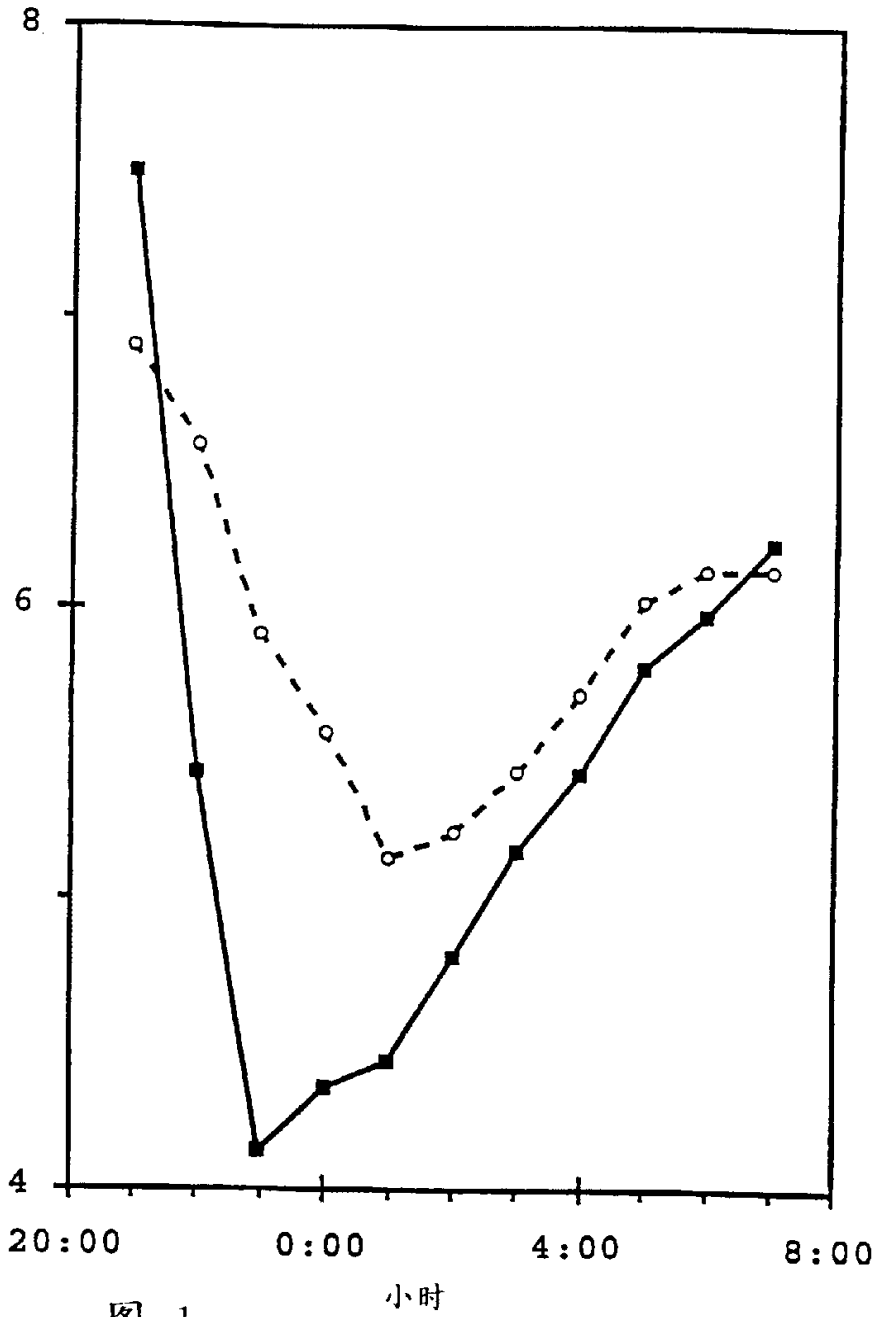


图 1

