



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95105569.0

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/62

[43]公开日 1996年9月25日

[22]申请日 95.5.26

[30]优先权

[32]95.3.21 [33]US[31]407831

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 J·A·盖洛韦

J·A·霍夫曼

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜 汪洋

A61K 38/28

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 高血糖素样胰岛素营养复合物、组合物及其方法

[57]摘要

本发明提供了含有与二价金属阳离子相结合的 GLP-1 分子的新型复合物，其中的二价金属阳离子能与 GLP-1 分子共沉淀。药物组合物和应用所述复合物提高胰岛 B 细胞中胰岛素表达的方法要求权利保护，同样，哺乳动物，尤其是人类成年起病型糖尿病的治疗方法也要求权利保护。

权利要求书

1. 一种 GLP-1 分子复合物, 它由与下列通式化合物结合的并能与该化合物形成共沉淀的二价金属阳离子组成:

R_1 -X-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Y-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Z-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg- R_2

其中

R_1 选自由 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 -甲基组氨酸组成的基团;

X 选自由 Ala、Gly、Val、Thr、Ile 和 α -甲基-Ala 组成的基团;

Y 选自由 Glu、Gln、Ala、Thr、Ser 和 Gly 组成的基团;

Z 选自由 Glu、Gln、Ala、Thr、Ser 和 Gly 组成的基团;

R_2 选自自由 NH_2 和 Gly-OH 组成的基团;

条件是该化合物具有在约 6.0 至约 9.0 范围内的等电点, 并且当 R_1 是 His、X 是 Ala、Y 是 Glu、以及 Z 是 Glu 时, R_2 必须是 NH_2 。

2. 根据权利要求 1 的复合物, 其中所述二价金属阳离子是锌。

3. 根据权利要求 2 的复合物, 其中 R_1 选自由 His 和脱氨基组氨酸组成的基团。

4. 根据权利要求 2 的复合物, 其中 X 选自由 Ala、Gly 和 Val 组

成的基团。

5. 根据权利要求 2 的复合物, 其中 Y 选自由 Glu 和 Gln 组成的基团。

6. 根据权利要求 2 的复合物, 其中 Z 选自由 Glu 和 Gln 组成的基团。

7. 根据权利要求 2 的复合物, 其中 R_1 是 His, X 是 Val, Y 是 Glu, Z 是 Glu, 以及 R_2 是 Gly-OH。

8. 根据权利要求 2 的复合物, 其中 R_1 是 His, X 是 Gly, Y 是 Gln, Z 是 Glu, 以及 R_2 是 Gly-OH。

9. 一种药物制剂, 它含有与一种或多种药用载体、稀释剂或赋形剂相结合的如权利要求 1-8 中任何一项所要求的复合物或其可药用的盐作为活性成分。

10. 如权利要求 1-8 中任一项所要求的用于糖尿病治疗的 GLP-1 分子复合物或其可药用的盐。

11. 一种制备如权利要求 1-8 中任一项所要求的 GLP-1 分子复合物的方法, 它包括将 GLP-1 分子与二价金属阳离子相混合。

说明书

高血糖素样胰岛素营养复合物, 组合物 及其方法

本发明涉及药物化学和有机化学领域, 并且提供了适用于增加哺乳动物胰岛 B 细胞表达胰岛素以及适用于治疗哺乳动物的成年起病型糖尿病的新的化合物, 及其药物组合物。

胰岛的内分泌处于复杂的控制之中, 即不仅受血液产生的代谢物(葡萄糖, 氨基酸, 儿茶酚胺等)的控制, 而且也受局部旁分泌作用的控制。主要的胰岛激素(高血糖素, 胰岛素和生长抑素)在它们各自的特异性细胞类型(分别为 A, B 和 D 细胞)之间相互作用, 从而调节由上面提到的代谢物介导的分泌应答。虽然胰岛素的分泌主要是受血液中葡萄糖含量的控制, 但生长抑素也抑制葡萄糖介导的胰岛素分泌应答。除了已提到的胰岛间旁分泌调节胰岛素的分泌外, 还有证据证实在肠内存在胰岛素营养因子。该观念起源于这样的观察资料: 给予同等量的葡萄糖, 口服时对于胰岛素分泌的刺激要比静脉注射更具有潜力。

人的激素高血糖素是一种胰腺的 A 细胞中产生的 29-氨基酸肽激素。该激素属于多基因的结构上相关肽系, 这些肽包括促胰液素、胃抑肽、血管活性作用的肠内肽以及胰高血糖素样肽。这些肽从多方面调节碳水化合物的代谢、胃肠运动以及分泌过程。但是该胰腺高血糖素的主要的公认的作用是促进肝糖原分解作用和糖原异生作

用,从而导致血糖含量升高。关于这一点,高血糖素的调节作用与胰岛素正好相反,可能对糖尿病常出现的高血糖症起作用 [(Lund, P. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79: 345 - 349 (1982))].

