(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-521093
(P2004-521093A)
(43)公表日　平成16年7月15日(2004.7.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I	テーマコード（参考）
A61K 38/26	A61K 37/28	
A61P 1/00	A61P 1/00	
A61P 3/04	A61P 3/04	
A61P 3/10	A61P 3/10	
A61P 9/00	A61P 9/00	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 130 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002-549286(P2002-549286)
(86)(22)出願日	平成13年12月7日(2001.12.7)
(85)翻訳文提出日	平成15年6月13日(2003.6.13)
(86)国際出願番号	PCT/US2001/044698
(87)国際公開番号	WO2002/047716
(87)国際公開日	平成14年6月20日(2002.6.20)
(31)優先権主張番号	60/255,251
(32)優先日	平成12年12月13日(2000.12.13)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/295,655
(32)優先日	平成13年6月4日(2001.6.4)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/298,652
(32)優先日	平成13年6月15日(2001.6.15)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人　590005922
イーライ・リリー・アンド・カンパニー
ＥＬＩ　ＬＩＬＬＹ　ＡＮＤ　ＣＯＭＰＡＮＹ
アメリカ合衆国４６２８５インディアナ州　インディアナポリス市、リリー・コーポレイト・センター
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100103230
弁理士　高山　裕貢
(74)代理人　100087114
弁理士　齋藤　みの里

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グルカゴン様インスリン刺激性ペプチドを用いる長期治療計画

(57)【要約】
本発明は、GLP-1化合物の長期定常状態血清レベルを特定の範囲内に維持することにより疾病を治療する方法を包含する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Val^8-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つ生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモル／リットルおよび約200ピコモル／リットルの間に維持することを含む、血中グルコースレベルを正常化する方法。
【請求項２】
高血糖、2型糖尿病、肥満、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する方法であって、Val^8-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つ生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモル／リットルおよび約200ピコモル／リットルの間に維持することを含む方法。
【請求項３】
Val^8-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つ生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1化合物の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモル／リットルおよび約200ピコモル／リットルの間に維持することを含む、β細胞の劣化を防止する方法。
【請求項４】
Val^8-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つ生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1化合物の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモル／リットルおよび約200ピコモル／リットルの間に維持することを含む、体重減少を誘発する方法。
【請求項５】
血漿レベルを約100ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持する、請求項1ないし4のいずれか記載の方法。
【請求項６】
血漿レベルを約100ピコモルおよび約180ピコモルの間に維持する、請求項5に記載の方法。
【請求項７】
生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することを含む［ここで、Xは参照値1としてのVal^8-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価である］、血中グルコースレベルを正常化する方法。
【請求項８】
高血糖、2型糖尿病、肥満、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する方法であって、生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することを含む［ここで、Xは参照値1としてのVal^8-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価である］方法。
【請求項９】
生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することを含む［ここで、Xは参照値1としてのVal^8-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価である］、β細胞の劣化を防止する方法。
【請求項１０】
生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射す

ることにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することを含む［ここで、Xは参照値1としてのVal^{8}-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価である］、体重減少を誘発する方法。

【請求項１１】

血漿レベルを約100/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持する、請求項7ないし10のいずれか記載の方法。

【請求項１２】

血漿レベルを約100/Xピコモルおよび約180/Xピコモルの間に維持する、請求項11に記載の方法。

【請求項１３】

GLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1回を超えずに投与する、請求項1ないし12のいずれか記載の方法。

【請求項１４】

GLP-1アナログまたは誘導体が、Val^{8}-GLP-1(7-37)OH、Val^{8}-GLP-1(7-36)NH_2、Gly^{8}-GLP-1(7-37)OH、Gly^{8}-GLP-1(7-36)NH_2、Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH、Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2、Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH、Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-36)NH_2、Gly^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH、Gly^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-36)NH_2、Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH、およびVal^{8}-His^{37}-GLP-1(7-36)NH_2、Arg^{34}-GLP-1(7-36)NH_2、Arg^{34}-GLP-1(7-37)OHより成る群から選ばれる、請求項1ないし6のいずれか記載の方法。

【請求項１５】

GLP-1アナログまたは誘導体が結晶懸濁液製剤として投与されるGLP-1アナログである、請求項1ないし6のいずれか記載の方法。

【請求項１６】

GLP-1アナログまたは誘導体が、アシル化されたGLP-1誘導体である、請求項1ないし14のいずれか記載の方法。

【請求項１７】

アシル化されたGLP-1誘導体が、26位に存在するリジンのイプシロンアミノ基においてアシル化されているGLP-1アナログである、請求項16に記載の方法。

【請求項１８】

アシル化されたGLP-1誘導体がArg^{34}Lys^{26}-(N-ε-(γ-Glu(N-α-ヘキサデカノイル)))-GLP-1(7-37)である、請求項17に記載の方法。

【請求項１９】

エクセンディン-4を皮下注射することにより投与し、エクセンディン-4の長期定常状態血漿レベルを約6ピコモル/リットルおよび約40ピコモル/リットルの間に維持することを含む、血中グルコースレベルを正常化する方法。

【請求項２０】

高血糖、2型糖尿病、肥満、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する方法であって、エクセンディン-4を皮下注射することにより投与し、エクセンディン-4の長期定常状態血漿レベルを約6ピコモル/リットルおよび約40ピコモル/リットルの間に維持することを含む方法。

【請求項２１】

エクセンディン-4を皮下注射することにより投与し、エクセンディン-4の長期定常状態血漿レベルを約6ピコモル/リットルおよび約40ピコモル/リットルの間に維持することを含む、β細胞の劣化を防止する方法。

【請求項２２】

エクセンディン-4を皮下注射することにより投与し、エクセンディン-4の長期定常状態血漿レベルを約6ピコモル/リットルおよび約40ピコモル/リットルの間に維持することを含む、体重減少を誘発する方法。

【請求項２３】

6日間の1日1回長期投薬後にGLP-1が定常状態血漿レベルに到達する、請求項1ないし18のいずれか記載の方法。

【請求項２４】

6日間の1日1回長期投薬後にGLP-1化合物が血漿中でおよそ3倍に蓄積する、請求項23に記載の方法。

【請求項２５】

a) 容器；

b) Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つGLP-1アナログまたは誘導体の或る量を含む製剤；および、

c) GLP-1化合物の血漿レベルを60ピコモルおよび200ピコモルの間に維持する製剤の投与を規定する包装挿入物、

を含む、ヒト医薬用途のための製造品。

【請求項２６】

包装挿入物が、高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療するための使用を教示する、請求項25に記載の製造品。

【請求項２７】

GLP-1アナログまたは誘導体が、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHおよび$Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-ヘキサデカノイル)))-GLP-1(7-37)より成る群から選ばれる、請求項25または26に記載の製造品。

【請求項２８】

a) 容器；

b) エクセンディン-4の或る量を含む製剤；および、

c) エクセンディン-4の血漿レベルを6ピコモルおよび40ピコモルの間に維持する製剤の投与を規定する包装挿入物、

を含む、ヒト医薬用途のための製造品。

【請求項２９】

Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つGLP-1アナログまたは誘導体を24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、該GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持することにより、血中グルコースを正常化し、β細胞を保持し、体重減少を誘発し、または高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する医薬の製造のための、該GLP-1アナログまたは誘導体の用途。

【請求項３０】

血漿レベルが約100ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持される、請求項29に記載の用途。

【請求項３１】

エクセンディン-4を皮下注射することにより投与し、エクセンディン-4の長期定常状態血漿レベルを約6ピコモルおよび約40ピコモルの間に維持することにより、血中グルコースを正常化し、β細胞を保持し、体重減少を誘発し、または高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する医薬の製造のための、エクセンディン-4の用途。

【請求項３２】

GLP-1アナログまたは誘導体は24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与し、GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することにより［ここで、Xは参照値1としてのVal^{8}-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価である］、血中グルコースを正常化し、β細胞を保持し、体重減少を誘発し、または高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満および過敏性腸症候群より成る群から選ばれ

る状態を治療する医薬の製造のための、該GLP-1アナログまたは誘導体の用途。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
この出願は、2000年12月13日出願の米国仮出願第60/255251号、2001年6月4日出願の同60/295655号、および2001年6月15日出願の同60/298652号の優先権を主張するものである。
【０００２】
本発明は、医薬製造品および方法においてグルカゴン様インスリン刺激性ペプチドを使用する長期治療計画に関するものである。
【背景技術】
【０００３】
腸管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は、インスリン分泌を刺激し、グルカゴン分泌を低下させ、胃内容物排出を阻害し、グルコース利用を増大させ、そして食欲抑制と体重減少を誘発するその能力の故に、2型糖尿病治療薬として非常に有望である。さらに、前臨床試験は、GLP-1が、この疾病の進行と共に起こるβ細胞の劣化を防止するよう働くかも知れないことを示唆している。おそらくGLP-1の最も際だった特徴は、インスリン療法および幾つかの型の経口療法を使用する場合にしばしば観察される低血糖の危険性を伴わずにインスリン分泌を刺激する能力である。血中グルコースレベルが或る閾値レベル以下に低下した場合、GLP-1は活性でなくなる。
【０００４】
しかしながら、GLP-1(1-37）は極めて活性が低く、また、天然に存在する2種類の末端切除ペプチドGLP-1(7-37)OHおよびGLP-1(7-36)NH_2は半減期が極端に短く循環から速やかに浄化されるという事実によって、GLP-1ペプチドを含む治療の有用性は限定されてきた。したがって、GLP-1に関する研究は、より長い作用時間を与えるGLP-1アナログ、GLP-1誘導体、およびその製剤の開発に的が絞られている。この開発分野において多大な進歩があったにもかかわらず、長時間作用性GLP-1アナログまたは誘導体を用いたヒトにおける臨床データを報告する公開論文は無い。本発明以前には、特定の力価を持つGLP-1化合物の定常状態レベルが長期の治療期間安全に維持できるかどうか、そして、内因性GLP-1について解明された活性に伴う利点が提供され続けるかどうかは不明であった。
【０００５】
連続注入または頻回投与を必要とする天然GLP-1による幾つかの短期臨床研究は、高濃度のGLP-1がしばしば吐き気と嘔吐を惹起することを示唆している。このことは、臨床家の間に、これらの望ましくない効果が投与を限定させ、したがってこの薬物が本来優れた効果を産むことができる可能性があっても、その有効性は限定されるであろうという懸念を生じさせた。
【０００６】
患者への天然GLP-1(7-37)OHのi.v.または皮下連続注入による投与を含む幾つかの臨床研究が公表されている。Naslund, et al.,(1999) Am.J.Phys. 277(3):1-14; Deacon, et al.(1995) Diabetes 44:1126-1131; Toft-Nielsen, et al.(1999) Diabetes Care 22(7):1137-1143を参照されたい。公表されている研究は一貫して約0.75pmol/kg/分および2.4pmol/kg/分の間の用量を短時間使用している。しかしながら、GLP-1(7-37)OHは血漿に暴露されると速やかに分解するため、与えられた時点でどれだけのレベルの無傷／活性のGLP-1ペプチドが血漿中に存在するかは常に明確である訳ではない。
【０００７】
にもかかわらずNaslund, et al.は、0.75pmol/kg/分の速度で180分間連続投与した後の無傷のGLP-1(7-37)OHの血漿レベルを予想することができた。この著者は、サンドイッチラジオイムノアッセイを用いてN末端分解したおよび無傷のGLP-1(7-37)OHの両者を検出した。無傷のGLP-1の血漿レベルは処置の最後の120分間の間およそ20ピコモルであった。同様の検定を用いて、Toft-Nielsen et al.は、1.2pmol/kg/分および2.4pmol/kg/分の投与後の無傷のGLP-1レベルはそれぞれおよそ10.2ピコモルおよび22.5ピコモルであると報告し

た。

【０００８】

ところがこれらの研究は、無傷且つ活性なGLP-1の血漿レベルが、吐き気および嘔吐といった副作用を回避または最小化しつつ同時に治療効果を達成できるかどうかという疑問に答えてこなかった。同様にこれらの研究は、活性GLP-1の血漿レベルが、治療中相対的に平坦であるべきなのか、それとも生理的状態に似せたピークと谷が好ましいのかを指摘してはいない。したがって、かなりの進歩はあったものの、どのような治療計画が有効な長期治療を導き、そして吐き気や嘔吐のような副作用を最小にしつつ、係る治療を維持できるかどうかを発見および理解する必要性が依然として存在する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

出願人は、GLP-1化合物の連続的血漿レベルを特定の範囲に維持することが有効な治療を提供することを発見した。ピークと谷が無いことは、吐き気や嘔吐のような副作用を回避または最小化すると考えられる。したがって本発明は、吐き気や嘔吐のような副作用を回避または最小化する、一定範囲内の連続的血漿中GLP-1化合物レベルを維持することを含む、長期治療計画を提供する。本発明が包含する血漿レベルは最適な血中グルコース制御を提供する。さらにこの治療計画は、体重減少の誘発、β細胞機能の改善、休眠状態のβ細胞の活性化、細胞のβ細胞への分化、β細胞増殖、および臓器機能の維持を包含する、長期にわたる建設的な健康への効能を提供する。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明は、血中グルコースレベルを正常化し、β細胞の劣化を防止し、体重減少を誘発し、または、高血糖、2型糖尿病、肥満、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する方法であって、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つ生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモル／リットルおよび約200ピコモル／リットルの間に維持することを含む［ここで、該GLP-1アナログまたは誘導体は、24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与する］方法を包含するものである。

【００１１】

さらに本発明は、血中グルコースレベルを正常化し、β細胞の劣化を防止し、体重減少を誘発し、または、高血糖、2型糖尿病、肥満、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する方法であって、生物活性型のGLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することを含む［ここで、Xは数値1としてのVal^{8}-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価であり、且つ、該GLP-1アナログまたは誘導体は24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与する］方法を包含するものである。

【００１２】

さらに本発明は、血中グルコースを正常化し、β細胞を保持し、体重減少を誘発し、または、高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する医薬を製造するための、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つGLP-1アナログまたは誘導体の用途であって、GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持することを含み、且つ、該GLP-1アナログまたは誘導体を、24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与する、用途を包含する。

【００１３】

さらに本発明は、GLP-1アナログまたは誘導体の長期定常状態血漿レベルを約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間に維持することを含む［ここで、Xは参照値1としてのVal^{8}-GLP-1(7-37)OHに対するGLP-1アナログまたは誘導体のインビトロ力価であり、且つ、該GL

P-1アナログまたは誘導体は24時間毎に1または2回を超えずに皮下注射することにより投与する]、血中グルコースを正常化し、β細胞を保持し、体重減少を誘発し、または、高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態を治療する医薬を製造するための、GLP-1アナログまたは誘導体の用途を包含するものである。

【００１４】

さらに本発明は、ヒト医薬使用のための製造品であって、容器；Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの2倍以内のインビトロ力価を持つ或る量のGLP-1アナログまたは誘導体を含む製剤、およびGLP-1アナログまたは誘導体の血漿レベルを約60ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持する該製剤の投与を規定する包装挿入物、を含む製造品を包含する。

【００１５】

本明細書に開示し説明する本発明の目的のため、以下の用語および略語を下記のように定義する。

【００１６】

「治療計画」とは、最適な血漿レベルが長期的に維持されるようなGLP-1化合物の投与である。本発明に係る計画に使用するGLP-1化合物は、GLP-1レセプターと呼ばれるレセプターにおいて作用することによりそれらの生物学的効果を発揮する。故に、GLP-1レセプター刺激に対してまたはGLP-1化合物の投与に対して有利に反応する疾病および／または状態を有する対象は、本発明に係る計画で治療することができる。

【００１７】

したがってこの計画は、高血糖の治療、血中グルコース管理の維持、2型糖尿病の治療、肥満の治療、体重減少の誘発、卒中の治療、心筋梗塞の治療、手術後に起こるまたはその他の理由の異化作用変化の治療、過敏性腸症候群の治療、β細胞劣化の防止、β細胞増殖の誘発、インスリン遺伝子転写の刺激、IDX-1/PDX-1またはその他の成長因子のアップレギュレーション、β細胞機能の改善、休眠状態のβ細胞の活性化、細胞のβ細胞への分化、および／またはβ細胞複製を包含する（但しこれらに限定される訳ではない）様々な建設的効果を提供する。血漿レベルを長期にわたり特定範囲内に維持することからもたらされる建設的効果は、治療される疾病または状態に付随する症状の改善、治療される疾病または状態に付随する症状の発現の遅延、治療の無い場合に比して増大した寿命、および／または治療の無い場合に比してより優れた生活の質、を包含する。2型糖尿病およびこれに伴う高血糖の治療に関連する本発明に係る治療計画により提供されるさらなる利点は、血中グルコースの自己監視をなくすまたは減らすこと、および食事時間に合わせる必要のない薬物投与に起因する、利便性の向上を包含する。

【００１８】

「長期的治療」とは、治療過程の間、活性GLP-1化合物の血漿レベルを特定範囲内に維持することを指す。特定の範囲とは、最適の有効性を提供し、且つ吐き気や嘔吐のような副作用を惹起しないまたは少なくとも最小化する活性GLP-1化合物の血漿レベルに相当する。計画される治療過程は治療される疾病または状態に応じて異なる。例えば、経口的薬物治療がもはや血中グルコースレベルを制御し得ない2型糖尿病患者のために計画された治療過程は、その患者がGLP-1レセプター刺激に反応する充分なβ細胞機能を持っている期間を包含する。肥満患者または体重減少を望む患者のために計画された治療過程は、その患者の身長と体格に基づく正常体重に到達するまでの期間を包含する。計画される治療過程はさらに、2型糖尿病の進行、糖尿病の発現、グルコース寛容減損、症状xの防止、または体重増加の防止といった予防的目標を持っているかも知れない。この型の治療は患者の生涯にわたり続く可能性がある。

【００１９】

「長期」とは一般に、好ましくは1日に2回を超えない、最も好ましくは1日に1回を超えない長期間の規則的投与を指す。しかしながら本明細書で使用する長期投与は、1日に1回または2回の毎日投与に加え、他の治療計画をも包含できる。例えば、長期投与は、充分な治療的血漿レベルを提供する持続放出製剤の規則的投与を包含する。このような投与は週

に1回、月に1回、またはそれ以下の頻度の投与を包含できる。短期または必要時投与とは対照的に、長期投与は、薬物投与を、食事のような事象、家庭でのグルコース監視の結果、または食欲抑制の必要性と連動しない。

【００２０】

「インスリン刺激活性」とは、グルコースレベルの上昇に応答してインスリン分泌を刺激し、それにより細胞によるグルコース取り込みと血漿グルコースレベルの低下を惹起する能力を指す。インスリン刺激活性は、GLP-1レセプター結合活性またはレセプター活性化を測定するインビボ実験およびインビトロ検定（例えばGelfand, et al.のEP619322および米国特許第5120712号にそれぞれ記載のような、膵臓島細胞またはインスリノーマ細胞を用いる検定）の利用を包含する当分野で既知の方法により評価できる。これらの参考文献の全教示は引用により本明細書の一部とする。インスリン刺激活性はインスリンレベルまたはC-ペプチドレベルを測定することによりヒトにおいて常套的に測定する。

【００２１】

「容器」とは、医薬製品の保存、運搬、調剤、および／または取り扱いのために好適な入れ物および密閉物を意味する。

【００２２】

「包装」とは、簡便な投与を可能にする使用者にとって便利な装置および／またはデリバリー、教育、および／または投与を助ける付随的装置を意味する。包装は、患者へのGLP-1化合物の投与を改善し、患者の教育のための教示時間を短縮または改善し、改善された保健経済学的研究のための基盤を提供し、そして／または分配経路の作業負荷を限定することができる。また、包装は、紙製包装、収縮包装、シースルー上面包装、試用クーポン、教育材料、付随的供給品、および／またはデリバリー装置を包含できるがこれらに限定される訳ではない。

【００２３】

「包装挿入物」とは、その製品をどのように投与するかという説明を提供する該製品に添付した情報、ならびに、医師、薬剤師、および患者に、該製品の使用についての情報開示に基づく決定をさせるために必要な安全性および有効性のデータ、および／または患者の教育的情報を意味する。包装挿入物は一般的には医薬品の「ラベル」と考えられる。

【００２４】

「対象」または「患者」とはヒトである。

本明細書で使用する「インビトロ力価」とは、細胞に基づく検定においてGLP-1レセプターを活性化する或る化合物の強さまたは能力の尺度である。インビトロ力価は、一回の用量-反応実験において50%活性を産む、化合物の有効濃度である「EC_{50}」として表す。本発明の目的のため、インビトロ力価は、ヒトGLP-1レセプターを安定に発現するHEK-293 Aurora CRE-BLAM細胞を使用する蛍光検定を用いて決定する。この検定は17頁および実施例3でより詳細に論ずる。本明細書に開示するインビトロ力価の値は、3ナノモルから30ナノモルまでのGLP-1化合物濃度をもたらす希釈を用いて用量反応曲線を作製することにより確立したEC_{50}として表す。相対的インビトロ力価の値は、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHを対照とし、この対照を参照値1に割り当てることにより確立する。

【００２５】

本発明に係るGLP-1化合物は、GLP-1レセプターに結合してシグナル伝達経路を始動させ、その結果本明細書に記載のようなインスリン刺激作用またはその他の生理的効果、例えばグルカゴンの阻害および胃内容物排出の遅延をもたらす能力を有するといった、GLP-1(7-37)OHまたはGLP-1(7-37)OHの断片との充分な相同性を有する。例えばGLP-1化合物は、Lacy, et al.(1967) Diabetes 16:35-39に記載の方法の改変である、EP619322に記載のような細胞に基づく検定を用いて、インスリン刺激活性について試験することができる。膵臓組織のコラゲナーゼ消化物はフィコール勾配（ハンクス均衡塩類溶液中27%、23%、20.5%、および11%、pH7.4）で分離する。20.5%/11%界面から島を採集し、洗浄し、そして立体顕微鏡下に外分泌およびその他の組織を含まないように精選する。この島を、10%牛胎児血漿を添加し11mMグルコースを含有するRPMI1640培地中、37℃で95%空気／5%CO_2で一夜イ

ンキュベートする。調べようとするGLP-1化合物を、10%牛胎児血漿および16.7mMグルコースを含有するRPMI培地中一定範囲の濃度、好ましくは3ナノモルないし30ナノモルに調製する。次に、単離した約8ないし10個の島を、96ウェル微量定量皿に入れた総体積250μlのGLP-1化合物含有培地にピペットで移す。この島を、37℃、95%空気、5%CO_2で90分間、GLP-1化合物の存在下にインキュベートする。次いで島を含まない培地のアリコートを集め、その100μlを、存在するインスリン量について、Equate Insulin RIAキット（Binax,Inc., Portland, ME）を用いてラジオイムノアッセイにより検定する。

【００２６】

本発明に係るGLP-1化合物はVal^8-GLP-1(7-37)OHのインビトロ力価よりも10倍以上は低くないことが好ましい。好ましくはこのGLP-1化合物はVal^8-GLP-1(7-37)OHのインビトロ力価より低くないインビトロ力価を有する。代表的なGLP-1化合物は以下に詳細に論ずる。さらに、本明細書に記載の長期治療計画に使用するGLP-1化合物は、要求された有効範囲に血漿レベルが長期間維持されるよう、修飾または製剤化を必要とするかも知れない。GLP-1化合物の修飾および製剤化もまた以下に詳細に論ずる。

【００２７】

GLP-1は2型糖尿病の可能性ある治療として提起されたものの、その短い半減期およびプロテアーゼ分解に対する感受性がこれを研究するには困難な分子とした。さらに、活性GLP-1の1回の皮下またはi.v.ボーラス投与後に、吐き気や嘔吐といった副作用が観察された。本出願人は、これは、投与直後に得られる該化合物の初期ピークレベルに起因するものと考える。短時間作用性製剤が治療上の利益を与えるためには、治療範囲において少なくとも食後のグルコース低下作用を達成する程充分長い血中レベルを提供する充分な高用量を注射しなければならない。短時間作用性GLP-1製剤を比較的高用量投与した後に起こるこれらの望ましくない効果は、患者に投与できる量を限定し、それに応じて有効性を限定する。

【００２８】

臨床研究は、インスリン分泌の刺激、グルカゴン分泌の阻害、肝グルコース産生の低下、胃空虚下の阻害、および体重減少の促進を包含するGLP-1の生理的効果の幾つかを確立した。しかしながらGLP-1化合物は、薬理学的レベルの活性GLP-1が治療過程の間ずっと連続的に存在しない限り、治療計画において有効に使用することはできない。この事は、血中グルコース低下能力および本明細書に記載のその他の長時間の生理的効果を充分に活用するために、特に当てはまる。

【００２９】

したがって本発明は、有効性を達成し尚且つ吐き気や嘔吐といった副作用を回避または最小化するために必要な特別の力価を有する活性GLP-1化合物の定常状態血漿レベルを記載するものである。薬物の定常状態濃度は、クリアランスと濃縮の所産である薬物排除が薬物のアベイラビリティーの速度に等しい時に実現する。間欠的投与の状況では、各投与の合間に薬物濃度が上がったり下がったりする。定常状態では、それぞれの合間にそのサイクル全体が全く同一に反復される。しかしながら本明細書に論じたように、投与の合間の活性GLP-1血漿中濃度の著明な変動は、吐き気や嘔吐のような副作用の原因であり、最適な生物学的応答をもたらさない。

