

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，有 無主張優先權

美國 1998年09月24日 60/101,719 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

本發明係有關在中風後經由控制高糖血症以減低致死率與罹病率所用之方法與組合物。該方法與組合物特別可用於非-胰島素依賴型糖尿病，有新的中風危險者或有進行中的或複發性中風者。先前存在的高糖血症會獲得治癒而新開始的高糖血症可被遏止。

發明背景

源自心血管疾病的罹病率與致死率在顯現出糖尿病或受損的葡萄糖耐受性之患者而言皆較沒有這些疾病的患者更為高。在接受冠狀動脈加護單元的患者總數中有24%有糖尿病，而在一般人群中糖尿病患者只佔約5%(Fuller, 1993)。患有心肌梗塞的糖尿病患者之住院死亡率為非糖尿病患者之兩倍(Hamsten, 1994; Malmberg and Ryden, 1988)。在後一急性恢復期中糖尿病患者經歷較高的死亡率且更常死亡，大部份是由致死的再一梗塞與充血性心臟衰竭所致(Stone 1989; Karlson, 1993; Barbash, 1993)。雖然在急性心肌梗塞後的罹病和死亡發生率上有減低之事實，但在中風後於糖尿病與非糖尿病之間的死亡率與罹病率差異仍存在著(Granger, 1993; Grines, 1993)。

中風危險性也已知會在糖尿病患者中明顯地升高。例如有非胰島素依賴型糖尿病(NIDDM)的男性患者之中風危險性比對應的非糖尿病患者較高約3倍而於NIDDM婦女則較高約5倍(Lehto, 1966)。於芬蘭國內的另一研究中，患有基線糖尿病的男人有增高6倍的中風致死危險率而在追蹤期中發展出糖尿病的男人之相對危險率為1.7。對於女

五、發明說明(2)

人，個別相對危險率為 8.2 和 3.7 (Tuomilehto, 1996)。再者，另一研究證實溫和與未確認的高糖血症也是急性中風的一項危險因素且於有高血糖值的患者中不論其 HbA_{1c} 為何都有增高的累積死亡率，HbA_{1c} 為反映長期血糖控制之值 (Gray, 1987)。

高糖血症對於中風發生的劣化效應也在其它研究中獲得證實 (Cazzato, 1991 ; Kiers, 1992 ; deFalco, 1993 ; Moulin, 1997 ; Weir, 1997)。中風期間的壓力激素回應強度明顯地助成高糖血症之發展 (O'Neill, 1992) 不過也可能是高糖血症本身主要經由長期酸毒症而不利地影響絕血性腦新陳代謝 (Levine, 1988 ; Wass and Lanier, 1996)。

動物研究強烈地支持下述概念：高糖血症有使中風期間的腦部傷害因下列原因而明顯更壞：區域性腦部血流的減少，顯著的水腫和腦幹壓縮，增加的梗塞尺寸，增加的收縮期 Ca²⁺ 水平，乳酸蓄積，血腦障壁破裂及增高的出血 (Duckrow, 1985, 1987 ; de Courten-Myers, 1988 ; Slivka, 1991 ; Araki, 1992 ; Wagner, 1992 ; Dietrich, 1993 ; Broderick, 1995)。

因此有需要舒減措施以使血糖正常化及用以控制會使糖尿病患者的中風傷害擴大之新陳代謝級聯。此點可以經由以皮下多劑胰島素處理調整胰島素和葡萄糖的注入及後急性緊密血糖調節而達到。後述服藥法在用於治療處於急性心肌梗塞中的糖尿病患者時可在心肌梗塞後的該年中，相對於除非視為需要才接受胰島素處治的糖尿病患者對照組

五、發明說明 (3)

而言，可使致死率降低30% (Malmberg, 1995)。

不過，胰島素注入會造成低糖血症之潛發，該症係經定義為血糖低於0.3 mM之情況。低糖血症會增加心肌梗塞之危險率，心室節律不齊且為胰島素注入的一種危險性後果。因此發展出用於中風糖尿病患者的胰島素注入法以防止低糖血症 (Hendra, 1992)。不過，在這種作法下仍有21%患者發展出低糖血症。出於心肌梗塞後的葡萄糖控制之另一研究中，於用胰島素和葡萄糖注入時有18%的患者發展出低糖血症 (Malmberg, 1994)。

胰島素注入也需要經常地監測血糖水平以使低糖血症的起始得以儘快地偵測到且治療。於所引述的研究中接受胰島素注入的患者內 (Malmberg, 1994)，至少每二小時測量血糖且據以調整注入速率。因此，胰島素-葡萄糖注入療法的安全性和效能有賴於血糖數據的容易且快速取得。這種對於監測血糖的強烈需求給健康維護職業者加上一重荷，且增加治療的不便性與成本。其結果，加護單元常不分派使糖尿病患者的血糖水平最適化之計，如可經由靜脈內胰島素給用而得者。在慮及胰島素注入所潛在的危險性與負荷，有需要有一種在糖尿病患者急性中風中管制血糖之替代措施。

腸降血糖激素，似胰增血糖素肽1，簡稱GLP-1，係在腸中從胰增血糖素原處理而得且其可增強養分-誘發性胰島素釋出 (Krcymann, 1987)。有多種經截短形式的GLP-1係已知可刺激胰島素分泌 (促胰島素作用) 及cAMP形成者

五、發明說明(4)

(參看，例如，Mojsov, 1992)。已確立出在各種活體外(in vitro)實驗室實驗和哺乳動物，尤其是人類對於外源給用 GLP-1，GLP-1 (7-36) 醃胺，與 GLP-1 (3-37) 酸所得促胰島素回應之間的關係(參看，例如，Nauck, 1993 a 和 b；Gutniak, 1992；和 Thorens, 1993)。GLP-1 (7-36) 醃胺經由刺激胰島素敏感性及增強在生理濃度下的葡萄糖誘發胰島素釋出而對胰島素-依賴型糖尿病患者發出明顯的抗糖尿病形成效應(Gutniak, 1992)。在給非-胰島素依賴型糖尿病患者服用時，GLP-1 (7-36) 醃胺會刺激胰島素釋出，降低胰增血糖素的分泌，抑制胃的排空及增強葡萄糖利用(Nauck, 1993 a 和 b；Gutnick, 1992)。

GLP-1 型分子對於長期糖尿病療法之用途卻因為彼等肽的血清半生期十分短而受阻。例如，GLP-1 (7-37) 的血清半生期只有 3 至 5 分。GLP-1 (7-36) 醃胺在經皮下投服時具有約 50 分鐘的半生期。因此，彼等 GLP 分子必須以連續注入形式給藥來達到長期效用(Gutniak, 1994)。

發明概述

本發明提出用以減低中風後的死亡率和罹病率之方法與組合物。該方法包括給有此需要的患者服用一可以將血糖有效地正常化之選自 GLP-1，GLP-1 類似物，GLP-1 衍生物和彼等的醫藥可接受鹽所形成的組合中之化合物。本發明經由，例如促成較小的梗塞尺寸而提供糖尿病患者在中風後減低死亡率與罹病率之效益。本發明對非-胰島素依賴型的治療相對於用胰島素和葡萄糖注入的組合治療可避免

五、發明說明 (5)

掉不方便且昂貴的頻繁血糖監測以及血糖結果的解釋與胰島素劑量率的調整。該處治也可避免掉先前存在的伴隨胰島素注入之低糖血症危險。於本發明中，某些種GLP-1具有短半生期但因為患者典型地係臥病者，都在加護單位內接受連續地非經腸給用流體，所以連續投藥的需要性即不成為缺點。這種處治包括有高糖血症的所有患者不論彼等是否經診斷為糖尿病患者皆然。

圖式之簡略說明

圖1為一圖形其顯示出對5個NIDDM患者在晚間連續注入GLP-1 (7-36) 醯胺對平均血糖濃度(mM)的影響(—■—)。

。該圖形也繪示出對相同的5個NIDDM患者，但在不同晚上連續胰島素注入對平均血糖濃度的影響(--○--)

圖2為一圖形顯示出對5個NIDDM患者於白天注入，從三餐的每餐開始進行三小時GLP-1 (7-36) 醯胺注入對於平均血糖濃度的影響(—■—)。該圖形也繪示出對於相同的5個NIDDM患者，但於不同天，且係在每一餐之前不久注射時所得皮下注射胰島素對平均血糖濃度的影響(--○--)

發明之詳細說明

本發明方法與組合物，特別是使用似腸降血糖素肽-1，其類似物或衍生物的醫藥物(醫藥組合物或調配物)可以有效地減低糖尿病患者，特別是非胰島素依賴性糖尿病患者在中風後的死亡率和罹病率。可用來實施本發明的GLP-1類似物和衍生物為具有相對於GLP-1增加的半生期及在給患者服用時影響死亡率與罹病率的能力者。

五、發明說明（ 6 ）

中風

中風或腦中風或腦血管意外(CVA)為一種腦血管疾病其特徵為非痙攣和局竈性神經缺陷的突然發作。中風在美國引起每年約200,000的死亡例及神經病廢。於西方國家中絕血性梗塞在約85-90%病例中引起中風，而在其它病人組中也發現有顱內出血情形。腦絕血係因持續數秒鐘的血流減低所激發。若血流中止持續數分鐘以上時，就會包括腦組織梗塞現象。腦絕血與梗塞的最常見肇因為伴有血栓性插塞和心臟性插塞之動脈粥樣硬化。絕血性中風的臨床特徵在於其起始及隨後過程之方法。其表徵為在動脈硬化年齡組中的個體之半身輕癱之急性起始。不過，也可能發生任何種腦障礙徵候。頸動脈系統徵候與跡象常會影響中腦動脈的分佈，且患者可能展現出對側半身輕癱，半身感覺缺陷(hemisensory deficit)及半盲。在涉及優性半球時，常會有某種程度的失語症。此外也可能包括前(頸動脈)或後(底椎)循環其可能導致或多或少的特殊臨床徵候。

