

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；2003/12/16；60/529,932

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

【發明所屬之技術領域】

本發明是針對類升糖素肽-1 (glucagon-like peptide-1)的胜肽類似物，其醫藥可接受之鹽類，利用這些類似物治療哺乳動物的方法以及利用含該類似物之醫藥組合物。

【先前技術】

類升糖素肽-1 (7-36) 醯胺 (GLP-1)是在腸道 L 細胞中藉由對升糖素前體(前升糖素，preproglucagon)進行組織特異性後-轉譯處理而合成的，(Varndell, J.M., et al., J. Histochem Cytochem, 1985:33:1080-6) 並因進食而釋放進入血液循環。GLP-1 的血漿濃度從空腹時約 15 pmol/L 上升至餐後 40 pmol/L 的高峰值。科學家已經證明，當血漿葡萄糖濃度在一定範圍內升高時，口服葡萄糖導致的血漿胰島素水平升高比由靜脈投予葡萄糖高三倍 (Kreymann, B., et al., Lancet 1987:2, 1300-4)。這種由進食而造成胰島素釋放之增加，已知為腸促胰島素 (incretin effect) 效應，主要係由體液調節，而現在認為 GLP-1 是人體中最強的生理性腸促胰島素。除了促胰島素作用，GLP-1 還可以抑制升糖素的分泌，延遲胃的排空 (Wettergren A., et al., Dig Dis Sci 1993:38:665-73) 以及可能會增加周圍組織對葡萄糖的處理 (D'Alessio, D.A. et al., J. Clin Invest 1994:93:2293-6)。

1994 年，有人注意到單皮下注射(s/c) GLP-1 便可

以使非胰島素依賴型糖尿病(NIDDM)患者的餐後血糖完全降至正常範圍，便提出 GLP-1 之治療功效(Gutniak, M.K., et al., Diabetes Care 1994:17:1039-44)。這種作用經認為是通過增加胰島素釋放以及減少升糖素的分泌而予以調節。另外，還顯示靜脈注射 GLP-1 可以延遲 NIDDM 患者的餐後胃排空(Williams, B., et al., J. Clin Endo Metab 1996:81:327-32)。與磺醯尿素類藥物不同，GLP-1 的促胰島素作用係根據血糖濃度 (Holz, G.G. 4th, et al., Nature 1993:361:362-5)。因此，在低血糖濃度情況下減低 GLP-1-調節之胰島素釋放可保護對抗嚴重的低血糖。這兩種作用的結合使 GLP-1 擁有比目前用於治療 NIDDM 的其他藥物獨特的治療優勢。

許多研究表明，當給健康人 GLP-1 時，能顯著影響血糖水平以及胰島素和升糖素的濃度(Orskov, C, Diabetologia 35:701-711, 1992; Holst, J.J., et al., Potential of GLP-1 in diabetes management in Glucagon III, Handbook of Experimental Pharmacology, Lefevbre PJ, Ed. Berlin, Springer Verlag, 1996, p. 311-326)，而且這些作用都具有葡萄糖相關性(Kreymann, B., et al., Lancet ii:1300-1304, 1987; Weir, G.C., et al., Diabetes 38:338-342, 1989)。而且，對糖尿病患者同樣有效(Gutniak, M., N. Engl J Med 226:1316-1322, 1992; Nathan, D.M., et al., Diabetes Care 15:270-276, 1992)，其

可將 II 型糖尿病患者的血糖水平控制在正常範圍內 (Nauck, M.A., et al., *Diabetologia* 36:741-744, 1993), 並可以改善 I 型糖尿病患者對血糖的控制 (Creutzfeldt, W.O., et al., *Diabetes Care* 19:580-586, 1996), 而提升其成為治療糖尿病藥物之可能性。

然而, GLP-1 於代謝上不穩定, 在體內血漿半衰期 ($t_{1/2}$) 僅 1 至 2 分鐘。經投予之外源性 GLP-1 亦快速地遭分解 (Deacon, C.F., et al., *Diabetes* 44:1126-1131, 1995)。這種代謝上之不穩定限制了天然的 GLP-1 之治療潛力。

人們曾試圖通過改善藥物配方來增強 GLP-1 及其類似物的治療潛力。例如, 國際專利公開案 No. WO 01/57084 便描述了生產 GLP-1 類似物晶體的過程, 據說這種晶體在製備醫藥組合物時很有用, 該醫藥組合物例如包含晶體和醫藥可接受載體之注射藥物。GLP-1(7-37)OH 之異源性微晶體簇已經可從鹽溶液中培養出來, 並可於用鋅和/或間甲酚進行晶體浸濕處理後對其進行檢查 (Kim and Haren, *Pharma. Res.* Vol. 12 No. 11 (1995))。含有針狀晶體和不定形沉澱的 GLP(7-36)NH₂ 粗製晶體懸浮液可用含有鋅或魚精蛋白的磷酸鹽溶液製備 (Pridal, et. al., *International Journal of Pharmaceutics* Vol. 136, pp.53-59 (1996))。歐洲專利公開案 No. EP 0619322A2 中描述了藉由將蛋白質溶液在 pH 7 至 8.5 的緩衝液中與特定的鹽和低分子量之聚

乙二醇 (PEG) 組合混合來製備微晶體狀 GLP-1(7-37)OH 的方法。尤其，美國專利 No. 6,566,490 描述了 GLP-1 的微晶體種植，其可有助於純化胜肽產物的製備。美國專利 6,555,521 (US '521) 揭示一種具有四角形扁平杆或平板狀之 GLP-1 晶體，這些形態據說可增強其純度並可增強其在體內的活性。US '521 認為這些晶體的形態相對統一，在懸浮液中停留的時間比之前的晶體簇和無定形晶體懸浮液長，而在這些懸浮液中晶體會快速沉降、聚集或凝集，阻塞注射器針頭，使劑量更無法確定。

已提出一種生物可分解之聚[(dl-乳酸-共-甘醇酸)-b-乙二醇-b-(-乳酸-共-甘醇酸)]之三段式共聚物其可用於控制 GLP-1 調配物之釋放。然而與其他聚合物系統相似，三段式共聚物之製造涉及複雜之程序以及會形成不均勻之粒子。

同樣地，亦已提出一種生物可分解之聚合物，例如，聚(乳酸-共-甘醇酸) (PLGA)，用於持續性遞送胜肽之調配物。然而此技藝中已不贊成使用此等生物可分解之聚合物，因為這些聚合物於製造時通常難溶於水且需要水-不混溶之有機溶劑，例如二氯甲烷，以及/或惡劣的製備條件。此等有機溶劑以及/或惡劣的製備條件經視為可能會對有興趣之蛋白質或胜肽增加誘發構型改變之風險，造成結構完整性之降低且危及生物活性。(Choi et al., Pharm. Research, Vol. 21, No. 5, (2004))。聚二醇醚共聚物具有同樣的缺點。(同上)。

在前述參考文獻中描述的 GLP-1 組成，用於製備 GLP 類醫藥調配物時不夠理想，因為其易於含有雜質以及 / 或另一方面不易重複性生產以及給藥。此外，已知 GLP 類似物在高濃度時會令人感覺噁心，所以需要提供持久的藥效，同時降低初始的藥物血漿濃度。因此，我們需要一種 GLP-1 調配物，其可以更簡單且可靠地生產製造、更簡單且可重複地給藥，以及可提供經降低的初始血漿濃度以減少或消除非所欲之副作用。

【發明內容】

本發明經摘述於下列段落 1) 到 67) 以及，之後的申請專利範圍。據此：

- 1) 於一方面中，本發明係關於一種醫藥組合物，其包括至少一種來自類升糖素肽-1、艾珊汀-4 (exendin-4)、及其類似物和衍生物之促胰島素分子，其在 pH 6 至 8，溫度約 4 至 40°C 的條件下，於水中的溶解度小於 1 mg/mL，較佳為小於 0.5 mg/mL。
- 2) 該促胰島素分子的等電點較佳為約 5 至 9，更佳為約 6 至 8，惟該分子非為人類 GLP-1(7-36)NH₂ 或者人類 GLP-1(7-37)-OH。
- 3) 於一具體實施例中，根據段落(1)本發明之特徵為一種組合物，復包括水。
- 4) 根據段落(1)至(3)中任一段所述之組合物，復包括非水性介質。

- 5) 根據段落(1)至(4)中任一段所述之組合物，其中該分子係存在於一種 pH 值小於 7，較佳為小於 5 的水溶液中。
- 6) 根據段落(1)至(5)中任一段所述之組合物，其中該分子係存在於 pH 值等於或小於 4.5 的澄清溶液中。
- 7) 根據段落(1)至(4)中任一段所述之組合物，該分子係存在於一種 pH 值大於 7，較佳大於 8 的水溶液中。
- 8) 根據段落(7)所述之組合物，其中該分子係存在於 pH 值等於或大於 10 的澄清溶液中。
- 9) 根據段落(1)至(4)中任一段所述之組合物，其中該分子之顆粒係存在於一種水性懸浮液或凝膠中。
- 10) 根據段落(9)所述之組合物，其中該分子之顆粒係存在於 pH 值約為 4 至 10 的水性懸浮液或凝膠中。
- 11) 根據段落(1)至(3)中任一段所述之組合物，其中該分子之顆粒係存在於一種非水性介質中。
- 12) 根據段落(1)至(11)中任一段所述之組合物，其中該分子之濃度約為 0.001 至 500 mg/mL，較佳為約 0.1 至 10 mg/mL。
- 13) 根據段落(1)至(12)中任一段所述之組合物，復包括防腐劑。
- 14) 根據段落(13)所述之組合物，其中該防腐劑係選自由間甲酚、酚、苯甲醇以及對羥基苯甲酸甲酯所組成之群組。
- 15) 根據段落(14)所述之組合物，其中該防腐劑之濃度為 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL。

16) 根據段落(1)至(15)中任一段所述之組合物，復包括一種等滲壓劑(isotonic agent)。

17) 根據段落(1)至(16)所述之組合物，其中該等滲壓劑的濃度為 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL。