【００３０】

本発明に係る治療計画は、特定の状態のための特定の治療工程の間ずっと、GLP-1化合物の連続的な定常状態血漿レベルが維持されるようにGLP-1化合物を投与することを含む。本発明の文脈において、血漿レベルを「維持する」とは、いったん定常状態レベルが達成されたならば治療過程中の薬物の血漿濃度が著しく変動せず、したがって吐き気や嘔吐のような副作用が回避または最小化され、同時に最適な治療効果が得られる事を意味する。薬物レベルは、いったん定常状態の血漿レベルが達成された後にそれが要求された有効範囲内に維持されるならば著しく変動しない。驚くべき事に、天然GLP-1と似通った力価を持つ、外から投与されたGLP-1化合物の治療的血漿レベルは、体内で分泌される循環内のGLP-1レベルよりも著しく高い。

【００３１】
本発明は、長時間作用性GLP-1製剤を3種類の異なる用量レベルで1日に1回皮下注射で投与する臨床治験から作製したデータに基づくものである。6日間の投与の後、薬物レベルは定常状態のプラトーに達し、これが治療過程の間連続的に維持された。本発明に係る長期治療計画は、本明細書に記載の範囲内の血漿レベルを得るため連続的に投与されるGLP-1化合物を含み、または、より好ましくは長時間作用性GLP-1化合物の投与を含む。本発明の文脈における長時間作用性とは、活性GLP-1化合物の血漿レベルが単一用量のデリバリー後少なくとも12時間、本明細書に記載の治療的範囲内にとどまる事を意味する。好ましくは血漿レベルは単一用量のデリバリー後少なくとも24時間この範囲内に維持される。この好ましい時間作用が1日1回の投与をもたらす。

【００３２】
1日目にVal^{8}-GLP-1(7-37)OHを含有する持続放出製剤を投与して、2.5mg、3.5mg、および2群の4.5mgにそれぞれ対応する用量について、105、147、300、および222pg/mLの平均Cmax値を達成した。これらのCmax値は、治療の1日目に所定用量のうち１つにおいて1群8人の患者について達成された無傷のVal^{8}-GLP-1(7-37)OHの平均最大血漿中濃度を表す。（図1および3を参照されたい）。3つの群全てについてVal^{8}-GLP-1(7-37)OHの血漿中濃度は幾らかのグルコース低下を生じ、200pg/mL以上のレベルが最も著明な効果を示した（第1表）。平均血漿プロファイルの精査は、6日間の1日1回投与の後に定常状態が本質上達成され、薬物の蓄積はほぼ3倍である事を示唆した。6日目において、2.5mg、3.5mg、および4.5mg投与群の平均Cmax値はそれぞれ534、525、および570pg/mLであった。活性薬物への暴露を表す、対応する$AUC_{(0-24)}$値もまた似通ったものであり、それぞれ8878、9846、および10619ng*h/Lであった。したがって、1.8倍の用量増加に、1.2倍の平均定常状態暴露AUC(0-24)の増大が結び付いた（図1および3を参照されたい）。

【００３３】
第1表
【表１】

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

略語：Rmax ＝ 平均最大濃度；AUC ＝ 曲線下面積。

【００３４】
投与前飢餓血中グルコースの臨床的に意味のある降下が、全治療群において投与後に観察された。Rmaxで表される平均最大観察グルコース濃度は、治療の6日目においてプラセボ対照群よりも23%ないし34%の範囲で低かった。さらに、6日目のグルコース応答は治療の21日後に観察されたものと似通っていた（図2および4を参照されたい）。応答のプラトーは2.5mgおよび3.5mg用量に相当する定常状態濃度で達成されたが、これはそれぞれ534および525pg/mLの平均Cmax値をもたらした。意外な事に、600pg/mL未満の血漿レベルを有する群では、重篤な吐き気および嘔吐は無く、稀な、概して短い吐き気または嘔吐のエピソ

ードが観察されたに過ぎなかった。一人の患者にVal^{8}-GLP-1(7-37)OHのCmax 990pg/mLをもたらす用量が投与されたが、この高いレベルは若干の吐き気を伴った。

【００３５】

加えて、治療群では体重減少が起こった。21日間の投与期間中の患者一人あたりの平均体重減少量はおよそ2.1kgであった。

【００３６】

類似の力価を有するGLP-1化合物の分子量には違いがあるため、観察されたVal^{8}-GLP-1(7-37)OHの血漿中レベルをpg/mLからピコモル（pmole/L）に変換した。したがって、最大効果を提供し尚且つ吐き気および嘔吐といった副作用を回避または最小化する好ましい血漿レベルの範囲は、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの力価と同様または2倍以内の力価を有するGLP-1化合物について約60および約200pmole/リットルの間である。より好ましくは、血漿レベルは約80ピコモルおよび約200ピコモルの間である。さらに好ましくは血漿レベルは約100ピコモルおよび約200ピコモルの間である。

【００３７】

したがって、さらに本発明は、血中グルコースの正常化、β細胞の保持、体重減少の誘発、または、高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態の治療のための医薬を製造するための、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの力価と類似または2倍以内の力価を持つGLP-1化合物の用途に関するものである［ここでこの医薬は、GLP-1化合物の長期定常状態血漿レベルが約60ピコモルおよび約200ピコモルの間、好ましくは約80ピコモルおよび約200ピコモルの間、より好ましくは約100ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持されるような長期投与に適合している］。

【００３８】

本明細書で論ずる血漿レベルとは、血漿中で測定した活性GLP-1化合物の濃度を指す。血漿はDPP-IVとして知られる酵素を含有し、これはGLP-1化合物のN末端アミノ酸を容易に開裂する。GLP-1は活性であるためにはN末端に無傷のヒスチジンがなければならないという事が知られている。例えば、GLP-1(7-37)OHは血漿中に放出されると速やかに分解を受けてGLP-1(9-37)OHとなる。GLP-1(9-37)OHは活性でない。さらに、GLP-1はC末端での開裂によっても不活性化され得る。不活性なGLP-1(7-33)代謝産物もまた文献に報告されている。本明細書に記載のVal^{8}-GLP-1(7-37)OHの血漿レベルはサンドイッチラジオイムノアッセイを用いて測定した。この検定は、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの無傷のアミノ末端を特異的に認識する抗体を、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの無傷のC末端を認識する別の抗体と組み合わせて利用するものである。このようにして活性Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの血漿レベルのみが測定される（実施例2を参照されたい）。

【００３９】

Val^{8}-GLP-1(7-37)OH以外の活性GLP-1化合物の血漿レベルは、被験化合物の無傷のN末端を特異的に同定し且つ天然GLP-1と交差反応しない抗体を当分野で周知の方法によって作製することにより、同様に測定できる。

【００４０】

Arg^{34}Lys^{26}-(N-ε-(γ-Glu(N-α-ヘキサデカノイル)))-GLP-1(7-37)のような幾つかのGLP-1誘導体は、血漿アルブミンと結合し徐々にアルブミンから解離して、GLP-1レセプターに結合してシグナルを始動させ得る非結合誘導体として血漿中に放出されるため、長時間作用性である。本発明の目的のため、血漿レベルとは、アルブミンと結合せずに血漿中に存在するArg^{34}Lys^{26}-(N-ε-(γ-Glu(N-α-ヘキサデカノイル)))-GLP-1(7-37)のような活性GLP-1誘導体の濃度を指す。

【００４１】

副作用を最小化しつつ最大の有効性を達成するため、GLP-1化合物の血漿レベルは治療過程中にいったん定常状態レベルが得られたならば著しく変動すべきでない。レベルは、治療過程全体を通じていったん定常状態レベルが達成された後にそれが本明細書に記載の範囲内に維持されるならば著しく変動しない。最も好ましくは、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの力価

と類似またはその2倍以内の力価を有するGLP-1化合物の血漿レベルを、定常状態レベルが得られた後、治療過程全体を通じて約100ピコモルおよび約200ピコモルの間に維持する。例えば、図3は、1日1回の投与に基づく15日間の過程全体において、平坦且つ著しい変動の無いVal^8-GLP-1(7-37)OHの血漿レベルを示す。レベルは、約120ピコモルおよび180ピコモルの間に相当する、約400および約600pg/mLの間に維持される。

【００４２】

Val^8-GLP-1(7-37)OHおよび類似力価のGLP-1化合物について適当な血漿レベルの最適範囲（第2表を参照されたい）は、異なる力価を持つエクセンディン-3およびエクセンディン-4を包含する他のGLP-1化合物にも適用できる。類似力価を持つGLP-1化合物は、インビトロ力価検定で測定した際にVal^8-GLP-1(7-37)OHの2倍以内の活性を持つ化合物を包含する。

【００４３】

本発明の目的のための好ましい検定は、ヒトGLP-1レセプターを安定に発現するHEK-293 Aurora CRE-BLAM細胞を用いてEC_{50}力価を測定するものである。これらのHEK-293細胞は、β-ラクタマーゼ（BLAM）遺伝子の発現をさせるcAMP応答要素（CRE）を持つDNAベクターを安定に取り込んだ。GLP-1アゴニストとレセプターとの相互作用は、cAMP応答要素の活性化およびそれに続くβ-ラクタマーゼの発現をもたらすシグナルを始動させる。次に、β-ラクタマーゼ（Aurora Biosciences Corp.）により開裂させた時に蛍光を放出するβ-ラクタマーゼCCF2/AM基質を、GLP-1アゴニスト力価の測定値を与える特定量のGLP-1アゴニストに暴露した細胞に加える事ができる。この検定はさらに、Zlokarnik, et al. (1998) Science 279:84-88に記載されている（実施例3をも参照されたい）。第2表に列挙したEC_{50}値は、3ナノモルから30ナノモルまでの希釈を用いる用量反応曲線を作製することにより上記のBLAM検定を利用して決定した。

【００４４】

エクセンディン-4はVal^8-GLP-1(7-37)OHよりおよそ5倍高い力価を持っている。したがって、エクセンディン-4の最適血漿レベルはVal^8-GLP-1(7-37)OHおよび類似力価を持つ化合物に関して適当なレベルよりもおよそ5倍低い。これは約6ピコモルおよび約40ピコモルの間、好ましくは約12ピコモルおよび約30ピコモルの間の範囲の血漿レベルに相当する。増大した力価を持つGLP-1化合物のもう一つの例は、Val^8-GLP-1(7-37)OHよりおよそ3倍高い力価を持っているVal^8-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OHである。したがってこの化合物の最適血漿レベルはVal^8-GLP-1(7-37)OHについて決定されたレベルよりもおよそ3倍低い。

【００４５】

第2表

【表２】

GLP-1化合物	Val^{8}-GLP-1(7-37)OHと比較したインビトロ活性
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
エクセンディン-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-ヘキサデカノイル)))-GLP-1(7-37)	1.92

【００４６】
したがって、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHの力価とは異なる力価を持つGLP-1化合物について適当な血漿レベルの範囲を決定することができる。例えば、特定のGLP-1化合物のための血漿レベル範囲は約60/Xおよび200/Xの間、好ましくは約60/Xおよび150/Xの間、最も好ましくは約100/Xおよび約150/Xの間［ここでXは、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHに対する該GLP-1化合物のインビトロ力価である（ここでVal^{8}-GLP-1(7-37)OHは参照値1を持つ）］である。
【００４７】
さらに本発明は、血中グルコースの正常化、β細胞の保持、体重減少の誘発、または、高血糖、2型糖尿病、卒中、心筋梗塞、手術後に起こる異化作用の変化、肥満、および過敏性腸症候群より成る群から選ばれる状態の治療のための医薬を製造するための、GLP-1化合物の用途に関するものである［ここでこの医薬は、GLP-1化合物の長期血漿レベルが約60/Xピコモルおよび約200/Xピコモルの間（ここでXは、参照値1を有するVal^{8}-GLP-1(7-37)OHに対する該GLP-1化合物のインビトロ力価である）に維持されるような長期投与に適合している］。
【００４８】
本発明の発明者が発見した範囲内に血漿レベルを維持することにより、患者の利便性の立場からの利益と同時に数多くの臨床上の利益が得られる。この治療計画を利用する際には、対象にとって低血糖の危険性は全くまたは殆ど無い。加えてこの治療法は、侵襲的な、計画的な、および／または時間のかかる事象を最小化する。さらにこの治療法は、利用に関連した血中グルコースの自己監視を減らす事により患者に利便性を与える。最も好ましくは、この治療計画を利用する対象の血中グルコースの自己監視を著しく減らす、または排除する。例えばこの利用は、患者が食事の前、最中、または後に計画することを必要としない。最も好ましくは、対象は、この計画の利用を、いかなる量のグルコース、カロリー、または栄養の消費事象とも結び付ける必要がない。さらに本発明の使用は、好ましくは必要な有効量を決定するために対象が必要とするいかなる用量滴定をも限定する。最も好ましくは、用量滴定は必要なく、この事によって1または2種類の用量が全患者にとって適当となる。
【００４９】

前臨床データはGLP-1療法に伴う長期的な健康上の恩恵の幾つかを示唆しているが、係る恩恵の達成に要する定常血漿レベルに関する理解が不足しているため、ヒト患者でこれらの長期的な恩恵を利用することはできなかった。

【００５０】

本明細書に記載の無傷のGLP-1化合物の血漿レベルを維持することにより、グルカゴンの抑制、ソマトスタチンのアップレギュレーション、インスリン遺伝子転写の刺激、IDX-1/PDX-1またはその他の成長因子のアップレギュレーション、β細胞機能の改善、休眠β細胞の活性化、細胞のβ細胞への分化、β細胞複製、およびβ細胞増殖から誘導される長期的恩恵がもたらされる。本発明の目的のため、β細胞を保持する方法は以下の効果の全てまたは幾つかまたは１つに起因し得る：β細胞機能の改善、休眠β細胞の活性化、細胞のβ細胞への分化、β細胞複製、例えばアポトーシスの阻害によるβ細胞劣化の防止、およびβ細胞増殖。

【００５１】

本明細書に記載の無傷のGLP-1化合物の血漿レベルの維持は、体重減少または体重増加の欠如をもたらす食欲抑制といったような長期的恩恵をもたらす。例えば、肥満および関連状態は、この長期治療計画により治療または防止される。より少ない体重増加、体重増加の欠如、および／または減量による任意のおよび全ての体重減少は、総合的に前向きの身体的および心理的健康効果を対象に提供し、過大な体重に関連する危険因子を減らすのに寄与し、そして該化合物の使用遵守を強化し、それにより血中グルコース偏倚の可能性およびこれと同時に起こる作用を低減させる。

【００５２】

主張した血清レベルの範囲内でGLP-1化合物に長期暴露させるもう一つの恩恵は、GLP-1化合物が最初に投与された時に起こる胃内容物排出の遅延を排除することを包含する。GLP-1化合物が投与されている患者の食物摂取に対するグルコースピークのタイミングを分析することにより、GLP-1化合物の存在により引き起こされる胃内容物排出の遅延はおよそ2ないし3時間である事が判明した。驚くべき事に、長期GLP-1化合物療法の6日後に、グルコースピークの分析は、この胃内容物排出の遅延が排除される事を示した。したがって、主張した血清レベルの範囲内でのGLP-1化合物への長期暴露は、胃内容物排出の遅延といったGI効果の排除を導き、故に、薬剤に対する患者の寛容性を増し、ことによると副作用を最小化する。

【００５３】

この長期治療計画は、GLP-1化合物を他の血中グルコース低下薬、例えばメトフォルミン、スルホニル尿素類、チアゾリジンジオン類、および／またはビスグアニジン類と共に使用する治療を包含できる。本明細書に記載の血漿レベルの範囲は、GLP-1化合物を単一治療として使用、または経口抗糖尿病薬と併用する場合に適当である。

【００５４】

「GLP-1化合物」という語は、GLP-1(7-37)OHおよびGLP-1(7-36)NH_2ならびにこれらのアナログおよび誘導体を指す。GLP-1化合物はまたエクセンディン-3およびエクセンディン-4ならびにこれらのアナログおよび誘導体を包含する。これらのGLP-1化合物のいかなるものも、1回投与後に血漿レベルを長期間維持できるよう、さらなる修飾を要するかも知れず、または製剤化されるかも知れない。GLP-1ペプチドは、当分野で知られる様々な方法、例えば固相合成化学、天然供給源からのGLP-1分子の精製、組換えDNA技術、またはこれらの方法の組み合わせによって製造できる。例えば、GLP-1ペプチドを製造する方法は、米国特許第5118666、5120712、5512549、5977071および6191102号に記載されている。当技術の慣例として、GLP-1化合物のN末端残基を7位として表す。

【００５５】

二つの天然に存在する末端切除GLP-1ペプチドを、式I、配列番号1に示す。

【化１】

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-
29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa

式I、配列番号1

［式中、37位のXaaはGlyまたは-NH_2である］

【００５６】

好ましくは、GLP-1化合物は配列番号1のアミノ酸配列を有するか、または1、2、3、4または5個のアミノ酸が配列番号1と相違するように修飾されている。

【００５７】

当分野で知られる幾つかのGLP-1化合物は、例えばGLP-1(7-34)およびGLP-1(7-35)、GLP-1(7-36)、Gln^{9}-GLP-1(7-37)、D-Gln^{9}-GLP-1(7-37)、Thr^{16}-Lys^{18}-GLP-1(7-37)およびLys^{18}-GLP-1(7-37)を包含する。GLP-1(7-34)およびGLP-1(7-35)のようなGLP-1化合物は米国特許第5118666号に開示されており、これは引用により本明細書の一部とする。知られている他の生物活性GLP-1アナログが、米国特許第5977071号；米国特許第5545618号；米国特許第5705483号；米国特許第5977071号；米国特許第6133235号；およびAdelhorst, et al., J.Biol.Chem. 269:6275(1994)に開示されている。

【００５８】

さらにGLP-1化合物は、GLP-1(7-37)OHのN末端および／またはC末端に1またはそれ以上のアミノ酸が付加されているポリペプチド、またはその断片もしくはアナログを包含する。好ましくは、1ないし6個のアミノ酸がGLP-1(7-37)OHのN末端に付加され、そして／または1ないし8個のアミノ酸がC末端に付加される。この型のGLP-1化合物は約39個までのアミノ酸を有することが好ましい。「伸長された」GLP-1化合物中のアミノ酸は、GLP-1(7-37)OH中の対応アミノ酸と同じ番号で表示する。例えば、GLP-1(7-37)OHのN末端に2個のアミノ酸を付加して得られるGLP-1化合物のN末端アミノ酸は5位にあり、GLP-1(7-37)OHのC末端に1個のアミノ酸を付加して得られるGLP-1化合物のC末端アミノ酸は39位にある。伸長GLP-1化合物のアミノ酸1-6は、好ましくはGLP-1(1-37)OHの対応位置のアミノ酸と同じであるか、またはその同類置換である。伸長GLP-1化合物のアミノ酸38-45は、好ましくはエクセンディン-3またはエクセンディン-4の対応位置のアミノ酸と同じであるか、またはその同類置換である。エクセンディン-およびエクセンディン-4のアミノ酸配列は式II、配列番号2に示す。

【００５９】

【化２】

配列番号2

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Xaa-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-
29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-
40 41 42 43 44 45
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser

［式中、
8位のXaaはSerまたはGlyであり；そして、
9位のXaaはAspまたはGluである］

【００６０】

本明細書中使用する同類置換とは、或るアミノ酸を、同じ正味の電荷、ならびにほぼ同じ大きさおよび形状を持つ別のアミノ酸で置換することである。脂肪族または置換脂肪族アミノ酸側鎖を有するアミノ酸は、それらの側鎖にある炭素およびヘテロ原子の総数が約4より多く相違しない場合、ほぼ同じ大きさを持っている。それらは、側鎖にある分枝の数が1より多く相違しない場合、ほぼ同じ形状を持っている。側鎖にフェニルまたは置換フェニル基を持つアミノ酸は、ほぼ同じ大きさおよび形状を持つと考えられる。

【００６１】

GLP-1化合物の好ましい群は、式III（配列番号3）：

【化３】

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe-
29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-
40 41 42 43 44 45
Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa

式III (配列番号3)

【００６２】

［式中、7位のXaaは、L-ヒスチジン、D-ヒスチジン、デスアミノヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジンまたはα-メチルヒスチジンであり；
8位のXaaはAla、Gly、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、AspまたはLysであり；
9位のXaaはGlu、Asp、Lys、Thr、Ser、Arg、Trp、Phe、TyrまたはHisであり：
11位のXaaはThr、Ala、Gly、Ser、Leu、Ile、Val、Glu、Asp、Arg、HisまたはLysであり；
14位のXaaはSer、Ala、Gly、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、AspまたはLysであり；
12位のXaaはHis、Trp、Phe、またはTyrであり；
16位のXaaはVal、Ala、Gly、Ser、Thr、Leu、Ile、Tyr、Glu、Asp、Trp、His、Pheまたは

Lysであり；
17位のXaaはSer、Ala、Gly、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、AspまたはLysであり；
18位のXaaはSer、Ala、Gly、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、Asp、His、Pro、ArgまたはLysであり；
19位のXaaはTyr、Phe、Trp、Glu、Asp、Gly、Gln、Asn、Arg、CysまたはLysであり；
20位のXaaはLeu、Ala、Gly、Ser、Thr、Ile、Val、Glu、Asp、MetまたはLysであり；
21位のXaaはGlu、Asp、またはLysであり；
22位のXaaはGly、Ala、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、AspまたはLysであり；
23位のXaaはGln、Asn、Arg、Glu、Asp、His、またはLysであり；
24位のXaaはAla、Gly、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Arg、Glu、AspまたはLysであり；
25位のXaaはAla、Gly、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、AspまたはLysであり；
26位のXaaはLys、Arg、Gln、Glu、Asp、Trp、Tyr、PheまたはHisであり；
27位のXaaはGlu、Asp、Ala、His、Phe、Tyr、Trp、Arg、LeuまたはLysであり；
30位のXaaはAla、Gly、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、Asp、HisまたはLysであり；
31位のXaaはTrp、Phe、Tyr、Glu、Asp、Ser、Thr、ArgまたはLysであり；
32位のXaaはLeu、Gly、Ala、Ser、Thr、Ile、Val、Glu、Asp、またはLysであり；
33位のXaaはVal、Gly、Ala、Ser、Thr、Leu、Ile、Glu、Asp、ArgまたはLysであり；
34位のXaaはLys、Arg、Glu、Asp、AsnまたはHisであり；
35位のXaaはGly、Ala、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、Asp、Arg、Trp、Tyr、Phe、Pro、HisまたはLysであり；
36位のXaaはArg、Lys、Glu、Asp、Thr、Ser、Trp、Tyr、Phe、GlyまたはHisであり；
37位のXaaはGly、Ala、Ser、Thr、Leu、Ile、Val、Glu、Asp、His、Lys、Arg、Trp、Tyr、Phe、Gly-Pro、Gly-Pro-NH_2、-NH_2であるか、または削除されており；
38位のXaaはArg、Lys、Glu、Asp、Ser、もしくはHisであるか、または削除されており；
39位のXaaはArg、Lys、Glu、Asp、Ser、もしくはHisであるか、または削除されており；
40位のXaaはAsp、Glu、Gly、もしくはLysであるか、または削除されており；
41位のXaaはPhe、Trp、Tyr、Glu、Asp、Ala、もしくはLysであるか、または削除されており；
42位のXaaはPro、Lys、Glu、もしくはAspであるか、または削除されており；
43位のXaaはGlu、Asp、Pro、もしくはLysであるか、または削除されており；
44位のXaaはGlu、Asp、Pro、もしくはLysであるか、または削除されており；そして、
45位のXaaはVal、Glu、Asp、Ser、もしくはLysであるか、または削除されている］
で示されるGLP-1アナログ、または、
それらのC-1-6-エステル、もしくはアミド、またはC-1-6-アルキルアミド、またはC-1-6-ジアルキルアミド（但し、37、38、39、40、41、42、43、または44位のアミノ酸が削除されている場合、当該アミノ酸より下流の各アミノ酸もまた削除されている）に含まれる。式IIIの包含するアナログは、GLP-1(7-37)OH、GLP-1(7-36)NH_2、エクセンディン-3、またはエクセンディン-4の対応アミノ酸と相違するアミノ酸を6個より多く持たない事が好ましい。式IIIの包含するアナログは、GLP-1(7-37)OH、GLP-1(7-36)NH_2、エクセンディン-3、またはエクセンディン-4の対応アミノ酸と相違するアミノ酸を1個から5個の間持つ事がより好ましい。