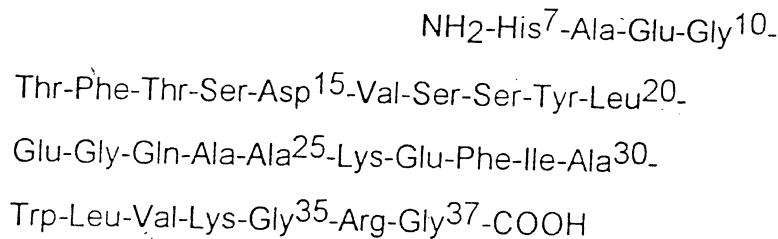
高糖血症係經定義為約200毫克/公合(11.1毫莫耳/升)或更大的血漿葡萄糖濃度，或約125毫克/公合(7.0毫莫耳/升)或更大之禁食血漿葡萄糖水平。本發明的一部份即為防止高糖血症或將其減低到正常值。

化合物

GLP-1類似物，衍生物，變體，前驅體和同系物皆適合用來實施本發明，只要其包括會促成減低中風後死亡率或罹病率的活性片段即可。

五、發明說明(7)

“GPL-1”意指 GLP-1 (7-37)。以技藝中的慣例而言，GLP-1 (7-37) 的胺基端係經指稱為編號 7 而其羧基端為編號 37。GLP-1 (7-37) 的胺基酸序列係技藝中熟知者，不過為讀者的方便，將其呈現於下：



“GLP-1 類似物”係經定義為在相對於 GLP-1 而言具有包括一或多個胺基酸取代，缺失，倒置或添加的改質之分子。技藝中已知的 GLP-1 類似物包括，例如 GLP-1 (7-34) 和 GLP-1 (7-35)，GLP-1 (7-36)，Val⁸-GLP-1 (7-37)，Gln⁹-GLP-1 (7-37)，D-Gln⁹-GLP-1 (7-37)，Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)，及 Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)。較佳的 GLP-1 類似物為 GLP-1 (7-34) 和 GLP-1 (7-35)，彼等都經揭示於美國專利第 5,118,666 號之中，以及 GLP-1 (7-36)。這些化合物都是經生物處理的有促胰島素性質之 GLP-1 形式。其它 GLP-1 類似物皆揭示於美國專利第 5,545,618 號之中。

“GLP-1 衍生物”係經定義為具有 GLP-1 或 GLP-1 類似物所具之胺基酸序列，但另外具有至少一種在一或多個其胺基酸側基，α-碳原子，末端胺基，或末端羧酸基上的化學改質之分子。化學改質包括添加化學部份體，創造新的鍵，及脫除化學部份體。在胺基酸側基上的改質包括離胺酸 e-

五、發明說明 (8)

胺基的醯基化，精胺酸，組胺酸或離胺酸的N-烷基化，穀胺酸或天冬胺酸的羧酸基之烷基化，及穀胺醯胺或天冬胺酸的脫醯胺化。末端胺基的改質包括去-胺基，N-低碳數烷基，N-二-低碳數烷基，和N-醯基諸改質。末端羧基的改質包括醯胺，低碳數烷基醯胺，二烷基醯胺，和低碳數烷基酯諸項改質。低碳數烷基為C₁-C₄烷基。再者，一或多個側基，或末端基，可經由用熟練蛋白質化學家所知的保護基予以保護。胺基酸的 α -碳可經一-或二-烷基化。

於本發明中，可用的較佳GLP-1類似物和衍生物之組合包括在美國專利第5,545,618號中揭示的各種GLP-1分子。活性GLP-1肽，7-34，7-35，7-36和7-37諸有效類似物係在位置7-10有胺基酸取代及/或在C-端經截短及/或含有在鹼性肽中的各種其它胺基酸取代者。在7和8位置有D-胺基酸取代及/或在7位置有N-烷基化或N-醯基化胺基酸之類似物特別可抗拒活體內(in vivo)降解。

顯示出增強的胰島素刺激性質之類似物具有天然GLP-1，7-34，7-35，7-36，或7-37，或彼等的C-端醯胺的序列，加上至少一種選自下列所成組合中之改質：

(a)用中性胺基酸，精胺酸，或D形式的離胺酸取代位置2b及/或34處的離胺酸及/或用中性胺基酸，離胺酸，或D形式的精胺酸取代位置36的精胺酸；

(b)抗氧化性胺基酸對位置31的色胺酸之取代；

(c)根據至少一種下列之取代：

五、發明說明 (9)

Y 取代位置 16 的 V ；

K 取代位置 18 的 S ；

D 取代位置 21 的 E ；

S 取代位置 22 的 G ；

R 取代位置 23 的 Q ；

R 取代位置 24 的 A ； 及

Q 取代位置 26 的 K ；

(採用對胺基酸的單字母密碼)

(d) 包括至少一種下列之取代：

另一小的中性胺基酸取代位置 8 的 A ；

另一酸性胺基酸或中性胺基酸取代位置 9 的 E ；

另一中性胺基酸取代位置 10 的 G ； 及

另一酸性胺基酸取代位置 15 的 D ； 及

(e) 另一中性胺基酸或 D 或 N-醯基化或烷基化形式的組胺酸取代位置 7 的組胺酸。

有關改質 (a)，(b)，(d) 和 (e)，經取代的胺基酸可為 D 形式者。在位置 7 取代的胺基酸也可呈 N-醯基化或 N-烷基化形式。

在血漿中呈現相對於 GLP-1 (7-37) 較增進的抗降解性之肽皆適合用來實施本發明。於這些類似物中，任何種上述截端形式的 GLP-1 (7-34) 至 GLP-1 (7-37) 或其 C-端醯胺化形式係經由下列予以改質：

(a) 用 D-中性或 D-酸性胺基酸取代位置 7 的 H，或

(b) 用 D-胺基酸取代位置 8 的 A，或

五、發明說明 (10)

(c) 上述兩者同時，或

(d) 用 N-醯基化或 N-烷基化形式的任何天然發生型胺基酸取代位置 7 的 H。

依此可抗拒降解的類似物包括 (N-醯基(1-6C)AA)⁷GLP-1 (7-37) 和 (N-烷基(1-6C AA)⁷GLP-1 (7-37) 其中當 AA 為離胺醯基殘基時，其一或兩個氮可經烷基化或醯基化，AA 表與保持胰島素刺激活性一致之任何胺基酸。

對於在 7 和 8 位置中的 D-胺基酸取代，可以在位置 7 使用任何酸性或中性胺基酸的 D-殘基及在位置 8 用任何胺基酸的 D 殘基，再度地要保持住胰島素刺激活性。位置 7 和 8 中任一者或兩者皆可經 D-胺基酸取代；在位置 7 的 D-胺基酸也可經醯基化或烷基化。彼等經改質形式不僅可應用於 GLP-1 (7-37) 而且也可以用於較短的經截端類似物。

因此，於較佳類似物中包括其中 GLP-1 的 (7-34)，(7-35) 或 (7-37) 諸形式只經由用中性胺基酸，精胺酸，或 D 形式的離胺酸取代位置 26 及 / 或 34 的離胺酸及 / 或用中性胺基酸，離胺酸或 D 形式的精胺酸取代位置 36 的精胺酸予以改質者。特別較佳者為其中用來取代位置 26 和 34 的離胺酸之胺基酸係選自下列所成組合之中者：K⁺，G，S，A，L，I，Q，R，R⁺ 和 M，且取代位置 36 的精胺酸所用的胺基酸係選自下列所成組合之中者：K，K⁺，G，S，A，L，I，Q，M 和 R⁺。(此處的⁺表 D 形式)。

此外，較佳的類似物為其中的該唯一改質為用抗氧化性胺基酸取代位置 31 的色胺酸者。特別有利的取代係選自

五、發明說明 (11)

F, V, L, I, A 和 Y 所成組合之中者。

特別較佳的類似物為有下列組合取代者: S 取代位置 22 的 G, R 取代位置 23 的 Q 和位置 24 的 A, 及 Q 取代位置 26 的 K, 或 Y 取代位置 16 的 V 和 K 取代位置 18 的 S; 或這些取代再加上 D 取代位置 21 的 E 者。

於其中特別較佳者為其中取代位置 8 的丙胺酸所用的小中性胺基酸係選自 S, S⁺, GC, C⁺, Sar, A⁺, β-ala 和 Aib 所成組合之中者; 及/或取代位置 9 的穀胺酸所用之酸性或中性胺基酸係選自下列所成組合之中者: E⁺, D, D⁺, Cya T, T⁺, N, N⁺, Q, Q⁺, Cit, MSO, 和乙醯基-K; 及/或取代位置 10 的甘胺酸所用另一中性胺基酸係選自下列所成組合之中者: S, S⁺, Y, Y⁺, T, T⁺, N, N⁺, Q, Q⁺, Cit, MSO, 乙醯基-K, F, 和 F⁺; 及/或其中用 D 取代位置 15 的 E 者。

另外較佳的類似物為其中只有位置 7 經變動者。較佳的取代為其中取代位置 7 的組胺酸所用之胺基酸係選自下列所成組合之中者: H⁺, Y, Y⁺, F, F⁺, R, R⁺, Orn, Orn⁺, M, M⁺, N-甲醯基-H, N-甲醯基-H⁺, N-乙醯基-H, N-乙醯基-H⁺, N-異丙基-H, N-異丙基-H⁺, N-乙醯基-K; N-乙醯基-K⁺, P 和 P⁺。

另外較佳的實施例為除了下列指定實施例(類似物)之外, 只有兩種上述類別的改質形式之組合者:

(H⁺)⁷-GLP-1 (7-37);

(Y)⁷-GLP-1 (7-37);

五、發明說明 (12)

