(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1501809 B
(45)授权公告日 2012.10.10

(21)申请号 01820624.7

(22)申请日 2001.12.07

(30)优先权数据
60/255,251 2000.12.13 US
60/295,655 2001.06.04 US
60/298,652 2001.06.15 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2003.06.13

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2001/044698 2001.12.07

(87)PCT申请的公布数据
WO2002/047716 EN 2002.06.20

(73)专利权人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州

(72)发明人 S·W·多德 K·F·梅斯
M·E·特劳特曼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 曹雯 孟凡宏

(51)Int.Cl.
A61K 38/26(2006.01)

(56)对比文件
US 5977071 A, 全文.
EP 0926159 A, 全文.
CN 1227567 A,1999.09.01, 说明书第2-3页.

审查员 罗德明

权利要求书 1 页 说明书 24 页
序列表 14 页 附图 4 页

(54)发明名称

应用胰高血糖素样促胰岛肽的长期治疗方案

(57)摘要

本发明涉及通过使GLP-1化合物血清水平的长期稳定状态维持在某一特定的范围内来治疗疾病。

CN 1501809 B

1. $Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)用于制备治疗II型糖尿病或肥胖症的药物的用途，其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)的长期稳定状态血浆水平维持在60/X pmol到200/X pmol之间，其中X是$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)相对于给定参考值为1的Val^{8}-GLP-1(7-37)OH的EC50体外效力，并且其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)通过皮下注射施用于人受试者，每24小时不多于一次或两次。

2. 根据权利要求1的用途，其中所述血浆水平维持在100/X pmol到200/X pmol之间。

3. 根据权利要求1或权利要求2的用途，其中所述血浆水平维持在100/X pmol到180/X pmol之间。

4. 根据权利要求1的用途，其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)具有Val^{8}-GLP-1(7-37)OH的两倍以内的EC50体外效力，其中所述治疗包括将$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)的长期稳定状态血浆水平维持在60pmol到200pmol之间，并且其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)通过皮下注射施用于人受试者，每24小时不多于一次或两次。

5. 根据权利要求4的用途，其中所述血浆水平维持在100pmol到200pmol之间。

6. 根据权利要求4或权利要求5的用途，其中所述血浆水平维持在100pmol到180pmol之间。

7. 根据权利要求1到6的任一项的用途，其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)每24小时施用不多于一次。

8. 根据任一项前述权利要求的用途，其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)在6天每天一次长期给药后达到稳定态血浆水平。

9. 根据权利要求8的用途，其中$Arg^{34}LyS^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)在6天每天一次长期给药后在血浆中积累约3倍。

应用胰高血糖素样促胰岛肽的长期治疗方案

[0001] 本申请要求下述美国临时申请的权益，它们是2000年12月13日提交的60/255,251,2001年6月4日提交的60/295,655和2001年6月15日提交的60/298,652。

[0002] 1. 发明领域

[0003] 本发明涉及在药物制品和制备方法中应用胰高血糖素－样促胰岛肽的长期治疗方案。

[0004] 2. 背景资料

[0005] 由于肠激素胰高血糖素－样肽-1(GLP-1)具有刺激胰岛素分泌、降低高血糖素素分泌、抑制胃排空、提高葡萄糖利用、和诱导食欲抑制以及重量损失的能力，因而很有希望成为一种II型糖尿病的治疗剂。此外，前临床研究显示GLP-1还可能对阻止该病发展过程中出现的β－细胞恶化起作用。GLP-1最突出的特性有可能是它在不伴有低血糖症的情况下能够刺激胰岛素分泌，已知在利用胰岛素疗法和一些口服治疗类型中经常发生低血糖症。当血糖水平降低到某一阈值时，GLP-1是没有活性的。

[0006] 但有关GLP-1肽的治疗用途受到下述事实的限制，即：GLP-1(1-37)的活性很低，而且两种天然存在的截短肽GLP-1(7-37)OH和GLP-1(7-36)NH_2的半衰期都极短，因而会被迅速地从环境中清除。因此，有关GLP-1的研究多集中在研制能提供更长作用时间的GLP-1类似物、GLP-1衍生物及其制剂上。尽管在这一研究领域已取得了很多进展，但仍没有文章报道有关长效GLP-1类似物或衍生物施用于人的临床资料。在本发明以前，不清楚具有特别效力的稳定水平GLP-1化合物是否能在长期的治疗过程中安全地保持，并与已阐明活性的内源GLP-1联合发挥作用。

[0007] 一些对需要连续注射或频繁给药的天然GLP-1进行的短期研究表明，高浓度的GLP-1引起频繁的恶心和呕吐。这已经引起了临床医生的关注，因为尽管药物本身能够产生很好的效果，但这些不希望有的效果将使给药剂量受到限制，并由此影响药效。

[0008] 已有几篇涉及通过静脉注射或皮下连续注射向患者施用天然GLP- 1(7-37)OH的临床研究报告发表，参见Naslund,等(1999)Am.J.Phys.277(3):1-14;Deacon,等(1995)Diabetes44:1126-1131;Toft-Nielsen,等(1999)Diabetes Care22(7):1137-1143。所发表的研究结果都是在短时期内使用约0.75pmol/kg/min到2.4pmol/kg/min的剂量。然而，因为GLP-1(7-37)OH一旦暴露于血浆即被迅速地降解，所以并不能总是明确，在给定的时间点完整/活性的GLP-1肽在血浆中的水平如何。

[0009] 尽管如此，Naslund,等在以0.75pmol/kg/min的速率连续施用180min后，预测了完整GLP-1(7-37)OH的血浆水平。作者利用夹心放射免疫法检测了N-末端降解的和完整的GLP-1(7-37)OH。在治疗的最后120min，完整的GLP-1的血浆水平是大约20pmol。利用类似的试验Toft-Nielsen等报道了在以1.2pmol/kg/min和2.4pmol/kg/min给药后，完整的GLP-1的水平分别为10.2pmol和22.5pmol。

[0010] 但这些研究并不能回答下面的问题，即是否可以达到完整的和活性的GLP-1的血浆水平，使得在实现治疗效果的同时避免副作用，例如恶心和呕吐或使之最小化。同样，这些研究也不能表明活性的GLP-1的血浆水平在治疗过程中应当相对平稳，还是模仿生理状态下产

生峰值和谷值更为优选。因此，尽管已取得了相当的进展，仍需发现和认识怎样的治疗方案可形成有效的长期治疗，并且是否这种治疗能维持最低限度的副作用，例如恶心和呕吐。

[0011] 申请人发现使 GLP-1 化合物连续的血浆水平维持在某种特定的范围内可提供有效的治疗。据信没有峰值谷值可防止副作用例如恶心和呕吐，或使其最小化。因此，本发明提供一种包括使 GLP-1 化合物连续的血浆水平维持在某一范围内的长期治疗方案，其可避免副作用例如恶心和呕吐或使其最小化。本发明中所包含的血浆水平提供最佳的血糖控制。此外，这一治疗方案提供长期的积极的健康效果，包括诱导重量减轻、改善 β 细胞功能、活化休眠的 β 细胞、使细胞分化为 β 细胞，β 细胞增殖和保持器官功能。

[0012] 本发明包括使血糖水平正常化、阻止 β 细胞恶化、诱导重量减轻、或治疗下述疾病的方法，所述疾病包括：高血糖、II 型糖尿病、肥胖症、中风、心肌梗死、外科后出现的代谢改变和过敏性肠综合征，该 方法包括使 GLP-1 类似物或衍生物以生物活性形式，将长期稳定状态血浆水平维持在大约 60pmol/l 到大约 200pmol/l 之间，所述的生物活性形式在体外的效力处于 Val^8-GLP-1(7-37)OH 在体外效力两倍以内，其中所述的 GLP-1 类似物或衍生物通过皮下注射施用，每 24 小时仅一次或两次。

[0013] 本发明还包括使血糖水平正常化、阻止 β 细胞恶化、诱导重量减轻、或治疗下述疾病的方法，所述疾病选自：高血糖、II 型糖尿病、肥胖症、中风、心肌梗死、外科后出现的代谢改变和过敏性肠综合征，该方法包括使 GLP-1 类似物或衍生物以生物活性形式，将长期稳定状态血浆水平维持在大约 60/X pmol 到大约 200/X pmol 之间，其中 X 是所述的 GLP-1 类似物或衍生物相对于给定参考值为 1 的 Val^8-GLP-1(7-37)OH 在体外的效力，其中所述的 GLP-1 类似物或衍生物通过皮下注射施用，每 24 小时仅一次或两次。

[0014] 本发明还包括应用具有 Val^8-GLP-1(7-37)OH 体外效力两倍以内体外效力的 GLP-1 类似物或衍生物制造使血糖水平正常化、保护 β 细胞、诱导重量减轻、或治疗下述疾病的药剂，所述的疾病选自：高血糖、II 型糖尿病、肥胖症、中风、心肌梗死、外科后出现的代谢改变、肥胖症和过敏性肠综合征，其包括使 GLP-1 类似物或衍生物长期稳定状态血浆水平维持在大约 60pmol 到大约 200pmol 之间，其中所述的 GLP-1 类似物或衍生物通过皮下注射施用，每 24 小时仅一次或两次。

[0015] 本发明还包括应用 GLP-1 类似物或衍生物制造使血糖水平正常化、保护 β 细胞、诱导重量减轻、或治疗下述疾病的药剂，所述的疾病选自：高血糖、II 型糖尿病、肥胖症、中风、心肌梗死、外科后出现的代谢改变和过敏性肠综合征，其包括使 GLP-1 类似物或衍生物长期稳定状态血浆水平维持在大约 60/Xpmol 到大约 200/Xpmol 之间，其中 X 是所述的 GLP-1 类似物或衍生物相对于给定参考值为 1 的 Val^8-GLP-1(7-37)OH 在体外的效力，其中所述的 GLP-1 类似物或衍生物通过皮下注射施用，每 24 小时仅一次或两次。

[0016] 本发明还包括一种人药用制品，该制品包含容器、含有具有 Val^8-GLP-1(7-37)OH 体外效力两倍以内体外效力的 GLP-1 类似物或衍生物剂型和包装说明书，说明书中提供了使 GLP-1 类似物或衍生物血浆水平保持在约 60pmol 到约 200pmol 之间的该剂型给药方法。

[0017] 图 1：表示对 II 型糖尿病患者每天一次施用安慰剂（基准），2.5mg（组 1），和 3.5mg（组 2）Val^8-GLP-1(7-37)OH 后的平均 (+/-SEM) 血浆 Val^8-GLP-1(7-37)OH 浓度。

[0018] 表示对 II 型糖尿病患者每天一次施用安慰剂（基准），2.5mg（组 1），和 3.5mg（组 2）Val18-GLP-1(7-37)OH 后的平均 (+/-SEM) 血浆 Val18-GLP-1(7-37)OH 浓度。

[0019] 图 2 :表示对 II 型糖尿病患者每天一次施用安慰剂 (基准),2.5mg(组 1),和 3.5mg(组 2)Val^8-GLP-1(7-37)OH 后的平均 (+/-SEM) 血浆葡萄糖浓度。

[0020] 图 3 :表示对 II 型糖尿病患者每天一次施用安慰剂 (基准),4.5mg(组 3 和 4) Val^8-GLP-1(7-37)OH 后的平均 (+/-SEM) 血浆 Val^8-GLP-1(7-37)OH 浓度。

[0021] 图 4 :表示对 II 型糖尿病患者每天一次施用安慰剂 (基准),4.5mg(组 3 和 4) Val^8-GLP-1(7-37)OH 后的平均 (+/-SEM) 血浆葡萄糖浓度。

[0022] 为公开和描述本发明,对下述术语和缩写进行了如下定义。

[0023] " 治疗方案" 是一种使 GLP-1 化合物最佳的血浆水平得以长期维持的给药方法。本发明的治疗方案中使用的 GLP-1 化合物是作为一种受体行使其生物功能,这种受体称为 GLP-1 受体。因此,本发明的治疗方案可用于治疗患有易于对 GLP-1 受体刺激、或施用 GLP-1 化合物产生应答的疾病和 / 或病征的受试者。

[0024] 因此,该治疗方案对治疗下述疾病具有多种积极效果,这些疾病包括但不限于治疗高血糖、维持血糖控制、治疗 II 型糖尿病、治疗肥胖症,诱导重量减轻,治疗中风,治疗心肌梗死,治疗由于外科手术后或其他原因导致的代谢变化,治疗过敏性肠综合征,阻止 β - 细胞恶化、诱导 β - 细胞增殖、刺激胰岛素基因转录,上调 IDX-1/PDX-1 或其它生长因子,改善 β - 细胞功能,活化休眠的 β - 细胞,使细胞分化为 β - 细胞和 / 或 β 细胞复制。在延续的时间段内始终使血浆水平保持在一个特定的范围内所产生的积极效果包括 :使与正在进行治疗的疾病或病症相关的症状得以改善,使与正在进行治疗的疾病或病症相关的症状发作得以延迟,与不进行所述治疗相比寿命有所延长,和 / 或与不进行所述治疗相比生命品质得以提高。本发明的治疗方案涉及治疗 II 型糖尿病和与之相关的高血糖,其进一步的有益之处在于,由于消除或降低了血糖自我监控并且给药也无需与进餐同步进行,因而更加方便。

[0025] " 长期治疗" 是指在治疗过程中使活性 GLP-1 化合物血浆水平维持在一种特定范围内。该特定范围表示活性 GLP-1 化合物的血浆水平,其能提供最佳的效力但不引起副作用,例如恶心和呕吐或使之最小化。计划的疗程依所要治疗的疾病或病症的不同而有所不同。例如 :针对不能用口服治疗控制血糖水平的 II 型糖尿病患者的疗程,将包括该患者具有足够的 β 细胞功能,以对 GLP-1 受体刺激产生应答的时期。一种针对肥胖患者或希望体重减轻的患者制定的疗程,将包括直到使所述的患者达到在该患者的身高和体格基础之上的正常体重为止的时期。指定的疗程也可以具有预防疾病的目的,例如阻止 II 型糖尿病的发展,肥胖症的演变,葡糖耐量削弱,x 综合症,或阻止体重增加。这种治疗能在患者的一生中持续进行。

