

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 029

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.: ⁷

C 07 K 14/605

A 61 K 38/26

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-1748**
(22) Přihlášeno: **07.12.1999**
(30) Právo přednosti: **07.12.1998 US 1998/206601**
07.12.1998 US 1998/111255
(40) Zveřejněno: **13.02.2002**
(Věstník č. 02/2002)
(47) Uděleno: **16.07.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.09.2004**
(Věstník č. 9/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/EP1999/009660**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/034331**

(73) Majitel patentu:

**SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES SAS, Paris, FR**

(72) Původce:

Dong Zheng Xin, Framingham, MA, US

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000**

(54) Název vynálezu:

**Analog GLP-1, jeho použití a farmaceutický
prostředek jej obsahující**

(57) Anotace:

Peptidový analog glukagonu GLP-1, jeho farmakologicky
přijatelné soli, metody použití takového analogu,
farmaceutické prostředky, které tento analog obsahují pro
léčení savců, zejména léčení diabetes typu I a II.

CZ 294029 B6

Analog GLP-1, jeho použití a farmaceutický prostředek jej obsahující

Oblast techniky

Předložený vynález je zaměřen na peptidový analog GLP-1, který je podobný glukagonu, jeho farmakologicky přijatelné soli, způsoby použití takového analogu pro léčení savců a na vhodné farmaceutické prostředky, které tento analog obsahují.

Dosavadní stav techniky

Amid peptidu-1(7-36), který je podobný glukagonu (GLP-1), je syntetizován ve střevních L-buňkách pomocí tkáňově specifického posttranslačního zpracování glukagonového prekurzoru preproglukagonu (Varndell, J.M., a kol., J. Histochem Cytochem, 1985:33:1080-6) a je uvolňován do oběhu v rámci odpovědi na potravu. Koncentrace GLP-1 vzrůstá z úrovně v období hladovění, která je přibližně 15 pmol/l, na vrcholnou hladinu po jídle, která je 40 pmol/l. Bylo ukázáno, že pro daný vzrůst plazmatické koncentrace glukózy je zvýšení plazmatického inzulínu přibližně třikrát vyšší, když je glukóza podána orálně, ve srovnání s jejím podáním intravenózním (Kreymann, B. a kol., Lancet 1987:2, 1300-4). Toto zvýšení hladiny uvolňování inzulínu vlivem potravy, známé jako efekt na vnitřní sekreci, je primárně hormonální a GLP-1 je nyní považován za nejsilnější substanci, fyziologicky ovlivňující vnitřní sekreci u člověka. Vznik účinku na inzulín GLP-1 potlačuje vylučování glukagonu, zpozdňuje vyprazdňování žaludku (Wettergren A., Dig Dis Sci 1993:38:665-73) a může zvýšit množství periferní glukózy, která je k dispozici (D'Alessio, D.A. a kol., J. Clin Invest 1994:93:2293-6).

V roce 1994 bylo navrženo schéma léčebného účinku GLP-1 po pozorování, že jedna podkožní (s/c) dávka GLP-1 je schopna kompletně normalizovat hladiny glukózy po jídle u pacientů s diabetes mellitus, který není závislý na inzulínu (NIDDM) (Gutniak, M.K., a kol., Diabetes Care 1994:17:1039-44). Mělo se za to, že tento účinek je zprostředkován jak zvýšeným uvolňováním inzulínu, tak snížením vylučování glukagonu. Dále bylo ukázáno, že intravenózní infuze GLP-1 zpozdňuje vyprazdňování žaludku u pacientů s NIDDM (Williams, B., a kol., J. Clin Endo Metab 1996:81:327-32). Na rozdíl od sulfonylureáz, inzulínotropní působení GLP-1 je závislé na koncentraci glukózy v plazmě (Holz, G.G. 4. a kol., Nature 1993:361:362-5). Tedy nepřítomnost uvolňování inzulínu, zprostředkované GLP-1 při nízké koncentraci glukózy v plazmě, chrání proti prudkému nástupu hypoglykémie. Tato kombinace účinků dává GLP-1 jedinečný potenciál léčebných výhod oproti jiným činidlům, nyní běžně používaných pro léčení NIIDM.