(N-acetyl-H)⁷-GLP-1 (7-37) ;

(N-isopropyl-H)⁷-GLP-1 (7-37) ;

(A⁺)⁸-GLP-1 (7-37) ;

(E⁺)⁹-GLP-1 (7-37) ;

(D)⁹-GLP-1 (7-37) ;

(D⁺)⁹-GLP-1 (7-37) ;

(F⁺)¹⁰-GLP-1 (7-37) ;

(S)²²(R)²³(R)²⁴(Q)²⁶-GLP-1 (7-37) ;

(S)⁸(Q)⁹(Y)¹⁶(K)¹⁸(D)²¹-GLP-1 (7-37) 。

具有增強的安定性之較佳類似物形式也只具有一或最多兩處胺基酸改質者。

對於位置7的組胺酸之較佳取代包括D-形式的酸性或中性胺基酸或D-形式的組胺酸。較佳為P⁺，D⁺，E⁺，N⁺，Q⁺，L⁺，V⁺，I⁺和H⁺。

在位置7的組胺酸，或一置換(D或L)，也可以經N-烷基化(1-6C)或N-醯基化。烷基為具有所示C數的直鏈或支鏈型(包括環狀)烴基殘基。醯基為式RCO-基其中R為烷基。較佳的烷基為t-丙基，α-丙基和乙基；較佳的醯基為乙醯基和丙醯基。可經烷基化或醯基化的較佳殘基包括P，D，E，N，Q，V，L，I，K和H可為D或L形式。

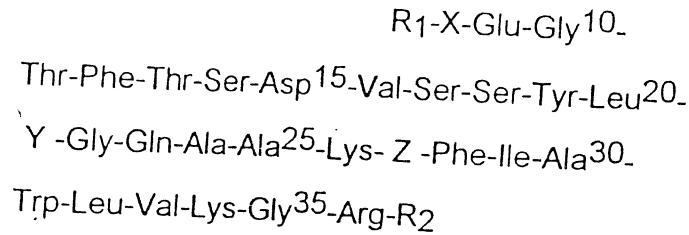
對於位置8的丙胺酸之較佳取代基為D-形式的P，V，L，I和A；此外也為較佳者為D-形式的D，E，N，Q，K，T，S和H。

某些特殊類似物同時顯示出增進的胰島素釋放刺激能力

五、發明說明 (13)

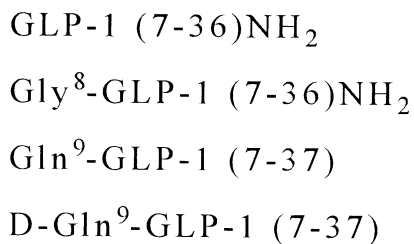
和增進的安定性。

供本發明所用的一較佳 GLP-1 類似物和衍生物組合係由具有下式的分子及其醫藥可接受鹽所構成：



其中： R_1 係選自下列所成組合之中者：L-組胺酸，D-組胺酸，去胺基-組胺酸，2-胺基-組胺酸，b-羥基-組胺酸，同組胺酸， α -氟甲基-組胺酸，和 α -甲基-組胺酸；X係選自下列所成組合之中者：Ala，Gly，Val，Thr，Ile 和 α -甲基-Ala，Y係選自下列所成組合之中者：Glu，Gln，Ala，Thr，Ser 與 Gly；Z係選自下列所成組合之中者：Glu，Gln，Ala，Thr，Ser 和 Gly；且 R_2 係選自下列所成組合之中者： NH_2 ，與 Gly-OH；但其限制條件為該化合物具有在約 6.0 至約 9.0 範圍內之等電點且更有一限制條件為當 R_1 為 His，X 為 Ala，Y 為 Glu，且 Z 為 Glu 時， R_2 必須為 NH_2 。

有許多具有在約 6.0 至約 9.0 範圍內的等電點之 GLP-1 類似物和衍生物皆經揭示出且包括，例如：



五、發明說明 (14)

acetyl-Lys⁹-GLP-1 (7-37)

Thr⁹-GLP-1 (7-37)

D-Thr⁹-GLP-1 (7-37)

Asn⁹-GLP-1 (7-37)

D-Asn⁹-GLP-1 (7-37)

Ser²²-Arg²³-Arg²⁴-Gln²⁶-GLP-1 (7-37)

Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)

Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)

Arg²³-GLP-1 (7-37)

Arg²⁴-GLP-1 (7-37)

另一較佳的可用於本發明中之活性化合物組合係揭示於 WO 91/11457，(美國專利第 5,545,618 號相關者)中且包括具有至少一種下面所示改質之 GLP-1 (7-34)，GLP-1 (7-35)，GLP-1 (7-36)，或 GLP-1 (7-37)：

(a) 用甘胺酸，絲胺酸，半胱胺酸，蘇胺酸，天冬胺醯胺，穀胺醯胺，酪胺酸，丙胺酸，纈胺酸，異白胺酸，白胺酸，甲硫胺酸，苯丙胺酸，精胺酸，或 D-離胺酸取代位置 26 及 / 或位置 34 的離胺酸；或用甘胺酸，絲胺酸，半胱胺酸，蘇胺酸，天冬胺醯胺，穀胺醯胺，酪胺酸，丙胺酸，纈胺酸，異白胺酸，白胺酸，甲硫胺酸，苯丙胺酸，離胺酸，或 D-精胺酸取代位置 36 的精胺酸；

(b) 用抗氧化性胺基酸取代位置 31 的色胺酸；

(c) 至少一種下列取代：酪胺酸取代位置 16 的纈胺酸，離胺酸取代位置 18 的絲胺酸；天冬胺酸取代位置 21 的穀

五、發明說明 (15)

胺酸；絲胺酸取代位置 22 的甘胺酸；精胺酸取代位置 23 的穀胺醯胺；精胺酸取代位置 24 的丙胺酸；及穀胺醯胺取代位置 26 的離胺酸；及

(d) 至少一種下列取代：用甘胺酸，絲胺酸，或半胱胺酸取代位置 8 的丙胺酸；天冬胺酸，甘胺酸，絲胺酸，半胱胺酸，蘇胺酸，天冬胺醯胺，穀胺醯胺，酪胺酸，丙胺酸，纈胺酸，異白胺酸，白胺酸，甲硫胺酸，或苯丙胺酸取代位置 9 的穀胺酸；用絲胺酸，半胱胺酸，蘇胺酸，天冬胺醯胺，穀胺醯胺，酪胺酸，丙胺酸，纈胺酸，異白胺酸，白胺酸，甲硫胺酸，或苯丙胺酸取代位置 10 的甘胺酸；及用穀胺酸取代位置 15 的天冬胺酸；及

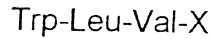
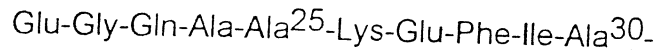
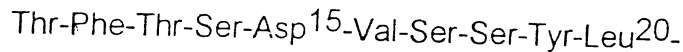
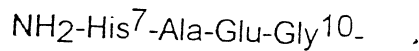
(e) 用甘胺酸，絲胺酸，半胱胺酸，蘇胺酸，天冬胺醯胺，穀胺醯胺，酪胺酸，丙胺酸，纈胺酸，異白胺酸，白胺酸，甲硫胺酸，或苯丙胺酸，或 D- 或 N- 醯基化或烷基化形式的組胺酸取代位置 7 的組胺酸；其中，在 (a)，(b)，(d)，和 (e) 諸取代中，經取代的胺基酸可視情況為 D- 形式且經取代在位置 7 的胺基酸可視情況呈 N- 醯基化或 N- 烷基化形式。

因為酵素，二肽基-肽酶 IV (DPP IV) 可能為促成所觀察到的給服 GLP-1 之快速活體內抑活化 (Mentlein et al., 1993)，所以較佳者為服用經保護可對抗 DPP IV 活性的 GLP-1 類似物和衍生物，且更佳者為給用 Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂，Val⁸-GLP-1 (7-37)OH，α- 甲基-Ala⁸-GLP-1 (7-36)NH₂，與 Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37)OH，GLY⁸-GLP-1 (7-37)OH 或彼

五、發明說明 (16)

等的醫藥可接受鹽。

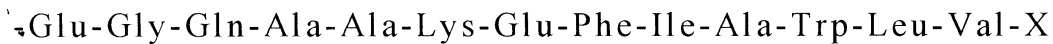
此外較佳者為在本發明中使用美國專利第 5,188,666 ('666) 號中所揭示的分子。彼等分子包括具有下列諸胺基酸序列中之一者的肽：



其中 X 可為 Lys 和 Lys-Gly；或該肽的衍生物，且其中該肽可為該肽的醫藥可接受之酸加成鹽；該肽的醫藥可接受之羧酸鹽；該肽的醫藥可接受之低碳數烷基酯；或選自下列所成組合中的該肽之醫藥可接受醯胺：醯胺，低碳數烷醯胺，和二-低碳數烷基醯胺。