已经发现高血糖素能够结合到位于产生胰岛素的细胞表面的特异性受体上。当高血糖素结合到这些受体上时,能刺激这些细胞快速合成 cAMP。已发现 cAMP 又能刺激胰岛素的表达 [Korman, L. Y., et al., Diabetes, 34: 717 - 722 (1985)]. 胰岛素起着抑制高血糖素合成的作用 [Ganong, W. F., Review of Medical Physiology, Lange Publication, Los Altos, California, P. 273 (1979)]. 因此,高血糖素的表达受胰岛素精密地调节,并主要受血清葡萄糖水平的调节。

最初高血糖素基因是从 360bp 前体转译形成多肽,前高血糖素原 [Lund, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 345 - 349 (1982)]. 随后将该多肽加工形成高血糖素原。Patzelt, C., et al., Nature, 282: 260 - 266 (1979) 证实,随后将高血糖素原切割为高血糖素和第二个多肽。由 Lund, P. K., et al., Lopez L. C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 5485 - 5489 (1983), and Bell, G. I., et al., Nature 302: 716 - 718 (1983) 的后来研究证实高血糖素原分子恰在赖氨酸 - 精氨酸二肽残基后被切割。对由海峡鲑鱼 (*Ictalurus punctata*) 产生的高血糖素原的研究表明由该动物产生的高血糖素原也恰在赖氨酸 - 精氨酸二肽残基后进行蛋白质水解切割 [Aanrews P. C., et al., J. Biol. Chem., 260: 3910 - 3914 (1985), Lopez, L. C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80: 5485 - 5489 (1983)]. Bell, G. I., et al., (见上文) 发现哺乳动物高血糖素原在赖氨酸 - 精氨酸二肽或精氨酸 - 精氨酸二肽上被切割, 并且证明高血

糖素原分子含有三个不连续的并且高度同源性的肽分子，将这三个肽分子命名为高血糖素，高血糖素样肽 1 (GLP-1) 和高血糖素样肽 2 (GLP-2)。Lopez, et al., 推断出高血糖素样肽 1 的长度为 37 个氨基酸残基并且高血糖素样肽 2 的长度为 34 个氨基酸残基。对大鼠前高血糖素原的结构进行类似研究结果表明在相邻接的赖氨酸-精氨酸或精氨酸-精氨酸二肽残基之间进行蛋白水解切割，具有相似的图谱，结果产生了高血糖素，GLP-1 和 GLP-2 [Heinrich, G., et al., *Endocrinol.*, 115: 2176 - 2181 (1984)]。已经发现人，大鼠、牛、和仓鼠的 GLP-1 序列是相同的 [Ghiglione, M., et al., *Diabetologia*, 27: 599 - 600 (1984)]。

由 Lopez 等人总结出的关于 GLP-1 的长度的结论已由 Uttenthal, L. O. 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 61: 472 - 479 (1985) 的工作所证实。Uttenthal 等人检验了在人胰腺中存在的 GLP-1 的分子结构。他们的研究表明，GLP-1 和 GLP-2 分别以 37 氨基酸和 34 氨基酸肽的形式存在于胰腺中。

GLP-1 和高血糖素之间的相似性提示早期的研究者，GLP-1 可能具有生物学活性。尽管某些研究者发现 GLP-1 可以诱导大鼠脑细胞合成 cAMP [Hoosein, N. M., 等人, *Febs Lett.* 178: 83 - 86 (1984)]，而其他研究者没有发现 GLP-1 有任何生理学作用 (Lopez, L. C., 等人)。由于没有鉴定出 GLP-1 有任何生理学作用，使得某些研究者产生疑问：GLP-1 究竟是不是一种激素，以及高血糖素和 GLP-1 之间的相关性是否是人为制造的。

也发现了 GLP-1 的变型 (7-37) 及其类似物。这些变型及类似物包括：例如 Gln^9 -GLP-1 (7-37), D-Gln^9 -GLP-1 (7-37), 乙

基 - Lys⁹ - GLP - 1 (7 - 37), Thr¹⁶ - Lys¹⁸ - GLP - 1 (7 - 37), Lys¹⁸ - GLP - 1 (7 - 37) 等等及其包括例如酸加成盐、羧酸盐、低级烷基酯以及酰胺的衍生物 [参见, 例如 WO 91/11457]。一般地讲, 已知已公开的各种形式的 GLP - 1 可刺激胰岛素的分泌 (胰岛素营养作用) 以及 cAMP 的形成 [参见, 例如, Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research, 40: 333 - 343 (1992)]。

更重要的是, 许多著者已证实了实验室试验和哺乳动物, 特别是人对外源施用 GLP - 1, 特别是 GLP - 1 (7 - 36)NH₂ 和 GLP - 1 (7 - 37) 的胰岛素营养应答之间的关系 (参见, 例如 [Nauck, M. A., 等人, Diabetologia, 36: 741 - 744 (1993); Gutniak, M., 等人, New England J. of Medicine, 326 (20): 1316 - 1322 (1992); Nauck, M. A. 等人, J. Clin. Invest., 91: 301 - 307 (1993); 以及 Thorens, B., 等人, Diabetes, 42: 1219 - 1225 (1993)]。