【００６３】

GLP-1化合物のもう一つの好ましい群は、式IV（配列番号4）：

【化４】

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

式IV（配列番号4）

【００６４】

［式中、
Xaa_8はGly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、またはThrであり；
Xaa_8はAsp、Glu、Arg、Thr、Ala、Lys、またはHisであり；
Xaa_{11}はHis、Trp、Phe、またはTyrであり；
Xaa_{16}はLeu、Ser、Thr、Trp、His、Phe、Asp、Val、Glu、またはAlaであり；
Xaa_{22}はGly、Asp、Glu、Gln、Asn、Lys、Arg、Cys、またはシステイン酸であり；
Xaa_{23}はHis、Asp、Lys、Glu、またはGlnであり；
Xaa_{24}はGlu、His、Ala、またはLysであり；
Xaa_{26}はAsp、Lys、Glu、またはHisであり；
Xaa_{27}はAla、Glu、His、Phe、Tyr、Trp、Arg、またはLysであり；
Xaa_{30}はAla、Glu、Asp、Ser、またはHisであり；
Xaa_{33}はAsp、Arg、Val、Lys、Ala、Gly、またはGluであり；
Xaa_{34}はGlu、Lys、またはAspであり；
Xaa_{35}はThr、Ser、Lys、Arg、Trp、Tyr、Phe、Asp、Gly、Pro、His、またはGluであり；
Xaa_{36}はArg、Glu、またはHisであり；
Rは Lys、Arg、Thr、Ser、Glu、Asp、Trp、Tyr、Phe、His、$-NH_2$、Gly、Gly-Pro、もしくはGly-Pro-NH_2であるか、または削除されている］
で示されるGLP-1アナログを含む。式IVの包含するアナログは、GLP-1(7-37)OH、またはGLP-1(7-36)NH_2の対応アミノ酸と相違するアミノ酸を6個より多く持たない事が好ましい。式IVの包含するアナログは、GLP-1(7-37)OH、またはGLP-1(7-36)NH_2の対応アミノ酸と相違するアミノ酸を1個から5個の間持つ事がより好ましい。

【００６５】

GLP-1化合物のもう一つの好ましい群は、式V（配列番号5）：

【化５】

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

式III（配列番号5）

【００６６】

［式中、
Xaa_8はGly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、またはThrであり；
Xaa_{12}はHis、Trp、Phe、またはTyrであり；
Xaa_{16}はLeu、Ser、Thr、Trp、His、Phe、Asp、Val、Glu、またはAlaであり；
Xaa_{22}はGly、Asp、Glu、Gln、Asn、Lys、Arg、Cys、またはシステイン酸であり；
Xaa_{23}はHis、Asp、Lys、Glu、またはGlnであり；
Xaa_{26}はAsp、Lys、Glu、またはHisであり；
Xaa_{30}はAla、Glu、Asp、Ser、またはHisであり；
Xaa_{35}はThr、Ser、Lys、Arg、Trp、Tyr、Phe、Asp、Gly、Pro、His、またはGluであり；
Rは Lys、Arg、Thr、Ser、Glu、Asp、Trp、Tyr、Phe、His、$-NH_2$、Gly、Gly-Pro、もしく

はGly-Pro-NH_2であるか、または削除されている］
で示されるGLP-1アナログを含む。式Vの包含するアナログは、GLP-1(7-37)OH、またはGLP-1(7-36)NH_2の対応アミノ酸と相違するアミノ酸を6個より多く持たない事が好ましい。式Vの包含するアナログは、GLP-1(7-37)OHまたはGLP-1(7-36)NH_2の対応アミノ酸と相違するアミノ酸を1個から5個の間持つ事がより好ましい。

【００６７】

GLP-1化合物のもう一つの好ましい群は、式VI（配列番号6）：

【化６】

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

式VI（配列番号6）

【００６８】

［式中、
Xaa_8はGly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、またはThrであり；
Xaa_{22}はGly、Asp、Glu、Gln、Asn、Lys、Arg、Cys、またはシステイン酸であり；
Xaa_{23}はHis、Asp、Lys、Glu、またはGlnであり；
Xaa_{27}はAla、Glu、His、Phe、Tyr、Trp、Arg、またはLysであり；
Xaa_{30}はAla、Glu、Asp、Ser、またはHisであり；
Rは Lys、Arg、Thr、Ser、Glu、Asp、Trp、Tyr、Phe、His、-NH_2、Gly、Gly-Pro、もしくはGly-Pro-NH_2であるか、または削除されている］
で示されるGLP-1アナログを含む。

【００６９】

GLP-1化合物のもう一つの好ましい群は、式VII（配列番号7）：

【化７】

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

（配列番号7）

【００７０】

［式中、
Xaa_7は、L-ヒスチジン、D-ヒスチジン、デスアミノ-ヒスチジン、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジンまたはα-メチル-ヒスチジンであり；
Xaa_8はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンまたはスレオニンであり、好ましくはXaa_8はグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンまたはスレオニンであり；
Xaa_{22}はアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン、リジン、アルギニン、システイン、またはシステイン酸であり；
Rは-NH_2またはGly(OH)である］
で示されるGLP-1アナログを含む。

【００７１】

式I、II、III、IV、V、およびVIで示される最も好ましいGLP-1化合物は、係るアナログまたは断片の骨格が8位にアラニン以外のアミノ酸を含むGLP-1アナログを含む（8位アナロ

グ）。8位の好ましいアミノ酸は、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはメチオニンであり、より好ましくはバリンまたはグリシンである。

【００７２】

その他の好ましいGLP-1化合物は、8位のアミノ酸が好ましくはグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはメチオニン、より好ましくはバリンまたはグリシンであって、且つ22位がグルタミン酸、リジン、アスパラギン酸、またはアルギニン、より好ましくはグルタミン酸またはリジンである事を除いてはGLP-1(7-37)OHの配列を有するGLP-1アナログである。

【００７３】

その他の好ましいGLP-1化合物は、8位のアミノ酸が好ましくはグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはメチオニン、より好ましくはバリンまたはグリシンであって、且つ30位がグルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、またはヒスチジン、より好ましくはグルタミン酸である事を除いてはGLP-1(7-37)OHの配列を有するGLP-1アナログである。

【００７４】

その他の好ましいGLP-1化合物は、8位のアミノ酸が好ましくはグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはメチオニン、より好ましくはバリンまたはグリシンであって、且つ37位がヒスチジン、リジン、アルギニン、スレオニン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、より好ましくはヒスチジンである事を除いてはGLP-1(7-37)OHの配列を有するGLP-1アナログである。

【００７５】

その他の好ましいGLP-1化合物は、8位のアミノ酸が好ましくはグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはメチオニン、より好ましくはバリンまたはグリシンであって、且つ22位がグルタミン酸、リジン、アスパラギン酸、またはアルギニン、より好ましくはグルタミン酸またはリジンであって、且つ23位がリジン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびヒスチジンであり、さらに好ましくはリジンまたはグルタミン酸である事を除いてはGLP-1(7-37)OHの配列を有するGLP-1アナログである。

【００７６】

その他の好ましいGLP-1化合物は、8位のアミノ酸が好ましくはグリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、またはメチオニン、より好ましくはバリンまたはグリシンであって、且つ22位がグルタミン酸、リジン、アスパラギン酸、またはアルギニン、より好ましくはグルタミン酸またはリジンであって、且つ27位がアラニン、リジン、アルギニン、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、またはヒスチジン、より好ましくはアラニンである事を除いてはGLP-1(7-37)OHの配列を有するGLP-1アナログである。

【００７７】

本明細書中使用する、GLP-1化合物を表記する命名法において、置換アミノ酸とその位置は親構造の前に示す。例えば、Val^{8}-GLP-1(7-37)OHは、通常GLP-1(7-37)OH（式I、配列番号1）の8位に存在するアラニンがバリンに置き換わっているGLP-1化合物を示す。

【００７８】

その他の好ましいGLP-1化合物は、

【化８－１】

Val^{8}-GLP-1(7-37)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,

【化８－２】

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, および Gly^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH.

を包含する。

【００７９】

より好ましいGLP-1化合物は、

【化９】

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, および Arg^{34}-GLP-1(7-37)OH.

である。

【００８０】
GLP-1化合物はさらに、GLP-1またはGLP-1アナログのアミノ酸配列を持ち、但し加えてそのアミノ酸側鎖、α-炭素原子、末端アミノ基、または末端カルボキシ基の1個またはそれ以上に化学的修飾を有する分子として定義される「GLP-1誘導体」を包含する。化学的修飾とは、化学的基の付加、新たな結合の創出、および化学的基の除去を包含するがこれらに限定される訳ではない。
【００８１】
この長期治療計画に使用するGLP-1化合物は、血漿レベルが、要求される有効な範囲に長期間維持されるよう、修飾または製剤化を必要とするかも知れない。例えばGLP-1化合物を、懸濁状のアモルファスまたは結晶性粒子に取り込ませる事［ここでGLP-1化合物は亜鉛またはプロタミンと複合体形成し、投与されると徐々に可溶化する］を包含する様々な手段が、長時間の作用を達成するために利用できる。別の手段は、GLP-1化合物が血漿アルブミンと結合して時間と共にゆっくりと解離するよう、GLP-1化合物を誘導体化することを包含する。さらに、経時的持続放出を提供するための生体吸着性ポリマーを使用するデポ製剤もまた、本発明での使用に好適である。
【００８２】
例えば、GLP-1化合物は、選択されたGLP-1ペプチドを約9.5ないし約11.5のpHでグリシン不含溶液に溶解することにより、長時間の作用を有する亜鉛結晶中に組み入れる事ができる。この「アルカリ性正常化」工程は該ペプチドのβシートコンホメーションの含有量を減らし、幾つかのGLP-1化合物の溶解度とバイオアベイラビリティーを増強するように見受けられる。この工程はまた、その後のプロセスに先立ち、該ペプチドを好ましいαヘリックスコンホメーションに維持する役割を果たす。このようにしてこの重要工程は、該ペプチドのバルクロットにおける変化を、より再生産性のある均質な溶液へと「正常化」する。
【００８３】
好ましくは、このアルカリ性正常化溶液中のペプチド濃度は5mg/mLより大きい。より好ましくはこの濃度は約10mg/mLないし約30mg/mLである。溶解しているペプチドの、他の好ましい濃度範囲は、約5mg/mLないし約25mg/mL、約8mg/mLないし約25mg/mLおよび約10mg/mLないし約20mg/mLである。最も好ましい濃度は約15mg/mLである。
【００８４】
好ましくは、水および塩基、例えばNaOH、KOHまたは水酸化アンモニウムのみを含むアルカリ性水溶液を使用して該ペプチドを溶解する。より好ましい塩基はNaOHである。
【００８５】
好ましくは、アルカリ性正常化工程のpHは約10.0ないし約11.0である。より好ましくはpHは約10.5である。溶解しているペプチドを含むアルカリ溶液は、約5分間ないし約3時間の間、一般に約20℃および約25℃の間である（但しこれに限定されると解してはならない）周囲温度で静置させておく事ができる。このアルカリ性溶液は穏やかに攪拌してもよい。より好ましくは、溶解しているアルカリ性ペプチド溶液は周囲温度で約1時間静置させる。当業者は、ペプチドコンホメーションの「正常化」を確実とし、しかも該ペプチドに起こり得る化学分解を回避または最小化する、この工程のためのpH、時間、温度および攪拌条件の組み合わせを、それぞれのペプチドについて容易に確立できる事が理解できるであろう。
【００８６】
選択されたペプチドの結晶を製造するプロセスにおける次の工程は、グリシンの添加である。グリシンのようなアミノ酸は亜鉛イオンに結合し、これはさらにペプチド中のヒスチジン残基(群)と極めて強固に結合する。したがって、亜鉛結合についての競合が、ペプチド結晶の形成に、そしてその後の結晶性組成物の安定性に役割を果たす事ができる。アルカリ性ペプチド溶液に添加されるグリシンは固体形態または保存溶液であってよい。好ましくはグリシンは固体で添加する。好ましくは、添加されるグリシンは遊離塩基型である。好ましくは、アルカリ性ペプチド溶液中で得られるグリシン濃度は約5mMないし約250mM

である。より好ましいグリシンの濃度範囲は約10mMないし約150mM、約20mMないし約100mM、約40mMないし約80mMおよび約55mMないし約65mMである。最も好ましくはグリシン濃度は約60mMである。

【００８７】

所望により、グリシン添加後にこのアルカリ性ペプチド溶液のpHを再調整してもよい。pHを調節する場合、好ましくは約9.0および約11.0の間のpHに調節する。より好ましくは約9.2および約9.8の間のpHに調節する。最も好ましくは約pH9.5に調節する。

【００８８】

所望により、グリシンを添加したアルカリ性ペプチド溶液を濾過してもよい。溶液中に不溶の粒子、粉末または繊維状物質の形跡が明らかな場合は濾過が推奨される。所望によりこれは、このプロセスの中で、無菌濾過を実施することにより溶液を滅菌する良い機会でもある。好ましくはこの濾過は、0.45μmまたはそれ以下の孔径を有する低蛋白結合性の無菌発熱性物質不含フィルターを用いて実施する。好ましくはこのフィルターは、0.22μmまたはそれ以下の孔径を有する、無菌で発熱性物質不含の低蛋白結合フィルターである。より好ましくはこのフィルターは、無菌0.22μm Millex(登録商標)フィルター（Millipore Corporation, Waltham, MA, USA）である。

【００８９】

結晶を作製するプロセスにおける次の工程は、最終的総容量の約2%ないし約20%の、エタノールおよびイソプロパノールより成る群から選ばれるアルコール、および、該ペプチド1モルあたり約0.5モルないし約2.5モルの亜鉛を、アルカリ性ペプチド溶液に添加することである。この亜鉛とエタノールは単一の水性保存液で添加してよく、または1もしくはそれ以上の段階に分けて任意の順序で添加してよい。好ましくはアルコールを亜鉛の前に添加する。

【００９０】

好ましくは、添加されるアルコールは、アルカリ性ペプチド-亜鉛-アルコール溶液の最終総容量の約2%ないし約20%（容量）を構成する。より好ましくは、アルコールは最終総容量の約5%ないし約15%を構成する。より好ましくは、アルコールは最終総容量の約6%ないし約12%を構成する。最も好ましくは、アルコールは最終総容量の約9%を構成する。好ましくは、アルコールはエタノールである。

【００９１】

この段階で添加される亜鉛とは亜鉛イオンを指す。この亜鉛は様々な形態で添加できるが、希HClで酸性化した酸化亜鉛溶液および酢酸亜鉛または塩化亜鉛のような塩の形態が好ましい。希HClで酸性化した酸化亜鉛溶液がより好ましい。

【００９２】

好ましくは、ペプチド1モルあたり1.0モルないし約2.25モルの亜鉛をこの工程で添加する。亜鉛添加についての別の好ましい範囲は、ペプチド1モルあたり1.1ないし2.0モルの亜鉛、ペプチド1モルあたり1.3ないし1.7モル、およびペプチド1モルあたり1.4ないし1.6モルを包含する。最も好ましくは、ペプチド1モルあたり約1.5モルの亜鉛を添加する。

【００９３】

好ましくは、ペプチド溶液に添加する亜鉛を含む溶液は、徐々にそして／または少量ずつ添加し、それにより添加部位で形成され得るペプチドおよび／または亜鉛複合体の限局的沈殿が最少化される。より好ましくは、グリシンは、この工程で添加される亜鉛を含む溶液の成分でもある。例えば、亜鉛-グリシン溶液は、酸化亜鉛をpH約1.6となるまで希HClに溶解し、次いで固体グリシンを添加することによって製造できる。溶液のpHを約pH2および約pH3の間となるまで上昇させるに充分な量のグリシンを加える。亜鉛-グリシン溶液のpHはさらに、例えば希NaOHを用いて上昇させる事ができる。この亜鉛-グリシン溶液の好ましいpH範囲は約pH4.0ないし約pH6.0である。亜鉛-グリシン溶液の、より好ましいpH範囲は約pH5.0ないし約pH5.5である。先に述べたように、グリシンは、該ペプチドと亜鉛の結合と競合し得る、亜鉛に対する結合親和性を有する。したがって、限局的沈殿形成の問題が最小化するため、該組成物に添加される亜鉛を含む溶液中のグリシンの存在は、こ

の亜鉛溶液をより速やかに添加することを可能にする。加えて、亜鉛-グリシン溶液をpH2.0以上、好ましくは約pH4.0ないし約pH6.0とすることにより、無菌ペプチド組成物中にこれを導入する前に、製造者によって例えばpH2-10の溶液を取り扱うと考えられるフィルターを使用して、該溶液を無菌濾過することが可能となる。好ましくはこの亜鉛-グリシン溶液は、約50mMないし約70mMのグリシンおよび約20mMないし約200mMの亜鉛を含む。

【００９４】

選択されたペプチドの最初の結晶化における最終工程は、溶液のpHを約pH7.5および約pH10.5の間に調節してペプチドの結晶を形成させる事である。溶液のpH調節に有用な好ましい試薬溶液は希HCl、希酢酸および希NaOHを包含する。

【００９５】

選択されたペプチドの結晶化にとって好ましいpH範囲は、約pH8.0ないし約pH10.0、約pH7.5ないし約pH9.5、約pH8.5ないし約pH9.2、約pH9.0ないし約pH9.5、約pH7.5ないし約pH8.5、約pH8.7ないし約pH9.5、および約pH9.2ないし約pH10.0を包含する。

【００９６】

当業者は、結晶化の好ましいpHは、該ペプチドの性質およびその濃度、アルコール濃度、亜鉛濃度、溶液のイオン強度ならびに結晶化温度を包含する多くの因子に依存するという事が理解できるであろう。例を挙げると、ペプチドVal^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OHは、約7.7ないし約8.1のpH範囲で選ばれたエタノールおよび亜鉛濃度においてのみ結晶を生成したが、ペプチドVal^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OHは約9.8ないし約10.4のpH範囲で広範囲の亜鉛およびエタノール濃度において結晶を生成した。

【００９７】

当業者はさらに、与えられた条件の組について、結晶化の最適pHを決定する好ましい方法はこれを実験的に決定すること、即ち、酸性化溶液、好ましくは希HClまたは希酢酸を少量ずつ徐々に添加し、それぞれの添加の後に何が起こるかを観察することであるという事が理解できるであろう。一般に、酸性溶液の添加箇所で少量の限局的領域の沈殿形成が起こる。沈殿の完全な再溶解のため、穏やかな攪拌にだんだん長い時間がかかるようになった時、それが、酸の添加を停止し透明または僅かに濁った溶液から結晶化を進行させるための最適な時点である。

【００９８】

当業者はさらに、結晶化のために選択するpHと温度は、結晶化が進む速度、結晶化収率、および生成する結晶の大きさと均質性に影響するという事が理解できるであろう。好ましくは、選択されたペプチドの結晶化のpHは約pH8.0ないし約pH10である。より好ましくはこのpHは約8.7ないし約9.5である。別の範囲の好ましい結晶化pHは約8.8ないし約9.3、約9.0ないし約9.5、および約8.5ないし約9.3である。最も好ましくは結晶化は約pH9.1で実施する。

【００９９】

好ましくは結晶化の温度は約10℃ないし約30℃である。より好ましくは結晶化温度は約15℃ないし約28℃である。最も好ましくは結晶化温度は周囲温度、または約20℃ないし約25℃である。

【０１００】

好ましくは、上記の結晶化工程は、約3時間ないし約72時間のうちに完結させる、即ち該ペプチドの90%またはそれ以上がほぼ結晶型で沈殿する。より好ましくはこの結晶化は約10時間ないし約48時間で完結する。最も好ましくはこの結晶化は約16時間ないし約26時間で完結する。結晶化の完結は、組成物のアリコートに存在する該ペプチドのHPLC分析を包含する種々の手段で決定できる。本明細書の方法5は、利用できるこのような１つのプロトコルを記載するものである。

【０１０１】

好ましくは、上記プロセスの工程に従って生成される結晶は薄板状結晶である。このプロセスにより生成した結晶は顕微鏡で調べる事ができる。

【０１０２】

上記のように製造したGLP-1ペプチドの結晶を含む薬用組成物は、原母液中の結晶懸濁液に適当な薬学上許容し得る賦形剤を添加することにより製造できる。別法として、この結晶を、濾過、低速遠心分離またはその他の相分離手段により単離し、様々な方法で薬学上許容し得る組成物の製造に利用できる。当業者は、このような薬用組成物の製造に役立つ好適な方法および賦形剤が理解できるであろう。

【０１０３】

以下のプロセスは、最初の結晶化段階から得た結晶および原母液から出発し、安定な薬用組成物の製造に至る。

【０１０４】

選択されたペプチドの結晶の安定な薬用組成物を製造するため、原母液全量またはその一部の中にある結晶懸濁液のpHを、該ペプチドの97%またはそれ以上が不溶性となるpH値まで下げる。好ましくはプロセスのこの部分は、最初の結晶化の完結が決定された後数時間以内に開始する。好ましくは、HClまたは酢酸の希釈溶液を用いてpHを下げ、この酸性溶液は徐々に、そして漸増する量を添加する。当業者は、この第二段階の結晶化を起こさせる好ましいpHは、該ペプチドの性質およびその濃度、アルコール濃度、亜鉛濃度、懸濁液のイオン強度ならびに結晶化温度を包含する多くの因子に依存するという事が理解できるであろう。好ましくはこのpHは、最初の結晶化が進行したpHよりも約0.2ないし2.0pH単位だけ低くする。より好ましくはこのpHは最初の結晶化が進行したpHよりも約0.5ないし約1.5pH単位だけ低くし、最も好ましくは約0.8ないし1.3pH単位だけ低くする。この第二段階の結晶化の温度は好ましくは周囲温度または約20℃ないし約25℃である。ペプチドVal^{8}-GLP-1(7-37)OHについては、好ましいpHは約7.5ないし約8.5である。より好ましいpHは約7.8ないし約8.2である。

【０１０５】

好ましくは、ペプチド結晶の懸濁液のpHを、98%またはそれ以上、より好ましくは99%またはそれ以上のペプチドが該組成物中で不溶性となるpHまで下げる。この第二段階の結晶化で生成するさらなる沈殿は結晶を含む。好ましくは、この第二段階の結晶化で生成するさらなる沈殿は、主として第一段階の結晶化で生成したものと同等の形態およびサイズ分布を有する結晶となる。

【０１０６】

好ましくは、第二段階の結晶化は、この第二段階の結晶化開始から30時間以内に、より好ましくは18時間以内に、より好ましくは6時間以内に、そして最も好ましくは2時間以内に次工程を開始させるに十分な程完結させる、即ち該ペプチドの97%またはそれ以上が不溶性となるようにする。沈殿化収率の定量は、該組成物のアリコート中に存在するペプチドのHPLC分析を包含する種々の手段により決定できる。

【０１０７】

選択されたペプチド結晶の安定な薬用組成物を製造するプロセスにおける次の工程は、薬学上許容し得る保存剤ならびにTRIS、マレイン酸塩、燐酸塩、琥珀酸塩、グリシルグリシンおよびアジピン酸塩より成る群から選ばれる緩衝剤を添加することである。所望により1またはそれ以上の浸透圧物質、例えば塩化ナトリウム、その他の塩類、グリセリンまたはマンニトールを添加できる。これらの成分は単一の溶液として、または組み合わせた溶液として、または個別的に任意の順序で添加できる。保存剤は最後に加えるのが好ましい。これらの成分のうち、好ましい緩衝剤はTRISおよびマレイン酸塩より成る群から選ばれ、好ましい保存剤はm-クレゾールであり、そして好ましい浸透圧物質は塩化ナトリウムである。より好ましい緩衝剤はTRISである。

【０１０８】

選択された緩衝剤がTRISである場合、結晶性ペプチド懸濁液に添加するTRISの好ましい量は、最終組成物中のTRIS濃度が約5mMないし約40mMであるような量である。最終組成物中のTRIS濃度のより好ましい範囲は約10mMないし約20mMである。最終組成物中のTRISの最も好ましい濃度は約15mMである。

【０１０９】

選択された緩衝剤がマレイン酸塩である場合、結晶性ペプチド懸濁液に添加するマレイン酸塩の好ましい量は、最終組成物中のマレイン酸塩濃度が約2mMないし約20mMであるような量である。最終組成物中のマレイン酸塩濃度のより好ましい範囲は約5mMないし約15mMである。最終組成物中のマレイン酸塩の最も好ましい濃度は約9mMである。

【０１１０】

該ペプチド組成物の成分に塩化ナトリウムを選択する場合、結晶性ペプチド懸濁液に添加するための好ましい量は、最終組成物中の添加された塩化ナトリウム濃度が約30mMないし約200mMであるような量である。最終組成物中の添加された塩化ナトリウムのより好ましい濃度は50mMないし約150mMである。好ましい塩化ナトリウム濃度のその他の範囲は、約80mMないし約120mM、約70mMないし約130mM、および約90mMないし約130mMである。薬用組成物中の添加された塩化ナトリウムの最も好ましい量は約110mMである。

【０１１１】

プロセスのこの時点で、いかなる薬学上許容し得る保存剤を結晶性ペプチド懸濁液に添加してもよいが、本発明に係る組成物のためにはフェノール性保存剤またはベンジルアルコールが好ましい。フェノール性保存剤の例は、フェノール、クロロクレゾール、m-クレゾール、o-クレゾール、p-クレゾール、エチルパラベン、メチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、チモールまたはこれらの混合物を包含する。より好ましい保存剤はベンジルアルコール、m-クレゾール、フェノール、メチルパラベンおよびこれらの混合物である。最も好ましい薬学上許容し得る保存剤はm-クレゾールである。

