

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/26

A61P 9/10

# [12] 发明专利申请公开说明书

//(A61K38/26,31: 7004)

(A61K38/26,31: 7004,33: 00)

[21] 申请号 00806935.2

(A61K38/26,38: 44)

(A61K38/26,38: 06)

[43]公开日 2002年10月23日

[11]公开号 CN 1376072A

[22]申请日 2000.5.1 [21]申请号 00806935.2

[30]优先权

[32]1999.4.30 [33]US [31]09/303,016

[86]国际申请 PCT/US00/11652 2000.5.1

[87]国际公布 WO00/66142 英 2000.11.9

[85]进入国家阶段日期 2001.10.30

[71]申请人 拜尔内布拉斯加股份有限公司

地址 美国内布拉斯加州

[72]发明人 T·R·库利奇

M·R·W·埃勒斯

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 利用胰高血糖素样肽-1 或其生物活性类似物代谢介入以改善缺血性及再灌注大脑的功能

[57]摘要

现发现在急性中风或脑出血后使用 GLP-1 治疗(优选静脉给药)是一种理想的治疗方法,因为它提供了一种优化胰岛素分泌的方法,它可增强大脑的合成代谢,可通过抑制胰高血糖素而增强胰岛素的效用,和维持正常的血糖水平或适度的低血糖,同时没有严重低血糖的风险。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

# 权 利 要 求 书

---

1. 一种改善在缺血期后血流再灌注所引起的脑组织损伤的方法，其特征在于，它包括：对需要治疗的个体，给予有效量的组合物，该组合物含有在  
5 制药用载体中的、可结合于胰高血糖素样肽-1 受体的化合物。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，胰高血糖素样肽-1 是 GLP-1 和其生物活性类似物。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，制药用载体是选自下组：盐水、缓冲盐水、葡聚糖、水、甘油、乙醇、乳糖、磷酸盐、甘露醇、精氨酸、  
10 海藻糖、和它们的组合。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，对需要治疗的个体的给药是静脉给药 0.1-10 pmol/kg/min。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，同时给予葡萄糖。
6. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，同时给予氧消除剂。
- 15 7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，给药在缺血事件发生 4 小时内开始。
8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，给药在缺血事件发生 4 小时内进行并持续。
9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，给药是以 0.1-10pmol/kg/min  
20 静脉连续给药。
10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，给药是丸药的皮下注射，剂量为 0.1-75nmol/kg。
11. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，给药方式是皮下或微压注射、肺深部吸入、外置泵或埋置泵、注射药库，和其他缓释给药机制，和敷贴、  
25 口腔和其他透皮、透膜的给药机制。
12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，给药是静脉给药，并且与葡萄糖联用。
13. 一种 GLP-1 代谢介入从而改善缺血和再灌注脑细胞功能的方法，其特征在于，所述的方法包括：给予需要用治疗的个体有效量的组合物，该组合物含有 GLP-1 和药物载体。  
30
14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，胰高血糖素样肽-1 是 GLP-

- 1 或其生物活性类似物。
15. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，药物载体选自下组：盐水、缓冲盐水、葡聚糖、水、甘油、乙醇、乳糖、磷酸盐、甘露醇、精氨酸、海藻糖和它们的组合。
- 5 16. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，对需要治疗的个体的给药剂量为 0.1-10pmol/kg/min。
17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，同时给予葡萄糖。
18. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，给药在缺血事件发生 4 小时内开始。
- 10 19. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，给药在缺血事件发生 4 小时内进行并持续。
20. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，在人感到缺血事件要发生时立刻给药。
21. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，需要运用代谢介入法改善  
15 的组织损伤是医学程序造成的，该医学程序是造成脑组织缺血的外科事件。
22. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，医学程序涉及再灌注事件。
23. 一种用于 GLP-1 代谢介入以改善缺血和再灌注脑组织功能的组合物，其特征在于，包括：有效量的 GLP-1 或其生物活性类似物，和药学上有效的载体。

# 说明书

---

利用胰高血糖素样肽-1 或其生物活性类似物代谢介入  
以改善缺血性及再灌注大脑的功能

5

## 发明领域

本发明有关一种改善缺血性及再灌注大脑功能的有效治疗法。

## 发明背景

10 中风，或脑血管意外，是由于流向脑部某一区域的脑血流急性受阻而引起的。在美国每年大约有五十万个病例，其中 30%是致死性的，因此中风在美国位于主要致死原因的第三位。其中 80%的中风是“缺血性”的，这是某一脑动脉急性栓塞(通常是血液凝块或血栓)及血流量的减少所造成的。余下部分是“大出血性”的，这是由于脑动脉的破裂而使大量血液流入脑器官，接着就可发生因局部组织的收缩而使血流受阻，导致缺血。

中风通常发生在 65 岁以上的个体，而高血压是最主要的风险因素。但是还有一些重要的风险因素，糖尿病就是其中最主要的因素，它能增加 2-3 倍的患病风险并与中风后死亡率及患病率增加有关。虽然其因果关系和潜在机理仍有争论，然而已有强有力的证据表明，高血糖本身不论其与糖尿病有关  
20 与否，均能增加与中风相关的死亡率和发病率。

至今，对急性中风仍无经证实的治疗方法，只是运用通常的医学支持疗法，接着对明显的损伤进行康复。1996 年，基于一定数量的对照试验，FDA 批准了运用组织纤维酶原激活剂(tPA)治疗急性中风。试验病例的一部分，但不是全部，显示出对临床效果有 30-55%的改善，总体上而言能减小死亡率和患病率。尽管颅内出血的风险有明显增加(tPA 治疗组为 6.4%，安慰剂治疗组  
25 为 0.64%)，其中半数是致死的，但还是获得了总体益处。因为对于安全性和不确定的有效性有担忧，用 tPA 进行溶栓疗法治疗急性缺血性中风并未被临床医生广泛接受。目前，溶栓疗法实际上限于主要的医学中心并由专业化的医学专家对急性中风进行治疗，限于经 CT 扫描无严重梗死迹象并且无包括糖  
30 尿病在内的严重医学症状的 70 岁以下患者。因此大约只有 1.5%可以作为 tPA

溶栓疗法候选者的病人接受了实际的治疗。这种状况可能随着临床运用经验的积累和适用病人类型更加明确的确定而有所改善。然而有证据表明中风后同时再灌注能改善状况，这支持了运用再灌注疗法的思路。

5 从这些考虑出发，很明显对于急性中风极迫切需要新型有效的疗法。这也激发了深入研究来寻找那些在缺血期(不论是缺血性还是出血性中风)能提供神经保护的鉴别策略，以及能阻断缺血性中风再通后的再灌注损伤的治疗方法。其目标是拯救阻塞中心周围所谓缺血半影区内的神经元。待选的药剂可分为三大组：兴奋毒性抑制剂；白细胞粘附抑制剂；和神经营养因子。在第一组中，最主要的注意力集中在阻断神经递质谷氨酰氨的兴奋毒性作用，  
10 主要是通过阻断 NMDA 类的谷氨酰氨受体。其他的策略包括阻断钠离子和钙离子通道和清除一氧化氮。

第二种策略是阻断白细胞粘附，它基于这样一个前提，嗜中性粒细胞和单核细胞在再灌注损伤和梗死扩散方面起主要作用，使用相关粘附分子和炎性细胞因子的抑制剂可以防止其进入缺血区域(Jean 等，1998)。

15 第三种策略涉及使用神经营养因子，这些因子对处于缺血期和再灌注期的神经元提供综合的营养支持，从而保护神经元。在这组药剂中包括：碱性成纤维细胞生长因子和胰岛素。大量的研究表明，胰岛素在多种类型的中风模型中均有很强的神经保护作用。然而，胰岛素的使用又因高血糖的神经毒性、适度血糖的潜在益处和严重低血糖的致死可能性等不确定性而变得复杂  
20 化。

依据本发明，可以看出确实有真切和持续的需要，以便改善缺血性和再灌注大脑的功能。本发明也将满足这一需要作为主要的目标。

本发明的另一目标是在急性中风和出血后利用 GLP-1 或其生物活性类似物来优化胰岛素分泌、通过抑制胰高血糖素的拮抗作用来强化胰岛素的效用  
25 和维持正常血糖浓度或保持适度低血糖而避免严重低血糖的风险，从而治疗缺血性和再灌注大脑。

本发明的另一目标是运用一种组合物来达到上述目的，该组合物无严重低血糖的风险并能纠正高血糖。

本发明的另一目标是使用一种生物活性化合物进行治疗的方法，该化合物  
30 物而不管怎样都没有任何副作用的风险。

达到上述目标的方式的方法和手段会在下列的发明详细描述中阐明。

### 发明概述

现已发现在急性中风或出血后运用 GLP-1 进行治疗，最好是静脉给药，  
5 是一种理想的治疗方法。因为它提供一种优化胰岛素的分泌的方法，它可增加大脑的合成代谢，通过抑制胰高血糖素来强化胰岛素的效用，和维持正常的血糖或适度的低血糖且无严重低血糖的风险或其他不良反应。

### 发明详述

10 大量的动物及人的研究已经揭示了，高血糖与中风相关死亡率和患病率的严重程度是密切关联的。然而，对于血液中高葡萄糖浓度是否确实造成缺血时的神经元损伤，或高血糖只是对神经元损伤的继发性应激反应等还有相当的争论。一项在英国进行的 811 例急性中风的回顾性研究结论表明，高血糖预示着更高的死亡率和患病率并与其他不良预后症状相独立，因此它是神经损伤的原因。然而，这一结论受到了某些人根据统计结果而提出的挑战，  
15 在一些地区的研究结论表明，中风病人中的高血糖是脑损伤应激反应的结果而不是原因。不论怎样，很明显有 20-43%的中风病人表现出高血糖。这可部分归因于先前已有的糖尿病(占高血糖病人的 25-50%)，但是就大多数而言这似乎反映因急性中风应激反应而使得皮质激素，胰高血糖素和儿茶酚胺生成的增加。目前还不能明确地回答形成的高血糖是否和中风病人的神经元损伤是前因后果关系。  
20

有关澄清高血糖在造成神经元损伤中作用的努力集中在合适的急性中风的动物模型上。这些研究揭示了，在暂时性病灶性脑缺血后伴有再灌注的大鼠模型上(一个与用 tPA 血管化治疗缺血性中风的临床状况有关的模型)中，  
25 高血糖看上去与神经元损伤的加剧有因果关系。与病灶性缺血相比，不论是由在大鼠身上的暂时性心脏停搏还是由双侧血管阻塞造成的广泛性缺血的模型，高血糖都表现出较不明显的神经毒性。在这些广泛性缺血模型中的试验表现出胰岛素诱导的正常或偏低的血糖有神经保护作用，但这种效应看似由胰岛素直接介导的，与它的降血糖作用无关。这样，在动物身上的试验提示，  
30 在急性中风期之中和之后血糖的神经效应是复杂多样的，与缺血区域的范围大小和血液葡萄糖的作用时间密切相关。

不论是病灶性还是广泛性，缺血-再灌注的后果是可逆或不可逆的脑细胞损伤，细胞死亡和器官功能性效用的下降。

与一段缺血厌氧期及继发再灌注相关联的一种似是而非的细胞损伤理论是，细胞损伤和死亡看起来不仅仅只是直接由于缺氧阶段的结果，而且是在缺血阶段对氧化破坏高度敏感的组织再通氧所造成的。再灌注损伤从血流再通时即刻开始氧化性破坏，并作为在同一缺血性组织中发展的一个炎性过程，这种损伤持续及恶化达很多个数小时之久。旨在降低缺氧后细胞对氧化破坏的敏感性的努力和旨在减弱同一组织中炎性反应的努力都已显示出，可减轻缺氧后的再灌注器官的可逆性或不可逆性的损伤。一种组合了减轻最初的氧化破坏损伤和继发的炎性相关的损伤的方法，能提供协同保护以防止再灌注损伤。GLP-1 和其生物活性类似物可以通过在脑细胞上产生强劲的组成代谢作用而达此目的。

不仅仅是 GLP-1 及其生物活性类似物，这种疗法还包括使用自由基清除剂，诸如：谷胱甘肽(glutadione)，褪黑激素，维生素 E 和过氧化物歧化酶(SOD)。在这些组合中，使再灌注损伤的风险降到更低的程度。

对于治疗这样的病人，现行通用的方法是用诸如葡激酶或 tPA 等溶栓药物进行治疗。美国专利第 4, 976, 959 号揭示了一种使用 tPA 和 SOD 以抑制再灌注时组织损伤的疗法。这样，有越来越多的病人会受到再灌注损伤的危险和溶栓疗法所造成的影响。

本发明发现使用人 GLP-1，或其生物活性类似物，可增强或恢复胰岛素的分泌应答，产生了起神经保护作用的胰岛素，这可能由于直接的神经营养的效应，同样也可能是由于控制了中风相关的高血糖。

术语“GLP-1”，或胰高血糖素样肽，包括在本专利文本中使用的 GLP-1 模拟物和其生物活性类似物，它们可以包括胰高血糖素样肽及其相关肽、和胰高血糖素样肽-1 类似物，它们与诸如酰胺化 GLP-1(7-36)受体蛋白之类的胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体蛋白相结合，并象酰胺化 GLP-1(7-36)那样对胰岛素分泌有相应的天然效应。GLP-1(7-36)酰胺是 LGP-1 的天然生物活性形式。见 Göke, B 和 Byrne, M, 糖尿病医学(Diabetic Medicine). 1996, 13:854-860。GLP-1 受体是在例如产生胰岛素的胰 $\beta$ -细胞上发现的细胞表面蛋白。胰高血糖素样肽和其类似物包括那些具有胰岛素营养活性的物质，这些物质是在产生胰岛素的胰 $\beta$ -细胞等上的 GLP-1 受体分子及第二信使活性的促效剂(即

起激活作用)。通过该受体显示活性的胰高血糖素样肽促效剂, 在下列文献中描述: 欧洲专利 EP0708179A2; Hjorth, S. A. 等 *J. Biol. Chem.* 269(48):30121-30124 (1994); Siegel, E. G. 等美国糖尿病学会第 57 届学术研讨会, 波士顿, 1997 年; Hareter, A. 等, 美国糖尿病学会第 57 届学术研讨会, 波士顿, 1997 年; Adelhoest, K 等, *J. Biol. Chem.* 269(9):6275-6278(1994); Deacon, C. F. 等, 第 16 届国际糖尿病联合会大会摘要, 糖尿病学增补本(1997); Irwin, D. M. 等 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94: 7915-7920(1997); Mosjov, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40:333-343(1992)。胰高血糖素样分子包括表达 GLP-1 促效剂的多聚核苷酸, 此促效剂就是在产生胰岛素的  $\beta$ -细胞表面发现的 GLP-1 受体分子及其第二信使系统的激活物。GLP-1 模拟物也是  $\beta$ -细胞的促效剂, 这包括例如专门设计用于激活 GLP-1 受体的化学化合物。最近的出版物阐明了黑寡妇型 GLP-1 和 Ser<sup>2</sup>GLP-1, 参见 G. G. Holz, J. F. Hakner/比较生物化学和物理学, B 部分 121(1998)177-184 和 Ritzel, 等, 一种合成的血浆稳定性提高的胰高血糖素样肽-1 类似物, 内分泌杂志, 1998 年 10 月; 159(1): 93-102。胰高血糖素样肽-1 的拮抗剂也是已知的(例如, 可参见: Watanbe, Y. 等, 内分泌杂志, 140(1)45-52, 1994), 包括氨基化 exendin(9-39)(一种 exendin 类似物), 它是 GLP-1 受体的强效拮抗剂(例如见 W097/46584)。进一步的例子包括化学合成的胰高血糖素样肽和任何与之基本同源的多肽或片段。“基本同源”既可针对氨基酸序列也可针对核苷酸序列, 也就是说, 一个特定的序列(例如是突变子的序列), 对于参照序列而言有一个或几个位点的置换、缺失或增加, 但这些变化的净效应并不导致在特定序列和参照序列之间产生功能上有害的差别。就本发明的目的而言, 有 50%以上的同源性, 更好的是有 90%以上的同源性, 并且有相同的增强  $\beta$ -细胞对血浆中葡萄糖产生应答的生物活性和相同的表达特性的序列, 均视为基本同源。25 为测定同源性, 应忽视突变序列切断的截断。同源性较低, 但有可比的生物活性和相同的表达特性的那些序列, 将视为等价的。

哺乳动物的 GLP 肽和胰高血糖素是由同一基因编码的。在回肠中, 原形分子被加工为两类 GLP 肽激素, 就是 GLP-1 和 GLP-2。现已知有四种 GLP-1 相关的肽来源于原形肽。GLP-1(1-37)有如下序列: HisAspGluPheGluArg  
30 HisAlaGluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLysGluPheI  
leAlaTrpLeuValLysGlyArgGly(SEQ ID NO: 1)。GLP-1(1-37)经翻译后加工时



酰胺化而形成 GLP-1(1-36)NH<sub>2</sub>，其序列为 HisAspGluPheGluArgHisAlaGlu  
 GlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLysGluPheIleAlaTrpL  
 euValLysGlyArg(NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 2), 或经酶解产生 GLP-1(7-37)，其序列为  
 HisAlaGluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLys  
 5 GluPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArgGly (SEQ ID NO: 3)。GLP-1(7-37) 也可被  
 酰胺化为氨基化的 GLP-1(7-36)，其序列为 HisAlaGluGlyThrPhe  
 ThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLysGluPheIleAlaTrpLeuValLys  
 GlyArg(NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 4)，这是天然形态的 GLP-1 分子。

小肠 L 细胞分别分泌 GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 3) 和 GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID  
 10 NO: 4)，两者的比例是 1: 5。这些截断的 GLP-1 形式在原位处的半衰期是短  
 的，也就是小于 10 分钟，并可被氨基二肽酶灭活而分别产生：  
 GluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLysGluPheIleAlaT  
 rpLeuValLysGlyArgGly (SEQ ID NO: 5)，和 GluGlyThrPheThrSerAspVal  
 SerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLysGluPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArg(NH<sub>2</sub>)  
 15 (SEQ ID NO: 6)。GluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAla  
 AlaLysGluPheIleAlaTrpLeuValLysGlyArgGly (SEQ ID NO: 5)，和  
 GluGlyThrPheThrSerAspValSerSerTyrLeuGluGlyGlnAlaAlaLysGluPheIleAla  
 TrpLeuValLysGlyArg(NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 6) 这两个片段被怀疑影响肝糖的形成，  
 但并不刺激胰脏合成和释放胰岛素。

20 在美洲大毒蛇的毒液中有六种多肽与 GLP-1 同源。表 1 中将它们的序列  
 与 GLP-1 作了比较。

表 1:

- a: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRNH<sub>2</sub>  
 25 b: HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSNH<sub>2</sub>  
 c: DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSNH<sub>2</sub>  
 d: HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSNH<sub>2</sub>  
 e: HSDATFTA EYSKLLAKLALQKYLE SILGSSTSPRPPSS  
 f: HSDATFTA EYSKLLAKLALQKYLE SILGSSTSPRPPS  
 30 g: HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPPNH<sub>2</sub>  
 h: HSDAIFTQQYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPPNH<sub>2</sub>

- a=GLP-1(序列识别号 4)
- b=Exendin3(SEQ ID N07)
- c=Exendin4(9-39)(NH<sub>2</sub>(SEQ ID N08)
- 5 d=Exendin4(SEQ ID N09)
- e=毒蜥素 I(SEQ ID N010)
- f=毒蜥素 II(SEQ ID N011)
- g=毒虫析素(SEQ ID N012)
- h=Q<sup>8</sup>, Q<sup>9</sup> 毒虫析素(SEQ ID N013)。

10

表 1 的强调部分所示的主要同源性是：肽 c 和 f 分别是从 b 和 g 衍生而来。所有天然存在的六种肽(a, b, c, d, e, f)在第 1、7、11 和 18 位点是同源的。GLP-1 和 exendin3 和 4(a, b 和 d)更在位点 4, 5, 6, 8, 9, 15, 22, 23, 25, 26 和 29 同源。在位点 2 上, A, S 和 G 是结构相似的。在位点 3 上, 残基 D  
15 和 E(Asp 和 Glu)是结构相似的。在位点 22、23 上, F(苯丙氨酸)和 I(异亮氨酸)分别与 Y(酪氨酸)和 L(亮氨酸)结构相类似。同样的, 在位点 26 上, L 与 I 也是结构相类似的,

这样, 在 GLP-1、exendin3 和 4 的 30 个氨基酸残基中有 15 个是相同的, 还有另 5 个是等价的。只是在位点 16、17、19、21、24、27、28 和 30 上的  
20 残基结构有明显不同。Exendins 在羧基端多 9 个氨基酸残基。

GLP-1 样肽可用固相合成法进行化学合成。GLP-1 也可用传统的重组技术, 通过如 Sambrook 和 Maniatis 所著的文献中描述的标准方法制造。这里所讲的“重组”是指一种蛋白质来自重组的表达系统(例如, 微生物或哺乳动物), 这种系统是通过遗传的方法加以改变使之含有表达 GLP-1 或其生物活性类似  
25 物的基因。

GLP-1 样的多肽可用下列的方法从重组细胞的培养物中加以收集与纯化, 这些方法包括但不限于: 硫酸铵或乙醇沉淀, 酸提取, 阳离子或阴离子交换色谱, 磷酸纤维素色谱, 疏水相互作用色谱, 亲和色谱, 羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱(HPLC)可用于最后的纯化步骤。

30 本发明中多肽可以是天然提取的纯品, 或是化学合成方法的产物, 或是利用重组技术从原核生物或真核生物宿主(例如细菌, 酵母, 高等植物, 昆

虫或哺乳动物，培养或体内培养)进行制备。依据重组过程中所用的宿主情况，本发明中的多肽通常是非糖基化的，但也可以是糖基化的。

GLP-1 的生物活性可用标准的方法加以测定，总体而言，就是受体结合活性筛选法，该方法利用其表面有 GLP-1 受体的合适细胞，诸如 RINmSF 细胞或  
5 INS-1 细胞之类的胰岛素瘤细胞系。也可参见 Mosjov, S. (1992) 和欧洲专利 EP0708170A2。除了利用放射免疫法测量特异性结合于细胞膜上的示踪物之外，还可测量 cAMP 的活性或葡萄糖依赖的胰岛素的合成。在一种方法中，将编码本发明受体的多聚核苷酸转染细胞来表达 GLP-1 受体蛋白。这样，举例而言，这些方法可以用来筛选受体的促效剂，只要将待筛选的化合物与这些  
10 细胞相混合，再筛选和测定这些化合物是否能产生信号(例如，可激活受体)。

多克隆及单克隆抗体也可用以测定纯度和鉴别在这里所描述方法中运用的 GLP-1 样肽。诸如 ABGA1178 之类的抗体可检测完整的未经剪切的 GLP-1(1-37)或氨基端切除的 GLP-1(7-37)或氨基化的 GLP-1(7-36)。其他抗体检测前体分子的 C 端最末端，这一方法可运用减量法计算已截短的肽(例如：GLP-  
15 1(7-37)或氨基化 GLP-1(7-36))的生物活性。(Orskov 等 *Diabetes*, 1993, 42:658-661; Orskov 等 *J. Clin. Invest.* 1991, 87:415-423)

其他筛选方法包括使用那些表达 GLP-1 受体的细胞，如转染的 CHO 细胞，并在系统中检测因受体激活而导致的胞外的 pH 或离子浓度的变化。举例来讲：将待选的促效剂与表达 GLP-1 受体蛋白和第二信使应答(如信号传导或离子或  
20 pH 变化)的细胞接触，可检测以确定这些待选的促效剂是否有效应。

本发明中的胰高血糖素样肽-1 受体结合蛋白可以和合适的药物载体相组合使用。这种组合物包括治疗有效量的多肽和药物学上合适载体或赋形剂。这样的载体包括但不限于：盐水，缓冲盐水，葡聚糖，水，甘油，乙醇，乳糖，磷酸盐，甘露醇，精氨酸，海藻糖，和它们的组合。制剂需要与给药方式  
25 相适应并容易被本领域技术人员所确定。GLP-1 肽可以与本领域已知的那些能提高肽药物体内半衰期的药剂相组合，从而加强或延长肽的生物活性。例如在用药以前，可以将本发明物质与分子或化学部分进行共价连接。另外，增强剂也可与组合物同时给药。再进一步，这些药剂可以含有被认为是 GLP-1 样肽的酶解反应抑制剂的分子，它们可以与 GLP-1 肽组合物同时给药或在 GLP-1  
30 肽组合物给药后使用。这样的分子可用诸如口服或注射的方法给药。

有效的剂量浓度范围实际上多少与给药方式有关，即缓释给药或持续给

药如静脉输注或皮下输注。既然 GLP-1 无副作用，因而可有相当大灵活性。通过静脉注射皮下给药，也可以丸药形式施用。

5 虽然下列的范围没有限制而且列出只是作为说明，不同给药方式的推荐剂量范围是：静脉连续输注 (I. V.) 0.1pmol/kg/min 到 10pmol/kg/min；皮下给药 (s. c.) 0.1pmol/kg/min 到 75pmol/kg/min, 单剂注射 (丸药)：静脉 0.1nmol/kg 到 2.0nmol/kg, 皮下 0.1nmol/kg 到 100nmol/kg。

10 较优的 GLP-1 肽给药方式是通过连续给药，剂量范围是从约 1pmol/kg/min 到约 10pmol/kg/min GLP-1，途径是缓释皮下给药，肌内给药，腹腔内给药，缓释注射药库，深部肺吸入，同样也可用静脉给药，口腔给药，药贴给药或其他缓释给药方法。

15 葡萄糖神经毒性的可能机制仍是不明确的，而申请人不希望被理论所束缚。然而，在脑部缺血期，和其他组织相同，厌氧糖酵解增强了并产生了乳酸，这又可因高血糖而更严重。乳酸可能尤其对缺血的神经元细胞有毒性。第二种可能是高血糖加剧了红血球细胞渗漏穿过缺血的毛细血管内皮，从而产生微小的出血行梗死。第三种提出的机制是神经元的兴奋性毒性 (如由谷氨酰胺所诱导) 是葡萄糖敏感性的，因此高血糖又强化了这种严重的神经损害之源。虽然还不了解它的精确的机制，事实是使用 GLP-1 治疗带来了明显的好处。

20 GLP-1 能在而且应当在感到这事情已经或正在发生时马上使用，这一点是重要的并且可防止损伤和风险的加剧。也就是说，GLP-1 可以在家里或救护车上使用以发挥其即刻的合成代谢作用从而改善脑代谢。

从这些理由出发，在治疗急性中风和控制梗死范围时极其重要的策略是控制高血糖，将血液中葡萄糖水平降至正常或适度的低血糖范围。然而至今唯一实用的控制高血糖的手段是使用胰岛素。

25 至今，非随机分组的对照人体试验已经完成，用来检验胰岛素治疗对急性中风的益处，虽然这样的试验是值得提倡的，但胰岛素的副作用风险太大了。与人体试验的数据匮乏相对照，大量的试验已评估了在动物中风模型中胰岛素的效用。几乎无例外，这些研究记录了很大的益处，提示了胰岛素有保护功能的能力，可控制梗死范围大小，并降低广泛性和病灶性缺血并再灌注后的死亡率。在广泛性缺血的模型中 (模型的两侧颈动脉都阻塞，并且某些模型有的诱发有高血压，或者在模型中诱导了心脏窒息性停搏)，胰岛素有明

30

显的保护作用，可限制梗死范围，减少神经功能缺失和促进代谢恢复。而且胰岛素的作用与其降血糖的功能在很大程度上无关；实际上，严重的低血糖对大脑的功能及结果都是有害的。

在暂时性的病灶性脑缺血模型中，胰岛素同样有强大的保护作用，可减少梗死部分体积和脑坏死的程度，(Yip, PK, He, YY, Hsu, CY, Garg, N, Marangos, P 和 Hogan, EL(1991) “在病灶性大脑缺血-再灌注中血浆葡萄糖对梗死范围的影响”，*Neurology* 41, 899-905; Hamilton, MG, Tranner, BI, 和 Auer, RN(1995) “胰岛素减少在暂时性病灶性缺血中大脑梗死”，*J. Neurosurg.* 82, 262-268)

White 及其同事已对胰岛素强大的神经效用从机理上进行了考证 (White, BC, Grossman, LI, 和 Krause, GS(1993) “广泛性缺血和再灌注引起的脑损伤：对于膜损伤和修复的理论性假定”，*Neurology* 43, 1656-1665; White, BC, Grossman, LI, O'Neil, BJ, DeGracia, DJ, Neumar, RW, Rafols, JA, 和 Krause, GS(1996) “广泛性缺血和再灌注”，*Ann. Emerg., Med.* 27, 588-594)。这些作者提出胰岛素作为强有力的神经营养因子能激活一般的神经元修复途径，而这些途径与其调节葡萄糖代谢的功能相独立。在中风过程中大多数的损伤发生在再灌注时期。这被认为起因于缺血所诱导的膜脂裂解，膜脂肪酸的局部累积，和继发的在再灌注引起的脂肪酸氧化过程中导致的过氧化物生成。再灌注产生的氧自由基再通过脂质过氧化来破坏神经元细胞膜。这种损伤因再灌注引起的蛋白质合成抑制而加剧，这使膜修复系统失去作用。在这背景下，胰岛素和胰岛素样生长因子(IGF)家族中其他成员有主要的神经元拯救作用，这是通过刺激蛋白质合成和上调新的膜脂质合成机能而达到的。这依次起源于胰岛素刺激真核细胞启动因子-2(eIF-2 $\alpha$ )的脱磷酸作用，然后是促进了 mRNA 转录物的有效翻译。

## 25 实施例

根据本发明，使用 GLP-1(氨基化胰高血糖素样肽-1(7-36))是用以治疗急性中风的胰岛素的理想替代物。这是因为 GLP-1 有葡萄糖依赖性的胰岛素营养作用。GLP-1 可在正常或高血糖的情况下促进内源性胰岛素的分泌，在低血糖的情况下则不会，这样能免于造成严重的低血压。这也意味着在 II 型糖尿病中，GLP-1 能刺激胰岛素持续分泌，并将血糖纠正在正常的范围内。这些作用将会给急性中风病人带来很大的益处。在那些非糖尿病并随有应激性高血

糖的的中风患者中也能得到相似的结果。在血糖正常的中风患者中，GLP-1 会导致胰岛素的适度分泌，并在不补充葡萄糖时又回到基线水平。在这种情况下，最好同时静脉输注葡萄糖（低剂量，如 5%）以便维持对胰岛素分泌的刺激。与葡萄糖-胰岛素输注不同，不需要对滴定剂量的操心，因为 GLP-1 对葡萄糖的依赖作用会通过升高循环中胰岛素的水平来维持正常的血糖从而达到自动滴注的结果。

目前认为，循环中的游离脂肪酸(FFA)不能进入脑部，不能成为大脑的能量来源。当供氧充分时，大脑专一地代谢葡萄糖，只在长期饥饿时才转而利用肝脏产生的酮体。在缺血时，葡萄糖的有氧氧化受到损害，而糖酵解加强了，但这不能产生足够的 ATP。结果就是细胞膜的功能受损，钙离子进入细胞，神经元细胞膜磷脂的酶解过程加强，产生了脑内的游离脂肪酸。这些脂肪酸并不是由于胰高血糖素的作用而产生的。而且，通过减弱由应激诱导的胰岛素拮抗状态，胰高血糖素的抑制通常可以改善代谢环境。改善代谢环境对抑制炎症反应有益处。

从上述的例子中可见，这些例子只是说明了已达到所有设定目标的本发明的一个方面。重要的是，这些例子不能作为是本发明讲授内容或揭示内容或范围等的限制，因为它们只是示范性的。