更具体地讲, 已经明确的引起成年起病型糖尿病高血糖症的基本缺陷是内源性胰岛素的分泌障碍以及由肌肉和肝脏产生的对胰岛素作用的抗性 [Galloway, J. S., Diabetes Care, 13: 1209 - 1239, (1990)]。后一缺陷导致肝脏过量地产生葡萄糖。因此, 正常的个体以大约 2mg/kg/分钟的速率释放葡萄糖, 而在患有成年起病型糖尿病的患者中, 该释放是通常超过 2.5mg/kg/分钟, 从而在 24 小时内葡萄糖的净剩余量至少为 70 克。在肝脏中葡萄糖的产生量, 空腹时的血液葡萄糖以及葡萄糖血红蛋白测定显示的综合代谢控制之间存在极高度相关性, 根据这一事实 [Galloway, J. A., (见上文); 以及 Galloway, J. A., 等人, Clin. Therap., 12: 460 - 472 (1990)], 显而易见, 对空腹血液葡萄糖的控制是取得足于防止高血糖并发症的综合

代谢正常化的绝对必要条件。现有的胰岛素形式使肝葡萄糖正常产生时总是出现明显的高胰岛素血症和低血糖，考虑这一事实 (Galloway, J. A., and Galloway, J. A., et al., 见上文)，需要另外的途径。

已经证实静脉输注 GLIP-1 (7-36)NH₂ 产生二倍的正常血清浓度时将产生下表显示的效果：

表 1

	正常受试者	成年起病型 糖尿病的患者
餐后血糖 (1)	未改变	降低
空腹血糖 (2)	--	降低
空腹高血糖素 (2)	--	降低
餐后高血糖素 (1)	--	降低
餐后内源性胰岛素分泌 (1)	未变化	增加
游离脂肪酸	降低 (3)	降低 (2)

(1) Gutniak, M., et al., (见上文)。

(2) Nauck, M. A., et al., Diabetologia, (见上文)。

(3) Orskov, C., et al., Diabetes, 42: 658 - 661, (1993)。

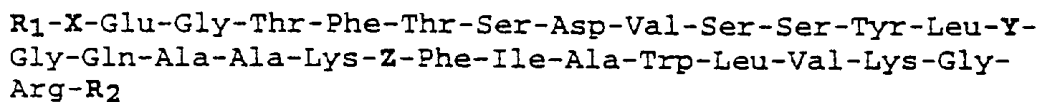
但是，GLP-1，特别是用作为哺乳动物用药的药物组合物成分的 GLP-1 是否能长期稳定是值得怀疑的。事实上，当在 4°C 低温下贮存时，在早至样品制备后 11 个月时就发现了 GLP-1 (7-37) 的副产物 (Mojsov, S., 见上文)。因此，需要一种更稳定的 GLP-1 化合物，能安全地给需要这种治疗的哺乳动物用药。

再者，GLP-1 分子的生物半寿期，特别是那些受二肽基肽酶

IV (DPP IV) 影响的分子的生物半寿期间是非常短的。例如, GLP-1(7-37)的生物半寿期仅为3-5分钟,而且还受哺乳动物非肠道给药后快速吸收的影响。因此,还需要一种在非肠道给药后吸收缓慢的GLP-1化合物。

因此,本发明解决了与天然GLP-1分子相关联的血清不稳定以及较短血清半寿期的问题。另外,本发明还提供了在非肠道给药后吸收缓慢的化合物,因而该化合物具有更长的生物半寿期。还提供了本发明所述化合物制备的药物组合物,以及该化合物的应用方法。

本发明提供了由与下列通式的化合物相缔合的并且能与该化合物进行共沉淀的二价金属阳离子组成的一种复合物:



其中:

R_1 选自由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 -氟甲基组氨酸以及 α -甲基组氨酸组成的基团;

X选自由Ala、Gly、Val、Thr、Ile以及 α -甲基-Ala组成的基团;

Y选自由Glu、Gln、Ala、ThrSer、以及Gly组成的基团;

Z选自由Glu、Gln、Ala、Thr、Ser、以及Gly组成的基团;

R_2 选自由 NH_2 和Gly-OH组成的基团;条件是该化合物的等电点在约6.0-9.0范围内;并且当 R_1 是His、X是Ala、Y是Glu和Z是Glu时, R_2 必须是 NH_2 。

本发明还提供了一种药物组合物，该组合物包括与一种或多种药用载体、稀释剂或赋形剂相结合的本发明化合物。

本发明进一步提供了用于增强胰岛素表达的一种方法，该方法包括给哺乳动物胰岛B细胞提供有效量的本发明所述组合物；还提供了一种治疗成年起病型糖尿病的方法，该方法包括给需要进行这种治疗的哺乳动物施用有效量的本发明的化合物。

本发明另一方面提供了一种由与二价金属离子络合的GLP-1分子组成的复合物，所述GLP-1分子的等电点在约6.0-约9.0范围内。

如在本说明书中使用的，术语“GLP-1分子”是指天然存在的GLP-1(7-36)NH₂，GLP-1(7-37)、及其天然和非天然的功能类似物和衍生物，以及其盐。GLP-1(7-36)NH₂的氨基酸序列是本领域熟知的，但为方便读者起见仍列出如下：

His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-
Tyr-Leu²⁰-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-
Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-NH₂.

对于GLP-1(7-37)，在GLP-1(7-36)NH₂分子的第37位上用Gly取代Arg³⁶羧基末端酰胺官能度。

另外，在现有技术中已描述了一大批GLP-1(7-36)NH₂和GLP-1(7-37)分子的受保护的、未受保护的以及部分受保护的天然和非天然功能类似物和衍生物的存在及制备[参见，例如美国专利号5,120,712以及5,118,666，它们作为参考文献并引入本文，以及Orskov, C., 等人, J. Biol. Chem., 264(22): 12826-12829(1989)以及WO 91/11457(Buckley, D. I. 等人, 1991年8月8日出版)。

如在现有技术中已知的,氨基酸残基可以是其受保护形式,其中的氨基和羧基都具有适当的保护基团;也可以是部分受保护形式,其中的氨基或羧基具有合适的保护基团;或者可以是未受保护形式,其中的氨基或羧基都不具有合适的保护基团。在许多经典著作中描述了用于形成和除去这样的保护基团的许多反应,包括例如“Protective Groups in Organic Chemistry”, Plenum Press (London and New York, 1973); Green, T. H., “Protective Groups in Organic Synthesis”, Wiley (New York, 1981); 以及“The Peptides”, Vol. I. Schroder and Lübke, Academic Press (London and New York, 1965)。

典型的氨基保护基团包括,例如甲酰基、乙酰基、异丙基、丁氧基羰基、苄基甲氧基羰基、苄酯基等等。

典型的羧基保护基团包括例如,苯基酯,甲基酯,乙基酯,正-丁基酯,对-硝基苯基酯,等等。

除了其中的氨基和羧基都具有合适保护基团的受保护形式外,术语“受保护”也指那些其中的二肽基-肽酶 IV 的活性被对抗或被抑制的那些 GLP-1 分子 [参见例如, Mentlein, R., 等人, Eur. J. Biochem., 214: 829-835 (1993)]。除了 GLP-1 (7-36) NH₂, 被保护免受 DPP IV 活性作用的那些分子是优选的,更优选的是 Gly⁸-GLP-1 (7-36) NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37) OH, α-甲基-Ala⁸-GLP-1 (7-36) NH₂ 以及 Gly⁸-Gly²¹-GLP-1 (7-37) OH。

天然存在的 GLP-1 分子的衍生物是通过将天然存在的序列裂解为片段获得的那些肽,或者是根据对编码该天然存在的氨基酸顺

序的遗传物质 (DNA 或 RNA) 序列所掌握的信息合成的那些肽。术语“衍生物”还包括对天然或非天然 GLP-1 分子进行化学修饰后得到的分子。制备这些衍生物的方法对普通的有机和肽化学技术人员而言是熟知的 (参见, 例如 WO 91/11457, 见上文)。

本发明的 GLP-1 分子还包括 GLP-1 (7-36) NH₂ 和 GLP-1 (7-37) 的类似物及其衍生物, 所述类似物中添加或缺失了原始序列中不存在的一个或多个氨基酸。具体地讲, 对于 R₁, 优选的是 His 和 脱氨基组氨酸, 只要该分子的综合等电点是在约 6 至 9 的范围内。只要该分子的综合等电点是在约 6 至 9 的范围内, 在“X”位置优选的是 Ala, Gly 以及 Val。同样, 只要该分子的综合等电点是在约 6 至 9 的范围内, 则“Y”位置优选的是 Glu 和 Gln。只要该分子的综合等电点是在约 6 至 9 的范围内, 则“Z”位置优选的也是 Glu 和 Gln。最后, 只要该分子的综合等电点是在约 6 至 9 的范围内, 则对于 R₂ 优选的是 Gly-OH。

再者, 本发明包括 GLP-1 分子的盐形式。本发明的 GLP-1 可以具有一个足够的酸性基团、一个足够的碱性基团或该两种官能基团, 因而可以与大多数的无机碱, 以及无机和有机酸发生反应形成盐。通常用于形成酸加成盐的酸是无机酸例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等等、以及有机酸例如对-甲苯磺酸、甲烷磺酸、草酸、对-溴苯基磺酸、磺酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等等。这样的盐的例子包括硫酸盐、焦硫酸盐、双硫酸盐、亚硫酸盐、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、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸

盐、延胡索酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、酞酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯基乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、羟基乙酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、茶-1-磺酸盐、茶-2-磺酸盐、偏桃酸盐等等。优选的酸加成盐是那些由无机酸例如盐酸和氢溴酸并且尤其是盐酸形成的盐。

碱加成盐包括那些由于无机碱例如氢氧化铵、碱金属或碱土金属的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等衍生的盐。因而用于制备本发明所述盐的那些碱包括氢氧化钠, 氢氧化钾, 氢氧化铵, 碳酸钾等等。特别优选的是盐形式。

当然, 当将本发明化合物用于药物治疗目的时, 这些化合物也可以是盐形式, 但这种盐必须是药用盐。

因此, 本发明的 GLP-1 分子特别包括那些显示有胰岛素营养活性功能的 GLP-1 分子。术语“胰岛素营养活性”是指刺激、或者能够引起刺激激素胰岛素的合成或表达的一种物质的能力。

通过给动物细胞提供一种化合物, 或者将该化合物注射到动物体内并且分别检测释放到培养基中或动物循环系统中的免疫反应性胰岛素 (IRI), 可以测出该化合物的胰岛素营养特性。通过利用能特异性地检测胰岛素的放射免疫测定法可以检测 IRI 的存在。

虽然可以使用任何能检测 IRI 存在的放射性免疫测定法, 但优选的是使用 Albano, J. D. M. 等人, *Acta Endocrinol.*, 70: 487-509 (1972) 的测定法的改良法。在这种改良方法中, 使用了 pH 为 7.4 的磷酸盐/白蛋白缓冲液。在 10×75 mm 可进行实验处理的玻璃试管中

顺序加入 500 μ l 的磷酸盐缓冲液、50 μ l 的灌注液样品或溶于灌注液中的大鼠胰岛素标准物, 100 μ l 的抗胰岛素抗血清 (Wellcome Laboratories; 以 1: 40, 000 稀释) 以及 100 μ l 的 [125 I] 胰岛素, 得到总体积为 750 μ l 来进行孵育。在 4 $^{\circ}$ C 孵育 2-3 天后, 采用炭分离法从抗体结合胰岛素中分离出游离胰岛素。该检测法灵敏度是 1-2 μ U/ml。为了检测在细胞组织培养时释放到细胞培养基中的 IRI, 优选的是将放射性标记与胰岛素原结合。虽然可以使用任何能标记多肽的放射性标记物, 但优选的是使用 3 H 亮氨酸以便获得标记胰岛素原。只要足以形成可检测的胰岛素原分子的标记库, 标记时间并无限制; 但是, 优选的是在放射性标记物存在条件下将细胞孵育 60 分钟。

虽然可以使用许多能表达胰岛素的细胞系来测定一种化合物是否具有胰岛素营养作用, 但优选的是使用大鼠胰岛瘤细胞, 尤其是 IRI-38 大鼠胰岛瘤细胞。这样的细胞可在任何合适的培养基中生长; 但是, 优选的是使用含有 0.1% BSA 和 25mM 葡萄糖的 DME 培养基。

也可以采用胰腺输注法测定一种化合物的胰岛素营养特性。原位分离灌注的大鼠胰腺制备方法是 Penhos, J. C., 等人 Diabetes, 18: 733-738 (1969) 的方法的改良法。用阿米妥钠腹腔内注射 (Eli Lilly and Co.: 160ng/kg) 给空腹的雄性 Charles River Strain albino 大鼠 (重量为 350-600g), 使之麻醉。将肾的、肾上腺的、胃的和较低位结肠血管连接起来。除 4cm 的十二指肠以及降结肠和直肠外, 将肠道全部切除。因此, 仅灌注了一小部分的肠道, 将具有高血糖素样免疫反应性的肠道物质的可能干扰降至最低。灌注液是一种添加了 4% 葡聚糖 T70 和 0.2% 牛血清白蛋白 (组分 V) 的改良

Krebs - Ringer 二碳酸盐缓冲液, 并且通入 95% O₂和 5% CO₂形成气泡。使用一种装有泵的非脉动流式 4 通道滚桶 (Buchler Polystatic, Buchler Instruments Division, Nuclear - Chicago Corp.), 转动三通活塞可使一种灌注液转换至另一种灌注液。灌注的进行、监测和分析方法按照 Weir, G. C. 等人, J. Clin. Invest. 54: 1403 - 1412 (1974) 的方法, 该文献引入本文作为参考。

本发明的 GLP - 1 分子必须在氨基末端具有组氨酸官能度。本发明的 GLP - 1 分子也可以具有经修饰的组氨酸官能度来替代所需的组氨酸官能度。

本语“经修饰的组氨酸”是指经过化学或生物学改变的组氨酸官能度或者指一种从头至尾被合成的但保留其金属结合特性的被改变了的组氨酸官能度。

许多这样的经修饰的组氨酸官能度及其制备方法是本领域已知的, 并且包括例如, D - 组氨酸 (WO 91/11457), 脱氨基组氨酸 (WO 92/18531)、2 - 氨基 - 组氨酸 [Levine - Pinto, Ho, 等人 Biochem. Biophys. Res. Commun. 103 (4): 1121 - 1130 (1981)], β - 羟基 - L - 组氨酸 [Owa, T, 等人, Chemistry Letters, pp. 1873 - 1874 (1988)], L - 高组氨酸 [Altman, J., 等人, Synthetic Commun., 19 (11812): 2069 - 2076 (1989)], α - 氟甲基 - 组氨酸 (US 专利号 4,347,374) 以及 α - 甲基组氨酸 [O'Donnell, M. J., Synthetic. Commun., 19 (7, 8): 1157 - 1165 (1989)]。

还要求本发明的 GLP - 1 分子具有约 6.0 至约 9.0 范围内的等电点。已经发现许多在该范围内具有等电点的 GLP - 1 分子, 包括例如:

GLP-1 (7-36)NH₂
Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂
Gln⁹-GLP-1 (7-37)
D-Gln⁹-GLP-1 (7-37)
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), 等等(例如参见 WO 91/11457)。

另外, 当本发明的 GLP-1 分子具有上面提到的各种经修饰的组氨酸功能度来替代组氨酸功能度时, 该分子的等电点即落入上面限定的范围内。计算或通过实验测定其他 GLP-1 分子的等电点的方法是本领域一般技术人员熟知的。

用于制备本发明的 GLP-1 分子的方法也是普通的肽化学技术人员熟知的。

有一种制备 GLP-1 分子的方法是 Merrifield, J. M., Chem. Soc., 85: 2149 (1962) 以及 Stewart 和 Young, Solid Phase Peptide Synthesis, PP. 24 - 66, Freeman (San Francisco, 1969) 介绍的熟知的固相肽合成方案。但是, 也可利用例如一种蛋白质水解酶将天然存在的氨基酸序列分解成片段来获得高血糖素原多肽或 GLP-1 (1-37) 的片段。再者, 可以采用 Maniatis, T. 等人的 Molecular

Biology: A Laboratory Manual, CSH (Cold Spring Harbor, 1982) 公开的重组 DNA 技术来获得所需要的高血糖素原肽或 GLP - 1 (1 - 37) 的片段。

另外, 分子生物学技术领域的现状给本领域普通技术人员提供了另一种获得本发明化合物的方法。虽然可以用固相肽合成法或重组方法来生产, 但优选的是重组方法, 因为可以获得较高的产量。重组方法生产的基本步骤是:

a) 分离一种编码 GLP - 1 分子的天然 DNA 序列, 或构建一种编码 GLP - 1 分子序列的合成或半合成 DNA,

b) 以合适的方式将该编码序列置于一种表达载体中, 该方式适于表达单纯蛋白质或融合蛋白质,

c) 用该表达载体转化一种合适的真核或原核宿主细胞,

d) 在允许表达一种 GLP - 1 分子的前提下培养经转化的宿主细胞, 和

e) 回收和纯化重组产生的 GLP - 1 分子。

如前面介绍的, 编码序列可以是整个合成的或者是将较大的, 天然的高血糖素编码 DNA 进行修饰产生的。Lund 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 345 - 349 (1982) 介绍了编码前高血糖素原的 DNA 序列并且通过改变该天然序列可将该 DNA 序列用作半合成制备本发明化合物的起始物质而达到所需结果。

采用本领域熟知的技术, 可以构建合成基因, 该基因在体内或体外转录和翻译后可以生产 GLP - 1 分子。由于遗传密码子的天然简并性, 本领域技术人员将会认识到可以构建的 DNA 序列数量相当大, 但也并非无限的, 所有这些 DNA 序列都可以编码 GLP - 1 分子。

构建合成基因的方法是本领域熟知的。参见 Brown 等人 (1979) *Methods in Enzymology*, Academic Press, N. Y., Vol. 68, pgs. 109 - 151。基于本文公开的氨基酸序列可以设计编码 GLP - 1 分子的 DNA 序列。一旦设计出来后, 便可以利用常规的 DNA 合成设备, 例如 380A 或 380B 型 DNA 合成仪 (PE - Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) 制备该序列。

为了实现 GLP - 1 分子的表达, 使用合适的限制性核酸内切酶, 将设计的合成 DNA 序列插入到许多适用的重组 DNA 表达载体的任何一种中。一般步骤参见 Maniatis 等人 (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N. Y., Vol. 1 - 3。将限制性核酸内切酶切割位点设计到编码 GLP - 1 分子的 DNA 的任一末端以有助于从已知的扩增和表达载体上分离并整合到所述载体中。由所使用的母代表达载体的限制性核酸内切酶切割图谱决定了使用哪种特定的核酸内切酶。选择合适的限制性位点便于用控制序列将编码序列正确地定位, 从而得到合适的框架内解读并表达所需蛋白质。必须将该编码序列定位于有表达载体的启动子和核糖体结合位点的正确的解读框架中, 这两种序列必须是在要表达蛋白质的宿主细胞中有功能的。

为了实现该合成基因的有效转录, 必须将该合成基因与启动子 - 操纵子区进行可操作的连接。因此, 将该合成基因的启动子 - 操纵子区以相对于合成基因的 ATG 起动密码子相同的顺序方法放置。

用于转化原核和真核细胞的各种各样的表达载体是本领域熟知

的。参见, The Promega Biological Research Products Catalogue (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399) 以及 The Stratagene Cloning Systems Catalogue (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037)。美国专利号 4,710,473 中也描述了用于在大肠杆菌中高水平表达外源性基因的环 DNA 质粒转化载体。在重组 DNA 程序中这些质粒可用作为转化载体并且

- (a) 赋予质粒具有在宿主细胞中自主复制的能力;
- (b) 控制自主质粒在维持宿主细胞培养物的温度下进行复制;
- (c) 将质粒稳定地保持于宿主细胞群中;
- (d) 指导一种蛋白质产物的合成, 表示质粒保持于宿主细胞群中;
- (e) 给质粒提供特定的按顺序排列的限制性核酸内切酸识别位点; 和
- (f) 终止 mRNA 转录。

这些环 DNA 质粒用作重组 DNA 程序中的载体。以保证高水平地表达外源性基因。

已经构建了一种适于 GLP-1 分子的表达载体后, 接下来的步骤是将该载体置于合适细胞中, 从而构建用于表达该多肽的重组宿主细胞。用重组 DNA 载体转化细胞的技术是本领域熟知的, 并且在一般的参考文献 (例如 Maniatis, 等人, 见上文) 中有介绍。可用真核或原核细胞构建所述宿主细胞。

一般来说, 原核宿主细胞以更高的速率产生蛋白质, 并于更易于培养。在高水平的细菌表达系统中表达的蛋白质其特征是聚集为颗

粒或包涵体,其中过量表达的蛋白质含量很高。这样的蛋白质聚集体通常必须是可利用本领域熟知的技术进行溶解、变性和折叠的。参见 Kreuger 等人 (1990), Protein Folding, Gierasch and King, eds., pgs 136 - 142, American Association for the Advancement of Science 公开号 89 - 185, Washington, D. C.; 以及美国专利号 4,923,967。

一旦制备了所需的 GLP - 1 分子, 假如它具有约 6.0 至约 9.0 范围内的等电点, 则采用本发明领域熟知方法将所需 GLP - 1 分子与二价金属阳离子络合而制备本发明的复合物。这样的金属阳离子包括例如 Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} 等等。在这些金属离子中 Zn^{++} 是优选的。

通常, 将具有所需等电点的一种所需 GLP - 1 分子与一种合适缓冲液和合适形式的金属阳离子的混合物相结合。

合适的缓冲液是那些将混合物维持于约 6.0 至约 9.0 的 pH 范围内, 并且不干扰反应进行的缓冲液。优选的缓冲液包括 Goode's 缓冲液, 尤其是 HEPES, 以及 Tris 和 Tris 乙酸盐。

合适形式的金属离子是任何形式的二价金属阳离子, 该离子能够与本发明的 GLP - 1 分子形成一种复合物, 优选的是, 提供过量的二价金属阳离子盐例如氯化锌, 从而为每个 GLP - 1 底物分子提供了高至约 50 个分子的二价金属阳离子的摩尔比。

在该步骤中使用的温度是足于使反应完成所需温度。通常, 反应是在室温下进行。

利用标准技术分离和纯化本发明的产物, 即一种晶体的或非晶体的悬浮液。

本发明还提供了由本发明的一种化合物与药用载体、稀释剂或

赋形剂结合形成的药物组合物。以药理学领域熟知的方式制备这样的药物组合物，并优选地是通过非肠道途径将该药物组合物单独给药或与其他治疗剂结合给药。特别优选的途径包括肌肉内和皮下给药。

非肠道给药的日剂量（优选的是日剂量一次给药）在约 1pg/kg 体重至约 1,000 μ g/kg 体重的范围内，但是也可以给予更低或更高的剂量。所需剂量取决于患者病情的严重程度以及诸如病人的身高、体重、性别、年龄和既往病史等情况。

在制备本发明的组合物时，通常将含有至少本发明的一种化合物的活性成分与赋形剂混合或用赋形剂稀释。赋形剂用作稀释剂时，该赋形剂可以是作为活性成分载体或介质的固体、半固体或液体物质。

在制备药剂时，必须在与其他成分结合前先将活性化合物研磨成适当大小的颗粒。如果该活性化合物基本上是不溶的，则通常将其研磨成小于约 200 目的颗粒。如果该活性化合物基本上是水溶性的，通常用研磨来调节颗粒大小，例如约 40 目，使其在制剂中基本上呈均匀分布。

合适的赋形剂的一些例子包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、山梨醇和甘露醇。本发明的组合物可用本领域熟知的方法配制，以使给予患者后能快速、持续或延迟释放该活性成分。

本发明组合物最好是制剂成单位剂量的形式，通常每单位剂量含有约 50 μ g 至约 100mg，更常用的是约 1mg 至约 10mg 的活性成分。术语“单位剂量”是指适用于作为病人和其他哺乳动物的单一剂量的物理上独立的单位。每个单位含有计算产生期望的治疗效果的

预定量的活性物质,以及适宜的药用赋形剂。

为了进行非肠道给药,含有本发明化合物的组合物最好与蒸馏水结合并且将 pH 调至约 6.0 至约 9.0。

可以使用其他的药理学方法控制作用的持续时间。通过使用复合或吸收本发明化合物的多聚体可以制备可控制的释放制剂。通过选择合适的大分子(例如聚酯、聚氨基酸、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素以及精蛋白硫酸盐)和大分子浓度以及掺入方法,可进行有控制转运以便控制其释放。

通过控制的释放制剂来控制作用时间可采用的另一种方法是将本发明化合物掺入到聚合物例如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、多聚(乳酸)或乙烯乙酸乙烯酯共聚体的颗粒中。

此外,取代将本发明化合物掺入聚合物颗粒中的另一种方法,可以将本发明的化合物包备于微胶囊中,例如采用凝聚技术或采用界面聚合作用制备的微胶囊,例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊,或包备于胶体药物转运系统例如脂质体,白蛋白微球体,微乳剂,毫微颗粒以及毫微胶囊中,或者包备于大乳剂颗粒中,而不是将化合物掺入上述聚合物颗粒中。所述技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences(1980)。

本发明的化合物具有胰岛素营养活性。因此本发明的另一方面提供了一种用于加强胰岛素表达的方法,包括给哺乳动物胰岛 B 细胞提供有效量的本发明的化合物。

同样,本发明提供了一种哺乳动物,尤其是人类的成年起病型糖尿病的治疗方法,在需要这种治疗时,该疗法包括给患病哺乳动物施用有效量的本发明化合物或组合物。

下面提供的实施例是为了进一步阐述本发明。而不是将本发明限制于下列实施例范围。

实施例 1

采用熟知的，固相肽合成法制备 5 种不同 GLP-1 分子的等分试样，并冻干于小试管中。向试样中各加入一份 pH 为 7.4，氯化锌含量不同的 0.1M HEPES (N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙磺酸]) 缓冲液，从而得到约 0.1mg/ml 的蛋白质浓度。将试样混合并在室温 (22°C) 下贮存约 18 小时。然后将混合物离心 (Fisher model 235C 微型离心机) 5 分钟。从试管中吸取澄清的上清液。通过用分光光度计 (Gilford 260) 在 280nm 处检测其吸收值来估计上清液中蛋白质含量。在该波长处 1cm 的比色杯中 GLP-1 分子的 0.1mg/ml 溶液的理论吸收值是 0.207。试验结果显示于表 1 中。

表 1

Zn/GLP-1 分子	280 nm 吸收值				
	GLP-1 (7-36)NH ₂	Gly ⁸ -GLP-1 (7-36)NH ₂	Val ⁸ -GLP-1 (7-37)OH	α -甲基 Ala ⁸ -GLP-1 (7-36)NH ₂	Gly ⁸ -Gln ²¹ GLP-1 (7-37)OH
0	0.172	0.136	0.187	0.163	0.167
0.3	0.099	0.079	0.191	0.134	0.113
0.5	0.057	0.070	0.184	0.098	0.082
0.7	0.035	0.058	0.180	0.079	0.069
1.0	0.039	0.057	0.173	0.076	0.065
3.0	0.048	0.044	0.110	0.055	0.055

该实施例显示仅需要小量的锌与这些稀释溶液中的大部分 GLP-1 分子络合并使其沉淀出来。

实施例 2

将 5mg 的 GLP-1 (7-36)NH₂ 完全溶解于 2.5ml 的 pH 7.4 的无锌 0.1 HEPES 缓冲液中。迅速加入另外 2.5ml pH 为 7.4 的含有 0.6mM 氯化锌的 0.1M HEPES 缓冲液。在该样品中锌与 GLP-1 (7-36)NH₂ 的近似摩尔比为 1: 1。该溶液立即变得浑浊并立即形成沉淀。该混合物在室温 (22°C) 贮存 18 小时。

沉淀物牢固地吸附到玻璃管底部。用吸管将上清液完全移去。然后将沉淀溶解于 5.0ml 的 0.01N 盐酸中。测定上清液和沉淀重新溶解后的溶液在 280nm 处的吸收值。用原子吸收分光光度计定量这些溶液中的锌含量。实验结果显示于表 2 中。

表 2

	<u>280 nm 吸收值</u>	<u>锌浓度 (百万分之一)</u>
上清液 (5 ml)	0.118	9.02
重新溶解的沉淀 (5 ml)	1.932	13.3

此实施例证明当加入含锌的 HEPES 溶液时大部分的 GLP-1 (7-36)NH₂ 从该溶液中沉淀出来。在 280nm 处吸收值为 1.932, 表明重新溶解的沉淀物中 GLP-1 (7-36)NH₂ 的浓度为 0.933mg/ml 或 283 μM。同一溶液中锌浓度为百万分之 13.3, 相当于 203 μM 的锌浓度。因此, 在沉淀物中锌与 GLP-1 (7-36)NH₂ 的摩尔比是 0.717: 1。