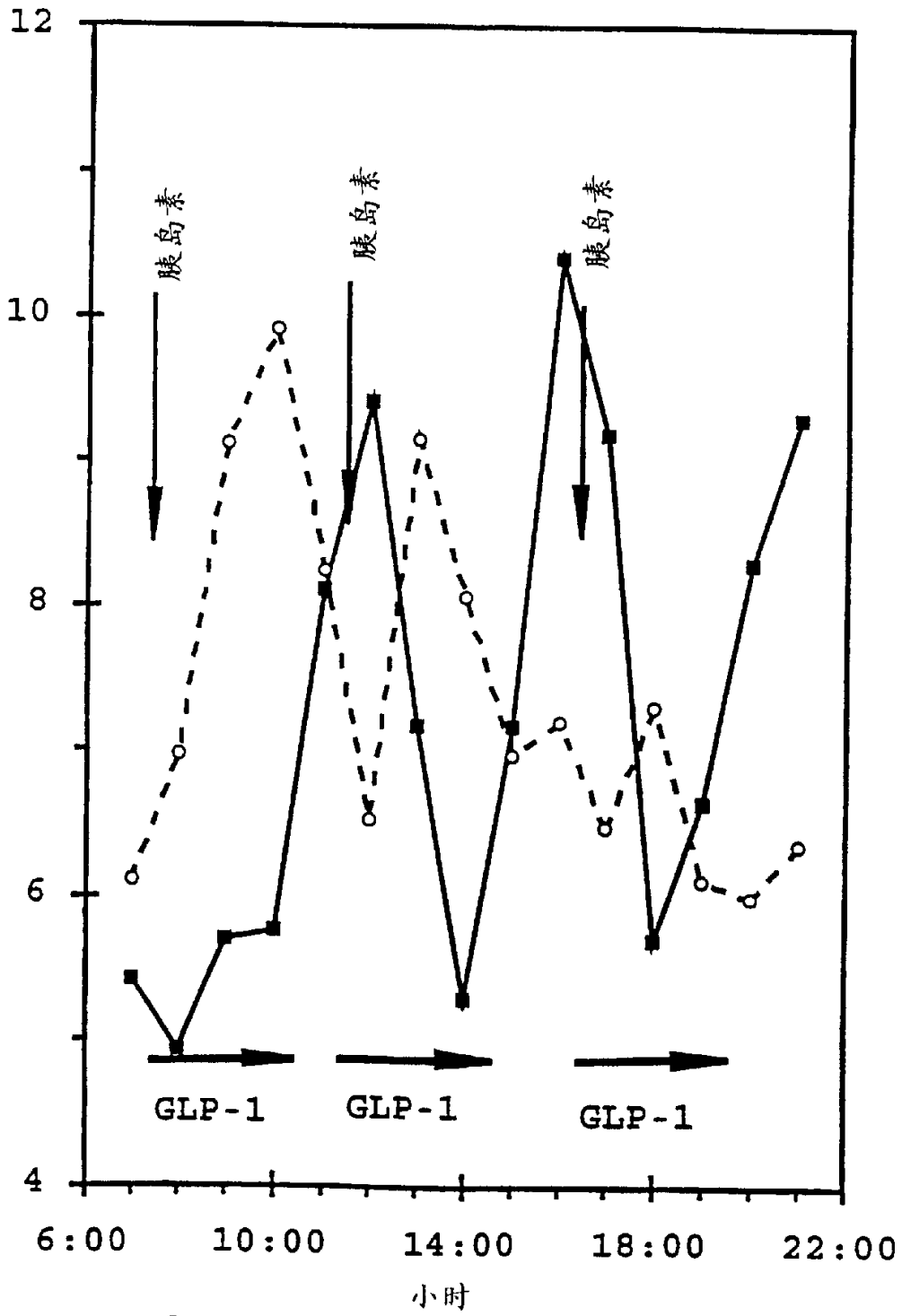


图 2