Početné studie ukázaly, že při podání zdravým pacientům GLP-1 silně ovlivňuje úroveň glykémie a rovněž koncentrace inzulínu a glukagonu (Orskov, C, Diabetologia 35:701-711, 1992; Holst, J.J. a kol., Možnosti uplatnění GLP-1 v zvládnutí diabetu v Glukagon III, Příručka experimentální farmakologie, Lefebvre PJ, vyd. Berlín, Springer Verlag, 1996, str. 311 až 326), jejichž účinky jsou závislé na glukóze (Keymann, B., a kol., Lancet ii: 1300-1304, Wier, G.C., a kol., Diabetes 38:338-342, 1989). Dále je také účinný u pacientů s diabetem (Gutniak, M., N. Engl J Med 226:1316-1322, 1992; Nathan, D. M., a kol., Diabetes Care 15:270-276, 1992) tím, že normalizuje hladiny glukózy v krvi u pacientů s diabetem typu 2 (Nauck, M.A. a kol., Diabetologia 36:741-744, 1993) a zlepšuje kontrolu glykémie u pacientů s diabetem typu 1 (Creutzfeld, W.O., a kol., Diabetes care 19:580-586, 1996), což zvyšuje možnost jeho použití jako terapeutického činidla.

Avšak GLP-1 je metabolicky nestabilní, jeho poločas v plazmě ($t_{1/2}$) je *in vivo* pouze 1 až 2 minuty. Aplikovaný GLP-1 je také rychle degradován (Deacon, C.D., a kol., Diabetes 44:1126-1131, 1995). Tato metabolická nestabilita omezuje terapeutický potenciál přirozeného GLP-1. Existuje tedy potřeba analogů GLP-1, které jsou aktivnější a jsou metabolicky stabilnější než přirozený GLP-1.

Podstata vynálezu

5 Podstatou vynálezu je analog GLP-1 vzorce I



10 V jiném provedení poskytuje předložený vynález farmaceutický prostředek, který obsahuje účinné množství analog GLP-1 vzorce I, která je zde výše definována nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl a farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

15 V ještě jiném provedení poskytuje předložený vynález způsob vyvolání agonistického účinku u receptoru GLP-1 u pacienta, který to vyžaduje, který spočívá v tom, že uvedenému pacientu podá účinné množství analogu GLP-1 vzorce I, která je zde výše definována nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

20 V dalším provedení poskytuje předložený vynález způsob léčení nemoci vybrané ze skupiny obsahující diabetes typu I, diabetes typu II, obezitu, glukagonom, vylučovací potíže u dýchacích cest, metabolické poruchy, artritidu, osteoporózu, nemoci centrálního nervového systému, restenózu, neurodegenerativní nemoci, selhání ledvin, městnání srdeční selhání, nefrotický syndrom, cirhóza, plicní otok, vysoký tlak a poruchy s očekávaným snížením příjmu potravy, u jedinců kteří to vyžadují, který spočívá v tom, že jedinci je podáno účinné množství analogu GLP-1 vzorce I, který zde byl výše definován nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli. Výhodný způsob právě uvedené metody je takový, kdy je léčen diabetes typu I nebo diabetes typu II.

25 Peptid tohoto vynálezu je zde označován formátem $(Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH_2$ se substituovanými aminokyselinami z přirozené sekvence, umístěnými v první soustavě závorek (např. $A5c^8$ pro Ala^8 v $hGLP-1$). Zkratka GLP-1 znamená glukagonu podobný peptid-1, $hGLP-1$ znamená lidský glukagonu podobný peptid-1. Číslo umístěná v závorce označují počet aminokyselin přítomných v peptidu (např. $hGLP-1(7-36)$ znamená aminokyseliny 7 až 36 ze sekvence peptidu lidského GLP-1). Sekvence $hGLP-1(7-36)$ je uvedena v Mojssov, S., Int. J. Peptide Protein Res., 40, 1992, str. 333 až 342. Označení „ NH_2 “ v $hGLP-1(7-36)NH_2$ znamená, že C-konec peptidu je ukončen amidovou skupinou. $hGLP-1(7-36)$ znamená, že C-konec je volná aminokyselina. Zbytky na pozicích 37 a 38 v $hGLP-1(7-38)$ jsou Gly respektive Arg.

