(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 954941 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 954941

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 14/605
A61K 38/26
C12N 15/16
C07K 14/60 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **17.10.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **17.10.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **19.04.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

18.10.1994 US 324960

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Eli Lilly and Company,** Lilly Corporate Center, INDIANAPOLIS, IN 46285, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Chen, Victor John,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**DiMarchi, Richard Dennis,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Kriauciunas, Aidas Vladas,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •**Smiley, David Lee,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •**Stycky, Russell Dean,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Glukagonintapaisia insuliinitrooppisia peptidianalogeja, koostumuksia ja käyttömenetelmiä

Glukagonliknande insulinotropiska peptidanaloger, kompositioner och användningsmetoder

Glukagonintapaisia insuliinitrooppisia peptidianalogeja, koostumuksia ja käyttömenetelmiä

Esillä oleva keksintö koskee orgaanista ja peptidikemiaa sovellettuna farmaseuttiseen tutkimukseen ja tuotekehitykseen. Keksintö antaa käyttöön uusia peptidijohdannaisia ja koostumuksia, jotka ovat käyttökelpoisia insuliinin ekspression säätelemisessä nisäkkäillä, ja diabetesin hoidossa.

Haiman saarekkeen umpirauhaseritystä säätelevät monimutkaiset kontrollimekanismit, joita eivät pane toimimaan ainoastaan verestä peräisin olevat metaboliitit, kuten glukoosi, aminohapot ja katekolamiinit, vaan myös paikalliset parakriiniset vaikutukset. Pääasialliset haiman saarekkeen hormonit, glukagoni, insuliini ja somatostatiini, vaikuttavat tiettyihin haiman solutyyppeihin (A-, B- ja D-solut, tässä järjestyksessä) mukauttamalla eritysvastetta. Vaikka insuliinin eritystä kontrolloivat pääasiassa veren glukoositasot, somatostatiini inhiboi glukoosivälitteistä insuliinin eritystä. Insuliinin erityksen saarekkeiden välisen parakriinisen säätelyn lisäksi, on aihetta uskoa, että suolessa on insulinotrooppisia tekijöitä. Tämä käsitys on peräisin sellaisista havainnoista, että suun kautta nautittu glukoosi stimuloi paljon voimakkaammin insuliinin eritystä kuin vastaava määrä glukoosia suonen sisäisesti annettuna.

Ihmisen glukagonihormoni on haiman A-soluissa tuotettu 29 aminohapon hormoni. Hormoni kuuluu monigeeniseen perheeseen, jossa on rakenteeltaan sukulaispeptidejä, joihin kuuluvat sekretiini, mahan inhibitorinen peptidi, vasoaktiivinen suolen peptidi ja glisentiini. Nämä peptidit säätelevät eri tavoin hiilihydraattimetaboliaa, maha-suoli-alueen liikkeitä ja eritystoimintaa. Olennaisin havaittu haiman glukagonin toimintamuoto on kuitenkin edistää maksan glykogenolyysiä ja glykoneogeneesiä, josta on seu-

rauksena veren sokeritasojen kohoaminen. Tässä suhteessa glukagonin toiminta on päinvastaista säätelyä kuin insuliinin toiminta ja saattaa edistää hyperglykemiaa, josta seuraa Diabetes mellitus (Lund, P.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 345 - 349).

Kun glukagoni sitoutuu reseptoriinsa insuliinia tuottavissa soluissa, cAMP-tuotanto nousee, mikä puolestaan stimuloi insuliinin ekspressiota (Korman, L.Y. et al., Diabetes 34 (1985) 717 - 722). Lisäksi korkeat insuliinitasot säätelevät alas glukagonisynteesiä takaisin kytkentä-inhibitiomekanismilla (Ganong, W.F., Review of Medical Physiology, Lange Publications, Los Altos, California, s. 273 (1979)). Näin insuliini- ja viime kädessä seerumin glukoositasot säätelevät tarkkaan glukagonin ekspressiota.

Preproglukagonia, glukagonin prekursorimuotoa, koodaa 360 emäsparin geeni ja se läpikäy prosessin glukagonin muodostumiseksi (Lund, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 345 - 349). Patzelt et al. (Nature 282 (1979) 260 - 266) osoitti, että proglukagonia prosessoidaan edelleen glukagoniksi ja toiseksi peptidiksi. Myöhemmät kokeet osoittivat, että proglukagoni on pilkkoutunut karboksyyli Lys-Arg- tai Arg-Arg-tähteiksi (Lund, P.K. et al., Lopez, L.C. et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 5485 - 5489 ja Bell, G.I. et al., Nature 302 (1983) 716 - 718. Bell, G.I. et al. keksivät myös, että proglukagoni sisälsi kolme erillistä ja erittäin homologista peptidialuetta, joita nimitettiin glukagoniksi, glukagonin kaltaiseksi peptidiksi 1 (GLP-1) ja glukagonin kaltaiseksi peptidiksi 2 (GLP-2). Lopez et al. osoittivat, että GLP-1 oli 37 aminohapon peptidi ja että GLP-2 oli 34 aminohapon peptidi. Analogiset tutkimukset rotan preproglukagonin rakenteesta paljastivat samanlaisen proteolyyttisen hajoamismallin Lys-Arg- tai Arg-Arg-tähteissä, jolloin muodostui glukagonia, GLP-1:ä ja GLP-2:a (Heinrich, G. et al., Endocrinol.

115 (1984) 2176 - 2181). Lopuksi ihmisen, rotan, naudan ja hamsterin GLP-1-sekvenssien on havaittu olevan identtiset (Ghiglione M. et al., Diabetologia 27 (1984) 599 - 600).

Lopez:n et al. saavuttama johtopäätös, joka koskee GLP-1:n kokoa, varmistui tutkimalla ihmisen haimasta löydetyn GLP-1:n molekyylimuotoja (Uttenthal, L.O. et al., J. Clin. Endocrinol. Metabol. 61 (1985) 472 - 479). Heidän tutkimuksensa osoittivat, että GLP-1:ä ja GLP-2:a on haimassa 37 ja 34 aminohapon peptideinä, tässä järjestyksessä.

Samankaltaisuus GLP-1:n ja glukagonin välillä oli vihjeenä alkuajan tutkijoille siitä, että GLP-1:llä saattaisi olla biologista aktiivisuutta. Vaikka jotkut tutkijat havaitsivat, että GLP-1 voisi indusoida rotan aivojen soluja syntetisoimaan cAMP:tä (Hoosein, N.M. et al., Febs. Lett. 178 (1984) 83 - 86), toiset tutkijat epäonnistuivat identifioimaan GLP-1:lle mitään fysiologista roolia (Lopez, L.C. et al., supra). Se, että GLP-1:lle ei kyetty identifioimaan mitään fysiologista roolia sai jotkut tutkijat asettamaan kyseenalaiseksi sen, oliko GLP-1 tosiasiassa hormoni ja olisiko glukagonin ja GLP-1:n välinen sukulaisuus artifaktaa.

Nyt on osoitettu, että biologisesti prosessoiduilla GLP-1:n muodoilla on insulinotrooppisia ominaisuuksia ja ne saattavat viivästyttää vatsalaukun tyhjenemistä. GLP-1-(7-34) ja GLP-1(7-35) esitetään US-patenttijulkaisussa nro 5 118 666, joka on tähän liitetty viitteenä. GLP-1(7-37) esitetään US-patenttijulkaisussa nro 5 120 712, joka on liitetty tähän viitteenä.

GLP-1:n muunnelmia ja analogeja tunnetaan alalla. Näitä variantteja ja analogeja ovat esimerkiksi GLP-1-(7-36), Gln^{9}-GLP-1(7-37), D-Gln^{9}-GLP-1(7-37), asetyyli-Lys^{9}-GLP-1(7-37), Thr^{16}-Lys^{18}-GLP-1(7-37) ja Lys^{18}-GLP-1(7-37). GLP-1:n johdannaisia ovat esimerkiksi happoadditiosuolat, karboksylaattisuolat, alemmat alkyyliesterit ja amidit

(katso esim. julkaisu WO-91/11 457). Yleensä erilaisten esitettyjen GLP-1-muotojen tiedetään stimuloivan insuliinin eritystä (insulinotrooppinen toiminta) ja cAMP:n muodostumista (katso esim. Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research 40 (1992) 333 - 343).

Mikä tärkeämpää, lukuisat tutkijat ovat osoittaneet oletetun suhteen erilaisten in vitro -laboratoriokokeiden sekä nisäkkäiden, erityisesti ihmisen insulinotrooppisten vasteiden välillä ulkopuoliseen GLP-1:n, GLP-1(7-36)-amidin ja GLP-1(7-37)-hapon antamiseen (katso esim. Nauck, M.A. et al., Diabetologia 36 (1993) 741 - 744, Gutniak, M. et al., New England J. of Medicine 326(20) (1992) 1316 - 1322, Nauck, M.A. et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 301 - 307 ja Thorens, B. et al., Diabetes 42 (1993) 1219 - 1225).

Perusviat, jotka saavat aikaan hyperglykemiaa kypsässä alkavassa diabetesissa, ovat heikentynyt endogeenisen insuliinin eritys ja lihas- ja maksakudoksen resistenssi insuliinin vaikutuksille (Galloway, J.S., Diabetes Care 13 (1990) 1209 - 1239). Jälkimmäinen vika johtaa ylimääräisen glukoosin tuotantoon maksassa. Tällöin, jos normaali yksilö vapauttaa glukoosia noin 2 mg/kg/min:n nopeudella, potilas, jolla on kypsä alkava diabetes vapauttaa glukoosia nopeudella, joka yltää 2,5 mg/kg/min:iin, mistä on seurauksena ainakin 70 gramman nettoylimäärä glukoosia 24 tunnissa.

Koska on erittäin huomattavia korrelaatioita maksan glukoosituotannon, veren glukoosin paastoarvojen ja koko metabolian kontrollin välillä, jotka on osoitettu glykohemoglobiinimittauksin, (Galloway, J.A., supra ja Galloway, J.A. et al., Clin Therap. 12 (1990) 460 - 472), on varsin ilmeistä, että veren glukoosin paastoarvon kontrolli on oleellinen, jotta saadaan koko metabolia normalisoitumaan riittävästi hyperglykeemisten komplikaatioiden estämiseksi. Koska olemassa olevat insuliinihoidot harvoin normali-

soivat maksan glukoosituotantoa tuottamatta huomattavaa hyperinsulinemiaa ja hypoglykemiaa (Galloway, J.A. ja Galloway, J.A. et al., supra), tarvitaan vaihtoehtoisia lähestymistapoja. Hoito, joka perustuu GLP-1-analogien antamiseen on eräs tällainen lähestymistapa ja esillä olevan keksinnön kohde.

Tällä hetkellä terapiassa, jossa käytetään GLP-1-tyyppisiä molekyylejä, on ollut huomattava ongelma, koska tällaisten peptidien puoliintumisaika seerumissa on melko lyhyt. Esimerkiksi GLP-1(7-37):n puoliintumisaika seerumissa on vain 3 - 5 minuuttia. Tällä hetkellä dipeptidyyli-peptidaasi IV (DPP IV) -aktiivisuuden uskotaan heti inaktivoivan GLP-1(7-37):n, nopean absorption ja poistumisen lisäksi, mikä seuraa ruuansulatuskanavan ulkopuolisen antamisen jälkeen. Niinpä on ratkaiseva tarve biologisesti aktiiviselle GLP-1(7-37)-analogeille, joilla on pidennetyt farmakodynaamiset profiilit ruuansulatuskanavan ulkopuolisen antamisen jälkeen.

Tämän mukaisesti tämän keksinnön ensisijaisena kohteena on antaa käyttöön uusia, kemiallisesti modifioituja peptidejä, jotka eivät vain stimuloi insuliinin eritystä tyypin II diabeetikoilla, vaan tuottavat myös muita hyödyllisiä insulinotrooppisia vasteita. Esillä olevan keksinnön yhdisteet pysyvät seerumissa pitempiä aikoja kuin natiivi GLP-1(7-37), joko osoittamalla resistenssiä DPP IV:lle tai absorboituen tai poistuen hitaammin kuin natiivi GLP-1(7-37) ruuansulatuskanavan ulkopuolisen antamisen jälkeen. Kaikkein yllättävintä oli se, että jotkut esillä olevan keksinnön yhdisteet osoittivat synergististä vaikutusta, kun yksilölliset GLP-1(7-37):n muutokset eivät onnistuneet yltämään sellaisten yhdisteiden biologiseen suorituskykyyn, jotka sisälsivät kaikki muutokset.

Esillä oleva keksintö antaa käyttöön yhdisteitä, joiden yleinen kaava on:

R^1-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-
Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe-Ile-
Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R^3
R^2 (kaava 1)

jossa R^1 valitaan ryhmästä, joka sisältää 4-imidatsopropionyylin (des-amino-histidyyli), 4-imidatsoasetyylin tai 4-imidatso-α,α-dimetyyli-asetyylin,

R^2 valitaan ryhmästä, joka sisältää haarautumattoman C_{6-10}-asyylin tai sitä ei ole,

R^3 valitaan ryhmästä, joka sisältää Gly-OH:n tai NH_2:n ja

Xaa on Lys tai Arg.

Esillä oleva keksintö antaa myös käyttöön farmaseuttiset koostumukset, jotka sisältävät esillä olevan keksinnön yhdisteen yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimentimen tai täyteaineen kanssa. Esillä oleva keksintö antaa edelleen käyttöön menetelmän insuliinista riippumattoman diabetes melitus:n hoitamiseksi nisäkkäällä, joka on tällaisen hoidon tarpeessa, jossa annetaan esillä olevan keksinnön yhdistettä tehokas määrä mainitulle nisäkkäälle.

Eräässä suoritusmuodossa esillä oleva keksintö antaa käyttöön luonnossa esiintyvän GLP-1(7-37):n analogeja, jotka syntyvät lisäämällä eri R-ryhmiä peptidisidoksen kautta kaavan 1 peptidiosan aminopäähän. Vaihtoehtoisesti keksinnön yhdisteitä tehdään edelleen asyloimalla Lys^{34}-tähteen epsilon-aminoryhmää tai tekemällä rajoitettuja aminohapposubstituutioita kohtaan 26 tai muuttamalla karboksyylipäätä. Siksi valmistettaessa esillä olevan keksinnön yhdisteitä looginen ensimmäinen vaihe on valmistaa kaavan 1 polypeptidirunko.

Tulisi huomata, että tämä spesifikaatio käyttää nimityskaavaa, joka on kehitetty prosessoitujen GLP-1-

muotojen ympärille. Tässä kaavassa tunnetun GLP-1(7-37)-OH:n aminopää on merkitty numerolla 7 ja karboksyylipää numerolla 37. Siksi kaavan 1 ensimmäinen Ala-tähde vastaa GLP-1(7-37)OH:n tähdettä 8. Samoin Xaa kaavassa 1 vastaa GLP-1(7-37)OH:n tähdettä 26 ja niin edelleen.

Koska tässä esitetään sekvenssi-informaatio ja kiinteäfaasiproteiinisynteesin tekniikan taso, kaavan 1 proteiiniosa voidaan valmistaa kemiallisella synteesillä. Voidaan myös käyttää rekombinantti-DNA-teknologiaa ekspressoimaan kaavan 1 proteiinirunkoa.

Polypeptidien kemiallisen kiinteäfaasisynteesin periaatteet ovat alalla hyvin tunnettuja ja ne voidaan löytää alan yleisestä kirjallisuudesta, kuten Dugas, H. ja Penney, C., Bioorganic Chemistry (1981) Springer-Verlag, New York, sivut 54 - 92, Merrifield, J.M., Chem. Soc. 85 (1962) 2149 ja Stewart ja Young, Solid Phase Peptide Synthesis, sivut 24 - 66, Freeman (San Francisco, 1969).

Esimerkiksi kaavan 1 proteiiniosa voidaan syntetisoida kiinteäfaasimenetelmällä käyttäen 430A-peptidisyntetisaattoria (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) ja PE-Applied Biosystems:n soveltamia synteesisyklejä. Boc-aminohapot ja muut reagenssit ovat kaupallisesti saatavilla PE-Applied Biosystems:stä ja muilta kemikaalien jakelijoilta. Sekventiaalista Boc-kemiaa, jossa käytetään kaksoispariprotokollaa, sovelletaan lähtö-p-metyyli-bentshydryyliamiinihartseihin C-terminaalisten karboksiamidien tuottamiseksi. C-terminaalisten happojen tuottamiseksi käytetään vastaavaa PAM-hartsia. Asn, Gln ja Arg kytketään käyttäen esikäsiteltyä hydroksibentsotriatsoliestereitä. Seuraavia sivuketjujen suojaryhmiä voidaan käyttää:

Arg, tosyyli
Asp, sykloheksyyli
Glu, sykloheksyyli

Ser, bentsyyli
Thr, bentsyyli
Tyr, 4-bromikarbobentsoksi

Boc-suojauksen poisto voidaan toteuttaa trifluorietikkahapolla metyleenikloridissa. Synteesin loppuun saattamisen jälkeen peptidien suojaus voidaan poistaa ja ne voidaan leikata hartsista vedettömällä fluorivedyllä (HF), joka sisältää 10 % meta-kresolia. Sivuketjujen suojaryhmän/suojaryhmien ja peptidin leikkaus hartsista suoritetaan -5 - 5 °C:ssa, edullisesti jäillä, 60 minuutissa. HF:n poistamisen jälkeen peptidi/hartsi pestään eetterillä, ja peptidi uutetaan jääetikalla ja kylmäkuivataan.

Suojattujen, suojaamattomien ja osittain suojattujen GLP-1-molekyylien valmistus on kuvattu alalla. Katso US-patenttijulkaisut nro 5 120 712 ja 5 118 666, tähän liitetty viitteinä, ja Orskov, C. et al., J. Biol. Chem. 264 (22) (1989) 12826 - 12829 ja julkaisu WO-91/11 457 (Buckley, D.I. et al., julkaistu elokuun 8. 1991).

Samoin molekyylibiologian tekniikan taso antaa tavalliselle alan ammattimiehelle toisen keinon, jolla kaavan 1 proteiiniosa voidaan saada. Vaikka se voidaan tuottaa kiinteäfaasipeptidisynteesillä tai rekombinanttitekniikoilla, rekombinanttitekniikat saattavat olla edullisia, koska niillä on mahdollista saada suurempia saantoja. Rekombinanttituotannon perusvaiheet ovat:

a) eristetään luonnollinen DNA-sekvenssi, joka koodaa GLP-1:tä tai rakennetaan synteettinen tai puolisynteettinen DNA:ta koodaava sekvenssi GLP-1:lle,

b) pannaan koodaava sekvenssi ekspressiovektoriin tavalla, joka on sopiva proteiinien ekspressoimiseksi joko yksin tai fuusioproteiineina,

c) transformoidaan sopiva eukaryootti- tai prokaryootti-isäntäsolu ekspressiovektorilla,

d) kasvatetaan transformoitu isäntäsolu olosuhteissa, jotka sallivat GLP-1-intermediaatin ekspression ja

e) otetaan talteen ja puhdistetaan rekombinantisti tuotettu proteiini.

Kuten edellä on sanottu, koodaavat sekvenssit voivat olla kokonaan synteettisiä tai syntyneet suuremman, natiivin glukagonia koodaavan DNA:n modifikaatioiden tuloksena. DNA-sekvenssi, joka koodaa preproglukagonia esitetään julkaisussa Lund et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 345 - 349, ja sitä voidaan käyttää lähtömateriaalina esillä olevan keksinnön yhdisteiden puolisynteettisessä tuotannossa muuttamalla natiivia sekvenssiä toivottujen tulosten saavuttamiseksi.

Synteettiset geenit, joiden in vitro - tai in vivo - transkription ja translaation seurauksena tuotetaan kaavan 1 proteiiniosaa, voidaan rakentaa alalla hyvin tunnetuilla tekniikoilla. Geneettisen koodin luonnollisen degeneraation vuoksi alan ammattimies tulee huomaamaan, että melkoinen, silti tarkalleen määrätty määrä DNA-sekvenssejä voidaan muodostaa, joista kaikki koodaavat kaavan 1 polypeptidiä.

Synteettisen geenin rakentamisen metodologia tunnetaan hyvin alalla. Katso Brown et al. (1979) Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., vol. 68 sivut 109 - 151. DNA-sekvenssejä, jotka koodaavat kaavan 1 proteiinirunkoa, voidaan kuvata tässä esitettyihin aminohapposekvensseihin perustuen. Kun sekvenssi on kerran kuvattu, se voidaan muodostaa käyttämällä perinteistä DNA-synteesilaitetta, kuten Model 380A- tai 380B-DNA-syntetisaattoreita (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404).

Kaavan 1 polypeptidin ekspression aikaansaamiseksi, pannaan valmistettu synteettinen DNA-sekvenssi mihin tahansa monista sopivista rekombinantti-DNA-ekspressiovektoreista käyttämällä sopivia restriktioendonukleaaseja. Kat-

so yleistä Maniatis et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., vol. 1 - 3. Restriktioendonukleaasien leikkauskohdat tehdään GLP-1-intermediaattia koodaavan DNA:n kumpaankin päähän helpottamaan eristystä tunnetuista amplifikaatio- ja ekspressiovektoreista ja niihin integroitumista. Tietyt käytetyt endonukleaasit määräytyvät käytettävän kantaekspressiovektorin restriktioendonukleaasileikkausmallin mukaan. Restriktioentsyymien leikkauskohdat valitaan siten, että koodaava sekvenssi orientoituu oikein kontrollisekvensseihin nähden, jotta saavutettaisiin kunnollinen kehyksen sisäinen luenta ja kiinnostuksen kohteena olevan proteiinin ekspressio. Koodaava sekvenssi tulee asettaa siten, että se on oikeassa lukukehyksessä, jossa on ekspressiovektorin promoottori ja ribosomin sitoutumiskohta, joista molemmat ovat toimintakykyisiä isäntäsolussa, jossa proteiini on määrä ekspressoida.

Synteettisen geenin tehokkaan transkription saavuttamiseksi se tulee operatiivisesti liittää promoottori-operaattori-alueeseen. Siksi synteettisen geenin promoottori-operaatori-alue asetetaan samaan sekventiaaliseen orientaatioon synteettisen geenin ATG-aloituskodonin suhteen.

Alalla tunnetaan hyvin lukuisia ekspressiovektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia prokaryootti- ja eukaryoottisolujen transformoimiseksi. Katso The Promega Biological Research Products Catalogue (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399) ja The Stratagene Cloning Systems Catalogue (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037). Myös US-patenttijulkaisu nro 4 710 473 kuvaa rengasmaisia DNA-plasmiditransformaatiovektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia eksogeenisten geenien ekspressoimiseksi E. coli:ssa suurina määrinä. Nämä plasmidit ovat käyttökelpoisia transformaatiovektoreina rekombinantti-DNA-menetelmissä ja

(a) antavat plasmidille kyvyn itsenäisesti replikoitua isäntäsolussa,

(b) kontrolloivat itsenäistä plasmidireplikaatiota suhteessa lämpötilaan, jossa isäntäsoluviljelmiä pidetään,

(c) stabiloivat plasmidia isäntäsolupopulaatioissa,

(d) ohjaavat proteiinituotteen synteesiä, mikä on viitteenä plasmidin ylläpitämisestä isäntäsolupopulaatiossa,

(e) antavat sarjan restriktioendonukleaasien tunnistuskohtia, jotka ovat plasmidille yksilöllisiä ja

(f) päättävät mRNA-transkription.

Nämä rengasmaiset DNA-plasmidit ovat käytökelpoisia vektoreina rekombinantti-DNA-menetelmissä eksogeenisten geenien korkeiden ekspressiotasojen varmistamiseksi.

Sen jälkeen, kun on rakennettu ekspressiovektori kaavan 1 proteiinille, seuraava vaihe on panna vektori sopivaan soluun ja siten rakentaa rekombinantti isäntäsolu, joka sopii polypeptidin ekspressoimiseksi. Tekniikat solujen transformoimiseksi rekombinantti-DNA-vektoreilla ovat alalla hyvin tunnettuja ja niitä voidaan löytää sellaisista yleisistä viitteistä kuin Maniatis et al., supra. Isäntäsolut voidaan rakentaa joko eukaryootti- tai prokaryoottisoluista.

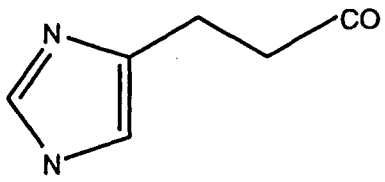
Prokaryootti-isäntäsolut tuottavat yleensä proteiinia nopeammin ja ovat helpompia viljellä. Proteiineille, joita ekspressoidaan tuottotasoltaan korkeissa bakteeriekspressiojärjestelmissä, on luonteenomaista aggregoituminen jyväsiksi tai inkluusiokappaleiksi, jotka sisältävät suuria määriä yliekspressoitua proteiinia. Tällaiset proteiiniaggregaatit täytyy tyypillisesti liuottaa, denaturoida ja laskostaa käyttäen alalla hyvin tunnettuja menetelmiä. Katso Kreuger et al. (1990), Protein Folding, Gierasch ja King, toimittajat, sivut 136 - 142, American Association for the Advancement of Science Publication nro

89 - 18S, Washington, D.C. ja US-patenttijulkaisu nro 4 923 967.

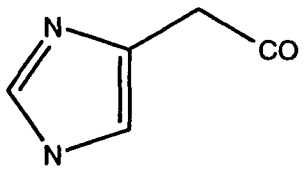
Kun on valmistettu kaavan 1 polypeptidirunko, imidatsoli, kuten on kuvattu edellä "Summary of Invention" -osassa, lisätään aminopäähän esillä olevan keksinnön eri toteutusmuotojen tuottamiseksi. Imidatsoliryhmän kytkeminen kaavan 1 polypeptidiin toteutetaan kemiallisen synteesin keinoin. Koska kaikki eri orgaaniset ryhmät, jotka otetaan mukaan tähän keksintöön, sisältävät karboksyylihapon, imidatsoliryhmä voidaan lisätä kiinteäfaasiproteiinisynteesillä, joka on analoginen aminohapon liittämiselle polypeptidin N-päähän. Vaihtoehtoisesti imidatsoliryhmän aktivoitu esteri voidaan lisätä standardeilla kemiallisilla reaktiomenetelmillä.

Esillä olevan keksinnön edullisia imidatsoliryhmiä ovat:

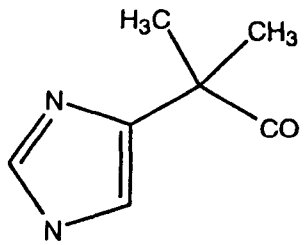
4-imidatsopropionyyli (des-aminohistidyyli)



4-imidatsoasetyyli



ja 4-imidatso-α,α-dimetyyliasetyyli



Edullisin ryhmä on 4-imidatsopropionyyli.

Esillä olevan keksinnön suoritusmuotoja tehdään edelleen asyloimalla Lys^{34}-tähteen epsilon-aminoryhmä. Suoraketjuiset asyylilisäykset, jotka sisältävät 6 - 10 hiiliatomia, ovat edullisia ja haaroittumaton C_8 on edullisin.

Muita esillä olevan keksinnön suoritusmuotoja ovat aminohapposubstituutiot kaavan 1 kohdassa 26 (Xaa). Lys ja Arg ovat hyväksyttäviä tässä kohdassa, vaikka Arg on edullinen.

Esillä olevaan keksintöön sisältyvät myös karboksyylipään modifikaatiot. Sinänsä R^3 voi olla Gly-OH tai NH_2, Gly-OH on edullinen karboksyylipään amidisuoritusmuotojen joukossa.

Asyyliryhmän additio Lys^{34}:n epsilon-aminoryhmään voidaan toteuttaa käyttämällä yhtä monista alalla tunnetuista menetelmistä. Katso Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" sivut 1, 2 - 12 (1990), Hashimoto et al., Pharmacuetical Res. "Syntesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" vol. 6, nro 2, sivut 171 - 176 (1989).

Esimerkiksi oktaanihapon N-hydroksi-sukkinimidiesteri voidaan liittää lysyyli-epsilon-amiiniin käyttäen 50-%:ista asetonitriiliä boraattipuskurissa. Peptidi voidaan asyloida joko ennen tai jälkeen imidatsoliryhmän lisäyksen. Lisäksi mikäli peptidi tehdään rekombinantisti, on asylointi mahdollista ennen entsymaattista leikkaamista.

Esillä oleva keksintö sisältää myös GLP-1(7-37)-analogien suolamuodot. Keksinnön yhdisteet voivat olla riittävän happamia tai riittävän emäksisiä reagoidakseen minkä tahansa määrän kanssa epäorgaanisia emäksiä ja epäorgaanisia ja orgaanisia happoja suolan muodostumiseksi. Hapot, joita yleensä käytetään happoadditiosuolojen muodostamiseksi, ovat epäorgaaniset hapot, kuten kloorivety-

happo, bromivetyhappo, jodivetyhappo, rikkihappo, fosforihappo ja vastaavat ja orgaaniset hapot, kuten p-tolueenisulfonihappo, metaanisulfonihappo, oksaalihappo, p-bromifenyylisulfonihappo, hiilihappo, meripihkahappo, sitruunahappo, bentsoehappo, etikkahappo ja vastaavat. Esimerkkejä tällaisista suoloista ovat sulfaatti, pyrosulfaatti, bisulfaatti, sulfiitti, bisulfiitti, fosfaatti, monovetyfosfaatti, divetyfosfaatti, metafosfaatti, pyrofosfaatti, kloridi, bromidi, jodidi, asetaatti, propionaatti, dekanoaatti, kaprylaatti, akrylaatti, formaatti, isobutyraatti, kaproaatti, heptanoaatti, propiolaatti, oksalaatti, malonaatti, sukkinaatti, suberaatti, sebakaatti, fumaraatti, maleaatti, butyyni-1,4-dioaatti, heksyyni-1,6-dioaatti, bentsoaatti, klooribentsoaatti, metyylibentsoaatti, dinitrobentsoaatti, hydroksibentsoaatti, metoksibentsoaatti, ftalaatti, sulfonaatti, ksyleenisulfonaatti, fenyyliasetaatti, fenyylipropionaatti, fenyylibutyraatti, sitraatti, laktaatti, gamma-hydroksibutyraatti, glykolaatti, tartraatti, metaanisulfonaatti, propaanisulfonaatti, naftaleeni-1-sulfonaatti, naftaleeni-2-sulfonaatti, mandelaatti, ja vastaavat. Edullisia happoadditiosuoloja ovat ne, jotka muodostuvat mineraalihappojen, kuten kloorivetyhapon, bromivetyhapon ja erityisesti kloorivetyhapon kanssa.

Emäsadditiosuoloja ovat ne, jotka ovat peräisin epäorgaanisista emäksistä, kuten ammoniumista tai alkali- tai maa-alkalimetallihydroksideistä, karbonaateista, bikarbonaateista ja vastaavista. Tällaiset emäkset, joita käytetään tämän keksinnön suolojen valmistamiseksi, sisältävät siis natriumhydroksidin, kaliumhydroksidin, ammoniumhydroksidin, kaliumkarbonaatin ja vastaavat. Erityisen edullisia ovat GLP-1(7-37)-analogien suolamuodot. Kun keksinnön yhdisteitä käytetään terapeuttisiin tarkoituksiin, nämä yhdisteet voivat myös olla suolamuodossa, mutta suolan tulee olla farmaseuttisesti hyväksyttävä.

Esillä olevan keksinnön GLP-1(7-37)-analogeilla on insulinotrooppista aktiivisuutta. Termi "insulinotrooppinen aktiivisuus" viittaa aineen kykyyn stimuloida insuliinihormonin synteesiä tai ekspressiota tai aiheuttaa sen stimulaatio.

Yhdisteen insulinotrooppinen ominaisuus voidaan määrittää antamalla tuota yhdistettä eläinsoluille tai injektoimalla tuota yhdistettä eläimiin ja monitoroimalla immunoreaktiivisen insuliinin (IRI) vapautuminen alustaan tai eläimen verenkiertojärjestelmään, tässä järjestyksessä. IRI:n läsnäolo osoitetaan radioimmunomäärityksellä, jolla voidaan spesifisesti osoittaa insuliini.

Vaikka voidaan käyttää mitä tahansa radioimmunomääritystä IRI:n läsnäolon osoittamiseksi, määrityksen modifikaatiota voidaan myös käyttää. Katso J.D.M. et al., Acta Endocrinol. 70 (1972) 487 - 509. Yhdisteen insulinotrooppinen ominaisuus voidaan myös määrittää haimainfuusiona. Katso Penhos, J.C. et al., Diabetes 18 (1969) 733 - 738.

Esillä oleva keksintö antaa myös käyttöön farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät esillä olevan keksinnön yhdisteen yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimentimen tai täyteaineen kanssa. Tällaiset farmaseuttiset koostumukset valmistetaan tavalla, joka on farmaseuttisella alalla hyvin tunnettu, ja niitä annetaan sellaisenaan tai yhdessä muiden terapeuttisten aineiden kanssa, edullisesti ruuansulatuskanavan ulkopuolista reittiä. Erityisen edullinen antotapa on antaminen ihon alle.

Ruuansulatuskanavan ulkopuoliset annokset voivat olla noin 1 pg/kg - 1 000 µg/kg ruumiin painoa, vaikka pienempiä ja suurempia annoksia voidaan antaa. Vaadittu annos riippuu potilaan tilan vakavuudesta ja sellaisista kriteereistä kuin potilaan pituus, paino, sukupuoli, ikä ja lääketieteellinen historia.

Kun tehdään esillä olevan keksinnön koostumuksia, aktiivinen ainesosa, joka sisältää ainakin yhden esillä

olevan keksinnön yhdisteen, sekoitetaan yleensä täyteaineen kanssa tai se laimennetaan täyteaineella. Kun täyteainetta käytetään laimentimena se voi olla puolikiinteä tai nestemäinen materiaali, joka toimii vehikkelinä, kantajana tai alustana aktiiviselle ainesosalle. Nestemäiset täyteaineet ovat edullisia.

Valmistettaessa formulaatiota voi olla tarpeellista jauhaa aktiivinen yhdiste sopivan hiukkaskoon saamiseksi ennen yhdistämistä muihin ainesosiin. Mikäli aktiivinen yhdiste on oleellisesti liukenematon, se jauhetaan tavallisesti noin alle 200 mesh:n hiukkaskokoon. Jos aktiivinen yhdiste on oleellisesti vesiliukoinen, hiukkaskoko säädetään yleensä jauhamalla, jotta saadaan aikaan oleellisesti tasainen jakautuminen formulaatiossa, esim. noin 40 mesh:iin.

Keksinnön koostumukset voidaan formuloida siten, että ne vapauttavat nopeasti, pitkäaikaisesti tai viivästyneesti aktiivisen ainesosan potilaalle antamisen jälkeen käyttämällä alalla hyvin tunnettuja menetelmiä. Koostumukset formuloidaan edullisesti yksikköannosmuodossa kunkin annoksen sisältäessä normaalisti noin 50 µg - 100 mg, useimmin noin 1 - 10 mg aktiivista ainesosaa. Termi "yksikköannosmuoto" viittaa fyysisesti erillisiin yksiköihin, jotka ovat sopivia jakamattomiksi annoksiksi ihmiskohteille tai muille nisäkkäille, kunkin yksikön sisältäessä ennalta määritetyn määrän aktiivista materiaalia, jonka on laskettu tuottavan halutun terapeuttisen vaikutuksen yhdessä sopivan farmaseuttisen täyteaineen kanssa.

Kun tarkoituksena on antaa koostumus ruuansulatuskanavan ulkopuolisesti, esillä olevan keksinnön yhdisteen sisältävät koostumukset yhdistetään edullisesti tislatun veden kanssa sopivassa pH:ssa. Farmaseuttisia lisämenetelmiä voidaan käyttää vaikutuksen keston kontrolloimiseksi. Kontrolloidusti vapauttavia preparaatteja voidaan saada käyttämällä polymeerejä esillä olevan keksinnön yhdisteen

tekemiseksi kompleksiksi tai absorboimiseksi. Kontrolloitua vapauttamista voidaan saada aikaan valitsemalla sopivia makromolekyylejä (esimerkiksi polyestereitä, polyaminohappoja, polyvinyylipyrrolidonia, etyleenivinyyliasetaattia, metyyliselluloosaa, karboksimetyyliselluloosaa ja protamiinisulfaattia) ja makromolekyylien pitoisuus sekä inkorporaatiomenetelmät vapautumisen kontrolloimiseksi.

Toinen mahdollinen menetelmä, jolla kontrolloidaan vaikutuksen kestoa kontrolloidusti vapauttavilla preparaateilla, on inkorporoida esillä olevan keksinnön yhdiste polymeerisen materiaalin hiukkasiin kuten polyestereihin, polyaminohappoihin, hydrogeeleihin, poly- (maitohappo) tai etyleenivinyyliasetaattikopolymeereihin.

Vaihtoehtoisesti, sen sijaan, että inkorporoidaan yhdiste näihin polymeerisiin hiukkasiin, on mahdollista panna esillä olevan keksinnön yhdiste mikrokapseleihin, jotka on valmistettu esimerkiksi koaservaatiotekniikoilla tai jakopinnan polymerisaatiolla, esimerkiksi hydroksimetyyliselluloosa- tai gelatiinimikrokapseleihin, tässä järjestyksessä, tai kolloidilääkkeenvapauttamisjärjestelmiin, esimerkiksi liposomeihin, albumiiniin, mikropallosiin, mikroemulsioihin, nanohiukkasiin ja nanokapseleihin tai makroemulsioihin. Tällaiset asiat esitetään Remington's Pharmaceutical Sciences:ssa (1980).

Esillä olevan keksinnön yhdisteillä on insulinotrooppista aktiivisuutta. Näin esillä olevan keksinnön toinen näkökohta antaa käyttöön menetelmän insuliinin ekspression edistämiseksi, joka sisältää sen, että annetaan nisäkkään haiman B-tyypin saarekesolulle tehokas määrä esillä olevan keksinnön yhdistettä.

Samoin esillä oleva keksintö antaa käyttöön menetelmän diabetes mellitus:n hoitamiseksi nisäkkäällä, edullisesti ihmisellä, joka on tällaisen hoidon tarpeessa, jossa annetaan tehokas määrä esillä olevan keksinnön yhdistettä tai koostumusta tällaiselle nisäkkäälle.

Asioiden valaisemiseksi annetaan seuraavat esimerkit avuksi kuvaamaan miten tehdä ja harjoittaa eri keksinnön suoritusmuotoja. Näitä esimerkkejä ei ole millään muotoa tarkoitettu rajoittamaan keksinnön piiriä.

Esimerkki 1

(Arg26)GLP-1(8-37)OH:n synteesi

Kaavan 1 polypeptidiosa, jossa Xaa on Arg ja R^3 on Gly-OH, valmistettiin kiinteäfaasisynteesillä Model 430A -peptidisyntetisaattorilla (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) käyttäen Boc-suojausstrategiaa. Sivuketjua suojaavat ryhmät olivat: Asp (Chxl), Glu (OBzl), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Lys (Cl-Z), His (BOM), Trp (CHO), Tyr (Br-Z) ja Arg (Tos). Kaikki paitsi Asp (Chxl) (Peptides International) saatiin PE-Applied Biosystems:stä. Kukin tähde kaksoiskytkettiin käyttäen joko DCC-alkavaa symmetristä anhydridiä tai HOBT-aktivaatiota. 30 tähteen intermediaatti jätettiin kiinni hartsiin.

Esimerkki 2

N-imidatsopropionyyli(Arg26)GLP-1(8-37)OH:nsynteesi

N-Cbz-imidatsol-4-yylipropaanihappo (R.G. Jones, J. Amer. Chem. Soc. 71 (1949) 383 kytkettiin esimerkissä 1 kuvattuun (8-37)peptidyylihartsiin panemalla 0,5 g (1,8 mmol) N-Cbz-imidatsol-4-yylipropaanihappoa kuhunkin kahdesta histidiinipatruunasta ja ajamalla normaali histidiinikaksoiskytkentäsykli Model 430A-peptidisyntetisaattorilla.

Valmistettua modifioitua peptidyylihartsia käsiteltiin 20 ml:lla 20-%:ista piperidiiniä DMF:ssä (dimetyyliformamidi) 4 °C:ssa 1 tunti Trp (CHO) -suojauksen poistamiseksi. Noin (2,6 g) modifioitua peptidyylihartsia pestiin useita kertoja CH_2Cl_2:lla, siirrettiin teflon-reaktioastiaan ja kuivattiin vakuumissa. 2 ml m-kresolia ja magneettisauva lisättiin astiaan, joka kiinnitettiin HF-laitteeseen (Pennisula Laboraties, Inc), jäähdytettiin

-78 °C:seen, tehtiin tyhjiöksi ja 20 - 25 ml HF:ää nesteytettiin astiaan. Reaktioseosta sekoitettiin 60 minuuttia jäähauteessa ja HF poistettiin sen jälkeen vakuumissa. Modifioitu peptiditähde (GLP-1-analogi) suspendoitiin 200 ml:aan etyylieetteriä ja se sekoitettiin nopeasti. Sen jälkeen kiinteä materiaali suodatettiin käyttäen 60 ml lasisintteriä. Sen jälkeen, kun oli pesty kiinteä aine kaksi kertaa etyylieetterillä, GLP-1-analogi liuotettiin pesemällä kiinteätä ainetta 40 ml:lla sekä 50-%:ista etikkahapon vesiliuosta että 10-%:ista etikkahapon vesiliuosta. 100 µl yhdistettyä vesisuodosta poistettiin ja siitä valmistettiin standardi-HPLC-analyysiin käyttäen seuraavia olosuhteita:

Puskurit: A) 0,1 % TFA B) 0,1 % TFA/50 % CH_3CN
Pylväs: Vydac C18 (0,46 x 15 cm)
Lämpötila: 45 °C
Virtausnopeus: 1,0 ml/min
Detektori: 214 nm
Gradientti: 0 % B 5 min, sen jälkeen 0 - 100 % B 60 minuutissa.

Jäljelle jäävä nestemäinen suodos (noin 90 ml) jaettiin kahteen osaan ja molemmat syötettiin 2,2 x 25 cm Vydac C18-pylvääseen ja niistä ajettiin preparatiivinen kromatografia (Pharmacia FPLC) huoneen lämpötilassa monitoroiden 214 nm:ssä. Fraktioita kerättiin joka viides minuutti virtausnopeudella 4 ml/min gradientista, joka alkoi 20-%:isella B:llä (A ja B olivat kuten edellä) ja päättyen 100-%:iseen B:hen 790 minuutissa huoneenlämpötilassa.

UV:tä absorboivat fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja valitut fraktiot (61 - 67) yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin niistä saatiin 114 mg otsikon yhdistettä. Samalla tavoin seuraavasta annoksesta saatiin 175 mg. GLP-1-analogi karakterisoitiin nopealla atomipommitusmenetelmällä (FAB), massaspektrianalyysillä ja aminohappoanalyysillä. Molekulaarinen ionihuippu, joka sijoittui (3369,2):een

sopi yhteen teoreettisen molekyylipainon (3368,7) + 1 kanssa. Aminohapposuhteet olivat yhtäpitävät halutun tuotteen kanssa:

Aminohappo	Teoreettinen	Havaittu
Asp	1	1,00
Thr	2	1,84
Ser	3	2,55
Glu	4	3,96
Gly	4	3,98
Ala	4	4,07
Val	2	1,95
Ile	1	0,9
Leu	2	1,94
Tyr	1	0,92
Phe	2	1,86
Lys	1	0,96
Arg	2	1,55

Esimerkki 3

N-imidatsopropionyyli(Arg26(N^{ϵ}-oktanoyyli(lysyyli-34)))GLP-1(8-37))OH:n synteesi

N-imidatsolipropyyli(Arg26)GLP-1(8-37)OHasyloitiin N-sukkinimidyylioktanoaatilla Lys^{34}:n N^{ϵ}-amiinista seuraavalla tavalla.

N-imidatsopropionyyli((Arg26)GLP-1(8-37)OH (70,5 mg, 0,021 mmol), kuten esimerkeissä 1 ja 2 on valmistettu, liuotettiin 25 ml:aan dimetyylisulfoksidia (DMSO). N-sukkinimidyylioktanoaatti (19,1 mg, 0,079 mmol) lisättiin sen jälkeen ja sekoitettiin liuokseen. 10-kertainen molaarinen ylimäärä tetrametyyliguanidiinia (26,2 ml, 0,21 mmol) lisättiin epsilon-aminoryhmän täydellisen deproteinaation varmistamiseksi. Reaktioseosta sekoitettiin vaihtelevissa lämpötiloissa ja monitoroitiin HPLC:llä. 45 minuutin kuluttua reaktio pysäytettiin 100 ml:lla 0,1 N HCl. Gelatiinihiukkaset poistettiin laskemalla liuos lasisuppilossa olevan lasivillatulpan läpi.

Otsikon tuotteen eristys lähtömateriaalista saavutettiin preparatiivisella C4-käänteisfaasi-HPLC-pylväällä käyttäen seuraavia olosuhteita:

Puskurit: A) 0,1 % TFA, 5 % asetonitriili
B) 0,1 % TFA, 95 % asetonitriili
Pylväs: Vydac C4 (2,2 x 25 cm)
Lämpötila: vaihteleva
Virtausnopeus: 2,0 ml/min
Detektori: 280 nm
Gradientti: 25 - 55 % B 300 minuutissa

Otsikon tuote eluoitui 44,6 - 46,7-%:isella asetonitriilillä määritettynä yksittäisten fraktioiden analyyttisellä HPLC:llä. Sopivat fraktiot yhdistettiin, jäädytettiin ja lyofilisoitiin. Reaktion saanto oli 22,7 mg (32 %) puhtauden ollessa noin 87 % HPLC:llä.

Lisäpuhdistusta saatiin käyttämällä toista preparatiivista HPLC-vaihetta pH:ssa 7,7 seuraavissa olosuhteissa:

Puskurit: A) 0,1 M $(NH_4)HCO_3$, 10 % asetonitriili
B) 0,1 M $(NH_4)HCO_3$, 50 % asetonitriili
Pylväs: Vydac C18 (2,2 x 25 cm)
Lämpötila: vaihteleva
Virtausnopeus: 2,0 ml/min
Detektori: 280 nm
Gradientti: 50 - 90 % B 300 minuutissa

Näyte (22,7 mg) liuotettiin 20 ml:aan puskuria A ja syötettiin pylvääseen. Komponenttien erotus saatiin käyttämällä edellistä gradienttia. Otsikon tuote eluoitui 34,8 - 35,6-%:isessa asetonitriilissä määritettynä analyyttisellä HPLC:llä. Sopivat fraktiot yhdistettiin ja kylmäkuivattiin. Recovery oli 10,46 mg (46,1 %) otsikon tuotetta HPLC-puhtauden ollessa noin 99 %. Kokonais-recovery molemmille RP-HPLC-vaiheille painon mukaan oli 14,8 %.

Esimerkki 4

N-imidatsoasetyyli(Arg26)GLP-1(8-37)OH:n synteesi

[N-(tert-butoksikarbonyyli)imidatsol-4-yyli]etikkahappo valmistettiin 4-imidatsolietikkahaposta suojaamalla

imidatsolirengas tert-butoksikarbonyylillä seuraavalla tavalla. Di-tert-butyylidikarbonaatti (1,1 ekviv./ekviv. amiinia) lisättiin vapaan amiinin, kaliumkarbonaatin (1,1 ekviv.) ja 50-%:isen nestemäisen dioksaanin seokseen, ja koko seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 4 tuntia. Muodostunut seos laimennettiin dietyylieetterillä ja kerrokset erotettiin. Vesikerros tehtiin happamaksi 1,0 N sitruunahapon vesiliuoksella ja sitä uutettiin kolme kertaa metyleenikloridilla. Uutteet kuivattiin ($MgSO_4$) ja liuotin poistettiin vakuumissa. Syntynyt öljy kiteytettiin sopivasta liuottimesta.

[N-(tert-butoksikarbonyyli)imidatsol-4-yyli]etikkahappo kytkettiin sen jälkeen esimerkissä 1 kuvattuun (8-37)peptidyylihartsiin panemalla noin 0,5 g (1,8 mmol) kumpaankin histidiinipatruunaan ja ajamalla normaali histidiinikaksoiskytkentäsykli Model 490A -peptidisyntetisaattoriin, kuten esimerkissä 2 on kuvattu.

Modifioitu peptidyylihartsi vapautettiin hartsista ja puhdistettiin oleellisesti esimerkin 2 mukaisesti. UV:tä absorboivat fraktiot analysoitiin HPLC:llä ja yhdistettiin sen jälkeen ja kylmäkuivattiin, jolloin saatiin noin 100 mg otsikon yhdistettä. Sen jälkeen näyte karakterisoitiin nopealla atomipommitusmenetelmällä (FAB) ja massaspektrianalyysillä. Havaittu molekulaarinen ionihuippu sopi yhteen teoreettisen molekyylipainon kanssa.

Esimerkki 5

N-[imidatsoli-α,α-dimetyyli-asetyyli]GLP-1(8-37)-OH:n synteesi

α,α-dimetyyli-α-[N-(tertbutoksikarbonyyli)imidatsol-4-yyli]etikkahappo valmistettiin N-trityyli-α,α-dimetyyli-4-imidatsoliasetonitriilistä [J.I. DeGraw et al., JMC 20 (1977) 1671] seuraavasti.

N-trityyli-α,α-dimetyyli-4-imidatsoliasetonitriili (3,97 g, 10,5 mmol) lisättiin 5-%:iseen pitoisuuteen HCl/metanoli-liuosta (25 ml) ja koko seosta kuumennettiin pa-

lautusjäähdyttäen kolme tuntia ennen konsentrointia vakuumissa. Jäljelle jäävä materiaali erotettiin 5 N HCl:n vesiliuoksen (25 ml) ja etyyliasetaatin (50 ml) välillä. Vesikerros erotettiin ja sitä kuumennettiin palautusjäähdyttäen 24 tuntia. Vakuumissa konsentroinnin jälkeen raaka α,α-dimetyyli-4-imidatsolietikkahappo liuotettiin veteen ja konsentroitiin jälleen. Otsikon yhdiste (1,88 g, mp, 155 °C (dec)) valmistettiin tästä raa'asta haposta yleisellä menetelmällä, joka on edellä kuvattu. α,α-dimetyyli-α-[N-(tertbutoksikarbonyyli)imidatsol-4-yyli]etikkahappo kytkettiin sen jälkeen (8-37)-peptidyylihartsiin oleellisesti edeltävien esimerkkien mukaisesti.

Esimerkki 6

N-imidatsoasetyyli-GLP-1(8-36)NH_2:n synteesi

GLP-1(8-36)NH_2 tuotettiin kiinteäfaasipeptidikemialla Applied Biosystems:n (ABI) 460A -peptidisyntetisaattorilla käyttäen MBHA-hartsia (ABI, lot # A1A023, 0,77 mmol/g). Kaikkien aminohappojen α-aminoryhmät oli suojattu tert-butyloksikarbonyyli-(t-Boc)-ryhmällä. Sellaiset, joilla oli reaktiivisia sivuketjuja, ne suojattiin seuraavasti: Arg(Tos), Lys(Cl-Z), Trp(CHO), Glu(CHex), Tyr(Br-Z), Ser(Bzl), Asp(OBzl), Thr(Bzl).

Suojatut aminohapot aktivoitiin dikloorimetaanissa (DCM) puolella ekvivalentilla disykloheksyylikarbodi-imidiä (DCC) aminohappoekvivalenttia kohti symmetrisen aminohappoanhydridin saamiseksi. Kuitenkin arginiini-, glutamiini- ja glysiinitähteet aktivoitiin muodostamalla näiden aminohappojen 1-hydroksibentsotriatsoli-(HOBt)-estereitä (1:1:1 ekvivalenttia aminohappoa, HOBt:tä ja DCC:tä dimetyyliformamidissa (DMF)).

Tähteet liitettiin peräkkäin C-terminaalista N-terminaaliin päin sarjalla kytkemis- ja suojauksenpoistosyklejä. Kytkentäsyklissä aktivoitu aminohappo kävi läpi edellä kytketyn aminohapon vapaan primäärisen amiinin nukleofiilisen substituution. Suojauksen poisto oli N-termi-

naalisen kytkentäryhmän Boc poisto vedettömällä trifluoroetikkahapolla (TFA). Tästä muodostui vapaa amiiniryhmä neutraloinnin jälkeen di-isopropyylietyyliamiinilla (DIEA).

Synteesin mittakaava oli 0,5 mmol. Funktionaalisten kohtien pitoisuus MBHA-hartsissa oli 0,77 mmol/g, käytettiin 649 mg hartsia. Kaikille aminohapoille käytettiin kaksinkertaista molaarista ylimäärää symmetristä anhydridiä. C-terminaalinen arginiini kytkettiin MBHA-hartsiin standardien menetelmien mukaan. Kaikki tähteet kaksoiskytkettiin. Se tarkoittaa, että kukin tähde kytkettiin hartsiin kahdesti. Toinen kytkentä suoritettiin ilman Boc-protektionpoistovaihetta ennen aminohapon liittämistä uudelleen. Tämä auttoi kaikkia hartsin vapaita aminoryhmiä täydelliseen reaktioon. Tryptofaani-tähde kytkettiin nelinkertaisesti.

Otsikon yhdiste valmistettiin käyttäen peptidyylihartsia ja esimerkin 4 R-ryhmää oleellisesti edeltävien esimerkkien mukaisesti. Sen jälkeen, kun R-ryhmä oli lisätty aminopäähän ja formyyliryhmät poistettu, peptidi vapautettiin hartsista hydrolyysin avulla nestemäisellä fluorivetyhapolla (HF) 0 °C:ssa yhden tunnin ajan käyttäen Teflon-reaktioastiaa. Jokaista peptidyylihartsigrammaa kohden lisättiin 1 ml m-kresolihuuhteluainetta ja käytettiin 10 ml nestemäistä HF:ää. Huuhteluaine esti sivuketjun kytkentäryhmien (vapautuneet hiilikationeina) tarttumista uudelleen peptidiin. Yhden tunnin jälkeen HF poistettiin vakuumissa jättäen jäljelle peptidin, hartsin ja m-kresolin lietteen.

Sen jälkeen peptidi saostettiin HF-reaktioastiassa jääkylmällä dietyylieetterillä. Sakka siirrettiin 150 ml:n sintterilasisuppiloon useiden eetteripesujen kanssa. Fysikaalinen peptidi/hartsi-seos pestiin useita kertoja kylmällä eetterillä HF- ja m-kresoli-jäänteiden poistamiseksi. Toisessa vaiheessa uutettiin peptidi pois hartsista

käyttämällä 10-%:ista etikkahappoa vedessä (v/v). Raaka peptidiliuos saatiin vakuumisuodattamalla puhtaaseen pyöreäpohjaiseen pulloon.

Esimerkki 7

In vitro -sitoutumismääritys reseptoriin (cAMP määritys)

a) Rotan GLP-1-reseptori, membraanin preparoiminen:

Julkaistua DNA-sekvenssiä rotan GLP-1-reseptorille (Thorens B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 8641 - 8645 ja dihydrofolaattireduktaasiresistenssimarkkerigeenille käytettiin yhdessä PCR-tekniikan kanssa ekspressiovektorin rakentamiseksi. Kiinan hamsterin munasarja-(CHO)-solulinjan DXB-11-muunnos transformoitiin vektorilla, jolloin saatiin rekombinantti CHO-solulinja, joka ekspressoi rotan GLP-1-membraanireseptoria.

Solut kasvatettiin ja harvestoitiin ja membraanipreparaatti saatiin pesemällä solut ensin PBS-puskurilla, sen jälkeen kahdesti kylmällä puskurilla (25 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 20 µg/ml leupeptiini, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotiniini, 50 µg/ml trypsiini-inhibiittori, pH 8,0) ja suspendoimalla puskuriin. Solususpensio hajotettiin lasi-Teflon-homogenisaattorissa, ja syntyvä näyte sentrifugoitiin sen jälkeen 35 300 x g 30 minuuttia 4 °C:ssa. Supernatantti poistettiin ja pelletti suspendoitiin uudelleen kylmään puskuriin ja homogenisoitiin. Näytteet säilytettiin -80 °C:ssa.

b) Syklinen AMP (cAMP) -määritys:

Membraanipreparaattinäytettä esi-inkuboitiin testiyhdisteen tai kontrolliyhdisteen kanssa puskurissa (25 mM HEPES, 0,2 % (w/v) BSA, pH 7,6) 32 °C:ssa 10 minuuttia. Reaktiopuskuri (lopullinen pitoisuus: 25 mM HEPES, 0,2 % (w/v) BSA, 2,6 mM Mg, 0,8 mM ATP, 0,1 mM GTP, 5 mM kreatiinifosfaatti, kreatiinikinaasi 50 U/ml, 0,2 mM IBMX, pH 7,6) lisättiin ja inkubointia jatkettiin vielä 30 minuuttia. Inkubaatiot pysäytettiin lisäämällä 10 mM EDTA:ta.

cAMP:n tuotto määritettiin käyttämällä fluoresenssileimaan perustuvaa immunomääritysmenetelmää. Lyhyesti sanottuna, sen jälkeen kun inkubointi oli lopetettu, lisättiin fluoresoiva leima (cAMP-b-fykoerytriinikonjugaatti), jonka jälkeen lisättiin affiniteettipuhdistettu anti-cAMP-kaniantiseerumi. 45 minuutin inkuboinnin jälkeen huoneenlämpötilassa lisättiin anti-kani-IgG:llä päällystettyjä määrityshelmiä ja inkuboitiin vielä 15 minuuttia. Sen jälkeen levyistä poistettiin ilma ja ne luettiin Pandex PFCIA -lukijalla.

Tässä määrityksessä tunnettu insulinotrooppinen aine, kuten GLP-1(7-37)OH osoitti laskevaa fluoresenssi-intensiteettiä cAMP-pitoisuuden kasvun suhteen. Fluoresenssi-intensiteettiarvot korreloitiin cAMP-tuoton nopeuteen (pmol/min/mg). Kääntäen, aineilla, joilla ei ollut insulinotrooppista vaikutusta eivät onnistuneet stimuloimaan cAMP-tuottoa ja siksi eivät osoittaneet fluoresenssi-intensiteetin laskua.

Taulukko 1

cAMP-määritys

Yhdiste	Suhteellinen prosentuaalinen vahvuus
GLP-1(7-37)OH	100,0 ± 18
Arg^{26}-GLP-1(7-37)OH	140,8 ± 28,7
N-imidatsopropionyyli-GLP-1(8-37)OH	21,9 ± 7,8
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	89,0 ± 12,6
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli-GLP-1(8-37)OH	8,8 ± 1,4 [a]
GLP-1(7-36)NH_2	88,4 ± 29,4
N-imidatsoasetyyli-GLP-1(8-36)NH_2	24,2 ± 9,8
N-imidatsoasetyyli-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	95,0 ± 14,3
α,α-imidatsoasetyyli-GLP-1(8-37)OH	108,2 ± 22,4

[a] Asyloidut yhdisteet antoivat yleensä epätodellisen matalat vahvuusarvot epäspesifisestä sitoutumisesta johtuen

Esimerkki 8

In vitro -koiramääritys

a) Hyperglykemia Clamp-tutkimukset

Kokeet tehtiin yli yön paastonneille, tajuissaan oleville, aikuisille (1 - 2 vuotiaille) uros- ja naaras-beagleille, jotka painoivat 8 - 15 kiloa. Ainakin 10 päivää ennen koetta eläimet nukutettiin isofluraanilla ja tehtiin viilto vasemman tai oikean nivuksen alueelle. Pantiin silastiset katetrit reisivaltimoon ja proksimaaliseen

peräreisilaskimoon ja ne varmistettiin 4 - 0 silkkiompeleella. Katetrien vapaat päät kuljetettiin ihonalaisesti selkään käyttäen troakaarineulaa. Katetrit täytettiin sen jälkeen glyseroli/hepariini-liuoksella (3:1, v/v, 250 KIU/ml:n lopullinen hepariinipitoisuus) ja vapaat päät solmittiin ja pantiin ihonalaiseen taskuun, jotta iho voitiin täydellisesti sulkea. Keflex®:ä annettiin sekä ennen leikkausta (20 mg/kg, I.V. ja 20 mg/kg, I.M.) että leikkauksen jälkeen (250 mg, p.o. kerran päivässä seitsemän päivän ajan) tulehdusten estämiseksi. Torbugesic:ä (1,5 mg/kg, I.M.) annettiin leikkauksen jälkeen kipujen kontrolloimiseksi.

Verta otettiin juuri ennen tutkimuspäivää eläimen kunnon määrittämiseksi. Käytettiin vain eläimiä, joiden hematokriitti oli yli 38 % ja leukosyyttimäärä alle 16 000/mm^3.

Iltapäivällä ennen koetta katetrien vapaat päät otettiin ulos ihonalaisesta taskusta pienen viilon läpi, joka tehtiin paikallispuudutuksella (2 % lidokaiini) ja koira varustettiin liekajärjestelmätakilla ja kaulusosalla.

Koeaamuna katetrien sisällöt imettiin ja katetrit huuhdeltiin fysiologisella suolaliuoksella ja letkujen jatkokset (jotka suojattiin ruostumattomalla teräslangalla) kiinnitettiin katetreihin. IV-injektiokokeiden aamuna neulan päällä oleva teflonkatetri pantiin ihon kautta pään laskimoon, kun valmistauduttiin testiaineen IV-lääkeannoksen antamista varten. Koira pantiin metaboliseen häkkiin ja katetrin jatkoletkut ja lieat kiinnitettiin kääntyvään niveljärjestelmään, jolloin koira voi liikkua vapaasti häkissä. Tällä hetkellä (-60 minuuttia) ulkopuolinen glukoosi-infuusio (50 % w/v vedessä) aloitettiin pysyvän laskimokatetrin läpi. Glukoosia annettiin laskevina määrinä ja asteittain tutkimuksen ensimmäisten kuuden minuutin aikana, jotta plasman glukoosipitoisuus nousisi nopeasti

150 mg/dl:aan. Plasman glukoosipitoisuudet määritettiin joka 2,5 - 7,5 minuutti loppututkimuksen ajan ja glukoosin infuusionopeus säädettiin siten, että plasman glukoosipitoisuus pysyi noin pitoisuudessa 150 mg/dl.

60 minuuttia glukoosi-infuusion aloituksen jälkeen (hetki 0) testiaine annettiin joko suonensisäisesti (1,0, 2,9, 5,0 tai 10,0 µg/kg, annos liuotettuna 2 ml:aan fysiologista suolaliuosta, joka sisälsi 0,3 % koiran albumiinia, w/v) aikaisemmin asetetun teflonkatetrin läpi tai ihonalaisesti (10 µg/kg, 150 µM fosfaatilla puskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa) selänpuoleiselle kaulan alueelle.

Valtimoverinäytteet (3,5 ml) otettiin hetkillä -30, -15, 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ja 120 minuuttia IV-tutkimusten aikana ja hetkillä -30, -15, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ja 120 minuuttia SC-tutkimusten aikana. Näytteet kerättiin vakuumiverenottoputkiin, jotka sisälsivät dinatrium-EDTA:ta ja pantiin välittömästi jäille. GLP-1(7-37):n proteolyyttisen hajoamisen estämiseksi plasmanäytteissä, 1,5 ml EDTA:ta sisältävää verta siirrettiin polypropyleeniputkeen, joka sisälsi 40 µl aprotiniinia (10 000 KIU/ml) ja sekoitettiin hyvin. Näytteet sentrifugoitiin ja syntyvä plasma siirrettiin polypropyleenikoeputkiin ja säilytettiin jäillä tutkimuksen ajan.

Kokeen päätteeksi eläin nukutettiin (isoflurane), katetrit pestiin tuoreella fysiologisella suolaliuoksella ja täytettiin glyseroli/hepariini-seoksella, katetrin vapaat päät solmittiin ja pantiin ihon alle, kuten aiemmin on kuvattu, ja annettiin antibiootteja (300 mg Kefex^{R}, I.M.).

Plasman glukoosipitoisuudet määritettiin tutkimuspäivänä käyttäen glukoosioksidaasimenetelmää Beckman'n glukoosianalysaattorilla. Muita määrityksiä varten näytteet säilöttiin -70 °C:seen analyysihetkeen asti. Insulii-

nipitoisuudet määritettiin käyttäen kaupallista radioimmunomäärityskittiä sian insuliini standardina. GLP-1(7-37)-tasot määritettiin käyttäen kaksoisvasta-aineimmunomääritystä.

Insuliinin muutos laskettiin erona insuliinipitoisuuden hetkellä t ja keksiarvoajan insuliinipitoisuuden välillä ennen testiaineen injektiota (perustaso). Pinta-ala insuliinin muutoskäyrän alta laskettiin puolisuunnikassääntöä käyttäen. Glukoosin infuusionopeuden muutos laskettiin erona glukoosin infuusionopeuden ajanjaksona x ja glukoosin keskiarvoinfuusionopeuden välillä 30 minuutin aikana ennen testiaineen injektiota (perustaso). Pinta-ala glukoosin infuusionopeuden muutoskäyrän alta laskettiin puolisuunnikassääntöä käyttäen. Arvot ovat luetteloituina keskiarvona ± keksiarvon standardivirheenä (SEM).

b) Euglykemia Clamp-tutkimukset

Euglykemia Clamp-tutkimukset suoritettiin samanlaisella tavalla kuin hyperglykemia SC -tutkimukset, poiketen siten, että plasman glukoosipitoisuus pidettiin normaalilla perustasolla tai lähellä sitä tutkimuksen ajan. Tämän toteuttamiseksi plasman glukoosipitoisuudet määritettiin joka 2,5 - 5 minuutti testiaineen injektion jälkeen. Kun plasman glukoosipitoisuus laski enemmän kuin 5 mg/dl esikäsittelyarvoista, aloitettiin ulkopuolinen glukoosi-infuusio (50-%:isen glukoosin vesiliuos, w/v) paikoilleen asetetun laskimon katetrin läpi, millä yritettiin ylläpitää plasman glukoosipitoisuus lähellä perustasoa. Koska laskimon letku ja sen jatke oli täytetty heparinisoidulla fysiologisella suolaliuoksella eikä glukoosilla, sen ajanhetken välillä, jolloin infuusio aloitettiin ja sen, jolloin glukoosi todella meni koiraan, oli huomattava viive. Tästä syystä glukoosipitoisuudet laskivat perustason alle lyhyeksi aikaa lääkehoidon jälkeen. Jotta saataisiin tarkempi arvio siitä glukoosin määrästä, joka todella infuusiossa siirtyi koiraan, saatiin hukkati-

lavuuden arvio (930 µl) ja glukoosin infuusionopeudet korjattiin sen mukaisesti.

Insuliinin muutos laskettiin erona insuliinipitoisuuden ajanhetkellä t ja keskiarvoajan insuliinipitoisuuden välillä ennen testiaineen injektiota (perustaso). Pinta-ala insuliinimuutoskäyrän alla laskettiin käyttäen vinosuunnikassääntöä. Arvot on luetteloitu keskiarvona ± keskiarvon standardivirheenä (SEM).

c) Oraalinen glukoosinsietokoe

Oraaliset glukoosinsietokokeet suoritettiin ryhmässä, jossa oli neljä yli yön paastonnutta uros- ja naarasbeaglea, jotka painoivat 12 - 14 kg. Eläinten valmistaminen tapahtui samalla tavoin, kun edellä on kuvattu. Sen jälkeen kun eläimet oli pantu metaboliseen häkkiin, niille sallittiin 20 minuutin lepoaika ennen kuin koe alkoi. Tämän mukautumisjakson jälkeen otettiin nollanäyte, 30 tuuman, 24 Fr:n kumiputki pantiin ruokatorven läpi eläimen vatsaan, glukoosiannos (1,5 g/kg, 50 % glukoosi w/v vedessä), jonka jälkeen seurasi 20 ml:n annos tislattua vettä injektoitiin putken läpi vatsaan ja ajanlasku aloitettiin. Kaksi minuuttia myöhemmin ihonalainen testiaineannos (3 nmol/kg tai noin 10 µg/kg, 150 µM fosfaatilla puskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa) injektoitiin kaulan selän puolelle.

Nollanäytteen lisäksi otettiin valtimoverinäytteitä (3,5 ml) 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210, 225 ja 240 minuuttia glukoosin annon jälkeen. Näytteet kerättiin vakuumiverenkeräysputkiin, jotka sisälsivät EDTA:ta ja niitä käsiteltiin, kuten yllä on kuvattu.

Kokeen päätteeksi eläin nukutettiin (isofluraani), katetrit pestiin tuoreella fysiologisella suolaliuoksella ja täytettiin glyseroli/hepariini-seoksella, katetrien vapaa pää solmittiin ja pantiin ihon alle kuten aikaisem-

min on kuvattu ja annettiin antibioottia (300 mg Keflex^R, I.M.).

Kutakin neljää koiraa tutkittiin kolme eri kertaa: kerran antamalla ihonalaisesti fosfaatilla puskuroitua fysiologista suolaliuosta, kerran GLP-1(7-37)OH:ta ja kerran N-imidatsopropionyyli(Arg26(N$^\varepsilon$-oktanoyyli(lysyyli34)))-GLP-1(8-37))OH:ta. Kokeet toistamiseen tutkituilla eläimillä suoritettiin vähintään viikon välein. Leukosyyttimäärä ja hematokriitti määritettiin päivää ennen kokeita.

Insuliiniala käyrän alla perustason yläpuolella (nollahetken insuliiniarvo) laskettiin käyttäen vinosuunnikassääntöä. Glukoosiala käyrän alla perustason yläpuolella (nollahetken glukoosiarvo) laskettiin käyttämällä vinosuunnikassääntöä. Arvot ovat luetteloituina keskiarvona ± keskiarvon standardivirheenä (SEM).

Taulukko 2

Koiran I.V. hyperglykemia Clamp-testi (150 mg/dl)

Yhdiste	Annos (µg/kg)	n	Insuliinivaikutuksen kesto (min)[a]	Maksimaalinen insuliinin muutos (ng/ml)[b]	Insuliinin muutos AUC (ng/ml•min; 0-60 min)[c]	GIR-muutos AUC (mg/kg; 0-60 min)[d]
Vehikkeli	0	7	Ei aktiivinen	0,8±0,2	7±14	238±46
GLP-1(7-36)NH_2	1,0	7	2,5	3,4±0,6	32±8	414±73
N-imidatsopropionyyli-GLP-1(8-37)OH	1,0	3	7,5	3,1±0,8	52±18	399±63
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	1,0	3	12,5	2,6±0,6	38±16	419±122
Lys^{34}-N$^\varepsilon$-oktanoyyli-GLP-1(7-37)OH	1,0	3	15	3,8±1,0	50±2	463±12
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-Lys^{34}-N$^\varepsilon$-oktanoyyli-GLP-1(8-37)OH	1,0	4	42,5	2,3±0,8	90±40	350±93
	5,0	3	72,5	3,8±0,2	132±7	568±126
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-Lys^{34}-N$^\varepsilon$-dekanoyyli GLP-1(8-37)OH	5,0	2	Ei aktiivinen	0,9±0,9	14±10	236±58

[a] **Insuliinivaikutuksen kesto:** Aika, jona insuliinin keskimääräinen muutos oli jatkuvsti ≥ 0,5 ng/ml.

[b] **Maksimaalinen insuliinimuutos:** Insuliinin maksimaalinen kasvu perustason yläpuolella havaittuna 120 minuutin koeajan aikana.

[c] **Insuliinimuutos AUC:** Pinta-ala insuliininmuutoskäyrän alapuolella, edustaa peptidin kokonaisinsulinotrooppista vaikutusta.

[d] **GIR-muutos AUC:** Pinta-ala glukoosin infuusionopeuden muutoskäyrän alapuolella, edustaa peptidin metabolista kokonaisvaikutusta.

Taulukko 3

Koiran S.C. hyperglykemia Clamp-testi (150 mg/dl)

Yhdiste	Annos (µg/kg)	n	Insuliinivaikutuksen kesto (min)[a]	Maksimaalinen insuliinin muutos (ng/ml)[b]	Insuliinin muutos AUC (ng/ml•min; 0-120 min)[c]	GIR-muutos AUC (mg/kg; 0-120 min)[d]
Vehikkeli	0	5	Ei aktiivinen	0,4±0,2	11±20	528±224
GLP-1(7-37)OH	10	5	27	1,6±0,8	64±33	696±145
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	10	4	42	3,6±1,0	97±39	811±216
Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli-GLP-1(7-37)OH	10	5	Ei aktiivinen	0,6±0,3	29±8	532±112
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli-GLP-1(8-37)OH	10	4	Ei aktiivinen	0,6±0,4	11±26	659±182
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli GLP-1(8-37)OH	10	5	>90	2,0±0,4	113±24	926±268

[a] **Insuliinivaikutuksen kesto:** Aika, jona insuliinin keskimääräinen muutos oli jatkuvsti ≥ 0,5 ng/ml.

[b] **Maksimaalinen insuliinimuutos:** Insuliinin maksimaalinen kasvu perustason yläpuolella havaittuna 120 minuutin koeajan aikana.

[c] **Insuliinimuutos AUC:** Pinta-ala insuliininmuutoskäyrän alapuolella, edustaa peptidin kokonaisinsulinotrooppista vaikutusta.

[d] **GIR-muutos AUC:** Pinta-ala glukoosin infuusionopeuden muutoskäyrän alapuolella, edustaa peptidin metabolista kokonaisvaikutusta.

Esimerkki 9

Rotan in vivo -määritykset

a) Glukoosin sietokykytestit

Kokeet tehtiin yli yön paastonneilla, tajuissaan olevilla uros Sprague Dawley (Charles River) - tai Zucker Diabetic Fatty (Genetic Models, Inc.) -rotilla, jotka painoivat noin 250 grammaa (Sprague Dawley -rotat) tai 300 grammaa (Zucker Diabetic Fatty rats). Neljästä viiteen päivään ennen tutkimusta rotat nukutettiin isofluraanilla ja polyetyleenikatetri (PE50) pantiin oikeaan kaulalaskimoon. Katetri varmistettiin haavanipistimellä, täytettiin hepariinia sisältävällä fysiologisella suolaliuoksella (2 % natriumhepariini) ja suljettiin pienellä ruostumatonta terästä olevalla tulpalla.

Kuudentoistatunnin paaston jälkeen kaksitoista etukäteen kanyloitua rottaa eroteltiin neljään ryhmään, kolme rottaa ryhmää kohden. Häntälaskimosta otettiin 0,4 ml verta, kerättiin Mikrotainer-putkeen, joka sisältää litiumhepariinia ja pantiin heti jäille (nollanäyte). Glukoosiannos (1,0 g/kg, 50 % glukoosia (w/v) vedessä) annettiin sisään asetetun kaulakanyylin läpi ja kanyyli huuhdeltiin 200 µl:lla fysiologista suolaliuosta. Kaksikymmentä sekuntia myöhemmin testiaineannos [100 µl/100 g ruumiinpainoa kohti joko vehikkeliä (fysiologista suolaliuosta, joka sisältää 0,3 % (w/v) naudan seerumin albumiinia) tai vehikkeliä, joka sisältää analogia] annettiin kaulakanyylin läpi ja kanyyli huuhdeltiin kuten edellä. Rotista otettiin verinäyte hännästä jälleen 2, 5, 10, 20 ja 30 minuutin

kuluttua glukoosiannoksen antamisen jälkeen ja näytteitä käsiteltiin kuten edellä. Kokeen päätteeksi verinäytteet sentrifugoitiin ja plasma kerättiin.

Plasman glukoosipitoisuudet määritettiin koepäivänä käyttäen kytketyn heksokinaasin menetelmää kliinis-kemiallisessa analysaattorissa. Insuliinimääritystä varten plasma laimennettiin nollakalibraattorilla ja jäädytettiin -20 °C:seen analyysihetkeen asti. Insuliinipitoisuudet määritettiin käyttäen kaupallista radioimmunomäärityskittiä rotan insuliini standardina.

Insuliinin muutos (insuliinin muutos perustason arvosta) laskettiin erona insuliinipitoisuuden ajan hetkellä t ja insuliinipitoisuuden ajanhetkellä 0 välillä. Pinta-ala insuliinin muutoskäyrän alapuolella laskettiin käyttäen vinosuunnikassääntöä. Plasman glukoosin muutos (plasman glukoosin kasvu perustason arvon yläpuolella) laskettiin erona plasman glukoosipitoisuuden ajan hetkellä t ja plasman glukoosipitoisuuden ajanhetkellä 0 välillä. Pinta-ala plasman glukoosin muutoskäyrän alapuolella laskettiin käyttäen vinosuunnikassääntöä. Arvot on lueteltu keskiarvona ± keskiarvon strandardivirheenä (SEM).

b) Hyperglykemia Clamp-tutkimukset

Kokeet tehtiin aikaisemmin katetroiduilla, normaaleilla uros Sprague Dawley -rotilla, jotka painoivat noin 350 grammaa. Ainakin viikko ennen tutkimuksia rotat leikattiin isofluraaninukutuksella. Kaksi katetria pantiin kaulalaskimoon glukoosin ja peptidin infuusiota varten ja yksi katetri kaulavaltimoon verinäytteenottoa varten. Katetrit vietiin ihon läpi päälaelta, täytettiin glyseroli/hepariini-liuoksella (3:1, v/v) ja suljettiin yhden sentimetrin ruostumatonta terästä olevalla tulpalla. Eläimet pantiin yksittäin rautalankahäkkeihin niille sallittiin vapaa pääsy standardille kuivamuonalle ja vedelle.

Katetroituja rottia pidettiin paastolla yli yön ennen tutkimuksia. Koeaamuna rotat punnittiin ja näyteput-

ket liitettiin niiden sisään asetettuihin katetreihin. Putket suljettiin kevyellä ruostumatonta terästä olevalla puristimella suojaamistarkoituksissa. Tutkimuksen aikana rottia pidettiin vapaina muovisessa kenkälaatikkohäkissä (12" x 10" x 12"), jossa oli noin tuuma alustaa. Noin 15 minuutin mukauttamisen jälkeen otettiin perusnäyte insuliini- ja glukoositasojen mittausta varten. Hetkellä -60 minuuttia rotille annettiin annos 20-%:ista dekstroosia plasman glukoosin nostamiseksi 150 mg/dl:ksi. Plasman glukoosipitoisuus pidettiin tällä tasolla tutkimuksen ajan mittaamalla plasman glukoosipitoisuus joka viides minuutti ja säätämällä kalibroitu muuttuva infuusiopumppu sen mukaisesti. Verinäytteitä otettiin hetkillä -15 ja 0 minuuttia perustason mittausta varten. Välittömästi nollahetken näytteen ottamisen jälkeen injektoitiin peptidiä (130 - 155 µM kantaliuospitoisuus, laimennettuna fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen) kaulalaskimokatetrin kautta ja se huuhdeltiin fusiologisella suolaliuoksella. Glukoosi- ja insuliinimäärityksiä varten otettiin verinäytteitä hetkillä 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ja 90 minuuttia. Kaikki verinäytteet kerättiin ruiskuihin, jotka oli päällystetty natriumheparriinilla, siirrettiin mikrosentrifuugiputkiin ja pantiin jäille. Sen jälkeen verinäytteet sentrifugoitiin mikrosentrifuugissa plasmakomponentin erottamiseksi.

Plasman glukoositasot määritettiin tutkimuspäivänä glukoosioksidaasimenetelmällä käyttämällä Beckman Glucose Analyzer 2:ta, kun taas insuliinipitoisuudet mitattiin kaupallisella kitillä (Diagnostic Products Corporation) rotan insuliini standardina.

Insuliinin muutos (Insuliinin muutos perustason arvosta) laskettiin erona insuliinipitoisuuden ajanhetkellä t ja insuliinin keskiarvopitoisuuden ennen testiaineen injektiota välillä. Pinta-ala insuliininmuutoskäyrän alla laskettiin käyttämällä vinosuunnikasmenetelmää. Glukoosin

infuusionopeuden muutos (prosentuaalinen muutos glukoosin infuusionopeudessa perustason arvosta) laskettiin glukoosin infuusionopeusarvon ajanhetkellä t ja keskimääräisen glukoosin infuusionopeuden ennen testiaineen injektiota välisenä erona, jaettuna keskimääräisellä glukoosin infuusionopeudella ennen testiaineen injektiota, kerrottuna 100:lla. Pinta-ala glukoosin infuusionopeuden muutoskäyrän alla laskettiin absoluuttisina glukoosin infuusionopeuden muutoksen arvoina (laskettuna erona glukoosin infuusionopeuden arvon ajanhetkellä t ja glukoosin infuusionopeuden ennen testiaineen injektiota välisenä erona) käyttäen vinosuunnikassääntöä. Arvot luetellaan keskiarvona ± keskiarvon standardivirheenä (SEM).

Taulukko 4

Rotan IV glukoosin sietokykykoe (1 g/kg)

Yhdiste	Annos mg/kg	n	Insuliinin muutos AUC ng/ml•min; 0-15 min[a]	Maksimaalinen insuliinin muutos (ng/ml)[b]	Insuliinin muutos hetkellä 10 min (ng/ml)[c]
Vehikkeli	0	196	33±1	2,9±0,1	2,2±0,1
GLP-1(7-36)NH_2	0,2	5	34±4	4,0±0,8	1,8±0,5
	0,3	4	50±13	6,1±0,7	2,2±1,2
	0,4	5	73±14	7,7±1,0	3,8±1,0
	0,6	6	67±11	7,7±1,2	3,4±0,9
	0,8	3	97±25	11,3±2,8	4,1±1,8
	1,0	8	89±16	11,4±2,3	3,9±0,7
	2,0	5	106±11	11,7±1,3	4,9±0,7
GLP-1(7-37)OH	0,6	3	79±8	7,8±1,1	5,4±1,2
	0,92	2	75±12	8,4±0,2	3,5±1,2
	1,2	3	77±17	8,4±1,6	4,2±1,3
N-imidatsoasetyyli-GLP-1(8-36) NH_2	0,05	3	49±6	4,9±0,9	2,5±0,2
	0,15	3	55±8	5,9±1,4	2,8±0,1
	0,3	3	98±29	10,5±2,3	5,5±1,4
	0,6	3	105±4	13,0±0,4	4,8±0,1
	0,92	3	95±11	12,0±1,2	4,0±0,5
	1,2	2	117±6	13,7±0,5	6,0±0,4
N-imidatsoasetyyli-Arg26-GLP-1(8-37)OH	1,2	2	85±13	9,8±2,5	3,6±0,5
	2,4	3	170±16	16,5±3,9	9,8±2,5
N-imidatsopropionyyli-GLP-1(8-37)OH	0,1	3	70±4	7,8±0,3	3,2±0,5
	0,2	9	92±6	10,2±0,6	5,0±0,6
	0,4	6	74±12	7,7±1,6	4,8±0,7
	0,8	6	121±16	13,3±1,8	7,5±1,1
	1,0	4	98±11	12,4±1,6	5,4±0,4
	2,0	4	127±24	16,1±3,0	5,9±1,1
N-imidatsopropionyyli-Arg26-GLP-1(8-37)OH	0,6	2	114±13	11,8±2,1	7,7±0,8
	0,92	3	85±7	9,2±1,8	5,5±0,9
	1,2	6	127±13	12,9±1,8	8,2±1,1
Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli GLP-1(7-37)OH	0,6	3	33±8	5,0±2,3	1,3±0,2
	1,2	3	136±30	13,1±2,0	10,0±2,8
N-imidatsopropionyyli-Arg26-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli-GLP-1(8-37)OH	1,2	6	100±18	8,5±1,7	8,3±1,5
	1,6	3	60±11	5,9±1,6	4,3±0,7
	2,4	3	128±22	12,9±2,5	10,1±1,6

[a] **Insuliinimuutos AUC:** Pinta-ala insuliininmuutos-käyrän alapuolella, peptidin kokonaisinsulinotrooppinen vaikutus.

[b] **Maksimaalinen insuliinimuutos:** Insuliinin maksimaalinen kasvu perustason yläpuolella (yleensä viisi minuuttia injektion jälkeen).

[c] **Insuliinin muutos 10 minuutin kohdalla:** Insuliinin muutos perustasosta mitattuna 10 minuuttia injektion jälkeen. Mitä lähempänä tämä arvo aktiivisilla analogeilla on maksimaalista insuliinin muutosta (prosentteina) sitä pitempi analogin toiminnallinen aika on.

Taulukko 5

Rotan I.V. hyperglykemia Clamp-koe (150 mg/dl)

Yhdiste	Annos (µg/kg)	n	Insuliinivaikutuksen kesto (min)[a]	Maksimaalinen insuliinin muutos (ng/ml)[b]	Insuliinimuutos AUC (ng/ml•min; 0-15 min)[c]	GIR-muutos AUC 0-30 min)[d]
Vehikkeli	0	4		0,1±0,1	0,5±1,7	39±10
GLP-1(7-37)OH	0,05	4	6	1,6±0,3	3,0±1,6	48±22
	0,1	4	6	3,6±1,2	7,3±2,8	150±25
	0,2	3	6	2,8±0,1	5,8±0,9	154±10
	0,6	4	6	4,9±1,3	14,9±2,9	151±46
	1,0	5	6	7,7±0,8	16,7±4,0	131±29
	2,0	4	6	3,6±0,9	11,5±1,0	152±36
	4,0	4	40	2,0±0,4	10,4±5,0	139±27
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	1,0	5	15	6,6±2,2	25,6±3,6	324±45
Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli GLP-1(7-37)OH	1,0	4	4	2,4±0,8	13,2±2,5	132±38
N-imidatsopropionyyli-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli GLP-1(8-37)OH	1,0	5	5	1,0±0,2	7,6±2,5	183±38
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli-GLP-1(7-37)OH	0,05	4	30	0,7±0,2	6,3±1,4	75±32
	1,0	4	20	5,2±1,8	35,5±10,9	294±25
	2,0	5	10	3,8±0,9	32,5±10,4	245±58
	4,0	5	20	4,7±0,8	35,7±4,8	274±71
Imidatsopropionyyli-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-oktanoyyli GLP-1(8-37)OH	0,05	4	8	0,5±0,2	3,3±1,4	124±34
	1,0	5	30	4,2±1,3	26,5±7,8	218±41
	2,0	4	60	5,2±2,1	45,4±15,5	351±66
	4,0	4	40	6,0±3,0	45,5±13,8	380±40
N-imidatsopropionyyli-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-dekanoyyli GLP-1(8-37)OH	1,0	4	15	0,8±0,1	4,5±2,0	83±17

[a] **Insuliinin vaikutuksen kesto:** Aika, jona insuliinin keskimääräinen muutos oli > 0 ng/ml.

[b] **Maksimaalinen insuliinimuutos:** Insuliinin maksimaalinen kasvu perustason yläpuolella 90 minuutin koeaikana.

[c] **Insuliinimuutos AUC:** Pinta-ala insuliininmuutoskäyrän alapuolella, edustaa peptidin kokonaisinsulinotrooppista vaikutusta.

[d] **GIR-muutos AUC:** Pinta-ala glukoosin infuusionopeuden muutoskäyrän alapuolella (mg/kg/min), edustaa peptidin metabolista kokonaisvaikutusta.

Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, jonka kaava on:

R^1-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys(-R^2)-Gly-Arg-R^3

(Kaava 1)

tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, t u n n e t t u siitä, että R^1 valitaan ryhmästä, joka koostuu 4 imidatsopropionyylistä, 4-imidatsoasetyylistä tai 4-imidatso-α,α-dimetyyliasetyylistä,

R^2 valitaan ryhmästä, joka koostuu haarautumattomasta C_{6-10}-asyylistä tai sitä ei ole,

R^3 valitaan ryhmästä, joka koostuu Gly-OH:sta tai NH_2:sta ja

Xaa on Lys tai Arg.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^1 on 4-imidatsoasetyyli ja R^2 on haarautumaton C_8-asyyli.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^2 puuttuu.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^1 on 4-imidatsopropionyyli, R^2 on haarautumaton C_8-asyyli ja R^3 on Gly-OH ja Xaa on Arg.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^2 puuttuu.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^1 on 4-imidatso-α,α-dimetyyliasetyyli ja R^2 on haarautumaton C_8-asyyli.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R^2 puuttuu.

8. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että siinä on aktiivisena ainesosana kaavan 1 mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisesti, yhdessä yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan kanssa.

9. Kaavan 1 mukainen yhdiste, minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisesti, t u n n e t t u siitä, että sitä käytetään diabetes:n hoitoon.

10. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisen, kaavan 1 mukaisen yhdisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että siinä:

valmistetaan sopiva kaavan 1 mukainen proteiinirunko joko synteettisesti tai rekombinanttitekniikoilla,

kytketään mainittu proteiinirunko R^1-yhdisteen karboksyylihappojohdannaiseen ja vaihtoehtoisesti

asyloidaan Lys(27):n epsilon-aminoryhmä.