【０１１２】

プロセスのこの時点で結晶性ペプチド組成物に添加する薬学上許容し得る保存剤の好ましい量は、最終組成物中の保存剤濃度が約1.0mg/mLないし約20.0mg/mLとなるような量である。最終組成物中の保存剤のより好ましい濃度範囲は、約2.0mg/mLないし約8.0mg/mL、約2.5mg/mLないし約4.5mg/mLおよび約2.0mg/mLないし約4.0mg/mLである。最終組成物中の保存剤の最も好ましい濃度は約3.0mg/mLである。

【０１１３】

選択されたペプチド結晶の安定な薬用組成物を製造するプロセスの最終工程は、最終的pHを約6.0および約8.5の間、好ましくは約pH6.5および約pH8.0の間に調節することである。このpH調節には多岐にわたる酸性化および／またはアルカリ性化試薬溶液のうち任意のものを使用できるが、希HCl、希NaOHおよび希酢酸が好ましい。より好ましい試薬溶液は希HClおよび希NaOHである。この組成物が調節される好ましいpHは、選択されたペプチド、ペプチド濃度、提唱された投与経路および選択された緩衝剤に或る程度依存するであろう。

【０１１４】

好ましくは、選択された緩衝剤としてTRISを用いる場合、pHは約6.5および約8.5の間に調節する。より好ましくは、pHは約7.0および約7.8の間、約7.2および約7.8の間、約7.5および約8.5の間、または約7.0および約8.0の間に調節する。選択された緩衝剤がTRISである場合、この組成物が調節される最も好ましいpHは約7.5である。選択された緩衝剤としてマレイン酸塩を用いる場合、pHは約6.0および約7.5の間に調節する。より好ましくは、pHは約6.4および約7.5の間、約6.4および約7.0の間、または約6.0および約7.0の間に調節する。選択された緩衝剤がマレイン酸塩である場合、この組成物が調節される最も好ましいpHは約6.5である。

【０１１５】

製剤化アプローチの代わりに、本発明に係る治療計画に好適な長時間作用性GLP-1化合物を誘導体化することができる。誘導体化は様々な手段によって達成する。アミノ酸側鎖基の修飾は、リジンε-アミノ基のアシル化、アルギニン、ヒスチジン、またはリジンのN-アルキル化、グルタミン酸またはアスパラギン酸のカルボン酸基のアルキル化、ならびにグルタミンまたはアスパラギンの脱アミド化を包含するが、これらに限定されない。末端アミノ基の修飾は、デスアミノ、N-低級アルキル、N-ジ低級アルキル、およびN-アシル修飾を包含するがこれらに限定されない。末端カルボキシ基の修飾は、アミド、低級アルキルアミド、ジアルキルアミド、および低級アルキルエステル修飾を包含するがこれらに限

定されない。さらに、1またはそれ以上の側鎖基または末端基を、当分野における通常の知識を有する蛋白化学者に周知の保護基によって保護することができる。アミノ酸のα炭素はモノまたはジメチル化できる。

【０１１６】

好ましいGLP-1誘導体はアシル化によって取得できる。脂肪酸誘導体化の原則を使用して、血中アルブミンおよび末梢組織にある脂肪酸結合部位への脂肪酸残基の結合を介した血漿アルブミンとの結合を促進することによって、GLP-1の作用を長期化する。好ましいGLP-1誘導体は$Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-ヘキサデカノイル)))-GLP-1(7-37)である。GLP-1誘導体および係る誘導体を製造する方法は、Knudsen, et al.(2000) J.Med.Chem. 43:1664-1669に開示されている。加えて、多数の公開された出願が、GLP-1、GLP-1アナログ、エクセンディン-4、およびエクセンディン-4アナログの誘導体を記載している。米国特許第5512540号、WO96/29342、WO98/08871、WO99/43341、WO99/43708、WO99/43707、WO99/43706、およびWO99/43705を参照されたい。

【０１１７】

GLP-1ペプチドはまた、ミクロスフェアを用いてカプセル化し、その後経口的にデリバリーすることができる。例えば、GLP-1化合物は市販の生物適合性、生物分解性ポリマー、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)-COOHおよび増量剤としてのオリーブ油より成るミクロスフェア中にカプセル化できる。Joseph, et al.(2000) Diabetologia 43:1319-1328を参照されたい。Alkermes由来のMedisorb(登録商標)およびProlease(登録商標)生物分解性ポリマーといった他の型のミクロスフェア技術もまた商業的に利用可能である。Medisorb(登録商標)ポリマーはラクチド異性体のいずれかを用いて製造できる。ラクチド：グリコリド比を0:100および100:0の間で変え、ポリマーの性質を広範囲とすることができる。これにより、数週間から数ヶ月の範囲の再吸収時間を持つデリバリーシステムおよび移植可能装置の設計が可能となる。

【０１１８】

本発明のもう一つの態様は、包装挿入物、容器を含むヒト医薬使用のための製造品を包含し、この挿入物は、特定の力価を持つGLP-1化合物の血漿レベルを、吐き気や嘔吐といった副作用を回避または最小化する或る範囲内に維持することを含む治療計画を記載している。

【０１１９】

本製造品に使用する容器は薬学技術において常套的である。一般にこの容器は、通常ガラスでできているバイアルまたはカートリッジ、および付属の蓋、閉鎖用部品、ビーズ、プランジャー、隔壁、および／または患者もしくは薬剤師の使用に適したその他の係る製造品である。或いはまた、この容器は、乾燥粉末を入れたカートリッジと適当な希釈剤を前もって充填した注射筒で構成されるキットの一部である。その他の選択肢は、希釈剤の液体と乾燥粉末とを再構成が望まれるまで相互に分離しておく、バイパス付きの二室式カートリッジより成る容器を包含する。再構成の時点でこの二室式カートリッジが希釈剤の液体を乾燥粉末中に流入させる。好ましくはこの容器は、0.1ないし100mL、好ましくは0.5ないし25mL、より好ましくは5ないし10mL、さらに好ましくは1.5ないし3mL容量が入る大きさである。或いはまた、この容器は、ブリスター、カプセル、またはブリスターディスクである。この容器のためのその他の選択肢は、経皮パッチ、移植可能な装置、ミクロスフェア担体およびその他のデポデリバリーシステムを包含する。

【０１２０】

挿入物は医師に、本明細書に記載の範囲内のGLP-1化合物の血漿レベルをもたらす幾つかの用量の選択肢を提供し、または好ましくは挿入物は医師に、本明細書に記載の範囲内のGLP-1化合物の血漿レベルをもたらす単一の用量を提供する。

【０１２１】

包装挿入物は、医薬製品を如何に投与するかという説明と、医師、薬剤師、および患者に当該製品の使用に関して情報を提供された上での決定を可能にさせるために必要な、安全性および有効性のデータを提供する。包装挿入物は一般に、医薬製品のラベルとみなされ

ている。
【０１２２】
包装挿入物は以下のような指摘またはラベル説明の幾つかまたは全てを提供できる：
1) 単独治療として、または単一もしくは複数の経口抗糖尿病薬との組み合わせ治療としての、単一もしくは複数の経口抗糖尿病薬で充分に管理されていない患者において、係る薬剤のみと比較した場合に改善されている血糖管理；
2) 高血糖が充分に管理されていない患者のための使用；
3) 単一または複数の経口抗糖尿病薬で充分に管理されていない患者における、0.5%より大きいまたはこれに等しい、好ましくは1%より大きいまたはこれに等しいHbAlcの平均低下；
4) 単独治療の患者の平均体重増加量は、3ヶ月間またはそれ以上の期間、TZDまたはスルホニル尿素いずれかの単独治療で治療された患者の平均体重増加量より少ない；
5) 統計学的に有意な体重減少の証明；
6) 治療用量において重篤な低血糖が無い；
7) 治療用量において症候性低血糖が無い；
8) 固定された注射食事間隔が無い；
9) 毎日投与の開始は中等度以上の用量滴定を必要とせず（4用量未満またはこれに等しい）、その後の毎日投与は血中グルコース監視とは無関係である；
10) 少なくとも12ヶ月、好ましくは少なくとも18ヶ月の冷蔵貯蔵寿命；
11) 室温での使用時保管；
12) 治療用量において最小の注射部位の苦痛；
13) 治療用量において注射部位の苦痛が無い；
14) 治療用量において最小の吐き気；
15) 動物モデルでのβ細胞の保持；
16) ヒトでのβ細胞の保持；
17) 0.1および0.25mLの間の注射容量；および、
18) 子供における使用の安全性。
【０１２３】
さらに、包装挿入物は、患者の体重もしくはボディマス指数、性別、または年齢に拘わらずGLP-1の連続的血漿レベルを治療範囲内に維持することを含む、本発明に包含される治療計画についての指示を提供できる。加えて包装挿入物は、本発明が、患者がグルコースレベルを自己監視する必要のない、且つ食事時間に合わせる必要のない（それにより、最適な血中グルコースの管理を安全に維持しつつ患者に利便性を与える事ができる）プロトコルによって、定常状態のGLP-1レベルを維持する手段をどのようにして提供するのかを説明する。
【０１２４】
長期投薬計画を提供する本発明で特許請求される製造品によって、副作用の発生は著しく減少する。故に、好ましい製造品は、本明細書に記載の範囲内の血漿レベルを有する患者の30%未満にしか吐き気の発生が無いという事を報告している包装挿入物を提供する。より好ましくは、吐き気および嘔吐は本明細書に記載の範囲内の血漿レベルを有する患者の20%未満にしか起こらない。さらに好ましくは、本明細書に記載の範囲内の血漿レベルを有する患者の10%未満しか係る副作用を経験しない。最も好ましくは、吐き気および嘔吐は、本明細書に記載の範囲内の血漿レベルを有する患者の5%未満にしか起こらない。
【０１２５】
本明細書に記載の治療計画に起因する低血糖の発生は稀である。63mg/dL未満の血中グルコースレベルを特徴とする低血糖の発生が報告されている包装挿入物は10%未満、好ましくは5%未満であり、最も好ましくは低血糖の報告は無い。
【発明を実施するための最良の形態】
【０１２６】
本発明を以下の実施例により説明するが、これらはいかなるやり方によっても限定的であ

る事を意図するものではない。

【０１２７】

実施例1

2型糖尿病患者における臨床試験

2型糖尿病患者8名ずつの4群をVal^8-GLP-1(7-37)OHの長時間作用製剤で治療した。最初の3群には2.5または3.5または4.5mgのいずれかを1日に1回6日間投与した。4群目には1日に1回4.5mgを21日間投与した。試験の前日、それぞれの患者にプラセボとして食塩水の注射を行った。血中グルコースを13時間追跡した。評価の日程中、食事は全て厳密に標準化した。患者は、24時間にわたる6日目および21日目の評価を除き、外来患者であった。1日目の注射の後、4時間の間グルコースおよびVal^8-GLP-1(7-37)OHの血漿レベルを求めるため、血液試料を採取した。患者には毎朝投与した。投与の6日目（第4群については21日目にも）、血中グルコースおよびVal^8-GLP-1(7-37)OH血漿レベル測定のため、投与後26時間まで試料を採取した。Val^8-GLP-1(7-37)OH血漿レベルを図1および3に、そして対応するグルコースレベルを図2および4に示す。21日の投与群の患者は平均2.125kg体重が減少した（標準偏差：1.36kg)。5名の対象は計3kg、1名は2kg減少し、2名は減少しなかった。

【０１２８】

実施例2

Val^8-GLP-1(7-37)OH血漿レベルの測定：

天然GLP-1ペプチド、およびDPP-IVによるGLP-1(9-37)OHのような分解産物の内因性濃度が存在するため、無傷のVal^8-GLP-1(7-37)OH濃度は、分解されていない完全長Val^8-GLP-1(7-37)OHを特異的に認識するELISA検定を用いて測定した。微量定量プレート上に固定化したN末端抗Val^8-GLP-1(7-37)OH特異的抗血清によって、免疫反応性Val^8-GLP-1(7-37)OHを血漿から捕捉する。この抗血清はVal^8-GLP-1(7-37)OHのN末端に極めて特異的である。GLP-1のC末端に特異的なアルカリホスファターゼコンジュゲート化抗体を添加して「サンドイッチ」を完成する。検出はpNPP、アルカリホスファターゼに対する比色定量基質を用いて完成する。生成した色の量は、試料中に存在する免疫反応性Val^8-GLP-1(7-37)OHの濃度に直接比例する。ヒト血漿中のVal^8-GLP-1(7-37)OHの定量は、Val^8-GLP-1(7-37)OHをレファランス標準に用いる標準曲線から内挿できる。加重4パラメータロジスティクアルゴリズムを用いるコンピュータプログラムによってデータを解析した。被験試料中の免疫反応性Val^8-GLP-1(7-37)OHの濃度を標準曲線を用いて決定した。

【０１２９】

実施例3

インビトロ力価検定：

ヒトGLP-1レセプターを発現するHEK-293 Aurora CRE-BLAM細胞を20000ないし40000細胞/ウェル/100μlで96ウェル黒色透明底プレートに蒔く。播種の翌日、培地を無血漿培地に交換する。播種の3日後、異なる濃度のGLP-1アゴニストを含有する無血漿培地20μlを各ウェルに加え、用量反応曲線を作製する。一般に、3ナノモルから30ナノモルまでのGLP-1化合物を含有する14種類の希釈液を用いて用量反応曲線を作製し、ここからEC50値が決定できた。GLP-1化合物と共に5時間インキュベートした後、β-ラクタマーゼ基質（CCF2-AM Aurora Biosciences 製品コード100012）20μlを加え、インキュベーションを1時間継続し、この時点で蛍光をcytoflourで測定した。

【０１３０】

実施例4

GLP-1(7-37)OHの結晶化：

GLP-1(7-37)OHを、このペプチドの質量に基づき0.015NのNaOH約0.5mLに約17mg/mLの濃度で溶解した。この蛋白溶液を希NaOHで約pH10.5に調節した。この溶液を約1時間周囲温度に維持した。

【０１３１】

このペプチド溶液のアリコート390μLに1.0Mグリシン（pH10）溶液25μLを加え、GLP-1(7-37)OH約16mg/mLおよびグリシン約60mMの最終濃度とした。この溶液のpHを必要に応じて

希HClおよび／または希NaOHで約pH10に調節した。

【０１３２】

次にこの溶液を、60mMグリシン緩衝液（pH10）で前もってすすいだ滅菌0.22μm Millex(登録商標)-GV（Millipore Corporation, Waltham, MA, USA）4mmフィルターユニットでガラスバイアル中に濾過した。

【０１３３】

濾過したペプチド溶液300μLに50%エタノール水溶液66μLを加えた。この溶液に150mM酸化亜鉛（pH2.3）溶液（希HClにて調製）計14.1μLを、少量ずつ、それぞれの添加後に手動攪拌しながら、溶液が透明になるまで添加した。亜鉛：ペプチドのモル比は約1.5:1であった。

【０１３４】

最終溶液を約pH9.0に調節し、周囲温度で結晶化を進行させた。この結晶化溶液は、約12.6mg/mL GLP-1(7-37)OH、47mMグリシン、8.7%（容量）エタノール、およびpH9.0のGLP-1(7-37)OH 1モルあたり約1.5モルの亜鉛を含んでいた。

【０１３５】

周囲温度で1日後、400X倍率の顕微鏡下でGLP-1(7-37)OHの薄板結晶が観察された。

【０１３６】

結晶化の収率を、0.01N HClに10倍希釈で再溶解した懸濁液全体のアリコートの吸光度を、分光光度計を用いて、14000 X gで約4分間この懸濁液を遠心分離し同様に希釈して得た上清と比較することにより、決定した。この実験について結晶化収率は92%であった。

【０１３７】

実施例5

Val^8-GLP-1(7-37)OHの結晶化：

Val^8-GLP-1(7-37)OHを、このペプチドの質量に基づき0.015NのNaOH約0.57mLに約17mg/mLの濃度で溶解した。この蛋白溶液を希NaOHで約pH10.5に調節した。この溶液を約1時間周囲温度に維持した。

【０１３８】

このペプチド溶液のアリコート390μLに1.0Mグリシン（pH8）溶液25μLを加え、Val^8-GLP-1(7-37)OH約16mg/mLおよびグリシン約60mMの最終濃度とした。この溶液のpH（約pH9.0）を必要に応じて希HClおよび／または希NaOHで約pH9.9に調節した。

【０１３９】

次にこの溶液を、滅菌0.22μm Millex(登録商標)-GV（Millipore Corporation, Waltham, MA, USA）4mmフィルターユニットで0.5mLエッペンドルフ管中に濾過した。

【０１４０】

清浄な試験管に入れた、濾過したペプチド溶液300μLに50%エタノール水溶液66μLを加えた。この溶液に150mM酸化亜鉛（pH2.3）溶液（希HClにて調製）計14.1μLを、少量ずつ、それぞれの添加後に手動攪拌しながら、溶液が透明になるまで添加した。亜鉛：ペプチドのモル比は約1.5:1であった。

【０１４１】

最終溶液を約pH8.9に調節し、周囲温度で結晶化を進行させた。この結晶化溶液は、約12.6mg/mL Val^8-GLP-1(7-37)OH、47mMグリシン、8.7%（容量）エタノール、およびpH8.9のVal^8-GLP-1(7-37)OH 1モルあたり約1.5モルの亜鉛を含んでいた。

【０１４２】

周囲温度で約3日後、400X倍率の顕微鏡下でVal^8-GLP-1(7-37)OHの薄板結晶が観察された。

【０１４３】

実施例6

Val^8-GLP-1(7-36)NH_2の結晶化：

Val^8-GLP-1(7-36)NH_2を、このペプチドの質量に基づき0.015NのNaOH約0.44mLに約17mg/mLの濃度で溶解した。この蛋白溶液を希NaOHで約pH10.5に調節した。この溶液を約1時間周

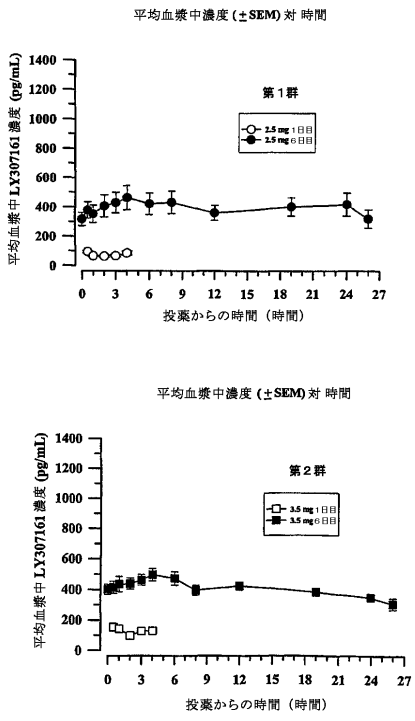
囲温度に維持した。
【０１４４】
このペプチド溶液のアリコート390μLに1.0Mグリシン（pH10.2）溶液25μLを加え、Val^8-GLP-1(7-36)NH_2約16mg/mLおよびグリシン約60mMの最終濃度とした。
【０１４５】
次にこの溶液を、滅菌0.22μm Millex(登録商標)-GV（Millipore Corporation, Waltham, MA, USA）4mmフィルターユニットでガラスバイアル中に濾過した。
【０１４６】
清浄なガラスバイアルに入れた、濾過したペプチド溶液300μLに50%エタノール水溶液66μLを加えた。この溶液に150mM酸化亜鉛（pH2.3）溶液（希HClにて調製）計14.1μLを、少量ずつ、それぞれの添加後に手動攪拌しながら、溶液が透明になるまで添加した。亜鉛：ペプチドのモル比は約1.5:1であった。
【０１４７】
最終溶液を約pH9.85に調節し、周囲温度で結晶化を進行させた。この結晶化溶液は、約12.6mg/mL Val^8-GLP-1(7-36)NH_2、47mMグリシン、8.7%（容量）エタノール、およびpH9.85のVal^8-GLP-1(7-36)NH_2 1モルあたり約1.5モルの亜鉛を含んでいた。
【０１４８】
周囲温度で約3日後、400X倍率の顕微鏡下でVal^8-GLP-1(7-36)NH_2の微結晶が観察された。
【０１４９】
実施例7
Val^8-GLP-1(7-37)NH_2の結晶化：
Val^8-GLP-1(7-37)NH_2を、このペプチドの質量に基づき0.015NのNaOH約0.48mLに約17mg/mLの濃度で溶解した。この蛋白溶液を希NaOHで約pH11.1に調節し、次いで希HClでpH10.36に調節した。この溶液を約1時間周囲温度に維持した。
【０１５０】
このペプチド溶液のアリコート390μLに1.0Mグリシン（pH10）溶液25μLを加え、Val^8-GLP-1(7-37)NH_2約16mg/mLおよびグリシン約60mMの最終濃度とした。
【０１５１】
次にこの溶液を、滅菌0.22μm Millex(登録商標)-GV（Millipore Corporation, Waltham, MA, USA）4mmフィルターユニットでガラスバイアル中に濾過した。
【０１５２】
清浄なガラスバイアルに入れた濾過したペプチド溶液300μLに50%エタノール水溶液66μLを加えた。この溶液に150mM酸化亜鉛（pH2.3）溶液（希HClにて調製）計約7μLを、少量ずつ、それぞれの添加後に手動攪拌しながら、溶液が透明になるまで添加した。亜鉛：ペプチドのモル比は約0.75:1であった。
【０１５３】
最終溶液を約pH9.8に調節し、周囲温度で結晶化を進行させた。この結晶化溶液は、約12.6mg/mL Val^8-GLP-1(7-37)NH_2、47mMグリシン、8.7%（容量）エタノール、およびpH9.8のVal^8-GLP-1(7-37)NH_2 1モルあたり約0.75モルの亜鉛を含んでいた。
【０１５４】
周囲温度で約48時間後、400X倍率の顕微鏡下でVal^8-GLP-1(7-37)NH_2のクラスターが観察された。
【図面の簡単な説明】
【０１５５】
【図１】図1は、2型糖尿病患者にプラセボ（基線）、2.5mg（第1群）、および3.5mg（第2群）のVal^8-GLP-1(7-37)OHを1日に1回投与した後の、平均（+/-SEM)血漿中Val^8-GLP-1(7-37)OH濃度を表すグラフである。
【図２】図2は、2型糖尿病患者にプラセボ（基線）、2.5mg（第1群）、および3.5mg（第2群）のVal^8-GLP-1(7-37)OHを1日に1回投与した後の、平均（+/-SEM)グルコース濃度を表すグラフである。

【図３】図3は、2型糖尿病患者にプラセボ（基線）および4.5mg（第3群および4群）のVal^{8}-GLP-1(7-37)OHを1日に1回投与した後の、平均（+/-SEM)血漿中Val^{8}-GLP-1(7-37)OH濃度を表すグラフである。

【図４】図4は、2型糖尿病患者にプラセボ（基線）および4.5mg（第3群および4群）のVal^{8}-GLP-1(7-37)OHを1日に1回投与した後の、平均（+/-SEM)グルコース濃度を表すグラフである。

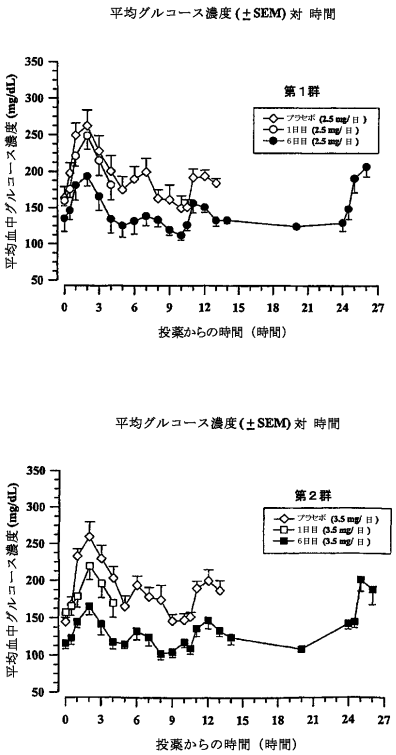
【図１】

Fig. 1



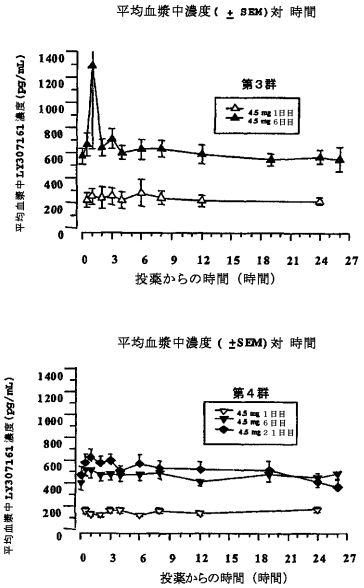
【図２】

Fig. 2



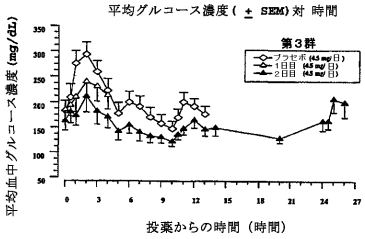
【図３】

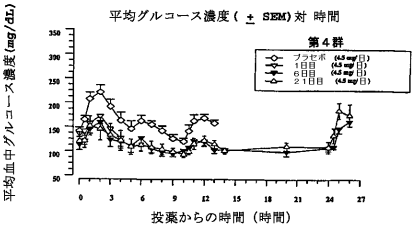
Fig. 3



【図４】

Fig. 4





【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/47716 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K 38/26

(21) International Application Number: PCT/US01/44698

(22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/255,251	13 December 2000 (13.12.2000)	US
60/295,655	4 June 2001 (04.06.2001)	US
60/298,652	15 June 2001 (15.06.2001)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DODD, Steven, Witt** [US/US]; 6541 Stafford Trace, Zionsville, IN 46077 (US). **MACE, Kenneth, Francis** [US/US]; 10907 Killington Circle, Fishers, IN 46038 (US). **TRAUTMANN, Michael, Ernst** [DE/DE]; Lilly Forschung GmbH, Essener Strasse 93, D-22419 Hamburg (DE).