40 Plné názvy jiných zkratk, které jsou zde použity, jsou následující: Aib pro kyselinu α -aminoizomásele, Boc pro t-butyloxykarbonyl, HF pro fluorovodík, Fm pro formyl, Xan pro xanthyl, Bzl pro benzyl, Tos pro tosyl, DPN pro 2,4-dinitrofenyl, DMF pro dimethylformamid, DCM pro dichlormethan, HBTU pro hexafluorofosfát 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronia, DIEA pro diizopropylethylamin, HOAc pro kyselinu octovou, TFA pro kyselinu trifluoroctovou, 2CIZ pro 2-chlorbenzyloxykarbonyl, 2BrZ pro 2-brombenzyloxykarbonyl, OcHex pro O-cyklohexyl, Fmoc pro 9-fluorenylmethoxykarbonyl, HOBt pro N-hydroxybenzotriazol a PAM pryskyřice pro 4-hydroxymethylfenylacetamidomethyl pryskyřici.

45 Detailní popis

Peptid tohoto vynálezu může být připraven pomocí standardní syntézy peptidů na pevné fázi. Viz Steward, J. M., a kol. Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co., 2. vyd., 1984). Například alkylové skupiny, např. $(C_1-C_{30})alkyl$, mohou být připojeny pomocí redukční alkylace. Hydroxyalkylové skupiny, např. $(C_1-C_{30})hydroxalkyl$, mohou být také připojeny pomocí redukční alkylace, kde volná hydroxylová skupina je chráněna t-butylesterem. Acylové skupiny, např. COE^1 , mohou být připojeny spojením volné kyseliny, např. E^1COOH , k volné aminoskupině N-koncové aminokyseliny tak, že je smíchána kompletní pryskyřice se 3 molárními ekvivalenty jak volné kyseliny, tak diizopropylkarboxydiimidu v methylenchloridu po dobu 1 hodiny. Pokud

volná kyselina obsahuje volnou hydroxylovou skupinu, např. kyselina p-hydroxyfenylpropionová, potom by připojení mělo být provedeno s dalšími třemi molárními ekvivalenty HOBt.

Pokud R^1 je $NH-X^2-CH_2-CONH_2$ (tj. $Z^0=CONH_2$), potom syntéza peptidu začíná pomocí BocHN- X^2-CH_2-COOH , která je připojena k MBHA pryskyřici. Pokud R^1 je $NH-X_2-CH_2-COOH$ (tj. $Z^0=COOH$), potom syntéza peptidu začíná pomocí BocHN- X_2-CH_2-COOH , která je připojena k PAM pryskyřici. Pro tento určitý krok jsou používány 4 molární ekvivalenty BocHN- X_2-COOH , HBTU a HOBt a 10 molárních ekvivalentů DIEA. Doba potřebná k připojení je asi 8 hodin.

Chráněná aminokyselina, kyselina 1-(terc-butoxykarbonyl-amino)-1-cyklohexan karboxylová, byla syntetizována následujícím způsobem. 19,1 gramu (0,133 mol) kyseliny 1-amino-1-cyklohexan karboxylové (Acros Organics, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) bylo rozpuštěno ve 200 ml dioxanu a 100 ml vody. K tomu bylo přidáno 67 ml 2 N NaOH. Roztok byl ochlazen v lázni vody s ledem. K tomuto roztoku bylo přidáno 32,0 g (0,147 molu) di-terc-butyl-dikarbonátu. Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byl za sníženého tlaku odstraněn dioxan. Ke zbývajícimu vodnému roztoku bylo přidáno 200 ml octanu ethyl-natého. Směs byla ochlazená v lázni vody s ledem. pH vodné vrstvy bylo upraveno na asi 3 pomocí přidání 4 N HCl. Organická vrstva byla oddělena. Vodní vrstva byla extrahována octanem ethylnatým (1x100 ml). Dvě organické vrstvy byly spojeny a promyty vodou (2x150 ml), sušeny nad bezvodým $MgSO_4$, filtrovány a za sníženého tlaku koncentrovány do suchého stavu. Výtěžek byl rekrystalován ze směsi octan ethylnatý/hexany. Bylo získáno 9,2 g čistého produktu. Výtěžek byl 29%.

