

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/16

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99810174.5

[43] 公开日 2001 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 1314818A

[22] 申请日 1999.8.24 [21] 申请号 99810174.5

[30] 优先权

[32] 1998.8.28 [33] US [31] 60/098,273

[32] 1998.9.11 [33] US [31] 60/100,012

[86] 国际申请 PCT/US99/19348 1999.8.24

[87] 国际公布 WO00/12116 英 2000.3.9

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.27

[71] 申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 B·L·胡赫斯

R·K·沃尔夫

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 周慧敏

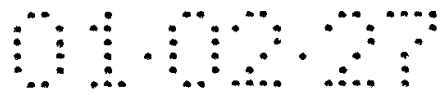
权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 服用促胰岛素肽的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种通过吸入方法服用胰高血糖素样肽-1 分子的方法,一种通过吸入服用胰高血糖素样肽-1 分子治疗糖尿病的方法,以及一种通过吸入服用胰高血糖素样肽-1 分子治疗高血糖症的方法。

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



权 利 要 求 书

1. 一种服用胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 分子的方法, 包括通过肺吸装置给需要的患者服用有效量的选自下列一组的 GLP-1 分子: GLP-1、GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物。

5 2. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子被输送到患者的下呼吸道。μ

3. 如权利要求 2 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子沉积在肺泡中。

4. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是通过患者的口腔吸入的。

10 5. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是作为一种在可以药用的载体中含有 GLP-1 分子的药用制剂形式服用的。

6. 如权利要求 5 的方法, 其中, 所述制剂选自下列一组: 含水介质的溶液和无水介质的悬浮液。

7. 如权利要求 6 的方法, 其中, 所述制剂是作为气溶胶服用的。

15 8. 如权利要求 5 的方法, 其中, 所述制剂为干粉形式。

9. 如权利要求 5 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子的粒度小于大约 10 微米 MMAD。

10. 如权利要求 9 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子的粒度小于大约 1-大约 5 微米 MMAD。

20 11. 如权利要求 10 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子的粒度小于大约 2-大约 3 微米 MMAD。

12. 如权利要求 1 的方法, 其中, 至少大约 10%的被输送的 GLP-1 分子沉积在肺里。

25 13. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是用适于肺服用的吸入装置输送的, 并能够将 GLP-1 分子沉积在患者的肺里。

14. 如权利要求 13 的方法, 其中, 所述装置选自下列一组: 喷雾器、定量吸入器、干粉吸入器、和喷洒器。

15. 如权利要求 14 的方法, 其中, 所述装置是干粉吸入器。

30 16. 如权利要求 1 的方法, 其中, 所述 GLP-1 选自由 GLP-1 类似物和 GLP-1 衍生物构成的一组。

17. 如权利要求 16 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是 GLP-1 类似物。

18. 如权利要求 17 的方法, 其中, 所述 GLP-1 类似物选自下列一组: Val⁸-GLP-1 (7-37) OH、Gly⁸-GLP-1 (7-37) OH、Asp⁸-GLP-1 (7-37) OH.

19. 如权利要求 18 的方法, 其中, 所述 GLP-1 类似物是 Val⁸-GLP-1 (7-37) OH.

20. 如权利要求 18 的方法, 其中, 所述 GLP-1 类似物是 Gly⁸-GLP-1 (7-37) OH.

21. 一种治疗糖尿病的方法, 包括通过肺输送给需要治疗的患者服用有效剂量的 GLP-1 分子.

22. 如权利要求 21 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是在可以药用的载体中含有所述 GLP-1 分子的药用制剂形式服用的.

23. 如权利要求 21 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是 Val⁸-GLP-1 (7-37) OH.

24. 如权利要求 21 的方法, 其中, 所述 GLP-1 类似物是 Val⁸-GLP-1 (7-37) OH.

25. 如权利要求 21 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是用适于肺服用的吸入装置输送的, 并能够将 GLP-1 分子沉积在患者的肺里.

26. 如权利要求 25 的方法, 其中, 所述装置是喷雾剂式干粉吸入器.

27. 如权利要求 25 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大约 40 μg--大约 4000 μg GLP-1 分子.

28. 如权利要求 25 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大约 80 μg--大约 2000 μg GLP-1 分子.

29. 如权利要求 25 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大约 160 μg--大约 1000 μg GLP-1 分子.

30. 如权利要求 25 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大约 320 μg--大约 500 μg GLP-1 分子.

31. 一种治疗高血糖症的方法, 包括通过肺吸装置给需要治疗的患者服用有效剂量的 GLP-1 分子.

32. 如权利要求 31 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是在可以药用的载体中含有所述 GLP-1 分子的药用制剂形式服用的.

33. 如权利要求 31 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是 Val⁸-GLP-1

(7-37) OH.

34. 如权利要求 31 的方法, 其中, 所述 GLP-1 类似物是 Gly⁸-GLP-1
(7-37) OH.

5 35. 如权利要求 31 的方法, 其中, 所述 GLP-1 分子是用适于肺服
用的吸入装置输送的, 并能够将 GLP-1 分子沉积在患者的肺里。

36. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述装置选自下列一组: 喷洒
器和干粉吸入器。

37. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大
约 40 μg--大约 4000 μg GLP-1 分子。

10 38. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大
约 80 μg--大约 2000 μg GLP-1 分子。

39. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大
约 160 μg--大约 1000 μg GLP-1 分子。

15 40. 如权利要求 35 的方法, 其中, 所述装置启动一次可以服用大
约 320 μg--大约 500 μg GLP-1 分子。

说明书

服用促胰岛素肽的方法

本发明领域

5 本发明涉及治疗糖尿病和胰岛素抗性患者的方法。具体地讲，本发明涉及通过肺输送胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 及其类似物，以便通过肺进行系统性吸收，无需通过注射服用抗糖尿病化合物。

本发明背景

10 胰高血糖素样肽-1 最早是在 1987 年作为肠降血糖素激素鉴定的，它是在摄取食物之后由肠道分泌的一种肽。胰高血糖素样肽-1 是在对 160 个氨基酸的前体蛋白——前胰高血糖素原——进行蛋白酶解加工之后由肠道的 L 细胞分泌的。前胰高血糖素原的裂解首先产生活性较差的有 37 个氨基酸肽的胰高血糖素样肽-1。随后裂解残基 6 和 7 之间的肽键，得到了具有生物学活性的胰高血糖素样肽-1，被
15 称作 GLP-1 (7-37)。应当指出的是，本说明书采用围绕该激素形成的命名方法。本领域通常的做法是，将 GLP-1 (7-37) 的氨基末端编号为 7，而羧基末端编号为 37。在去掉末端甘氨酸残基之后，大约 80% 在 L 细胞中合成的 GLP-1 (7-37) 的 C-末端是酰胺化的。游离 GLP-1 (7-37) 和酰胺——GLP-1 (7-36) NH₂ 的生物学作用和代谢转化是
20 无法分辨的。在本文中，这两种天然存在的形式总称为 GLP-1。