'666 中的發明係有關一肽片段其具有促胰島素性且可從天然發生的胺基酸序列衍生物而得。彼等序列皆適合用來實施本發明。本發明包括選自下列所成組合之中的化合物

(A) 包括下面的序列之肽：



其中 X 係選自下列所成組合之中者：

- (a) Lys，
- (b) Lys-Gly，
- (c) Lys-Gly-Arg；

及 (B) 該肽的衍生物；其中該化合物實質地不含天然雜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

質，且具有超越 GLP-1 (1-36) 或 GLP-1 (1-37) 所具促胰島素活性之促胰島素活性。

本發明也包括選自下列所成組合中之化合物：

(A) 一肽其包括下面的序列：

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

其中 X 係選自下列所成組合之中者：

- (a) Lys，
- (b) Lys-Gly，
- (c) Lys-Gly-Arg；

及 (B) 該肽的衍生物；其中該化合物實質地不含天然雜質，且具有在至少 10^{-10} M 濃度之下的促胰島素活性。

特別有用者的具有下式之肽：

(1) $H_2N-X-CO-R^1$

其中 R^1 為 OH，OM，或 $-NR^2R^3$ ；

M 為醫藥可接受的陽離子或低碳數分枝型或未分枝型烷基；

R^2 與 R^3 可相同或相異且係選自氫與低碳數分枝或未分枝型烷基之中者；

X 為一包括下面的序列之肽：

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

NH^2 為 X 的胺基末端之胺基；且 CO 為 X 的羧基末端之羧

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

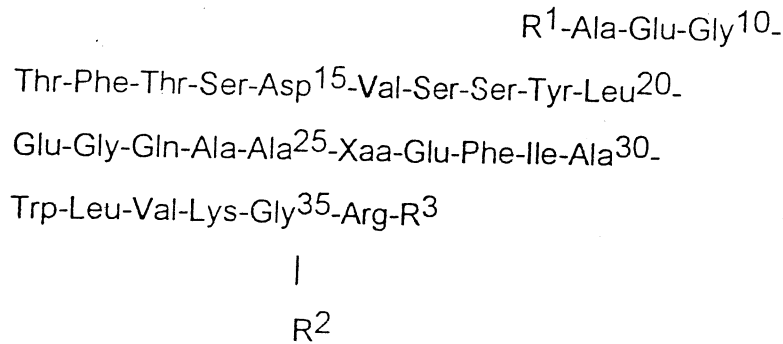
基：

(2) 其酸加成鹽；及

(3) 其經保護或經部份保護的衍生物；

其中該化合物所具促胰島素活性超越 GLP-1 (1-36) 或 GLP-1 (1-37) 所具促胰島素活性。

另一較佳的可用於本發明中之分子組合包括美國專利第 5,512,549 號中所揭示且具有下式通式之化合物：



及其醫藥可接受鹽，其中 R^1 可為 4-咪唑基丙醯基，4-咪唑基乙醯基，或 4-咪唑基-a, a-二甲基-乙醯基； R^2 可為 C_6 - C_{10} 未分枝醯基，或不存在； R^3 可為 Gly-OH 或 NH_2 ；且，Xaa 為 Lys 或 Arg。

可用於本發明中的更佳化合物為其中 Xaa 為 Arg 且 R^2 為 C_6 - C_{10} 未分枝醯基者。

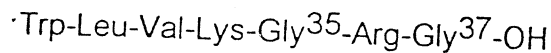
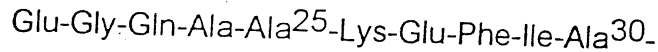
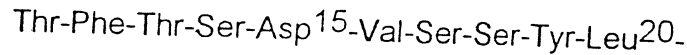
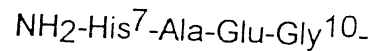
可用於本發明中的高度較佳化合物為其中 Xaa 為 Arg， R^2 為 C_6 - C_{10} 未分枝醯基，且 R^3 為 Gly-OH 者。

可用於本發明中的更高度較佳化合物為其中 Xaa 為 Arg， R^2 為 C_6 - C_{10} 未分枝醯基， R^3 為 Gly-OH，且 R^1 為 4-咪唑基丙醯基者。

五、發明說明 (19)

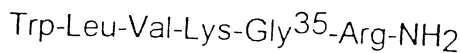
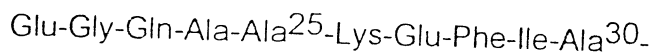
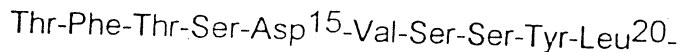
可用於本發明中的最佳化合物為其中 Xaa 為 Arg，R² 為 C₈ 未分枝醯基，R³ 為 Gly-OH，且 R¹ 為 4-咪唑基丙醯基者。

於本發明中，高度較佳者為使用美國專利第 5,120,712 號中所揭示的分子。彼等分子包括具有下面胺基酸序列之肽：



和該肽的衍生物，其中該肽可為該肽的醫藥可接受酸加成鹽；該肽的醫藥可接受性羧酸鹽；該肽的醫藥可接受性低碳數烷基酯；或該肽的醫藥可接受醯胺其中該醯胺可為醯胺，低碳數烷基醯胺，或二-低碳數烷基醯胺。

於本發明中最高度較佳者為使用 GLP-1 (7-36) 醯胺，或其醫藥可接受鹽。GLP-1 (7-36) 醯胺的胺基酸序列為：



於本發明中最高度較佳者為使用 Val⁸-GLP-1 (7-37)OH，或其醫藥可接受鹽。Val⁸-GLP-1 (7-37)OH 的胺基酸序列為：

五、發明說明 (20)

$$\text{NH}_2\text{-His}^7\text{-Val-Glu-Gly}^{10}\text{-}$$

$$\text{Thr-Phe-Thr-Ser-Asp}^{15}\text{-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu}^{20}\text{-}$$

$$\text{Glu-Gly-Gln-Ala-Ala}^{25}\text{-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala}^{30}\text{-}$$

$$\text{Trp-Leu-Val-Lys-Gly}^{35}\text{-Arg-Gly}^{37}\text{-OH}$$
化合物之製備

本發明所用的活性化合物，亦即，GLP-1，GLP-1類似物，或GLP-1衍生物，或任何相關化合物包括在經周圍給用時可以有效地減低中風後死亡率與罹病率之活性片段的製備方法係熟知者，且載於美國專利第5,118,666；5,120,712；和5,523,549號之中。

本發明所用活性化合物或其前驅體的胺基酸部份係經由下述方法製得：1)固相合成化學；2)從天然來源純化出GLP分子；3)重組DNA技術；或4)這些方法的組合。

多肽的固相化學合成係技藝中熟知者且可參看此領域的一般教科書例如Dugas and Penney (1981)；Merrifield (1962)；Stewart and Young (1969, 1984)。

舉例而言，可利用PE-Applied Biosystems所供應的430A肽合成器(PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404)和合成循環經由固相方法合成胺基酸部份。BOC-胺基酸和其它藥劑可在市面上從PE-Applied Biosystems與其它化學品供應商取得。採用雙重偶合方案的次序性BOC化學可應用於用對-甲基二苯甲基胺樹脂起始以製造C-端羧醯胺之情況中。要製造C-端酸時，係使用對應的PAM樹脂。Asn, Gln和Arg係使用預形

五、發明說明（21）

成的羥基苯并三唑酯予以偶合。下列側鏈保護基都可以用：

Arg，甲苯磺醯基

Asp，環己基

Glu，環己基

Ser，苄基

Thr，苄基

Tyr，4-溴苄氧羰基

BOC保護可用三氟乙酸/二氯甲烷予以完成。在合成完畢後可用含10%間-甲酚的無水氟化氫(HF)將肽脫保護基及從樹脂切下來。側鏈保護基的切斷及肽從樹脂切斷係在-5°C至5°C，較佳者在冰上進行60分鐘。於脫除掉HF之後，用醚洗肽/樹脂，並用冰醋酸萃取出肽及予以冷凍乾燥。

諳於重組DNA技術者所熟知的技術都可用來製備本發明所用的活性化合物。事實上，因為有較高的產率，所以重組DNA法可能為較佳者。重組製造中的基本步驟為：

- a) 分離出編碼本發明GLP-1分子的天然DNA序列或構成一合成型或半合成型GLP-1分子的DNA密碼序列，
- b) 將該密碼序列放置於一表現載體內其方式的適合於表現出蛋白質其可呈單獨形式或呈融合蛋白質形式，
- c) 用該表現載體轉形一恰當的真核生物或原核生物宿主細胞，
- d) 在可促成GLP-1分子的表現之情況下培養該經轉形的宿主細胞，及

五、發明說明 (22)

e) 收取及純化該經重組製成的GLP-1分子。

如前文所述者，該密碼序列可為完整合成者或為對較大的天然胰增血糖素-編碼DNA的改質結果。編碼胰增血糖素原的DNA序列載於Lund et al (1982)中且可用於本發明化合物的半合成製造中作為起始物經由變更天然序列以達到所欲結果。

經由試管內(in vitro)或活體內(in vivo)轉錄與轉譯以導致GLP-1分子的製造所用之合成基因可經由技藝中熟知的技術予以構成。由於基因密碼的天然簡併性，熟練技術員都了解可構成一頗大但確定數目的DNA序列，彼等全都編碼本發明GLP-1分子。

合成型基因構成方法係技藝中熟知者(Brown et al. 1979)。DNA序列係使用基因密碼從合意的胺基酸序列設計出，其可由熟練的生物學家容易地確定。在設計之後，可用習用的DNA合成裝置何如Model 380A或380B DNA合成器(PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404)產生該序列本身。

要表現本發明所用化合物的胺基酸部份時，係將處理過的合成DNA序列經由使用恰當的核酸內切限制酶而插置於許多恰當的重組DNA表現載體中(Maniatis et al., 1989)。諸核酸內切限制酶切斷部位係經設計成GLP-1分子-編碼DNA的任一端以幫助分離出，及整合到技藝中熟知的擴增與表現載體之內。所採用的特殊核酸內切酶係決定於所用的母表現載體所具核酸內切限制酶之切斷型態。

五、發明說明 (23)

限制部位皆經選擇得使密碼序列與對照序列恰當地取向，藉此達到恰當的架構內讀碼 (in-frame reading) 及標的蛋白質之表現。密碼序列必須經配置到與啓動子和表現載體的核糖體結合部位都處於正確讀碼區內；兩者都是在要表現蛋白質的宿主細胞內作用。

要達到合成基因的有效轉錄時，其必須與一啓動子-操縱子區 (promoter-operator region) 呈可操縱地締合著。所以，合成基因的啓動子-操縱子區係配置成相對於合成基因的 ATG 起始密碼子呈相同的序列取向。