[0026] " 长期的" 通常是指在延续的时段中定期给药,优选地是不多于每天两次,最优选地是至多每天一次。但此处所使用的长期给药还可以包括除每天一或两次剂量之外的其他治疗方案。例如,长期给药包括施用可定期提供充足的治疗性血浆水平的持续释放剂型。这种给药方式可包括一周给药一次,一月一次乃至更低的给药频率。与急性的或即时给药相反,长期给药不与进餐、内部葡萄糖检测结果等情况相联系,也无需抑制食欲。

[0027] " 促胰岛活性" 指能够根据升高的葡萄糖水平刺激胰岛素分泌,从而使细胞摄取葡萄糖、降低血浆葡萄糖水平。促胰岛活性可以通过本领域已知的方法评估,包括使用测定 GLP-1 受体结合活性或受体激活作用的体内实验和体外试验,如分别在 EP619,322, Gelfand,等,和 U.S.Patent No.5,120,712 中所描述的胰岛细胞或胰岛瘤细胞的试验。这

些文献中的全部内容在此引入作为参考。在人体中通常是通过测定胰岛素水平或 C- 肽水平测定促胰岛活性。

[0028] ″容器″是指适于存储、运输、分发、和 / 或操作药物产品的任何容器和闭合物。

[0029] ″包装″指一种便于消费者给药的装置，和 / 或帮助递送，训练和 / 或施用的辅助装置。所述的包装可以改善 GLP-1 化合物向患者的施用，减少或优化患者了解说明书的时间，提供一种用于改进健康经济分析的平台，和 / 或减少工作量分配渠道。同时、该包装还可包括但不局限于纸包装、热缩塑料包装、透明顶部包装，试用装、教育性的材料、辅助设备和 / 或传送装置。

[0030] ″包装说明书″指的是随产品发送的，用于介绍如何施用所述产品资料，和使医生、药剂师和患者做出有关使用该产品理性判断所需的安全和功效数据，和 / 或对患者的教育性资料。所述的包装说明书通常被认为是药剂的″标签″。

[0031] 一种″受试者″或″患者″是人。

[0032] 此处所用到的″在体外的效力″是衡量化合物在细胞试验中激活 GLP-1 受体的能力或药效的衡量标准。在体外药效可以表示为该″ EC50″其是化合物在单次剂量反应实验中产生 50％活性的有效浓度。为本发明的目的通过应用稳定表达人 GLP-1 受体的 HEK-293Aurora CRE-BLAM 细胞的荧光试验确定在体外的药效。该试验在第 17 页的实施例 3 中有更详细的描述。此处所公开的体外药效值以 EC_{50} 表示，其是通过由稀释产生的 3 毫微摩尔到 30 毫微摩尔浓度的 GLP-1 化合物制作的剂量反应曲线来确定的。相对的体外药效值是用 Val^8-GLP-1(7-37)OH 作为对照建立的，赋予该对照的参考值为 1。

[0033] 本发明的 GLP-1 化合物与 GLP-1(7-37)OH 或 GLP-1(7-37)OH 的片段具有足够的同源性，以使得该化合物具有结合 GLP-1 受体并引发信号转导途径，产生本申请所描述的促胰岛作用或其他的生理效果，例如胰高血糖素抑制和延缓胃排空。例如 :可利用在 EP619322 中描述的细胞试验检验 GLP-1 化合物的促胰岛活性，EP619322 中描述的方法是 lacy，等 (1967) Diabetes16 :35-39 中描述的方法的一种改进方法。胶原酶消化的胰腺组织在 Ficoll 梯度溶液 (27％、23％、20.5％，和 11％的 Hank 的平衡盐液 pH7.4) 中分离。从 20.5％ /11％界面中收集胰岛，洗涤并在立体显微镜下精选不含外分泌物和其他组织的胰岛。将上述胰岛在添加了 10％胎儿牛血浆并且包含 11mM 葡萄糖的 RPMI1640 培养基中于 37℃和 95％空气 /5％ CO_2 的条件下温育过夜。在添加了 10％胎儿牛血浆并且包含 16.7mM 葡萄糖的 RPMI1640 培养基中制备一定浓度范围的待研究 GLP-1 化合物，优选地是 3 毫微摩尔到 30 毫微摩尔。用移液管将分离出的约 8 到 10 个胰岛转移到 96 孔板 中总体积为 250μl 的含 GLP-1 化合物的培养基中。所述的胰岛在 GLP-1 化合物存在下，于 37℃和 95％空气 /5％ CO_2 的条件下温育 90min。然后收集小份的不含胰岛的培养基，取其中的 100μl，用 Equate InsulinRIAKit(Binax, Inc., Portland, ME) 通过放射免疫测定分析其中胰岛素的量。

[0034] 优选地，本发明的 GLP-1 化合物的体外药效比 Val^8-GLP-1(7-37)OH 的体外药效低至多 10 倍。优选地是，所述的 GLP-1 的体外药效不低于 Val^8-GLP-1(7-37)OH 的体外药效。下面将详细讨论代表性的 GLP-1 化合物。而且，用于此处所述的长期治疗方案的 GLP-1 可能需要经过修饰或制剂，以使得血浆水平在延续的时间段中保持在所声称的有效范围中。下面还将详细描述经修饰和制剂的 GLP-1 化合物。

[0035] 虽然已有动议可将 GLP-1 用于治疗 II 型糖尿病，但由于其半衰期短且对蛋白酶降

解作用敏感，使其成为难于进行研究的分子。而且已观察到单一皮下注射、静脉注射、大丸剂施用活性 GLP-1 可引起副作用，如恶心和呕吐。申请人认为这是由于施用所述化合物后立即获得的起始峰水平造成的。为使短期作用剂型能提供治疗效果，必须注射足够高的剂量以提供治疗范围内的血液水平，至少是足以完成进餐后葡萄糖降低的效果。这些在施用相对高剂量的短期作用 GLP-1 剂型后出现的不希望有的效果限制了可向患者施用的量，并由此降低了功效。

[0036] 临床研究已经确定了部分 GLP-1 生理效果，其包括刺激胰岛素分泌、抑制胰高血糖素分泌、降低肝葡萄糖产量、抑制胃排空，和促进体重减轻。但是除非活性 GLP-1 的药物水平在整个治疗过程中连续地存在，否则不能将 GLP-1 化合物有效地应用于治疗方案中。为完全开发血糖降低潜力以及此处描述的其他长期生理效果上述情况的确是事实。

[0037] 据此，本发明描述了活性 GLP-1 化合物的稳定态血浆水平，其具有实现所需功效所必须的药效，且可避免副作用，例如恶心和呕吐或使副作用最小化。当药物的消除，即清除的产物，与药物的利用率相当时，即达到了所述的药物稳定态浓度。在周期性的剂量范围中，在每次给药间隔期间，药物的浓度会有升高和降低。在稳定态，整个周期中在每个间隔都是反复同一的。但如此处所述，在剂量之间活性 GLP-1 血浆浓度标记性的波动产生副作用例如恶心和呕吐，不产生最佳的生物应答。

[0038] 本发明的治疗方案包括施用 GLP-1 化合物以便在针对特定疾病的特定治疗过程中使该化合物维持连续稳态的血浆水平。在本发明的上下文中，″ 维持″ 血浆水平指在治疗过程中药物血浆浓度一旦达到稳定态就不再产生明显的起伏，从而使副作用例如恶心和呕吐得以避免或最小化，进而获得最佳的治疗效果。如果药物水平保持在请求保护的有效范围内，一旦达到了稳定态血浆水平药物水平就不再明显地起伏。令人惊讶的是，在这一循环中外部施用的具有与天然 GLP-1 类似药效的 GLP-1 化合物的治疗性血浆水平明显高于内源分泌的 GLP-1 的水平。

[0039] 本发明是以临床实验数据为基础的，其中长效 GLP-1 剂型是通过皮下注射给药的，以三种不同的剂量水平每天给药一次。定期给药 6 天后，药物水平达到稳定态平台，也就是说在治疗过程中可连续地保持。本发明的长期治疗方案可以包括连续施用 GLP-1 化合物，使血浆水平处于本发明所述的范围内，优选地包括施用长效 GLP-1 化合物。在本发明的上下文中，长效是指在一次给药剂量之后活性 GLP-1 化合物的血浆水平在本发明所描述的治疗范围内可维持至少 12 小时。优选地是在一次给药剂量后血浆水平在这一范围内至少维持 24 小时。有了这种优选的定时作用即可实施一天给药一次。

[0040] 在第一天施用了含 Val^8-GLP-1(7-37)OH 持续释放剂型之后，在相应施用 2.5mg，3.5mg，和两组 4.5mg 剂量时，即可分别达到 105，147，300，和 222pg/mL 的平均 Cmax 值。这些 Cmax 代表接受以上述给定剂量之一进行治疗的第一天，8 个为一组的病人所达到的完整 Val^8-GLP-1(7-37)OH 平均最大血浆浓度（参见图 1 和 3）。三组 Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆浓度导致 200pg/mL 以上水平的葡萄糖降低表现出了最显著的效果（表 1）。检查平均血浆分布图表明，稳定态基本上是在一天一次的剂量进行 6 天后形成的，且药物的积累大约是 3 倍。在第 6 天 2.5mg，3.5mg，和 4.5mg 剂量组的平均 Cmax 值分别是 534，525 和 570pg/ml。相应的代表活性药物溶出 (exposure) 的 $AUC_{(0-24)}$ 值与之类似，分别为 8878，9846，和 10619ng*h/L。因此，剂量上 1.8 倍的提高与平均稳定态溶出 $AUC_{(0-24)}$ 相联系（参见图 1 和 3）。

[0041] 表 1

[0042]

剂量 (mg)/组	参数	第 0 天 (安慰剂)	第 1 天	第 6 天	第 21 天
2.5/1	R_{max} (mg/dL) $AUC_{(0-4)}$ (mg*h/dL)	267(17.0) 901(18.8)	246(19.3) 833(19.2)	205(16.3) 654(21.2)	--
3.5/2	R_{max} (mg/dL) $AUC_{(0-4)}$ (mg*h/dL)	265(15.9) 871(18.2)	214(23.9) 738(22.2)	175(14.7) 557(14.3)	--
4.5/3	R_{max} (mg/dL) $AUC_{(0-4)}$ (mg*h/dL)	287(22.5) 995(24.1)	244(29.3) 834(31.5)	221(34.9) 704(35.0)	--
4.5/4	R_{max} (mg/dL) $AUC_{(0-4)}$ (mg*h/dL)	226(15.1) 759(14.8)	177(22.0) 592(20.4)	159(20.2) 529(21.0)	156(26.6) 516(33.5)

[0043] 缩写 :R_{max} = 最大浓度平均值 ;AUC = 曲线下的面积

[0044] 在所有的治疗组中,给药后可观察到剂量前空腹血糖的临床相关性降低。在治疗的第 6 天,所观察到的以 Rmax 表示的平均最大浓度低于安慰剂组,变动范围在 23%到 34%之间。而且,第 6 天的葡萄糖反应与治疗 21 天后所观察到的情况类似 (参见图 2 和 4)。在相应于 2.5mg 和 3.5mg 剂量的稳定态浓度,所述反应达到平稳状态,所述的 2.5mg 和 3.5mg 剂量分别导致 534 和 525pg/mL 的 Cmax 值。出乎意料地,在具有低于 600pg/mL 血浆水平的组中,没有发生严重的恶心和呕吐,仅有偶然的、通常只观察到短暂急性发作的恶心或呕吐。一个患者接受了产生 Cmax 的达 990pg/mLVal^8-GLP-1(7-37)OH 的剂量,这一较高剂量与一定程度的恶心相关。

[0045] 此外,在治疗组中出现了体重减轻。在 21 天的给药期间每个患者 体重减轻的平均数量为约 2.1kg。

[0046] 因为具有类似药效的 GLP-1 化合物的分子量可能有所不同,所观察到的 Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平由 pg/mL 转换为 pmol(pmoles/L)。因此提供最大功效并避免副作用,例如恶心和呕吐或使之最小化的血浆水平优选范围在约 60 到约 200pmol/l,这是由于 GLP-1 化合物具有类似于或两倍于 Val^8-GLP-1(7-37)OH 药效之内的功效。更优选的血浆水平在约 80pmol 到约 200pmol 之间。更优选的血浆水平在约 100pmol 到约 200pmol 之间。

[0047] 因此,本发明还涉及具有类似于或两倍于 Val^8-GLP-1(7-37)OH 药效之内功效的 GLP-1 化合物在制造下列药物中的应用,所述的药物用于使血糖正常化,保护 β 细胞,诱导体重减轻或用于治疗下述的疾病 :高血糖、II 型糖尿病、中风、心肌梗死、外科后出现的代谢改变、肥胖症和过敏性肠综合征,其中所述的药剂适于长期使用以使 GLP-1 化合物的长期稳定状态血浆水平维持在大约 60pmol/l 到大约 200pmol/l 之间,优选地在约 80pmol 到约 200pmol 之间,更优选地是在约 100pmol 到约 200pmol 之间。