已知 GLP-1 能刺激胰岛素分泌 (促胰岛素作用)，导致细胞摄取葡萄糖，由此降低血糖水平 (例如，参见 Mojsos, S., 国际肽蛋白研究杂志, 40: 333-343, 1992)。本领域中已知有多种 GLP-1 类似物和具有促胰岛素 (insulintropic) 作用的衍生物。还证实了 N-末端
25 的组氨酸残基 (His7) 对于 GLP-1 的促胰岛素活性来说是非常重要的 (Szuki, S., 糖尿病研究; 临床实践 5 (增卷 1): S30, 1988)。

多位作者已证实了实验室实验和哺乳动物，特别是人之间外源服用 GLP-1 对促胰岛素反应的关系。例如，参见 Nauck, M. A. 等，糖尿病学, 36: 741-744 (1993); Gutniak, M. 等，新英格兰医学杂志,
30 326 (20): 1316-1322 (1992); Nauck, M. A. 等，临床研究杂志 91: 301-307 (1993); 和 Thorens, B. 等，糖尿病, 42: 1219-1225 (1993)。

基于 GLP-1 的肽极有可能作为胰岛素治疗的替代物，治疗使用磺

酰脲治疗失败的糖尿病患者。学术研究人员业已对 GLP-1 进行了深入研究，该研究是为以下 II 型糖尿病患者建立的，这些患者在使用磺酰脲治疗时失败：

5 1) GLP-1 能刺激胰岛素分泌，但仅仅是在高血糖期间。由于 GLP-1 的这一特征以及有关胰岛素的分泌量与高血糖的程度呈正比的观察结果，使得 GLP-1 的安全性与胰岛素相比得到提高。另外，GLP-1 治疗会导致胰腺释放胰岛素，以及对肝脏的第一次通过的胰岛素的作用。与皮下注射胰岛素相比，这会导致在外周具有较低的胰岛素循环水平。

10 2) GLP-1 能抑制高血糖素分泌，而这再加上通过门静脉进行的胰岛素输送，有助于抑制糖尿病患者的过多的肝葡萄糖输出。

3) GLP-1 能延缓胃排空，这有利于延长营养物的吸收时间，降低饭后葡萄糖高峰。

15 4) 若干报导者业已提出，GLP-1 可以在诸如肌肉和脂肪的外周组织中提高胰岛素的敏感性。

5) 最后，业已证实 GLP-1 是潜在的食欲调节剂。

与胰岛素治疗相比，进餐时使用基于 GLP-1 的肽具有若干优点。胰岛素治疗需要血液葡萄糖监测，这样做既昂贵又痛苦。与胰岛素相比，依赖于葡萄糖的 GLP-1 提供了一种强化的治疗窗口，并且降低了
20 监测血液葡萄糖的必要性。强化胰岛素治疗的另一个问题是体重增加，这一问题在肥胖 II 型糖尿病患者身上表现的最为明显。

如果将天然 GLP-1 用于 I 型糖尿病患者，其治疗潜能可进一步加强。有多项研究业已证实了天然 GLP-1 在治疗胰岛素依赖型糖尿病方面的效果。与 II 型糖尿病患者相似，GLP-1 可通过其胰高血糖素抗性降低空腹高血糖症。其他的研究业已证实，GLP-1 还能降低 I 型糖尿病患者的饭后糖血移动，最有可能是通过推迟胃排空。以上发现表明，GLP-1 可用作 I 型和 II 型患者的治疗剂。
25

迄今为止，服用临床上证实过的肽激素和 GLP-1 一般是通过皮下注射完成的，这种方法既不方便又不完美。因此，许多研究者业已研
30 究了服用肽激素的其他途径，如口服、直肠、经皮和鼻腔途径。不过，到目前为止，这些服用途径尚未构成临床上得到认可的肽激素疗法。

多年来就已经知道，某些蛋白可以通过肺吸收。例如，通过吸入

气溶胶服用胰岛素是由 Gaensslen 在 1925 年第一次报导的。尽管多项人和动物研究业已证实某些胰岛素制剂可以通过肺吸收，但肽激素的肺输送并未得到有效应用，因为其生物可利用性极低。诸如细胞因子和生长因子的通常超过 150 个氨基酸残基的较大的蛋白，通常有利于通过肺的肺泡区的衬里细胞吸收。不过，较小蛋白的肺吸收更难以预测；尽管业已报导了胰岛素（51 个残基）、降钙素（32 个残基）和甲状旁腺激素（34 个残基）能通过肺途径系统地吸收。参见被收作本文参考文献的 US5,607,915。尽管肺可以系统地吸收某些小的蛋白激素，但与肺输送肽相关的药效学是不可预测的。

10 因此，有必要提供一种肺输送 GLP-1 及其相关类似物的可靠方法，因为它可以为患者提供一种替代胰岛素的诱人的、非侵害性的方案。这一需要的特别现实之处在于，胰岛素具有很窄的治疗指数，而 GLP-1 治疗能提供一种仅应答高血糖症状。血液葡萄糖正常化的途径，而没有高血糖症的威胁。

15 不是所有的蛋白激素都可以通过肺有效地吸收，并且，存在影响肺吸收的很多因素。肺对蛋白的吸收，在很大程度上取决于蛋白的物理特征。因此，尽管业已观察到可以通过肺输送某些蛋白激素，但 GLP-1 及某些相关肽的物理特性和短的长度使得人们不清楚所述肽是否能够通过肺途径有效输送。

20 有效的肺输送取决于将蛋白输送到生成肺泡上皮细胞的能力。沉积在呼吸道上皮上的蛋白颗粒被吸收的程度降低，因为其表面的粘液起到截留作用，然后通过粘液转运将碎片从呼吸道上清除。这一机制也是生物可利用性低的主要原因。上述途径中，蛋白不被吸收而是被清除的程度取决于其溶解度，其大小以及其他在很大程度上尚未鉴定的机制。

25 即使一种肽激素能够可再现地输送到深层肺泡上皮中，仍然难以预测它是否能快速吸收并转移到血液中。业已计算出了某些蛋白通过肺输送的吸收值，并且，在甲状旁腺激素（1-34）的 15 分钟到糖基化 α 1-抗胰蛋白酶的 48 小时范围内波动。另外，在肺中存在多种内源肽酶，它能在吸收之前降解肽。因此，溶解并吸收一种肽颗粒所需要的时间越长，它被酶促失活的可能性就越大。因此，由于 GLP-1 的体积较小，及其所固有的易受某些酶作用的特征，有关气溶胶化的