Boc-A5c-OH byla syntetizována analogickým způsobem jako Boc-A6c-OH. Ostatní chráněné Acc aminokyseliny mohou být připraveny analogickým způsobem osobou s běžnou zkušeností v oboru podle popisů, uvedených v předloženém patentu.

Při syntéze analogu GLP-1, který je předmětem tohoto vynálezu, který obsahuje Aib, jsou doby potřebné pro připojení tohoto zbytku a zbytků, které je bezprostředně následují, 2 hodiny.

Hydroxyalkylové skupiny, např. (C_1-C_{30}) hydroxyalkyl, mohou být také připojeny pomocí redukční alkylace, kde volná hydroxylová skupina je chráněna t-butylesterem. Acylové skupiny, např. COX^1 , mohou být připojeny spojením volné kyseliny, např. X^1COOH , k volné aminoskupině N-koncové aminokyseliny tak, že je smíchána komplexní pryskyřice se 3 molárními ekvivalenty jak volné kyseliny, tak diizopropylkarboxydiimidu v methylenchloridu po dobu 1 hodiny. Pokud volná kyselina obsahuje volnou hydroxylovou skupinu, např. kyselina p-hydroxyfenylpropionová, potom by připojení mělo být provedeno s dalšími třemi molárními ekvivalenty HOBt.

U sloučeniny, která je předmětem tohoto vynálezu, může být následujícím postupem testována její schopnost vázat se na GLP-1.

Buněčná kultura:

Buňky RIN 5F pocházející z krysího inzulinomu (ATCC-# CRL-2058, Americká sbírka typových kultur, Manassas, VA), exprimující GLP-1 receptor, byly kultivovány v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca (DMEM), obsahujícím 10 % fetálního telecího séra a udržovány při 37 °C ve vlhké atmosféře o složení 5 % CO_2 /95 % vzduch.

Vazba radioaktivně značeného ligandu

Membrány pro studia vazby radioaktivně značeného ligandu byly připraveny homogenizací buněk RIN ve 20 ml ledového 50 mM Tris-HCl pomocí zařízení Brinkman Polytron (Westbury, NY) (nastavení 6, 15 s). Homogenáty byly 2x promyty centrifugací (39 000 g/10 min) a konečně

sedimenty byly resuspendovány v 50 mM Tris-HCl, obsahujícím 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml bacitracinu (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a 0,1% BSA. Pro testování byly alikvoty (0,4 ml) inkubovány s 0,05 nM (¹²⁵I)GLP-1(7-36) (~2200 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) buď s, anebo bez 0,05 ml neznáčených kompletujících testovaných peptidů. Po inkubaci 100 min (25 °C) byl vázaný (¹²⁵I)GLP-1(7-36) oddělen od volného rychlou filtrací přes filtry GF/S (Brandel, Gaithersburg, MD), které byly předem nasáknuty v 0,5% polyethyleniminu. Filtry byly potom 3x promyty 5 ml alikvoty ledového 50 mM Tris-HCl a vázaná radioaktivita, zachycená na filtrech, byla změřena spektrometrií gama (Wallac LKB, Gaithersburg, MD). Specifická vazba byla definována jako celkový vázaný (¹²⁵I)GLP-1(7-36) mínus ten, který je vázaný v přítomnosti 1000 nM GLP-1(7-36) (Bachem, Torrence, CA).

Peptid, který je předmětem tohoto vynálezu, může být poskytnut ve formě farmaceuticky přijatelné soli. Příklady takových solí zahrnují mimo jiné takové, které jsou vytvořeny s organickými kyselinami (např. kyselina octová, kyselina mléčná, kyselina maleinová, kyselina citronová, kyselina jablečná, kyselina askorbová, kyselina jantarová, kyselina benzoová, kyselina methansulfonová, kyselina toluensulfonová nebo kyselina pamoová), s organickými kyselinami (např. kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina fosforečná) a s polymerními kyselinami (např. tanin, karboxymethylcelulóza, kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová nebo kopolymer kyselin polymléčná-glykolová). Typický způsob pro přípravu soli peptidu, který je předmětem tohoto vynálezu, je v oboru dobře známý a může být proveden standardními metodami výměny solí. Tedy TFA sůl peptidu, který je předmětem tohoto vynálezu (TFA sůl je výsledkem purifikace peptidu pomocí preparativní HPLC, eluování pomocí pufrů obsahujících TFA) může být převedena na sůl jinou, jako je třeba octan tím, že je peptid rozpuštěn v malém množství vodného roztoku 0,25 N kyseliny octové. Výsledný roztok je nanesen na semipreparativní HPLC sloupec (Zorbax, 300 SB, C-8). Sloupec je vymýván (1) roztokem 0,1 N octanu amonného ve vodě po dobu 0,5 hodiny, (2) roztokem 0,25 N octanu amonného ve vodě po dobu 0,5 hodiny a (3) lineárním gradientem (20% až 100% roztok B po dobu více než 30 minut) při rychlosti průtoku 4 ml/minutu (roztok A je 0,25 N kyselina octová ve vodě; roztok B je 0,25 N kyselina octová ve směsi acetonitril/voda, 80:20). Frakce obsahující peptid jsou odebírány a vysušeny do suchého stavu pomocí lyofilizace.