[0048] 此处所讨论的血浆水平是指在血浆中测定的活性 GLP-1 化合物浓度。血浆中包含已知的可即时地切除 GLP-1 化合物 N- 末端的氨基酸的 DPP-IV 酶。已知 GLP-1 必须在其 N- 末端具有一个完整的组氨酸有待被激活。例如 GLP1(7-37)OH 一旦释放到血浆中即被迅速地降解为 GLP-1(9-37)OH。GLP-1(9-37)OH 是非活性的。另外,也可通过在 C- 末端的裂解使 GLP-1 失活。失活的 GLP-1(7-33) 代谢物也在文献中有所报道。此处所描述的 Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平是利用夹心放射免疫法测定的。所述的试验利用可特异识别完整 Val^8-GLP-1(7-37)OH 氨基末端的抗体与可识别 Val^8-GLP-1(7-37)OH 完整 C 末端的抗体相结合进行。因此只测定出活性 Val^8-GLP-1(7-37)OH 的血浆水平 (参见实施例 2)。

[0049] 除 Val^8-GLP-1(7-37)OH 之外的活性 GLP-1 化合物血浆水平也可以通过类似的方法进行测定,即用本领域已知的方法生成可特异地识别待测化合物完整 N- 末端且不与天

然 GLP-1 产生交叉反应的抗体。

[0050] 一些 GLP-1 衍生物，如 $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37) 是长效作用的，这是因为它们与血浆白蛋白结合，再缓慢地与白蛋白分离并作为非结合的衍生物释放到血浆中，这种非结合的衍生物可与 GLP-1 受体结合产生信号。在本发明中血浆水平是指活性 GLP-1 衍生物，如 $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7-37) 的浓度，其存在于血浆中不与白蛋白结合。

[0051] 为达到最强的药效同时使副作用最小化，在治疗过程中一旦形成了稳定态 GLP-1 化合物的水平即不应该再有明显的起伏变化。如果在治疗过程中一旦达到稳定态水平，它们即维持在本发明所描述的范围内血浆水平就不会发生明显的变化。最优选地是一旦达到稳定态，具有类似于或两倍于 Val^8-GLP-1(7-37)OH 药效之内功效的 GLP-1 化合物的血浆水平在整个治疗过程中保持在约 100pmol 到约 200pmol。例如，图 3 描述了 Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平，其在每天给药一次的 15 天的疗程中保持平稳，没有明显的起伏。血浆水平保持在相应于 120pmol 到 180pmol 的约 400 到约 600pg/mL。

[0052] 适合于 Val^8-GLP-1(7-37)OH 和具有类似药效的 GLP-1 化合物（参见表 2）的最佳血浆水平范围，也可应用于其他 GLP-1 化合物，包括具有不同药效的 Exendin-3 和 Exendin-4。具有类似药效的 GLP-1 化合物包括那些经体外药效试验测定其药效在两倍 Val^8GLP-1(7-37)OH 药效范围内的化合物。

[0053] 优选地用于本发明的试验利用稳定表达人 GLP-1 受体的 HEK-293Aurora CRE BLAM 细胞测定 EC_{50} 效力。这些 HEK-293 稳定地整合了带有 cAMP 应答元件 (CRE) 的 DNA 载体，所述的 cAMP 应答元件 (CRE) 驱动 β-内酰胺酶 (BLAM) 基因的表达。GLP-1 激动剂与所述受体的相互作用引发一种信号，该信号导致 cAMP 应答元件活化接下来表达 β-内酰胺酶。β-内酰胺酶 CCF2/AM 底物添加到暴露于特定量 GLP-1 激动剂的细胞中可用于 GLP-1 激动剂效力的测定，所述的 β-内酰胺酶 CCF2/AM 底物被 β-内酰胺酶 (Aurora Biosciences Corp.) 切割后可发射荧光。所述的试验在 Zlokarnik，等 (1998)Science 279 :84-88（参见实施例 3) 中有进一步的描述。列于表 2 中的 EC50 值是经上述的 BLAM 试验，用 3 毫微摩尔到 30 毫微摩尔的稀释物产生剂量应答曲线确定的。

[0054] Exendin-4 比 Val^8-GLP-1(7-37)OH 效力高出约 5- 倍；因此 Exendin-4 的最佳血浆水平要比 Val^8-GLP-1(7-37)OH 及其类似效力的化合物低约 5- 倍。与之相应的血浆水平在约 6pmol 到约 40pmol 的范围内，优选地是约 12pmol 到约 30pmol。另一个提高了功效的 GLP-1 化合物的例子是 Val^8-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，其比 Val^8-GLP-1(7-37)OH 功效高出近 3 倍。因此该化合物的最佳血浆水平要比 Val^8-GLP-1(7-37)OH 低约 3 倍。

[0055] 表 2

[0056]

GLP-1 化合物	相对于 Val^8-GLP-1(7-37)oH 的体外活性
Val^8-GLP-1(7-37)OH	1
Val^8-GLP-1(7-36)NH_2	1.06
GLP-1(7-37)OH	2.06
GLP-1(7-36)NH_2	1.50
Gly^8-GLP-1(7-37)OH	1.67
Val^8-Tyr^{12}-GLP-1(7-37)OH	1.73

Val^{8}-Trp^{12}-GLP-1(7-37)OH	1.07
Val^{8}-Leu^{16}-GLP-1(7-37)OH	1.13
Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH	1.22
Exendin-4	4.5
Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH	3.33
Val^{8}-Arg^{26}-GLP-1(7-37)OH	1.47
Val^{8}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH	1
$Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-十六烷酰基)))-GLP-1(7- 37)	1.92

[0057] 由此可确定适合于与 Val^{8}GLP-1(7-37)OH 效力不同的 GLP-1 化合物的血浆水平范围。例如，特定的 GLP-1 化合物血浆水平范围在约 60/X 到 200/X 之间，优选地是在约 60/X 到 150/X 之间，最优选地是在约 100/X 到约 150/X 之间，其中 X 是 GLP-1 化合物相对于 Val^{8}-GLP-1(7-37)OH 的体外效力，其中 Val^{8}-GLP-1(7-37)OH 具有参考值 1。

[0058] 另外，本发明涉及 GLP-1 化合物在制造使血糖正常化，保护 β 细胞，诱导体重减轻的药物，或用于治疗下述的疾病：高血糖、II 型糖 尿病、中风、心肌梗死、外科后出现的代谢改变、肥胖症和过敏性肠综合征的药物中的应用，其中所述的药剂适于长期使用，以使 GLP-1 化合物的长期血浆水平维持在大约 60/Xpmol/l 到大约 200/Xpmol/l 之间，其中 X 是 GLP-1 化合物相对于具有参考值为 1 的 Val^{8}-GLP-1(7-37)OH 的体外效力。

[0059] 使血浆水平保持在本发明的发明人所发现的范围内提供了多种临床上的有益之处，以及从方便患者的角度来看的有益之处。使用这一治疗方案仅有极小的或者根本不存在低血糖的危险。另外，这一治疗方案使侵入性的，计划性的和 / 或耗时的可能情况最小化。而且，该治疗方案使降低血糖的自我监控与使用相协同，为患者提供了方便。最优选地是，对使用该治疗方案的受试者而言，血糖自我监控得以显著地减少或被排除了。例如，这种使用无需患者在进餐之前，期间或之后进行计划。最优选地是，受试者不需要把使用该治疗方案与任意量的葡萄糖、卡路里或营养物消耗事件相联系。而且，使用本发明优选地是限制了为确定受试者所需有效剂量而进行的任何剂量的滴定 (titration)。最优选地是由于无需剂量滴定可使一或两种剂量适合于所有的患者。

[0060] 尽管临床前的资料暗示了一些与 GLP-1 治疗相关的长期健康利益，但由于缺乏对达到这种利益所需的稳定态血浆水平的了解，目前还不能在病人中利用这些长期利益。

[0061] 如此处所述的保持完整 GLP-1 化合物的血浆水平导致由抑制高血糖素，上调促生长素抑制素，促进胰岛素基因转录，上调 IDX-1/PDX-1 或其它生长因子、改善 β 细胞功能，激活休眠的 β 细胞，使细胞分化为 β 细胞，β 细胞复制和 β 细胞增殖衍生出的长期利益。为了本发明的目的，保持 β 细胞的方法可归因于下述作用的全部、部分或其中之一，改善 β 细胞功能，激活休眠的 β 细胞，使细胞分化为 β 细胞，β 细胞复制和阻止 β 细胞退化，例如通过抑制细胞编程性死亡和通过 β 细胞增殖。

[0062] 保持此处所述的完整 GLP-1 化合物的血浆水平诱导出长期的利益，如由食欲抑制导致体重减轻或者体重欠增加。例如，通过这一长期治疗方案使肥胖症或与之相关的疾病得到治疗或预防。由较少的体重增加、没有体重增加和 / 或体重损失造成的任何或全部的体重减轻， 由于减少了与过度的体重下降，被迫使用所述的化合物由此减少潜在的血糖逸出和与之相伴的副作用相关的危险因素，而为受试者从整体上提供了生理和心理方面的积极效果。

[0063] 另一个长期与请求保护的血清水平范围内的 GLP-1 化合物溶出的有益之处包括，

消除了在第一次施用GLP-1化合物时出现的胃排空的延迟。通过分析与接受GLP-1化合物的患者进食相关的葡萄糖峰值出现时间，确定了由GLP-1化合物的存在引起的胃排空的延迟是约2到3小时。令人惊讶的是，在经GLP-1治疗6天后，葡萄糖峰值试验表明这一胃排空延迟现象得以消除。因此长期与请求保护的血清水平范围内的GLP-1化合物接触可消除GI作用，如胃排空延迟，从而提高患者对药物的耐受性并潜在地使副作用最小化。

[0064] 这一治疗方案可包括应用GLP-1化合物及其他降血糖药物，如二甲双胍，磺酰脲，噻唑烷二酮，和/或双胍一起使用。此处所述的血清浓度范围适合于GLP-1化合物用作单治疗剂(monotherapy)或与口服的抗糖尿病试剂一起施用的情况。

[0065] 术语"GLP-1化合物"是指GLP-1(7-37)OH和GLP-1(7-36)NH_2及其类似物和衍生物。GLP-1化合物也包括Exendin-3和Exendin-4及其类似物和衍生物。这些GLP-1化合物中的任意一种都可能需要进一步的修饰或制剂，以使得在单次剂量后血清浓度能在长时间内得以保持。GLP-1肽可通过多种已知的方法制备，如固相合成化学法，由天然来源中纯化GLP-1分子，重组DNA技术或这些方法的结合。例如在下列文献中所述的制备GLP-1肽的方法，即美国专利No.5,118,666,5,120,712,5,512,549,5,977,071和6,191,102。按本领域的习惯，GLP-1化合物的N-末端残基以位置7表示。

[0066] 两种天然存在的截短的GLP-1肽如式I，SEQ ID NO:1所示。

[0067] 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

[0068] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-

[0069] 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

[0070] Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-

[0071] 29 30 31 32 33 34 35 36 37

[0072] Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa

[0073] 式I，SEQ ID No:1

[0074] 其中：

[0075] 第37的Xaa是Gly，或$-NH_2$。

[0076] 优选地是，GLP-1化合物具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，或经修饰产生的与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列有1,2,3,4或5个氨基酸差异的氨基酸序列。

[0077] 一些已知的GLP-1化合物包括，如GLP-1(7-34)和GLP-1(7-35)，GLP-1(7-36)，Gln^9-GLP1(7-37)，D-Gln^9-GLP-1(7-37)，Thr^{16}-Lys^{18}-GLP-1(7-37)，和Lys^{18}-GLP-1(7-37)。GLP-1化合物，如GLP-1(7-34)和GLP-1(7-35)在美国专利No.5,118,666中有描述，该文献在此引入作为参考。其他已知具有生物活性的GLP-1类似物在美国专利No5,977,071；美国专利No.5,545,618；美国专利No.5,705,483；美国专利No.5,977,071；美国专利No.6,133,235；和Adelhorst，等，J.Biol.Chem.269:6275(1994)中有描述。

[0078] GLP-1化合物还包括在GLP-1(7-37)OH的N-末端和/或C-末端添加了一个或多个氨基酸所形成的肽或其片段或类似物。优选地是在GLP-1(7-37)OH的N-末端添加1到6个氨基酸，和/或在GLP-1(7-37)OH的C-末端添加1到8个氨基酸所形成的肽。优选地，这种类型的GLP-1化合物具有多达39个氨基酸。在"延长的"GLP-1化合物中的氨基酸用与GLP-1(7-37)OH中相应氨基酸相同的数字表示。例如在GLP-1(7-37)OH的N-末端添加两个氨基酸后获得的GLP-1化合物的N-末端氨基酸在第5位；在GLP-1(7-37)OH的C-末端

添加一个氨基酸后获得的GLP-1化合物的C-末端氨基酸在第39位。优选地，延长的GLP-1化合物的1-6位氨基酸与GLP-1(1-37)OH相应位置的氨基酸相同或是其保守取代物。优选地，延长的GLP-1化合物的38-45位氨基酸与Exendin-3或Exendin-4相应位置的氨基酸相同或是其保守取代物。Exendin-3和Exendin-4的氨基酸序列如式II，SEQ ID NO:2所示。

[0079] SEQ ID NO：2

[0080] 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

[0081] His-Xaa-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-

[0082] 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

[0083] Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-

[0084] 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

[0085] Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-ger-Ser-

[0086] 40 41 42 43 44 45

[0087] Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

[0088] 其中：

[0089] 第8位的Xaa是Ser或Gly；且

[0090] 第9位的Xaa是Asp或Glu；

[0091] 此处所述的保守取代是指将一个氨基酸用另一个具有相同净电荷且具有大约大小和形状的氨基酸取代。带有脂族氨基酸或取代的脂族侧链的氨基酸，在其碳原子和侧链中的杂原子数的总和的差异不大于4时具有大致相同的大小。在其侧链中的分支数的差异不多于1时，它们具有近似相同的形状。认为在其侧链中带有苯基或有取代的苯基基团的氨基酸具有大致相同的大小和形状。

[0092] 优选的GLP-1化合物包括如式III(SEQ ID NO:3)所示的GLP-1的类似物：

[0093] 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

[0094] Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-

[0095] 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

[0096] Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe-

[0097] 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

[0098] Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-

[0099] 40 41 42 43 44 45

[0100] Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

[0101] 式III(SEQ ID NO:3)，其中：

[0102] 第7位的Xaa是: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(homohistidine)，α-氟甲基-组氨酸，或α-甲基组氨酸；

[0103] 第8位的Xaa是Ala，Gly，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，或Lys；

[0104] 第9位的Xaa是Glu，Asp，Lys，Thr，Ser，Arg，Trp，Phe，Tyr，或His；

[0105] 第11位的Xaa是Thr，Ala，Gly，Ser，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，Arg，His，或Lys；

[0106] 第14位的Xaa是Ser，Ala，Gly，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，或Lys；

[0107] 第12位的Xaa是His，Trp，Phe，或Tyr

[0108] 第 16 位的 Xaa 是 Val，Ala，Gly，Ser，Thr，Leu，Ile，Tyr，Glu，Asp，Trp，His，Phe，或 Lys；

[0109] 第 17 位的 Xaa 是 Ser，Ala，Gly，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，或 Lys；

[0110] 第 18 位的 Xaa 是 Ser，Ala，Gly，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，His，Pro，Arg，或 Lys；

[0111] 第 19 位的 Xaa 是 Tyr，Phe，Trp，Glu，Asp，Gly，Gln，Asn，Arg，Cys，或 Lys；

[0112] 第 20 位的 Xaa 是 Leu，Ala，Gly，Ser，Thr，Ile，Val，Glu，Asp，Met，或 Lys；

[0113] 第 21 位的 Xaa 是 Glu，Asp，或 Lys；

[0114] 第 22 位的 Xaa 是 Gly，Ala，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，或 Lys；

[0115] 第 23 位的 Xaa 是 Gln，Asn，Arg，Glu，Asp，His，或 Lys；

[0116] 第 24 位的 Xaa 是 Ala，Gly，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Arg，Glu，Asp，或 Lys；

[0117] 第 25 位的 Xaa 是 Ala，Gly，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，或 Lys；

[0118] 第 26 位的 Xaa 是 Lys，Arg，Gln，Glu，Asp，Trp，Tyr，Phe，或 His；

[0119] 第 27 位的 Xaa 是 Glu，Asp，Ala，His，Phe，Tyr，Trp，Arg， Leu，或 Lys；

[0120] 第 30 位的 Xaa 是 Ala，Gly，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，His，或 Lys；

[0121] 第 31 位的 Xaa 是 Trp，Phe，Tyr，Glu，Asp，Ser，Thr，Arg，或 Lys；

[0122] 第 32 位的 Xaa 是 Leu，Gly，Ala，Ser，Thr，Ile，Val，Glu，Asp，或 Lys；

[0123] 第 33 位的 Xaa 是 Val，Gly，Ala，Ser，Thr，Leu，Ile，Glu，Asp，Arg，或 Lys；

[0124] 第 34 位的 Xaa 是 Lys，Arg，Glu，Asp，Asn，或 His；

[0125] 第 35 位的 Xaa 是 Gly，Ala，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，Arg，Trp，Tyr，Phe，Pro，His，或 Lys；

[0126] 第 36 位的 Xaa 是 Arg，Lys，Glu，Asp，Thr，Ser，Trp，Tyr，Phe，Gly，或 His；

[0127] 第 37 位的 Xaa 是 Gly，Ala，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，His，Lys，Arg，Trp，Tyr，Phe，Gly-Pro，Gly-Pro-NH2，-NH2 或缺失；

[0128] 第 38 位的 Xaa 是 Arg，Lys，Glu，Asp，Ser，或 His，或缺失；

[0129] 第 39 位的 Xaa 是 Arg，Lys，Glu，Asp，Ser，或 His，或缺失；

[0130] 第 40 位的 Xaa 是 Asp，Glu，Gly，或 Lys，或缺失；

[0131] 第 41 位的 Xaa 是 Phe，Trp，Tyr，Glu，Asp，Ala，或 Lys，或缺失；

[0132] 第 42 位的 Xaa 是 Pro，Lys，Glu，或 Asp，或缺失；

[0133] 第 43 位的 Xaa 是 Glu，Asp，Pro，或 Lys，或缺失；

[0134] 第 44 位的 Xaa 是 Glu，Asp，Pro，或 Lys，或缺失；和

[0135] 第 45 位的 Xaa 是 Val，Glu，Asp，Ser，或 Lys，或缺失，或 C-1-6- 酯，或酰胺，或 C-1-6- 烷基酰胺 (alkylamide)，或 C-1-6 二烷基酰胺 (dialkylamide)；条件是当第 37，38，39，40，41，42，43，或 44 位的氨基酸缺失时，该氨基酸下游的每个氨基酸也缺失。优选地，式 III 所包括的类似物与 GLP-1(7-37)OH，GLP1(7-36)NH_2，Exendin-3，或 Exendin-4 中相应的氨基酸之间的差异不多于 6 个氨基酸。更优选的是式 III 中所包含的类似物与 GLP-1(7-37)OH， GLP1(7-36)NH_2，Exendin-3，或 Exendin-4 中相应的氨基酸之间的差异为 1 到 5 个氨基酸。

[0136] 另一组优选的 GLP-1 化合物包括式 IV(SEQIDNO：4) 所示的 GLP-1 类似物：

[0137] His-Xaa_8-Glu-Gly-Xaa_{11}-Xaa_{12}-Thr-Ser-Asp-Xaa_{16}-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa_{22}-Xaa_{23}-Xaa_{24}-Ala-Xaa_{26}-Xaa_{27}-Phe-Ile-Ala-Xaa_{31}-Leu-Xaa_{33}-Xaa_{34}-Xaa_{35}-Xaa_{36}-R

[0138] 式 IV(SEQ ID NO:4) 其中：

[0139] Xaa_8 是：Gly，Ala，Val，Leu，Ile，Ser，或 Thr；

[0140] Xaa_{11} 是：Asp，Glu，Arg，Thr，Ala，Lys，或 His；

[0141] Xaa_{12} 是：His，Trp，Phe，或 Tyr；

[0142] Xaa_{16} 是：Leu，Ser，Thr，Trp，His，Phe，Asp，Val，Glu，或 Ala；

[0143] Xaa_{22} 是：Gly，Asp，Glu，Gln，Asn，Lys，Arg，Cys，或半胱磺酸；

[0144] Xaa_{23} 是：His，Asp，Lys，Glu，或 Gln；

[0145] Xaa_{24} 是：Glu，His，Ala，或 Lys；

[0146] Xaa_{26} 是：Asp，Lys，Glu，或 His；

[0147] Xaa_{27} 是：Ala，Glu，His，Phe，Tyr，Trp，Arg，或 Lys；

[0148] Xaa_{30} 是：Ala，Glu，Asp，Ser，或 His；

[0149] Xaa_{33} 是：Asp，Arg，Val，Lys，Ala，Gly，或 Glu；

[0150] Xaa_{34} 是：Glu，Lys，或 Asp；

[0151] Xaa_{35} 是：Thr，Ser，Lys，Arg，Trp，Tyr，Phe，Asp，Gly，Pro，His，或 Glu；

[0152] Xaa_{36} 是：Arg，Glu，或 His；

[0153] R 是：Lys，Arg，Thr，Ser，Glu，Asp，Trp，Tyr，Phe，His，$-NH_2$，Gly，Gly-Pro，或 Gly-Pro-NH_2，或缺失。

[0154] 优选地，式 IV 所包含的类似物与 GLP-1(7-37)OH，或 GLP-1(7-36)NH_2，中相应的氨基酸具有不多于 6 个氨基酸的差异。更优选式 IV 所包含的类似物与 GLP-1(7-37)OH，或 GLP-1(7-36)NH_2 中相应的氨基 酸具有 1 到 5 个氨基酸的差异。

[0155] 另一组优选的 GLP-1 化合物包括式 V(SEQIDNO:5) 所示的 GLP-1 类似物：

[0156] His-Xaa_8-Glu-Gly-Thr-Xaa_{12}-Thr-Ser-Asp-Xaa_{16}-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa_{22}-Xaa_{23}-Ala-Ala-Xaa_{26}-Glu-Phe-Ile-Xaa_{30}-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa_{35}-Arg-R

[0157] 式 III(SEQ ID NO:5) 其中：

[0158] Xaa_8 是：Gly，Ala，Val，Leu，Ile，Ser，或 Thr；

[0159] Xaa_{12} 是：His，Trp，Phe，或 Tyr；

[0160] Xaa_{16} 是：Leu，Ser，Thr，Trp，His，Phe，Asp，Val，Glu，或 Ala；

[0161] Xaa_{22} 是：Gly，Asp，Glu，Gln，Asn，Lys，Arg，Cys，或半胱磺酸；

[0162] Xaa_{23} 是：His，Asp，Lys，Glu，或 Gln；

[0163] Xaa_{26} 是：Asp，Lys，Glu，或 His；

[0164] Xaa_{30} 是：Ala，Glu，Asp，Ser，或 His；

[0165] Xaa_{35} 是：Thr，Ser，Lys，Arg，Trp，Tyr，Phe，Asp，Gly，Pro，His，或 Glu；

[0166] R 是：Lys，Arg，Thr，Ser，Glu，Asp，Trp，Tyr，Phe，His，$-NH_2$，Gly，Gly-Pro，或 Gly-Pro-NH_2，或缺失。

[0167] 优选地，式 V 所包含的类似物与 GLP-1(7-37)OH，或 GLP-1(7-36)NH_2，中相应的氨基酸具有不多于 6 个氨基酸的差异。更优选式 V 所包含的类似物与 GLP-1(7-37)OH，或 GLP-1(7-36)NH_2 中相应的氨基酸具有 1 到 5 个氨基酸的差异。

[0168] 再一组优选的GLP-1化合物包括式VI(SEQ ID NO:6)所示的GLP-1类似物：

[0169] His-Xaa_8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa_{22}-Xaa_{23}-Ala-Ala-Lys-Xaa_{27}-Phe-Ile-Xaa_{30}-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

[0170] 式VI(SEQ ID NO:6)，其中：

[0171] Xaa_8是:Gly，Ala，Val，Leu，Ile，Ser，或Thr；

[0172] Xaa_{22}是:Gly，Asp，Glu，Gln，Asn，Lys，Arg，Cys，或半胱磺酸；

[0173] Xaa_{23}是:His，Asp，Lys，Glu，或Gln；

[0174] Xaa_{27}是:Ala，Glu，His，Phe，Tyr，Trp，Arg，或Lys

[0175] Xaa_{30}是:Ala，Glu，Asp，Ser，或His；

[0176] R是:Lys，Arg，Thr，Ser，Glu，Asp，Trp，Tyr，Phe，His，$-NH_2$，Gly，Gly-Pro，或Gly-Pro-NH_2，或缺失。

[0177] 又一组优选的GLP-1化合物包含式VII(SEQ ID NO:7)所示的GLP-1类似物：

[0178] Xaa_7-Xaa_8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa_{22}-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

[0179] (SEQ ID NO:7)

[0180] 其中：

[0181] Xaa_7是L-组氨酸、D-组氨酸、脱氨基-组氨酸、2氨基组氨酸、β-羟组氨酸、高组氨酸，α-氟甲基-组氨酸或α-甲基组氨酸；

[0182] Xaa_8是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸或苏氨酸。优选地，Xaa_8是甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸或苏氨酸；

[0183] Xaa_{22}是天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、或半胱磺酸。

[0184] R是$-NH_2$或Gly(OH)。

[0185] 最优选的式I，II，III，IV，V，和VI所示的GLP-1化合物包括GLP-1类似物，其中，这种类似物或其片段的骨架在第8位包含丙氨酸之外的氨基酸(第8位类似物)。在第8位优选的氨基酸为甘氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，或甲硫氨酸，更优选地是缬氨酸或甘氨酸。

[0186] 其它优选的GLP-1化合物是GLP-1类似物，除下述差异之外所述 的GLP-1类似物具有与GLP-1(7-37)OH相同的序列，所述差异为：第8位优选地是甘氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，或甲硫氨酸，更优选地是缬氨酸或甘氨酸，第22位是谷氨酸，赖氨酸，天冬氨酸，或精氨酸，更优选地是谷氨酸或赖氨酸。

[0187] 其它优选的GLP-1化合物是GLP-1类似物，除下述差异之外所述的GLP-1类似物具有与GLP-1(7-37)OH相同的序列，所述差异为：第8位优选地是甘氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，或甲硫氨酸，更优选地是缬氨酸或甘氨酸；第30位是谷氨酸，天冬氨酸，丝氨酸，或组氨酸，更优选地是谷氨酸。

[0188] 其它优选的GLP-1化合物是GLP-1类似物，除下述差异之外所述的GLP-1类似物具有与GLP-1(7-37)OH相同的序列，所述差异为：第8位优选地是甘氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，或甲硫氨酸，更优选地是缬氨酸或甘氨酸，第37位是组氨酸，赖氨酸，精氨酸，苏氨酸，丝氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，色氨酸，酪氨酸，苯丙氨酸，更优选地是组

氨酸。

[0189] 此外，优选的GLP-1化合物是GLP-1类似物，除下述差异之外所述的GLP-1类似物具有与GLP-1(7-37)OH相同的序列，所述差异为：第8位优选地是甘氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，或甲硫氨酸，更优选地是缬氨酸或甘氨酸，第22位是谷氨酸，赖氨酸，天冬氨酸，或精氨酸，更优选地是谷氨酸或赖氨酸；第23位是赖氨酸，精氨酸，谷氨酸，天冬氨酸，且组氨酸，更优选地是赖氨酸或谷氨酸。

[0190] 其它优选的GLP-1化合物是GLP-1类似物，除下述差异之外所述的GLP-1类似物具有与GLP-1(7-37)OH相同的序列，所述差异为：第8位优选地是甘氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，或甲硫氨酸，更优选地是缬氨酸或甘氨酸；第22位是谷氨酸，赖氨酸，天冬氨酸，或精氨酸，更优选地是谷氨酸或赖氨酸；第27位是丙氨酸，赖氨酸，精氨酸，色氨酸，酪氨酸，苯丙氨酸，或组氨酸，更优选地是丙氨酸。

[0191] 在此处描述GLP-1化合物的命名法中，取代氨基酸及其位置表示在亲本结构之前。例如，Val^{8}GLP-1(7-37)OH表示其中通常出现在GLP-1(7-37)OH(式I，SEQ ID NO:1)第8位的丙氨酸被缬氨酸所取 代的GLP-1化合物。

[0192] 此外优选的GLP-1化合物包括：

[0193] Val^{8}-GLP-1(7-

[0194] 37)OH，Gly^{8}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，Asp^{22}-GLP-1(7-37)OH，Arg^{22}-GLP-1(7-37)OH，Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Cys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Cya^{22}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Asp^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Arg^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Cys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Asp^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Arg^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Cys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH， Gly^{8}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH，His^{24}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-His^{24}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-His^{24}-GLP-1(7-37)OH，Lys^{24}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Lys^{24}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH，Asp^{30}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Asp^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Asp^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gln^{30}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Gln^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Gln^{30}-GLP-1(7-37)OH，Tyr^{30}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Tyr^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Tyr^{30}-GLP-1(7-37)OH，Ser^{30}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Ser^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Ser^{30}-GLP-1(7-37)OH，His^{30}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-His^{30}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-His^{30}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{34}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{34}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Glu^{34}-GLP-1(7-37)OH，Ala^{34}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Ala^{34}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Ala^{34}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{34}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Gly^{34}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Gly^{34}-GLP-1(7-37)OH，Ala^{35}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Ala^{35}-GLP-1(7-37)

OH，Gly^{8}-Ala^{35}-GLP-1(7-37)OH，Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH，His^{35}-GLP-1(7-37)OH Val^{8}-His^{35}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-His^{35}-GLP-1(7-37)OH，Pro^{35}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Pro^{35}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Pro^{35}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{35}-GLP-1(7-37)OH Val^{8}-Glu^{35}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Glu^{35}-GLP-1(7-37)oH，Val^{8}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{22}-Lys^{23}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{22}-Glu^{23}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{22}-Ala^{27}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Gly^{34}-Lys^{35}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH，和 Gly^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH.

[0195] 更优选的GLP-1化合物是

[0196] Val^{8}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH，Glu^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Gly^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2，Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH，Gly^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH，Arg^{34}-GLP-1(7-36)NH_2，和 Arg^{34}-GLP-1(7-37)OH.

[0197] GLP-1化合物还包括如下定义的"GLP-1衍生物"，即具有GLP-1或GLP-1类似物的氨基酸序列的分子，但其中具有一个或多个经化学修饰的氨基酸侧链基团，α-碳原子，末端氨基基团，或末端羧酸基团。化学修饰包括但不限于添加化学组分，产生新键和去除化学组分。

[0198] 所述的用于长期治疗方案的GLP-1化合物可能需要进行修饰或制剂，以使得在经延长的时段内，血浆水平保持在所请求保护的有效范围内。可应用多种方法以延长作用时间，包括例如将GLP-1化合物掺入到悬浮的非结晶或结晶颗粒中，其中，所述的GLP-1化合物与锌或鱼精蛋白相络合，施用后缓慢地溶解。另一种方法包括诱导GLP-1化合物与血浆白蛋白结合，再在一段时间之内缓慢地解离。此外，某些贮存剂型也适用于本发明，所述剂型中的生物可吸收聚合物(bioadsorbable polymer)可提供一段时间内的持续释放。

[0199] 例如，可将GLP-1化合物整合到锌晶体中，其可在pH约为9.5到约11.5的无甘氨酸的溶液中选择性的溶解GLP-1肽，由此提供延时作用。这种"碱标准化"步骤似乎可降低所述肽中的β-折叠构象，并加强α-螺旋构象这对一些GLP-1化合物的溶解性和生物活性是重要的。这一步骤也使所述的肽在后续程序之前保持优选的α-螺旋构象。因此，这一成批地"标准化"变异体的关键步骤使许多肽成为可复制的均一的溶液。

[0200] 优选地在碱标准化溶液中的肽浓度为高于5mg/mL。更优选所述的肽浓度在约10mg/mL到约30mg/mL。溶解肽的其他优选浓度范围是约5mg/mL到约25mg/mL，约8mg/mL到约25mg/mL和约10mg/mL到约20mg/mL。最优选的浓度是约15mg/mL。

[0201] 优选地用仅含有水和一种碱，如NaOH，KOH或氢氧化铵的含水碱溶液溶解所述的肽。更优选的碱是NaOH。

[0202] 优选地碱标准化步骤的pH是约10.0到约11.0。更优选pH是约10.5。所述的含有溶解肽的碱溶液可在室温下静置约5min到约3h的一段时间，所述的室温虽然不能解释为一种限定，但一般而言是指约20℃到约25℃。也可以轻轻搅动所述的碱性溶液。更优选地是将溶解的碱性肽溶液在室温下静置约1小时。本领域的技术人员可以了解，在这一

步骤中对每一种肽如何将 pH,时间,温度和搅拌条件结合起来,以保证所述肽的"标准化作用"完成,同时避免或最小化可能发生的针 对所述肽的化学降解。

[0203] 在制备所选择肽的晶体的过程中的下一个步骤是添加甘氨酸。氨基酸,如甘氨酸与锌离子结合,所述锌离子也可非常紧密地与肽中的组氨酸残基结合。因此,锌结合竞争可在肽晶体形成以及其后的晶体组合物稳定性中起重要作用。添加到碱性肽溶液中的甘氨酸可以是固体或储备溶液的形式。优选地是,甘氨酸作为固体添加。优选地所添加的甘氨酸是游离碱的形式。优选地是,在所述碱性肽溶液中的甘氨酸的终浓度是约 5mM 到约 250mM。优选的甘氨酸浓度范围是约 10mM 到约 150mM,约 20mM 到约 100mM,约 40mM 到约 80mM 和约 55mM 到约 65mM。最优选地所述甘氨酸浓度是约 60mM。

[0204] 可选择地,可在添加甘氨酸后调节所述碱性肽溶液的 pH。如果调节 pH,优选地是将 pH 调节到约 9.0 到约 11.0 之间。更优选地是将 pH 调到约 9.2 到约 9.8 之间。最优选地是调到约 pH9.5。

[0205] 如果需要,可将添加了甘氨酸的碱性肽溶液过滤。如果溶液中明显有任何未溶解颗粒、粉末或绒状物的迹象则推荐进行过滤。如果需要此时也是在整个过程中通过无菌过滤步骤进行灭菌的好时机。优选地,所述过滤是用低蛋白结合和孔大小为 0.45μm 或更小的非致热原无菌过滤器进行。优选地,所述过滤器为无菌、非致原热、低蛋白结合的,其孔大小为 0.22μm 或更小。更优选地,所述过滤器为无菌的 0.22μm **Millex®**过滤器 (Millipore Corporation,Waltham,MA,USA)。

[0206] 形成晶体过程中的下一个步骤是向碱性肽溶液中添加选自乙醇和异丙醇的总的终体积为约 2%到约 20%的醇溶液,和每摩尔肽约 0.5mol 到约 2.5mol 的锌。所述的锌和乙醇可以一种含水储液一同加入,或以任意的顺序在一个步骤或多个步骤中分别加入。优选地是,所述的醇溶液先于锌加入。

[0207] 优选地,所添加的醇溶液以体积表示为所述碱性肽 - 锌 - 醇溶液总的终体积的约 2%到约 20%。更优选地是所添加的醇溶液的体积占总的终体积的约 5%到约 15%。更优选地,所添加的醇溶液的体积占总的终体积的约 6%到约 12%。最优选地是,所添加的醇溶液的体积约占总的终体积的 9%。所述醇溶液优选地是乙醇。

[0208] 在这一阶段添加的锌是指锌离子。所述的锌可以多种形式添加,但优选用稀释的盐酸酸化的氧化锌溶液或盐的形式,如醋酸锌或氯化 锌。更优选的是用稀释的 HCl 酸化的氧化锌溶液。

[0209] 优选地是,在这一步骤中每摩尔肽添加 1.0mol 到约 2.25mol 锌。所添加的锌的其他优选范围包括每摩尔肽 1.1 到 2.0mol 锌,每摩尔肽 1.3 到 1.7mol 锌,和每摩尔肽 1.4 到 1.6mol 锌。最优选地是每摩尔肽添加约 1.5mol 的锌。

[0210] 优选地向所述肽溶液中添加的含锌溶液是缓慢地,和 / 或少量增加的形式添加的,这可以使在添加处可能形成的局部肽沉淀和 / 或锌络合物最小化。更优选地是,甘氨酸液作为在此步骤添加的含锌溶液组分。例如可通过将氧化锌溶解于稀释的 HCl 中调 pH 至 1.6,然后添加甘氨酸制备锌 - 甘氨酸溶液。添加足量的甘氨酸使所述溶液的 pH 升高到约 pH2 到约 pH3 之间。所述锌 - 甘氨酸溶液的 pH 可通过例如,稀释的 NaOH 进一步升高。所述锌 - 甘氨酸溶液的优选 pH 范围是约 pH4.0 到约 pH6.0。更优选的锌 - 甘氨酸溶液的 pH 范围是约 pH5.0 到约 pH5.5。如前所述,甘氨酸具有锌结合亲和力,其可与锌对所述肽的结

合形成竞争。因此，在含锌溶液中甘氨酸的存在可使锌溶液以更快的速度添加，这是因为局部沉淀的问题减弱了。另外，使锌－甘氨酸溶液高于 pH2.0，优选地是约 pH4.0 到约 pH6.0，可使在加入无菌肽组分之前，使已经由制造商额定速率的过滤器过滤的溶液易于操作，如 pH2-10 的溶液。优选地是，所述锌－甘氨酸溶液包含约 50mM 到约 70mM 甘氨酸和约 20mM 到约 200mM 锌。

[0211] 使所选择的肽开始结晶的最后一个步骤是将溶液的 pH 调节到约 pH7.5 到约 pH10.5 之间使所述的肽晶体形成。优选的用于调节所述溶液 pH 的试剂包括稀释的 HCl，稀释的醋酸和稀释的 NaOH。

[0212] 所选择的肽结晶的优选 pH 范围包括从约 pH8.0 到约 pH10.0，约 pH7.5 到约 pH9.5，约 pH8.5 到约 pH9.2，约 pH9.0 到约 pH9.5，约 pH7.5 到约 pH8.5，约 pH8.7 到约 pH9.5，和约 pH9.2 到约 pH10.0。

[0213] 本领域的技术人员可以了解优选的结晶 pH 依赖于许多因素，包括肽的性质和其浓度，醇溶液的浓度，锌的浓度，溶液的离子强度和结晶的温度。作为说明，肽 Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH 只在选定的醇和锌浓度，pH 范围约 7.7 到约 8.1 下形成晶体，而肽 Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH 可在广泛的锌和醇浓度，pH 范围约 9.8 到约 10.4 的条件下形成晶体。

[0214] 本领域的技术人员可进一步认识到，在给定的一组条件下，优选的确定最佳结晶 pH 是凭经验确定的，也就是说缓慢地添加酸化溶液，优选用稀释的 HCl 或稀释的醋酸小量地增加，并观察每次小量增加后所出现的现象。一般在酸性溶液添加出会出现小量的局部沉淀区域。如果需要逐渐延长轻微涡动来完全溶解沉淀的时间，也就是停止加酸的最佳时间，使结晶过程从澄清的或稍微浑浊的溶液开始进行。

[0215] 本领域的技术人员可进一步认识到所选择的结晶 pH 和温度可影响结晶的速度，结晶收率，所形成晶体的大小和同质性。对所选择多肽进行结晶的优选 pH 约 pH8.0 到约 pH10。更优选地 pH 是约 8.7 到约 9.5。其他优选的结晶 pH 是约 8.8 到约 9.3，约 9.0 到约 9.5，和约 8.5 到约 9.3。最优选地是，在约 pH9.1 的条件下进行结晶。

[0216] 优选地，所述结晶温度是约 10℃到约 30℃。更优选地是约 15℃到约 28℃。最优选地是在室温下或约 20℃到约 25℃下结晶。

[0217] 优选地所述结晶步骤进行完全，即 90％或更多的肽在约 3h 到约 72h 沉淀于显著的结晶形式中。更优选地是在约 10h 到约 48h 结晶完全。最优选地是在约 16h 到约 26h 结晶完全。有多种方法用于确定结晶完成，包括对存在于小份所述组合物中的所述肽进行 HPLC 分析。此处所述的方法 5 描述了这样一种可应用的方案。

[0218] 优选地，依照上述方法产生的晶体是薄片晶体。可对经上述方法产生的晶体进行显微镜检。

[0219] 可向原始母液的晶体悬液中添加合适的药学上可接受的赋形剂来制备包含依上述方法制备的 GLP-1 肽晶体的药物组合物。另外，可以通过过滤，轻微的离心或其他相分离方法分离所述的晶体，用于在多种途径中制备药学上可接受的组合物。本领域的技术人员可以了解用于制备所述药物组合物的合适的方法和赋形剂。

[0220] 下述方法由所述晶体和起始结晶阶段的原始母液开始，接下来制备合适的药物组合物。

[0221] 为制备所选择肽晶体的合适的药物组合物，在其完全起始母液，或其部分中的晶体悬浮液的 pH 低于使 97％或更多的肽不能溶解的 pH。优选地是，所述过程中的这一部分是在确定初步结晶完成后的几个小时内开始的。优选地是，所述 pH 用稀释的 HCl 或醋酸降低，其中所述 的酸溶液以递增的小份缓慢加入。本领域的技术人员可以了解使这一结晶的第二阶段出现的 pH 依赖于许多因素，所述肽的性质及其浓度，所述醇溶液的浓度，锌的浓度，悬浮液的离子强度和结晶的温度。优选地，所述 pH 是低于已进行的起始结晶 pH 约 0.2 到 2.0pH 单位。更优选地是比已进行的起始结晶 pH 低约 0.5 到约 1.5pH 单位，最优选地是低约 0.8 到 1.3pH 单位。这一结晶第二阶段的温度优选地是室温或约 20℃到约 25℃。对于肽 Val^{8}-GLP-1(7-37)OH，优选的 pH 是约 7.5 到约 8.5。更优选的 pH 是约 7.8 到约 8.2。

[0222] 优选地是，所述肽晶体悬浮液的 pH 低于在 98％或更多，更优选地是在 99％或更多的肽变为在所述组合物中不溶时的 pH。在这一结晶的第二阶段形成的附加的沉淀包括晶体。优选地是，在结晶的第二阶段形成的附加沉淀在形态学和大小分布方面相对于那些在第一阶段形成的晶体将是更显著的晶体。

[0223] 优选地是，所述结晶的第二阶段充分完成，即，97％或更多的肽不溶，使得下一步骤在结晶的第二阶段开始的 30h 内，更优选地是 18h 内，更优选地是 6h 内，最优选地是 2h 内开始。所得沉淀的数量的由多种方法确定，包括对存在于小份组合物中的肽进行 HPLC 分析。

[0224] 制备所选择的肽结晶的稳定药物组合物的过程中下一步骤是添加药学上可接受的防腐剂和选自 TRIS，顺丁烯二酸盐，磷酸盐，琥珀酸盐，N- 甘氨酰甘氨酸和己二酸盐的缓冲液。可选择地，还可以添加一种或多种张力剂 (tonicity agents) 如氯化钠或其他的盐，甘油或或甘露醇。这些组分可以一种溶液或多种溶液组合的形式添加或以任意的顺序单独添加。优选最后添加防腐剂。这些组分中，优选的缓冲液选自 TRIS 和顺丁烯二酸盐，优选的防腐剂是间甲酚 (m-cresol)，优选的张力剂是氯化钠。更优选的缓冲液是 TRIS。

[0225] 如果选择 TRIS 作为缓冲液，添加到结晶肽悬浮液中的 TRIS 的优选的量是所述 TRIS 在最终组合物中的浓度是约 5mM 到约 40mM。更优选的所述 TRIS 在最终组合物中的浓度是约 10mM 到约 20mM。最优选的所述 TRIS 在最终组合物中的浓度是约 15mM。

[0226] 如果选择顺丁烯二酸盐作为缓冲液，添加到结晶肽悬液中的顺丁烯二酸盐的优选的量是所述顺丁烯二酸盐在最终组合物中的浓度是约 2mM 到约 20mM。更优选的所述顺丁烯二酸盐在最终组合物中的浓度 是约 5mM 到约 15mM。最优选的所述顺丁烯二酸盐在最终组合物中的浓度是约 9mM。

[0227] 如果选择氯化钠作为缓冲液，添加到结晶肽悬液中的氯化钠的优选的量是所述氯化钠在最终组合物中的浓度是约 30mM 到约 200mM。更优选的所述氯化钠在最终组合物中的浓度是约 50mM 到约 150mM。其他优选的氯化钠浓度范围是约 80mM 到约 120mM，约 70mM 到约 130mM，和约 90mM 到约 130mM。最优选的所述氯化钠在最终组合物中的浓度是约 110mM。

[0228] 尽管在所述过程的这一点上可将任何药学上可接受的防腐剂添加到所述的结晶肽悬液中，但对于本发明的组合物优选酚醛防腐剂或苯甲醇。酚醛防腐剂的例子包括，苯酚，氯甲酚，间甲酚 (m-cresol)，邻甲酚 (o-cresol)，对甲酚 (p-cresol)，对羟基苯甲酸乙酯，对羟基苯甲酸甲酯，对羟基苯甲酸丙酯，对羟基苯甲酸丁酯，百里酚或其混合物。更优选的防腐剂是苯甲醇，间甲酚，苯酚，对羟基苯甲酸甲酯及其混合物。最优选的药学上可接受

的防腐剂间甲酚。

[0229] 在所述过程的这一点上添加到结晶肽组合物中的药学上可接受的防腐剂的优选的量是所述防腐剂在最终组合物中的浓度是约 1.0mg/mL 到约 20.0mg/mL。更优选的所述防腐剂在最终组合物中的浓度是约 2.0mg/mL 到约 8.0mg/mL，约 2.5mg/mL 到约 4.5mg/mL 和约 2.0mg/mL 到约 4.0mg/mL。最优选的所述防腐剂在最终组合物中的浓度是约 3.0mg/mL。

[0230] 制备所选择的肽的稳定药物组合物的最终步骤是将最终的 pH 调节到约 6.0 到约 8.5 之间，优选地是调节到约 pH6.5 到约 pH8.0 之间。尽管有多种酸化或碱化试剂溶液均可用于这一步骤的 pH 调节，但优选使用稀释 HCl，稀释的 NaOH 和稀释的醋酸。更优选的试剂溶液是稀释的 HCl 和稀释的 NaOH。所述的组合物的优选 pH 在一定程度上取决于所选择的肽，所述肽的浓度，所选择的施用途径和所选择的缓冲液。

[0231] 优选地是选择 TRIS 作缓冲液，将所述 pH 调节到约 6.5 到约 8.5 之间。更优选地是，将所述 pH 调节到约 7.0 到约 7.8 之间，约 7.2 到约 7.8 之间，约 7.5 到约 8.5 之间，或约 7.0 到约 8.0 之间。当选择 TRIS 作为缓冲液时，最优选的是将 pH 调节到约 7.5。若选择顺丁烯二酸盐作缓冲液，将所述 pH 调节到约 6.0 到约 7.5 之间。更优选地是将 所述 pH 调节到约 6.4 到约 7.5 之间，约 6.4 到约 7.0 之间，或约 6.0 到约 7.0 之间。当选择顺丁烯二酸盐作为缓冲液时，最优选的是将 pH 调节到约 6.5。

[0232] 除制剂途径之外，适用于本发明的治疗方案的长效 GLP-1 可被衍生化。衍生化可通过多种方法实现。对氨基酸侧链基团的修饰包括但不限于赖氨酸 ε－氨基基团的酰化，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，和谷氨酰胺或天冬酰胺的脱酰基作用。末端氨基基团的修饰包括但不限于脱－氨基 (des-amino)，N- 低级烷基，N- 二－低级烷基，和 N- 酰基修饰。末端羧基基团的修饰包括但不限于酰胺，低级烷基酰胺，二烷基酰胺和低级烷基酯修饰。而且可将一个或多个侧链或末端基团用蛋白质化学领域的技术人员已知的保护性基团保护起来。氨基酸的 α－碳可以是单甲基或二甲基化的。

[0233] 优选的 GLP-1 衍生物是经酰化的。利用脂肪酸衍生原理，通过脂肪酸残基与在血液和外周组织中的白蛋白上的脂肪酸结合位点的结合，促进与血浆白蛋白的结合从而延长 GLP-1 的作用。优选的 GLP-1 衍生物是 $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α－十六烷酰基)))-GLP-1(7-37)。GLP-1 衍生物及所述衍生物的制备方法在 Knudsen，等 (2000) J.Med.Chem.43：1664-1669 中有描述。另外，许多公开的申请描述了 GLP-1，GLP-1 类似物，Exendin-4 及 Exendin-4 类似物。参见 U.S.PatentNo.5,512,540，WO96/29342，WO98/08871，WO99/43341，WO99/43708，WO99/43707，WO99/43706，和 WO99/43705。

[0234] GLP-1 肽也可用微球体包被然后口服。例如，GLP-1 化合物可包被到含可商购的生物相融性的，能进行生物降解的聚合物，聚 (丙交酯 -co- 乙交酯)-COOH 中，并以橄榄油作为填充料。参见 Joseβh，等 (2000)Diabetologia43：1319-1328。其它类型的微球体技术也是可商购的能进行生物降解的聚合物，如来自 Alkermes 的**Medisorb®**和 **Prolease®**。**Medisorb®**聚合物可由任何丙交酯异构体制造。丙交酯：乙交酯的比例可在 0 ： 100 到 100 ： 0 之间变化以获得广泛的聚合物性质。可由此设计再吸收时间在几周到几个月变化的递送系统和可移植设备。

[0235] 本发明的另一个实施方案包含人药用制品，该制品包括包装说明 书、容器，说明

书中描述了治疗方案，该治疗方案包括使具有特定功效的 GLP-1 化合物血浆水平保持在确定的范围内以避免副作用，如恶心和呕吐或使其最小化。

[0236] 本发明的制品中所用的容器是制药领域中常用的。一般而言，所述的容器是通常由玻璃制成的小瓶或盒，带有盖，填塞块，小珠，活塞，隔，和 / 或火漆或其他便于患者和医生使用的产品。另外，所述的容器是包括含有干粉的药盒，预先填充了合适的稀释液的注射器的试剂盒的一部分。其他的选项包括所述的容器是带有一个间道及两个分隔区的盒，所述的间道可使稀释液和干粉在需要相互混合之前彼此分开。在进行混合时，所述的具有两分隔室的盒可以使稀释液流到干粉中。优选地所述的包装物的大小为可容纳 0.1 到 100mL，优选地是 0.5 到 25mL，更优选地是，5 到 10mL，更优选地是 1.5 到 3mL 的体积。另外，所述的容器是泡罩 (blister)，胶囊，或泡碟 (blisterdisc)。对所述容器而言，其他的选项包括透过皮肤起作用的小片，可移植的装置，微球体载体和其他可贮存递送系统。

[0237] 所述的说明书可为医生提供几种可使 GLP-1 化合物血浆水平保持在本发明所描述的范围内的剂量，或优选地，所述的说明书为医生提供一种可使 GLP-1 化合物血浆水平保持在本发明所描述的范围内的单次剂量。

[0238] 所述的包装说明书提供如何施用药物产品的说明，以及使医生、药剂师和患者了解有关施用该产品的信息的安全性和功效数据。所述的包装说明书一般被视为药物产品的标签。

[0239] 所述的包装说明书可提供下列指示或标签描述的一些或全部 ：

[0240] 1) 可改善下述患者的糖尿病控制 (glycemic control)，所述患者是以单次或多次口服抗糖尿病试剂进行单一治疗，或非单独使用所述试剂而是与单次或多次口服抗糖尿病试剂进行结合治疗均未能充分控制病情的患者 ；

[0241] 2) 用于高血糖控制不当的患者 ；

[0242] 3) 用单一或多重抗糖尿病试剂控制不当的患者中，HbA1c 的平均还原大于或等于 0.5％，优选地是大于或等于 1％ ；

[0243] 4) 用单一治疗剂治疗的患者的平均体重增加将小于以 TZD 或磺酰脲作为单一治疗剂的患者在超过 3 个月或更长时间的平均体重增加 ；

[0244] 5) 统计学上明显显示出体重减轻 ；

[0245] 6) 治疗剂量不会引起严重的低血糖症 ；

[0246] 7) 治疗量不会引起有症状的低血糖症 ；

[0247] 8) 没有固定的注射进餐间隔 ；

[0248] 9) 每日给药的开始需要不高于中等剂量滴定度 (少于或等于 4 剂) 接下来独立于血液葡萄糖监控的每日给药 ；

[0249] 10) 冷冻保藏期限为至少 12 个月，优选地是至少 18 个月 ；

[0250] 11) 室温使用保存 ；

[0251] 12) 在治疗性给药时有轻微的注射位点不适 ；

[0252] 13) 在治疗性给药时无注射位点不适 ；

[0253] 14) 给药时有轻微的恶心 ；

[0254] 15) 动物模型中的 β 细胞保护 (preservation) ；

[0255] 16) 人体中的 β 细胞保护 ；

[0256] 17) 注射量在 0.1 到 0.25mL 之间 ;和

[0257] 18) 可安全地用于儿童。

[0258] 而且,所述的包装说明书可提供有关如何使不同体重或体质指标 (body mass index),性别或年龄的患者将 GLP-1 连续的血浆水平维持在治疗范围内的本发明治疗方案的指导。另外,包装说明书描述本发明如何提供保持稳定态 GLP-1 水平的方法,该方法无需患者自我监控葡萄糖水平,也无需与进餐一起定时,由此在安全地维持最佳血液葡萄糖控制的同时方便了患者。

[0259] 本发明请求保护的制品提供长期给药方案,显著地降低了副作用的发生率。因此,优选的产品所提供的包装说明书报道有少于 30%的血浆水平处于本发明所述范围内的患者出现恶心和呕吐。更优选地是,少于 20%的血浆水平处于本发明所述范围内的患者出现恶心和呕吐。更优选地是,在具有此处所述范围的血浆水平的患者中,只有小于 10%的人有这种副作用。最优选地是,在具有此处所述的血浆水平的患者中只有小于 5%的人出现恶心和呕吐。

[0260] 由本发明的治疗方案引发低血糖的几率极低。以血液葡萄糖水平低于 63mg/dL 为特征报告低血糖发生比率的包装说明书少于 10%,优选地是小于 5%,最优选地是没有低血糖报告。

[0261] 通过下述实施例对本发明进行说明但这些实施例不对本发明作出 任何形式的限制。

[0262] 实施例 1

[0263] II 型糖尿病的临床研究

[0264] 以 8 个病人为一组的四组 II 型糖尿病患者接受了长效 Val^8-GLP-1(7-37)OH 制剂的治疗。前三组的给药量分别为 2.5 或 3.5 或 4.5mg 每天给药一次共 6 天。第四组的给药量为 4.5mg 共 21 天。在进行研究的前一天,给每位患者注射盐水作为安慰剂。监控血糖 13 小时。在评估期间患者进餐都是严格标准化的。除在第 6 天和第 21 天进行 24h 评估外,所述的患者均作为门诊病人。在第 1 天进行注射后,取血样测定 4h 过程中的葡萄糖和 Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平。每天早晨对患者给药。在给药的第 6 天 (对第 4 组还包括第 21 天),取样至给药后 26h,以确定血液葡萄糖和 Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平。

[0265] Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平如图 1 和 3 所示,相应的葡萄糖水平如图 2 和 4 所示。21 天给药的患者平均减重 2.125kg(标准偏差 :1.36kg)。有 5 名受试者共减轻 3kg,1 名减轻 2kg,还有 2 名体重没有减轻。

[0266] 实施例 2

[0267] Val^8-GLP-1(7-37)OH 血浆水平的确定 :

[0268] 由于存在内源天然 GLP-1 肽及其经 DPP-IV 降解的产物,如 GLP-1(9-37)OH 的浓度,完整的 Val^8-GLP-1(7-37)OH 的浓度是用可特异性识别全长非降解 Val^8-GLP-1(7-37)OH 的 ELISA 试验确定的。用固定于微滴定板上的 N- 末端抗 -Val^8-GLP-1(7-37)OH 抗血清将免疫反应性的 Val^8-GLP-1(7-37)OH 从血浆中捕获出来。这种抗血清对 Val^8-GLP-1(7-37)OH 的 N- 末端具有高度的特异性。加入特异于 GLP-1C- 末端的碱性磷酸酶偶联抗体以完成 " 夹心 " 。用 pNPP,一种可与碱性磷酸酶一起显示颜色的物质,完成检测。产生颜色的量直接与样品中的免疫反应性 Val^8-GLP-1(7-37) 成比例。人血浆中的 Val^8-GLP-1(7-37)

OH 可通过用 Val^8-GLP-1(7-37)OH 作为参考标准的标准曲线换算出。所得数据通过应用加权的 (weighted)4- 参数逻辑算法的计算机程序进行分析。测试样品中的免疫反应性 Val^8-GLP-1(7-37) 的浓度通过标准曲 线确定。

[0269] 实施例 3

[0270] 体外药效分析：

[0271] 以 20,000 到 40,000 细 胞 / 孔 /100μl 的 量，将 表 达 人 GLP-1 受 体 的 HEK-293Aurora CRE-BLAM 细胞接种于 96 孔黑亮底 (blackclearbottom) 平板中。接种后转天用无血浆培养基替换所述培养基。接种后的第 3 天，在每孔中添加 20μl 含不同浓度 GLP-1 拮抗剂的无血浆培养基，制备剂量应答曲线。通常用含 3 毫微摩尔到 30 毫微摩尔 GLP-1 化合物的 14 种稀释物制作剂量应答曲线，由此可确定 EC50 值。与 GLP-1 化合物温育 5h 后，添加 20μlβ- 内酰胺酶底物 (CCF2-AM-AuroraBiosciences-produ ctcode100012) 并继续温育 1h，在 cytoflour 上测定荧光。

[0272] 实施例 4

[0273] GLP-1(7-37)OH 的结晶：

[0274] 根据所述肽的质量，将 GLP-1(7-37)OH 以约 17mg/mL 的浓度溶于约 0.5mL 的 0.015NNaOH。用稀释的 NaOH 将所述蛋白溶液 pH 调节到约 10.5。将所述溶液在室温下放置约 1 小时。

[0275] 向 390μL 小份的此种肽溶液中添加 25μL1.0M，pH10 的甘氨酸溶液，达到 GLP-1(7-37)OH 终浓度为约 16mg/mL，甘氨酸终浓度约为 60mM。需要时可用稀释的 HCl 和 / 或稀释的 NaOH 将所述溶液的 pH 调节到约 pH10。

[0276] 然后将所述溶液经无菌的 0.22μm **Millex®-GV** (MilliporeCorporation, Waltham,MA,USA)4mm 过滤器过滤到小玻璃瓶中，所述的过滤器已事先用 pH10 的 60mM 甘氨酸缓冲液漂洗过。

[0277] 向 300μL 过滤过的肽溶液中添加 66μL50％的乙醇水溶液。向这一添加后的溶液中以小额增量添加总量为 14.1μL 的 150mMpH2.3 的氧化锌溶液 (用稀释的 HCl 制备)，每次小量添加后手动混合所述溶液直至其变为澄清。锌：肽的摩尔比为约 1.5 ： 1。

[0278] 将最终溶液的 pH 调节到约 9.0 在室温下结晶。所述的结晶溶液包含约 12.6mg/mLGLP-1(7-37)OH，47mM 甘氨酸，8.7％体积乙醇，每 摩尔 GLP-1(7-37)OH 约 1.5 摩尔锌，pH9.0。

[0279] 在室温下一天后，在 400X 放大的显微镜下即可观察到 GLP-1(7-37)OH 的晶体薄片。

[0280] 用分光光度计比较再溶解于 0.01N HCl10- 倍稀释液的全部悬液小份样品，和所述悬液在 14,000Xg 下离心约 4min 后获得的上清液经类似稀释后的溶液样品的吸光度来确定晶体的收率。对这一实验结晶收率为 92％。

[0281] 实施例 5

[0282] Val^8-GLP-1(7-37)OH 的结晶：

[0283] 根据所述肽的质量，将 Val^8-GLP-1(7-37)OH 以约 17mg/mL 的浓度溶于约 0.57mL 的 0.015NNaOH。用稀释的 NaOH 将所述蛋白溶液 pH 调节到约 10.5。将所述溶液在室温下放置约 1 小时。

[0284] 向390μL小份的此种肽溶液中添加25μL1.0M，pH8的甘氨酸溶液，使Val^8-GLP-1(7-37)OH终浓度达到约16mg/mL，甘氨酸的终浓度约60mM。需要时可用稀释的HCl和/或稀释的NaOH将所述溶液的pH(约为pH9.0)调节到约pH9.9。

[0285] 然后将所述溶液经无菌的0.22μm Millex®-GV(MilliporeCorporation，Waltham，MA，USA)4mm过滤器过滤到0.5mL的Eppendorf管中。

[0286] 向300μL过滤过的肽溶液中添加66μL50％的乙醇水溶液。向这一添加后的溶液中以小额增量添加总量为14.1μL的150mMpH2.3的氧化锌溶液(用稀释的HCl制备)，每次小量添加后手动混合所述溶液直至其变为澄清。锌：肽的摩尔比为约1.5：1。

[0287] 将最终溶液的pH调节到约8.9并在室温下结晶。所述的结晶溶液包含约12.6mg/mLVal^8-GLP-1(7-37)OH，47mM甘氨酸，8.7％体积乙醇，每1.5摩尔Val^8-GLP-1(7-37)OH约1.5摩尔锌，pH8.9。

[0288] 在室温下三天后，在400X放大的显微镜下即可观察到Val^8-GLP-1(7-37)OH的晶体薄片。

[0289] 实施例6

[0290] Val^8-GLP-1(7-36)NH_2的结晶：

[0291] 根据所述肽的质量，将Val^8-GLP-1(7-36)NH_2以约17mg/mL的浓度溶于约0.44mL的0.015NNaOH。用稀释的NaOH将所述蛋白溶液pH调节到约10.5。将所述溶液在室温下放置约1小时。

[0292] 向390μL小份的此种肽溶液中添加25μL1.0M，pH10.2的甘氨酸溶液达到Val^8-GLP-1(7-36)NH_2终浓度为约16mg/mL，甘氨酸的终浓度约为60mM。

[0293] 然后将所述溶液经无菌的0.22μm Millex®-GV(MilliporeCorporation，Waltham，MA，USA)4mm过滤器过滤到小玻璃瓶中。

[0294] 向300μL过滤过的肽溶液中添加66μL50％的乙醇水溶液。向这一添加后的溶液中以小额增量添加总量为14.1μL的150mMpH2.3的氧化锌溶液(用稀释的HCl制备)，每次小量添加后手动混合所述溶液直至其变为澄清。锌：肽的摩尔比为约1.5：1。

[0295] 将最终溶液的pH调节到约9.85并在室温下结晶。所述的结晶溶液包含约12.6mg/mLVal^8-GLP-1(7-36)NH_2，47mM甘氨酸，8.7％体积乙醇，每1.5摩尔Val^8-GLP-1(7-36)NH_2约1.5摩尔锌，pH9.85。

[0296] 在室温下三天后，在400X放大的显微镜下即可观察到Val^8-GLP-1(7-36)NH_2的晶体薄片。

[0297] 实施例7

[0298] Val^8-GLP-1(7-37)NH_2的结晶：

[0299] 根据所述肽的质量，将Val^8-GLP-1(7-37)NH_2以约17mg/mL的浓度溶于约0.48mL的0.015N NaOH。用稀释的NaOH将所述蛋白溶液pH调节到约11.1，然后再用稀释的HCl调节到pH10.36。将所述溶液在室温下放置约1小时。

[0300] 向390μL小份的此种肽溶液中添加25μL1.0M，pH10的甘氨酸溶液达到Val^8-GLP-1(7-37)NH_2终浓度约16mg/mL，甘氨酸终浓度约60mM。

[0301] 然后将所述溶液经无菌的0.22μm Millex®-GV(MilliporeCorporation，Waltham，MA，USA)4mm过滤器过滤到小玻璃瓶中。

[0302] 向干净小玻璃瓶中的300μL过滤过的肽溶液中添加66μL50%的乙醇水溶液。向这一添加后的溶液中以小额增量添加总量为7μL的150mMpH2.3的氧化锌溶液（用稀释的HCl制备），每次小量添加后手动混合 所述溶液直至其变为澄清。锌：肽的摩尔比为约0.75 ： 1。

[0303] 将最终溶液的pH调节到约9.8并在室温下结晶。所述的结晶溶液包含约12.6mg/mLVal^{8}-GLP-1(7-37)NH_2，47mM甘氨酸，8.7%体积乙醇，每摩尔Val^{8}-GLP-1(7-37)NH_2约0.75摩尔锌，pH9.8。

[0304] 在室温下48小时后，在400X放大的显微镜下即可观察到Val^{8}-GLP-1(7-37)NH_2的簇。

[0001]

序列表

<110> 伊莱利利公司

<120> 应用胰高血糖素样促胰岛肽的长期治疗方案

<130> X-14866

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> 人源

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 第 31 位的 Xaa 是 Gly 或缺失

<400> 1

His Gly 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 Xaa
20 25 30

<210> 2
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)

[0002]

<223> 第 2 位的 Xaa 是 Ser 或 Gly;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 第 3 位的 Xaa 是 Asp 或 Glu;

<400> 2

His Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 第 1 位的 Xaa 是 L-组氨酸，D-组氨酸，脱氨基组氨酸，α-氨基组氨酸，β-羟基-组氨酸，高组氨酸，α-氟甲基组氨酸，或α-甲基组氨酸;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 第 2 位的 Xaa 是 Ala，Gly，Ser，Thr，Leu，Ile，Val，Glu，Asp，或 Lys;

[0003]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 第 3 位的 Xaa 是 Glu，Asp，Lys，Thr，Ser，Arg，Trp，Phe，Tyr，或 His；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 第 5 位的 Xaa 是 Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Arg, His, 或 Lys；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 第 6 位的 Xaa 是 His, Trp, Phe, 或 Tyr；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> 第 8 位的 Xaa 是 Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, 或 Lys；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 第 10 位的 Xaa 是 Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, His, Phe, 或 Lys；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> 第 11 位的 Xaa 是 Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, 或 Lys；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> 第 12 位的 Xaa 是 Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, Pro, Arg, 或 Lys；

[0004]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> 第 13 位的 Xaa 是 Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gly, Gln, Asn, Arg, Cys, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> 第 14 位的 Xaa 是 Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> 第 15 位的 Xaa 是 Glu, Asp, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 第 16 位的 Xaa 是 Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 第 17 位的 Xaa 是 Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, His, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> 第 18 位的 Xaa 是 Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> 第 19 位的 Xaa 是 Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0005]

<222> (20)..(20)
<223> 第 20 位的 Xaa 是 Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 第 21 位的 Xaa 是 Glu, Asp, Ala, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, Leu, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 第 24 位的 Xaa 是 Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> 第 25 位的 Xaa 是 Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, Ser, Thr, Arg, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> 第 26 位的 Xaa 是 Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ilc, Val, Glu, Asp, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 第 27 位的 Xaa 是 Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, Arg, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> 第 28 位的 Xaa 是 Lys, Arg, Glu, Asp, Asn, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> 第 29 位的 Xaa 是 Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Arg, Trp, Tyr,

[0006]

Phe, Pro, His, 或Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> 第30位的Xaa是Arg, Lys, Glu, Asp, Thr, Ser, Trp, Tyr, Phe, Gly, 或His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 第31位的Xaa是Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Gly-Pro, Gly-Pro-NH2, -NH2或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> 第32位的Xaa是Arg, Lys, Glu, Asp, Ser, 或His, 或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> 第33位的Xaa是Arg, Lys, Glu, Asp, Ser, 或His, 或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> 第34位的Xaa是Asp, Glu, Gly, 或Lys, 或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> 第35位的Xaa是Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, Ala, 或Lys, 或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36)..(36)
<223> 第36位的Xaa是Pro, Lys, Glu, 或Asp, 或缺失;

[0007]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> 第 37 位的 Xaa 是 Glu, Asp, Pro, 或 Lys, 或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> 第 38 位的 Xaa 是 Glu, Asp, Pro, 或 Lys, 或缺失;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> 第 39 位的 Xaa 是 Val, Glu, Asp, Ser, 或 Lys, 或缺失。

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Thr Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35

<210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0008]

<222> (2)..(2)
<223> 第 2 位的 Xaa 是 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, 或 Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> 第 5 位的 Xaa 是 Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 第 6 位的 Xaa 是 His, Trp, Phe, 或 Tyr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 第 10 位的 Xaa 是 Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, 或 Ala;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 第 16 位的 Xaa 是 Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, 或磺基丙氨酸;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 第 17 位的 Xaa 是 His, Asp, Lys, Glu, 或 Gln;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> 第 18 位的 Xaa 是 Glu, His, Ala, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 第 20 位的 Xaa 是 Asp, Lys, Glu, 或 His;

[0009]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 第 21 位的 Xaa 是 Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 第 24 位的 Xaa 是 Ala, Glu, Asp, Ser, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 第 27 位的 Xaa 是 Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, 或 Glu;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> 第 28 位的 Xaa 是 Glu, Lys, 或 Asp;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> 第 29 位的 Xaa 是 Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, 或 Glu;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> 第 30 位的 Xaa 是 Arg, Glu, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 第 31 位的 Xaa 是 Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro, 或 Gly-Pro-NH2, 或缺失。

[0010]

<400> 4

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

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 5
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 第 2 位的 Xaa 是 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, 或 Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> 第 6 位的 Xaa 是 His, Trp, Phe, 或 Tyr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> 第 10 位的 Xaa 是 Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, 或 Ala;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 第 16 位的 Xaa 是 Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, 或磺基丙氨酸;

[0011]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 第 17 位的 Xaa 是 His, Asp, Lys, Glu, 或 Gln;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> 第 20 位的 Xaa 是 Asp, Lys, Glu, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 第 24 位的 Xaa 是 Ala, Glu, Asp, Ser, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> 第 29 位的 Xaa 是 Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, 或 Glu;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 第 31 位的 Xaa 是 Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro, 或 Gly-Pro-NH2, 或缺失。

<400> 5

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

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

<210> 6
<211> 31

[0012]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 第 2 位的 Xaa 是 Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, 或 Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 第 16 位的 Xaa 是 Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, 或半胱磺酸;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> 第 17 位的 Xaa 是 His, Asp, Lys, Glu, 或 Gln;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 第 21 位的 Xaa 是 Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, 或 Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 第 24 位的 Xaa 是 Ala, Glu, Asp, Ser, 或 His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 第 31 位的 Xaa 是 Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro, 或 Gly-Pro-NH2, 或缺失。

<400> 6

[0013]

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

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

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 第 1 位的 Xaa 是 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，α-甲基组氨酸；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 第 2 位的 Xaa 是甘氨酸，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，或苏氨酸；

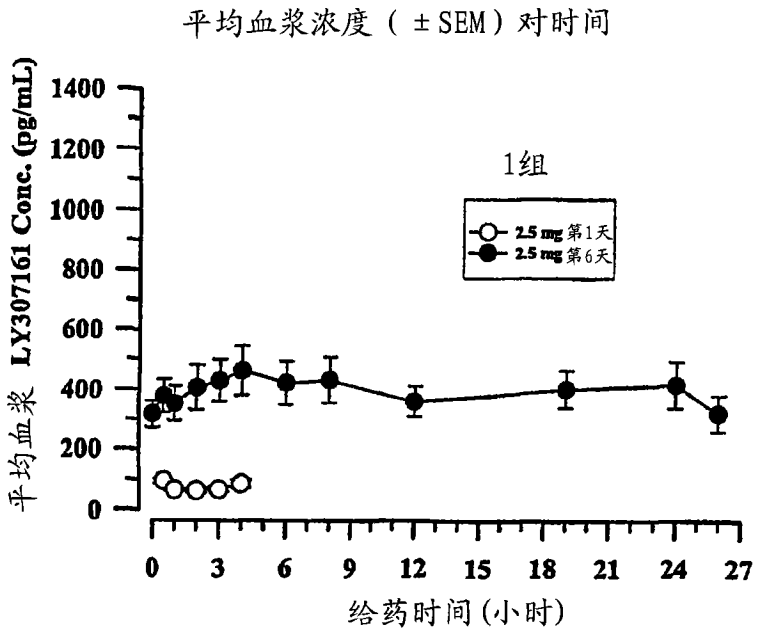
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> 第 16 位的 Xaa 是天冬氨酸，谷氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，赖氨酸，精氨酸，半胱氨酸，或半胱磺酸；

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> 第 31 位的 Xaa 是-NH2 或 Gly(OH).

<400> 7
[0014]

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

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


平均血浆浓度（±SEM）对时间
平均血浆 LY307161 Conc. (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1组
2.5 mg 第1天
2.5 mg 第6天
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
给药时间(小时)

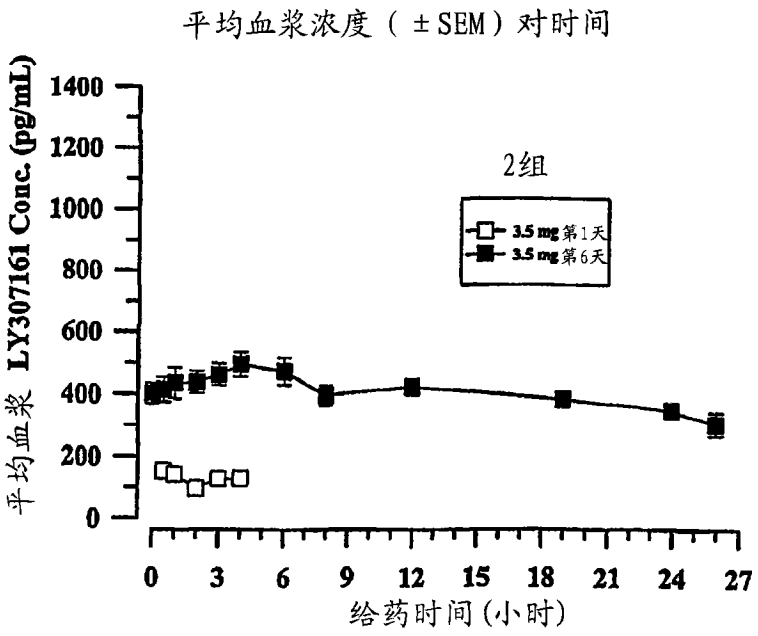
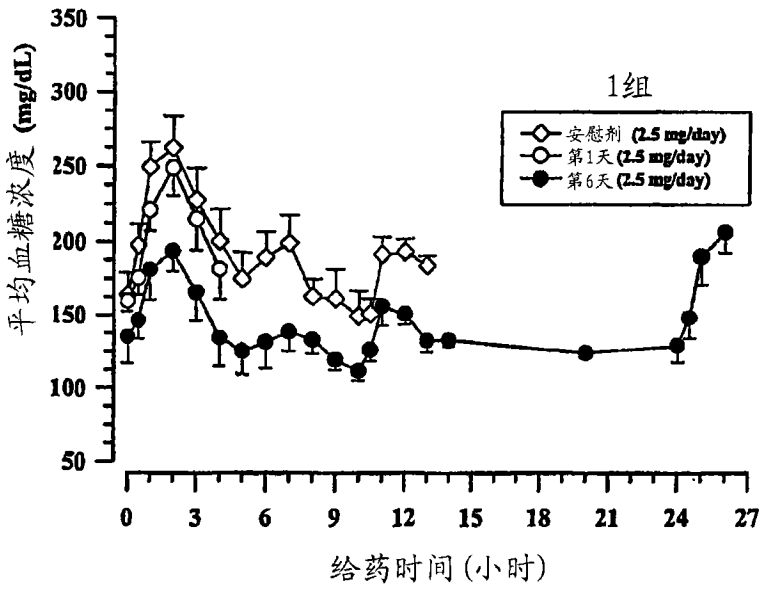

平均血浆浓度（±SEM）对时间
平均血浆 LY307161 Conc. (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
2组
3.5 mg 第1天
3.5 mg 第6天
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
给药时间(小时)

图 1

平均血糖浓度（±SEM）对时间



平均血糖浓度（±SEM）对时间

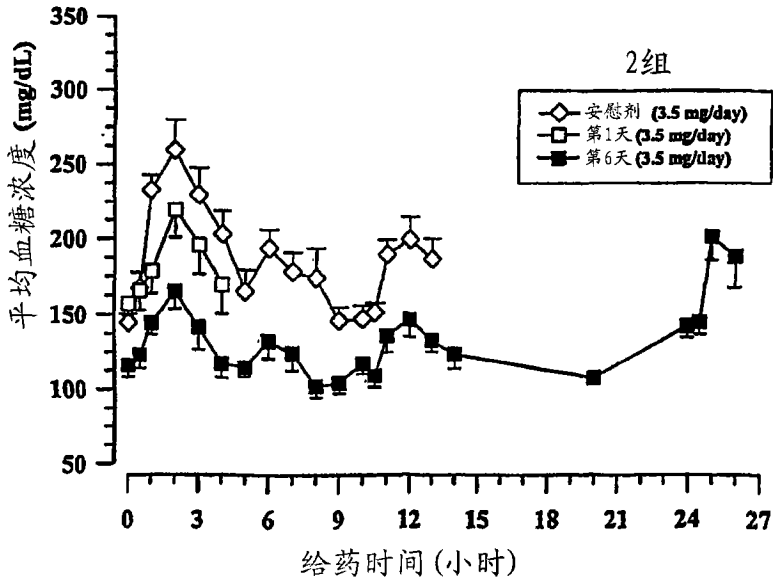
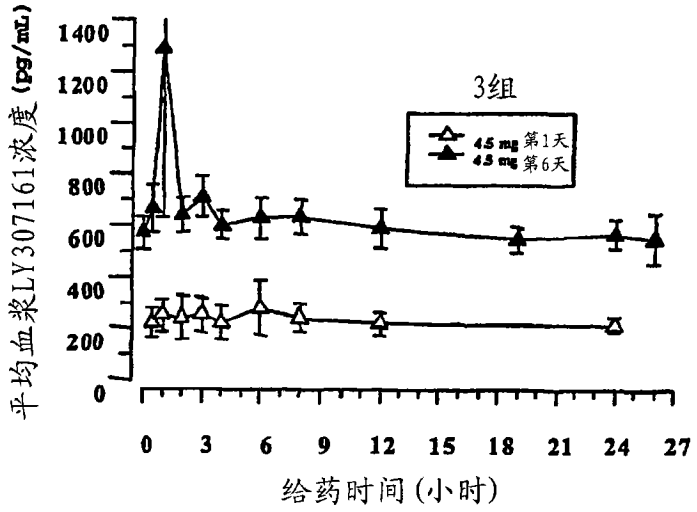


图 2

平均血浆浓度（±SEM）对时间



平均血浆浓度（±SEM）对时间

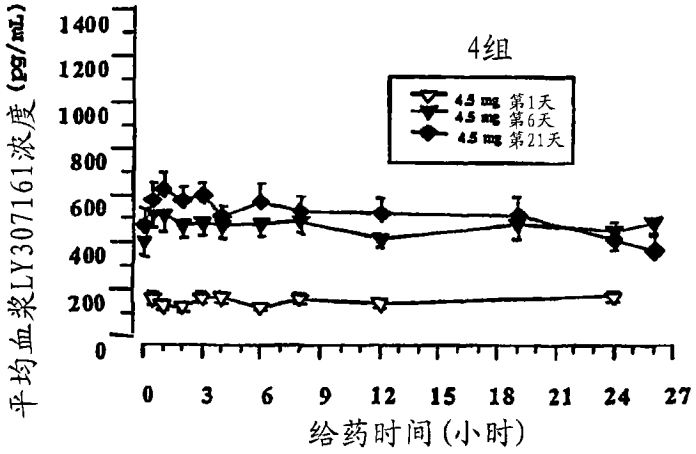
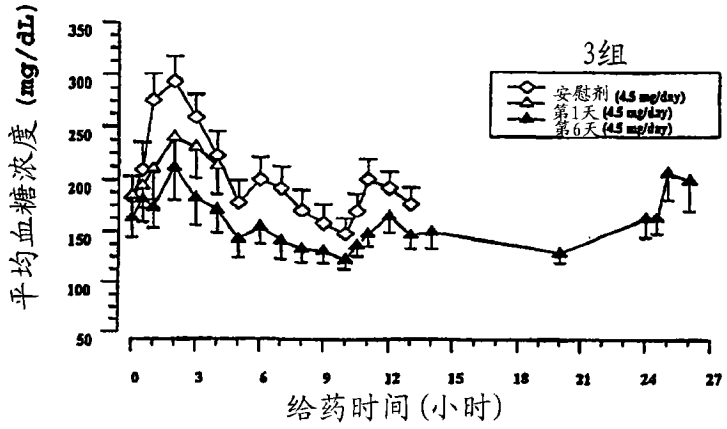


图 3

平均血糖浓度（±SEM）对时间



平均糖浆浓度（±SEM）对时间

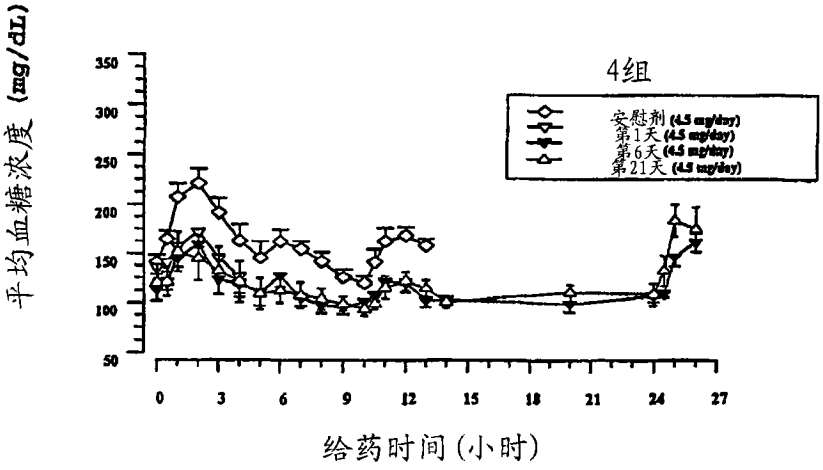


图 4