GLP-1 类似物能可再现地并且有效地通过肺输送的发现是十分惊人的。

本发明概述

5 本发明涉及一种服用胰高血糖素样肽-1 分子的方法，包括通过肺输送给需要这种肽的患者服用有效量的所述肽。本发明还涉及一种治疗糖尿病的方法，包括通过肺输送给需要治疗的患者服用有效剂量的胰高血糖素样肽-1。本发明的另一方面涉及一种治疗高血糖症的方法，包括通过肺输送给需要治疗的患者服用有效剂量的胰高血糖素样肽-1。优选地，所述胰高血糖素样肽-1 分子是通过吸入方法输送的，
10 并且输送到患者的下呼吸道。

胰高血糖素样肽-1 可以存在于载体中，作为溶液或悬浮液或干粉用适用于吸入服用的多种装置中的一种输送。优选地，胰高血糖素样肽-1 是以能有效到达肺的下呼吸道的粒度输送的。

本发明详细说明

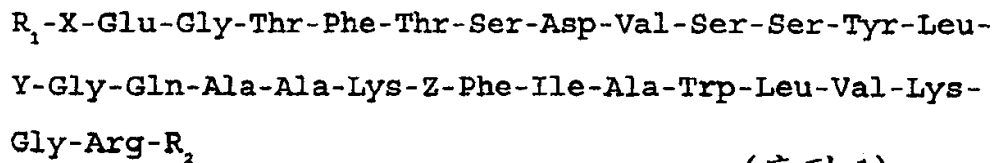
15 术语“GLP-1”是指胰高血糖素样肽-1，其序列和结构在本领域中是公知的。参见被收作本文参考文献的 US5,120,712。如上文所述，存在两种天然形式的人 GLP-1——GLP-1(7-37) 和 GLP-1(7-36) NH₂ 仅在必要时对二者加以区分。

20 术语“GLP-1 类似物”被定义为与 GLP-1 相比，具有一个或多个氨基酸取代、缺失、倒位或添加的分子。本领域已知多种 GLP-1 类似物，并且，包括，例如，GLP-1(7-34)，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) 和 Lys¹⁸-GLP-1(7-37)。优选的 GLP-1 类似物是 GLP-1(7-34) 和 GLP-1(7-35)，这些类似物披露于被
25 收作本文参考文献的 US5,118,666 中。

30 术语“GLP-1 衍生物”被定义为具有 GLP-1 或 GLP-1 类似物的氨基酸序列，并且在其氨基酸侧面基团， α -碳原子，末端氨基，或末端羧酸基团上具有一种或多种化学修饰的分子。化学修饰包括，但不限于添加化学部分，形成新的键，和去掉化学部分。在氨基酸侧链基团上的修饰包括，但不限于赖氨酸- ϵ -氨基的酰化，精氨酸、组氨酸或赖氨酸的 N-烷基化，谷氨酸或天冬氨酸羧酸基团的烷基化，以及谷氨酰胺或天冬酰胺的脱酰胺化。末端氨基的修饰包括，但不限于脱

氨、N-低级烷基、N-二-低级烷基、和N-酰基修饰。末端羧基的修饰包括，但不限于酰胺、低级烷基酰胺、二氨基酰胺、和低级烷基酯修饰。低级烷基是C1-C4烷基。另外，可以用蛋白质化学领域普通技术人员所公知的保护基团保护末端基团。氨基酸的 α -碳原子可以是一-或二-甲基化。

术语“GLP-1分子”表示GLP-1、GLP-1类似物或GLP-1衍生物。GLP-1类似物的其他优选基团由下面的结构式定义：



(序列 1)

及其可以药用的盐，其中： R_1 选自下列一组：L-组氨酸、D-组氨酸、脱氧-组氨酸、2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸、 α -氟甲基组氨酸、和 α -甲基-组氨酸；X选自下列一组：Ala、Gly、Val、Thr、Ile、和 α -甲基-Ala；Y选自下列一组：Glu、Gln、Ala、Thr、Ser和Gly；Z选自下列一组：Glu、Gln、Ala、Thr、Ser和Gly；而 R_2 选自下列一组：NH₂和Gly-OH；其前提是，当 R_1 是His、X是Ala、Y是Glu、而Z是Glu时， R_2 必须是NH₂。

与本发明一致的化合物的其他优选基团披露于W091/11457 (US5,545,618, 被收作本文参考文献)中，并且，主要包括GLP-1 (7-34)、GLP-1 (7-35)、GLP-1 (7-36)、或GLP-1 (7-37)、或其酰胺形式及其可以药用的盐，并具有选自下列一组的至少一种修饰：

(a) 用甘氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、或D-赖氨酸取代26位和/或34位上的赖氨酸；或者用甘氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或D-精氨酸取代36位上的精氨酸；

(b) 用一种抗氧化的氨基酸取代31位上的色氨酸；

(c) 至少进行下列一种取代：用酪氨酸取代16位上的缬氨酸；用赖氨酸取代18位上的丝氨酸；用天冬氨酸取代21位上的谷氨酸；

用丝氨酸取代 22 位上的甘氨酸；用精氨酸取代 23 位上的谷氨酰胺；用精氨酸取代 24 位上的丙氨酸；以及用谷氨酰胺取代 26 位上的赖氨酸；和

(d) 进行至少下列一种取代：用甘氨酸、丝氨酸、或半胱氨酸取代 8 位上的丙氨酸；用天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、或苯丙氨酸取代 9 位上的谷氨酸；用丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸或苯丙氨酸取代 10 位上的甘氨酸；以及用谷氨酸取代 15 位上的天冬氨酸；和

(e) 用甘氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸或苯丙氨酸或 D-或 N-酰化或烷基化形式的组胺酸取代 7 位上的组胺酸，其中，在 (a)、(b)、(d) 和 (e) 的取代中，被取代的氨基酸可以选择性地为 D-形式，而在 7 位上被取代的氨基酸可以选择性地为 N-酰化或 N-烷基化形式。

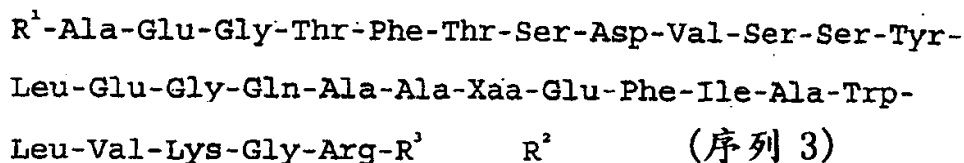
由于所述酶——二肽基-肽酶 IV (DPP IV) 有可能决定所观察到的服用的 GLP-1 的快速失活 [例如，参见 Mentlein, R. 等，欧洲生物化学杂志，214: 829-835 (1993)]，优选服用能免受 DPP IV 活性的作用的 GLP-1 类似物和衍生物，更优选服用 Gly⁸-GLP-1 (7-36) NH₂、Val⁸-GLP-1 (7-37) OH, α-甲基-Ala-GLP-1 (7-36) NH₂、和 Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37) OH 或其可以药用的盐。