(74) Agents: **STEWART, Mark, J.** et al.; ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/47716 A2

(54) Title: CHRONIC TREATMENT REGIMEN USING GLUCAGON-LIKE INSULINOTROPIC PEPTIDES

(57) Abstract: The present invention encompasses a method of treating a disease by maintaining chronic steady state serum levels of a GLP-1 compound within a specified range.

CHRONIC TREATMENT REGIMEN USING GLUCAGON-LIKE INSULINOTROPIC PEPTIDES

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Numbers 60/255,251, filed December 13, 2000, 60/295,655, filed June 4, 2001 and 60/298,652 filed June 15, 2001.

1. Field of the Invention

The present invention relates to a chronic treatment regimen using glucagon-like insulinotropic peptides in pharmaceutical articles of manufacture and methods.

2. Background Information

The intestinal hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) shows great promise as a treatment for type 2 diabetes due to its ability to stimulate insulin secretion, lower glucagon secretion, inhibit gastric emptying, enhance glucose utilization, and induce appetite suppression and weight loss. Further, pre-clinical studies suggest that GLP-1 may also act to prevent the β-cell deterioration that occurs as the disease progresses. Perhaps the most salient characteristic of GLP-1 is its ability to stimulate insulin secretion without the associated risk of hypoglycemia that is often seen when using insulin therapy and some types of oral therapies. When blood glucose levels drop to a certain threshold level, GLP-1 is not active.

However, the usefulness of therapy involving GLP-1 peptides has been limited by the fact that GLP-1(1-37) is poorly active, and the two naturally occurring truncated peptides, GLP-1(7-37)OH and GLP-1(7-36)NH_2, have extremely short half-lives and are rapidly cleared from the circulation. Thus, research related to GLP-1 has focused on the development of GLP-1 analogs, GLP-1 derivatives, and formulations thereof which provide a more extended time

action. Despite much progress in this area of development, there are no published papers reporting on clinical data in humans using long-acting GLP-1 analogs or derivatives. Until the present invention, it has been unclear whether steady state levels of a GLP-1 compound with a particular potency can be safely maintained for a lengthy course of treatment and continue to provide the benefits associated with the activities that have been elucidated for endogenous GLP-1.

Some short-term clinical studies with native GLP-1 which require continuous infusion or frequent dosing suggest that high concentrations of GLP-1 cause frequent nausea and vomiting. This has raised concern among clinicians that these undesired effects will limit the dosage and thus, limit the efficacy even though the drug inherently may be capable of producing a greater effect.

There are several published clinical studies involving administration of native GLP-1(7-37)OH to patients by i.v. or subcutaneous continuous infusion. See Naslund, *et al.* (1999) *Am. J. Phys.* 277(3):1-14; Deacon, *et al.* (1995) *Diabetes* 44:1126-1131; Toft-Nielsen, *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22(7):1137-1143. The published studies consistently use a dose between about 0.75 pmol/kg/min and 2.4 pmol/kg/min for short periods of time. However, because GLP-1(7-37)OH is rapidly degraded upon exposure to plasma, it is not always clear what levels of intact/active GLP-1 peptide are present in the plasma at a given time point.

Naslund, *et al.*, nevertheless, were able to predict plasma levels of intact GLP-1(7-37)OH after continuous administration at a rate of 0.75 pmol/kg/min for 180 min. The authors used a sandwich radioimmunoassy to detect both N-terminally degraded and intact GLP-1(7-37)OH. Plasma levels of intact GLP-1 were approximately 20 picomolar for the last 120 min. of treatment. Using a similar assay,

Toft-Nielsen et al. reported intact GLP-1 levels of approximately 10.2 picomolar and 22.5 picomolar after administration of 1.2 pmol/kg/min and 2.4 pmol/kg/min, respectively.

These studies, however, have not answered the question whether plasma levels of intact and active GLP-1 can be achieved to achieve therapeutic benefit while at the same time avoiding or minimizing side effects such as nausea and vomiting. Similarly, these studies do not indicate whether plasma levels of active GLP-1 should be relatively flat during treatment or whether peaks and valleys, which would mimic the physiological state, would be preferred. Thus, despite considerable progress, there remains a need to discover and understand what treatment regimen leads to effective long-term therapy and whether such treatment can be maintained with minimal side effects such as nausea and vomiting.

Applicants have discovered that maintaining continuous plasma levels of a GLP-1 compound in a specific range provides effective treatment. It is believed that the absence of peaks and valleys avoids or minimizes side effects such as nausea and vomiting. Accordingly, the present invention provides a chronic treatment regimen which comprises maintaining continuous plasma levels of a GLP-1 compound within a certain range that avoids or minimizes side effects such as nausea and vomiting. The plasma levels encompassed by the present invention provide optimal blood glucose control. Furthermore, this treatment regimen provides long-term positive health effects including the inducement of weight loss, improvement of β cell function, activation of dormant β cells, differentiation of cells into β cells, β cell proliferation, and the maintenance of organ function.

The present invention encompasses a method of normalizing blood glucose levels, preventing β cell deterioration, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, obesity, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, and irritable bowel syndrome, which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60 picomoles/liter and about 200 picomoles/liter of a GLP-1 analog or derivative in a biologically active form having an in vitro potency within two-fold the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

The present invention also encompasses a method of normalizing blood glucose levels, preventing β cell deterioration, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, obesity, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, and irritable bowel syndrome, which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar of a GLP-1 analog or derivative in a biologically active form wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which is a given a value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

The present invention also encompasses use of a GLP-1 analog or derivative having an in vitro potency within 2-fold that of Val^8-GLP-1(7-37)OH for the manufacture of a medicament for normalizing blood glucose, preserving β cells, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state

plasma levels of the GLP-1 analog or derivative between about 60 picomolar and about 200 picomolar and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection not more the once or twice every 24 hours.

The present invention also encompasses use of a GLP-1 analog or derivative for the manufacture of a medicament for normalizing blood glucose, preserving β cells, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels of the GLP-1 analog or derivative between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which is given a reference value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

The invention also encompasses an article of manufacture for human pharmaceutical use comprising a container; a dosage form comprising an amount of a GLP-1 analog or derivative having an in vitro potency within two-fold that of Val^8-GLP-1(7-37)OH, and a package insert that provides for administration of the dosage form that results in maintaining GLP-1 analog or derivative plasma levels between about 60 picomolar and about 200 picomolar.

Figure 1: Graphs representing the mean (+/- SEM) plasma Val^8-GLP-1(7-37)OH concentrations following once-daily administration of placebo (baseline), 2.5 mg (Group 1), and 3.5 mg (Group 2) of Val^8-GLP-1(7-37)OH to patients with type 2 diabetes.

Figure 2: Graphs representing the mean (+/- SEM) glucose concentrations following once-daily administration of placebo (baseline), 2.5 mg (Group 1), and 3.5 mg (Group 2) of Val^8-GLP-1(7-37)OH to patients with type 2 diabetes.

Figure 3: Graphs representing the mean (+/- SEM) plasma Val^8-GLP-1(7-37)OH concentrations following once-daily administration of placebo (baseline) and 4.5 mg (Groups 3 and 4) of Val^8-GLP-1(7-37)OH to patients with type 2 diabetes.

Figure 4: Graphs representing the mean (+/- SEM) glucose concentrations following once-daily administration of placebo (baseline) and 4.5 mg (Groups 3 and 4) of Val^8-GLP-1(7-37)OH to patients with type 2 diabetes.

For purposes of the present invention as disclosed and described herein, the following terms and abbreviations are defined as follows.

A "treatment regimen" is the administration of a GLP-1 compound such that optimum plasma levels are chronically maintained. The GLP-1 compounds used for the regimen of the present invention exert their biological effects by acting at a receptor referred to as the GLP-1 receptor. Subjects with diseases and/or conditions that respond favorably to GLP-1 receptor stimulation or to the administration of GLP-1 compounds can therefore be treated with the regimen of the present invention.

Thus, this regimen provides a variety of positive effects including but not limited to treating hyperglycemia, maintaining blood glucose control, treating type 2 diabetes, treating obesity, inducing weight loss, treating stroke, treating myocardial infarction, treating catabolic changes that occur after surgery or for other reasons, treating irritable bowel syndrome, preventing β-cell deterioration, inducing β-cell proliferation, stimulating insulin gene transcription, up-regulating IDX-1/PDX-1 or other growth factors, improving β-cell function, activating dormant β-

cells, differentiating cells into β-cells, and/or β cell replication. Positive effects that result from maintaining blood plasma levels within a specific range over extended time periods include an amelioration of the symptom(s) associated with the disease or condition being treated, a delay in the onset of symptoms associated with the disease or condition being treated, increased longevity compared with the absence of the treatment, and/or a greater quality of life compared with the absence of the treatment. Further benefits provided by the treatment regimen of the present invention which relate to the treatment of type 2 diabetes and associated hyperglycemia include enhanced convenience due to the elimination or reduction of blood glucose self-monitoring and administration of drug that need not be timed with meals.

"Chronic therapy" refers to maintaining blood plasma levels of active GLP-1 compounds within a specific range for a course of therapy. The specified range corresponds to plasma levels of active GLP-1 compounds that provide optimal efficacy and yet do not cause or at least minimize side effects such as nausea and vomiting. A planned course of therapy will differ depending on the condition or disease being treated. For example, a planned course of therapy for a type 2 diabetic wherein oral medications are no longer able to control blood glucose levels would encompass that time period wherein the patient has adequate β cell function to respond to GLP-1 receptor stimulation. A planned course of therapy for an obese patient or a patient desiring to lose weight would encompass that time period until the patient has reached a normal weight based on the patient's height and build. A planned course of therapy may also have a prophylactic goal such as to prevent the progression of type 2 diabetes, the development of diabetes, impaired glucose tolerance, syndrome x, or to prevent weight gain.

This type of therapy could potentially last a patient's lifetime.

"Chronic" generally refers to regular administration for an extended period preferably not more frequently than twice daily, most preferably not more than once daily. However, chronic administration as used herein may encompass other regimens in addition to once or twice daily dosing. For example, chronic administration encompasses administration of a sustained release formulation that provides sufficient therapeutic blood plasma levels on a regular basis. Such administration may include administration once a week, once a month, or even less frequently. Contrary to acute or on-demand administration, chronic administration does not link administration of drug to events such as meals, results of home glucose monitoring, or need for appetite suppression.

"Insulinotropic activity" refers to the ability to stimulate insulin secretion in response to elevated glucose levels, thereby causing glucose uptake by cells and decreased plasma glucose levels. Insulinotropic activity can be assessed by methods known in the art, including using *in vivo* experiments and *in vitro* assays that measure GLP-1 receptor binding activity or receptor activation, e.g., assays employing pancreatic islet cells or insulinoma cells, as described in EP 619,322 to Gelfand, *et al.*, and U.S. Patent No. 5,120,712, respectively. The entire teachings of these references are incorporated herein by reference. Insulinotropic activity is routinely measured in humans by measuring insulin levels or C-peptide levels.

"Container" means any receptacle and closure suitable for storing, shipping, dispensing, and/or handling a pharmaceutical product.

"Packaging" means a customer-friendly device allowing convenient administration and/or ancillary devices that aid

in delivery, education, and/or administration. The packaging may improve GLP-1 compound administration to the patient, reduce or improve educational instruction time for the patient, provide a platform for improved health economic studies, and/or limit distribution channel workload. Also, the packaging may include but not be limited to a paper-based package, shrink wrapped package, see-through top packaging, trial-use coupons, educational materials, ancillary supplies, and/or delivery device.

"Package insert" means information accompanying the product that provides a description of how to administer the product, along with the safety and efficacy data required to allow the physician, pharmacist, and patient to make an informed decision regarding use of the product, and/or patient education information. The package insert generally is regarded as the "label" for a pharmaceutical product.

A "subject" or "patient" is a human.

"In vitro potency" as used herein is the measure of the potency or ability of a compound to activate the GLP-1 receptor in a cell-based assay. In vitro potency is expressed as the "EC_{50}" which is the effective concentration of compound that results in 50% activity in a single dose-response experiment. For the purposes of the present invention, in vitro potency is determined using a fluorescence assay that employs HEK-293 Aurora CRE-BLAM cells that stably express the human GLP-1 receptor. The assay is discussed in more detail on page 17 and in example 3. The in vitro potency values as disclosed herein are expressed as the EC_{50} which was established by generating a dose response curve using dilutions resulting in GLP-1 compound concentrations from 3 nanomolar to 30 nanomolar. Relative in vitro potency values are established by running Val^8-GLP-1(7-37)OH as a control and assigning the control a reference value of 1.

The GLP-1 compounds of the present invention have sufficient homology to GLP-1(7-37)OH or a fragment of GLP-1(7-37)OH such that the compound has the ability to bind to the GLP-1 receptor and initiate a signal transduction pathway resulting in insulinotropic action or other physiological effects as described herein such as inhibition of glucagon and delay in gastric emptying. For example, GLP-1 compounds can be tested for insulinotropic activity using a cell-based assay such as that described in EP 619 322 which is a modification of the method described by Lacy, *et al.* (1967) *Diabetes* 16:35-39. A collagenase digest of pancreatic tissue is separated on a Ficoll gradient (27%, 23 %, 20.5 %, and 11% in Hank's balanced salt solution, pH 7.4). The islets are collected from the 20.5%/11% interface, washed and handpicked free of exocrine and other tissue under a stereomicroscope. The islets are incubated overnight in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine plasma and containing 11 mM glucose at 37°C and 95% air/5% CO_2. The GLP-1 compound to be studied is prepared at a range of concentrations, preferably 3 nanomolar to 30 nanomolar in RPMI medium containing 10% fetal bovine plasma and 16.7 mM glucose. About 8 to 10 isolated islets are then transferred by pipette to a total volume of 250 µl of the GLP-1 compound containing medium in 96 well microtiter dishes. The islets are incubated in the presence of the GLP-1 compound at 37°C, 95% air, 5% CO_2 for 90 minutes. Then aliquots of islet-free medium are collected and 100 µl thereof are assayed for the amount of insulin present by radioimmunoassay using an Equate Insulin RIA Kit (Binax, Inc., Portland, ME).

It is preferred that the GLP-1 compounds of the present invention have an in vitro potency no more than 10-fold lower than the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH. Preferably, the GLP-1 compounds have an in vitro potency not

lower than the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH. Representative GLP-1 compounds are discussed in detail below. Furthermore, the GLP-1 compounds used in the chronic treatment regimen described herein may require modification or formulation such that blood plasma levels are maintained in the claimed efficacious range for extended time periods. Modification and formulation of GLP-1 compounds is also discussed in detail below.

Although GLP-1 has been proposed as a possible therapy for type 2 diabetes, its short half-life and susceptibility to protease degradation has made it a difficult molecule to study. Furthermore, side effects such as nausea and vomiting have been observed after a single subcutaneous or i.v. bolus administration of active GLP-1. Applicants believe this is due to the initial peak levels of the compound that are obtained immediately after administration. In order for a short acting formulation to provide a therapeutic benefit, it must be injected at a high enough dose to provide blood levels that are in the therapeutic range at least long enough to achieve a glucose lowering effect after a meal. These undesired effects occurring after administration of a relatively high dose of a short-acting GLP-1 formulation limit the amount that can be administered to patients and correspondingly limits the efficacy.

Clinical studies have established several of the physiological effects of GLP-1 which include stimulation of insulin secretion, inhibition of glucagon secretion, decrease in hepatic glucose production, inhibition of gastric emptying, and promotion of weight loss. However, GLP-1 compounds cannot be effectively used in a treatment regimen unless pharmacological levels of active GLP-1 are present continuously throughout the course of treatment. This is particularly true in order to fully exploit blood

glucose lowering potential as well as other long-term physiological effects described herein.

Accordingly, the present invention describes the steady state plasma levels of an active GLP-1 compound having a specific potency necessary to achieve efficacy yet avoid or minimize side effects such as nausea and vomiting. The steady state concentration of a drug is achieved when drug elimination which is a product of clearance and concentration equals the rate of drug availability. In the context of intermittent dosage, during each interdose interval, the concentration of drug rises and falls. At steady state, the entire cycle is repeated identically in each interval. However, as discussed herein, marked fluctuations in active GLP-1 plasma concentrations between doses is responsible for side effects such as nausea and vomiting and do not result in an optimal biological response.

The treatment regimen of the present invention involves administering a GLP-1 compound such that continuous steady state plasma levels of the compound are maintained throughout a particular course of treatment for a particular condition. In the context of the present invention, "maintaining" plasma levels means that the plasma concentration of drug during the course of treatment does not fluctuate significantly once steady state levels are achieved and thus, side effects such as nausea and vomiting are avoided or minimized and at the same time an optimal therapeutic effect is obtained. Drug levels do not fluctuate significantly if they remain within the claimed efficacious range once steady state plasma levels are achieved. Surprisingly, it was discovered that the therapeutic plasma levels for exogenously administered GLP-1 compounds having a similar potency to native GLP-1 is

significantly higher than levels of endogenously secreted GLP-1 in the circulation.

The present invention is based on data generated from a clinical trial wherein a long-acting GLP-1 formulation was administered via subcutaneous injection once a day at three different dose levels. After six days of dosing, drug levels reached a steady state plateau that was maintained continuously during the course of treatment. The chronic treatment regimen of the present invention may involve a GLP-1 compound administered continuously in order to obtain plasma levels within the range described herein or more preferably involves the administration of a long-acting GLP-1 compound. Long acting in the context of the present invention means that the plasma levels of an active GLP-1 compound stay within the therapeutic range described herein for at least 12 hours after delivery of a single dose. Preferably plasma levels remain within this range for at least 24 hours after delivery of a single dose. This preferred time action would result in once a day dosing.

Following administration of a sustained release formulation containing Val^8-GLP-1(7-37)OH on day 1, mean Cmax values of 105, 147, 300, and 222 pg/mL were achieved for doses corresponding to 2.5 mg, 3.5 mg, and two groups at 4.5 mg, respectively. These Cmax values represent the mean maximum plasma concentration of intact Val^8-GLP-1(7-37)OH achieved for a group of 8 patients at one of the given doses during the first day of treatment. (See Figures 1 and 3). The plasma concentration of Val^8-GLP-1(7-37)OH for all three groups resulted in some glucose lowering with levels above 200 pg/mL showing the most significant effect (Table 1). Inspection of the mean plasma profiles suggested that steady state was essentially attained after once a day dosing for 6 days and that the accumulation of drug was approximately 3-fold. On day 6, the mean Cmax values for the 2.5 mg, 3.5

mg, and 4.5 mg dosage groups were 534, 525, and 570 pg/mL, respectively. The corresponding $AUC_{(0-24)}$ values which represent exposure to the active drug were also similar: 8878, 9846, and 10619 ng*h/L, respectively. Thus, a 1.8-fold increase in dose was associated with a 1.2-fold increase in the mean steady state exposure AUC(0-24) (See Figures 1 and 3).

Table 1

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

Abbreviations: R_{max} = mean maximum concentration; AUC = area under the curve.

A clinically relevant fall in the pre-dose fasting blood glucose was seen after dosing in all treatment groups. The mean maximum observed glucose concentrations represented as Rmax ranged from 23 % to 34 % lower than the placebo controlled group on the sixth day of treatment. Furthermore, the glucose response of day 6 was similar to that seen after 21 days of treatment (See Figures 2 and 4). A plateau in the response was achieved at steady state concentration corresponding to the 2.5 mg and 3.5 mg doses which resulted in mean Cmax values of 534 and 525 pg/mL,

respectively. Unexpectantly, no severe nausea and vomiting and only occasional, generally short episodes of nausea or vomiting was observed in groups having plasma levels below 600 pg/mL. One patient received a dose that resulted in a Cmax of 990 pg/mL of Val^8-GLP-1(7-37)OH and this higher level was associated with some nausea.

In addition, weight loss occurred in the treatment groups. The average amount of weight loss per patient during the 21-day dosing period was approximately 2.1 kg.

Because there will be differences in the molecular weight of GLP-1 compounds having similar potencies, the observed plasma levels for Val^8-GLP-1(7-37)OH are converted from pg/mL to picomolar (pmoles/L). Thus, the preferred range of plasma levels that provide maximum efficacy and yet avoid or minimize side effects such as nausea and vomiting is between about 60 and about 200 pmoles/liter for GLP-1 compounds having a potency that is similar or within two-fold the potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH. More preferably, plasma levels are between about 80 picomolar and about 200 picomolar. Even more preferably, plasma levels are between about 100 picomolar and about 200 picomolar.

Thus, the invention also relates to the use of a GLP-1 compound having a potency that is similar or within two-fold the potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH for the manufacture of a medicament for the normalization of blood glucose, preservation of β-cells, induction of weight loss or the treatment of a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome, wherein the medicament is adapted for chronic administration such that chronic steady state plasma levels of the GLP-1 compound are maintained between about 60 picomolar and about 200 picomolar, preferably between about 80 picomolar and about

200 picomolar, more preferably between about 100 picomolar and about 200 picomolar

Plasma levels as discussed herein refer to the concentration of an active GLP-1 compound as measured in blood plasma. Plasma contains an enzyme known as DPP-IV which readily cleaves amino acids at the N-terminus of GLP-1 compounds. It is known that GLP-1 must have an intact Histidine at the N-terminus to be active. For example GLP-1(7-37)OH is rapidly degraded to GLP-1(9-37)OH once it is released into the plasma. GLP-1(9-37)OH is not active. Furthermore, GLP-1 can also be inactivated by cleavage at the C-terminus. An inactive GLP-1(7-33) metabolite has also been reported in the literature. The plasma levels described herein for Val^{8}-GLP-1(7-37)OH were measured using a sandwich radioimmunoassay. The assay makes use of an antibody that specifically recognizes the intact amino-terminus of Val^{8}-GLP-1(7-37)OH in combination with another antibody which recognizes the intact C-terminus of Val^{8}-GLP-1(7-37)OH. Thus, only plasma levels of active Val^{8}-GLP-1(7-37)OH are measured. (See Example 2).

Plasma levels of active GLP-1 compounds other than Val^{8}-GLP-1(7-37)OH can similarly be measured by generating antibodies by methods well-known in the art that specifically identify the intact N-terminus of the compound being tested and do not cross-react with native GLP-1.

Some GLP-1 derivatives such as $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37) are long-acting because they bind to plasma albumin and slowly dissociate from albumin and are released into the plasma as unbound derivatives that can bind the GLP-1 receptor and initiate a signal. For the purposes of the present invention, plasma levels refer to the concentration of active GLP-1 derivatives such as $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37) that are present in the plasma not bound to albumin.

To achieve maximum efficacy while minimizing side effects, the plasma levels of a GLP-1 compound should not fluctuate significantly once steady state levels are obtained during the course of treatment. Levels do not fluctuate significantly if they are maintained within the ranges described herein once steady state levels are achieved throughout a course of treatment. Most preferably, plasma levels of a GLP-1 compound with a potency similar to or within two-fold that of Val^8-GLP-1(7-37)OH are maintained between about 100 picomolar and about 200 picomolar throughout a course of treatment once steady state levels are obtained. For example, Figure 3 depicts plasma levels of Val^8-GLP-1(7-37)OH which remain flat and do not fluctuate significantly over the course of 15 days based on once a day dosing. Levels are maintained between about 400 and about 600 pg/mL which corresponds to between about 120 picomolar and 180 picomolar.

The optimal range of plasma levels appropriate for Val^8-GLP-1(7-37)OH and GLP-1 compounds of similar potency (See Table 2) can also be applied to other GLP-1 compounds including Exendin-3 and Exendin-4 which have different potencies. GLP-1 compounds of similar potency include compounds that have within two-fold the activity of Val^8-GLP-1(7-37)OH as measured by an in vitro potency assay.