18) 根據段落(1)至(17)中任一段所述之組合物，復包括二價離子，較佳為鋅。

19) 根據段落(18)所述之組合物，其中鋅的濃度為 0.0005 mg/mL 至 50 mg/mL。

20) 根據段落(1)至(19)中任一段所述之組合物，復包括穩定劑。

21) 根據段落(20)所述之組合物，其中該穩定劑係選自由咪唑、精胺酸以及組胺酸所組成之群組。

22) 根據段落(1)至(21)中任一段所述之組合物，復包括界面活性劑。

23) 根據段落(1)至(22)中任一段所述之組合物，復包括螯合劑。

24) 根據段落(1)至(23)中任一段所述之組合物，復包括緩衝劑。

25) 根據段落(24)所述之組合物，其中該緩衝劑係選自由 Tris、醋酸銨、醋酸鈉、甘胺酸、天冬胺酸以及 Bis-Tris 所組成之群組。

26) 根據段落(1)至(25)中任一段所述之組合物，復包括鹼性多肽。

27) 根據段落(26)所述之組合物，其中該鹼性多肽係選自由聚離胺酸、聚精胺酸、聚鳥胺酸、魚精蛋白、腐胺、精胺、亞精胺以及組蛋白所組成之群組。

28) 根據段落(1)至(27)中任一段所述之組合物，復包括醇類或單糖或二糖類。

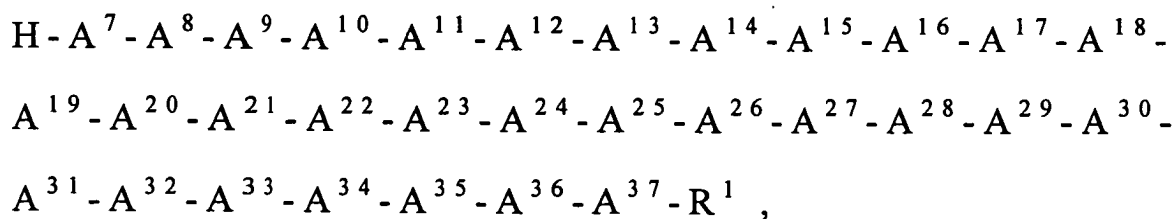
29) 根據段落(28)所述之組合物，其中該醇類或單糖或二糖類係選自由甲醇、乙醇、丙酮、甘油、海藻糖、甘露醇、葡萄糖、赤藻糖、核糖、半乳糖、果糖、麥芽糖、蔗糖以及乳糖所組成之群組。

30) 根據段落(1)至(29)中任一段所述之組合物，復包括硫酸銨。

31) 根據段落(1)至(30)中任一段所述之組合物，其中該分子係選自 GLP-1 類似物及衍生物，該類似物及衍生物具有至少兩個選自 L-或 D-Arg 以及 L-或 D-hArg 之殘基。

32) 根據段落(31)所述之組合物，其中該分子係選自 GLP-1 類似物及衍生物，其中第 26 號及 34 號殘基中至少一者為 L-或 D-Arg 或為 L-或 D-hArg。

33) 根據段落(32)所述之組合物，其中該 GLP-1 類似物係如下式(I)之化合物：



(I)

其中：

A^7 為 L-His 或刪除；

A^8 為 Ala、D-Ala、Aib、Gly、Ser、Gly、 β -Ala、Val、Acc、N-Me-Ala、N-Me-D-Ala 或 N-Me-Gly；

A^9 為 Glu、N-Me-Glu、N-Me-Asp 或 Asp；

A^{10} 為 Gly、Acc、 β -Ala 或 Aib；

A^{11} 為 Thr 或 Ser；

A^{12} 為 Phe、Acc、Aic、Aib、3Pal、4Pal、1Nal、2Nal、Cha、Trp 或 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{13} 為 Thr 或 Ser；

A^{14} 為 Ser 或 Aib；

A^{15} 為 Asp 或 Glu；

A^{16} 為 Val、Acc、Aib、Leu、Ile、Tle、Nle、Abu、Ala、1Nal、2Nal 或 Cha；

A^{17} 為 Ser 或 Thr；

A^{18} 為 Ser 或 Thr；

A^{19} 為 Tyr、Cha、Phe、3Pal、4Pal、Acc、1Nal、2Nal 或 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{20} 為 Leu、Acc、Aib、Nle、Ile、Cha、Tle、Val、Phe、1Nal、2Nal 或者 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{21} 為 Glu 或 Asp；

A^{22} 為 Gly、Acc、 β -Ala 或 Aib；

A^{23} 為 Gln 或 Asn；

A^{24} 為 Ala、Aib、Val、Abu、Tle 或 Acc；

A^{25} 為 Ala、Aib、Val、Abu、Tle 或 Acc；

A^{26} 為 Lys、Arg、hArg、Orn、Dab、或 Dap；

A^{27} 為 Glu 或 Asn；

A^{28} 為 Phe、3Pal、4Pal、1Nal、2Nal、Aic、Acc、Aib、Cha、Trp 或 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{29} 為 Ile、Acc、Aib、Leu、Nle、Cha、Tle、Val、Abu、Ala、Phe、1Nal、2Nal 或 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{30} 為 Ala、Aib 或 Acc；

A^{31} 為 Trp、2Nal、3Pal、4Pal、Phe、Acc、Aib、Cha 或 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{32} 為 Leu、Acc、Aib、Nle、Ile、Cha、Tle、1Nal、2Nal、Phe、 $(X^1)_n$ -Phe 或 Ala；

A^{33} 為 Val、Acc、Aib、Leu、Ile、Tle、Nle、Cha、Ala、1Nal、2Nal、Phe、Abu、Lys 或 $(X^1)_n$ -Phe；

A^{34} 為 Lys、Arg、hArg、Orn、Dab 或 Dap；

A^{35} 為 Gly、 β -Ala、Gaba、Ava、HN- $(CH_2)_m$ -C(O)、Aib、Acc、D-胺基酸，或者經刪除；

A^{36} 為 L-或 D-Arg，D-或 L-Lys，D-或 L-hArg，D-或 L-Orn，L-或 D-Dab，L-或 D-Dap，或者經刪除；

A^{37} 為 Gly、 β -Ala、Gaba、Ava、Aib、Acc、Ado、Aun、Aec、D-胺基酸，或者經刪除；

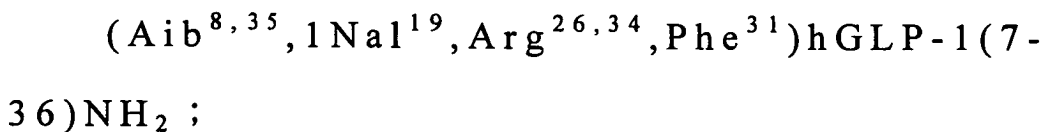
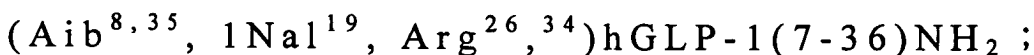
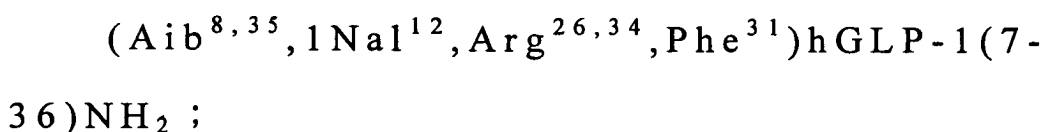
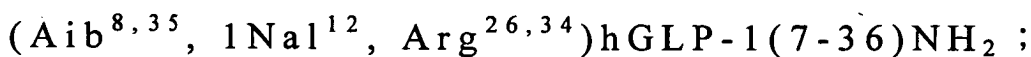
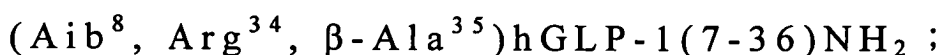
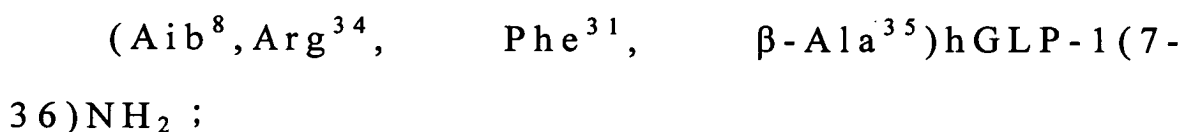
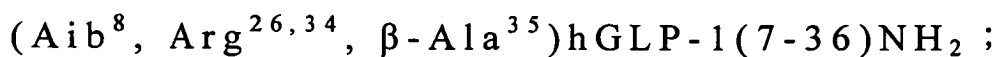
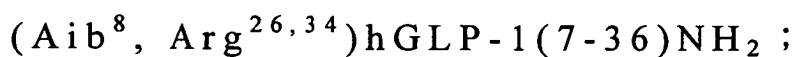
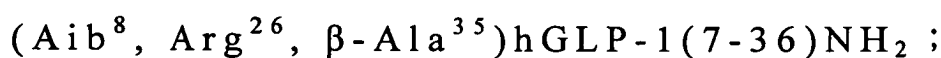
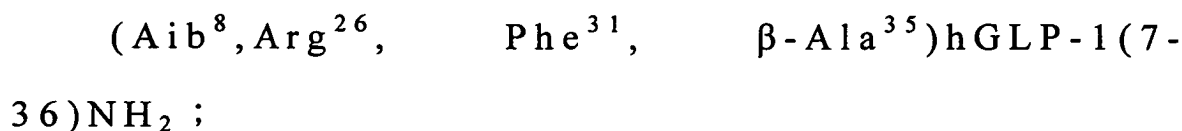
各 X^1 與各 (C_1-C_6) 烷基、OH 或鹵素無關；

n 為 1、2、3、4、或 5；

R^1 為 OH、 NH_2 、 (C_1-C_{30}) 烷氧基、或 $NH-X^2-CH_2-$

Z^0 ，其中 X^2 為 (C_1-C_{12}) 烴部分，而 Z^0 為 H 、 OH 、 CO_2H 或 $CONH_2$ ；

34) 根據段落(33)所述之組合物，其中該 GLP-1 類似物係下式之化合物：



(Aib^{8,35}, 2Nal¹², Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, 2Nal¹², Arg^{26,34}, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, 2Nal^{12,31}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, 2Nal¹⁹, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, 2Nal¹⁹, Arg^{26,34}, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, 2Nal^{19,31}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg²⁶, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal²⁸)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal²⁸, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal^{28,31})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal²⁸)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal²⁸, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ,

(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal^{28,31})hGLP-1(7-36)NH₂ ;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26,34}, 2\text{Nal}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26,34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Aib}^{8,35}, \text{Phe}^{31}, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{26})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{26}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{26}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{26,34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Arg}^{34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{26})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{26}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{26}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{26,34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{D-Ala}^8, \text{Arg}^{34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{26})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{26}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{26}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{26,34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Gly}^8, \text{Arg}^{34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{N-Me-D-Ala}^8, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{N-Me-D-Ala}^8, \text{Arg}^{26,34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{N-Me-D-Ala}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{26})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{26}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{26}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{26,34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Ser}^8, \text{Arg}^{34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$;
 $(\text{Val}^8, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$,
 $(\text{Val}^8, \text{Arg}^{26,34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$,
 $(\text{Val}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7\text{-}36)\text{NH}_2$,

$(\text{Val}^8, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Val}^8, \text{Arg}^{34}, \text{Aib}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; 或

$(\text{Val}^8, \text{Arg}^{34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$ 。

35) 於一較佳之具體實施例中，根據段落(34)本發明之特徵為一種組合物，其中該 GLP-1 類似物係下式之化合物：

$(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26,34}, 2\text{Nal}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26,34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$;

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Phe}^{31}, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$ 。

36) 又一較佳之具體實施例中，根據段落(34)本發明之特徵為一種組合物，其中該 GLP-1 類似物係下式之化合物：

$(\text{Aib}^{8,35}, \text{Arg}^{26,34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$ 。

37) 一種於有此需要之受者體內引發 GLP-1 受體出現激動作用之方法，該方法包括對該受者投予有效量之段落(1)或段落(33)之化合物或其醫藥可接受之鹽。

38) 一種治療選自由 I 型糖尿病、II 型糖尿病、肥胖症、胰高血糖素瘤(glucagonomas)、呼吸道分泌失調、代謝失調、關節炎、骨質疏鬆症、中樞神經系統疾病、心臟瓣

膜再狹窄以及神經退化性疾病所組成之疾病之方法，該方法包括對有此需要之受者投予有效量之段落(1)之化合物或其醫藥可接受之鹽。該疾病較佳為 I 型糖尿病或 II 型糖尿病。

39) 本發明之配方中所使用之另一較佳之式(I)化合物係於下列本發明之實施例一節中所揭示特別列舉之各化合物，或其醫藥上可接受之鹽。

40) 又另一方面，本發明提供一種於有此需要之受者體內引發 GLP-1 受體出現激動作用之方法，該方法包括對該受者投予本發明之配方，該配方包括有效量之上述所界定之式(I)化合物或其醫藥上可接受之鹽。

41) 另一方面，本發明提供一種治療選自由 I 型糖尿病、II 型糖尿病、肥胖症、胰高血糖素瘤、呼吸道分泌失調、代謝失調、關節炎、骨質疏鬆症、中樞神經系統疾病、心臟瓣膜再狹窄、神經退化性疾病、腎衰竭、充血性心衰竭、腎病徵候群、硬化、肺水腫、高血壓以及其他需要減少食物攝入之病症所組成之疾病之方法，該方法包括對有此需要之受者投予本發明所使用之配方，該配方包括有效量之上述所界定之式(I)化合物或其醫藥上可接受之鹽。上述方法較佳係用於治療 I 型糖尿病或 II 型糖尿病等疾病。

42) 於又一較佳方面，本發明之特徵係段落(40)或(41)之方法，其中該組合物包括實質上由 $[Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, Phe^{31}]hGLP-1(7-36)NH_2$ 以及鋅鹽所組成之水性溶液，更佳者為該組合物之 pH 值低於 7.0，又更佳者低於 5.0，

再又更佳者低於 4.0。

43) 於更佳之具體實施例中，本發明之特徵係段落(42)之組合物，其中該 $[Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, Phe^{31}]hGLP-1(7-36)NH_2$ 之濃度係 0.5 至 0.8 mg/ml，較佳為約 2.0 至約 6.0 mg/ml，更佳為約 3.5 至 5.5 mg/ml，又較佳為約 4.0 mg/ml。

44) 本發明之其他較佳具體實施例係描述於段落(45)至(65)：

45) 一種澄清溶液或凝膠之醫藥組合物，包括鋅以及 GLP-1 或艾珊汀-4 之類似物。

46) 根據段落(45)所述之醫藥組合物，其中該組合物經由皮下投予至受者後形成沉澱物。

47) 根據段落(46)所述之組合物，復包括水。

48) 如段落(46)及(47)中任一段所述之組合物，復包括非-水性介質。

49) 根據段落(47)至(48)中任一段所述之組合物，其中該分子係存在於 pH 為 2.5 至 10.5 間之水溶液中，該 pH 較佳為 3.5 至 8。

50) 根據段落(46)至(49)中任一段所述之組合物，其中該分子之濃度為約 0.001 至 500 mg/mL，較佳約 0.1 至 10 mg/mL。

51) 根據段落(46)至(50)中任一段所述之組合物，復包括防腐劑。

52) 根據段落(51)所述之組合物，其中該防腐劑係選自由

間甲酚、酚、苯甲醇以及對羥基苯甲酸甲酯所組成之群組。

53) 根據段落(52)所述之組合物，其中該防腐劑之濃度為 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL。

54) 根據段落(45)至(53)中任一段所述之組合物，復包括一種等滲壓劑。

55) 根據段落(54)所述之組合物，其中該等滲壓劑的濃度為 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL。

56) 根據段落(46)至(55)中任一段所述之組合物，其中鋅的濃度為 0.0005 mg/mL 至 50 mg/mL。

57) 根據段落(46)至(56)中任一段所述之組合物，復包括穩定劑。

58) 根據段落(57)所述之組合物，其中該穩定劑係選自由咪唑、精胺酸以及組胺酸所組成之群組。

59) 根據段落(46)至(58)中任一段所述之組合物，復包括界面活性劑。

60) 根據段落(46)至(59)中任一段所述之組合物，復包括螯合劑。

61) 根據段落(46)至(60)中任一段所述之組合物，復包括緩衝劑。

62) 根據段落(61)所述之組合物，其中該緩衝劑係選自由 Tris、醋酸銨、醋酸鈉、甘胺酸、天冬胺酸以及 Bis-Tris 所組成之群組。

63) 根據段落(46)至(62)中任一段所述之組合物，復包括

鹼性多肽。

64) 根據段落(63)所述之組合物，其中該鹼性多肽係選自由聚離胺酸、聚精胺酸、聚鳥胺酸、魚精蛋白、腐胺、精胺、亞精胺以及組蛋白所組成之群組。

65) 根據段落(46)至(64)中任一段所述之組合物，復包括醇類或單糖或二糖類。

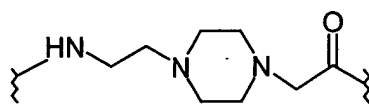
66) 根據段落(65)所述之組合物，其中該醇類或單糖或二糖類係選自由甲醇、乙醇、丙醇、甘油、海藻糖、甘露醇、葡萄糖、赤藻糖、核糖、半乳糖、果糖、麥芽糖、蔗糖以及乳糖所組成之群組。

67) 根據段落(46)至(66)中任一段所述之組合物，包括(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂；或其醫藥可接受之鹽。

除了 N 端胺基酸，本文中所有胺基酸之縮寫形式(例如 Ala)都代表-NH-CH(R)-CO-結構，其中 R 為胺基酸之支鏈(例如 Ala 之 CH₃)。至於 N 端胺基酸，縮寫形式代表(R²R³)-N-CH(R)-CO-結構，其中 R 為胺基酸之支鏈，R² 和 R³ 之定義如上述，除了當 A⁷ 為 Ura、Paa 或 Pta，此例中 R² 和 R³ 則不存在因為 Ura、Paa 和 Pta 係視為 des-胺基胺基酸。Amp、1Nal、2Nal、Nle、Cha、3-Pal、4-Pal 和 Aib 分別為下列α-胺基酸的縮寫：4-胺基-苯基丙胺酸、β-(1-萘基)丙胺酸、β-(2-萘基)丙胺酸、正白胺酸(norleucine)、環己基丙胺酸、β-(3-

吡啶基)丙胺酸、 β -(4-吡啶基)丙胺酸以及 α -胺基異丁酸。其他的胺基酸定義：Ura 為尿刊酸 (urocanic acid)；Pta 為(4-吡啶基硫)乙酸；Paa 為反-3-(3-吡啶基)丙烯酸；Tma-His 為 N,N-四甲基甲脒基-組胺酸；N-Me-Ala 為 N-甲基-丙胺酸；N-Me-Gly 為 N-甲基-甘胺酸；N-Me-Glu 為 N-甲基-麩胺酸；Tle 為第三-丁基甘胺酸；Abu 為 α -胺基丁酸；Tba 為第三-丁酸丙胺酸；Orn 為鳥胺酸；Aib 為 α -胺基異丁酸； β -Ala 為 β -丙胺酸；Gaba 為 γ -胺基丁酸；Ava 為 5-胺基戊酸；Ado 為 12-胺基十二醇酸；Aic 為 2-胺基二氫化茛-2-羧酸；Aun 為 11-胺基十一醇酸；而 Aec 為 4-(2-胺基乙基)-1-羧甲基-

六氫吡啶，由以下結構表示：



Acc 係指選自由 1-胺基-1-環丙烷羧酸(A3c)；1-胺基-1-環丁烷羧酸(A4c)；1-胺基-1-環戊烷羧酸(A5c)；1-胺基-1-環己烷羧酸 (A6c)；1-胺基-1-環庚烷羧酸 (A7c)；1-胺基-1-環辛烷羧酸(A8c)；以及 1-胺基-1-環壬烷羧酸 (A9c)所組成群之胺基酸。在上式中，羥烷基、羥基苯烷基以及羥基萘烷基可含有 1 至 4 個羥基取代基。COX⁵ 代表 -C=O·X⁵。-C=O·X⁵ 之實例包含，但非限於乙醯基以及苯丙醯基。

本文中之其他縮寫的全名如下：Boc 為第三-丁氧基羰基，HF 為氟化氫，Fm 為甲醯基，Xan 為黃嘌呤酸基，Bzl 為苯甲基，Tos 為苯甲磺醯基，DNP 為 2,4-二硝基苯

基，DMF 為二甲基甲醯胺，DCM 為二氯甲烷，HBTU 為 2-(1H- 苯并三唑-1-yl)-1,1,3,3-四甲基六氫磷酸尿鎗 (uronium)，DIEA 為二異丙基乙胺，HOAc 為乙酸，TFA 為三氟乙酸，2ClZ 為 2-氯苯甲氧基羰基，2BrZ 為 2-溴苯甲氧基羰基，OcHex 為 O-環己基，Fmoc 為 9-芴基甲氧基羰基，HOBt 為 N-羥基苯并三唑，PAM 樹脂為 4-羥基甲基苯基乙醯胺基甲基樹脂，Tris 為三(羥甲基)胺基甲烷，以及 Bis-Tris 為雙(2-羥乙基)胺基-三(羥甲基)胺基甲烷(亦即，2-雙(2-羥乙基)胺基-2-(羥甲基)-1,3-丙二醇)。

「鹵基」或「鹵素」包括氟基、氯基、溴基、以及碘基。

「(C₁-C₁₂)烴部分」、「(C₁-C₃₀)烴部分」等包括具有所示碳原子數目之支鏈或直鏈烷基、烯基及炔基，惟烯基和炔基之例中具有至少 2 個碳原子。

本發明之胜肽亦可用另一種格式表示，例如 (A5c⁸)hGLP-1(7-36)NH₂，第一個括弧中的原序列經胺基酸取代(例如，在 hGLP-1 中，A5c⁸ 取代 Ala⁸)。縮寫 GLP-1 代表類升糖素肽-1；hGLP-1 代表人類類升糖素肽-1。括弧中的數字代表胜肽中存在之胺基酸數目(例如，hGLP-1(7-36)為人類 GLP-1 胜肽序列中的第 7 到 36 個胺基酸)。hGLP-1(7-37)之序列列於 Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Res., 40, 1992, pp. 333-342。hGLP-1(7-36)NH₂ 中「NH₂」代表胜肽之 C 端已醯胺

化。hGLP-1(7-36)表示 C 端為游離酸。在 hGLP-1(7-38)中，除非另行說明，位置 37 及 38 之殘基分別為 Gly 及 Arg。

【實施方式】

胜肽之合成

本發明所用的胜肽可由標準的固相胜肽合成方法予以製備。參見，例如，Stewart, J.M., et al., Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co., 2d ed. 1984)。上述一般式中之取代基 R^2 及 R^3 可藉由此技藝中已知之標準方法附接至 N 端胺基酸之游離胺。例如，烷基，如 (C_1-C_{30}) 烷基可使用還原性烷化法(reductive alkylation)加以附接。羥烷基，如 (C_1-C_{30}) 羥烷基亦可使用還原性烷化法加以附接，其中該游離之羥基係由第三-丁基酯保護。醯基，如 COE^1 ，可藉由與游離酸偶合而加以附接，例如， E^1COOH 可藉由將具有 3 莫耳當量之游離酸與二異丙基碳二醯亞胺兩者之完整的樹脂於二氯甲烷中混合 1 小時而附接至 N 端胺基酸之游離胺。若該游離酸含有游離之羥基，例如對-羥基苯丙酸，則於進行偶合時還要另外加入 3 莫耳當量之 HOBT。

當 R^1 為 $NH-X^2-CH_2-CONH_2$ 時 (亦即， $Z^0=CONH_2$)，胜肽之合成起始於與 MBHA 樹脂偶合之 $BocHN-X^2-CH_2-COOH$ 。如果 R^1 為 $NH-X^2-CH_2-COOH$ ，(亦即， $Z^0=COOH$)胜肽之合成起始於與 PAM 樹

脂偶合之 $\text{Boc-HN-X}^2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ 。對此特殊步驟來說，使用了 4 莫耳當量之 $\text{Boc-HN-X}^2\text{-COOH}$ 、HBTU 與 HOBt 以及 10 莫耳當量之 DIEA。偶合時間為約 8 小時。

經保護之胺基酸 1-(N-第三-丁氧羰基-胺基)-1-環己烷-羧酸 (Boc-A6c-OH) 係以下述步驟合成。將 19.1 g (0.133 莫耳) 之 1-胺基-1-環己烷羧酸 (Acros Organics, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 溶解於 200 ml 之二噁烷與 100 ml 之水中。於其中加入 67 ml 之 2N NaOH。在冰水浴中將溶液冷卻。於此溶液中加入 32.0 g (0.147 莫耳) 之二碳酸二-第三-丁基酯。將反應混合物在室溫下攪拌一整夜。然後於減壓下移除二噁烷。於殘餘之水溶液中加入 200 ml 之乙酸乙酯。在冰水浴中將混合物冷卻。藉由加入 4N HCl 將水層之 pH 值調至 3 左右。將有機層分離。水層以乙酸乙酯萃取 (1 x 100 ml)。將兩有機層合併並用水洗滌 (2 x 150 ml)，以無水 MgSO_4 脫水，過濾並於減壓下濃縮至乾。殘質於乙酸乙酯/己烷中進行再結晶。得到 9.2 g 之純的產物。產率為 29%。

Boc-A5c-OH 係以與 Boc-A6c-OH 類似之方法予以合成。其他經保護之 Acc 胺基酸可由熟於此技藝之人士按本文所教示之類似方法予以合成。

於合成含 A5c、A6c 及/或 Aib 之胜肽時，將這些殘基與其隨後一個殘基偶合之時間為 2 小時。為了合成 $(\text{Tma-His}^7)\text{hGLP-1(7-36)NH}_2$ ，在最後一次偶合反應時

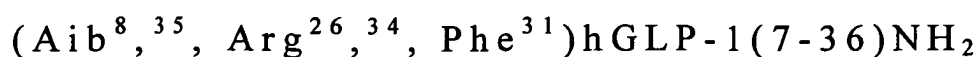
使用混合於 4ml DMF 中之 HBTU (2 mmol) 與 DIEA (1.0 ml) 來與胜肽-樹脂之 N-端游離胺反應；偶合時間大約為 2 小時。

上述一般式中之取代基 R^2 和 R^3 可藉由此技藝中之標準方法附接至 N 端胺基酸之游離胺。例如，烷基，如 (C_1 - C_{30}) 烷基，可使用還原性烷化法加以附接。羥烷基，如 (C_1 - C_{30}) 羥烷基亦可使用還原性烷化法加以附接，其中該游離之羥基係以第三-丁基酯保護。醯基，如 COX^1 ，可藉由將游離酸如 X^1COOH ，與 N 端胺基酸之游離胺偶合予以附接，其係藉由將具有 3 莫耳當量之游離酸與二異丙基碳二醯亞胺兩者之完整的樹脂於二氯甲烷中混合 1 小時。如果游離酸含有游離之羥基，例如對-羥基苯丙酸，則於進行偶合時還要另外加入 3 莫耳當量之 HOBt。

下列實施例中說明可使用及有利於實行本發明而採用之胜肽的合成方法，此等合成方法為熟於此技藝者所知悉。熟於此技藝者亦知道其他方法。這些實施例僅用以說明之目的而非以任何方式限制本發明之範疇。

Boc- β Ala-OH、Boc-D-Arg(Tos)-OH 及 Boc-D-Asp(OcHex) 係購自 Nova Biochem, San Diego, California。Boc-Aun-OH 係購自 Bachem, King of Prussia, PA。Boc-Ava-OH 及 Boc-Ado-OH 係購自 Chem-Impex International, Wood Dale, IL。Boc-2Nal-OH 係購自 Synthetech, Inc. Albany, OR 購得。

實施例 1



該標題胜肽係以 Applied Biosystems (Foster City, CA) 430A 型胜肽合成器予以合成，此儀器已經修改俾用於加速 Boc-化學固相胜肽之合成。參見 Schnolzer, et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 90:180 (1992)。使用 0.91 mmol/g 之 4-甲基二苯甲胺 (MBHA) 樹脂 (Peninsula, Belmont, CA) 進行置換。Boc 胺基酸 (Bachem, CA, Torrance, CA; Nova Biochem., LaJolla, CA) 係與下列側鏈保護基一同使用：Boc-Ala-OH、Boc-Arg(Tos)-OH、Boc-Asp(OcHex)-OH、Boc-Tyr(2BrZ)-OH、Boc-His(DNP)-OH、Boc-Val-OH、Boc-Leu-OH、Boc-Gly-OH、Boc-Gln-OH、Boc-Ile-OH、Boc-Lys(2ClZ)-OH、Boc-Thr(Bzl)-OH、Boc-Ser(Bzl)-OH、Boc-Phe-OH、Boc-Aib-OH、Boc-Glu(OcHex)-OH 以及 Boc-Trp(Fm)-OH。該合成係以 0.20 mmol 之規模進行。Boc 基團係以 100% TFA 處理 2 x 1 分鐘而予以移除。Boc 胺基酸 (2.5 mmol) 以 HBTU (2.0 mmol) 及 DIEA (1.0 mL) 於 4 mL 之 DMF 中預先活化，且偶合前不需對胜肽-樹脂 TFA 鹽進行中和。除了 Boc-Aib-OH 殘基與下列殘基，Boc-Lys(2ClZ)-OH 及 Boc-His(DNP)-OH，外偶合時間為 5 分鐘，其中該偶合時間為 2 小時。

在胜肽鏈裝配結束時，將樹脂以 20% 巰基乙醇/10% DIEA 於 DMF 溶液中處理 2 x 30 分鐘以移除 His 側鏈上

之 DNP 基團。藉由以 100% TFA 處理 2 x 2 分鐘以移除 N 端之 Boc 基團。於以溶於 DMF 之 10% 之 DIEA 中和該胜肽-樹脂後(1 x 1 分鐘)，Trp 側鏈上的甲醯基係以 15% 乙醇胺/15% 水/70% DMF 之溶液處理 2 x 30 分鐘予以移除。以 DMF 及 DCM 洗滌胜肽-樹脂，並於減壓下乾燥。於 0°C 下在含有 1ml 苯甲醚及二硫蘇糖醇(24 mg)之 10ml HF 中攪拌該胜肽-樹脂 75 分鐘後完成最後的裂解。以氮氣流移除 HF。殘質以乙醚(6 x 10 mL)洗滌以及以 4N HOAc (6 x 10 mL)萃取。

水性萃取物中之胜肽混合物係以逆相製備性之高壓液相層析術(HPLC)，使用逆相 VYDAC® C₁₈ 管柱(Nest Group, Southborough, MA)進行純化。將管柱以 10ml/min 之流速進行線性梯度之洗提(20%至 50%之溶液 B 洗提 105 分鐘以上)(溶液 A=含 0.1% TFA 之水；溶液 B=含 0.1% TFA 之乙腈)。收集分液且以分析性 HPLC 進行檢驗。將含有純產物者合併，以及將其凍乾。得到約 18 mg 之白色固體。根據分析性 HPLC 的分析，純度為 99%。由電噴灑質譜儀(MS(ES))之分析算出分子量為 3356.6 (與之前計算的分子量 3356.77 一致)。

實施例 2 至 81，以及用於實行本發明之其他肽基化合物之合成大體上與上述實施例 1 之(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ 之合成過程相似，只是根據所欲之胜肽使用適當之經保護之胺基酸。

實施例 2 至 82

- | Ex.No. | 化合物 |
|--------|--|
| 2. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{26})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 3. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{26}, \text{Phe}^{31}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 4. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{26}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 5. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 6. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{26,34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 7. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 8. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{34}, \text{Phe}^{31}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 9. | $(\text{Aib}^8, \text{Arg}^{34}, \beta\text{-Ala}^{35})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 10. | $(\text{Aib}^{8,35}, 1\text{Nal}^{12}, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 11. | $(\text{Aib}^{8,35}, 1\text{Nal}^{12}, \text{Arg}^{26,34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 12. | $(\text{Aib}^{8,35}, 1\text{Nal}^{12,31}, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 13. | $(\text{Aib}^{8,35}, 1\text{Nal}^{19}, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 14. | $(\text{Aib}^{8,35}, 1\text{Nal}^{19}, \text{Arg}^{26,34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 15. | $(\text{Aib}^{8,35}, 1\text{Nal}^{19,31}, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 16. | $(\text{Aib}^{8,35}, 2\text{Nal}^{12}, \text{Arg}^{26,34})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |
| 17. | $(\text{Aib}^{8,35}, 2\text{Nal}^{12}, \text{Arg}^{26,34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$; |

18. (Aib^{8,35}, 2Nal^{12,31}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
19. (Aib^{8,35}, 2Nal¹⁹, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
20. (Aib^{8,35}, 2Nal¹⁹, Arg^{26,34}, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
21. (Aib^{8,35}, 2Nal^{19,31}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
22. (Aib^{8,35}, Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
23. (Aib^{8,35}, Arg²⁶, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
24. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
25. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal²⁸)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
26. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal²⁸, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
27. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal^{28,31})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
28. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 1Nal³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
29. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal²⁸)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
30. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal²⁸, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
31. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal^{28,31})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
32. (Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
33. (Aib^{8,35}, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
34. (Aib^{8,35}, Phe³¹, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

35. (Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
36. (Arg²⁶, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
37. (Arg²⁶, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
38. (Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
39. (Arg^{26,34}, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
40. (Arg^{26,34}, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
41. (Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
42. (Arg³⁴, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
43. (Arg³⁴, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
44. (D-Ala⁸, Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
45. (D-Ala⁸, Arg²⁶, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
46. (D-Ala⁸, Arg²⁶, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
47. (D-Ala⁸, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
48. (D-Ala⁸, Arg^{26,34}, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
49. (D-Ala⁸, Arg^{26,34}, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
50. (D-Ala⁸, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
51. (D-Ala⁸, Arg³⁴, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
52. (D-Ala⁸, Arg³⁴, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
53. (Gly⁸, Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
54. (Gly⁸, Arg²⁶, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
55. (Gly⁸, Arg²⁶, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
56. (Gly⁸, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
57. (Gly⁸, Arg^{26,34}, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
58. (Gly⁸, Arg^{26,34}, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

59. (Gly⁸, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
60. (Gly⁸, Arg³⁴, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
61. (Gly⁸, Arg³⁴, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
62. (N-Me-D-Ala⁸, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
63. (N-Me-D-Ala⁸, Arg^{26,34}, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
64. (N-Me-D-Ala⁸, Arg^{26,34}, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
65. (Ser⁸, Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
66. (Ser⁸, Arg²⁶, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
67. (Ser⁸, Arg²⁶, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
68. (Ser⁸, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
69. (Ser⁸, Arg^{26,34}, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
70. (Ser⁸, Arg^{26,34}, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
71. (Ser⁸, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
72. (Ser⁸, Arg³⁴, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
73. (Ser⁸, Arg³⁴, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
74. (Val⁸, Arg²⁶)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
75. (Val⁸, Arg²⁶, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
76. (Val⁸, Arg²⁶, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
77. (Val⁸, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ ;
78. (Val⁸, Arg^{26,34}, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
79. (Val⁸, Arg^{26,34}, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;
80. (Val⁸, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

81. (Val⁸, Arg³⁴, Aib³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ ;

82. (Val⁸, Arg³⁴, β-Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ .

本文所舉例之化合物的代表性樣本之物理數據列係於
下表 1 中。

表 1	Ex.No.	Mol.Wt. 計算值	Mol.Wt. MS(ES)	純度 (HPLC)
	1	3356.77	3356.6	99%
	6	3381.74	3381.3	97%
	22	3367.75	3367.77	99%
	23	3328.72	3328.5	99%
	24	3395.74	3395.5	99%
	32	3406.84	3406.4	99%
	33	3367.75	3367.77	99%
	34	3328.72	3328.5	99%

實驗程序

A. GLP-1 受體親和性之測定

用於實行本發明之化合物與 GLP-1 受體間之結合能力可使用下列程序進行試驗。

細胞培養：

將表現 GLP-1 受體之 RIN 5F 大鼠胰島素瘤細胞 (ATCC-# CRL-2058, 美國菌種中心) 培養於含有 10% 胎牛血清之杜貝可氏修正之伊格氏培養基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 培養基中，且維持

於 37°C，5% CO₂/95% 空氣之潮濕之氛圍下。

放射性配體之結合：

於 20 ml 之 50 mM 冰冷的 Tris-HCl 中以 Brinkman Polytron (Westbury, NY) 將 RIN 細胞均質化(設定 6，時間 15 秒)，以製備用於放射性配體結合研究之膜。均質物以離心(39,000 g/10 分鐘)洗滌兩次，以及將最終之沉澱物再懸浮於 50 mM 之 Tris-HCl (含 2.5 mM MgCl₂、0.1 mg/ml 桿菌肽(bacitracin，購自 Sigma Chemical, St. Louis, MO)以及 0.1% BSA)。為了分析的方便，將各等份(0.4 ml)與 0.05 nM 之 (¹²⁵I)GLP-1(7-36) (約 2200 Ci/mmol，購自 New England Nuclear, Boston, MA) 培養，含有及不含 0.05 ml 未標記之競爭試驗勝肽。25°C 下培養 100 分鐘後，藉由預先浸泡過 0.5% 聚乙烯亞胺之 GF/C 過濾膜 (Brandel, Gaithersburg, MD) 進行快速過濾，將經結合之 (¹²⁵I)GLP-1(7-36) 自由離之 (¹²⁵I)GLP-1(7-36) 中分離出來。然後將過濾膜以 5 ml 等份之 50 mM 冰冷的 Tris-HCl 洗滌三次，結合在過濾膜上之具有放射性者可用 γ 光譜 (Wallac LKB, Gaithersburg, MD) 進行計數。專一性結合之定義為所有 (¹²⁵I)GLP-1 結合數目減去於 1000 nM GLP1(7-36) 存在時之結合數目 (Bachem, Torrence, CA)。

B. 溶解度與 pH 之測定

有利地，本發明中使用的化合物係相對難溶於近乎中

性或生理上之 pH 的水溶液，而相對可溶於酸性或鹼性 pH 值之水溶液。本發明較適用之化合物在 pH 約 6 至約 8 以及溫度約 4°C 至 40 °C 之間時溶解度應低於 1mg/mL，較佳低於 0.5mg/mL。

B.1. 化合物溶解度與緩衝鹽溶液中 pH 之測定

有利於實行本發明之化合物可以而且在不同 pH 值及不同溫度下利用以下步驟測定其於 PBS 中之溶解度。

PBS 緩衝溶液之母液可藉由將一包預-混合粉末 (SIGMA，產品編號：P-3813) 溶解在 1 公升之去離子水中予以製備，而得 10 mM 磷酸鹽-緩衝溶液，具有 138 mM NaCl、2.7 mM KCl、以及 pH 7.4。以磷酸及/或氫氧化鈉調節此母溶液之 pH，即可得到具有不同 pH 值之 PBS 溶液。

秤 2mg 實施例 1 之樣品加入各個玻璃瓶中。於各瓶中加入特定 pH 之 50 μ l 等份之 PBS。震盪試劑瓶，若需要，可使用超音波處理，直到溶液澄清。紀錄各個 pH 測定中溶解 2 mg 化合物所需要之緩衝液的總體積，且計算溶解度。

將在室溫(20 至 25 °C)下澄清之肽溶液置於冰箱中 (4 °C) 一整夜，然後於 4 °C 下測定肽的溶解度。

B.2. 化合物溶解度與鹽溶液之 pH 關係之測定

有利於實行本發明之化合物可以而且在不同 pH 值及溫度下利用以下程序測定其於鹽水中之溶解度。

將 9 克之 NaCl 溶解在 1 公升之去離子水中，得到鹽

水溶液之母液。以 HCl 及 / 或 NaOH 調節此母溶液之 pH，得到具有不同 pH 值之鹽水溶液。

秤 2mg 實施例 1 之樣品加入各個玻璃瓶中。於各瓶中加入特定 pH 之 50 μ l 等份之鹽水溶液。震盪試劑瓶以及，若需要，可使用超音波處理，直到溶液澄清。紀錄各個 pH 測定中溶解 2 mg 化合物所需要之鹽水的總體積，且計算溶解度。

將在室溫(20 至 25 $^{\circ}$ C)下澄清之溶液置於冰箱中(4 $^{\circ}$ C)一整夜然後於 4 $^{\circ}$ C 下測定其溶解度。

B.3. 於 pH 7.0 之鹽溶液中測定的化合物之溶解度

有利於實行本發明之化合物可以而且在室溫下於 pH=7 之鹽水中利用以下程序測定其溶解度。

將 9 克之 NaCl 溶解於 1 公升之去離子水中，得到鹽水溶液。(Aib⁸, Arg^{26,34}, β -Ala³⁵)hGLP-1(7-36)NH₂ (實施例 6)、(Aib^{8,35}, Arg^{26,34})hGLP-1(7-36)NH₂ (實施例 24)、以及(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, 2Nal³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ (實施例 32)各秤 2 mg 分別加入至各個玻璃瓶中且加入 1 mL 等份之鹽水，震盪以及以超音波處理，直到澄清。紀錄溶解 2 mg 之胜肽所需之鹽水的總體積，計算於室溫下之溶解度。

B.4. 在各種 pH 之鹽水中化合物溶解度之測定

有利於實行本發明之化合物可以而且在室溫下於具有各種 pH 之鹽水溶液中利用以下程序測定其溶解度。。

將 9 克之 NaCl 溶解在 1 公升之去離子水中，得到鹽

水溶液之母液。將此鹽水之母溶液的各等份以 HCl 及 NaOH 處理，而得到具有各種 pH 值之鹽水溶液。

各秤 2 mg 之(Aib^{8,35}, Arg²⁶, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂ (實施例 23)以及(Aib^{8,35}, Phe³¹, Arg³⁴)hGLP-1(7-36)NH₂ (實施例 34)分別加到各玻璃瓶中。加入 50 μl 等份之特定 pH 的鹽水緩衝液。震盪試劑瓶以及以超音波處理，直到澄清。紀錄用於溶解 2 mg 之胜肽所需之緩衝液的總體積，且計算該溶解度。

C. 化合物之水性溶解度與溶液中鋅濃度之關係的測定

有利於實行本發明之化合物可以而且於含有不同鋅濃度之 pH 7 的水中利用以下程序測定其溶解度。

將 ZnCl₂ 溶解於去離子水中，得到濃度為 100 mg/ml 的鋅母溶液，以及使用 HCl 將 pH 調節至 2.7。具有各種 ZnCl₂ 濃度之溶液(Zn 測試溶液)係將母溶液進行適當之稀釋而得。

將 1 mg 實施例 1 之化合物溶解於各 250 μl 之 Zn 測試溶液中，得到含有 4 mg/ml 之實施例 1 化合物的溶液。然後使用 0.2 N NaOH 調節此溶液之 pH，直到觀察到白色沉澱之形成。將該沉澱溶液離心且母液以 HPLC 進行分析。測定該測試化合物之 UV 吸收區的峰值，以及經由比對校正曲線，決定母液中該測試化合物之濃度。

作為用於實行本發明之化合物的代表性實例，實施例 1 之化合物係以前述之分析法進行測定，而得到以下結果(鹽水溶液，pH 7.0，室溫)：

表 2	ZnCl ₂ 濃度 (mg/mL)	溶解度 (μM/mL)
	0	0.0539
	80	0.0059
	500	0.0056
	1000	0.0097
	1500	0.0097
	2500	0.0110

D. pH = 4.0 之胜肽/鋅溶液之製備

0.5 mg/ml 之 ZnCl₂ 溶液係藉由將 100 mg/ml ZnCl₂ 以 pH 2.7 之鹽酸溶液稀釋而製得。將 1 mg 實施例 1 之化合物溶解於 250 μl 之此溶液中，得到 pH 為 4 之具有 4 mg/ml 之化合物及 0.5 mg/ml 之澄清溶液。

E. pH = 7.0 之胜肽/鋅懸浮液/凝膠之製備

於體內藥效(pharmacodynamic, PD)研究中所使用之 pH 7.0 的測試化合物之顆粒懸浮液或凝膠可依下列程序製造。

將約 250 μL 之上述製備程序 D 所製造之澄清溶液 (pH 4, 0.5 mg/ml 之 Zn, 4 mg/ml 之實施例 1 化合物) 以約 25 μL 之 0.2 N NaOH 中和至 pH 7.0。

F. 使用 IEF 凝膠測定 pI

使用 Invitrogen 的 Novex IEF pH3 至 10 凝膠測定 GLP-1 胜肽的 pI。

將欲進行測試之肽基化合物溶於水中，使其濃度為 0.5 mg/ml。對各個此等化合物，將 5 μl 之所得的溶液與 5 μl 之 Novex® 樣品緩衝液 2X (由 20 mM 精胺酸游離

鹼、20 mM 離胺酸游離鹼以及 15% 甘油所組成) 混合，以及將所得之 10 μ l 樣品溶液與蛋白質標準樣品載入到該凝膠中。

電泳之緩衝液亦購自 Invitrogen，且按操作說明進行電泳，大致如下：100 V 恆壓 1 小時，接著 200 V 恆壓 1 小時，然後 500 V 恆壓 30 分鐘。

然後將凝膠置於含有 3.5% 磺基水楊酸之 12% TCA 中固定 30 分鐘，按照 Novex[®] Colloidal Blue Kit 中說明，以 Colloidal Coomassie Blue 染色 2 小時，然後在水中脫色一整夜。

將凝膠以程式片斷分析法 1.2 (Fragment Analysis) 進行掃描及分析。未知胜肽之 pI 係相應於具有 pI 值為 10.7、9.5、8.3、8.0、7.8、7.4、6.9、6.0、5.3、5.2、4.5、4.2 及 3.5 之標準化合物之 pI 進行計算。

用於實行本發明之較佳化合物的 pI 值約為 6.0 至約 8.5，更佳為約 6.5 至約 8.0，又更佳為約 7.0 至約 7.8。驚人地，發現該等特別適合使用之本發明之組合物係具有接近生理 pH 之 pI 者。

G. 體內分析

可使用下列分析法測試本發明之組合物於體內促進及提高效果之能力。

G.1. 實驗程序：

實驗前一天，於氫氯酸麻醉下對重 300 至 350 g 之成熟的 Sprague-Dawley 雄鼠 (Taconic, Germantown,

NY)插入右心房頸靜脈導管。大鼠在注射適當之測試組合物或載劑對照組前禁食 18 小時，注射時間記為 0。使大鼠於整個實驗期間內禁食。

於時間 0，對老鼠皮下注射(sc) (a)呈澄清溶液之 pH 4.0 之實施例 1 化合物(Aib^{8,35}, Arg^{26,34}, Phe³¹)hGLP-1(7-36)NH₂)(即製備程序 D 之溶液，或(b)呈懸浮液或凝膠之 pH 7.0 之實施例 1 化合物(即製備程序 E 之懸浮液或凝膠)。在兩種情況下，注射量都很小(4 至 6 μL)，且注射至受者體內之 GLP-1 化合物的劑量為 75 μg/kg。在 sc 注射後的適當時間下經由靜脈(iv)導管抽出 500 μl 的血液樣品，並經由 iv 注入葡萄糖，以檢測胰島素之分泌是否提高。葡萄糖注入的時間安排在注射化合物後的 0.25、1、6、12 及 24 小時。抽完最初的血液樣品後，靜脈注射葡萄糖(1g /kg)同時注入 500 μl 之稀釋肝素液(10U/mL)。之後，在注射葡萄糖後的 2.5、5、10 及 20 分鐘時，抽取 500 μl 之血液樣品。這些步驟後均立即經由導管靜脈注射 500 μl 之稀釋肝素液(10U/mL)。將血液樣品離心，收集各樣品之血漿且將樣品儲存於-20°C 直到進行胰島素含量分析。各樣品中胰島素的含量可使用大鼠胰島素酵素-連結之免疫吸附試驗(ELISA)套組(American Laboratory Products Co., Windham, NH)進行測定。

結果：

令人驚訝地，於實施例 1 化合物之澄清溶液及懸浮液

或凝膠中，可觀察到在整個 24 小時的實驗中因注射葡萄糖而誘發持續的胰島素-增強活性。

G.2. 實驗程序：

如 G.1. 所進行之分析，但於時間 0 時，對大鼠以皮下注射方式(sc)投予上述製備程序 D 所製備之 (Aib^{8,35})hGLP1(7-36)NH₂ 溶液或載劑對照組。如同 G.1.，該注射量係非常少(4 至 6 μL)且投予至受者之 GLP-1 化合物的劑量為 75 μg /kg。

結果：

於整個 24 小時的實驗中，可觀察到因注射葡萄糖而誘發持續的胰島素-增強活性。

G.3. 實驗程序：

一般程序係與 G.1. 所提供者相同。此例中，於時間 0 時，以皮下注射方式(sc)投予製備程序 D 所製備之實施例 1 化合物，或載劑對照組。葡萄糖注入的時間點為藥物注射後之 1、6、12、24、48、及 72 小時。如實驗 G.1. 所述，進行經由 iv 導管之葡萄糖注射和血液採樣。由於禁食時間的延長，載劑及葡萄糖-單一控制係包含於各時間點。

結果：

在皮下注射該測試組合物至少 48 小時後，可觀察到由葡萄糖誘發之持續的胰島素-增強活性。此外，如同步驟 G.1.，未觀察到由葡萄糖引起之高水平的胰島素增強初始分泌。

H. 體內分析

本發明之組合物可以且利用下述 H.1 至 H.4 之分析法測定其於體內促進活性化合物之緩釋的能力。用於實行本發明之代表性化合物的實例為實施例 1 之化合物， $(\text{Aib}^8, ^{35}, \text{Arg}^{26, 34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$ ，將其調配成下表 3 所述之各種實驗配方，且進行 H.1. 至 H.4. 之分析。

下述分析法所使用之組合物係根據以下一般程序予以製造：

將氯化鋅(Merck, Mollet del Vallès, Barcelona, Spain)溶解於注射用無菌水(Braun, Rubí, Spain)中俾製造 100 mg/ml 之 ZnCl_2 母溶液，使用 HCl 調整其 pH 為 2.7。藉由將該母溶液稀釋，而得到含有各種鋅濃度之溶液，例如 0.1 mg/ml、0.5 mg/ml、2 mg/ml 等。以類似方式稀釋該 1 mg/ml 之 ZnCl_2 母溶液俾製備較低濃度之鋅溶液，例如 10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 。

秤取適量之欲分析的化合物，例如實施例 1 之胜肽，且溶解於各個適量體積之所得的鋅溶液以產生具有所欲化合物濃度(例如 4 mg/ml)之澄清溶液。然後，若需要，將所得之溶液進行微-過濾，以及於投予前儲存於防光照之小玻璃瓶中。

可藉由此技藝中許多已知之方法測定受試者之血漿內該測試化合物之濃度。於一方便之方法中，化合物(例如，實施例 1 之胜肽)之濃度係經由放射性免疫分析予以測定，該方法係採用該測試化合物之兔衍生之抗體與已知量之經

放射性碘標記(例如, ^{125}I)之測試化合物競爭。

H.1. 藥動研究 1

鋅對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響可由以下之說明予以測定。

依照上述程序, 調配四種水性組合物, 其中於 pH = 2.7 時, 實施例 1 化合物之濃度為 4 mg/mL, ZnCl_2 之濃度分別為 0.0、0.1、0.5、及 2.0 mg/ml。參見表 3、實施例 H1a、H1b、H1c 及 H1d。分別將該四種組合物經皮下注射至 16 隻 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, Mass., USA)。大鼠之平均年齡約為 8 至 9 週, 以及平均體重約為 260 至 430 g。提供食物及水讓大鼠任意攝取。經注射後其血漿中實施例 1 化合物之濃度係描述於第 1 圖。

H.2. 藥動研究 2

注射體積對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響可由以下之說明予以測定。

依照上述程序, 調配三種水性組合物, 其中於 pH = 2.7 時, 實施例 1 化合物之濃度分別為 3000、300、及 75 $\mu\text{g/mL}$, 且 Zn 之濃度為 0.5 mg/ml。參見表 3、實施例 H2a、H2b、及 H2c。分別將該三種組合物經皮下注射至 16 隻 Sprague-Dawley 大鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, Mass., USA)。大鼠之平均年齡約為 8 至 10 週, 以及平均體重約為 330 至 460

g。研究開始前使大鼠禁食一整夜。選擇注射之體積俾對各大鼠提供劑量為 $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ 之實施例 1 化合物(分別為 $0.025 \text{ ml}/\text{kg}$ 、 $0.25 \text{ ml}/\text{kg}$ 、以及 $1 \text{ ml}/\text{kg}$)。經注射後其血漿中實施例 1 化合物之濃度係描述於第 2 圖。

H.3. 藥動研究 3

鋅對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響可由以下之說明予以測定。

依照上述程序，調配三種水性組合物，其中於 $\text{pH} = 2.7$ 時，實施例 1 化合物之濃度為 $4 \text{ mg}/\text{mL}$ ，以及鋅之濃度分別為 10 、 20 、及 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。參見表 3、實施例 H3a、H3b、及 H3c。分別將該三種組合物經皮下注射至 16 隻雄性白化之 Sprague-Dawley 大鼠(St. Feliu de Codines, Barcelona, ES)。研究開始前使這些大鼠禁食一整夜。經注射(劑量= $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ 之實施例 1 化合物)後其血漿中實施例 1 化合物之濃度係描述於第 3 圖。

H.4. 藥動研究 4

鋅與生物活性化合物之濃度對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響可由以下之說明予以測定。

依照上述程序，調配兩種水性組合物。第一種溶液包括 $1.45 \text{ mg}/\text{ml}$ 之實施例 1 化合物以及 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 之鋅，第二種包括 $1.45 \text{ mg}/\text{ml}$ 之實施例 1 化合物但不含鋅。兩溶液之 $\text{pH} = 2.7$ 。參見表 3、實施例 H4a、及 H4b。將各溶液經皮下注射至雄性米格魯犬(Isoquimen,

Barcelona, Spain), 年齡約為 54 至 65 月齡且體重約為 16 至 21 kg。研究開始前使該米格魯犬禁食一整夜。此外, 只含有活性化合物之第二種溶液係經由靜脈投予。所有注射劑量為 $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。經注射後其血漿中實施例 1 化合物之濃度係描述於第 4 圖。

表 3: 經測試之組合物之摘述

實施例	組成份	含量	單位
H1a	活性化合物: 實施例 1	4	mg
	溶液之 pH = 2.7	1	mL
H1b	活性化合物: 實施例 1	4	mg
	溶液: 0.1 mg/mL 之 ZnCl_2 於 WFI (pH=2.7)	1	mL
H1c	活性化合物: 實施例 1	4	mg
	溶液: 0.5 mg/mL 之 ZnCl_2 於 WFI (pH=2.7)	1	mL
H1d	活性化合物: 實施例 1	4	mg
	溶液: 2 mg/mL 之 ZnCl_2 於 WFI (pH=2.7)	1	mL
H2a	活性化合物: 實施例 1	3	mg
	溶液: 0.5 mg/mL 之 ZnCl_2 於 WFI	1	mL
H2b	活性化合物: 實施例 1	300	μg
	溶液: 0.5 mg/mL 之 ZnCl_2 於 WFI	1	mL
H2c	活性化合物: 實施例 1	75	μg
	溶液: 0.5 mg/mL 之 ZnCl_2 於 WFI	1	mL
	溶液: NaOH 7M	8	μL
H3a	活性化合物: 實施例 1	4	mg

	溶液： 10 $\mu\text{g/ml}$ 之 ZnCl_2 於 WFI	1	ml
H3b	活性化合物：實施例1 溶液： 20 $\mu\text{g/ml}$ 之 ZnCl_2 於 WFI	4 1	mg ml
H3c	活性化合物：實施例1 溶液： 30 $\mu\text{g/ml}$ 之 ZnCl_2 於 WFI	4 1	mg ml
H4a	活性化合物：實施例1 WFI	1.45 1	mg Ml
H4b	活性化合物：實施例1 溶液： 30 $\mu\text{g/ml}$ 之 ZnCl_2 於 WFI	1.45 1	mg/Ml ml

WFI = 注射用無菌水(BRAUN, Rubi, Spain)

本發明中所使用之胜肽可呈醫藥可接受之鹽類的形式提供。此等鹽類之實例包含，但非限於：與有機酸(例如，乙酸、乳酸、順丁烯二酸、檸檬酸、蘋果酸、抗壞血酸、琥珀酸、苯甲酸、甲烷磺酸、甲苯磺酸、或雙羥萘酸(pamoic acid))，無機酸(例如，鹽酸、硫酸、或磷酸)，以及多元酸(例如，單寧酸、羧甲基纖維素、聚乳酸、聚羥基乙酸、或聚乳酸-羥基乙酸之共聚物)所形成之鹽類。本發明胜肽之鹽類的典型的製造方法為熟於此技藝者所知悉，其可藉由鹽之置換反應標準方法而得到。此外，本發明胜肽之 TFA 鹽(該 TFA 鹽係經由使用製備性 HPLC 純化該胜肽而得，其係以含 TFA 之緩衝液進行洗提)可轉變

為另一種鹽，例如藉由將該胜肽溶解於少量之 0.25 N 之醋酸水溶液而可得醋酸鹽。將所得之溶液施用於半-製備性 HPLC 管柱(semi-prep HPLC column, Zorbax, 300 SB, C-8)。將管柱以(1) 0.1N 醋酸銨水溶液洗提 0.5 小時，(2) 0.25N 醋酸水溶液洗提 0.5 小時，以及(3) 20% 到 100%之溶液 B 以 4 ml/min 的流速線性梯度洗提 30 分鐘以上(溶液 A 係 0.25N 之乙酸水溶液；溶液 B 係 0.25N 之乙酸，其係溶於乙腈/水，80：20)。收集含有該胜肽之分液且冷凍至乾。

如熟於此技藝者所知，GLP-1 已知之用途和潛在用途是多種多樣的(參見 Todd, J.F., et al., *Clinical Science*, 1998, 95, pp.325-329；及 Todd, J.F. et al., *European Journal of Clinical Investigation*, 1997, 27, pp.533-536)。因此，為了引起激動效應，投予本發明化合物可產生與使用 GLP-1 本身一樣的效果。GLP-1 之各種用途總結如下：治療 I 型糖尿病、II 型糖尿病、肥胖、胰高血糖素瘤、呼吸道分泌失調、代謝失調、關節炎、骨質疏鬆症、中樞神經系統疾病、心瓣手術後的再狹窄、神經退化性疾病、腎衰竭、充血性心衰竭、腎病徵候群、硬化、肺水腫、高血壓、以及其他需要減少食物攝入之病症。本發明之 GLP-1 類似物可在受者體內產生拮抗作用而可治療下列疾病：低血糖症及與胃手術或小腸切除相關之吸收不良綜合症。

因此，本發明之範圍包含本文所界定之醫藥組合物，

該組合物係以至少一種式(I)之化合物作為活性成分。

本發明之配方中活性成分之劑量係可變的；然而，活性成分之含量必須達到適當之劑量。劑量之選擇取決於欲達到的療效、投藥途徑、及治療時間，且通常由主治醫生決定。一般來說，本發明之活性作用的有效劑量係在 1×10^{-7} 至 200 mg/kg/日，較佳為 1×10^{-4} 至 100 mg/kg/日，其可為單一投藥劑量，或分成多個劑量投藥。

本發明之配方較佳係由非腸胃途徑投予，例如，肌肉注射、腹膜注射、靜脈注射、皮下注射等。

本發明之非腸胃途徑投予之製劑包含無菌之水性或非水性溶液、懸浮液、凝膠、或乳液，惟其於體內可達到所欲之釋放量變曲線。非水性溶劑或載劑之實例係丙二醇、聚乙二醇、植物油，例如橄欖油及玉米油、凝膠及可注射之有機酯類，例如油酸乙酯。這些劑量形式亦可包含輔助劑，例如防腐劑、濕化劑、乳化劑和分散劑。其可經以下方式滅菌，例如，經由細菌-阻隔過濾器(bacteria-retaining filter)之過濾作用，加入消毒劑至組合物中，以放射線照射該組合物，或將組合物加熱。其亦可製成無菌之固體組合物形式，該固體組合物在使用前可立即將其溶解於無菌水，或其他某些無菌之注射介質中。

除非特別說明，本文中所使用之技術及科學術語與本發明所屬之領域內之一般人士所理解者具有相同意義。再者，所有刊物、專利申請案、專利及其他本文所提及之參考文獻皆以參考資料合併於本文。

圖式簡單說明

第 1 圖顯示鋅對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響，其中 x 軸為時間及 y 軸為血漿中實施例 1 化合物之濃度。

第 2 圖顯示注射體積對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響，其中 x 軸為時間及 y 軸為血漿中實施例 1 化合物之濃度。

第 3 圖顯示鋅對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響，其中 x 軸為時間及 y 軸為血漿中實施例 1 化合物之濃度。

第 4 圖顯示鋅與生物活性化合物之濃度對以本發明組合物之方式投予至受者之生物活性化合物的生物利用率之影響，其中 x 軸為時間及 y 軸為血漿中實施例 1 化合物之濃度。

申請專利範圍如下：

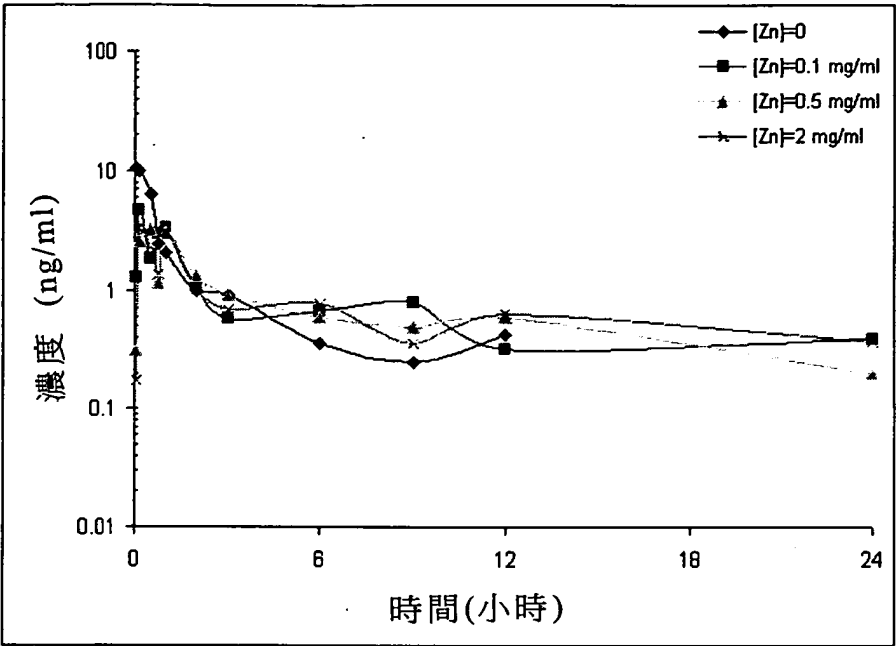
五、中文發明摘要：

本發明是針對類升糖素肽-1 (glucagon-like peptide-1) 的胜肽類似物，其醫藥可接受之鹽類，利用這些類似物治療哺乳動物的方法以及利用含該類似物之醫藥組合物。

六、英文發明摘要：

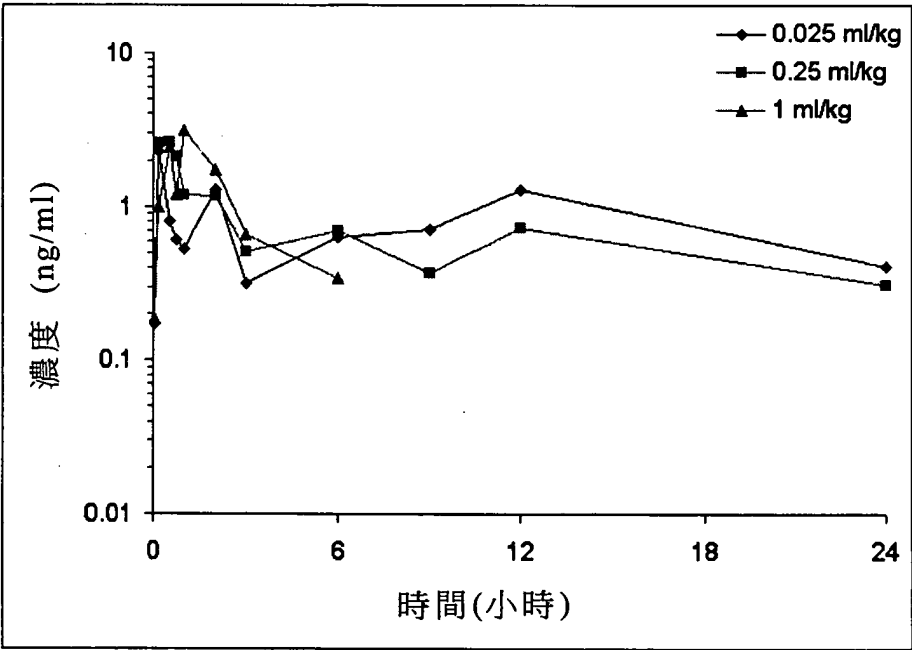
The present invention is directed to peptide analogues of glucagon-like peptide-1, the pharmaceutically-acceptable salts thereof, to methods of using such analogues to treat mammals and to pharmaceutical compositions useful therefore comprising said analogues.

實施例 H. 1.



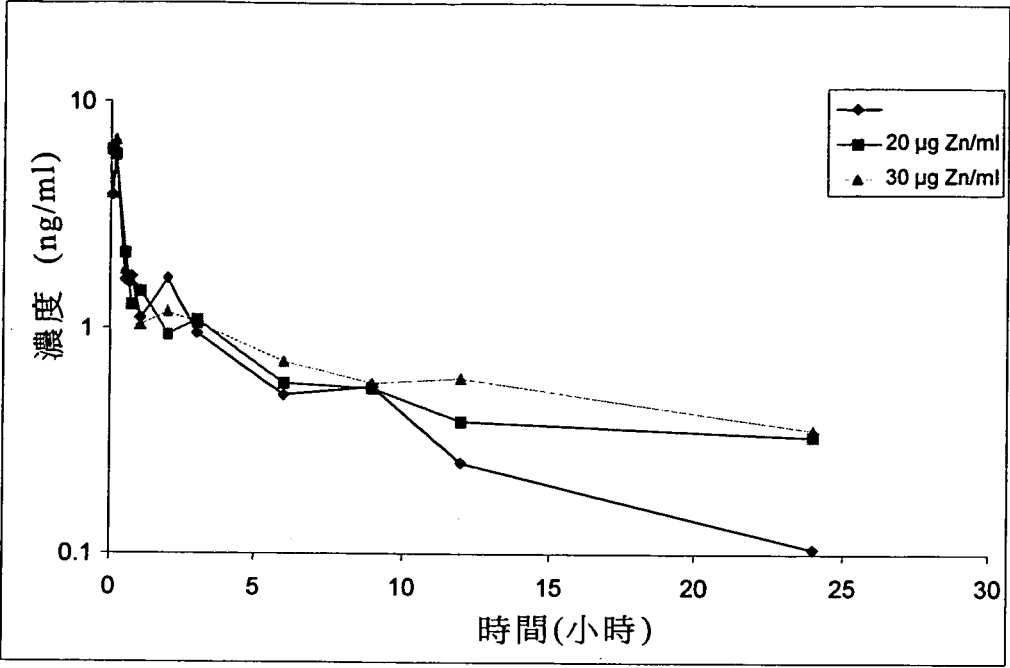
第 1 圖

5

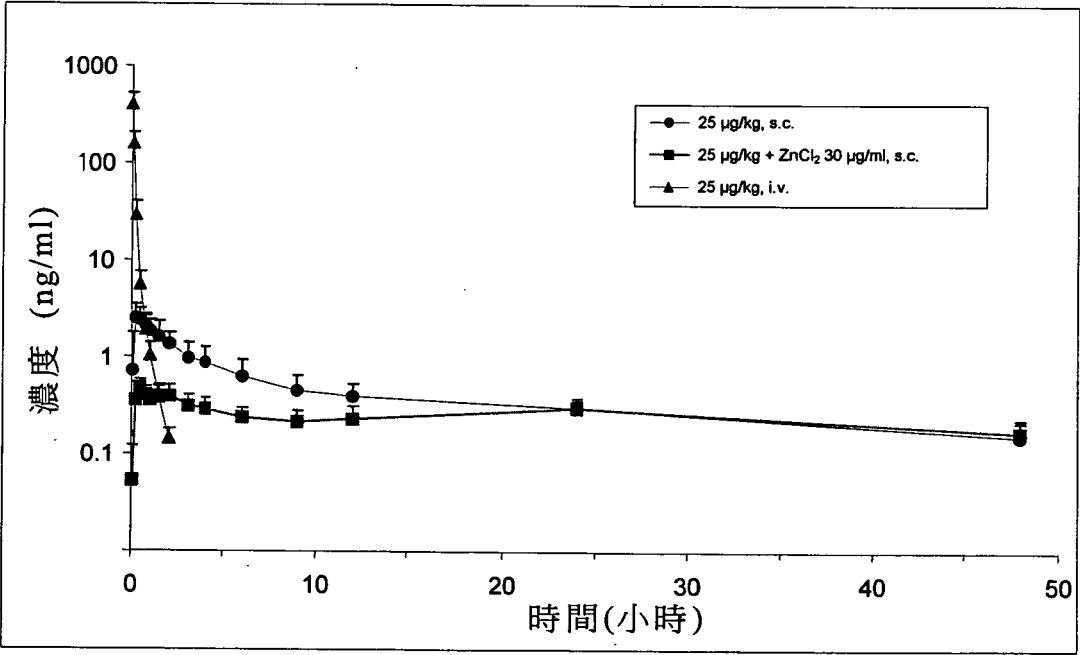


第 2 圖

10



第 3 圖



第 4 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：93139220

※申請日期：93.12.16

※IPC 分類：A61K^{38/00}；A61P^{3/08}

一、發明名稱：(中文/英文)

GLP-1 醫藥組合物

GLP-1 PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

益普生製藥公司

IPSEN PHARMA S.A.S.

代表人：(中文/英文) 安德魯·布爾戈尤 / Andre BOURGOUIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國布露涅-比蘭庫市(92100)桂喬治葛斯 65 號

65 Quai Georges Gorse, Boulogne-Billancourt 92100, France

國 籍：(中文/英文) 法國/France

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 董正欣 / DONG, ZHENG XIN

2. 羅蘭得·查瑞夫-柴考 / CHERIF-CHEIKH, ROLAND

國 籍：(中文/英文) 1. 美國/U.S.A.；2. 法國 / FRANCE

(2011年10月修正)
100年10月6日
補充

申請專利範圍

1. 一種用於有需要之受者體內引發 GLP-1 受體出現激動作用之醫藥組合物，包括有效量之具有下列式(I)的類似物，或其醫藥上可接受之鹽，
$$(\text{Aib}^8, ^{35}, \text{Arg}^{26, 34}, \text{Phe}^{31})\text{hGLP-1}(7-36)\text{NH}_2$$

(I)。
2. 一種用於治療選自下列群組之疾病之醫藥組合物，該群組由 I 型糖尿病、II 型糖尿病、肥胖症、胰高血糖素瘤 (glucagonomas)、呼吸道分泌失調、代謝失調、關節炎、骨質疏鬆症、中樞神經系統疾病、心臟瓣膜再狹窄以及神經退化性疾病所組成，其包括有效量之如申請專利範圍第 1 項的式(I)所定義的類似物，或其醫藥上可接受之鹽。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，其中該類似物之濃度為約 0.001 至 500 mg/mL。
4. 如申請專利範圍第 3 項之組合物，其中該類似物之濃度為約 0.1 至 10 mg/mL。
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括防腐劑。
6. 如申請專利範圍第 5 項之組合物，其中該防腐劑係選自由間-甲酚、酚、苯甲醇以及對羥基苯甲酸甲酯所組成之群組。
7. 如申請專利範圍第 6 項之組合物，其中該防腐劑之濃度為 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL。
8. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括一種等滲

壓劑(isotonic agent)。

9.如申請專利範圍第 8 項之組合物，其中該等滲壓劑的濃度為 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL。

10.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括二價離子。

11.如申請專利範圍第 10 項之組合物，其中該二價離子為鋅，以及該鋅之濃度為自 0.0005 mg/mL 至 50mg/mL。

12.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括穩定劑。

13.如申請專利範圍第 12 項之組合物，其中該穩定劑係選自由咪唑、精胺酸以及組胺酸所組成之群組。

14.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括界面活性劑。

15.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括螯合劑。

16.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括緩衝劑。

17.如申請專利範圍第 16 項之組合物，其中該緩衝劑係選自由 Tris、醋酸銨、醋酸鈉、甘胺酸、天冬胺酸以及 Bis-Tris 所組成之群組。

18.如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括鹼性多肽。

19.如申請專利範圍第 18 項之組合物，其中該鹼性多肽係選自由聚離胺酸、聚精胺酸、聚鳥胺酸、魚精蛋白、腐

胺、精胺、亞精胺以及組蛋白所組成之群組。

20. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括醇類或單糖或二糖類。

21. 如申請專利範圍第 20 項之組合物，其中該醇類或單糖或二糖類係選自由甲醇、乙醇、丙酮、甘油、海藻糖、甘露醇、葡萄糖、赤藻糖、核糖、半乳糖、果糖、麥芽糖、蔗糖以及乳糖所組成之群組。

22. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，復包括硫酸銨。

23. 如申請專利範圍第 2 項之組合物，其中該疾病為 I 型或 II 型糖尿病。

24. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之組合物，其進一步含有鋅以及醫藥上可接受之載體或稀釋劑。

25. 如申請專利範圍第 24 項之組合物，其中該鋅之濃度為 0.0005 mg/mL 至 50 mg/mL。

26. 如申請專利範圍第 24 項之組合物，其中該稀釋劑包括醫藥上可接受之水溶液。