



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95119955.2

[51]Int.Cl⁶

C07K 14/605

[43]公开日 1996年8月21日

[22]申请日 95.10.17

[30]优先权

[32]94.10.18[33]US[31]324,960

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 V·J·陈 R·D·迪马奇

A·V·克里西尤纳斯

D·L·施迈利 R·D·施塔奇

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王其灏

A61K 38/26 C07K 1/113

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 类胰高血糖素促胰岛素的多肽类似物组合物及其使用方法

[57]摘要

本文公开了类胰高血糖素促胰岛素的多肽 (GLP-1 (7-37) 类似物和衍生物。类似物包括氨基酸替代, 氨基和羧基末端的修饰及 C₆-C₁₀ 的酰化。所要求的化合物刺激胰岛素在功能不良的 β 细胞中的分泌或生物合成, 并因此而用于治疗 II 型糖尿病。

酰基, R^2 是 C_6 无支链酰基。

7. 根据权利要求6的化合物, 其中 R^2 不存在。

8. 一种药物制剂, 包括作为活性成分的式1化合物或一种其药物可接受的盐, 如权利要求1-7中所要求的任一化合物, 与一种或多种药物上可接受的载体结合。

9. 如权利要求1-7中所要求的任一式1的化合物, 用于治疗糖尿病。

10. 一种制备如权利要求1-7中所要求的任一式1的化合物的方法, 包括:

用合成或重组手段制备式1的适合的蛋白质骨架;

在 R^2 化合物的羧酸衍生物上偶联上述蛋白质骨架; 并且可选择地,

酰化 Lys (27) 的 ϵ 氨基。

说明书

类胰高血糖素促胰岛素的 多肽类似物组合物及其使用方法

本发明涉及应用于药物研究和开发的有机和多肽化学领域。本发明提供了用于向上调节哺乳动物的胰岛素表达和治疗糖尿病的新型的多肽衍生物和组合物。

胰岛中激素的分泌受复杂的控制机制调节，其不仅受血载代谢产物如葡萄糖、氨基酸和儿茶酚胺的作用，也受局部旁分泌的影响。主要的胰岛激素，胰高血糖素，胰岛素和促生长激素释放抑制因子与特定的胰腺细胞类型(分别为A,B和D细胞)相互作用，调节分泌应答。虽然胰岛素的分泌主要受血液葡萄糖水平的控制，但促生长激素释放抑制因子抑制葡萄糖介导的胰岛素的分泌。除胰岛素分泌的岛间旁分泌调节外，有证据表明肠道中存在着促胰岛素因子。这一概念源自下列事实的发现，即口服葡萄糖与相应量的静脉注射葡萄糖相比是更有效的胰岛素分泌的刺激物。

人胰高血糖素是由胰腺A细胞产生的29个氨基酸的激素，该激素属于多基因族的结构相关的多肽，这些多肽包括促胰液素，胃抑制多肽，血管作用的肠肽和 glicentin。这些多肽多方面调节糖代谢，胃肠运动和分泌过程。然而，胰腺胰高血糖素主要的已认知作用是促进肝糖原分解和糖原生成，从而导致血糖水平的提高。从这一角度看，胰高血糖素的作用是胰岛素的反向调节并可能导致伴随糖尿病的

高血糖症 (Lund, P. K., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79: 345-349 (1982))。

当胰高血糖素与其在胰岛素产生的细胞上的受体结合时, 产生的CAMP增加, 其反过来刺激胰岛素的表达 (Korman, L. Y., 等人, Diabetes, 34 717-722 (1985))。并且, 高水平的胰岛素通过反馈抑制机理向下调节胰高血糖素合成 (Ganong, W. F., Review of Medical Physiology, Lange Publications, Los Altos, California, P. 273 (1979))。因此, 胰高血糖素的表达受胰岛素的细微调节, 并最终受血清葡萄糖水平的调节。

前胰高血糖素原, 即胰高血糖素的前体, 是由360个碱基对基因编码并被加工形成胰高血糖素原 (Lund, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 345-349 (1982))。Patzelt, 等人 (Nature, 282 260-266 (1979) 证明了胰高血糖素原可进一步加工成胰高血糖素及另一个多肽。较后来的实验证明胰高血糖素原是羧基端裂解掉Lys-Arg或Arg-Arg残基形成 (Lund, P. K., 等人, Lopez L. C., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80: 5485-5489 (1983), 和Bell, G. I., 等人, Nature 302: 716-718 (1983)。Bell, G. I., 等人还发现胰高血糖素原含有三个分离的高度同源的肽区域, 其被称为胰高血糖素, 类胰高血糖素肽1 (GLP-1) 和类胰高血糖素肽2 (GLP-2)。Lopez. 等人证明了GLP-1是 - 37个氨基酸的多肽, GLP-2是 - 34个氨基酸的多肽。对鼠前胰高血糖素原的结构类似研究揭示了蛋白水解断裂点在Lys-Arg或Arg-Arg残基处的相似行为, 从而形成胰高血糖素, GLP-1 和GLP-2 (Heinrich, G., 等人, Endocrinol., 115: 2176-2181 (1984))。最终发现, 人、鼠、牛和仓鼠的GLP-1序列是相同的 (Ghiglione, M.,

等人, *Diabetologia*, 27: 599-600 (1984))。

由Lopez, 等人得到的有关GLP-1 的大小结论是通过研究人胰腺中发现的GLP-1的分子形式来确证的 (Uttenthal, L.O., 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 61: 472-479 (1985))。他们的研究表明胰腺中的GLP-1和GLP-2分别为37和34氨基酸的多肽。

GLP-1和胰高血糖素的相似性使早期的研究者设想GLP-1可能具有生物活性。虽然一些研究者发现GLP-1能诱导鼠脑细胞合成cAMP (Hoosein, N.M., 等人, *Febs Lett.* 178: 83-86 (1984)), 但另一些研究者却没有识别出GLP-1的任何生理作用 (Lopez, L.C., 等前述)。由于没有能识别出GLP-1的任何生理学作用, 使得一些研究者对GLP-1是否确实是一种激素产生疑问, 并怀疑胰高血糖素和GLP-1的相关性是否可能是人为造成的。

现在已发现GLP-1 的生物加工的形式具有促胰岛素的特性并会推迟胃的排空。GLP-1 (7-34) 和GLP-1 (7-35) 由美国专利U.S. 5,118,666公开, 在此引为参考文献。GLP-1 (7-37) 由美国专利U.S. 5,120,712公开, 在此引为参考文献。

GLP-1的变异体和类似物在本领域已公知。这些变异体和类似物包括, 例如, GLP-1 (7-36), Gln⁹-GLP-1 (7-37), D-Gln⁹-GLP-1 (7-37), 乙酰基-Lys⁹-GLP-1 (7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37) 和 Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)。GLP-1的衍生物包括, 例如, 酸加成盐, 羧酸盐, 低级烷基酯和酰胺 (参见例如WO 91/11457)。通常已知各种已公开的GLP-1形式均可刺激胰岛素分泌 (促胰岛素作用) 和cAMP的形成 (参见, 例如, Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research*, 40 : 333-343 (1992))。

更为重要的是,许多研究者已证明各种体外实验与哺乳动物,特别是人类的促胰岛素应答与外源给药GLP-1, GLP-1(7-36)酰胺和GLP-1(7-37)酸之间具有可预见关系(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); 和 Thorens, B., 等人, *Diabetes*, 42: 1219-1225 (1993))。

在发作糖尿病的成年人中引起高血糖症的基本缺陷包括内源胰岛素分泌的减少和肌肉及肝组织对胰岛素所产生的效果的反抗作用(Galloway, J. S., *Diabetes Care*, 13: 1209-1239, (1990))。后者导致肝中过多的葡萄糖产生。因此,当一个正常人以大约2mg/kg/分钟的速率释放葡萄糖时,已发作糖尿病的病人以超过2.5mg/kg/min的速率释放葡萄糖,从而导致每24小时至少过量70g的葡萄糖。

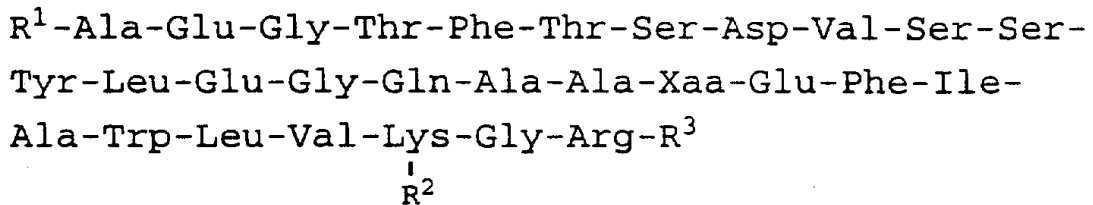
如通过糖血红蛋白的测量所显示的,因为肝葡萄糖量、空腹时血液中葡萄糖水平和全身代谢控制间存在着高度相关性, (Galloway, J. A., 前述; 和 Galloway, J. A., 等人, *Clin. Therap.*, 12: 460-472 (1990)), 显而易见, 要得到足以防止高血糖并发症的全身代谢的正常水平, 对空腹时血糖葡萄糖的控制是至关重要的。而现存的胰岛素疗法很少能在不引起明显的血胰岛素过多和低血糖的情况下使肝中葡萄糖量达到正常 (Galloway, J. A., 和 Galloway, J. A., 等人, 前述), 因此需要采用其它疗法。基于给药GLP-1类似物的疗法是所择方法之一, 并且也是本发明目的所在。

目前, 含有使用GLP-1型分子的疗法已存在明显的问题, 因为这类肽的血清半衰期很短。例如, GLP-1(7-37)的血清半衰期仅3至5分

钟。目前,除了肠道使用后被快速吸收和清除外,人们认为二肽-肽酶IV (DPPIV)的活性很易使GLP-1(7-37)失活。因此急需具有生物活性的GLP-1(7-37)类似物,其可在非肠道使用后形成延长的药效曲线。

因此,本发明的首要目的是提供新型的、化学修饰的多肽,其不仅能刺激II型糖尿病的胰岛素分泌,还可产生其它有利的促胰岛素反应。本发明化合物在血清中比天然GLP-1(1-37)可保持较长的时间,这通过该化合物对DPP IV显示的抵抗性或非肠道使用后比天然GLP-1(7-37)吸收和清除得较慢来达到。最令人惊讶的是,当GLP-1(7-37)的单一取代物加和起来不能显示出含所有取代物的化合物的生物活性时,本发明的一些化合物证明有协同效果。

本发明提供了具有下列通式的化合物:



(式1)

其中R¹选自4-咪唑丙酰基(脱氨基组氨酰),4-咪唑乙酰基或4-咪唑- α , α 二甲基-乙酰基;

R²选自C₆-C₁₀的无支链酰基或不存在;

R³选自Gly-OH或NH₂;和

Xaa为Lys或Arg。

本发明还提供药物组合物，其包含本发明化合物与药物上可接受的载体，稀释剂或赋形剂。本发明进一步地提供一种对需要非胰岛素依赖型糖尿病治疗的哺乳动物治疗的方法，该方法包括对所说哺乳动物使用有效量的本发明化合物。

在一种实施方案，本发明提供天然GLP-1(7-37)的类似物，通过在式1的肽部分的氨基末端以肽键连接上不同的R基。可选择地，本发明的另外的化合物是通过酰化Lys³⁴残基的ε氨基和通过在26位进行限定的氨基酸的替换或改变羧基末端来制备。因此，当制备本发明化合物时逻辑上第一步是制备式1所示的多肽骨架。

应注明的是，本说明书所采用的命名图式源于GLP-1的演变格式。本图式中，已知的GLP-1(7-37)OH的氨基末端被指定为7位，羧基末端记为37位。因此，式1的第一位Ala残基对应于GLP-1(7-37)OH的8位残基。同样式1的Xaa对应于GLP-1(7-37)OH的26位残基，依次类推。

根据给出的此处公开的序列信息和本领域的固相蛋白质合成技术，式1所示的蛋白部分可通过化学合成方法制备。重组DNA技术也可用来表达式1所示的蛋白质骨架。

多肽的固相化学合成原理已为公知技术并可在本领域通常的教科书中找到，如Dugas H.和Penney,C.,Bioorganic Chemistry (1981)Springer-Verlag,New York,pgs.,54-92,Merrifield,J.M.,Chem.Soc.,85:2149(1962),和Stewart和Young,Solid Phase PeptideSynthesis,pp.24-66,Freeman (San Francisco,1969)。

例如，式1的蛋白质部分可通过使用430A肽合成仪(PE-Applied Biosystems,Inc.,850 Lincoln Centre Drive,Foster City,

CA 94404)和使用PE-Applied Biosystems提供的合成循环的固相技术进行合成。Boc氨基酸和其它试剂从PE-Applied Biosystems和其它化学产品公司购得。采用双偶方式的顺序Boc化学被用于以对-甲基二苯甲基胺树脂为原料制得C-末端酰胺。制备C-末端酸,使用相应的PAM树脂。使用已制备的羟基苯并三唑酯偶联Asn, Gln和Arg。可使用下列所示的侧链保护基:

Arg, 甲苯磺酰基

Asp, 环己基

Glu, 环己基

Ser, 苄基

Thr, 苄基

Tyr, 4-溴羰基氧基

Boc的脱保护可在二氯甲烷中用三氟乙酸来实现。肽合成完成后可用含10%的间-甲酚的无水氟化氢(HF)将肽脱保护并从树脂上裂解下来。侧链保护基裂解和肽从树脂上的裂解在-5°C至5°C时进行,优选冰上进行60分钟。除去HF后,肽/树脂以乙醚清洗,用冰醋酸提取多肽并冻干。

保护、非保护和部分保护的GLP-1分子制备已为现有技术所描述。见美国专利U.S. 5,120,712和5,118,666,在此引为参考文献和Orskov, C., 等人, *J. Biol. Chem.*, 264 (22):12826-12829 (1989) 和WO 91/11457 (Buckley, D. I., 等人, 1991年8月8日公开)。

同样,分子生物学的现有技术为本领域技术人员提供了另一途径,通过该途径能够合成式1的蛋白质部分。虽然采用固相肽合成或重组方法均可生产该蛋白质部分,但优选使用重组的方法,因为可能

获得高产率。重组方法生产的基本步骤是：

a) 分离编码GLP-1的天然DNA序列或构建合成的或半合成的编码GLP-1的DNA,

b) 将编码序列更以适于或单独的或是作为融合蛋白的表达蛋白的方式置于表达载体。

c) 用表达载体转化适合的真核或原核生物宿主细胞,

d) 在允许GLP-1中间产物表达的条件下培养该转化的宿主细胞, 并

e) 回收并纯化重组产生的蛋白质。

如前所述, 编码序列可以是全合成的或是对更长的天然胰高血糖素的编码DNA修饰的结果。编码前胰高血糖素原的DNA序列描述于Luns等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 345-349 (1982) 中, 并且通过改变天然序列以获得所需结果, 它可用作本发明的化合物的半合成生产的起始原料。

合成基因, 其在体外或体内的转录和翻译最终形成式1所示的蛋白质部分可由领域所熟知的技术来进行。由于基因密码子的本身所具有的简并性, 本领域技术人员会认识到可以构建出大量的确定数目的DNA序列, 所有这些序列均可编码式1所示的多肽。

合成基因构建的方法已为本领域所熟知。见Brown, 等人 (1979) Methods in Enzymology, Academic Press, N. Y., Vol. 68, pgs. 109-151。根据本文公开的氨基酸序列可以设计出编码式1的蛋白骨架的DNA序列。一旦设计出来, 则可用常规DNA合成仪器如Model 380A或380B DNA合成仪 (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) 来生成该序列

本身。

为有效地表达式1的多肽,通过使用合适的限制在许多适于重组DNA表达的任一载体中插入已设计的DNA序列。参见(Maniatis 等人(1989)Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3。限制性内切酶的切割位点设计入编码GLP-1中间体的DNA的任一末端以便于分离出或整合入已知的扩增和表达载体。根据限制性内切酶对所用的母体表达载体的切割方式选用特定的限制性内切酶。选择限制性位点以使用控制序列正确定向编码序列来使所需蛋白质的得到正确的框架阅读和表达。编码序列必须定位,以使其和启动子与表达载体的核糖体结合位点一起处于正确的阅读框内,启动子和表达载体的核糖体结合位点两者均在表达蛋白质的宿主细胞中起作用。

为使合成基因得到充分转录,其必须通过操作与启动子-操纵子区域相结合。因此,考虑到合成基因的ATG起始密码子,合成基因的启动子-操纵基因区域处于同样的序列方向。

本领域已熟知有大量的用于转化原核和真核生物细胞的表达载体。见The Promega Biological Research Products Catalogue (1992) (promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399); 和 The Stratagene Cloning Systems Catalogue (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037)。美国专利U.S. 4,710,473也描述了用于外源基因在E. Coli中高水平表达的环状DNA质粒转化载体。这些质粒作为转化载体在重组DNA技术和下述过程中是非常有用的。

- (a) 赋予质粒的在宿主细胞中的自复制能力,
- (b) 控制与宿主细胞培养物保养相关的温度下的自主质粒复制;
- (c) 稳定在宿主细胞群体中质粒的保养;
- (d) 直接合成宿主细胞群体中质粒保养的蛋白质生产指示物。
- (e) 提供一系列限制性内切酶的对质粒的单一识别位点,和
- (f) 终止mRNA转录。

这些环状DNA质粒在重组DNA技术中为保证外源基因的高水平表达可做为有用的载体。

构建完式1蛋白质的表达载体后,下一步是将载体放入适当的细胞中,从而构建得一个表达多肽的重组宿主细胞。用重组DNA载体转化细胞的技术在本领域已熟知, 并可见于通常的参考文献如 Maniatis等人, 前述。宿主细胞可由真核生物或原核生物细胞构建。

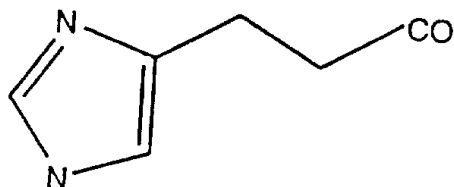
原核生物细胞通常可以较高的速率生产蛋白质并易于培养。在高水平细菌表达体系中表达的蛋白质以颗粒有特点地集聚或包含高水平过度表达的蛋白质的内含物。这种蛋白质集聚物典型地必须使用本领域熟知技术进行溶解、变性和重折叠。见Kreuger等(1990)于Protein Folding, Gierasch 和 King 编, pgs 136-142, American Association for the Advancement of Science Publication No., 89-185, Washington, D.C; 美国专利U.S. 4,923,967。

制得式1的多肽骨架后,正如上述"本发明概述"中所定义的咪唑被加在肽的氨基末端生成本发明各种实施方案中的产物,用化学合成手段将咪唑基团偶联于式1的多肽上。因为本发明中使用的所有有机基团含有羧酸,所以可以通过类似于在多肽N-末端加氨基酸的

固相蛋白合成方法加咪唑基。可选择地，能够用标准的化学反应方法加咪唑基的活化酯。

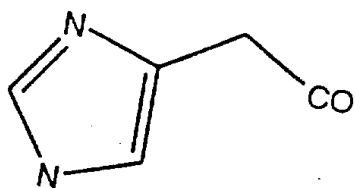
本发明优选的咪唑基为：

4-咪唑丙酰基(脱氨基组氨酰)

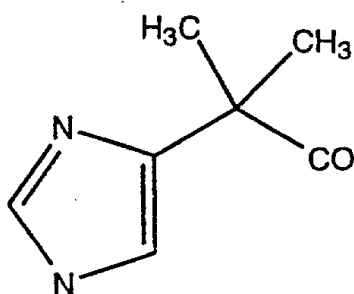


4-咪唑乙酰基

,和



和4-咪唑- α, α -二甲基-乙酰基



最优选基团为4-咪唑丙酰基

本发明的另一实施方案是酰化 Lys³⁴ 残基的 ϵ 氨基。优选含有6至10个碳原子的直链酰基加成物,且最优选无支链的C₈。

本发明的其它实施方案包括在式1的26位(Xaa)的氨基酸替代物。在该位置Lys和Arg是可接受的,优选Arg。

本发明中也包括羧基末端的修饰。因为R³可以是Gly-OH或NH₂, Gly-OH比羧基末端为酰胺的实施方案更为优选。

用本领域熟知的各种方法之一来实现在Lys³⁴的 ϵ 氨基上加酰基。见Bioconjugate Chem" Chemical Modifications of Proteins:History and Applications"Pages 1,2-12(1990); Hashimoto 等, Pharmacuetical Res." Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity "Vol.6.No. 2 .171-176(1989)。

例如,在硼酸盐缓冲液中用50%乙腈将辛酸的N-羟基-琥珀酰亚胺酯加到 Lys- ϵ 胺上。可在加咪唑基之前或之后将肽酰化。并且,若是用重组技术制备的多肽,在酶促裂解之前进行酰化是可能的。

本发明还包括GLP-1(7-37)类似物的盐的形式。本发明的化合物可以具有充分的酸性或碱性,能与任一无机碱,无机及有机酸反应形成盐。通常采用的形成酸加成盐的酸为无机酸,如盐酸,氢溴酸,氢碘酸,硫酸,磷酸等,和有机酸如对-甲苯磺酸,甲磺酸,草酸,对溴苯基磺酸,碳酸,琥珀酸,柠檬酸,苯甲酸,乙酸等。这类盐的例子包括硫酸盐,焦硫酸盐,硫酸氢盐,亚硫酸盐,亚硫酸氢盐,磷酸盐,磷酸氢盐,磷酸二氢盐,偏磷酸盐,焦磷酸盐,盐酸盐,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,丁二酸盐,辛二酸盐,癸二酸盐,富马酸盐,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,苯乙酸盐,苯丙酸盐,苯丁酸盐,柠檬酸盐,乳酸盐, γ -羟基丁酸盐,甘醇酸盐,酒石酸盐,甲磺酸盐,丙磺酸盐,萘-1-磺酸盐,萘-2-磺酸盐,扁桃酸盐等,优选的酸加成盐是那些与无机酸如盐酸,氢溴酸,尤其是盐酸形成的盐。

碱加成盐包括那些由无机碱衍生物的盐,如铵或碱金属或碱土金属的氢氧化物,碳酸盐,碳酸氢盐等。用于制备本发明盐的这类碱包括氢氧化钠,氢氧化钾,氢氧化铵,碳酸钾等。GLP-1(7-37)类似物的盐的形式是特别优选的。当本发明化合物用于治疗目的时,那些化合物也可使用盐的形式,但盐须是药物上可接受的。

本发明的GLP-1(7-37)类似物证明具有促胰岛素的活性。"促胰岛素活性"一词是指一种物质刺激胰岛素合成或表达的能力或引起该刺激的能力。

通过将化合物提供给动物细胞,或将化合物注射入动物体内并分别监测免疫反应性的胰岛素(IRI)释放入培养基或动物循环系统中的量来确定该化合物的促胰岛素性质。

虽然可使用能够检测IRI的任一种放射免疫测定法,但也使用该测定法改性方法。见J.D.M.等Acta Endocrinol.,70:487-509(1972),化合物的促胰岛素性质可由胰腺浸剂测定。见Penhos,J.C.等人,Diabetes,18:733-738(1969)。

本发明还提供药物组合物,其包含与药物上可接受的载体,稀释剂或赋形剂结合的本发明的化合物。使用制药学领域熟知的技术来

制备这种药物组合物,优选通过非肠道途径,将本发明的药物组合物,单独给药或与其它治疗剂结合使用。尤其优选的途径是皮下给药方式。

虽然给药剂量可低些或高些,非肠道剂量的范围为约1pg/kg 至约1,000 μ g/kg体重。所需剂量依病人的病情的严重性和下列各种标准如病人的身高,体重,性别,年龄及病史情况而定。

在制备本发明的组合物时,通常含有至少一种本发明化合物的活性成份与一种赋形剂混合或被一种赋形剂稀释,当赋形剂用作稀释剂时,它可以是半固体或液体材料,其作为活性成份的液体载体,固体载体或介质。优选液体赋形剂。

在制备制剂时,有必要将活性化合物磨粉使其与其它成份结合之前具有适当的颗粒大小。如果活性化合物基本上不溶,则它通常被磨成小于200目的颗粒。如果活性化合物基本上是水溶性的,则颗粒大小通常通过研磨调节以提供一种在制剂中基本上均一的分布,如约40目。

采用本领域熟知的方法将本发明的组合物进行配制以便病人在给药后活性成份得到快速、持续或延缓释放。组合物优选以单位剂量形式进行配制,每剂通常含有约50 μ g至100mg的,更为普遍的是约1mg至10mg的活性成分。"单位剂量形式"一词指物理上分离的单元,适于作为用于人或其它哺乳动物时的单元剂量,每一单位含有预定的活性物质的量,该量是通过与适宜的药物赋形剂一起可产生所需的治疗效果而计算出的。

为非肠道给药的目的,含有本发明化合物的组合物优选在一适当PH时与蒸馏水组合。可采用另外的制药方法控制作用持续时间。

通过使用聚合物配合或吸收本发明化合物的方法获得控制释放制剂。通过选择适合的大分子(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,羧甲基纤维素和硫酸鱼精蛋白)和大分子的浓度以及为了控制释放目的结合的方法来实施控制释放。

通过控制释放制剂控制作用持续时间的另一种可能的方法是将本发明化合物结合入聚合物质的颗粒中,如聚酯,聚氨基酸,水凝胶,聚(乳酸)或乙烯乙酸乙烯酯共聚物。

可选择地,代替将化合物结合入这些聚合物颗粒的方法,可以是将本发明化合物埋入制好的微胶囊中,例如使用凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊,如分别得到的羟甲基纤维素或明胶微囊,或者将本发明化合物置于胶体药物送药体系中,如脂质体,白蛋白微球体,微乳液,纤颗粒和纤胶囊或将本发明化合物置于粗乳液中。这些技术均公开于Remington's Pharmaceutical Sciences (1980)。

本发明化合物具有促胰岛素的活性。因此,本发明的另一方面,是提供一种增强胰岛素的表达的方法,包括对哺乳动物的胰腺B-型胰岛细胞提供有效量的本发明化合物。

相似地,本发明提供一种对哺乳动物特别是人在需要这种治疗时治疗糖尿病的方法,包括给予该哺乳动物有效量的本发明化合物或组合物。

顺便说明,下列实施例用以帮助描述如何实施本发明的各种实施方案。这些实施例并不意味着限制本发明的范围。

实施例1

(Arg 26) GLP-1(8-37)OH的合成

在Model 430A多肽合成仪(PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)上用Boc保护策略以固相合成方法制备式1中当Xaa为 Arg 和R³为Gly-OH时的多肽部分。侧链保护基为: Asp (Chx1), Glu(OBzl) Ser (Bzl), Thr (Bzl), Lys (Cl-Z), His (BOM), Trp (CHO), Tyr (Br-Z) 和 Arg (Tos)。除Asp(chx1) (Peptides Internationad)外所有的均得自PE-Applied Biosystems。或者用DCC起始的对称酸酐或HOBT活化作用使每一残基双偶合,留下30个残基中间体与树脂连接。

实施例2

N-咪唑基丙酰 (Arg 26) GLP-1(8-37)OH的合成

通过将0.5gm (1.8m mol) N-Cbz-咪唑-4-基丙酸置于两组中的每一组组氨酸药筒(cartridges)中,并在430A型多肽合成仪上进行一般的组氨酸双偶联环反应,从而将N-Cbz-咪唑-4-基丙酸(R. G. Jones, J. Amer. Chem. Soc., 71, 383 (1949)偶联到实施例1中所描述的肽 (8-37)肽基树脂上。

在4°C下用20ml 20%哌啶的DMF(二甲基甲酰胺)溶液处理所制备的被改性肽基树脂1小时以除去Trp(CHO)保护。用CH₂Cl₂将大约(2.6gm)被改性的肽基树脂洗涤数次,转置于一聚四氟乙烯反应容器中并在真空中干燥。将2ml 间甲酚和一个电磁搅拌棒加入与HF发生器(Penninsula Laboratories, Inc.)相连的反应器中,冷却至-78°C,抽真空,且20-25ml HF冷凝至反应器中。在冰浴中将反应混合物搅拌60分钟;然后真空移去HF。将被改性的肽残基(GLP-1类似物)悬浮

在200ml乙醚中,并稍稍搅拌。然后用-60ml 多孔玻璃滤斗将固体物滤出。用乙醚洗涤固体两遍后,通过用50%乙酸水溶液和10% 乙酸水溶液各40ml洗涤固体来增溶GLP-1类似物。将100 ml 合并的滤液水溶液移出,并用以下条件准备标准的HPLC分析:

缓冲液: A) 0.1% TFA
B) 0.1% TFA/50%CH₃CN

柱: Vydac C18(0.46×15cm)

温度: 45 °C

流速: 1.0ml/min

检测器: 214nm

梯度: 0% B进行5分钟,然后从0至100%B进行60分钟。

剩余的滤流水溶液(大约90ml)分为两部分,每一部分被装载到2.2×25cm Vydac C18柱上,室温下进行制备色谱(Pharmacia FPLC),在214nm处监测。每5分钟收集一级分,洗脱速度为4ml/分钟,梯度由20%B开括(A和B如上文所定义),以100% B 终止,历时790分钟,在室温下进行。

用HPLC分析有UV吸收的级分,并将被选择的级分(61-67)合并且冻干,得到114mg 标题化合物。用类似方式,由第二部分得到175mg。用快速原子轰击(FAB),质谱分析,和氨基酸分析对GLP-1类似物进行表征。分子离子峰的出现(3369.2)与理论分子量(3368.7)+ 1相吻合。氨基酸的比例与所需要的产品一致:

<u>氨基酸</u>	<u>理论值</u>	<u>实测值</u>
Asp	1	1.00
Thr	2	1.84
Ser	3	2.55
Glu	4	3.96
Gly	4	3.98
Ala	4	4.07
Val	2	1.95
Ile	1	0.9
Leu	2	1.94
Tyr	1	0.92
Phe	2	1.86
Lys	1	0.96
Arg	2	1.55

实施例3

N-咪唑基丙酰(Arg 26 (N^ε-辛酰基(赖氨酰34)))GLP-1(8-37) OH的合成

用以下方法用Lys³⁴的N^ε-氨基上的N-琥珀酰亚胺基辛酸酯使N-咪唑基(Arg 26) GLP-1(8-37)OH酰化。

将实施例1和2中制备的N-咪唑基丙酰(Arg 26) GLP-1(8-37)OH(70.5mg; 0.021 mmol)溶解在25ml二甲亚砜(DMSO)中。然后加入N-琥珀酰亚胺基辛酸酯(19.1mg; 0.079mmol)并搅拌入溶液中。加入10倍摩尔过量的四甲基胍(26.2ml; 0.21mmol),以使ε-氨基完

全去保护。室温下搅拌混合物,并用HPLC检测。45分钟后用100ml的0.1 N HCl终止反应。使混合物通过一玻璃漏斗中的玻璃棉塞去除凝胶状颗粒。

用以下条件在C4反相制备HPLC柱上从起始反应物中分离标题产物:

缓冲液: A) 0.1% TFA, 5%乙腈
B) 0.1% TFA, 95%乙腈
柱: Vydac C4 (2.2×25cm)
温度: 室温
流速: 2.0ml /分钟
监测器: 280nm
梯度: 25-55% B 历时300分钟。

如用HPLC分析各级分所测定的,在44.6至46.7%乙腈下洗脱标题产物。收集合适的级分,冷冻并冻干。反应得到22.7mg(32%),用HPLC分析纯度大约为87%的标题产物。

用以下条件,用第二次制备HPLC步骤,在pH=7.7条件下,进行进一步的纯化:

缓冲液: A) 0.1M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, 10% 乙腈
B) 0.1M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, 50% 乙腈
柱: Vydac C18 (2.2×25cm)
温度: 室温

流速: 2.0ml /分钟
监测器: 280nm
梯度: 50-90% B 历时300分钟。

将样品(22.7mg)溶解在20ml缓冲液A中,并装载上柱。用上述梯度分离各组份。如HPLC分析测定的在34.8和35.6% 乙腈之间洗脱出标题产物。合并合适的级分并冻干。得到10.46mg(46.1%)标题产物, HPLC纯度大约为99%,RP-HPLC两步骤的总收率以重量计为14.8%。

实施例4

N-咪唑基乙酰(Arg 26) GLP -1(8-37))OH的合成

用下面的方法,通过用叔丁氧羰基保护咪唑环,由4-咪唑乙酸制备[N-(叔丁氧羰基)-咪唑-4-基]乙酸。碳酸氢二叔丁酯(1.1当量/当量的胺)被加入到游离胺,碳酸钾(1.1当量)和50%二噁烷水溶液的混合物中,室温下将反应混合物搅拌4小时。所得混合物用二乙醚稀释并分离各层。含水相用1.0N柠檬酸水溶液酸化并用二氯甲烷萃取三次,将萃取液干燥(MgSO₄)并真空去除溶剂。所得油状物用合适的溶剂结晶。

通过将大约0.5gm (1.8mmol) [N-(叔丁氧羰基)-咪唑-4-基] 乙酸置于两组中每一个组氨酸药筒中并如在实施例2中所述在430A型肽合成仪上进行正常组氨酸双偶联环反应,将[N-(叔丁氧羰基)-咪唑-4-基]乙酸偶联到实施例1中描述的(8-37)肽基树脂上。

被改性肽基从树脂上释放下来,基本上根据实施例2纯化。用HPLC分析UV吸收级分,然后合并冻干得到大约100mg标题化合物。

然后用快速原子轰击 (FAB) 和质谱分析对样品进行表征。发现分子离子峰与理论分子量相一致。

实施例5

N-[咪唑- α, α -二甲基-乙酰]GLP-1(8-37)OH的合成

如下由N-三苯甲基- α, α -二甲基-4-咪唑-乙腈[J.I. DeGraw, et al., JMC, 20, 1671 (1977)]制备 α, α -二甲基- α -[N-(叔丁氧羰基)咪唑-4-基]乙酸。

将N-三苯甲基- α, α -二甲基-4-咪唑乙腈(3.97g, 10.5mmol)加至5%浓盐酸/甲醇溶液(25ml)中,并在真空浓缩之前回流3小时。残余物分配在5N盐酸水溶液(25ml)和乙酸乙酯(50ml)之间。将含水相分离并回流24小时。真空浓缩后,将 α, α -二甲基-4-咪唑乙酸粗产品溶解于水并再浓缩。用上述的一般方法由该粗产品制得标题化合物(1.88g, mp, 155°C(分解))。

然后基本上根据上述实施例,将 α, α -二甲基- α -[N-(叔丁氧羰基)咪唑-4-基]乙酸偶联到(8-37)肽基树脂上。

实施例6

N-咪唑乙酰-GLP-1(8-36)NH₂的合成

在使用MBHA树脂(ABI, Lot # AIA023, 0.77mmol/g)的应用生物系统(ABI)(460A多肽合成仪)上通过固相肽化学制备GLP-1(8-36)NH₂。所有的氨基酸具有被叔丁氧羰基(t-Boc)保护的 α 氨基。带反应侧链的氨基酸被如下保护:

Arg(tos); Lys(C1-Z); Trp(CHO); Glu(CHex); Tyr(Br-Z); Ser(Bzl);

Asp(OBzl); Thr(Bzl)。

每当量氨基酸用二分之一当量的二环己基碳二亚胺(DCC)在二氯甲烷(DCM)中活化被保护氨基酸,得到氨基酸的对称酸酐。但精氨酸,谷氨酰胺和甘氨酸残基是通过生成这些氨基酸的1-羟基苯并三唑(HOBT)酯(在二甲基甲酰胺(DMF)中,氨基酸,HOBT和DCC的当量比为1:1:1)而活化。

用一系列偶联和去保护循环由C-末端至N-末端顺序将残基联接。偶联过程包括被活化氨基酸被先前被偶联的氨基酸的自由伯胺进行亲核取代。用无水三氟乙酸(TFA)去除N-末端保护基BOC进行去保护。用二异丙乙胺(DIEA)中和后产生一个自由胺基。

合成量是0.5mmol。MBHA-树脂的官能位点的浓度是0.77mmol/g,用649mg树脂。对所有的氨基酸使用了二倍摩尔过量的对称酸酐。通过标准方法将C-末端精氨酸偶联到MBHA-树脂上。所有的残基都是双偶合的。即每一残基偶联到树脂上两次。第二次偶联是在再加偶联氨基酸之前没有Boc去保护作用下进行的。这有助于树脂上所有游离胺基团的完全反应。色氨酸残基被四倍偶合。

基本上根据上述实施例用肽基树脂和实施例4中的R基团制备标题化合物。将R基团加至氨基酸残基且甲酰基被去除后,通过用聚四氟乙烯反应容器用氢氟酸液体(HF)把树脂在0°C下水解1小时,使多肽从树脂上解脱下来。对于每克肽基树脂,加入1ml间-甲苯酚清除剂并使用10ml HF液体。清除剂阻止侧链保护基(作为碳阳离子被释放)与多肽再反应。一小时后,真空去除HF,剩下肽,树脂和m-甲苯酚淤浆。

然后在冰冷的二乙醚在HF反应器中将肽沉淀。将沉淀物移至

-150ml 烧结玻璃漏斗中并用乙醚淋洗几次。肽/树脂物理混合物用冷乙醚洗涤几次去除残余的HF 和间-甲苯酚。第二步是用10% 的乙酸水溶液 (V/V) 从树脂中将肽萃取出来。真空抽滤, 滤液滤到一干净圆底烧瓶中得粗产品肽溶液。

实施例7

体外受体结合测定

(cAMP测定)

a) 鼠, GLP-1受体, 膜制备:

使用被公开的鼠GLP-1受体DNA序列 (Thorens B., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 8641-8645 (1992)) 和二氢叶酸还原酶抵抗标记基因与PCR技术结合构建一个表达媒介。用该媒介转化中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系的DXB-11变种, 得到表达鼠GLP-1 膜受体的重组CHO细胞系。

生长细胞并采集之, 首先用PBS缓冲液洗涤细胞, 然后用冷的缓冲液 (25mM HEPES, 2mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 20 μ g/ml 亮肽素, 1mM PMSF, 2 μ g/ml 抑肽酶, 50 μ g/ml 胰蛋白酶抑制剂, pH8.0) 洗涤二次并再悬浮于缓冲液中, 得到膜制品。在玻璃聚四氟乙烯均化器中将细胞悬浮液进行细胞溶解。将所得样品在4°C以 353,00Xg离心30分钟。移去上清液, 将沉淀物再悬浮于冷缓冲液中并均化。分成等份在-80°C下保存。

b) 环AMP (cAMP) 测定

一膜制品的样品与被试化合物和对比化合物一起在缓冲液 (25mM HEPES, 0.2% (W/V) BSA, pH7.6) 中在32°C预温育10分钟。加

入反应缓冲液(终浓度:25mM HEPES,0.2%(W/V)BSA,2.6mM Mg, 0.8mM ATP,0.1mM GTP,5mM磷酸肌酸,肌酸激酶50u/ml,0.2mM IBMX,pH 7.6),再温育30分钟。通过加入10mM EDTA终止温育。

用荧光示踪免疫测定方法测定cAMP产物。简单地说,停止温育后,加入荧光示踪物(cAMP-b藻红素共轭物),然后加入被亲和纯化的抗-cAMP兔抗血清。室温温育45分钟后,加入抗兔IgG涂层的测定小球,再温育15分钟。然后将平片抽真空并在Pandex PFCIA 读数器上读数。

在该测定中,由于增长的cAMP浓度,已知的促胰岛素剂如GLP-1(7-37)OH显示出降低的荧光强度。荧光强度值与cAMP产物的比例相关(pmol/min/mg)。相反,没有促胰岛素作用的试剂没有激发cAMP产物,因而没有显示荧光强度的降低。

表 1
cAMP 测 定

<u>化合物</u>	<u>% 相对效力</u>
GLP-1 (7-37) OH	100.0 ± 18
Arg ²⁶ -GLP-1 (7-37) OH	140.8 ± 28.7
N-咪唑基丙酰基-GLP-1 (8-37) OH	21.9 ± 7.8
N-咪唑基丙酰基-Arg ²⁶ GLP-1 (8-37) OH	89.0 ± 12.6
N-咪唑并丙酰Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基-GLP-1 (8- 37) OH	8.8 ± 1.4 ^a
GLP-1 (7-36) NH ²	88.4 ± 29.4
N-咪 唑基乙酰-GLP-1(8-36)NH ₂	24.2 ± 9.8
N-咪唑基乙酰-Arg ²⁶ - GLP-1 (8-37) OH	95.0 ± 14.3
α, α-咪唑基乙酰- GLP-1 (8-37) OH	108.2 ± 22.4

a 酰基化化合物由于非特定结合,通常给出人为低的效力值。

实施例8

狗体内测定

a) 高血糖抑制研究

在整夜禁食的神志清醒成年(1-2岁)体重8-15kg 雄性和雌性小猎兔犬身上进行实验。在研究前至少十天,用异氟烷麻醉动物,并在左边或右边的腹股沟处切口。将硅橡胶导液管插入股动脉和近侧的尾股静脉,并用4-0丝缝合线固定。导液管的自由端用套针针头经皮下穿至背部。然后用甘油/肝素溶液(3:1, V/V; 肝素终浓度为250KIU/ml)装满导管,将自由端打结并置于皮下囊袋中使皮肤完全闭合。Keflex^R术前(20mg/kg/, IV和20mg/kg, I.M.)和术后(250mg P.O., 一日一次,连用七天)均施用以防感染。术后施用Torbugesic (1.5mg/kg, I.M.)以减轻疼痛。

在研究的前一天抽血检查动物的健康状况,只有血细胞比容大于38%且白血球数低于 $16,000/\text{mm}^3$ 的动物才能被使用。

实验前的下午,局部麻醉下(2%利多卡因)通过一小切口从皮下囊袋中将导液管自由端外置。用束缚系统套将狗固定并集合上颈圈。

实验的早晨,将导管内容物吸收,并用盐水冲洗内容物,让延长线(用不锈钢链保护)与导管接连。IV注射实验的早上,将经针头(over-the-needle)的聚四氟乙烯导管经皮插入头侧静脉,以准备施用测试物质的静脉药团(bolus)。将狗置于代谢笼子中,导管延长部分和链与一链的转节系统连接使狗能在笼内自由走动。这时,(-60分钟)通过连接的静脉导管进行葡萄糖的外源输注(50% W/V水溶液)。在研究的第一个六分钟内以向下点滴的形式注入葡萄糖,使血浆葡萄糖浓度快速升到150mg/dl。在剩余的研究中自始至终每2.5

至7.5分钟测定血浆葡萄糖浓度,并适当调节葡萄糖输液速度以保持血浆葡萄糖浓度在150mg/dl。

葡萄糖输注起始(0时)后六十分钟,或通过事先插入的聚四氟乙烯导管的静脉内给药(1.0,2.9,5.0或10.0 μ g/kg,溶解在2ml含0.3%狗血蛋白的盐水中的剂型,W/V)或在颈背侧皮下给药(10 μ g/kg,150 μ M的磷酸缓冲盐水溶液)施用测试物质。

静脉内研究期间在-30,-15,0,2.5,5,7.5,10,12.5,15,20,30,45,60,75,90,105和120分钟抽取动脉血样(3.5ml),在皮下研究期内在-30,-15,0,3,6,9,12,15,20,30,45,60,75,90,105和120分钟抽取动脉血样(3.5ml)。将样品采集在含EDTA二钠的真空血采样试管中,并立即置于冰中。为防止血浆样品中GLP-1(7-37)蛋白分解的分裂,将含血的1.5ml EDTA转移至一含40 μ l抑肽酶(10,000 KIU/ml)的聚丙烯试管中并混合均匀。将样品离心,所得血浆转至聚丙烯试管中并在冰中保存整个研究持续期。

实验结束时,将动物麻醉(异氟烷),用新鲜盐水冲洗导液管并装入甘油/肝素混合物;将导液管自由端打结并如前所述经皮放置;并施用抗生素(300mg Keflex^R,I.M.)。

在研究的当天,在贝克曼葡萄糖分析仪中用葡萄糖氧化酶测定血浆葡萄糖浓度。其它测定样品在-70 $^{\circ}$ C贮存直至分析的时刻。以猪胰岛素为标准用商售放射免疫药盒测定胰岛素浓度。用双抗体免疫测定GLP-1(7-37)水平。

以t时间胰岛素的浓度和注射测试物质之前以时间平均的胰岛素浓度(基线)之间的不同计算胰岛素的变化。用不规则四边形规则计算胰岛素变化曲线下的面积。以时间间隔X内葡萄糖输入的速度

和注射测试物质前30分钟内的平均葡萄糖输入速度(基线)之间的不同计算葡萄糖注入速度的变化。用不规则四边形规则计算葡萄糖输入速度变化曲线下的面积。用平均值 \pm 平均标准误差(SEM)列出所得值。

b) 血糖正常的抑制研究

除在研究的整个过程中血浆葡萄糖浓度保持在或接近正常基础水平外,用与高血糖SC研究相同的方法进行血糖正常抑制实验。为完成该实验,注射测试物质后每2.5至5分钟测定血浆葡萄糖浓度。当血浆葡萄糖浓度的减少大于从预处理值开始的5mg/dl,就开始通过静脉内导管由外部输入葡萄糖。(50%葡萄糖的水溶液,W/V)以努力保持血浆葡萄糖浓度接近基线。因为静脉线及其延伸被肝素化盐水装满而没有葡萄糖,因此起始输入时间和葡萄糖实际进入狗体的时间之间有一明显的置后期。因为这个原因,给药后一个短时间葡萄糖浓度降低于基线。为得到实际输给狗的葡萄糖量的更精确的估算,得到麻木空间的体积估算值(930 μ l),从而校正了葡萄糖输注速度。

以t时间胰岛素浓度和注射测试物质前时间平均胰岛素浓度(基线)之间的不同来计算胰岛素的变化。用不规则四边形规则计算胰岛素变化曲线下的面积,用平均值 \pm 平均标准误差(SEM)列出所得值。

c) 口服葡萄糖耐药量试验

用一组四夜禁食,重12-14kg雄性或雌性的小猎兔犬进行口服葡萄糖耐药量试验。动物的准备与上述相同。放置于代谢笼后,在实验开始前让动物适应二十分钟。在这一适应期末,抽取零样品,将一

根30英寸24 Fr.橡胶结肠管通过食管插入动物的胃。通过管给胃施用葡萄糖药团(1.5g/kg; 50%葡萄糖W/V的水溶液),然后注入20ml 蒸馏水药团,并开始计时。两分钟后,在颈侧面注射实验物质皮下药团(3nmol/kg或大约10 μ g/kg; 150 μ M的磷酸盐缓冲盐水溶液)。

除零样品外,在施用葡萄糖后5,10,15,20,30,40,50,60,75,90,105,120,135,150,165,180,195,210,225,225,和240分钟抽取动脉血样3.5ml。将样品收集在含EDTA二钠盐的真空血液收集管中并按上述进行处理。

实验结束时,将动物麻醉(异氟烷);用新鲜盐水冲洗导管并装入甘油/肝素混合物;将导液管自由端打结并如上所述经皮下放置;施用抗生素(300mg Keflex^R, I.M.)。

在三种不同情况下研究四条狗的每一条:一次皮下施用磷酸盐缓冲盐水;一次用GLP-1(7-37) OH,一次用N-咪唑基丙酰(Arg 26(N⁶-辛酰基(赖氨酰34)))GLP-1(8-37)) OH。最少相隔一周进行动物实验的再研究。在所有实验的前一天测定白细胞数和血细胞比容。

用不规则四边形计算基线以上(零时胰岛素值)曲线下胰岛素面积。用不规则四边形规则计算基线以上(零时葡萄糖值)曲线下葡萄糖面积。用平均值 \pm 平均标准误差(SEM)列出所得值。

表 2

狗静脉内高血糖(150mg/dl)抑制试验

化合物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n	胰岛素效	最大胰	胰岛素	GIR
			果持续时 间 (分钟) ^a	岛素变 化 (ng/ml) ^b	变化AUC (ng/ml·分; 0-60分) ^c	变化AUC (mg/kg; 0-60分钟) ^d
赋形剂	0	7	无活性	0.8±0.2	7±14	238±46
GLP-1(7-36)NH ₂	1.0	7	2.5	3.4±0.6	32±8	414±73
N-咪唑基丙酰- GLP-1(8-37)OH	1.0	3	7.5	3.1±0.8	52±18	399±63
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - GLP-1(8-37)OH	1.0	3	12.5	2.6±0.6	38±16	419±122
Lys ³⁴ -N ⁶ -辛酰基 GLP-1(7-37)OH	1.0	3	15	3.8±1.0	50±2	463±12
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ⁶ -辛酰基 GLP-1(8-37)OH	1.0 5.0	4 3	42.5 72.5	2.3±0.8 3.8±0.2	90±40 132±7	350±93 568±126
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ⁶ 癸酰基 GLP-1(8-37)OH	5.0	2	无活性	0.9±0.9	14±10	236±58

- a 胰岛素效果持续时间:胰岛素平均变化始终 $\geq 0.5\text{ng/ml}$ 的时间。
- b. 最大胰岛素变化:在120 分钟实验期内发现的基线以上的胰岛素的最大增加。
- c. 胰岛素变化AUC:胰岛素变化曲线下的面积,代表肽的总的亲胰岛素效果。
- d. GIR 变化AUC:葡萄糖输入速度变化曲线下的面积;代表肽的总的代谢的效果。

表 3

狗皮下高血糖(150mg/dl)抑制试验

化合物	剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	n	胰岛素效	最大胰	胰岛素	GIR
			果持续时 间 (分钟) ^a	岛素变 化 (ng/ml) ^b	变化AUC (ng/ml·分; 0-120分) ^c	变化AUC (mg/kg; 0-120分钟) ^d
赋形剂	0	5	无活性	0.4 ± 0.2	11 ± 20	528 ± 224
GLP-1(7-36)OH	10	5	27	1.6 ± 0.8	64 ± 33	696 ± 145
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - GLP-1(8-37)OH	10	4	42	3.6 ± 1.0	97 ± 39	811 ± 216
Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基 GLP-1(7-37)OH	10	5	无活性	0.6 ± 0.3	29 ± 8	532 ± 112
-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基 GLP-1(8-37)OH	10	4	无活性	0.6 ± 0.4	11 ± 26	659 ± 182
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基 GLP-1(8-37)OH	10	5	> 90	2.0 ± 0.4	113 ± 24	926 ± 268

- a 胰岛素效果的持续时间:胰岛素平均变化始终 $\geq 0.5\text{ng/ml}$ 的时间。
- b 最大胰岛素变化:在120分钟实验期内发现的基线以上的胰岛素最大增加。
- c 胰岛素变化AUC:胰岛素变化曲线下的面积;代表肽的总的亲胰岛素效果。
- d GIR 变化AUC:葡萄糖输入速度变化曲线下的面积;代表肽总的代谢效果。

实施例9

鼠的体内测定

a) 葡萄糖耐药性试验

用整夜禁食的,神志正常的体重大约250(Sprague Dawley鼠)或300(Zucker Diabetic Fatty鼠)克的雄性 Sprague Dawley(Charles River)或Zucker Diabetic Fatty(Genetic Models, Inc.)鼠进行实验。在研究前4至5天,用异氟烷麻醉鼠,并将聚乙烯(PE 50)导液管插入颈静脉。用伤口钳固定导管,装入含肝素的盐水(2%肝素钠),用小的不锈钢塞封口。

16小时禁食后,将12只长期插套管的鼠每组三只鼠分为四组。从尾静脉抽取0.4ml(血样,收集到含肝素锂的微容试管中并立即置于冰中(零时刻样品)。通过插入颈静脉的导管施用葡萄糖药团(1.0g/kg,50%葡萄糖(W/V水溶液),并用200 μl 盐水冲洗导管。二十秒后通过颈静脉导管给予测试物质的药团[每100g体重量100 μl 赋形剂(含0.3%(W/V)牛血清白蛋白的盐水)或含类似物的赋形剂],如前冲洗导液管。在给葡萄糖药团后2,5,10,20和30分钟再从鼠的尾部

取血,如上处理血样。实验结束时,将血样离心,收集血浆。

用偶联的己糖磷酸激酶方法在临床化学分析仪中在实验的当天测定血浆葡萄糖浓度。用零校准器稀释用于胰岛素测定的血浆并在 -20°C 冷冻至分析时。用鼠胰岛素为标准,用商售放射免疫测定药盒测定胰岛素浓度。

以 t 时刻胰岛素浓度和零时刻胰岛素浓度之间的不同计算胰岛素变化(由基线值开始胰岛素的变化)。用不规则四边形规则计算胰岛素变化曲线下的面积。以 t 时刻血浆葡萄糖浓度与零时刻血浆葡萄糖浓度之间的差异计算血浆葡萄糖变化(基线值以上血浆葡萄糖的增加)。用不规则四边形规则计算血浆葡萄糖变化曲线下的面积。以平均值 \pm 平均标准误差(SEM)列出所得值。

b) 高血糖抑制研究

在长期插入导管的体重大约350克正常的雄性Sprague Dawley鼠身上进行实验。在研究前至少一个星期,在异氟烷麻醉下对小鼠手术。在颈静脉埋值两导液管以输注葡萄糖和肽,一根导管插入颈动脉以取血样。通过头顶皮将导管外置,充入甘油/肝素溶液(3:1, V/V),并用一厘米不锈钢塞封口。分别在网笼内在室内喂养动物,使其自由进食标准鼠什锦馅饼和水。

在实验前使插管小鼠整夜禁食。实验的早晨,将鼠称重并使样品试管与长期导管连接。将试管装入轻的不锈钢弹簧片中以保护。研究期间,将鼠自由地放在带大约1英寸铺垫的塑料鞋盒笼中(12"×10"×12")。适应15分钟后,抽取基样测定胰岛素和葡萄糖含量。在-60分钟时间时,给鼠20%葡萄糖药团将血浆葡萄糖升至150mg/dl。通过每五分钟测定血浆葡萄糖浓度并相应调节被校准的变化的输注

泵,使血浆葡萄糖浓度在研究期间内保持在该水平。在-15和0分钟采集血样用于基线测定。抽取零分钟样品后立即通过颈静脉导管注入肽(130-155 μ M现有浓度,在磷酸缓冲盐水中稀释)。并用盐水冲洗。在2,4,6,8,10,12,15,20,25,30,40,50,60,70,80和90分钟抽取血样测定胰岛素和葡萄糖,所有血样收集在肝素钠涂层的注射器中,移至微离心试管并置于冰中。然后在微离心机中将血样离心分离血浆成份。

研究的同一天,用贝克曼葡萄糖分析仪 2 用葡萄糖氧化酶方法测定血浆葡萄糖含量,同时用商售药盒(Diagnostic Products Corporation)用鼠胰岛素为标准测定胰岛素浓度。

以t时刻胰岛素浓度和注射实验物质之前平均胰岛素浓度之间的差异计算胰岛素变化(由基线值开始胰岛素的变化)。用不规则四边形规则计算胰岛素变化曲线下的面积。以t时刻葡萄糖输入速度值和注入实验物质前平均葡萄糖输注速度值之间的差异,被注入实验物质前平均葡萄糖输注速度除,乘100,来计算葡萄糖输入速度变化(由基线值开始葡萄糖输注速度百分比变化)。用不规则四边形规则以绝对葡萄糖输注速度变化值为基础(以t时刻葡萄糖输注速度值和注射实验物质前葡萄糖输入速度间的差异计算)计算葡萄糖输注速度变化值曲线下的面积。用平均值 \pm 平均标准误差(SEM)列出所得值。

表 4

鼠静脉内葡萄糖(1 g/kg)耐药性试验

化合物	剂量 (mg/kg)	n	胰岛素变	最大胰	10分钟时
			化AUC (ng/ml·分钟 0-15分钟 ^a)	岛素变 化 (ng/ml) ^b	胰岛素变 化 (ng/ml) ^c
赋形剂	0	196	33±1	2.9±0.1	2.2±0.1
GLP-1(7-36)NH ₂	0.2	5	34±1	4.0±0.8	1.8±0.5
	0.3	4	50±13	6.1±0.7	2.2±1.2
	0.4	5	73±14	7.7±1.0	3.8±1.0
	0.6	6	67±11	7.7±1.2	3.4±0.9
	0.8	3	97±25	11.3±2.8	4.1±1.8
	1.0	8	89±16	11.4±2.3	3.9±0.7
	2.0	5	106±11	11.7±1.3	4.9±0.7
GLP-1(7-37)OH	0.6	3	79±8	7.8±1.1	5.4±1.2
	0.92	2	75±12	8.4±0.2	3.5±1.2
	1.2	3	77±17	8.4±1.6	4.2±1.3
N-咪唑基丙酰-	0.05	3	49±6	4.9±0.9	2.5±0.2
	0.15	3	55±8	5.9±1.4	2.8±0.1
GLP-1(8-36)NH ₂	0.3	3	98±29	10.5±2.3	5.5±1.4
	0.6	3	105±4	13.0±0.4	4.8±0.1
	0.92	3	95±11	12.0±1.2	4.0±0.5
	1.2	2	117±6	13.7±0.5	6.0±0.4
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ -	1.2	2	85±13	9.8±2.5	3.6±0.5
	2.4	3	170±16	16.5±3.9	9.8±2.5
GLP-1(8-37)OH					
N-咪唑基丙酰-	0.1	3	70±4	7.8±0.3	3.2±0.5
	0.2	9	92±6	10.2±0.6	5.0±0.6
GLP-1(8-37)OH	0.4	6	74±12	7.7±1.6	4.8±0.7
	0.8	6	121±16	13.3±1.8	7.5±1.1
	1.0	4	98±11	12.4±1.6	5.4±0.4
	2.0	4	127±24	16.1±3.0	5.9±1.1
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ -	0.6	2	114±13	11.8±2.1	7.7±0.8
	0.92	3	85±7	9.2±1.8	5.5±0.9
GLP-1(8-37)OH	1.2	6	127±13	12.9±1.8	8.2±1.1
Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基	0.6	3	33±8	5.0±2.3	1.3±0.2
	1.2	3	136±30	13.1±2.0	10.0±2.8
GLP-1(7-37)OH					
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ -	1.2	6	100±18	8.5±1.7	8.3±1.5
	1.6	3	60±11	5.9±1.6	4.3±0.7
Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基	2.4	3	128±22	12.9±2.5	10.1±1.6
GLP-1(8-37)OH					

a 胰岛素变化A1C:胰岛素变化曲线下的面积; 代表肽总的亲胰岛素活性。

b 最大胰岛素变化:基线以上胰岛素的最大增加(通常是注射后五分钟)。

c 10分钟时胰岛素变化:注射后10分钟由基线测定胰岛素的变化。在活性类似物中,该值越接近最大胰岛素变化(百分比),类似物作用时间越长。

表 5

鼠静脉内高血糖(150mg/dl)抑制试验

化合物	剂量 (μ g/kg)	n	胰岛素效 果持续时 间 (分钟) ^a	最大胰 岛素变 化 (ng/ml) ^b	胰岛素 变化AUC ^c (ng/ml.分钟; 0-15分) ^c	GIR 变化AUC (mg/kg; 0-30分钟) ^d
赋形剂	0	4	无活性	0.1±0.1	0.5±1.7	39±10
GLP-1(7-37)OH	0.05	4	6	1.6±0.3	3.0±1.6	48±22
	0.1	4	6	3.6±1.2	7.3±2.9	150±25
	0.2	3	6	2.8±0.1	5.8±0.9	154±10
	0.6	4	6	4.9±1.3	14.9±2.9	151±16
	1.0	5	6	7.7±0.8	16.7±1.0	131±29
	2.0	4	6	3.6±0.9	11.5±1.0	152±36
	4.0	4	40	2.0±0.4	10.4±5.0	139±27
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - GLP-1(8-37)OH	1.0	5	13	0.6±2.2	25.0±3.6	32±14.5
Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰基 GLP-1(7-37)OH	1.0	4	4	2.4±0.8	13.2±2.5	132±38
N-咪唑基丙酰- Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰 GLP-1(8-37)OH	1.0	5	5	1.0±0.2	7.0±2.5	183±38
-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ^ε 辛酰 GLP-1(7-37)OH	0.05	4	30	0.7±0.2	6.3±1.4	75±32
	1.0	4	20	5.2±1.8	15.5±10.9	29±12.5
	2.0	5	10	3.8±0.9	32.5±10.4	245±58
	4.0	5	20	4.7±0.8	35.7±4.8	271±71
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ^ε -辛酰 GLP-(8-37)OH	0.05	4	8	0.5±0.2	1.3±1.4	124±34
	1.0	5	30	4.2±1.3	26.5±7.8	218±41
	2.0	4	60	5.2±2.1	45.4±15.5	351±66
	4.0	4	40	6.0±3.0	45.5±13.8	380±10
N-咪唑基丙酰-Arg ²⁶ - Lys ³⁴ -N ^ε -癸酰 GLP-1(8-37)OH	1.0	4	15	0.8±0.1	1.5±2.0	83±17

- a 胰岛素效果的持续时间:胰岛素平均变化 > 0 ng/ml期间内的时间。
- b 最大胰岛素变化:90分钟试验期内,基线上胰岛素最大增加。
- c 胰岛素变化AUC:胰岛素变化曲线下的面积;代表肽总的亲胰岛素效果。
- d GIR 变化AUC:葡萄糖输注速度变化(以mg/kg/分钟表示)曲线下的面积;代表肽的总的代谢效果。