The preferred assay for the purposes of the present invention measures EC_{50} potency using HEK-293 Aurora CRE-BLAM cells that stably express the human GLP-1 receptor. These HEK-293 cells have stably integrated a DNA vector having a cAMP response element (CRE) driving expression of the β-lactamase (BLAM) gene. The interaction of a GLP-1 agonist with the receptor initiates a signal that results in activation of the cAMP response element and subsequent expression of β-lactamase. The β-lactamase CCF2/AM substrate that emits flourescence when it is cleaved by β-

lactamase (Aurora Biosciences Corp.) can then be added to cells that have been exposed to a specific amount of GLP-1 agonist to provide a measure of GLP-1 agonist potency. The assay is further described in Zlokarnik, *et al.* (1998) *Science* 279:84-88 (See also Example 3). The EC_{50} values listed in Table 2 were determined using the BLAM assay described above by generating a dose response curve using dilutions from 3 nanomolar to 30 nanomolar.

Exendin-4 has a potency that is approximately 5-fold higher than Val^{8}-GLP-1(7-37)OH; thus, optimum plasma levels of Exendin-4 will be approximately 5-fold lower than the levels appropriate for Val^{8}-GLP-1(7-37)OH and compounds of similar potency. This would correspond to plasma levels in the range between about 6 picomolar and about 40 picomolar, preferably between about 12 picomolar and about 30 picomolar. Another example of a GLP-1 compound with increased potency is Val^{8}-Glu^{22}-GLP-1(7-37)OH which has a potency approximately 3-fold higher than Val^{8}-GLP-1(7-37)OH. Thus, optimum plasma levels of this compound will be approximately 3-fold lower than the levels determined for Val^{8}-GLP-1(7-37)OH.

Table 2

GLP-1 Compound	In vitro activity relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH
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-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37)	1.92

Thus, the range of plasma levels appropriate for a GLP-1 compound with a potency that differs from that of Val^8-GLP-1(7-37)OH can be determined. For example, a range of plasma levels for a particular GLP-1 compound is between about 60/X and 200/X, preferably between about 60/X and 150/X, most preferably between about 100/X and about 150/X wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 compound relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH wherein Val^8-GLP-1(7-37)OH has a reference value of 1.

Further, the invention relates to the use of a GLP-1 compound for the manufacture of a medicament for the normalization of blood glucose, preservation of β-cells,

induction of weight loss, or the treatment of a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome, wherein the medicament is adapted for chronic administration such that chronic plasma levels of the GLP-1 compound are maintained between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 compound relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which has a reference value of 1.

Maintaining plasma levels within the range discovered by the inventors of the present invention provides numerous clinical benefits as well as benefits from a patient convenience standpoint. There is little or no risk of hypoglycemia to the subject when using this treatment regimen. Additionally, this regimen minimizes invasive, planning, and/or time-consuming events. Furthermore, the regimen provides convenience to the patient by reducing blood glucose self-monitoring in conjunction with use. Most preferably, blood glucose self-monitoring is reduced significantly or eliminated for subjects using this treatment regimen. For example, this use does not require patient planning before, during, or following a meal. Most preferably, subjects do not need to link use of this regimen with any glucose, calorie, or sustenance consumption event of any quantity. Furthermore, use of this invention preferably limits any dose titration needed for a subject to determine the effective amount required. Most preferably, no dose titration is required thereby making one or two doses appropriate for all patients.

While pre-clinical data has alluded to some of the long-term health benefits associated with GLP-1 therapy, it has not been possible to take advantage of these long-term benefits in human patients due to the lack of understanding

regarding the steady plasma levels required to achieve such benefits.

Maintaining plasma levels of intact GLP-1 compounds as described herein induce long-term benefits derived from the suppression of glucagon, upregulation of somatostatin, stimulation of insulin gene transcription, up-regulation of IDX-1/PDX-1 or other growth factors, improvement of β cell function, activation of dormant β cells, differentiation of cells into β cells, β cell replication, and β cell proliferation. For the purposes of the present invention, a method of preserving β cells may be due to all or some or one of the following effects: improvement of β cell function, activation of dormant β cells, differentiation of cells into β cells, β cell replication, preventing β-cell deterioration such as by inhibition of apoptosis, and β cell proliferation.

Maintaining plasma levels of intact GLP-1 compounds as described herein induce long-term benefits such as appetite suppression resulting in weight loss or lack of weight gain. For example, obesity and related conditions are treated or prevented by this chronic treatment regimen. Any and all reduction in weight via less weight gain, no weight gain, and/or weight loss provides the subject with overall positive physical and psychological health effects, contributes to lessening risk factors linked to excessive body weight, and enforces compliant use of the compounds thereby reducing potential blood glucose excursions and its concomitant effects.

Another benefit of chronic exposure to GLP-1 compounds within the range of claimed serum levels includes the elimination of the delay on gastric emptying that occurs when GLP-1 compounds are first administered. By analyzing the timing of glucose peaks relative to the ingestion of a

meal for patients receiving a GLP-1 compound, it was determined that the delay in gastric emptying caused by the presence of a GLP-1 compound is approximately 2 to 3 hours. Surprisingly, after 6 days of chronic GLP-1 compound therapy, the analysis of glucose peaks indicated that this delay in gastric emptying was eliminated. Thus, chronic exposure to GLP-1 compounds within the claimed serum level range leads to an elimination of GI effects such as a delay in gastric emptying and, therefore, increases patient tolerability to the drug and potentially minimizes side effects.

This chronic treatment regimen may include treatment using GLP-1 compounds along with other blood glucose lowering drugs such as metformin, sulfonyl ureas, thiazolidinediones, and/or bisguanidines. The range of plasma levels described herein is appropriate when GLP-1 compounds are used as a monotherapy or used in conjunction with oral anti-diabetic agents.

The term "GLP-1 compounds" refers to GLP-1(7-37)OH and GLP-1(7-36)NH_2 and analogs and derivatives thereof. GLP-1 compounds also include Exendin-3 and Exendin-4 and analogs and derivatives thereof. Any of these GLP-1 compounds may need further modification or be formulated such that blood plasma levels are maintained for extended time periods following a single dose. GLP-1 peptides can be made by a variety of methods known in the art such as solid-phase synthetic chemistry, purification of GLP-1 molecules from natural sources, recombinant DNA technology, or a combination of these methods. For example, methods for preparing GLP-1 peptides are described in United States Patent Nos. 5,118,666, 5,120,712, 5,512,549, 5,977,071, and 6,191,102. As is the custom in the art, the N-terminal residue of a GLP-1 compound is represented as position 7.

The two naturally occurring truncated GLP-1 peptides are represented in formula I, SEQ ID NO: 1.

```
          7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
          His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
          18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
          Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-
          29  30  31  32  33  34  35  36  37
          Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Xaa
               Formula I, SEQ ID NO:1
```

wherein:
Xaa at position 37 is Gly, or $-NH_2$.

Preferably, a GLP-1 compound has the amino acid sequence of SEQ ID NO. 1 or is modified so that from one, two, three, four or five amino acids differ from SEQ ID NO: 1.

Some GLP-1 compounds known in the art include, for example, GLP-1(7-34) and GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), Gln^9-GLP-1(7-37), D-Gln^9-GLP-1(7-37), Thr^{16}-Lys^{18}-GLP-1(7-37), and Lys^{18}-GLP-1(7-37). GLP-1 compounds such as GLP-1(7-34) and GLP-1(7-35) are disclosed in U.S. Patent No. 5,118,666, herein incorporated by reference. Other known biologically active GLP-1 analogs are disclosed in U.S. Patent No 5,977,071; U.S. Patent No. 5,545,618; U.S. Patent No. 5,705,483; U.S. Patent No. 5,977,071; U.S. Patent No. 6,133,235: and Adelhorst, *et al.*, *J. Biol. Chem. 269:*6275 (1994).

GLP-1 compounds also include polypeptides in which one or more amino acids have been added to the *N*-terminus and/or *C*-terminus of GLP-1(7-37)OH, or fragments or analogs thereof. Preferably from one to six amino acids are added to the *N*-terminus and/or from one to eight amino acids are

added to the *C*-terminus of GLP-1(7-37)OH. It is preferred that GLP-1 compounds of this type have up to about thirty-nine amino acids. The amino acids in the "extended" GLP-1 compounds are denoted by the same number as the corresponding amino acid in GLP-1(7-37)OH. For example, the *N*-terminal amino acid of a GLP-1 compound obtained by adding two amino acids to the *N*-terminus of GLP-1(7-37)OH is at position 5; and the *C*-terminal amino acid of a GLP-1 compound obtained by adding one amino acid to the *C*-terminus of GLP-1(7-37)OH is at position 39. Amino acids 1-6 of an extended GLP-1 compound are preferably the same as or a conservative substitution of the amino acid at the corresponding position of GLP-1(1-37)OH. Amino acids 38-45 of an extended GLP-1 compound are preferably the same as or a conservative substitution of the amino acid at the corresponding position of Exendin-3 or Exendin-4. The amino acid sequence of Exendin-3 and Exendin-4 are represented in formula II, SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2

```
7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
His-Xaa-Xaa-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-
18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-
29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39
Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-
40  41  42  43  44  45
Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser
```

wherein:
Xaa at position 8 is Ser or Gly; and
Xaa at position 9 is Asp or Glu;

As used herein, a conservative substitution is the replacement of an amino acid with another amino acid that

has the same net electronic charge and approximately the same size and shape. Amino acids with aliphatic or substituted aliphatic amino acid side chains have approximately the same size when the total number carbon and heteroatoms in their side chains differs by no more than about four. They have approximately the same shape when the number of branches in the their side chains differs by no more than one. Amino acids with phenyl or substituted phenyl groups in their side chains are considered to have about the same size and shape.

A preferred group of GLP-1 compounds is comprised of GLP-1 analogs of formula III (SEQ ID NO: 3):

```
          7   8   9   10  11  12  13  14  15  16  17
          Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Thr-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-
          18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28
          Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Phe-
          29  30  31  32  33  34  35  36  37  38  39
          Ile-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-
          40  41  42  43  44  45
          Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa
          Formula III (SEQ ID NO: 3)
```

wherein:

Xaa at position 7 is: L-histidine, D-histidine, desamino-histidine, 2-amino-histidine, β-hydroxy-histidine, homohistidine, α-fluoromethyl-histidine or α-methyl-histidine;

Xaa at position 8 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

Xaa at position 9 is Glu, Asp, Lys, Thr, Ser, Arg, Trp, Phe, Tyr, or His;

Xaa at position 11 is Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Arg, His, or Lys;

Xaa at position 14 is Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val,

Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 12 is His, Trp, Phe, or Tyr
Xaa at position 16 is Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, His, Phe, or Lys;
Xaa at position 17 is Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 18 is Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, Pro, Arg, or Lys;
Xaa at position 19 is Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gly, Gln, Asn, Arg, Cys, or Lys;
Xaa at position 20 is Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, or Lys;
Xaa at position 21 is Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 22 is Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 23 is Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, His, or Lys;
Xaa at position 24 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 25 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 26 is Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, or His;
Xaa at position 27 is Glu, Asp, Ala, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, Leu, or Lys;
Xaa at position 30 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, or Lys;
Xaa at position 31 is Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, Ser, Thr, Arg, or Lys;
Xaa at position 32 is Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;
Xaa at position 33 is Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, Arg, or Lys;
Xaa at position 34 is Lys, Arg, Glu, Asp, Asn, or His;
Xaa at position 35 is Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val,

Glu, Asp, Arg, Trp, Tyr, Phe, Pro, His, or Lys;
Xaa at position 36 is Arg, Lys, Glu, Asp, Thr, Ser, Trp, Tyr, Phe, Gly, or His;
Xaa at position 37 is Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Gly-Pro, Gly-Pro-NH_2, -NH_2 or is deleted;
Xaa at position 38 is Arg, Lys, Glu, Asp, Ser, or His, or is deleted;
Xaa at position 39 is Arg, Lys, Glu, Asp, Ser, or His, or is deleted;
Xaa at position 40 is Asp, Glu, Gly, or Lys, or is deleted;
Xaa at position 41 is Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, Ala, or Lys, or is deleted;
Xaa at position 42 is Pro, Lys, Glu, or Asp, or is deleted;
Xaa at position 43 is Glu, Asp, Pro, or Lys, or is deleted;
Xaa at position 44 is Glu, Asp, Pro, or Lys, or is deleted; and
Xaa at position 45 is Val, Glu, Asp, Ser, or Lys, or is deleted, or
a C-1-6-ester, or amide, or C-1-6-alkylamide, or C-1-6-dialkylamide thereof; provided that when the amino acid at position 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, or 44 is deleted, then each amino acid downstream of that amino acid is also deleted. It is preferred that the analogs encompassed by formula III, have not more than six amino acids that differ from the corresponding amino acids in GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH_2, Exendin-3, or Exendin-4. It is more preferred that the analogs encompassed by formula III have between one and five amino acids that differ from the corresponding amino acids in GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH_2, Exendin-3, or Exendin-4.

Another preferred group of GLP-1 compounds is comprised of GLP-1 analogs of formula IV (SEQ ID NO: 4):

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

formula IV (SEQ ID NO: 4)

wherein:

Xaa_8 is: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

Xaa_{11} is: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, or His; Xaa_{12} is: His, Trp, Phe, or Tyr;

Xaa_{16} is: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, or Ala;

Xaa_{22} is: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, or Cysteic Acid;

Xaa_{23} is: His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

Xaa_{24} is: Glu, His, Ala, or Lys;

Xaa_{26} is: Asp, Lys, Glu, or His;

Xaa_{27} is: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, or Lys;

Xaa_{30} is: Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

Xaa_{33} is: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, or Glu;

Xaa_{34} is: Glu, Lys, or Asp;

Xaa_{35} is: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, or Glu;

Xaa_{36} is: Arg, Glu, or His;

R is: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, $-NH_2$, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH_2, or is deleted. It is preferred that the analogs encompassed by formula IV, have not more than six amino acids that differ from the corresponding amino acids in GLP-1(7-37)OH, or GLP-1(7-36)NH_2. It is more preferred that the analogs encompassed by formula IV have between one and five amino acids that

differ from the corresponding amino acids in GLP-1(7-37)OH, or GLP-1(7-36)NH_2.

Another preferred group of GLP-1 compounds is comprised of GLP-1 analogs of formula V (SEQ ID NO: 5):

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

formula III (SEQ ID NO: 5)

wherein:

Xaa_8 is: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

Xaa_{12} is: His, Trp, Phe, or Tyr;

Xaa_{16} is: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, or Ala;

Xaa_{22} is: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, or Cysteic Acid;

Xaa_{23} is: His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

Xaa_{26} is: Asp, Lys, Glu, or His;

Xaa_{30} is: Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

Xaa_{35} is: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, or Glu;

R is: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, $-NH_2$, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH_2, or is deleted.

It is preferred that the analogs encompassed by formula V, have not more than six amino acids that differ from the corresponding amino acids in GLP-1(7-37)OH, or GLP-1(7-36)NH_2. It is more preferred that the analogs encompassed by formula V have between one and five amino acids that differ from the corresponding amino acids in GLP-1(7-37)OH or GLP-1(7-36)NH_2.

Another preferred group of GLP-1 compounds is comprised of GLP-1 analogs of formula VI (SEQ ID NO: 6):

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

formula VI (SEQ ID NO: 6)

wherein:

Xaa_8 is: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

Xaa_{22} is: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, or Cysteic Acid;

Xaa_{23} is: His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

Xaa_{27} is: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, or Lys

Xaa_{30} is: Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

R is: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, $-NH_2$, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH_2, or is deleted.

Another preferred group of GLP-1 compounds is comprised of GLP-1 analogs of formula VII (SEQ ID NO: 7):

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

(SEQ ID NO: 7)

wherein:

Xaa_7 is L-histidine, D-histidine, desamino-histidine, 2amino-histidine, β-hydroxy-histidine, homohistidine, α-fluoromethyl-histidine or α-methyl-histidine;

Xaa_8 is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine or threonine. Preferably, Xaa_8 is glycine, valine, leucine, isoleucine, serine or threonine;

Xaa_{22} is aspartic acid, glutamic acid, glutamine, asparagine, lysine, arginine, cysteine, or cysteic acid.

R is $-NH_2$ or Gly(OH).

Most preferred GLP-1 compounds of formula I, II, III, IV, V, and VI comprise GLP-1 analogs wherein the backbone for such analogs or fragments contains an amino acid other than alanine at position 8 (position 8 analogs). Preferred amino acids at position 8 are glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, or methionine and more preferably are valine or glycine.

Other preferred GLP-1 compounds are GLP-1 analogs that have the sequence of GLP-1(7-37)OH except that the amino acid at position 8 is preferably glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, or methionine and more preferably valine or glycine and position 22 is glutamic acid, lysine, aspartic acid, or arginine and more preferably glutamic acid or lysine.

Other preferred GLP-1 compounds are GLP-1 analogs that have the sequence of GLP-1(7-37)OH except that the amino acid at position 8 is preferably glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, or methionine and more preferably valine or glycine and position 30 is glutamic acid, aspartic acid, serine, or histidine and more preferably glutamic acid.

Other preferred GLP-1 compounds are GLP-1 analogs that have the sequence of GLP-1(7-37)OH except that the amino acid at position 8 is preferably glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, or methionine and more preferably valine or glycine and position 37 is histidine, lysine, arginine, threonine, serine, glutamic acid, aspartic acid, tryptophan, tyrosine, phenylalanine and more preferably histidine.

Other preferred GLP-1 compounds are GLP-1 analogs that have the sequence of GLP-1(7-37)OH except that the amino acid at position 8 is preferably glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, or methionine and more preferably valine or glycine and position 22 is glutamic

acid, lysine, aspartic acid, or arginine and more preferably glutamic acid or lysine and position 23 is lysine, arginine, glutamic acid, aspartic acid, and histidine and more preferably lysine or glutamic acid.

Other preferred GLP-1 compounds are GLP-1 analogs that have the sequence of GLP-1(7-37)OH except that the amino acid at position 8 is preferably glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, or methionine and more preferably valine or glycine and position 22 is glutamic acid, lysine, aspartic acid, or arginine and more preferably glutamic acid or lysine and position 27 is alanine, lysine, arginine, tryptophan, tyrosine, phenylalanine, or histidine and more preferably alanine.

In the nomenclature used herein to describe GLP-1 compounds, the substituting amino acid and its position is indicated prior to the parent structure. For example Val^{8}-GLP-1(7-37)OH designates a GLP-1 compound in which the alanine normally found at position 8 in GLP-1(7-37)OH (formula I, SEQ ID NO:1) is replaced with valine.

Other preferred GLP-1 compounds include: Val^{8}-GLP-1(7-37)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, and Gly^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH.

More preferred GLP-1 compounds are 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, and Arg^{34}-GLP-1(7-37)OH.

A GLP-1 compound also includes a "GLP-1 derivative" which is defined as a molecule having the amino acid sequence of GLP-1 or of a GLP-1 analog, but additionally having chemical modification of one or more of its amino acid side groups, α-carbon atoms, terminal amino group, or terminal carboxylic acid group. A chemical modification includes, but is not limited to, adding chemical moieties, creating new bonds, and removing chemical moieties.

The GLP-1 compound used for the chronic treatment regimen may require modification or formulation so that blood plasma levels are maintained in the claimed efficacious range for extended time periods. Various means can be employed to achieve a protracted time action including, for example, the incorporation of GLP-1 compounds into suspended amorphous or crystalline particles wherein the GLP-1 compound is complexed with zinc or protamine and slowly solubilizes upon administration. Another means includes derivatizing a GLP-1 compound such that it binds plasma albumin and slowly dissociates over time. In addition, depot formulations wherein an bioadsorbable polymer is used to provide sustained release over time are also suitable for use in the present invention.

For example, GLP-1 compound can be incorporated into zinc crystals which have a protracted time action by dissolving the selected GLP-1 peptide in a glycine-free solution at a pH of about 9.5 to about 11.5. This "alkaline normalization" step appears to reduce the content of β-sheet conformation in the peptide and enhance the α-helix conformation that is important for solubility and bioavailability of some GLP-1 compounds. This step also serves to maintain the peptide in a preferred α-helix conformation prior to the subsequent process step. This key

step thus "normalizes" variation in bulk lots of the peptide into a more reproducible, homogenous solution.

Preferably, the peptide concentration in the alkaline normalization solution is greater than 5 mg/mL. More preferably, the concentration is about 10 mg/mL to about 30 mg/mL. Other ranges of preferred concentration of dissolved peptide are about 5 mg/mL to about 25 mg/mL, about 8 mg/mL to about 25 mg/mL and about 10 mg/mL to about 20 mg/mL. The most preferred concentration is about 15 mg/mL.

Preferably, an aqueous alkaline solution comprising only water and a base such as NaOH, KOH or ammonium hydroxide is employed to dissolve the peptide. A more preferred base is NaOH.

Preferably, the pH of the alkaline normalization step is about 10.0 to about 11.0. More preferably, the pH is about 10.5. The alkaline solution comprising the dissolved peptide may be allowed to sit quiescently for a period of about 5 minutes to about 3 hours at ambient temperature, which, although it is not to be construed as a limitation, is generally between about 20°C and about 25°C. The alkaline solution may also be gently stirred. More preferably, the dissolved alkaline peptide solution will sit quiescently for about 1 hour at ambient temperature. One skilled in the art will recognize that combinations of pH, time, temperature and stirring conditions for this step can be readily established for each peptide that ensures "normalization" of the peptide conformation is complete yet avoids or minimizes chemical degradation that may occur to the peptide.

The next step in the process for preparing crystals of a selected peptide is the addition of glycine. Amino acids such as glycine bind zinc ions which also bind very tightly to the histidine residue(s) in a peptide. Thus, competition for zinc binding may play a role in the formation of peptide

crystals, as well as in the stability of subsequent crystalline compositions. The glycine added to the alkaline peptide solution may be in a solid form or in a stock solution. Preferably, glycine is added as a solid. Preferably, the added glycine is in free-base form. Preferably, the resulting concentration of glycine in the alkaline peptide solution is about 5 mM to about 250 mM. Ranges of more preferred glycine concentration are about 10 mM to about 150 mM, about 20 mM to about 100 mM, about 40 mM to about 80 mM and about 55 mM to about 65 mM. Most preferably, the glycine concentration is about 60 mM.

Optionally, the pH of the alkaline peptide solution may be readjusted after the addition of the glycine. If the pH is adjusted, it is preferably adjusted to a pH between about 9.0 and about 11.0. More preferably, it is adjusted to a pH between about 9.2 and about 9.8. Most preferably, it is adjusted to about pH 9.5.

Optionally, the alkaline peptide solution with added glycine may be filtered. Filtration is recommended if any evidence of undissolved particles, dust or lint is apparent in the solution. If desired, this is also a good place in the process at which the solution can be sterilized by performing an aseptic filtration step. Preferably, the filtration will be conducted using a sterile non-pyrogenic filter having low-protein binding and a pore size of 0.45 μm or less. Preferably, the filter is a sterile non-pyrogenic, low-protein binding filter of pore size 0.22 μm or less. More preferably, the filter is a sterile 0.22 μm Millex® filter (Millipore Corporation, Waltham, MA, USA).

The next step in the process of forming crystals is addition to the alkaline peptide solution of about 2% to about 20% of the total final volume of an alcohol selected from the group consisting of ethanol and isopropanol, and about 0.5 moles to about 2.5 moles of zinc per mole of the

peptide. The zinc and ethanol may be added in a single aqueous stock solution or may be added separately in one or more steps in any order. Preferably, the alcohol is added before the zinc is added.

Preferably, the added alcohol represents, by volume, about 2% to about 20% of the total final volume of the alkaline peptide-zinc-alcohol solution. More preferably, the alcohol represents about 5% to about 15% of the total final volume. More preferably, the alcohol represents about 6% to about 12% of the total final volume. Most preferably, the alcohol represents about 9% of the total final volume. Preferably, the alcohol is ethanol.

The zinc added at this stage refers to the zinc ion. The zinc may be added in a variety of forms, but a zinc oxide solution acidified with dilute HCl and salt forms such as zinc acetate or zinc chloride are preferred. More preferred is a zinc oxide solution acidified with dilute HCl.

Preferably, 1.0 moles to about 2.25 moles of zinc per mole of the peptide is added in this process step. Other preferred ranges of zinc addition include 1.1 to 2.0 moles of zinc per mole of the peptide, 1.3 to 1.7 moles per mole of peptide, and 1.4 to 1.6 moles per mole of peptide. Most preferably, about 1.5 moles of zinc per mole of peptide is added.

Preferably, the solution comprising zinc that is added to the peptide solution is added slowly and/or in small increments, which minimizes the localized precipitation of peptide and/or zinc complexes that may form at the site of addition. More preferably, glycine is also a component of the solution comprising zinc that is being added at this step. For example, a zinc-glycine solution may be prepared by dissolving zinc oxide in dilute HCl to a pH of about 1.6 and then adding solid glycine. A sufficient quantity of

glycine is added to raise the pH of the solution to between about pH 2 and about pH 3. The pH of the zinc-glycine solution may be raised further using, for example, dilute NaOH. A preferred pH range of the zinc-glycine solution is about pH 4.0 to about pH 6.0. A more preferred pH range of the zinc-glycine solution is about pH 5.0 to about pH 5.5. As noted earlier, glycine has a binding affinity for zinc that may compete with zinc binding to the peptide. Thus, the presence of glycine in the solution comprising zinc that is being added to the composition allows the zinc solution to be added more quickly because localized precipitation problems are minimized. In addition, having a zinc-glycine solution above pH 2.0, and preferably about pH 4.0 to about pH 6.0, allows the solution to be sterile filtered using filters that are rated by their manufacturers to handle, for example, pH 2-10 solutions, prior to its introduction into a sterile peptide composition. Preferably, the zinc-glycine solution comprises about 50 mM to about 70 mM glycine and about 20 mM to about 200 mM zinc.