Jak je dobře známo odborníkům v oboru, známá a potenciální použití GLP-1 jsou různá a rozmanitá (viz Todd J.F. a kol., Clinical Science, 1998, 95, str. 325 až 329; a Todd J.F. a kol., European Journal of Clinical Investigation, 1997, 27, str. 533 až 536). Tedy podání sloučeniny, která je předmětem tohoto vynálezu za účelem vyvolání, může mít tytéž účinky a použití jako samotný GLP-1. Tato různá použití GLP-1 mohou být shrnuta následovně jako léčení: diabetu typu I, diabetu typu II, obezity, glukagonomů, vylučovacích potíží u dýchacích cest, metabolických poruch, artritidy, osteoporózy, nemoci centrálního nervového systému, restenózy, neurodegenerativních nemocí, selhání ledvin, městnavého srdečního selhání, nefrotického syndromu, cirhózy, plicního otoku, vysokého tlaku a poruch s očekávaným snížením příjmu potravy. Analog, který je předmětem tohoto vynálezu, který vyvolává agonistický efekt u jedince, může být použit pro léčení následujících poruch: hypoglykémie a syndromu špatného vstřebávání, spojeného s chirurgickým odnětím části žaludku a operacemi tenkého střeva.

Předložený vynález tedy ve svém rámci zahrnuje farmaceutický prostředek, který obsahuje jako svoji aktivní složku analog GLP-1 ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Dávka aktivní složky v prostředcích, které jsou předmětem tohoto vynálezu, může být různá; je však nezbytné, aby množství aktivní složky bylo takové, aby bylo dosaženo vhodné dávky. Vybraná dávka závisí na požadovaném léčebném účinku, na způsobu podávání a na době trvání léčby. Obecně účinná dávka pro aktivitu, které jsou předmětem tohoto vynálezu, je v rozsahu 1x10⁻⁷ až 200 mg/kg/den, výhodně 1x10⁻⁴ až 100 mg/kg/den, která může být podána jako jedna dávka nebo může být rozdělena do mnoha dávek.

5 Sloučenina, která je předmětem tohoto vynálezu, může být podávána orálně, parenterálně (např. intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní nebo podkožní injekcí, nebo pomocí implantátu), nazálně, vaginálně, rektálně, pod jazyk nebo místními způsoby podávání a mohou být připraveny s farmaceuticky přijatelnými nosiči tak, aby poskytly dávkové formy vhodné pro každý způsob

10 Pevné dávkové formy pro orální podávání zahrnuje kapsle, tablety, pilulky, prášky a granule. V takových pevných dávkových formách je aktivní složka smíšena alespoň s jedním inertním farmaceuticky přijatelným nosičem jako je sacharóza, laktóza nebo škrob. Takové dávkové formy mohou také obsahovat, jako v běžné praxi, další sloučeniny, jiné než taková inertní ředidla, např. lubrikační činidla jako je stearan hořečnatý. V případě kapslí, tablet a pilulek mohou dávkové formy také obsahovat pufrční činidla. Tablety a pilulky mohou být dále připraveny s enterickým povlakem.

15 Tekuté dávkové formy pro orální podávání zahrnují farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy, tinktury obsahující inertní ředidla, obecně v oboru používaná, jako je např. voda. Vedle takových inertních ředidel mohou také prostředky zahrnovat adjuvans, jako jsou zvlhčovací činidla, emulgační a suspenzní činidla a sladidla, činidla dodávající chuť a vůni.

20 Prostředky pro parenterální podávání, které jsou předmětem tohoto vynálezu, zahrnují sterilní vodné a nevodné roztoky, suspenze nebo emulze. Příklady nevodných rozpouštědel nebo nosičů jsou propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje, jako je olivový olej a kukuričný olej, želatina a organické estery, které je možno podávat injekčně, jako je ethylester kyseliny olejové. Takové dávkové formy mohou také obsahovat adjuvans, jako jsou konzervační, zvlhčovací, 25 emulgační a disperzní činidla. Mohou být sterilizovány například filtrací přes filtr zachycující bakterie, přidáním sterilizačního činidla do prostředků, ozářením prostředků nebo zahřátím prostředků. Mohou být také vyrobeny ve formě sterilního pevného prostředku, který může být bezprostředně před použitím rozpuštěn ve sterilní vodě nebo v nějakém jiném sterilním injekčním médiu.

30 Prostředky pro rektální nebo vaginální podávání jsou s výhodou čípky, které mohou vedle aktivní složky obsahovat excipienty, jako jsou kakaové máslo nebo vosk na čípky.

35 Prostředky pro nazální podávání nebo pro podávání pod jazyk jsou také připravovány se standardními excipienty, které jsou v oboru dobře známé.

Dále může být sloučenina, která je předmětem tohoto vynálezu, podávána pomocí prostředků pro trvalé uvolňování, jako jsou ty, které jsou popsány v následujících patentech a patentových přihláškách. Patent US 5 672 659 popisuje prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují 40 biologicky aktivní činidlo a polyester. Patent US 5 595 760 popisuje prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo v gelové formě. Patentová přihláška US 08/929 363, podaná 9. září 1997 (zveřejněná např. jako US patent 5 821 221), popisuje polymerní prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo a chitosan. Patentová přihláška US 08/740 778, podaná 1. listopadu 1996 (zveřejněná např. jako US patent 5 916 883), 45 popisuje prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo a cyklodextrin. Patentová přihláška US 09/015 394, podaná 29. ledna 1998 (zveřejněná např. jako WO 99/38 536), popisuje absorbovatelné prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo. Patentová přihláška US 09/121 653, podaná 23. července 1998 (zveřejněná např. jako WO 00/04 916), popisuje způsob přípravy mikročástic, obsahujících terapeutické 50 činidlo jako je peptid, procesem typu olej ve vodě. Patentová přihláška US 09/131 472, podaná 10. srpna 1998 (zveřejněná např. jako WO 00/09 166), popisuje komplexy obsahující terapeutické činidlo jako je peptid a fosforylovaný polymer. Patentová přihláška US 09/184 412, podaná 2. listopadu 1998 (zveřejněná např. jako WO 00/25 826), popisuje obsahující terapeutické činidlo jako je peptid a polymer obsahující nepolymerizovatelný lakton. Obsahy předchozích 55 patentů a patentových přihlášek jsou zde zahrnuty jako odkazy.

Pokud není definováno jinak, všechny zde používané technické a vědecké termíny mají tentýž význam, jak je obvykle chápán osobami s běžnou zkušeností v oboru, do něhož tento vynález spadá. Také všechny publikace, patentové přihlášky, patenty a ostatní odkazy zde zmíněné, jsou

5

Následující příklad popisuje syntetické metody pro přípravu peptidu, který je předmětem tohoto vynálezu, tyto metody jsou dobře známy odborníkům. Odborníkům v oboru jsou také známy jiné metody. Příklad je poskytnut pro účely ilustrace a není míněn tak, aby v jakémkoli směru omezoval rozsah předloženého vynálezu.

10

Boc-βAla-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH a Boc-D-Asp(OcHex) byly zakoupeny od Nova Biochem, San Diego, Kalifornie. Boc-Aun-OH byl zakoupen od Bachem, King of Prussia, PA. Boc-Ava-OH a Boc-Ado-OH byly zakoupeny od Chem-Impex, International, Wood Dale, IL. Boc-Nal-OH byl zakoupen od Synthetech, Inc. Albany, OR.

15

Příklad provedení vynálezu

20

Příklad 1: (Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH₂

25

Jmenovaný peptid byl syntetizován na syntetizátoru peptidů Applied Biosystems (Foster City, CA), model 450A, který byl modifikován tak, aby prováděl zrychlenou syntézu peptidů metodou Boc na pevné fázi. Viz Schnolzer a kol., Int. J. Peptide Protein Res., 90:180 (1992). Byla použita 4-methylbenzhydrolaminová (MBHA) pryskyřice (Peninsula, Belmont, CA) se substitucí 0,91 mmol/g. Byly použity Boc aminokyseliny (Bachem, CA, Torrance, CA; Nova Biochem, LaJolla, CA) s následujícím chráněním postranních skupin: Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, Boc-His(DNP)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Lys(2CIZ)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH a Boc-Trp(Fm)OH. Syntéza byla provedena v množství 0,20 mmol. Skupiny Boc byly odstraněny působením 100% TFA po dobu 2x1 minuta. Boc aminokyseliny (2,5 mmol) byly předem aktivovány pomocí HBTU (2,0 mmol) a DIEA (1,0 ml) v 4 ml DMF a byly spojeny bez předchozí neutralizace TFA soli komplexu peptid-pryskyřice. Doby připojení byly 5 minut s výjimkou zbytků Boc-Aib-OH a následujících zbytků, Boc-Lys(2CIZ)-OH a Boc-His(DNP)-OH, kde doby připojení byly 2 hodiny.

35

Po sestavení peptidového řetězce bylo na pryskyřici působeno roztokem 20% merkapt ethanolu/10% DIEA v DMF po dobu 2x30 minut, aby došlo k odstranění skupiny DNP na postranním řetězci His. N-koncová skupina Boc byla potom odstraněna působením 100% TFA po dobu 2x1 minuta. Po neutralizaci komplexu peptid-pryskyřice pomocí 10% DIEA v DMF (1x1 min) byla formylová skupina na postranním řetězci Trp odstraněna působením roztoku 15% ethanolamin/15 % voda/70% DMF po dobu 2x30 minut. Komplex peptid-pryskyřice byl promyt s DMF a DCM a sušen za sníženého tlaku. Závěrečné odštěpení bylo provedeno mícháním komplexu peptid-pryskyřice v 10 ml HF obsahující 1 ml anizolu a dithiothreitol (24 mg) při 0 °C po dobu 75 minut. HF byla odstraněna probubláváním dusíkem. Zbytek byl promyt éterem (6x10 ml) a extrahován 4N HOAc (6x10 ml).

45

Peptidová směs ve vodném extraktu byla purifikována pomocí preparativní vysokotlaké kapalně chromatografie reverzní fáze (HPLC) za použití sloupce VYDAC[®] C₁₈ pro reverzní fázi (Nest Group, Southborough, MA). Sloupec byl promýván lineárním gradientem (20 až 50 % roztoku B po dobu 105 minut) průtokovou rychlostí 10 ml/min (roztok A = voda obsahující 0,1% TFA; roztok B = acetonitril obsahující 0,1% FTA). Byly odebírány frakce a kontrolovány na analytické HPLC. Ty frakce, které obsahovaly čistý produkt byly spojeny a vysušeny pomocí lyofilizace.

55

bylo získání 135 mg bílé pevné látky. Na základě analytické HPLC byla stanovena 98,6% čistota. Analýzou pomocí hmotového spektrometru (MS(ES))₂ byla stanovena molekulová hmotnost 3339,7 (v soulase s vypočtenou molekulovou hmotností 3339,7).

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Analog GLP-1, který je (Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH₂, nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.
2. Analog GLP-1 podle nároku 1 k vyvolání agonistického účinku receptoru GLP-1.
- 15 3. Analog GLP-1 podle nároku 1 pro použití jako léčivo pro léčení nemoci vybrané ze skupiny zahrnující diabetes typu I, diabetes typu II, obezitu, glukagonom, vylučovací potíže u dýchacích cest, metabolické potíže, artritidu, osteoporózu, nemoci centrálního nervového systému, restenózu a neurodegenerativní nemoci.
- 20 4. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje analog GLP-1 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl podle nároku 1 a dále farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředící látku.

25

Konec dokumentu