有多種可用來轉形原核生物和真核生物細胞之表現載體係技藝中熟知者 (Promega Catalogue, 1992 ; Stratagene Catalogue, 1992)。此外，美國專利第 4,710,473 號述及可用來在大腸埃希氏菌 (E. Coli) 內以高水平表現外來基因之圓形 DNA 質體轉形載體。彼等質體可在重組 DNA 程序中用為轉形載體且

- (a) 在該質體上載有在宿主細胞內自主複製之能力；
- (b) 相對於維持宿主細胞培養物的溫度而控制自主質體複製；
- (c) 將質體在宿主細胞群內的維持予以穩定化；
- (d) 顯示質體在宿主細胞群中的維持之蛋白質產物的直接合成；
- (e) 供對質體為獨特性的順序性核酸內切限制酶辨識部位；及
- (f) 終止 mRNA 轉錄。

五、發明說明 (24)

這些圓形 DNA 質體可作為載體用於重組 DNA 程序中以確保外源基因之高表現水平。

在針對本發明所用化合物的胺基酸部份構成表現載體之後，下一步驟為將該載體置於適當的細胞內及藉此構成可用來表現多肽的重組宿主細胞。用重組 DNA 載體轉形細胞所用的技術皆為技藝中熟知者且可在如 Maniatis, et al., 上引資料等一般參考文獻中找到。宿主細胞可從真核生物或原核生物細胞構成。

原核生物宿主細胞通常以較高的速率產生蛋白質且較容易培養。在高水平細菌表現系統中表現出的蛋白質含特性地聚集成顆粒或包藏體，其含有高水平的過度表現蛋白質。彼等蛋白質聚集體典型地必須使用技藝中熟知的技術予以回收，溶解，變性及再摺疊 (Kreuger et al., 1990；美國專利第 4,923,967 號)。

GLP-1 類似物和衍生物之製備

對前驅體 GLP-1 或 GLP-1 胺基酸序列予以變更以製得合意的 GLP-1 類似物或 GLP-1 衍生物，或其活性片段之舉係用熟知方法予以完成的：化學改質，酵素改質，或化學和酵素改質之組合。傳統液相方法和半合成方法的技術也可以用來製備本發明所用的 GLP-1 分子。製備本發明 GLP-1 分子所用的方法係熟練肽化學家所熟知者。

在 Lys³⁴ 所含 ϵ -胺基加上醯基之舉可經由使用技藝中已知的多種方法中之任一者予以完成 (Bioconjugate Chem. 1990；Hashimoto et al., 1989)。

五、發明說明 (25)

例如，可以使用50%乙腈/硼酸鹽緩衝液將辛酸N-羥基-丁二醯亞胺酯加到離胺醯基- ϵ -胺基。可在咪唑基加入之前或之後將肽予以醯基化。再者，若肽係經由重組方式製備時，可在酵素切斷之前醯基化。此外，GLP-1衍生物中的離胺酸可依WO 96/29342中所述予以醯基化。

多種經保護，未保護，和經部份保護，天然和非天然的官能性GLP-1 (7-36) 醯胺和GLP-1 (7-37) 分子之類似物和衍生物的存在和製備皆經說明過(美國專利第5,120,712；5,545,618 和 5,118,666 號；Orskov et al., 1989；WO 91/11457)。

視情況，GLP-1衍生物的胺基端和羧基端胺基酸殘基皆可經保護，或，視情況，只將其中一端保護住。彼等保護基的形成和脫除所用的反應皆在諳於此技者所知的著作中述及，例如，Protective Groups in Organic Chemistry 1973；Green, 1981；和 Schröder and Lübke, 1965。代表性胺基保護基包括，例如，甲醯基，乙醯基，異丙基，丁氧羰基，苄甲氧羰基，苄氧羰基，等。代表性羧基保護基包括，例如，苄基酯，甲酯，乙酯，第三丁酯，對-硝基苯酯，等。

本發明使用的羧基端低碳數烷基酯GLP-1衍生物係經由用合意的(C₁-C₄)烷基醇與合意的多肽於催化性酸例如鹽酸存在中反應而製成。彼等烷基酯形成的恰當條件包括約50°C的反應溫度及約1小時至約3小時的反應時間。類似地，可以形成Asp及/或Glu殘基的烷基酯衍生物。

五、發明說明 (26)

本發明所用化合物的羧醯胺衍生物之製備係依，例如，Stewart et al. (1984) 中所述形成的。

GLP-1，GLP-1 類似物或 GLP-1 衍生物之醫藥可接受鹽形式都可用於本發明中。常用來形成酸加成鹽的酸為無機酸例如鹽酸，氫溴酸，氫碘酸，硫酸，磷酸，等；及有機酸例如對-甲苯磺酸，甲烷磺酸，草酸，對-溴苯基-磺酸，碳酸，丁二酸，檸檬酸，苯甲酸，乙酸，等。彼等鹽的例子包括硫酸鹽，焦硫酸鹽，硫酸氫鹽，亞硫酸鹽，亞硫酸氫鹽，磷酸鹽，磷酸一氫鹽，磷酸二氫鹽，偏磷酸鹽，焦磷酸鹽，氯化物，溴化物，碘化物，乙酸鹽，丙酸鹽，癸酸鹽，辛酸鹽，丙烯酸鹽，甲酸鹽，異丁酸鹽，己酸鹽，庚酸鹽，丙炔酸鹽，草酸鹽，丙二酸鹽，丁二酸鹽，辛二酸鹽，癸二酸鹽，反丁烯二酸鹽，順丁烯二酸鹽，丁炔-1,4-二酸鹽，己炔-1,6-二酸鹽，苯甲酸鹽，氯苯甲酸鹽，甲基苯甲酸鹽，二硝基苯甲酸鹽，羥基苯甲酸鹽，甲氧基苯甲酸鹽，酞酸鹽，磺酸鹽，二甲苯磺酸鹽，苯乙酸鹽，苯丙酸鹽，苯丁酸鹽，檸檬酸鹽，乳酸鹽， γ -羥基丁酸鹽，乙醇酸鹽，酒石酸鹽，甲烷磺酸鹽，丙烷磺酸鹽，萘-1-磺酸鹽，萘-2-磺酸鹽，扁桃酸鹽，等。較佳的酸加成鹽為用磺酸例如鹽酸和氫溴酸，且，特別者，鹽酸，所形成者。

鹼加成鹽包括衍生自無機鹼，例如銨或鹼金屬或鹼土金屬的氫氧化物，碳酸鹽，碳酸氫鹽，等。可用來製備本發明鹽類的彼等鹼因而包括氫氧化鈉，氫氧化鉀，氫氧化

五、發明說明 (27)

鉍，碳酸鉀，等。彼等鹽形式皆為特別較佳者。

於本發明中用到的 GLP-1，GLP-1 類似物，或 GLP-1 衍生在用於本發明中之前可與一或多種賦形劑調配。例如，用於本發明中的活性化合物可經由熟知方法與二價金屬陽離子錯合。彼等金屬陽離子包括，例如， Zn^{++} ， Mn^{++} ， Fe^{++} ， Co^{++} ， Cd^{++} ， Ni^{++} ，等。

本發明的組合物

視需要，用於本發明中的活性化合物可與醫藥可接受的緩衝劑組合，並將 pH 調節到可提供可接受的安定性，及為非經腸給藥可接受的 pH 值。

視需要，可加入一或多種醫藥可接受的抗微生物劑。間-甲酚和酚皆為較佳的醫藥可接受性抗微生物劑。可加入一或多種醫藥可接受性鹽以調整離子強度或張性。可加入一或多種賦形劑以進一步調整調配物的張性。甘油即為一種等張性調整用賦形劑之一例。

GLP-1 受體及經由結合到 GLP-1 受體所起始的信號轉導級聯皆載於 WO 96/25487；Thorens et al., 1993；和 Widmann et al., 1994 之中。GLP-1 受體為具有七個透膜功能部位的膜蛋白質，其經偶合到異三體型 G-蛋白質上其將經由配體結合的受體活化連接到細胞內第二信使的產生，特別是環狀腺苷一磷酸 (cAMP)。cAMP 轉而活化一特殊的蛋白質激酶，cAMP-依賴性蛋白質激酶 (蛋白質激酶 A，PKA)。這種酵素可將某些基因所含啓動子區內的許多關鍵性效應元素予以磷酸化。於胰 b-細胞和其它神經內分泌細胞

五、發明說明 (28)

中，調節分泌途徑所含某些特殊蛋白質的磷酸化會經由刺激分泌粒的外釋作用而刺激肽分泌。

有多種化合物皆為已知可刺激內源性 GLP-1 的分泌者。例如，將 STC-1 細胞暴露於某些促分泌物如腺苷酸環化酶活化劑，forskolin，或蛋白質激酶-C-刺激劑，12-O-十四烷醯基 phorbol-13-乙酸酯 (TPA)，會促成 GLP-1 釋放之明顯增加 (Abella et al., 1994)。STC-1 細胞素係源自載有胰島素-促進性致癌基因的轉殖小鼠體內的腸腫瘤，且 STC-1 細胞係已知含有可產生 GLP-1 的胰增血糖素原之 mRNA 轉錄本者。別的化合物，例如，抑體素，胃抑制多肽，葡萄糖依賴性促胰島素肽，鈴蟾素，抑鈣素基因-關聯性肽，胃泌素-釋放性肽，膽鹼能激動劑，b-腎上腺素能激動劑，異丙腎上腺素，及毒蕈鹼型膽鹼能激動劑，胺甲醯甲膽鹼，皆同樣地已知可促成內源 GLP-1 的釋出者 (Plarsancie et al., 1994 ; Orskov et al., 1996 ; Brubaker, 1991 ; Buchon, et al., 1987)。

組合物之投服

投服可經由熟練醫師已知為有效的任何途徑進行，例外者為直接進入中樞神經系統的非經腸投服不是本發明所教授或揭示之途徑。較佳者為經周圍的非經腸投服。非經腸投服係一般醫學文獻中所知者，其為經由無菌注射筒或某些其它機械裝置例如注入泵將一劑形注射到體內。為本發明目的而言，周圍非經腸途徑包括靜脈內，肌肉內，皮下，和腹膜內給藥徑途。更佳者為經靜脈內，肌肉內和皮

五、發明說明 (29)

下的投服本發明所用化合物之途徑。甚至更高度較佳者為經靜脈內和皮下投服本發明所用化合物之途徑。用於非經膠給藥時，較佳者係將本發明所用活性化合物與恰當 pH 的蒸餾水組合。

本發明用以促成死亡率和罹病率減低所用的某些化合物也可適合經口，直腸，鼻，或下呼吸道等非-非經腸途徑予以投服。於該等非-非經腸途徑中，對於投服本發明所用肽而言較佳者為下呼吸道途徑。供經由下呼吸道投服所用的各種肽化合物調配物皆揭示於美國專利第 5,284,656 和 5,364,838 號之中。文獻 WO 96/19197 揭示出適合用來增進本發明所用化合物的下呼吸道吸收之各種肽的氣霧劑。經口給藥途徑對本發明所用化合物係較佳者。

附加的醫藥方法可用來控制作用的持續期。控釋製劑可經由使用聚合物來複合或吸收本發明所用化合物而達到。經由選擇恰當的巨分子，例如聚酯，聚胺基酸，聚乙烯基吡咯酮，乙烯/乙酸乙烯酯共聚物，甲基纖維素，羧甲基纖維素，或硫酸魚精蛋白，及經由選擇恰當的巨分子濃度，以及摻入方法，以期延長釋放而得到延長的持續期。經由控釋製劑延長作用持續期的另一種可能方法為將來發明所用活性化合物摻加到聚合物材料例如聚酯，聚胺基酸，水凝膠，聚(乳酸)或乙烯/乙酸乙烯酯共聚物，之粒子內。另外，取代將化合物摻加到彼等聚合物粒子中者，可將本發所用化合物捕捉到經由，例如凝聚技術或界面聚合所製的微膠囊，例如分別為羧甲基纖維素-或明膠-微膠

五、發明說明 (30)

囊；或在膠體藥物輸送系統，例如，微脂粒，白蛋白微球粒，微乳液，奈微子 (nanoparticles)，和奈膠囊 (nanocapsules)，或到巨乳液等之內。彼等敘述皆為諳於此技者所知且經揭示於，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences，1980 之中。

劑量

GLP-1，GLP-1 類似物或 GLP-1 衍生物，或其活性片段對特殊患者減低因中風所致死亡率和罹病率之有效劑量決定於許多因素，其中包括患者的特性，重量和年齡，中風嚴重度，中風副型，給藥途徑和生物利用率，投服化合物在體內的持續存在，配方，及力價。在間斷給藥時，每次給藥的劑量也必須考慮到投藥之間隔，及所給化合物之生物利用率。在連續給藥時，適當的劑量率為 0.25 至 6 微微莫耳/公斤體重/分，較佳者為約 0.5 至約 1.2 微微莫耳/公斤/分。熟練醫師都可定出含 GLP-1，GLP-1 類似物或 GLP-1 衍生物，或其活性片段的投服劑量與速率以達到合意的臨床結果，即經由葡萄糖控制減低中風後的死亡率與罹病率。於一實施例中，將血漿葡萄糖濃度減低到約 7 毫莫耳/升以下係急性中風後的目標。

“醫藥可接受”意指適合給人類服用，亦即，不含毒性元素，不良雜質等，且不會干擾其中所含活性化合物的活性。

具有在 4.8 至 7.5 範圍內的等電點之眾多 GLP-1 類似物和衍生物皆經揭示出且包括，例如：

五、發明說明 (31)

GLP-1 (7-36) NH₂

Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂

Gln⁹-GLP-1 (7-37)

中風之診斷

“中風”之診斷係涉及醫學判斷者。本發明主題的治療通常係給急性中風期中的人所用。

需要本發明所用化合物的患者為處於急性中風期者，且其亦不能自我調節血液葡萄糖。若患者有下列情況時即為不能自我調節者：(1) 先前經診斷出患有根據 the National Diabetes Data Group (Diabetes, 1979) 的定義之胰島素-依賴型糖尿病 (IDDM) 或非-胰島素依賴型糖尿病 (NIDDM)；(2) 即使沒有事先的糖尿病診斷，也具有大於 11 毫莫耳/升的血液葡萄糖水平者；或 (3) 具有不正常的葡萄糖耐性者。

可以將患者的血糖水平有效地正常化所用 GLP-1，GLP-1 類似物，或 GLP-1 衍生物之劑量決定於許多因素，其中包括，但不限於，患者的性別，體重與年齡，不能調節血糖之嚴重度，不能調節血糖的基底肇因，是否有同時給用葡萄糖或另一種醣類源，給藥途徑與生物利用率，在體內的持續性，配方，與力價。於連續投服之情況中，適當的投藥率為 0.25 至 6 微微莫耳/公斤體重/分，較佳者為約 0.5 至約 1.2 微微莫耳/分之間。在斷續給藥之情況中，對每次給藥的劑量必須慮及投藥間隔，GLP-1，GLP-1 類似物或 GLP-1 衍生物的生物利用率，及促成正常血糖所需的水

五、發明說明 (32)

平。熟練醫師都可定出 GLP-1，GLP-1 類似物，或 GLP-1 衍生物的投服劑量和速率以達到合意的臨床結果。

實施例

本發明可經由參照特殊實施例而獲得更順利地了解，彼等係經提出以示範說明本發明具體實施例者。

實施例 1: 皮下注射 GLP-1 (7-30) 對 NIDDM 患者血糖之影響

對 5 個有非-胰島素依賴型糖尿病 (NIDDM) 的患者於晚期以 1.2 微微莫耳 / 公斤 / 時的投藥率經由皮下注入給用 GLP-1 (7-36) 醯胺 10 小時。其對照組為對相同的 5 個患者連續注入胰島素，但與 GLP-1 (7-36) 醯胺注入為不相同的天進行。每二小時調整胰島素注入速率以達到最適控制，及避免低血糖症。如表 1 中的數據，及圖 1 所示者，皮下注入 GLP-1 (7-36) 醯胺可將血糖近乎正常化而不會在任何患者體內誘發低血糖症。用 GLP-1 (7-36) 醯胺所得新陳代謝控制優於胰島素所達到者，且用 GLP-1 (7-36) 醯胺處理所得平均血糖水平比對照組在 23:00，0:00，和 1:00 較低具統計意義之量。

表 1. 對 5 個 NIDDM 患者用 GLP-1 (7-36) 醯胺在晚間連續注入 10 小時所得平均血糖水平。於不同天對相同的患者所作對照研究中，係經由連續注入而給用胰島素。

五、發明說明 (33)

小時	GLP-1 注入		胰島素注入(對照組)	
	平均血糖 (mM)	標準誤差 (mM)	平均血糖 (mM)	標準誤差 (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

實施例 2: 於用餐中皮下注射 GLP-1 (7-36) 對 NIDDM 患者血
水平之影響

在一天中，對 5 個 NIDDM 患者在早餐，午餐，和晚餐中注入 GLP-1 (7-36) 醯胺 3 小時。注入時間為 7:30-10:30 (早餐)，10:30-1:30 (午餐)，和 4:30-7:30 (晚餐)，如圖 2 中所指出者。在對相同的 5 個 NIDDM 患者於不同天進行的對照實驗中，係在開始用餐之前刻經皮下注射入胰島素，如圖 2 中所示者。於注入 GLP-1 時，可消除掉對於胰島素注射所觀察到的餐後葡萄糖逸出現象，且可維持住正常的血糖水平。緊接在每一次 GLP-1 (7-36) 醯胺注入終止之後，血

五、發明說明 (34)

糖水平有明顯地增加。未觀察到 GLP-1 (7-36) 醯胺的不當副作用。這些數據顯示 GLP-1 (7-36) 醯胺注入比胰島素注入可以更有效地控制餐後葡萄糖水平，且只要 GLP-1 (7-36) 醯胺注入繼續進行該控制即保持有效。

表 2. 對 5 個 NIDDM 患者在每一餐起始時開始注入 GLP-1 (7-36) 醯胺三小時所得平均血糖水平。於對相同患者在不同天進行的對照研究中，係在每一餐之前刻皮下注射投服胰島素。用餐係在 7:30，10:30 和 16:30 開始。

小時	GLP-1 注入		胰島素皮下注射 (對照組)	
	平均血糖 (mM)	標準誤差 (mM)	平均血糖 (mM)	標準誤差 (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

五、發明說明 (35)

引用文件：

- Abello, Jr. *et al.*, *Endocrinol.* 134:2011-2017a (1994).
- Araki N., *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12:469-76 (1992)
- Barbash-G.I., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 22:707-713 (1993)
- Bioconjugate Chem.* "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pp. 1-212 (1990)
- Broderick, J.P., *et al.*, *Stroke* 26:484-7 (1995)
- Brown, *et al.* (1979) *Methods in Enzymology*, Academic Press, N.Y., Vol. 68, pp. 109-151
- Brubaker, P.L. *Endocrinol.* 128:3175-3182 (1991)
- Buchan A.M.J. *et al.*, *Gastroenterol.* 93:791-800 (1987)
- Cazzato G., *et al.*, *Italian Journal of Neurological Sciences* 12:283-8 (1991)
- de Courten-Myers G., *et al.*, *Stroke* 19:623-30 (1988)
- deFalco F.A., *et al.*, *Schweizer Archiv Für Neurologie und Psychatrie* 144:233-9 (1993)
- National Diabetes Data Group, *Diabetes* 28:1039-57 (1979)
- Dietrich, W.D., *et al.*, *Stroke* 24:111-6 (1993)
- Duckrow R.B., *et al.*, *Annals of Neurology* 17:267-72 (1985)
- Duckrow R.B., *et al.*, *Stroke* 18:52-8 (1987)
- Dugas, H. and Penney, C., *Bioorganic Chemistry*, Springer-Verlag, New York (1981), pp. 54-92
- Fuller J.H., *Diabet. Metab.* 19:96-99 (1993)
- Granger C.B., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 21(4):920-5 (1993)
- Gray C.S., *et al.*, *Diabetic Medicine* 4:237-40 (1987)
- Green, T.H., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York (1981)
- Grines C., *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 328:673-679 (1993)
- Gutniak M., *et al.*, *Diabetes Care* 17:1039-44 (1994)
- Gutniak M., *et al.*, *New England J. of Medicine* 326(20):1316-1322 (1992)
- Hamsten A., *et al.*, *J. Int. Med.* 736:1-3 (1994) 236 Suppl.
- Hashimoto *et al.*, *Pharmaceutical Res.* 6(2):171-76 (1989)

五、發明說明 (36)

- Hendra, T.J., et al., *Diabetes Res. Clin. Pract.* 16:213-20 (1992)
- Karlson B.W., et al., *Diabet. Med.* 10(5):449-54 (1993)
- Kiers L., et al., *Journal of Neurology, Neurosurgery, Psychiatry* 55:263-70 (1992)
- Krcymann B., et al., *Lancet* 2:1300-1303 (1987)
- Kreuger, et al. (1990) in *Protein Folding*, Gierasch and King, eds., pp. 136-42, American Association for the Advancement of Science Publication No. 89-18S, Washington, D.C.
- Lehto S., et al., *Stroke* 27:63-8 (1966)
- Levine, S.R., *Annals of Neurology* 23:416-8 (1988)
- Lund, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:345-49 (1982)
- Malmberg K. and Rydén L., *Eur. Heart J.* 9:256-264 (1988)
- Malmberg K., et al., *J. Am. College Cardiology* 26:57-65 (1995)
- Malmberg, K.A., et al., *Diabetes Care* 17:1007-14 (1994)
- Maniatis et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3 (1989)
- Mentlein R., et al., *Eur. J. Biochem.* 214:829-35 (1993)
- Merrifield, J.M., *Chem. Soc.* 85:2149 (1962)
- Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research* 40:333-43 (1992)
- Moulin T., et al., *European Neurology* 38:10-27 (1997)
- Nauck M.A., et al., *Diabetologia* 36:741-44 (1993)
- Nauck M.A., et al., *J. Clin. Invest.* 91:301-7 (1993)
- O'Neill P.A., et al., *Stroke* 22:842-7 (1992)
- Orskov, C. et al., *Endocrinol.* 119:1467-1475 (1986)
- Orskov, C., et al., *J. Biol. Chem.* 264(22) :12826-29 (1989)
- Plaisancie, P. et al., *Endocrinol.* 135:2348-2403 (1994)
- Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London and New York (1973)
- Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980)
- Schröder and Lübke, *The Peptides*, Vol. I, Academic Press, London and New York (1965)

五、發明說明 (37)

Slivka A.P., *Brain Research* 562:66-70 (1991)

Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco (1969), pp. 24-66.

Stewart, J.M., *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company Press (1984)

Stone P., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 14:49-57 (1989)

The Promega Biological Research Products Catalogue (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399)

The Stratagene Cloning Systems Catalogue (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037)

Thorens B., *et al.*, *Diabetes* 42:1219-25 (1993)

Tuomilehto J., *et al.*, *Stroke* 27:210-15 (1996)

Wagner K.R., *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12:213-22 (1992)

Wass C.T. and Lanier W.L., *Mayo Clinic Proceedings* 71:801-12 (1996)

Weir C.J., *et al.*, *BMJ* 314 (7090):1303-6 (1997)

Widmann, C. *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 45:1029-1035 (1994)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

U.S. PATENT NOS.

4,710,473	5,284,656
4,923,967	5,364,838
5,118,666	5,545,618
5,188,666	5,512,549
5,120,712	5,523,549

FOREIGN PATENT NOS.

- WO 91/11457
- WO 96/29342
- WO 96/25487
- WO 96/19197

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

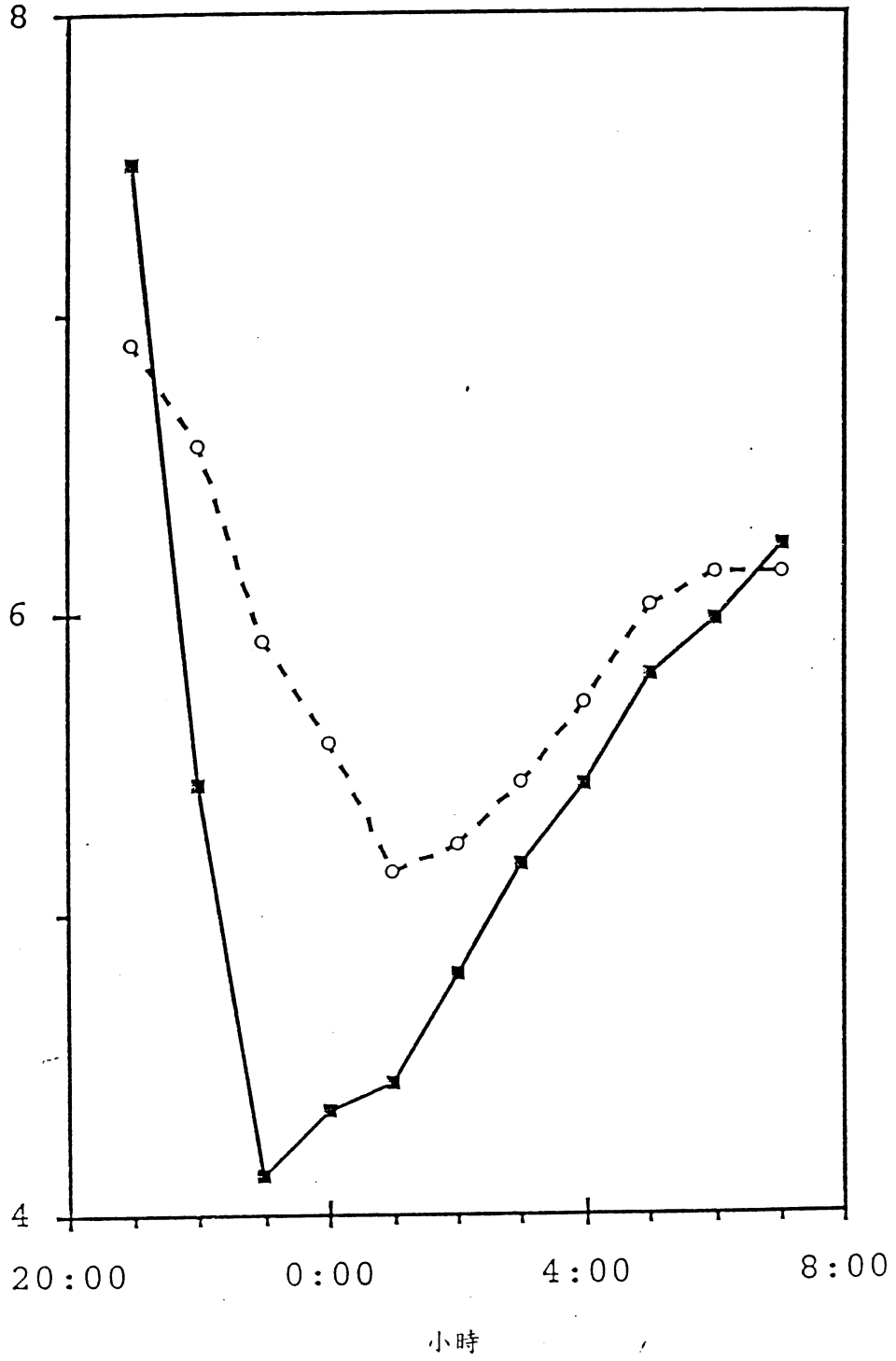


圖 1

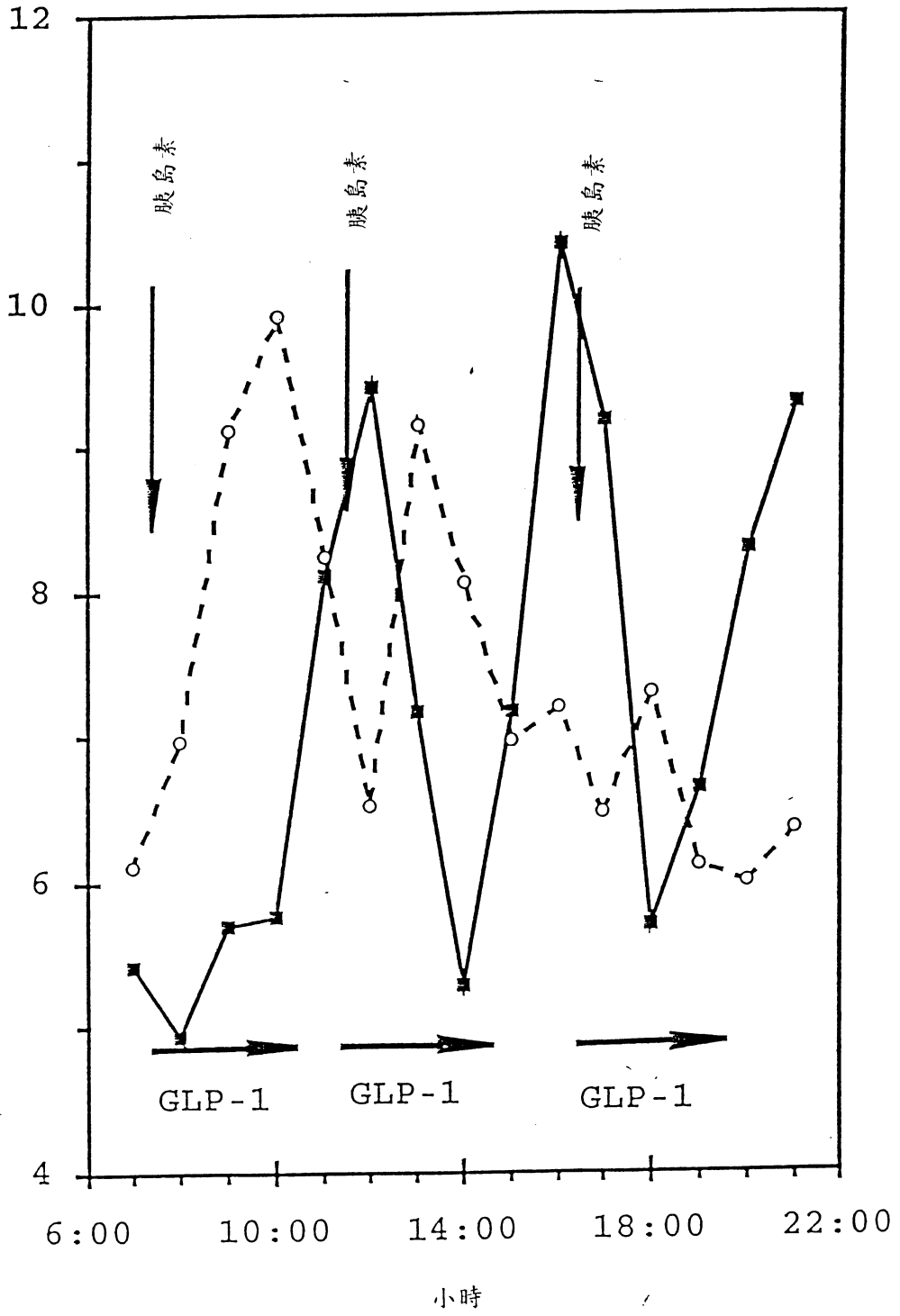


圖2

公告本

A4
C4

申請日期	88.10.22
案號	088116396
類別	A61K 38/26, A61P 9/10

中文說明書替換頁(95年4月)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中文	GLP-1或類似物用於中風後經由控制高血糖症以減低致死率與罹病率之用途
	英文	"USE OF GLP-1 OR ANALOGS IN REDUCING MORTALITY AND MORBIDITY AFTER STROKE BY CONTROLLING HYPERGLYCEMIA"
二、發明人	姓名	蘇德 依凡迪克
	國籍	瑞典
	住、居所	瑞典林地高市史佳法根路16B號
三、申請人	姓名 (名稱)	美國禮來大藥廠
	國籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國印第安那州印第安那普利市禮來公司中心
	代表人 姓名	彼得 . G. 史君格

四、中文發明摘要(發明之名稱: GLP-1或類似物用於中風後經由控制高血糖症以減低致死率與罹病率之用途)

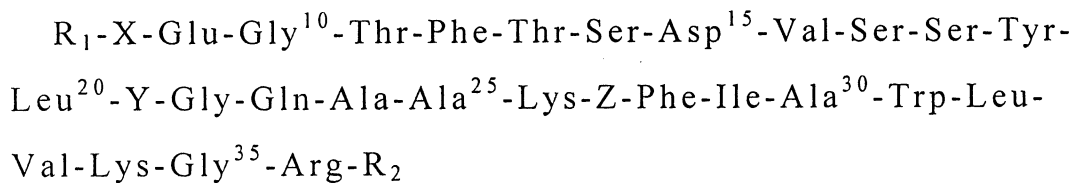
本發明提出一種減低與中風相關的致死率與罹病率之方法。GLP-1, GLP-1類似物, 或GLP-1衍生物係以能有效地將血糖正常化之劑量給用。

英文發明摘要(發明之名稱: "USE OF GLP-1 OR ANALOGS IN REDUCING MORTALITY AND MORBIDITY AFTER STROKE BY CONTROLLING HYPERGLYCEMIA")

This invention provides a method of reducing mortality and morbidity associated with stroke. GLP-1, a GLP-1 analog, or a GLP-1 derivative, is administered at a dose effective to normalize blood glucose.

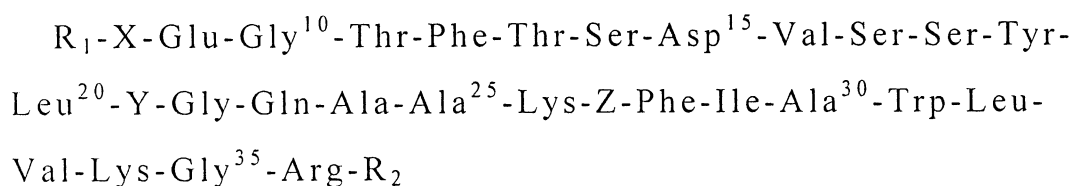
六、申請專利範圍

1. 一種用於中風後經由控制高血糖症以減低致死率與罹病率之醫藥組合物，包括有效量之發揮親胰島素活性之化合物，其藉與 GLP-1、GLP-1 類似物及 GLP-1 衍生物之相同受體或受體們交互作用而發揮它們的親胰島素活性。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該化合物係選自 GLP-1、GLP-1 類似物、GLP-1 衍生物及其醫藥可接受鹽。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之醫藥組合物，其中該 GLP-1 類似物包括胺基酸序列：



其中 R_1 為 His 或去胺基-組胺酸，X 為 Ala、Gly 或 Val，Y 為 Glu 或 Gln，Z 為 Glu 或 Gln 及 R_2 為 Gly-OH，及另包括一附加的胺基酸取代。

4. 根據申請專利範圍第 3 項之醫藥組合物，其中 R_1 為 L-組胺酸，X 為 Val，Y 為 Glu，Z 為 Glu 及 R_2 為 Gly-OH。
5. 根據申請專利範圍第 2 項之醫藥組合物，其中該 GLP-1 類似物包括胺基酸序列：



六、申請專利範圍

其中 R_1 為 His 或去胺基-組胺酸，X 為 Ala、Gly 或 Val，Y 為 Glu 或 Gln，Z 為 Glu 或 Gln 及 R_2 為 Gly-OH。

6. 根據申請專利範圍第 5 項之醫藥組合物，其中 R_1 為 L-組胺酸，X 為 Val，Y 為 Glu，Z 為 Glu 及 R_2 為 Gly-OH。

7. 根據申請專利範圍第 2 項之醫藥組合物，其中該 GLP-1 衍生物包括選自由 GLP-1 (7-34)、GLP-1 (7-35)、GLP-1 (7-36)、GLP-1 (7-37) 或其醯胺型式所組成之群組之 GLP-1 類似物之胺基酸序列，及另包括至少一種選自下列所組成之群之修飾：

(a) 用甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、蘇胺酸、天冬胺醯胺、穀胺醯胺、酪胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、精胺酸或 D-離胺酸取代位置 26 及/或位置 34 的離胺酸；或用甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、蘇胺酸、天冬胺醯胺、穀胺醯胺、酪胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、離胺酸或 D-精胺酸取代位置 36 的精胺酸；

(b) 用抗氧化性胺基酸取代位置 31 的色胺酸；

(c) 至少一種下列取代：用酪胺酸取代位置 16 的纈胺酸；用離胺酸取代位置 18 的絲胺酸；用天冬胺酸取代位置 21 的穀胺酸；用絲胺酸取代位置 22 的甘胺酸；精胺酸取代位置 23 的穀胺醯胺；用精胺酸取代

六、申請專利範圍

位置 24 的丙胺酸；及用穀胺醯胺取代位置 26 的離胺酸；及

(d) 包括下列至少一種之取代：用甘胺酸、絲胺酸或半胱胺酸取代位置 8 的丙胺酸；天冬胺酸、甘胺酸、絲胺酸、半胱胺酸、蘇胺酸、天冬胺醯胺、穀胺醯胺、酪胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸或苯丙胺酸取代位置 9 的穀胺酸；用絲胺酸、半胱胺酸、蘇胺酸、天冬胺醯胺、穀胺醯胺、酪胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸或苯丙胺酸取代位置 10 的甘胺酸；及用穀胺酸取代位置 15 的天冬胺酸。

8. 根據申請專利範圍第 7 項之醫藥組合物，其中該 GLP-1 類似物係選自由 GLP-1 (7-34)、GLP-1 (7-35)、GLP-1 (7-36)、GLP-1 (7-37) 或其醯胺型式所組成之群組，及另包括用丙胺酸取代位置 34 的精胺酸。
9. 根據申請專利範圍第 8 項之醫藥組合物，其中該 GLP-1 類似物包括經胺酸醯化 ϵ -胺基。
10. 根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項之醫藥組合物，其係以 0.25 至 6 微微莫耳/公斤/分之間之量投服。
11. 根據申請專利範圍第 10 項之醫藥組合物，其中該量為 0.5 至 2.4 微微莫耳/公斤/分之間。
12. 根據申請專利範圍第 11 項之醫藥組合物，其中該量為約 0.5 至約 1.2 微微莫耳/公斤/分之間。
13. 根據申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項之醫藥組合物，其

六、申請專利範圍

係用於經由非經腸途徑投服。

14. 根據申請專利範圍第13項之醫藥組合物，其係用於經靜脈內投服。
15. 根據申請專利範圍第13項之醫藥組合物，其係用於經皮下投服。
16. 根據申請專利範圍第14項之醫藥組合物，其係用於連續投服。
17. 根據申請專利範圍第14項之醫藥組合物，其係用於斷續投服。
18. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組合物，其係用於連續投服。
19. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組合物，其係用於斷續投服。