The last steps in the initial crystallization of a selected peptide are adjusting the pH of the solution to between about pH 7.5 and about pH 10.5 and allowing crystals of the peptide to form. Preferred reagent solutions useful for adjusting the pH of the solution include dilute HCl, dilute acetic acid and dilute NaOH.

Preferred pH ranges for crystallization of selected peptides include about pH 8.0 to about pH 10.0, about pH 7.5 to about pH 9.5, about pH 8.5 to about pH 9.2, about pH 9.0 to about pH 9.5, about pH 7.5 to about pH 8.5, about pH 8.7 to about pH 9.5, and about pH 9.2 to about pH 10.0.

One skilled in the art will recognize that the preferred pH of crystallization will depend on many factors, including the nature of the peptide and its concentration, the alcohol concentration, the zinc concentration, the ionic

strength of the solution and the temperature of crystallization. By way of illustration, the peptide Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH produced crystals at only select ethanol and zinc concentrations at a pH range of about 7.7 to about 8.1, whereas the peptide Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH produced crystals over a broad range of zinc and ethanol concentrations at a pH range of about 9.8 to about 10.4.

The skilled artisan will further recognize that, for a given set of conditions, a preferred manner of determining the optimal pH of crystallization is to determine it empirically, that is, to slowly add the acidification solution, preferably dilute HCl or dilute acetic acid, in small increments, and observe what happens after each increment is added. Generally, small quantities of localized zones of precipitation will occur at the spot of addition of the acidic solution. When gentle swirling takes increasingly longer periods of time to completely redissolve the precipitation, that is the best time to stop adding the acid and allow crystallization from the clear or slightly cloudy solution to proceed.

The skilled artisan will further recognize that the pH and temperature that one selects for crystallization will have an impact on the speed at which the crystallization proceeds, the crystallization yield, and the size and homogeneity of the crystals formed. Preferably, the pH of crystallization for the selected peptides is about pH 8.0 to about pH 10. More preferably, the pH is about 8.7 to about 9.5. Other ranges of preferred pH of crystallization are about 8.8 to about 9.3, about 9.0 to about 9.5, and about 8.5 to about 9.3. Most preferably, the crystallization is conducted at about pH 9.1.

Preferably, the temperature of crystallization is about 10°C to about 30°C. More preferably, the temperature of crystallization is about 15°C to about 28°C. Most

preferably, the temperature of crystallization is ambient temperature, or about 20°C to about 25°C.

Preferably, the crystallization step described above is complete, that is, 90% or more of the peptide is precipitated in predominantly crystalline form, in about 3 hours to about 72 hours. More preferably, the crystallization is complete in about 10 hours to about 48 hours. Most preferably, the crystallization is complete in about 16 hours to about 26 hours. Completion of crystallization may be determined by a variety of means, including HPLC analysis of the peptide present in an aliquot of the composition. Method 5 herein describes one such protocol that may be employed.

Preferably, the crystals produced according to the steps of the process described above are thin plate crystals. The crystals produced by the process may be examined by microscopy.

Pharmaceutical compositions comprising crystals of a GLP-1 peptide prepared as described above may be prepared by adding suitable, pharmaceutically acceptable excipients to the crystal suspension in the original mother liquor. Alternatively, the crystals may be isolated by filtration, gentle centrifugation or other means of phase separation, and used in a variety of ways to prepare pharmaceutically acceptable compositions. The skilled artisan will recognize suitable procedures and excipients useful for preparing such pharmaceutical compositions.

The following process starts with the crystals and original mother liquor from the initial crystallization stage and continues with the preparation of a stable pharmaceutical composition.

To prepare a stable pharmaceutical composition of crystals of a selected peptide, the pH of the suspension of crystals in their complete original mother liquor, or

portion thereof, is lowered to a pH value at which 97% or more of the peptide becomes insoluble. Preferably, this part of the process begins within a few hours after the initial crystallization is determined to be complete. Preferably, the pH is lowered using a dilute solution of HCl or acetic acid wherein the acidic solution is added slowly and in incremental portions. The skilled artisan will recognize that the preferred pH at which this second stage of crystallization should occur will depend on many factors, including the nature of the peptide and its concentration, the alcohol concentration, the zinc concentration, the ionic strength of the suspension and the temperature of crystallization. Preferably, the pH is about 0.2 to 2.0 pH units lower than the pH at which the initial crystallization proceeded. More preferably, the pH is about 0.5 to about 1.5 pH units lower, and most preferably, the pH is about 0.8 to 1.3 pH units lower than the pH at which the initial crystallization proceeded. The temperature of this second stage of crystallization is preferably ambient temperature, or about 20°C to about 25°C. For the peptide Val^8-GLP-1(7-37)OH, a preferred pH is about 7.5 to about 8.5. A more preferred pH is about 7.8 to about 8.2.

Preferably, the pH of a suspension of peptide crystals is lowered to a pH at which 98% or more, and more preferably at which 99% or more of the peptide becomes insoluble in the composition. The additional precipitation formed in this second stage of crystallization comprises crystals. Preferably, the additional precipitation formed in this second stage of crystallization will be predominantly crystals of comparable morphology and size distribution as those formed in the first stage of crystallization.

Preferably, the second stage of crystallization is complete enough, that is, 97% or more of the peptide is insoluble, to allow the following step to begin within 30

hours, more preferably within 18 hours, more preferably within 6 hours and most preferably within 2 hours of when the second stage of crystallization started. Quantitation of precipitation yield may be determined by a variety of means, including HPLC analysis of the peptide present in an aliquot of the composition.

The next step in the process to prepare a stable pharmaceutical composition of crystals of a selected peptide is to add a pharmaceutically acceptable preservative and a buffer selected from the group consisting of TRIS, maleate, phosphate, succinate, glycylglycine and adipate. Optionally, one or more tonicity agents such as sodium chloride, other salts, glycerin or mannitol may also be added. These components may be added as a single solution, as combination solutions or individually in any order. It is preferred that the preservative is added last. Of these components, a preferred buffer is selected from the group consisting of TRIS and maleate, a preferred preservative is m-cresol and a preferred tonicity agent is sodium chloride. A more preferred buffer is TRIS.

A preferred quantity of TRIS to add to the crystalline peptide suspension, if TRIS is the selected buffer, is such that the TRIS concentration in the final composition is about 5 mM to about 40 mM. A more preferred range of TRIS concentration in the final composition is about 10 mM to about 20 mM. A most preferred concentration of TRIS in the final composition is about 15 mM.

A preferred quantity of maleate to add to the crystalline peptide suspension, if maleate is the selected buffer, is such that the maleate concentration in the final composition is about 2 mM to about 20 mM. A more preferred range of maleate concentration in the final composition is about 5 mM to about 15 mM. A most preferred concentration of maleate in the final composition is about 9 mM.

If sodium chloride is selected to be a component of the peptide composition, a preferred quantity to add to the crystalline peptide suspension is such that the added sodium chloride in the final composition is about 30 mM to about 200 mM. A more preferred concentration of added sodium chloride in the final composition is 50 mM to about 150 mM. Other ranges of preferred sodium chloride concentration are about 80 mM to about 120 mM, about 70 mM to about 130 mM, and about 90 mM to about 130 mM. A most preferred quantity of added sodium chloride in a pharmaceutical composition is about 110 mM.

Although any pharmaceutically acceptable preservative may be added to the crystalline peptide suspension at this point in the process, for a composition of the present invention a phenolic preservative or benzyl alcohol is preferred. Examples of phenolic preservatives include phenol, chlorocresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, ethylparaben, methylparaben, propylparaben, butylparaben, thymol or mixtures thereof. More preferred preservatives are benzyl alcohol, m-cresol, phenol, methylparaben and mixtures thereof. A most preferred pharmaceutically acceptable preservative is m-cresol.

A preferred quantity of a pharmaceutically acceptable preservative to add to a crystalline peptide composition at this point in the process is an amount such that the preservative concentration in the final composition is about 1.0 mg/mL to about 20.0 mg/mL. More preferred ranges of concentration of preservative in the final composition are about 2.0 mg/mL to about 8.0 mg/mL, about 2.5 mg/mL to about 4.5 mg/mL and about 2.0 mg/mL to about 4.0 mg/mL. A most preferred concentration of preservative in the final composition is about 3.0 mg/mL.

The final step in the process of preparing a stable pharmaceutical composition of crystals of a selected peptide

is an adjustment to a final pH between about 6.0 and about 8.5 and preferably between about pH 6.5 and about pH 8.0. Although any of a wide variety of acidification and/or alkalization reagent solutions may be employed for this pH adjustment, dilute HCl, dilute NaOH and dilute acetic acid are preferred. More preferred reagent solutions are dilute HCl and dilute NaOH. The preferred pH to which the composition is adjusted will depend to some extent upon the selected peptide, the peptide concentration, the proposed route of administration and the selected buffer.

Preferably, with TRIS as the selected buffer, the pH will be adjusted to a pH between about 6.5 and about 8.5. More preferably, the pH will be adjusted to a pH between about 7.0 and about 7.8, between about 7.2 and about 7.8, between about 7.5 and about 8.5, or between about 7.0 and about 8.0. A most preferred pH to which the composition is adjusted when TRIS is the selected buffer is about 7.5. With maleate as the selected buffer, the pH will be adjusted to a pH between about 6.0 and about 7.5. More preferably, the pH will be adjusted to a pH between about 6.4 and about 7.5, between about 6.4 and about 7.0, or between about 6.0 and about 7.0. A most preferred pH to which the composition is adjusted when maleate is the selected buffer is about 6.5.

Instead of a formulation approach, long acting GLP-1 compounds suitable for the treatment regimen of the present invention can be derivitized. Derivatization is accomplished by various means. Modifications at amino acid side groups include, without limitation, acylation of lysine ε-amino groups, N-alkylation of arginine, histidine, or lysine, alkylation of glutamic or aspartic carboxylic acid groups, and deamidation of glutamine or asparagine. Modifications of the terminal amino group include, without

limitation, the des-amino, N-lower alkyl, N-di-lower alkyl, and N-acyl modifications. Modifications of the terminal carboxy group include, without limitation, the amide, lower alkyl amide, dialkyl amide, and lower alkyl ester modifications. Furthermore, one or more side groups, or terminal groups, may be protected by protective groups known to the ordinarily-skilled protein chemist. The α-carbon of an amino acid may be mono- or dimethylated.

Preferred GLP-1 derivatives are achieved through acylation. Using the principle of fatty acid derivitization, GLP-1 action is protracted by facilitating binding to plasma albumin via association of the fatty acid residue to fatty acid binding sites on albumin in the blood and peripheral tissues. A preferred GLP-1 derivative is $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37). GLP-1 derivatives and methods of making such derivatives are disclosed in Knudsen, *et al.* (2000) *J. Med. Chem.* 43:1664-1669. In addition, numerous published applications describe derivatives of GLP-1, GLP-1 analogs, Exendin-4, and Exendin-4 analogs. See U.S. Patent No. 5,512,540, WO96/29342, WO98/08871, WO99/43341, WO99/43708, WO99/43707, WO99/43706, and WO99/43705.

GLP-1 peptides can also be encapsulated using microspheres and then delivered orally. For example, GLP-1 compounds can be encapsulated into microspheres composed of a commercially available, biocompatible, biodegradable polymer, poly(lactide-co-glycolide)-COOH and olive oil as a filler. See Joseph, *et al.* (2000) *Diabetologia* 43:1319-1328. Other types of microsphere technology is also available commercially such as Medisorb® and Prolease® biodegradable polymers from Alkermes. Medisorb® polymers can be produced with any of the lactide isomers. Lactide:glycolide ratios can be varied between 0:100 and

100:0 allowing for a broad range of polymer properties. This allows for the design of delivery systems and implantable devices with resorption times ranging from weeks to months.

Another embodiment of the present invention encompasses articles of manufacture for human pharmaceutical use comprising a package insert, a container, and said insert describing a treatment regimen which involves maintaining plasma levels of a GLP-1 compound with a particular potency within a certain range that avoids or minimizes side effects such as nausea and vomiting.

The container used in the present article of manufacture is conventional in the pharmaceutical arts. Generally, the container is a vial or cartridge, usually made of glass, and accompanying cap, closure, bead, plunger, septum, and/or seal or other such article suitable for use by the patient or pharmacist. Alternatively, the container is part of a kit consisting of a cartridge containing dried powder and a syringe pre-filled with an appropriate diluent. Other options include the container consisting of a dual chamber cartridge with a bypass that keeps the diluent liquid and the dried powder separate from each other until reconstitution is desired. At the time of reconstitution, the dual chamber cartridge permits the diluent liquid to flow into the dried powder. Preferably, the container is sized to accommodate 0.1 to 100 mL, preferably 0.5 to 25 mL, and more preferably, 5 to 10 mL, even more preferably 1.5 to 3 mL volumes. Alternatively, the container is a blister, capsule, or blister disc. Other options for the container include a transdermal patch, implantable device, microsphere carriers and other depot delivery systems.

The insert may provide the physician with a choice of several doses which result in plasma levels of the GLP-1 compound within the ranges described herein, or preferably

the insert will provide the physician with a single dose which results in plasma levels of the GLP-1 compound within the ranges described herein.

The package insert provides a description of how to administer a pharmaceutical product, along with the safety and efficacy data required to allow the physician, pharmacist, and patient to make an informed decision regarding the use of the product. The package insert generally is regarded as the label of the pharmaceutical product.

The package insert may provide some or all of the following indications or label descriptions:

1) improved glycemic control in patients inadequately controlled on single or multiple oral anti-diabetic agents as a monotherapy or as a combination therapy with single of multiple oral anti-diabetic agents compared to such agents alone;
2) use for patients with inadequately controlled hyperglycemia;
3) mean reduction in HbA1c greater than or equal to 0.5%, preferably greater than or equal to 1 % in patients inadequately controlled on single or multiple oral anti-diabetic agents;
4) mean weight gain for patients on monotherapy will be less than the mean weight gain for patients treated with either a TZD or sulfonylurea as monotherapy over a 3 month period or a longer period;
5) statistically significant demonstration of weight loss;
6) no severe hypoglycemia at therapeutic dose;
7) no symptomatic hypoglycemia at therapeutic dose;
8) no fixed injection meal interval;
9) initiation of daily dosing requires no more than moderate dose titration (less than or equal to 4

doses) with subsequent daily dosing independent of blood glucose monitoring;

10) at least 12 months, preferably at least 18 months refrigerated shelf-life;

11) room temperature in-use storage;

12) minimal injection site discomfort at therapeutic dose;

13) no injection site discomfort at therapeutic dose;

14) minimal nausea at therapeutic dose;

15) β cell preservation in animal models;

16) β cell preservation in humans;

17) injection volume between 0.1 and 0.25 mLs; and

18) safe for use in children.

Furthermore, the package insert may provide instructions regarding the treatment regimen encompassed by the present invention involving maintaining continuous plasma levels of GLP-1 within a therapeutic range regardless of the patient's body weight or body mass index, sex, or age. In addition, the package insert describes how the present invention provides a means to maintain steady state GLP-1 levels with a protocol that does not require the patient to self-monitor glucose levels, and that does not need to be timed with meals thereby allowing patient convenience while safely maintaining optimal blood glucose control.

Incidences of side effects are notably reduced due to the presently claimed article of manufacture providing a chronic dosing regimen. Therefore, the preferred article of manufacture provides a package insert having reported incidences of nausea in less than 30% of patients with plasma levels within the ranges described herein. More preferably, nausea and vomiting occurs in less than 20% of patients with

plasma levels within the ranges described herein. Even more preferably, less than 10% of patients with plasma levels within the ranges described herein experience such side effects. Most preferably, nausea and vomiting occur in less than 5% of patients with plasma levels within the ranges described herein.

Incidences of hypoglycemia due to the treatment regimen described herein are rare. The package insert having reported incidences of hypoglycemia characterized by a blood glucose level less than 63 mg/dL is less than 10%, preferably less than 5 %, and most preferably there are no reports of hypoglycemia.

The invention is illustrated by the following examples which are not intended to be limiting in any way.

Example 1

Clinical Study in type 2 diabetics

Four groups of eight type 2 diabetic patients were treated with a long-acting formulation of Val^8-GLP-1(7-37)OH. The first three groups received either 2.5 or 3.5 or 4.5 mg once a day for 6 days. The fourth group received 4.5 mg once per day for 21 days. On the day before the study, each patient received a saline injection as placebo. Blood glucose was followed for 13 hours. All meals during the evaluation days were strictly standardized. Patients were outpatients except for the Day 6 and Day 21 evaluations over 24 hours. Following the injection on Day 1, blood samples were taken for glucose and Val^8-GLP-1(7-37)OH plasma levels during 4 hours. Patients were dosed each morning. On the sixth day of dosing (and also Day 21 for Group 4), samples were collected up to 26 hours post dose for the blood glucose and Val^8-GLP-1(7-37)OH plasma level determinations. Val^8-GLP-1(7-37)OH plasma levels are represented in Figures

1 and 3 and corresponding glucose levels are represented in Figures 2 and 4. Patients in the 21 day dosing group lost an average of 2.125 kg (standard deviation: 1.36 kg). Five subjects lost a total of 3 kg, one lost 2 kg, and 2 lost no weight.

Example 2

Determination of Val^8-GLP-1(7-37)OH plasma levels:

Due to the presence of endogenous concentrations of native GLP-1 peptides and degradation products such as GLP-1 (9-37)OH by DPP-IV, concentrations of intact Val^8-GLP-1(7-37)OH were measured using an ELISA assay in which full-length non-degraded Val^8-GLP-1(7-37)OH is specifically recognized. Immunoreactive Val^8-GLP-1(7-37)OH is captured from the plasma by an N-terminal anti-Val^8-GLP-1(7-37)OH specific antisera immobilized onto a microtiter plate. This antisera is highly specific to the N-terminus of Val^8-GLP-1(7-37)OH. An alkaline-phosphatase conjugated antibody, specific for the C-terminus of GLP-1, is added to complete the "sandwich." Detection is completed using pNPP, a colormetric substrate for alkaline phosphatase. The amount of color generated is directly proportional to the concentration of immunoreactive Val^8-GLP-1(7-37)OH present in the sample. Quantitation of Val^8-GLP-1(7-37)OH in human plasma can be interpolated from a standard curve using Val^8-GLP-1(7-37)OH as the reference standard. Data was analyzed by a computer program using a weighted 4-parameter logistic algorithm. The concentration of immunoreactive Val^8-GLP-1(7-37)OH in test samples was determined using a standard curve.

Example 3

In vitro potency assay:

HEK-293 Aurora CRE-BLAM cells expressing the human GLP-1 receptor are seeded at 20,000 to 40,000 cells/well/100 µl into a 96 well black clear bottom plate. The day after seeding, the medium is replaced with plasma free medium. On the third day after seeding, 20 µl of plasma free medium containing different concentrations of GLP-1 agonist is added to each well to generate a dose response curve. Generally, fourteen dilutions containing from 3 nanomolar to 30 nanomolar GLP-1 compound were used to generate a dose response curve from which EC50 values could be determined. After 5 hours of incubation with GLP-1 compound, 20 µl of β-lactamase substrate (CCF2-AM - Aurora Biosciences - product code 100012) was added and incubation continued for 1 hour at which point the flourescence was determined on a cytoflour.

Example 4

Crystallization of GLP-1(7-37)OH:

GLP-1(7-37)OH was dissolved in about 0.5 mL of 0.015 N NaOH at a concentration of about 17 mg/mL, based on the mass of the peptide. The protein solution was adjusted to about pH 10.5 with dilute NaOH. The solution was held at ambient temperature for about 1 hour.

To a 390 µL aliquot of this peptide solution was added 25 µL of a 1.0 M glycine pH 10 solution, giving a final concentration of about 16 mg/mL of GLP-1(7-37)OH and about 60 mM glycine. The pH of the solution was adjusted to about pH 10 with dilute HCl and/or dilute NaOH as needed.

The solution was then filtered into a glass vial through a sterile 0.22 µm Millex®-GV (Millipore Corporation,

Waltham, MA, USA) 4 mm filter unit that had been pre-rinsed with 60 mM glycine buffer at pH 10.

To 300 µL of the filtered peptide solution was added 66 µL of a 50% ethanol solution in water. To this solution was added, in small increments, a total of 14.1 µL of a 150 mM zinc oxide pH 2.3 solution (prepared with dilute HCl), with mixing by hand performed after each increment was added until the solution became clear. The molar ratio of zinc:peptide was about 1.5:1.

The final solution was adjusted to about pH 9.0 and crystallization proceeded at ambient temperature. The crystallization solution comprised about 12.6 mg/mL GLP-1(7-37)OH, 47 mM glycine, 8.7% ethanol by volume, and about 1.5 moles of zinc per mole of GLP-1(7-37)OH at pH 9.0.

After 1 day at ambient temperature, thin plate crystals of GLP-1(7-37)OH were observed under a microscope at 400X magnification.

The yield of crystallization was determined by using a spectrophotometer to compare the absorbance of an aliquot of the entire suspension redissolved in a 10-fold dilution of 0.01N HCl, with a similarly diluted supernatant obtained by centrifuging the suspension for about 4 minutes at 14,000 X g. For this experiment, the crystallization yield was 92%.

Example 5

Crystallization of Val^8-GLP-1(7-37)OH:

Val^8-GLP-1(7-37)OH was dissolved in about 0.57 mL of 0.015 N NaOH at a concentration of about 17 mg/mL, based on the mass of the peptide. The protein solution was adjusted to about pH 10.5 with dilute NaOH. The solution was held at ambient temperature for about 1 hour.

To a 390 µL aliquot of this peptide solution was added 25 µL of a 1.0 M glycine pH 8 solution, giving a final

concentration of about 16 mg/mL of Val^8-GLP-1(7-37)OH and about 60 mM glycine. The pH of the solution (about pH 9.0) was adjusted to about pH 9.9 with dilute HCl and/or dilute NaOH as needed.

The solution was then filtered into a 0.5 mL Eppendorf tube through a sterile 0.22 μm Millex®-GV (Millipore Corporation, Waltham, MA, USA) 4 mm filter unit.

To 300 μL of the filtered peptide solution in a clean test tube was added 66 μL of a 50% ethanol solution in water. To this solution was added, in small increments, a total of 14.1 μL of a 150 mM zinc oxide pH 2.3 solution (prepared with dilute HCl), with mixing by hand performed after each increment was added until the solution became clear. The molar ratio of zinc:peptide was about 1.5:1.

The final solution was adjusted to about pH 8.9 and crystallization proceeded at ambient temperature. The crystallization solution comprised about 12.6 mg/mL Val^8-GLP-1(7-37)OH, 47 mM glycine, 8.7% ethanol by volume, and about 1.5 moles of zinc per mole of Val^8-GLP-1(7-37)OH at pH 8.9.

After about three days at ambient temperature, thin plate crystals of Val^8-GLP-1(7-37)OH were observed under a microscope at 400X magnification.

Example 6

Crystallization of Val^8-GLP-1(7-36)NH_2:

Val^8-GLP-1(7-36)NH_2 was dissolved in about 0.44 mL of 0.015 N NaOH at a concentration of about 17 mg/mL, based on the mass of the peptide. The protein solution was adjusted to about pH 10.5 with dilute NaOH. The solution was held at ambient temperature for about 1 hour.

To a 390 μL aliquot of this peptide solution was added 25 μL of a 1.0 M glycine pH 10.2 solution, giving a final

concentration of about 16 mg/mL of Val^8-GLP-1(7-36)NH_2 and about 60 mM glycine.

The solution was then filtered into a glass vial through a sterile 0.22 μm Millex®-GV (Millipore Corporation, Waltham, MA, USA) 4 mm filter unit.

To 300 μL of the filtered peptide solution in a clean glass vial was added 66 μL of a 50% ethanol solution in water. To this solution was added, in small increments, a total of 14.1 μL of a 150 mM zinc oxide pH 2.3 solution (prepared with dilute HCl), with mixing by hand performed after each increment was added until the solution became clear. The molar ratio of zinc:peptide was about 1.5:1.

The final solution was adjusted to about pH 9.85 and crystallization proceeded at ambient temperature. The crystallization solution comprised about 12.6 mg/mL Val^8-GLP-1(7-36)NH_2, 47 mM glycine, 8.7% ethanol by volume, and about 1.5 moles of zinc per mole of Val^8-GLP-1(7-36)NH_2 at pH 9.85.

After about three days at ambient temperature, microcrystals of Val^8-GLP-1(7-36)NH_2 were observed under a microscope at 400X magnification.