优选将 US5,188,666 (被收作本文参考文献) 中要求保护的分子用于本发明。所述分子选自由具有以下氨基酸序列的肽组成的一组：

25 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
(序列 2)

其中 X 选自下列一组：Lys 和 Lys-Gly；以及所述肽的衍生物，其中所述肽选自下列一组：所述肽的可以药用的酸加成盐；所述肽的可以药用的羧化盐；所述肽的可以药用的低级烷基酯；以及选自下列一组的所述肽的可以药用的酰胺：酰胺、低级烷基酰胺和低级二烷基酰胺。

用于本发明的另一种优选类型的分子包括披露于被收作本文参考文献的 US5, 512, 549 中的具有以下通式的化合物:



及其可以药用的盐, 其中 R_1 选自下列一组: 4-咪唑丙酰、4-咪唑乙酰、或 4-咪唑-a, a 二甲基-乙酰; R_2 选自下列一组: C_6-C_{10} 无分支的酰基或是不存在; R_3 选自下列一组: Gly-OH 和 NH_2 ; 而 Xaa 是 Lys 或 Arg, 可将其用于本发明中。

10 用于本发明的序列 3 的更优选的化合物是这样的化合物, 其中, Xaa 是 Arg, 而 R_2 是 C_6-C_{10} 无分支的酰基。

用于本发明的序列 3 的高度优选的化合物是这样的化合物, 其中, Xaa 是 Arg, 而 R_2 是 C_6-C_{10} 无分支的酰基, 而 R_3 是 Gly-OH。

15 用于本发明的序列 3 的更优选的化合物是这样的化合物, 其中, Xaa 是 Arg, 而 R_2 是 C_6-C_{10} 无分支的酰基, 而 R_3 是 Gly-OH, 而 R_1 是 4-咪唑丙酰。

用于本发明的序列 3 的最优选的化合物是这样的化合物, 其中, Xaa 是 Arg, 而 R_2 是 C_8 无分支酰基, 而 R_3 是 Gly-OH, 而 R_1 是 4-咪唑丙酰。

20 将被收作本文参考文献的 US5, 705, 483 中要求保护的 Val⁸-GLP-1 (7-37) OH 或其可以药用的盐用于本发明是高度优选的。

25 用来制备用于本发明的 GLP-1、GLP-1 类似物、或 GLP-1 衍生物的方法在本领域中是众所周知的, 并容易为普通的蛋白质化学家或生物化学家所掌握。用于本发明的所述活性化合物的氨基酸部分或其前体, 可以通过固相合成化合法制备、从天然资源中纯化 GLP-1 分子或重组 DNA 技术制备。常规的有机合成技术可以对 GLP-1 进行烷基化和酰化。

术语“GLP-1 相关的化合物”是指落入 GLP-1、GLP-1 类似物或 GLP-1 衍生物定义范围内的所有化合物。

30 术语“防腐剂”是指添加到药用制剂中起到抗微生物剂的作用的化合物。肠胃外使用的制剂必须满足商业上有效的多用途制品的防腐剂有效的标准。本领域已知的可用于肠胃外制剂的有效的防腐剂有苯

扎氯铵、苄索铵、氯己啶、苯酚、间-甲酚、苯甲醇、羟苯甲酯、三氯叔丁醇、邻-甲酚、对-甲酚、氯甲酚、硝酸苯汞、硫柳汞、苯甲酸、及其各种混合物。例如，参见 Wallhauser, K., Develop. Biol. Standard, 24: 9-28 (Basel, S. Krager, 1974)。

5 术语“缓冲物”或“可以药用的缓冲物”是指已知用于蛋白质制剂中是安全的并且具有将该制剂的 pH 值控制在理想水平上的作用的化合物。例如，用于将 pH 控制在中等酸性 pH 值到中等碱性 pH 值的可以药用的缓冲物，包括诸如磷酸、乙酸、柠檬酸、Tris、精氨酸、或组氨酸的化合物。

10 术语“等渗剂”是指生理学上可以承受的并且能赋予一种制剂合适的渗透压，以防止水通过细胞膜发生净流动的化合物。诸如甘油的化合物通常以已知浓度用于上述目的。优选将 US5, 188, 666 (被收作本文参考文献) 中要求保护的分子用于本发明。所述分子选自由具有以下氨基酸序列的肽组成的一组：

15 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
(序列 2)

20 其中 X 选自下列一组：Lys 和 Lys-Gly；以及所述肽的衍生物，其中所述肽选自下列一组：所述肽的可以药用的酸加成盐；所述肽的可以药用的羧化盐；所述肽的可以药用的低级烷基酯；以及选自下列一组的所述肽的可以药用的酰胺：酰胺、低级烷基酰胺和低级二烷基酰胺。

用于本发明的另一种优选类型的分子包括披露于被收作本文参考文献的 US5, 512, 549 中的具有以下通式的化合物：

25 R¹-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-
Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R³
 R²
(序列 3)

30 及其可以药用的盐，其中 R₁ 选自下列一组：4-咪唑丙酰、4-咪唑乙酰、或 4-咪唑-a, a 二甲基-乙酰；R₂ 选自下列一组：C₆-C₁₀ 无分支的酰基或是不存在；R₃ 选自下列一组：Gly-OH 和 NH₂；而 Xaa 是 Lys 或 Arg，可将其用于本发明中。

* (与前文不连续) 当具有类似的粒度和类似的肺沉积水平时, 不同的吸入装置通常能产生类似的药物动力学。

根据本发明, GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物可以通过本领域已知的用于通过吸入服用治疗剂的多种吸入装置中的任一种输送。所述装置包括定量吸入器、喷雾器、干粉吸入器、喷洒器等。优选地, GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物是通过干粉吸入器或喷洒器输送的。用于服用 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的吸入装置具有若干理想特征。例如, 通过所述吸入装置输送是非常可靠的、可再现的、并且准确的。所述吸入装置应当输送小的颗粒, 例如, 低于大约 10 微米的质量中等空气动力学直径 (MMAD), 优选大约 1-5 微米 (MMAD), 以利于呼吸。适用于本发明实践的、市场上现有的吸入装置或近期开发的装置有 Turbohaler™ (Astra)、Rotahaler® (Glaxo)、Diskus® (Glaxo)、Spiros™ 吸入器 (Dura), 由 Inhale Therapeutics 开发的装置, AERx™ (Aradigm), Ultravent® 喷雾器 (Mallinckrodt), Acorn II® 喷雾器 (Marquest Medical 产品), Ventolin® 定量吸入器 (Glaxo), Spinhaler® 粉末吸入器 (Fisons) 等。

正如本领域技术人员能够理解的, GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的剂型、该剂型的输送量、以及服用单一剂量的持续时间, 取决于所使用的吸入装置的类型。对于诸如喷雾器的某些气溶胶输入系统来说, 使用该系统的服用频率和时间主要取决于 GLP-1 分子在该气溶胶中的浓度, 例如, 在喷雾溶液中具有较高浓度的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物可以较短的时间服用。诸如定量吸入器的装置可以产生较高的气溶胶浓度, 并可以用较短的时间输送所需数量的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物。诸如粉末吸入器的装置输送活性剂, 直到特定量的活性剂被从该装置中排出。在这种类型的吸入器中, 存在于特定量的粉末中的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的量决定了在一次服用中输送的剂量。

通过吸入装置输送的所述制剂中 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的粒度, 对于蛋白在肺, 特别是在下呼吸道或肺泡中的沉积能力来说是重要的。优选将 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物制备成至少被输送的大约 10% 的肽能沉积在肺中, 优选大约 10%-大约 20% 或更高。已知用嘴吸气的人在服用大约 2 微米-大约 3 微米 MMAD 的粒度时获得了最

大的肺沉积效率。当粒度超过大约 5 微米 MMAD 时，肺沉积明显降低。低于大约 1 微米 MMAD 的粒度会导致肺沉积降低，并且难于输送具有足够治疗效力的量的颗粒。因此，通过吸入输送的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的颗粒的粒度，优选低于大约 10 微米 MMAD，更优选在大约 1-大约 5 微米 MMAD 的范围内，最优选在大约 2-大约 3 微米 MMAD 的范围内。选择 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂，以便在所选择的吸入装置中产生所需要的粒度。

为了作为干粉服用，优选将 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物制备成颗粒形式，使得喷射的粒度小于大约 10 微米 MMAD，优选大约 1-大约 5 微米 MMAD，最优选大约 2-大约 3 微米 MMAD。优选的粒度能有效输送到患者肺的肺泡中。所述干粉优选主要由所产生的颗粒组成，以便所述颗粒的主要部分具有理想范围的大小。理想的是，至少大约 50% 的干粉是由直径小于大约 10 微米 MMAD 的颗粒组成。所述制剂可以通过对含有颗粒状 GLP-1 分子及其他所需成分的溶液进行喷雾干燥、研磨、或临界点凝聚获得。同样适用于制备用于本发明中的颗粒的其他方法在本领域中是公知。

所述颗粒通常是从装在一个容器中的干粉制剂分离的，然后通过运载空气流转移到患者的肺中。通常，在现有的干粉吸入器中，用于分散固体的力仅仅是由患者的吸气提供的。合适的干粉吸入器是 Astra (Sodertalje, 瑞典) 生产的 Turbohaler™。在另一种类型的吸入器中，由患者吸气所产生的空气流启动一个推进马达，由它分散 GLP-1 分子颗粒。Dura Spiros™ 吸入器就是这样一种装置。

用于通过干粉吸入器服用的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂，通常包括含有肽的细碎的干粉，不过该干粉还可以含有一种蓬松剂、载体、赋形剂、另一种添加剂等。可将添加剂加入 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的干粉制剂中，以便(例如)根据需要稀释所述干粉，从而通过颗粒干粉吸入器输送，有利于该制剂的加工，使该制剂具有理想的粉末特性，有利于该粉末从吸入装置中分散，稳定该制剂(例如，抗氧化剂或缓冲剂)，使该制剂具有好的口感等。所述添加剂优选不会对患者的呼吸道产生不利影响。GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物可以与添加剂在分子水平上混合，或者固体制剂中可以包括与添加剂颗粒混合的肽颗粒或者将肽颗粒包在添加剂颗粒上。常用的添加剂

包括一糖、二糖和多糖；糖醇及其他多元醇，如乳糖、葡萄糖、棉籽糖、松三糖、乳糖醇、麦芽糖醇、海藻糖、蔗糖、甘露糖醇、淀粉或其组合；表面活性剂，如山梨糖醇、二磷酸酰胆碱、或卵磷脂等。通常，诸如蓬松剂的添加剂能实现上述目的的使用量，通常为占该制剂重量的大约 50%-大约 90%。还可将本领域已知可用于制备蛋白的其他试剂加入所述制剂中。

在本发明的另一方面，可以通过以下方法产生含有 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的雾气：在加压条件下强制所述肽的悬浮液或溶液通过一个喷头。可以对喷头的大小和形状、所施加的压力、以及液体输送速度加以选择，以便获得所需要的输出量和粒度。可以产生电力喷雾，例如，通过将一个电场与毛细管或喷头输送装置连接。理想的是，通过喷雾器输送的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的推进物所具有的吸入液滴体积，小于大约 10 微米 MMAD，优选在大约 1-大约 5 微米 MMAD，最优选在大约 2-大约 3 微米 MMAD 范围内。

适用于喷雾器的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂，通常为每毫升溶液含有大约 1 毫克至大约 20 毫克所述肽。所述制剂可以含有诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂和金属阳离子的试剂。所述制剂还可以含有一种赋形剂或用于稳定所述肽的试剂，如缓冲剂、还原剂、蓬松蛋白或糖。用于配制 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的常用的蓬松蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白、等用于配制 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的常用的糖包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、或葡萄糖等。GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂还可以含有表面活性剂，这种表面活性剂能够减弱或避免表面诱导的肽的聚集，这种聚集是在形成气溶胶的过程中由于溶液的雾化而导致的。可以采用多种常见表面活性剂，如聚氧化乙烯脂肪酸酯和醇以及聚氧化乙烯山梨醇脂肪酸酯。其用量通常占该制剂重量的 0.001-4%。还可以使用诸如二磷脂酰胆碱或卵磷脂的其他表面活性剂。适用于本发明目的的特别优选的表面活性剂是聚氧化乙烯山梨聚糖单油酸酯，polysorbate80、或 polysorbate20 等。在所述制剂中还可以添加本领域公知的用于制备蛋白的其他试剂。

可以通过诸如喷射喷雾器或超声波喷雾器的喷雾器的服用 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物。通常，在喷射喷雾器上使用一个压缩空气

源，通过一个出口产生高速空气射流。当气体在喷头外面膨胀时，形成一个低压区，该低压区通过一个连接在液体容器上的毛细管吸出所述肽的溶液。来自所述毛细管的液体流，在它离开该毛细管时被剪切成不稳定的丝和液滴，形成气溶胶。可以使用多种类型的结构、流速、和调节板，以便由特定的喷射喷雾器获得所需要的性能特征。在超声波喷雾器中，使用高频电能产生振动的机械能，通常使用一个压电换能器。该能量被直接或通过一种连接液体传递给所述肽制剂，产生气溶胶。通过喷雾器输送的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的液滴的粒度小于大约 10 微米 MMAD，优选在大约 1-大约 5 微米 MMAD 范围内，
5 10 最优选在大约 2-大约 3 微米 MMAD 范围内。

适用于喷射喷雾器或超声波喷雾器的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂通常包括所述肽的水溶液，其浓度每毫升溶液大约 1-大约 20 毫克。该制剂可以含有诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂和二价金属阳离子的试剂。所述制剂还可以含有一种赋形剂或用于稳定所述肽的试剂，如缓冲剂、还原剂、蓬松蛋白或糖。用于配制 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的蓬松蛋白包括白蛋白、或鱼精蛋白等。用于配制 GLP-1 相关蛋白的常用的糖包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、或葡萄糖等。GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂还可以含有表面活性剂，该表面活性剂能减弱或避免在表面诱导的肽聚集，这种聚集是在形成气溶胶的过程中由溶液的雾化导致的。可以采用各种常用的表面活性剂，如聚氧化乙烯脂肪酸酯和醇以及聚氧化乙烯山梨聚糖脂肪酸酯。其用量通常占该制剂重量的 0.001-4%。还可以使用诸如磷脂酰胆碱或卵磷脂的其他表面活性剂。适用于本发明目的的特别优选的表面活性剂是聚氧化乙烯山梨聚糖单油酸酯、polysorbate80、或 polysorbate20 等。在所述制剂中还可以添加本领域已知的用于制备诸如 GLP-1 相关分子的蛋白的其他试剂。
15 20 25

本发明的另一方面涉及一种定量吸入器 (MDI)。在该实施方案中，将一种推进剂、GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物、以及任何赋形剂或其他添加剂以一种含有液化压缩气体的混合物形式装在金属罐中。启动定量阀，可以气溶胶形式释放出所述混合物，优选含有体积小于 10 微米 MMAD 的吸入颗粒，优选大约 1-大约 5 微米 MMAD，最优选大约 2-大约 3 微米 MMAD。通过由本领域技术人员所知的多种方法
30

产生的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂，可以获得所需要的气溶胶粒度，所述方法包括喷射研磨、喷雾干燥、或临界点凝聚。优选的定量吸入器包括 3M 或 Glaxo 生产的吸入器，并且采用一种氟化烃推进剂。

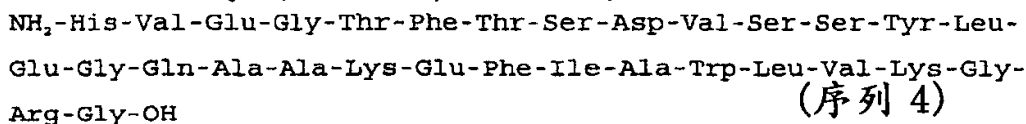
5 用于定量吸入器装置的 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的制剂通常包括含有肽的细碎的粉末，它以悬浮液形式存在于无水介质中，例如，在表面活性剂的帮助下悬浮在推进剂中。所述推进剂可以是用于该目的的任何常见材料，如含氯氟烃、氢氯氟碳化合物、氢氟碳化合物、或烃，包括三氯氟代甲烷、二氯二氟代甲烷、二氯四氟代乙醇和
10 1, 1, 1, 2-四氟代乙烷，HFA-134a (氟化烷烃 134a)、HFA-227 (氟化烷烃-227) 等。所述推进剂优选为氢氟碳化合物。可以选择表面活性剂以便在所述推进剂中的悬浮液形式稳定 GLP-1 分子，保护所述表面活性剂免受化学降解等。合适的表面活性剂包括山梨聚糖三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在某些场合下，溶液气溶胶优选使用诸如乙醇的溶剂。还可以使用诸如二磷脂酰胆碱或卵磷脂的其他表面活性剂。
15 在所述制剂还可以添加本领域已知用于配制蛋白的其他试剂。

本发明还涉及一种适于通过吸入服用的含有 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物的药用组合物或制剂。根据本发明，可将 GLP-1 和 GLP-1 类似物及衍生物用于生产适于通过吸入服用的制剂或药品。本发明还
20 涉及用于生产含有 GLP-1 相关分子、适于通过吸入服用的形式的制剂的方法，例如，可以用常规方法通过若干途径生产干粉制剂。可以通过雾化、喷雾干燥等产生适于在下呼吸道有最大沉积量的大小的颗粒。可以通过将所述肽溶解在诸如水的适当 pH 的合适的溶剂中生产液体制剂，该制剂含有缓冲剂或其他赋形剂。

25 通过下面的实施例可以更好地理解本发明。这些实施例是用来说明本发明的特定实施方案的，而不是要限定本发明的范围。

实施例

在通过肺服用之后，Val⁸-GLP-1 在 Beagle 犬体内的血清动力学
用常规重组 DNA 技术在大肠杆菌中制备 GLP-1 类似物 Val⁸-GLP-
30 1 (7-37) OH (序列 4)，并纯化至均化。



5 让 6 只一组的雌性 Beagle 犬吸入 Val⁸-GLP-1 15 分钟，平均气溶胶浓度为 77.2 μg/升，是由 Val⁸-GLP-1 在无菌水中的溶液产生的。在吸入处理之后大约 1 周以后，通过皮下注射给所述动物服用 100 μg/Kg 的剂量。在吸入处理之前和期间，监测潮气量、呼吸速度、和分钟量。采集血样，以便分析在吸入和皮下服用之后各个时间点上血浆 Val⁸-GLP-1 的含量。在处理之后大约 4 小时，采集支气管肺泡灌洗液 (BAL)，并分析 LDH 总蛋白、细胞数、和白细胞分类。

10 Val⁸-GLP-1 的输送能很好地承受 1198 μg/Kg 的吸入剂量，并且估计的肺沉积剂量为 240 μg/Kg。所有动物也都能很好地耐受皮下服用 100 μg/Kg。Val⁸-GLP-1 的吸入和皮下服用是用制备的材料输送的。

15 没有与治疗相关的临床表现；体重没有受到 Val⁸-GLP-1 的不利影响。仅观察到对肺的很小的影响。在为期 15 分钟的吸入处理期间，观察到潮气量和分钟量的增加，但有关数据的波动性很大。没有发现 LDH、红血细胞数、白血细胞数、嗜中性白细胞、淋巴细胞、嗜伊红性粒细胞、上皮细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞或单核细胞的改变。在气溶胶输送 Val⁸-GLP-1 之后，总蛋白有小的增加。

20 来自这一研究的结果表明，与皮下服用相比，通过吸入将 Val⁸-GLP-1 输送到 Beagle 犬的肺部，具有很好的生物可利用性 (40%，以 AUC 为基础)。在吸入至多 15 分钟的时间之后，对 Val⁸-GLP-1 具有很好的耐受性，在 1198 μg/Kg 的平均吸入剂量下，对肺只有很小的影响。在该研究中，这种影响是一种不能观察到的不利影响水平 (NOAEL)。

25 制备剂量溶液

30 在用药当天，在无菌水中制备浓度为 0.5 毫克/毫升或 8 毫克/毫升的分别用于皮下服用和肺服用的 Val⁸-GLP-1 溶液。在活性周期的最后制备另一种 Val⁸-GLP-1 溶液 (8 毫克/毫升)，以便确定气溶胶化的 Val⁸-GLP-1 的粒度分布。通过一个低蛋白结合 0.22 微米的金属罐过滤器过滤该溶液。用氢氧化钠溶液将该溶液的 pH 调整到 7.47。

试验动物

在该研究中使用 6 只雌性 Beagle 犬 (Marshall 农场, North Rose, NY)。通过记录在饲养笼标牌上的 5 位数动物编号和 7 位数纹身 (位于耳朵里面) 编号识别每一只动物。在开始该研究之前, 将所
5 有动物拴在饲养皮带上。在该研究开始时所述动物的体重为 8.4-11.1kg。在该研究开始时所述动物的年龄 33-37 周。

饲养动物的圈养和护理

将动物成对地圈养在不锈钢笼子中, 在处理当天例外。在处理当天, 对每一只动物进行单独圈养, 以便监测其进食方案。对房间进行
10 恒温调节, 以便温度保持在 70°F 下, 并将实际温度保持在与设定值相差 $\pm 8^\circ\text{F}$ 范围内。设计环境控制系统, 以便保持 20% 的相对湿度, 最大相对湿度为 80%。进行 12 小时的光照循环, 光照时间为上午 6 点到下午 6 点。然后, 在下午 6 点到第二天上午 6 点之间停止光照, 在采集血样时例外。每天用 Hill's 科学饮食喂动物一次。在处理之
15 前, 让动物禁食大约 12 小时。可以自由饮用自来水, 在处理期间例外。

处理组和研究时间

用气溶胶化的 Val⁸-GLP-1 处理所有 6 只动物 15 分钟。Val⁸-GLP-1 处理的肺的目标沉积剂量为每公斤体重 200 μg 。在肺服用 Val⁸-GLP-1
20 之后大约 7 天, 通过皮下服用给所有的狗使用剂量为每公斤体重 100 μg 的 Val⁸-GLP-1。

处理系统

狗站立, 拴在带子上进行试验。将两层 0.03 英寸的胶乳层放在动物脖子周围, 以便形成非限制性的气密性密封。将类似于 Allen
25 等 (J Appl Toxicol 1995; 15: 13-17) 所披露的装置的专用结构——11-L 头盔套在狗的头上, 并固定在所述拴狗带上。通过位于所述头盔排气一侧的传导装置 (transvector) 呼吸气流。由于所述头盔是气密性的, 并且其脖子是密封性的, 这样能构成一种仅仅是针对头部的接触系统。通过所述头盔的总的流量为大约 7.5 升/分钟。

气溶胶产生

气溶胶是使用 Respirgard II 喷雾器, 以大约 6.5 升/分钟的输入量产生的。来自所述发生器的输出物直接流入所述头盔。

环境浓度取样

用于总的重量浓度分析的所有取样，是用装有 A/E 型玻璃纤维滤膜的联机过滤装置进行的（Gelman 仪器公司，Ann Arbor, MI）。从所述腔室中进行滤膜取样，是以 1 升/分钟的额定取样速度进行的，
5 用一台便携式质量空气流校正器校正的（8300, Sierra 仪器, Carmel Valley, CA）。取样时间为 15 分钟。粒度分析是用 Sierra218K 型 Ambient Cascade Impactor（Anderson Samplers 公司，亚特兰大，GA）进行的。从所述腔室中进行级联取样是以 3 升/分钟的额定取样速度进行的，用一台便携式质量空气流校正器校正（8300, Sierra
10 仪器, Carmel Valley, CA），取样时间为 31 分钟。在重新称重之前让滤膜干燥大约 30 分钟。

剂量确定

在 15 分钟处理时间内吸入的 Val⁸-GLP-1 的剂量是按以下方法估算的：用在 15 分钟处理期间的平均分钟量（毫升）乘以处理时间，
15 以便得到在该吸入处理期间所呼吸的总的空气（升）。用该值乘以气溶胶浓度（ $\mu\text{g}/\text{升}$ ），以便确定总的剂量（毫克）。吸入剂量（ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ）是通过用总剂量（ μg ）除以动物的体重（Kg）计算出来的。

沉积在肺里的 Val⁸-GLP-1 的剂量是按以下方法估算的：吸入剂量（ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ）乘以 20%，得到估算的肺沉积剂量（ $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ）。MMEAD
20 为 1-2 微米 MMAD 的气溶胶，在肺中表现出的沉积效率大约为 20%（Schlesinger RB, 1985, 吸入气溶胶在试验动物和人体内沉积的比较：综述。J Toxicol Environ Health 15:197-214）。

肺功能

在第-5、0、和 7 天对所有动物称重。用一台‘0’大小的连接在
25 所述头盔上的一个出口上的呼吸速度描记器监测呼吸模式（潮气量，呼吸频率，以及分钟量）。用一台个人电脑，使用 Buxco XA 数据获取系统（Buxco 电子公司，Sharon, CT）收集信号。在处理开始之前，收集至少 15 分钟的处理前数据，然后在 15 分钟的处理时间内收集数据。所有数据都是以 5 分钟的平均值分析的。

支气管肺泡灌洗

30 在每一次用药方案之后大约 4 小时，进行支气管肺泡灌洗（BAL）。在 BAL 处理之前，通过静脉注射 2% 的 Brevital 将所述动

物麻醉。支气管肺泡灌洗是用儿科纤维光学支气管镜(Olympus, Model BF, 10 型, Lake Success, NY) 完成的。将支气管镜的镜头插入肺下叶的呼吸道的第 5 至第 7 节。在右侧和左侧肺叶之间交替进行 BAL。滴入两个 10 毫升的等分试样, 并轻轻地吸出。将回收到的灌洗液 5 的等分试样用于测定总的白细胞数、总的红细胞数、白细胞分类、总蛋白、和乳酸脱氢酶。

细胞数量和分类

用 Technicon H1 系统 (Technicon 仪器公司) 测定未浓缩的 BAL 液体的全血计数。通过显微镜估算 200Wright 染色细胞, 测定 BAL 10 的细胞分类。

血液采集

为了分析 Val⁸-GLP-1 的血浆动力学, 在处理之前以及在处理之后 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8 和 12 小时将大约 2-3 毫升血样采集到 EDTA 真空容器管中。为了获得血浆, 在 10℃ 下以大约 3000rpm 15 的速度将每一只试管离心 10 分钟。将血浆样品放在 -70℃ 下保存, 直到送去分析。

处理浓度/粒度和肺剂量

每一只狗用 Val⁸-GLP-1 处理的平均处理浓度为 64.0-101.3 μg/升。所有动物的平均 (±SD) 浓度为 77.2 ± 16.9 μg/升。以质量中等等同的空气动力学直径 (MMAD) 衡量的粒度为 0.91 微米, 几何标准误差 (GSD) 为 2.37。 20

计算出的在 6 只用 Val⁸-GLP-1 处理的狗的肺中的 Val⁸-GLP-1 的沉积剂量为 240 ± 42 μg/Kg (平均值 ± SD)。平均吸入剂量 (就是进入呼吸道的剂量, 而不管是否沉积) 为 1198 ± 208 μg/Kg (平均值 ± 25 SD), 每一只动物的数据在下面的表中给出。

用 Val⁸-GLP-1 气溶胶处理的动物的估计的肺剂量

动物编号	气溶胶浓度 ($\mu\text{g/L}$)	平均分钟量 (ml)	肺吸入剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	肺沉积剂量 ($\mu\text{g/kg}$)
27682	0.07717*	8406	1060	212
27684	0.07717*	9563	1030	206
27685	0.10133	7260	1350	270
27686	0.06400	12733	1360	272
27687	0.06733	9214	950	190
27689	0.07600	11890	1400	288

*没有测定动物 27682 和 27684 的气溶胶浓度，因此，将平均气溶胶浓度用于计算估计的吸入肺剂量 ($\mu\text{g/Kg}$)。

- 5 在所述处理期间，未观察到体重的明显改变。起始体重（第-5天）和最终的体重（第7天）分别为 9.5 ± 0.9 （平均值 \pm SD; $n=6$ ）和 $9.7 \pm 0.9\text{Kg}$ 。观察到了呼吸频率的明显改变。测定到了潮气量和分钟量的小的增加，但有关数据是高度波动的，这可能是由于在研究开始之前的适应时间较短。每一只动物的数据在下面的表中示出。

10

在接触 Val⁸-GLP-1 期间肺功能的改变

动物 编号	潮气量 (ml)			呼吸频率 (bpm)			分钟量 (ml/分钟)		
	5*	10*	15*	5*	10*	15*	5*	10*	15*
27682	119.0	152.1	105.1	74	86.0	95.7	7265	9360	8592
27684	104.6	99.4	100.8	119.2	118.2	108.7	10300	9117	9272
27685	165.9	178.5	209.6	58.1	49.4	42.5	7938	7465	6377
27686	325.1	586.2	374.4	56.3	33.8	59.4	12200	13300	12700
27687	245.9	221.6	183.1	39.5	45.5	50.5	9288	9573	8781
27689	184.5	367.6	454.0	39.8	46.8	33.3	7271	13400	15000
平均值	190.8	267.6	237.8	64.6	63.3	65.0	9044	10369	10120
标准误	82.8	180.7	145.3	29.8	32.2	30.3	1956	2426.1	3141
平均值 (本底)	239.0	216.8	207.6	45.9	51.4	64.4**	8448	8744.8	8223**
标准误 (本底)	161.4	137.2	209.5	12	10.2	32.3	2614	2614	1566

*处理时间的分钟数（数值表示 5 分钟的平均值）

**由 n=5（而不是 n=6）计算的平均值，因为在处理之前的 15 分钟里没有记录动物#27689 的值

5 在皮下和肺服用 Val⁸-GLP-1 之后药物动力学的比较

输送途径	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} ⁽¹⁾ (ng*h/ml)	T1/2(α) (小时)
皮下	10.53 ± 1.06	0.71 ± 0.14	36.37 ± 2.18	1.26 ± 0.11
吸入	8.66 ± 0.90	1.54 ± 0.59	35.21 ± 5.91	1.19 ± 0.11

*所有值是以平均值 ± SEM（平均值的标准误差）形式给出的。

(1) AUC_{0-t} = 血浆浓度曲线下从 0 时间到 t 时间的面积，其中，t = 用药之后 12 小时

10 通过竞争性放射免疫测定（RIA）测定免疫活性 Val⁸-GLP-1 的血浆浓度（表 3）。对 Val⁸-GLP-1 的吸收在用药之后 15 分钟很快达到显著的血浆浓度。皮下注射和吸入的血浆时间曲线相似。吸入的平均 T_{max} 值大于皮下注射的值。另外，通过吸入所达到的较高 Val⁸-GLP-1 浓度（接近 C_{max}），在该浓度水平上能比皮下注射保持更长的时间。

15 根据所述平均 AUC 值，吸入 Val⁸-GLP-1（平均吸入剂量为 1198 μg/Kg）相对皮下注射（100 μg/Kg）为大约 7.7%。根据肺沉积剂量估计为 240 μg/Kg，相对皮下注射的生物可利用性为 40%。

序列表

<110> Eli Lilly and Company

<120> 吸用胰高血糖素样肽的方法

<130> X-12013

<140>

<141>

<150> US 60/098273

<151> 1998-08-28

<150> US 60/100012

<151> 1998-09-11

<160> 4

<170> PatentIn .Ver. 2.0

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成序列

<220>

<223> 1号位置上的Xaa选自下列一组: Ala, Gly, Val, Thr, Ile
和 alpha- 甲基 -Ala.

<220>

<223> 14号位置上的Xaa选自下列一组: Glu, Gln, Ala, Thr, Ser 和 Gly.

<220>

<223> 20号位置上的Xaa选自下列一组: Glu, Gln, Ala, Thr, Ser 和 Gly.

<400> 1

Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Xaa Gly Gln
1 5 10 15

Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

010027

20

25

<210> 2
<211> 28
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<223> 人工序列描述:合成序列

<220>
<223>28 号位置上的Xaa选自下列一组: Lys和 Lys -Glg

<400> 2
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Xaa
20 25

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 19号位置上的Xaa选自 Lys 和 Arg.

<220>
<223> 人工序列描述:合成序列

<400> 3
Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15
Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25

<210> 4
<211> 31
<212> PRT

010027

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成或半合成序列

<400> 4

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30