Example 7

Crystallization of Val^8-GLP-1(7-37)NH_2:

Val^8-GLP-1(7-37)NH_2 was dissolved in about 0.48 mL of 0.015 N NaOH at a concentration of about 17 mg/mL, based on the mass of the peptide. The protein solution was adjusted to about pH 11.1 with dilute NaOH, then to pH 10.36 with dilute HCl. The solution was held at ambient temperature for about 1 hour.

To a 390 μL aliquot of this peptide solution was added 25 μL of a 1.0 M glycine pH 10 solution, giving a final

concentration of about 16 mg/mL of Val^8-GLP-1(7-37)NH_2 and about 60 mM glycine.

The solution was then filtered into a glass vial through a sterile 0.22 μm Millex®-GV (Millipore Corporation, Waltham, MA, USA) 4 mm filter unit.

To 300 μL of the filtered peptide solution in a clean glass vial was added 66 μL of a 50% ethanol solution in water. To this solution was added, in small increments, a total of about 7 μL of a 150 mM zinc oxide pH 2.3 solution (prepared with dilute HCl), with mixing by hand performed after each increment was added until the solution became clear. The molar ratio of zinc:peptide was about 0.75:1.

The final solution was adjusted to about pH 9.8 and crystallization proceeded at ambient temperature. The crystallization solution comprised about 12.6 mg/mL Val^8-GLP-1(7-37)NH_2, 47 mM glycine, 8.7% ethanol by volume, and about 0.75 moles of zinc per mole of Val^8-GLP-1(7-37)NH_2 at pH 9.8.

After about 48 hours at ambient temperature, clusters of Val^8-GLP-1(7-37)NH_2 were observed under a microscope at 400X magnification.

We Claim:

1. A method of normalizing blood glucose levels which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60 picomoles/liter and about 200 picomoles/liter of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form having an in vitro potency within two-fold the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

2. A method of treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, obesity, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60 picomoles/liter and about 200 picomoles/liter of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form having an in vitro potency within two-fold the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

3. A method of preventing β-cell deterioration which comprises maintaining steady state chronic plasma levels between about 60 picomoles/liter and about 200 picomoles/liter of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form having an in vitro potency within two-fold the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH wherein the GLP-1 compound is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

4. A method of inducing weight loss which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60 picomoles/liter and about 200 picomoles/liter of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form having an in vitro potency within two-fold the in vitro potency of Val^8-GLP-1(7-37)OH wherein the GLP-1 compound is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

5. The method of any one of Claims 1 through 4 wherein the plasma levels are maintained between about 100 picomolar and about 200 picomolar.

6. The method of Claim 5 wherein the plasma levels are maintained between about 100 picomolar and about 180 picomolar.

7. A method of normalizing blood glucose levels which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which is given a reference value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

8. A method of treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, obesity, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which is given a reference value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

9. A method of preventing β cell deterioration which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which is given a reference value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

10. A method of inducing weight loss which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar of a GLP-1 analog or derivative in biologically active form wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^8-GLP-1(7-37)OH which is given a reference value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

11. The method of any one of Claims 7 through 10 wherein the plasma levels are maintained between about 100/X picomolar and about 200/X picomolar.

12. The method of Claim 11 wherein the plasma levels are maintained between about 100/X picomolar and about 180/X picomolar.

13. The method of any one of Claims 1 through 12 wherein the GLP-1 analog or derivative is administered not more than once every 24 hours.

14. The method of any one of Claims 1 through 6 wherein the GLP-1 analog or derivative is selected from the group consisting of: Val^{8}-GLP-1(7-37)OH, Val^{8}-GLP-1(7-36)NH_2, Gly^{8}-GLP-1(7-37)OH, Gly^{8}-GLP-1(7-36)NH_2, Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-37)OH Val^{8}-Lys^{22}-GLP-1(7-36)NH_2, Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH, Val^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-36)NH_2, Gly^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-37)OH, Gly^{8}-Glu^{30}-GLP-1(7-36)NH_2, Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-37)OH, and Val^{8}-His^{37}-GLP-1(7-36)NH_2, Arg^{34}-GLP-1(7-36)NH_2, Arg^{34}-GLP-1(7-37)OH.

15. The method of any one of Claims 1 through 6 wherein the GLP-1 analog or derivative is a GLP-1 analog which is administered as a crystal suspension formulation.

16. The method of any one of Claims 1 through 14 wherein the GLP-1 analog or derivative is an acylated GLP-1 derivative.

17. The method of Claim 16 wherein the acylated GLP-1 derivative is a GLP-1 analog acylated at the epsilon-amino group of lysine present at position 26.

18. The method of Claim 17 wherein the acylated GLP-1 derivative is $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37).

19. A method of normalizing blood glucose levels which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 6 picomoles/liter and about 40 picomoles/liter of Exendin-4 wherein the Exendin-4 is administered by subcutaneous injection.

20. A method of treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, obesity, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 6 picomoles/liter and about 40 picomoles/liter of Exendin-4 wherein the Exendin-4 is administered by subcutaneous injection.

21. A method of preventing β-cell deterioration which comprises maintaining steady state chronic plasma levels between about 6 picomoles/liter and about 40 picomoles/liter of Exendin-4 wherein the Exendin-4 is administered by subcutaneous injection.

22. A method of inducing weight loss which comprises maintaining chronic steady state plasma levels between about 6 picomoles/liter and about 40 picomoles/liter of Exendin-4 wherein the Exendin-4 is administered by subcutaneous injection.

23. The method of any one of Claims 1 through 18 wherein the GLP-1 reaches steady state plasma levels after six days of chronic once a day dosing.

24. The method of Claim 23 wherein the GLP-1 compound accumulates approximately three-fold in the plasma after six days of chronic once a day dosing.

25. An article of manufacture for human pharmaceutical use comprising:

a) a container;

b) a dosage form comprising an amount of a GLP-1 analog or derivative having an in vitro potency within two-fold that of Val^8-GLP-1(7-37)OH; and

c) a package insert that provides for administration of the dosage form that results in maintaining GLP-1 compound plasma levels between 60 picomoles and 200 picomoles.

26. The article of Claim 25 wherein the package insert directs use to treat a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome.

27. The article of Claim 25 or 26 wherein the GLP-1 analog or derivative is selected from the group consisting of Val^8-GLP-1(7-37)OH and $Arg^{34}Lys^{26}$-(N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37).

28. An article of manufacture for human pharmaceutical use comprising:

a) a container;

b) a dosage form comprising an amount of Exendin-4; and

c) a package insert that provides for administration of the dosage form that results in maintaining Exendin-4 plasma levels between 6 picomoles and 40 picomoles.

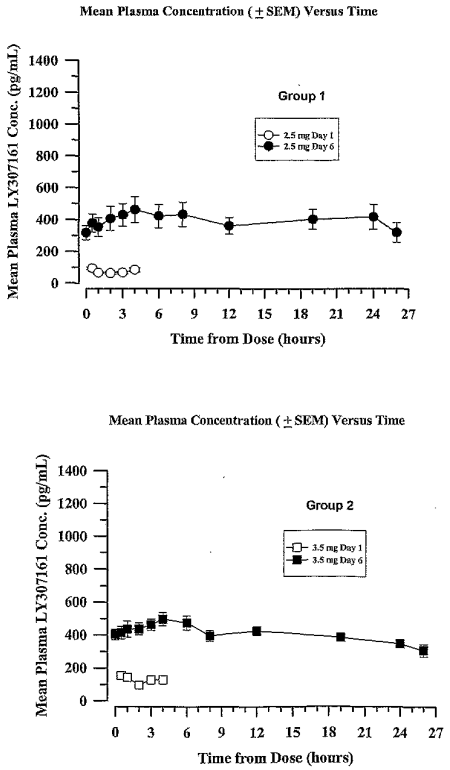
29. Use of a GLP-1 analog or derivative having an in vitro potency within 2-fold that of Val^8-GLP-1(7-37)OH for the manufacture of a medicament for normalizing blood glucose, preserving β cells, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels of the GLP-1 analog or derivative between about 60 picomolar and about 200 picomolar and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection not more the once or twice every 24 hours.

30. The Use of Claim 29 wherein the plasma levels are maintained between about 100 picomolar and about 200 picomolar.

31. Use of Exendin-4 for the manufacture of a medicament for normalizing blood glucose, preserving β cells, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels of Exendin-4 between about 6 picomolar and about 40 picomolar and wherein the Exendin-4 is administered by subcutaneous injection.

32. Use of a GLP-1 analog or derivative for the manufacture of a medicament for normalizing blood glucose, preserving β cells, inducing weight loss, or treating a condition selected from the group consisting of: hyperglycemia, type 2 diabetes, stroke, myocardial infarction, catabolic changes that occur after surgery, obesity, and irritable bowel syndrome which comprises maintaining chronic steady state plasma levels of the GLP-1 analog or derivative between about 60/X picomolar and about 200/X picomolar wherein X is the in vitro potency of the GLP-1 analog or derivative relative to Val^{8}-GLP-1(7-37)OH which is given a reference value of 1 and wherein the GLP-1 analog or derivative is administered by subcutaneous injection no more than once or twice every 24 hours.

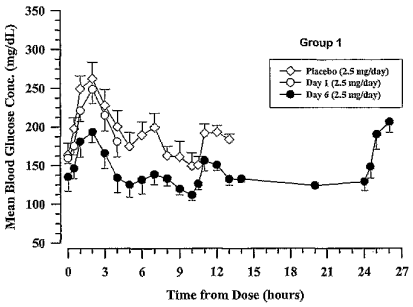
Fig. 1


Mean Plasma Concentration (±SEM) Versus Time
Mean Plasma LY307161 Conc. (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Group 1
2.5 mg Day 1
2.5 mg Day 6
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
Time from Dose (hours)

Mean Plasma Concentration (±SEM) Versus Time
Mean Plasma LY307161 Conc. (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Group 2
3.5 mg Day 1
3.5 mg Day 6
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
Time from Dose (hours)

Fig. 2

Mean Glucose Concentration (±SEM) Versus Time



Mean Glucose Concentration (±SEM) Versus Time

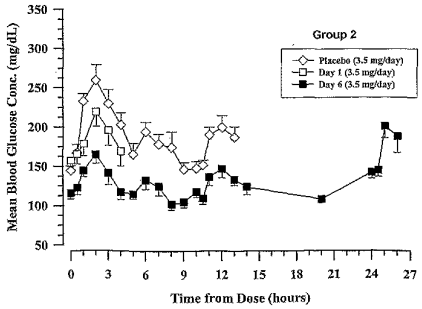
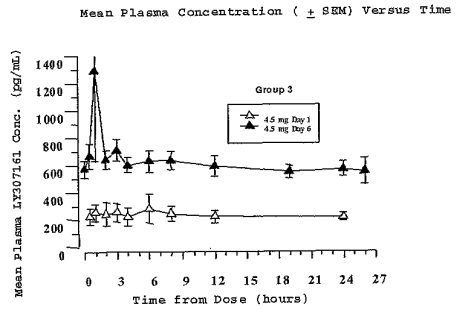


Fig. 3


Mean Plasma Concentration (± SEM) Versus Time
Mean Plasma LY307161 Conc. (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Group 3
4.5 mg Day 1
4.5 mg Day 6
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
Time from Dose (hours)

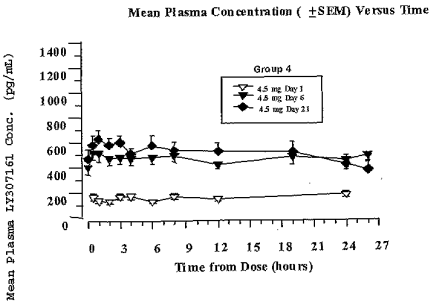
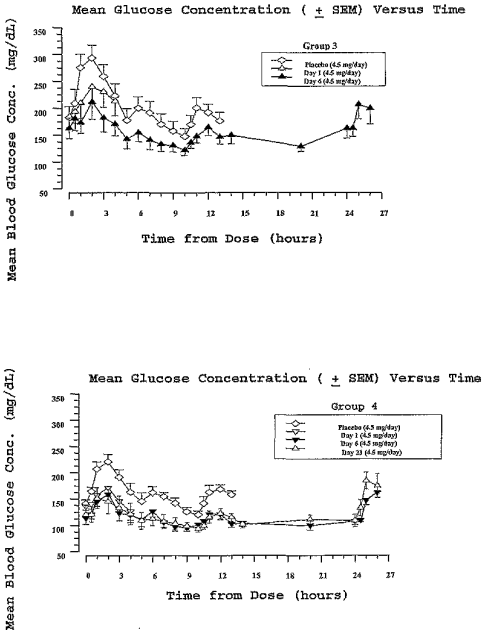

Mean Plasma Concentration (±SEM) Versus Time
Mean Plasma LY307161 Conc. (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Group 4
4.5 mg Day 1
4.5 mg Day 6
4.5 mg Day 21
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
Time from Dose (hours)

Fig. 4


Mean Glucose Concentration (± SEM) Versus Time
Group 3
Placebo (4.5 mg/day)
Day 1 (4.5 mg/day)
Day 6 (4.5 mg/day)
Mean Blood Glucose Conc. (mg/dL)
Time from Dose (hours)
Mean Glucose Concentration (± SEM) Versus Time
Group 4
Placebo (4.5 mg/day)
Day 1 (4.5 mg/day)
Day 6 (4.5 mg/day)
Day 23 (4.5 mg/day)
Mean Blood Glucose Conc. (mg/dL)
Time from Dose (hours)

X-14866 PCT.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> CHRONIC TREATMENT REGIMEN USING GLUCAGON-LIKE INSULINOTROPIC PEPTIDES

<130> X-14866

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 is Gly or is absent.

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Ser or Gly;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa at position 3 is Asp or 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> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is L-histidine, D-histidine, desamino-histidine, 2-amino-histidine, beta-hydroxy-histidine, homohistidine, alpha-fluoromethyl-histidine or alpha-methyl-histidine;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa at position 3 is Glu, Asp, Lys, Thr, Ser, Arg, Trp, Phe, Tyr, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa at position 5 is Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Arg, His, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa at position 6 is His, Trp, Phe, or Tyr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa at position 8 is Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa at position 10 is Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, His, Phe, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa at position 11 is Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa at position 12 is Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, Pro, Arg, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gly, Gln, Asn, Arg, Cys, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa at position 14 is Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa at position 15 is Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa at position 17 is Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, His, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa at position 18 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa at position 19 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa at position 20 is Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa at position 21 is Glu, Asp, Ala, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, Leu, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa at position 24 is Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa at position 25 is Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, Ser, Thr, Arg, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa at position 26 is Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa at position 27 is Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, Arg, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa at position 28 is Lys, Arg, Glu, Asp, Asn, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Arg, Trp, Tyr, Phe, Pro, His, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa at position 30 is Arg, Lys, Glu, Asp, Thr, Ser, Trp, Tyr, Phe, Gly, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 is Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, His, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Gly-Pro, Gly-Pro-NH2, -NH2 or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa at position 32 is Arg, Lys, Glu, Asp, Ser, or His, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa at position 33 is Arg, Lys, Glu, Asp, Ser, or His, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa at position 34 is Asp, Glu, Gly, or Lys, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa at position 35 is Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, Ala, or Lys, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa at position 36 is Pro, Lys, Glu, or Asp, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Xaa at position 37 is Glu, Asp, Pro, or Lys, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa at position 38 is Glu, Asp, Pro, or Lys, or is deleted;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> Xaa at position 39 is Val, Glu, Asp, Ser, or Lys,
or is deleted.

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa at position 5 is Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa at position 6 is His, Trp, Phe, or Tyr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa at position 10 is Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, or Ala;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, or Cysteic Acid;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa at position 17 is His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa at position 18 is Glu, His, Ala, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa at position 20 is Asp, Lys, Glu, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa at position 21 is Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa at position 24 is Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa at position 27 is Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, or Glu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa at position 28 is Glu, Lys, or Asp;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, or Glu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa at position 30 is Arg, Glu, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 is Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp,
Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro,
or Gly-Pro-NH2, or is deleted.

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa at position 6 is His, Trp, Phe, or Tyr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa at position 10 is Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, or Ala;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, or Cysteic Acid;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa at position 17 is His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa at position 20 is Asp, Lys, Glu, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa at position 24 is Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa at position 29 is Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, or Glu;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 is Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH2, or is deleted.

<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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys, or Cysteic Acid;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa at position 17 is His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa at position 21 is Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, or Lys;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa at position 24 is Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 is Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH2, or is deleted.

<400> 6

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> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa at position 1 is L-histidine, D-histidine, desamino-histidine, 2amino-histidine, beta-hydroxy-histidine, homohistidine, alpha-fluoromethyl-histidine or alpha-methyl-histidine;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine or threonine;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is aspartic acid, glutamic acid, glutamine, asparagine, lysine, arginine, cysteine, or cysteic acid;

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa at position 31 is -NH2 or Gly(OH).

<400> 7

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

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/047716 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 38/26

(21) International Application Number: PCT/US01/44698

(22) International Filing Date: 7 December 2001 (07.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/255,251	13 December 2000 (13.12.2000)	US
60/295,655	4 June 2001 (04.06.2001)	US
60/298,652	15 June 2001 (15.06.2001)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US]; Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DODD, Steven, Witt** [US/US]; 6541 Stafford Trace, Zionsville, IN 46077 (US). **MACE, Kenneth, Francis** [US/US]; 10907 Killington Circle, Fishers, IN 46038 (US). **TRAUTMANN, Michael, Ernst** [DE/DE]; Lilly Forschung GmbH, Essener Strasse 93, D-22419 Hamburg (DE).

(74) Agents: **STEWART, Mark, J.** et al.; ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations*

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations*

Published:

— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
18 December 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/047716 A3

(54) Title: CHRONIC TREATMENT REGIMEN USING GLUCAGON-LIKE INSULINOTROPIC PEPTIDES

(57) Abstract: The present invention encompasses a method of treating a disease by maintaining chronic steady state serum levels of a GLP-1 compound within a specified range.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna[illegible]pplication No
PCT/US 01/44698

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KNUDSEN L B ET AL: "Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US, vol. 43, no. 9, 4 May 2000 (2000-05-04), pages 1664-1669, XP002222050 ISSN: 0022-2623 page 1665, left-hand column, paragraph 1 -page 1667, left-hand column, paragraph 3; table 1 --- -/--	1-17,25, 26

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 March 2003	14/03/2003

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL – 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Charles, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna application No
PCT/US 01/44698

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GREIG N H ET AL: "ONCE DAILY INJECTION OF EXENDIN-4 TO DIABETIC MICE ACHIEVES LONG-TERM BENEFICIAL EFFECTS ON BLOOD GLUCOSE CONCENTRATIONS" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, vol. 42, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 45-50, XP000971927 ISSN: 0012-186X page 46, left-hand column, paragraph 1 page 48, right-hand column, paragraph 1 page 49, right-hand column, paragraph 3 ---	19-22, 28,31
E	WO 02 48183 A (MILLICAN ROHN LEE ;RINELLA JOSEPH VINCENT JUNIOR (US); LILLY CO EL) 20 June 2002 (2002-06-20) page 1, line 7 - line 9; claims 1,8,18; example 31; table 12 page 1, line 29 -page 2, line 11 page 3, line 28 -page 5, line 12 page 21, line 9 - line 14 page 24, line 6 -page 25, line 19 ---	1-18, 23-27
E	WO 02 47715 A (RINELLA JOSEPH VINCENT JUNIOR ;LILLY CO ELI (US); NG KINGMAN (US);) 20 June 2002 (2002-06-20) page 1, line 7 - line 9; claims 1,21,22; example 14; table 8 page 3, line 1 -page 4, line 4 page 19, line 5 - line 23 ---	1-18, 23-27
A	DEACON C F ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, vol. 41, 1998, pages 271-278, XP002202152 ISSN: 0012-186X page 271, right-hand column, paragraph 1 -page 272, left-hand column, paragraph 1 page 273, right-hand column, paragraph 4 -page 274, left-hand column, paragraph 1 page 275, left-hand column, paragraph 1 page 276, right-hand column, paragraph 1 -page 277, left-hand column, paragraph 1 ---	1-15,25, 26
A	WO 99 43708 A (MADSEN KJELD ;NOVONORDISK AS (DK); HUUSFELDT PER OLAF (DK); KNUDSE) 2 September 1999 (1999-09-02) page 10, line 20 -page 11, line 3; claims 1,24-37 page 17, line 28 -page 29, line 31 page 41, line 1 - line 10 ---	1,14-19
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat pplication No
PCT/US 01/44698

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 926 159 A (LILLY CO ELI) 30 June 1999 (1999-06-30) page 2, line 49 -page 3, line 54; claims 15-17 page 5, line 56 -page 6, line 9 ---	1-14
A	US 5 977 071 A (GALLOWAY JOHN A ET AL) 2 November 1999 (1999-11-02) cited in the application the whole document ---	1-14
A	EP 1 076 066 A (ZEALAND PHARMACEUTICALS AS) 14 February 2001 (2001-02-14) page 3, line 9 - line 48; claims 1-4 page 9, line 34 - line 43 -----	19-22, 28,31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int nal application No.
PCT/US 01/44698

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: 29,30,32
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01 /4698

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 29,30,32

Present claims 1-13 (partially), 15-17 (partially), 23-26 (partially), 29-30 (completely), 32 (completely) relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely GLP-1 analog or derivative.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds mentioned in the Claims 14, 18 and 19.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati application No
PCT/US 01/44698

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0248183	A	20-06-2002	AU	2860802 A	24-06-2002
			AU	3392902 A	24-06-2002
			AU	3926202 A	24-06-2002
			AU	3938402 A	24-06-2002
			WO	0248192 A2	20-06-2002
			WO	0248183 A2	20-06-2002
			WO	0247715 A2	20-06-2002
			WO	0247716 A2	20-06-2002
WO 0247715	A	20-06-2002	AU	2860802 A	24-06-2002
			AU	3392902 A	24-06-2002
			AU	3926202 A	24-06-2002
			AU	3938402 A	24-06-2002
			WO	0248192 A2	20-06-2002
			WO	0248183 A2	20-06-2002
			WO	0247715 A2	20-06-2002
			WO	0247716 A2	20-06-2002
WO 9943708	A	02-09-1999	AU	3247799 A	15-09-1999
			WO	9943708 A1	02-09-1999
			EP	1056775 A1	06-12-2000
			US	6268343 B1	31-07-2001
			US	2001011071 A1	02-08-2001
			US	2001047084 A1	29-11-2001
			ZA	9901571 A	02-09-1999
EP 0926159	A	30-06-1999	AU	1821899 A	05-07-1999
			BR	9813658 A	10-10-2000
			CA	2315243 A1	24-06-1999
			CN	1281369 T	24-01-2001
			CZ	20002104 A3	15-08-2001
			EP	0926159 A2	30-06-1999
			HR	20000409 A1	31-10-2000
			HU	0100046 A2	28-05-2001
			JP	2002508332 T	19-03-2002
			NO	20003081 A	08-08-2000
			NZ	505182 A	31-05-2002
			PL	341210 A1	26-03-2001
			TR	200001726 T2	23-10-2000
			WO	9930731 A1	24-06-1999
			ZA	9811466 A	14-06-2000
US 5977071	A	02-11-1999	US	5705483 A	06-01-1998
			US	2002165342 A1	07-11-2002
			US	6133235 A	17-10-2000
			US	6410513 B1	25-06-2002
			US	6388053 B1	14-05-2002
			AU	708159 B2	29-07-1999
			AU	2026895 A	03-10-1996
			BR	9503036 A	23-09-1997
			CA	2150080 A1	22-09-1996
			CN	1131674 A	25-09-1996
			CZ	9501321 A3	16-10-1996
			EP	0733644 A1	25-09-1996
			FI	952536 A	22-09-1996
			HU	74729 A2	28-02-1997
			IL	113809 A	26-07-2000
			JP	8269097 A	15-10-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No
PCT/US 01/44698

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5977071 A		NO 952034 A	23-09-1996
		NZ 272186 A	29-01-1997
		PL 308783 A1	30-09-1996
		RU 2147588 C1	20-04-2000
		TW 389769 B	11-05-2000
		ZA 9504141 A	22-11-1996
		CA 2137206 A1	10-06-1995
		EP 0658568 A1	21-06-1995
		JP 7196695 A	01-08-1995
EP 1076066 A	14-02-2001	EP 1076066 A1	14-02-2001
		AU 5966000 A	30-01-2001
		CN 1376166 T	23-10-2002
		WO 0104156 A1	18-01-2001
		EP 1196444 A1	17-04-2002
		JP 2003505347 T	12-02-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 9/10 １０３	
// Ｃ０７Ｋ 14/605	Ｃ０７Ｋ 14/605 ＺＮＡ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 スティーブン・ウィット・ドッド
アメリカ合衆国４６０７７インディアナ州ザイオンズビル、スタフォード・トレイス６５４１番
(72)発明者 ケネス・フランシス・メイス
アメリカ合衆国４６０３８インディアナ州フィッシャーズ、キリントン・サークル１０９０７番
(72)発明者 ミヒャエル・エルンスト・トラウトマン
ドイツ連邦共和国デー－２２４１９ハンブルク、エッセナー・シュトラーセ９３番、リリー・フォルシュング・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング