



HU000229208B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 208**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 01212**(22) A bejelentés napja: **2001. 06. 01.**(40) A közzététel napja: **2003. 08. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 09. 30.**(51) Int. Cl.: **C07K 146/05** (2006.01)**A61K 38/26** (2006.01)**A61P 3/10** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 01/16474

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0198331

(30) Elsőbbségi adatok:

60/212,171**2000. 06. 16.****US****60/240,349****2000. 10. 13.****US**

(72) Feltaláló(k):

Glaesner, Wolfgang, Indianapolis, Indiana (US)**jr. Millican, Rohn Lee, Indianapolis, Indiana (US)**

(73) Jogosult(ak):

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(74) Képviselő:

ifj. Szentpéteri Ádám, S.B.G. & K. Szabadalmi**Ügyvivői Iroda, Budapest**

(54)

Glukagonszerű peptid-1 analógok

(57) Kivonat

A találmány tárgya glukagonszerű peptid-1 analógok biztosítása gyógyszerek előállításához, melyek elhízás, sztrók, miokardiális infarktus, műtét utáni katabolikus változások vagy irritábilis bélszindróma esetében alkalmazhatók.

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT

NYOMDAPÉLDÁNY

Glukagonszerű peptid-1 analógok

A glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) 37 aminosavból álló peptid, amit a táplálék elfogyasztásának hatására az intesztinális L-sejtek szekretálnak. Azt találták, hogy az inzulin szekréciót stimulálják (inzulinotróp hatás), ezzel így a sejtek glükóz felvételét okozzák, és a szérum glükóz szintjét csökkentik [Mojsos: Int. J. Peptide Protein Research, 90, 333-343 (1992)]. Bár, a GLP-1(1-37) csak kissé aktív, ezért a figyelem a csonkított analógokra irányult, melyeket GLP vegyületeknek neveznek, és melyek biológiai tulajdonságai jobbak mint a GLP-1-nek. Ezek példái a GLP-1(1-37), a GLP-1(1-36)NH₂, a Gly⁸-GLP-1(7-37)OH és a Ser³⁴-GLP-1(7-37)OH. Mivel az inzulin szekréció stimulálására képesek, ezért a GLP vegyületek a diabetes, elhízás és ezzel kapcsolatos állapotok kezelésére igen ígéretesek.

A GLP-1 vegyületek legalább két különböző formában léteznek. Az első forma a fiziológiásan aktív és fiziológiás pH-n (7,4) vizes oldatban könnyen oldódik. Ezzel szemben a második forma vagy kis inzulinotróp aktivitással rendelkezik, vagy semennyivel, és alapjában véve vízben pH = 7,4-en nem oldódik. Sajnos az



inaktív forma akkor jön létre gyorsan, amikor a vizes GLP-1 oldatot keverjük, hidrofób felszínnek tesszük ki, vagy ha nagy levegő/víz határfelülettel rendelkezik. Ez az aktív GLP-1 vegyületek kereskedelmi mennyiségének előállítását figyelemre méltó módon megnehezíti, mivel a keverési műveletek vagy a pumpákon történő folyamatos átáramlás az ipari mennyiségek általános műveletei, és e műveletek felkavarodást, levegő/víz határfelületeket és/vagy a hidrofób felszínekkel történő kapcsolatot okoznak, melyek oldhatatlan formát eredményeznek. Az inaktív forma átalakítása a tárolás vagy a betegbe való beadás után is bekövetkezhet, tovább nehezítve az ilyen vegyületek gyógyszerként történő alkalmazását. Ezért igény mutatkozik biológiailag aktív GLP-1 analógokra, melyek átalakulási hajlama oldhatatlan formává kisebb mértékű mint a jelenleg rendelkezésre álló GLP-1 vegyületek esetében.

Azt találtuk, hogy számos GLP-1 analóg egy vagy több következő helyzetekben elvégezett módosítással: 11., 12., 16., 22., 23., 24., 26., 27., 30., 33., 34., 35., 36. vagy 37., a GLP-1(7-37)OH-hoz képest aggregálódásra kevésbé hajlamos.

Számos ilyen analóg megtartja a GLP-1 receptor aktiválási képességét, ami összevethető és néhány esetben nagyobb mint az ismert GLP-1 vegyületeknél, mint például a GLP-1(7-37)OH és a Val⁸-GLP-1(7-37)OH vegyületeknél. Például a Val⁸-Glu²²-GLP(7-37)OH aggregálódása húszszor nagyobb és GLP-1 receptor aktiváló hatása 25 %-kal nagyobb mint a GLP-1(7-37)OH esetében. E



megfigyelések alapján új GLP-1 vegyületeket és kezelési eljárásokat tettünk közzé felhasználva az új GLP-1 vegyületeket.

A jelen találmány egyik megvalósítási formájában a polipeptid szekvenciája (I) a következő: (a szekvencia száma: 1).

His-Xaa₈-Glu-Gly-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-R

I. képlet (a szekvencia száma: 1)

ahol:

Xaa₈ jelentése: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;

Xaa₁₁ jelentése: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys vagy His;

Xaa₁₂ jelentése: His, Trp, Phe, vagy Tyr;

Xaa₁₆ jelentése: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr, Glu, vagy Ala;

Xaa₂₂ jelentése: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys vagy ciszteinsav;

Xaa₂₃ jelentése: His, Asp, Lys, Glu, Gln vagy Arg;

Xaa₂₄ jelentése: Glu, Arg, Ala vagy Lys;

Xaa₂₆ jelentése: Trp, Tyr, Phe, Asp, His, Glu vagy His;

Xaa₂₇ jelentése: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg vagy Lys;

Xaa₃₀ jelentése: Ala, Glu, Asp, Ser vagy His;

Xaa₃₃ jelentése: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly vagy Glu;

Xaa₃₄ jelentése: Glu, Lys vagy Asp;

Xaa₃₅ jelentése: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His vagy Glu;



Xaa₃₆ jelentése: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu vagy His;

R jelentése: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro vagy Gly-Pro-NH₂, vagy hiányzik;

azzal a feltétellel, hogy a polipeptid nem a GLP-1(7-37)OH vagy a GLP-1(7-36)-NH₂, és azzal a feltétellel, hogy GLP-1 vegyület nem a Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, vagy Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹¹-GLP-1(7-37)OH, Ala¹¹-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-GLP-1(7-37)OH, Ala¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Ala²⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Glu²⁷-GLP-1(7-37)OH, Glu²⁷-GLP-1(7-36)NH₂, Ala³³-GLP-1(7-37)OH, vagy Ala³³-GLP-1(7-36)NH₂.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában a polipeptid aminosav szekvenciája (II) a következő (a szekvencia száma: 2):

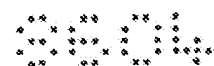
His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa₃₅-Arg-R,

ahol:

Xaa₈ jelentése: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;

Xaa₁₂ jelentése: His, Trp, Phe vagy Tyr;

Xaa₁₆ jelentése: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu vagy Ala;



Xaa₂₂ jelentése: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys vagy ciszteinsav;

Xaa₂₃ jelentése: His, Asp, Lys, Glu vagy Gln;

Xaa₂₆ jelentése: Asp, Lys, Glu vagy His;

Xaa₃₀ jelentése: Ala, Glu, Asp, Ser vagy His;

Xaa₃₅ jelentése: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His vagy Glu;

R jelentése: Lys, Arg; Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro vagy Gly-Pro-NH₂, vagy hiányzik;

azzal a feltétellel, hogy a GLP-1 vegyület szekvenciája nem egyezik a GLP-1(7-37)OH-val vagy a GLP-1(7-36)-NH₂-vel, és azzal a feltétellel, hogy GLP-1 vegyület nem a Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂ vagy Ala¹⁶-Glp-1(7-36)OH és Ala¹⁶-Glp-1(7-36)NH₂.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában a polipeptid aminosav szekvenciája (III) a következő (a szekvencia száma: 3):

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-
Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Lys-Xaa₂₇-Phe-Ile-
Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R,

ahol:

Xaa₈ jelentése: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;

Xaa₂₂ jelentése: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys vagy ciszteinsav;

Xaa₂₃ jelentése: His, Asp, Lys, Glu vagy Gln;

Xaa₂₇ jelentése: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg vagy Lys

Xaa₃₀ jelentése: Ala, Glu, Asp, Ser vagy His;

R jelentése: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro vagy Gly-Pro-NH₂, vagy hiányzik;

azzal a feltétellel, hogy a GLP-1 vegyület szekvenciája nem egyezik a GLP-1(7-37)OH-val vagy a GLP-1(7-36)-NH₂-vel, és azzal a feltétellel, hogy GLP-1 vegyület nem a Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-Glp-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-Glp-1(7-36)NH₂, Glu²⁷-Glp-1(7-37)OH vagy Glu²⁷-Glp-1(7-36)NH₂.

A jelen találmány egy másik megvalósítási formájában a polipeptid aminosav szekvenciája (IV) a következő (a szekvencia száma: 4):

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R,
ahol

Xaa₇ jelentése: L-hisztidin, D-hisztidin, dezamino-hisztidin, 2-amino-hisztidin, β-hidroxi-hisztidin, homohisztidin, α-fluorometil-hisztidin vagy α-metil-hisztidin;

Xaa₈ jelentése: glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, szerin vagy treonin. Előnyösen Xaa₈ jelentése glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin vagy treonin;

Xaa₂₂ jelentése: aszparaginsav, glutaminsav, glutamin, aszparagin, lizin, arginin, cisztein vagy ciszteinsav;

R jelentése -NH₂ vagy Gly(OH).

A jelen találmány egy másik megvalósítási formája glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) vegyület, melynek 8. helyzetében alanin helyett más aminosav szerepel, és a 22. helyzetben glicin helyett más aminosav található.

A jelen találmány egy további megvalósítási formája a GLP-1 receptor stimulálási eljárása, melyet a GLP-1 receptor stimulálására igényt mutató szubjektum esetében alkalmazunk. Az eljárás az itt leírt GLP-1, vagy a 1., 2., 3. vagy 4. szekvenciával rendelkező polipeptid hatékony mennyiségének szubjektumba történő beadását foglalja magában.

A jelen találmány még egy további megvalósítási formája az, hogy az itt leírt GLP-1 vegyületeket vagy az 1., 2., 3. vagy 4. aminosav szekvenciával rendelkező polipeptideket a GLP-1 receptor stimulálására igényt mutató szubjektumba beadjuk.

A jelen találmány GLP-1 vegyületei a GLP-1 receptor aktiválási képességet megtartják, továbbá más GLP-1 vegyületekhez képest aggregálódási hajlamuk kisebb. Ennek eredményeként a vegyületek oldatban minimális átalakítással oldhatatlan, inaktív formájúvá alakíthatók. Ez az előny a gyártási folyamatot nagymértékben egyszerűsíti. Továbbá, ahogy az elvárható, *in vivo* vagy



kismértékű aggregáció történhet, vagy semmilyen, miután a betegbe beadták, ezzel az aktivitás növelhető és a káros reakciók pedig minimalizálhatók. Ráadásul, ezek a GLP-1 vegyületek a diaminopeptidáz IV lebontásával szemben ellenállóak és cinket kötnek, és ezért úgy gondoljuk, hogy *in vivo* hatásuk megnyúlik.

Az 1. ábra a Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 5), a Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 6), a Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 7) és a Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 8) aminosav szekvenciáit mutatja be.

A 2. ábra a Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 9), a Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 10), a Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 11) és a Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 12) aminosavak szekvenciáit mutatja be.

A 3. ábra a Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 13), Glye-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 14), a Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 15) és a Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 16) aminosav szekvenciáit mutatja be.

A 4. ábra a Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 17) és a Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 18) aminosav szekvenciáit mutatja be.

A GLP-1 vegyület polipeptid, mely huszonöt-harminckilenc természetben előforduló vagy nem természetes aminosavból áll, és a GLP-1(7-37)OH-val megfelelő homológiát mutat, miközben



inzulinotróp aktivitású. A természetben nem előforduló aminosavak példái a következők: α -metil-aminosavak (például α -metil-alanin), D-aminosavak, hisztidin-szerű aminosavak (például 2-amino-hisztidin, β -hidroxi-hisztidin, homohisztidin, α -fluorometil-hisztidin és α -metil-hisztidin), aminosavak, melyek oldalláncaikban extra metilént tartalmaznak ("homo" aminosavak) és oldalláncukban a karbonsav funkcionális csoportokat szulfonsav csoportokra cserélték ki (például ciszteinsav). Előnyösen, ha azt másképp nem jeleztük, a jelen találmány GLP-1 vegyületei nem csak természetben előforduló aminosavakat tartalmaznak.

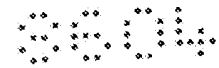
A GLP-1 vegyület tipikusan a GLP-1(7-37)OH aminosav szekvenciájával rendelkező polipeptid, GLP-1(7-37)OH analógja, GLP-1(7-37)OH fragmense, a GLP-1(7-37)OH analóg fragmense. A GLP-1(7-37)OH aminosav szekvenciája a következő:

⁷His-Ala-Glu-¹⁰Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-¹⁵Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-²⁰Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-²⁵Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-³⁰Ala-Trp-Leu-Val-Lys-³⁵Gly-Arg-³⁷Gly

(a szekvencia száma: 19).

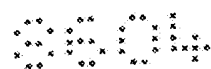
A szakirodalom alapján a GLP-1(7-37)OH aminoterminálisát 7-tel, míg karboxi-terminálisát 37-tel jelöljük. A polipeptid többi aminosavait egymás után számozzuk, ahogy azt a 19. szekvenciánál bemutattuk. Például a 12. helyzetben fenilalanin és a 22. helyzetben glicin található. Ha nem jelöljük, akkor a C-terminális a hagyományos karboxil forma.

A "GLP-1 fragmens" egy olyan polipeptid, melyet a GLP-1(7-37)OH vagy a GLP-1(7-37)OH analóg N-terminális és/vagy C-ter-



minális csonkítása után nyerünk. A nómenklatúrát a GLP-1 fragmenseken keresztül a GLP-1(7-37)OH leírására alkalmazzuk. Például a GLP-1(9-36)OH azt jelenti, hogy a GLP-1 fragmenst az N-terminálisról két aminosav és a C-terminálisról egy aminosav csonkítással nyerhetjük. A fragmensekben az aminosavak száma megegyezik a GLP-1(7-37)OH-ban lévő aminosavak számával. Például a GLP-1(9-36)OH-ban az N-terminális glutaminsav a 9. helyzetben található, a 12. helyzetben fenilalanin és a 22. helyzetben pedig glicin fordul elő, ahogy a GLP-1(7-37)OH-ban.

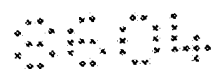
A "GLP-1 vegyület" szakkifejezés azokat a polipeptideket is felöleli, melyeknél a GLP-1(7-37)OH-nak vagy fragmensének N-végére és/vagy C-terminálisára egy vagy több aminosavat adtunk. Az ilyen típusú GLP-1 vegyületek körülbelül harminckilenc aminosavat tartalmaznak. A "kiterjesztett" GLP-1 vegyületekben az aminosavakat azonos számmal jelöltük, mint a GLP-1(7-37)OH-ban. Például a GLP-1 vegyület N-terminális aminosavait úgy kapjuk meg, hogy GLP-1(7-37)OH N-terminálisának 5. helyzetéhez két aminosavat adunk; és az GLP-1 vegyület C-terminális aminosavait úgy kapjuk meg, hogy GLP-1(7-37)OH C-terminálisának 38. helyzetéhez egy aminosavat adunk. Így a 12. helyzetben fenilalanin és a 22. helyzetben glicin található mindkét "kiterjesztett" GLP-1 vegyületben, ahogy a GLP-1(7-37)OH-ban. A kiterjesztett GLP-1 vegyület 1-6. aminosavai előnyösen a GLP-1(1-37)OH megfelelő aminosavaival megegyeznek vagy konzervatív helyettesítésűek. A kiterjesztett GLP-1 vegyület 38-45. aminosavai előnyösen a glukagon vagy az



exendin-9 megfelelő helyzeteiben lévő aminosavaival egyeznek meg vagy konzervatív helyettesítésűek.

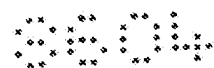
A "GLP-1 analóg" a GLP-1(7-37)OH-val vagy a GLP-1(7-37)OH fragmensével kielégítő mértékben homológ, miközben inzolinotróp aktivitású. Előnyösen a GLP-1 analóg GLP-1(7-37)OH vagy annak fragmensének aminosav szekvenciájával rendelkezik, melyet úgy módosítottak, hogy egy, két, három, négy vagy öt aminosav esetében a GLP-1(7-37)OH vagy GLP-1(7-37)OH fragmens megfelelő helyzetében eltérést mutasson. Az itt alkalmazott nomenklatúra alapján a GLP-1 vegyületek megadásához a kiindulási struktúra jelzett helyzeteiben aminosav helyettesítéseket végeztünk. Például a Glu²²-GLP-1(7-37)OH azt jelenti, hogy a normálisan a GLP-1(7-37)OH 22. helyzetében lévő glicint glutaminsavra cseréltük; a Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH pedig azt jelenti, hogy a normálisan a GLP-1(7-37)OH 8. és 22 helyzetében lévő glicint valinra, illetve glutaminsavra cseréltük.

A GLP-1 vegyület N-terminálisa általában nem szubsztituált, de alkilezett vagy acilezett lehet (előnyösen C1-C20). A C-terminális lehet szubsztituátlan, mint a GLP-1(7-37)OH esetében, -NH₂, -NHR vagy NRR' amidált vagy -OR" észterezett. Az R és R' jelentése egymástól függetlenül alkil- vagy acilcsoportok (előnyösen C1-C20). R" jelentése alkil (C1-C20). A GLP-1(7-36)NH₂ az "amidált GLP vegyületek" egyik példája. Előnyösen a jelen találmány GLP-1 vegyületeinek C-terminálisa nem szubsztituált, vagy -NH₂-vel szubsztituált.



Előnyösen a jelen találmány GLP-1 vegyületei a GLP-1 analógokat vagy a GLP-1 analóg fragmenseket ölelik fel, melyekben az ilyen analógok vagy fragmensek váza a 8. helyzetben (8. helyzetű analógok) alanin helyett más aminosavat tartalmaznak. A váz L-hisztidin, D-hisztidin vagy a hisztidin módosított formáit tartalmazhatja, mint például a 7. helyen dezamino-hisztidin, 2-amino-hisztidin, 3-hidroxi-hisztidin, homohisztidin, α -fluorometil-hisztidin vagy α -metil-hisztidin lehet. Előnyös, ha ezek a 8. helyzetű analógok egy vagy több további változást tartalmaznak a 11., 12., 16., 22., 23., 24., 26., 27., 30., 33., 34., 35., 36 és 37. helyeken összevetve a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaival. Sokkal előnyösebb, ha ezek a 8. helyzetű analógok a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaival összehasonlításban egy vagy több további változtatásokat tartalmaznak a 12., 16., 22., 23., 26., 30., 35. és 37. helyeken. Még ennél is előnyösebb, ha a 8. helyzetű analógok a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaival összevetésben egy vagy több további változást mutatnak a 22., 23., 27., 30. és 37. helyzetekben.

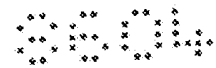
Az is előnyös, ha ezek az analógok hat vagy kevesebb változást tartalmaznak a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaihoz képest. Előnyösebben ezek az analógok öt vagy kevesebb változást tartalmaznak a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaihoz képest, vagy négy vagy kevesebb változást tartalmaznak a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaihoz képest. Még ennél is előnyösebb, ha ezek az analógok három vagy kevesebb változást tartalmaznak a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavai-



hoz képest. A legelőnyösebb, ha ezek az analógok két vagy kevesebb változást tartalmaznak a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaihoz képest.

Azt találtuk, hogy ezek a helyettesítések a GLP-1 vegyület aggregációs hajlamát csökkentik, és oldhatatlan formákat alakítanak ki. A jelen találmány GLP-1 vegyületei általában legalább ötször kevésbé gyorsan aggregálódnak mint a GLP-1(7-37)OH, ha ezt például a 3. példában leírt aggregációs eljárással vizsgáljuk, előnyösen legalább 20-szor, előnyösebben 40-szer, még előnyösebben 50-szer, még előnyösebben 60-szor és legelőnyösebben 65-ször kevésbé gyorsan aggregálódnak. Előnyösen az itt leírt GLP-1 vegyületek a GLP-1(7-36)NH₂ vagy a GLP-1(7-37)OH analógjai.

Egy előnyben részesített megvalósítási formában a jelen találmány GLP-1 vegyületének 22. helyzetében oldallánc található, mely legalább két szénatomot és egy poláros vagy töltött funkcionális csoportot tartalmaz. Ez az aszparaginsav, mely metilén és karboxi szénnel rendelkezik. Előnyösebben a 22. helyzetű aminosav oldallánca egyenes vagy elágazó láncú alkilcsoportot tartalmaz, mely közül 2-6 szénatom és egy funkcionális csoport, mint például karbonsav, amin, guanidinocsoport vagy szulfonsav csoport. Így a 22. helyzetben az előnyben részesített aminosav glutaminsav, aszparaginsav, arginin és lizin. Ha a 22. helyzetben aszparaginsav, glutaminsav, arginin vagy lizin található, akkor a 8. helyzetben előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin



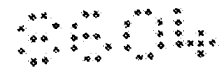
vagy metionin, még előnyösebben valin vagy glicin. Az oldalláncában szulfonsavat tartalmazó aminosav példája a ciszteinsav ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{SO}_3)-\text{CO}-$, rövidítése: "Cya"). Ha a 22. helyzetben szulfonsav van, mint például ciszteinsav, akkor a 8. helyzetben előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin vagy metionin, és előnyösebben valin vagy glicin aminosavak fordulnak elő.

Más előnyben részesített megvalósítási formában a 8. helyzetben előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin vagy metionin, és még előnyösebben valin vagy glicin szerepel és a 30. helyzetben glutaminsav, aszparaginsav, szerin vagy hisztidin, és még előnyösebben glutaminsav található.

Egy másik megvalósítási formában a 8. helyzetben az aminosav előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin vagy metionin és előnyösebben valin vagy glicin, és a 37. helyzetben hisztidin, lizin, arginin, treonin, szerin, glutaminsav, aszparaginsav, triptofán, tirozín, fenilalanin és előnyösebben hisztidin.

Egy másik megvalósítási formában a 8. helyzetű aminosav előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin vagy metionin és előnyösebben valin vagy glicin és a 22. helyzetben glutaminsav, lizin, aszparaginsav vagy arginin és előnyösebben glutaminsav vagy lizin és a 23. helyzetben lizin, arginin, glutaminsav, aszparaginsav és hisztidin és előnyösebben lizin vagy glutaminsav.

Egy további megvalósítási formában a 8. helyzetű aminosav előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin, treonin vagy me-



tionin és előnyösebben valin vagy glicin és a 22. helyzetben glutaminsav, lizin, aszparaginsav vagy arginin és előnyösebben glutaminsav vagy lizin és a 27. helyzetben alanin, lizin, arginin, triptofán, tirozin, fenilalanin vagy hisztidin és még előnyösebben alanin.

Egy további előnyben részesített megvalósítási formában a jelen találmány GLP-1 vegyületei a 8. aminosav helyzetben egy olyan aminosavat és a 11., 12., 16., 23., 24., 26., 27., 30., 33., 34., 35., 36. és 37. helyzetben egy, két vagy három kiválasztott aminosavat tartalmaznak, melyek eltérnek a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaitól.

Egy másik előnyben részesített megvalósítási formában a jelen találmány GLP-1 vegyületei a 8. helyzeten kívül további egy vagy két változtatást tartalmaznak a következő helyeken: 11., 12., 16., 22., 23., 24., 26., 27., 30., 33., 34., 35., 36. és 37., melyek a natív GLP-1(7-37)OH megfelelő aminosavaitól eltérnek.

Ahogy azt a fentiekben leírtuk, a jelen találmány GLP-1 vegyületei a 8., 11., 12., 16., 23., 24., 26., 27., 30., 33., 34., 35., 36. és 37. helyzetek aminosavain kívül a GLP-1(7-37) vagy GLP-1(7-37) fragmens megfelelő helyzeteihez viszonyítva más helyeken lévő aminosavakban is különbözik. A 8., 11., 12., 16., 23., 24., 26., 27., 30., 33., 34., 35., 36. és 37. helyzet aminosavaitól eltérő aminosavak közül azok előnyösek a megfelelő GLP-1(7-37)OH aminosav helyzeteket figyelembe véve, melyek konzervatív helyettesítések, és előnyösebben nagymértékben konzervatív helyettesítések.

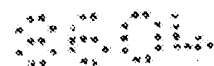


Előnyösen a jelen találmány GLP-1 vegyületei a 8. és a 22. helyzet aminosavain kívül semmi, egy, két vagy három aminosavban térnek el, melyek a GLP-1(7-37)OH vagy GLP-1(7-37)OH fragmens megfelelő helyzeteihez viszonyítva más helyen lévő aminosavak. Az egyik példában a GLP-1 vegyület 7., 21. és 27. helyzetű aminosavainak egyike vagy ezek közül több a GLP-1(7-37)OH vagy GLP-1(7-37)OH fragmens megfelelő aminosavaitól eltér, a 8. és a 22. helyzeteken túl.

Előnyösen csak a 7., 8. és 22. helyzetű aminosavak különböznek a GLP-1(7-37)OH (vagy fragmense) megfelelő aminosav helyzeteihez képest. Elvárható, hogy más, redukált aggregálódási tulajdonságokkal rendelkező javított GLP-1 vegyületek kinyerhetők az ismert, biológiailag aktív GLP-1 vegyületek közül, a 22. helyzetű glicin kicserélésével, és a 8. helyzetű alanin megváltoztatásával, az itt leírt módon a megfelelő aminosavra.

A biológiailag aktív GLP-1 vegyületeket közzétették [Hoffmann és mtsai: 5,977,071 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, Buckley és mtsai: 5,545,618 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Adelhorst és mtsai: Journal of Biological Chemistry 269, 6275 (1994)], amelyet itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be.

A "konzervatív helyettesítés" szakkifejezés jelentése az aminosav kicserélése egy másik aminosavra, melynek nettó elektromos töltése azonos és hozzávetőleg azonos méretű és alakú. Az alifás vagy a szubsztituált alifás oldalláncú amino-



savaknak hozzávetőleg akkor azonos a mérete, ha a szénatomok és a heteroatomok teljes száma az oldalláncban nem többel mint körülbelül négyvel tér el. Ezek hozzávetőleg akkor azonos alakúak, ha oldalláncukban az elágazások száma nem több mint egyvel tér el. A fenil vagy szubsztituált fenil aminosavak oldalláncaiban azonos méretűnek és alakúnak tekinthetők. Az alábbiakban ismertetjük az aminosavak öt csoportját. A GLP-1 vegyület aminosav kicserélése egy másik, de azonos csoportba tartozó aminosavval konzervatív helyettesítés.

I. csoport: glicin, alanin, valin, leucin, izoleucine, szerin, treonin, cisztein és természetben nem szereplő aminosavak C1-C4 alifás vagy C1-C4 hidroxil szubsztituált alifás oldallánccal (egyenes vagy egyetlen ponton elágazó).

II. csoport: glutaminsav, aszparaginsav és természetben nem előforduló aminosavak karboxilsav szubsztituált C1-C4 alifás oldalláncokkal (elágazás nélkül vagy egy elágazási ponttal).

III. csoport: lizin, ornitin, arginin és a természetben nem található aminosavak amin vagy guanidino szubsztituált C1-C4 alifás oldalláncokkal (elágazás nélkül vagy egy elágazási ponttal).

IV. csoport: glutaminsav, aszparagin és a természetben nem szereplő aminosavak amid szubsztituált C1-C4 alifás oldalláncokkal (elágazás nélkül vagy egy elágazási ponttal).

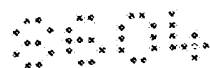
Ha azt másképp nem jeleztük, a konzervatív helyettesítések előnyösen a természetben előforduló aminosavakkal történnek.

A "nagymértékben konzervatív helyettesítés" szakkifejezés jelentése aminosav kicserélés, melynél az oldalláncban az azonos

funkcionális csoport kicserélését közel azonos méretűvel és alakúval végezzük. Aminosavak alifás vagy szubsztituált alifás aminosav oldallánccal közel azonos méretűek, ha a szénatomok és a heteroatomok száma nem több mint kettővel tér el. Közel azonos alakúak, ha oldalláncaikban azonos számú elágazást tartalmaznak. A nagymértékben konzervatív helyettesítések példái közé a valin helyett leucin, a treonin helyett szerin, az aszparaginsav helyett glutaminsav és a fenilglicin helyett fenilalanin helyettesítéseket soroljuk. A nem nagymértékben konzervatív helyettesítések példái a következők: alanin helyett valin, alanin helyett szerin és az aszparaginsav helyett szerin.

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek egyik példája az 1. számú aminosav szekvenciával rendelkező polipeptid. Egy előnyben részesített példában a GLP-1 vegyület a GLP-1(7-37)OH, azzal az eltéréssel, hogy az Xaa₈ jelentése Gly vagy Val, az Xaa₂₂ jelentése Glu vagy Lys, és az Xaa₂₃ jelentése Glu vagy Lys. Egy másik példában a GLP-1 vegyület a GLP-1(7-37)OH, azzal az eltéréssel, hogy az Xaa₈ Gly vagy Val és az Xaa₃₀ jelentése Glu. Egy további példában a GLP-1 vegyület a GLP-1(7-37)OH, azzal az eltéréssel, hogy az Xaa₈ jelentése Gly vagy Val és az Xaa₃₇ jelentése His.

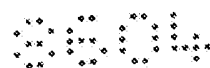
A jelen találmány GLP-1 vegyületének egy további példája egy olyan polipeptid, melynek aminosav szekvenciája a 4. számú szekvencia. Egy előnyben részesített példában az Xaa₇ jelentése L-hisztidin, D-hisztidin, dezamino-hisztidin, 2-amino-hisztidin, hidroxihisztidin, homohisztidin, α -fluorometil-hisztidin és α -



metil-hisztidin, Xaa₈ jelentése glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, szerin vagy treonin, és előnyösen glicin, valin, leucin, izoleucin, szerin vagy treonin, R jelentése -NH₂ vagy Gly(OH) és Xaa₂₂ jelentése lizin, glutaminsav, aszparaginsav vagy arginin, a 4. szekvenciában. Egy előnyösebb példában az Xaa₇ jelentése L-hisztidin, az Xaa₈ jelentése glicin vagy valin, az Xaa₂₂ jelentése lizin, glutaminsav, aszparaginsav vagy arginin és R jelentése Gly(OH). Alternativaként, Xaa₇, Xaa₈ és R jelentése a 9. szekvenciában a fentieknek megfelel, és Xaa₂₂ jelentése szulfoncsoportos oldalláncú aminosav, például ciszteinsav.

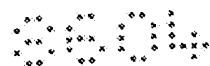
A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek további példájában a 8. helyzetű aminosav nem D-aminosav és oldalláncában nem tartalmaz: glicint, szerint, treonint, ciszteint vagy béta-alanin, ha a 22. helyzetben az aminosav C1-C2 alkil oldallánccal, C1-C2 hidroxilezett alkil oldallánccal vagy C1-C2 tiolált alkil láncsal (például cisztein) rendelkezik. A jelen találmány előnyben részesített GLP-1 vegyületeiben a 8. helyzetű aminosav nem D-aminosav és oldalláncában glicint, szerint, treonint, ciszteint vagy béta-alanint tartalmaz, ha a 22. helyzetben az aminosav C1-C2 alkil oldallánccal, C1-C4 hidroxilezett alkil oldallánccal vagy C1-C4 tiolált alkil láncsal rendelkezik.

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek másik példájában a 8. helyzetű aminosav glicin, valin, leucin, izoleucin, metionin, szerin, treonin, cisztein, aszparaginsav, glutaminsav, lizin, arginin, aszparagin, glutaminsav, fenilalanin, tirozin, hisztidin vagy



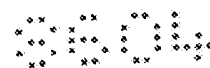
triptofán; és a 22. helyzetű aminosav aszparaginsav, glutaminsav, lizin, arginin, aszparagin, glutamin vagy hisztidin.

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek specifikus példái a következők: Glu²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 20), Asp²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 21), Arg²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 22), Lys²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 23), Cya²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 24), Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 5) , Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 7), Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 8), Val⁸-Cya²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 25), Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 9), Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 10), Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 11), Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 12), Gly⁸-Cya²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 26), Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 27), Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 28), Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 29), Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 30), Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 31), Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 32), Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 33), Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 34), Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 35), Val⁸-Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 36), Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 37), Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 38), Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 39), Gly⁸-Lys²²-



GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 40) és Gly⁸-Cys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 41), Val⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 42), Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 43), Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 44), Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 45), Val⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 46), Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 47), Val⁸-Glu²²-Lys²³-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 48), Val⁸-Glu²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 49), Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 50), Val⁸-Gly³⁴-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 51), Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 52), Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 53).

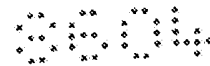
Ahogy azt itt használjuk a "GLP-1 vegyület" szakkifejezés az itt leírt vegyületek gyógyszerészetileg elfogadható sóira is vonatkozik. A jelen találmány GLP-1 vegyülete kellően savas, kellően lúgos vagy mindkét funkcionális csoportokkal rendelkezik, és ennek megfelelően bármely számban szervetlen bázisokkal, és szervetlen és szerves savakkal sókat képezhet. A savaddíciós sók kialakítására általánosan használt savak a szervetlen savak, mint például a sósav, a hidrobromid, a hidrojodid, kénsav, foszorsav és hasonló, és a szerves savak, mint például p-toluol-szulfonsav, metánszulfonsav, oxálsav, p-brómfenil-szulfonsav, szénsav, borostyánkősav, citromsav, benzoésav, ecetsav és hasonló. Az ilyen sók példái a következők: szulfát, piroszulfát, biszulfát, szulfít, biszulfít, foszfát, monohidrogénfoszfát, dihidrogénfoszfát, metafoszfát, pirofoszfát, klorid, bromid, jodid, acetát,



propionát, dekanoát, kaprilát, akrilát, formiát, izobutirát, kaproát, heptanoát, propiolát, oxalát, malonát, szukcinát, szuberát, szebakát, fumarát, maleát, butin-1,4-dioát, hexin-1,6-dioát, benzoát, klórbenzoát, metilbenzoát, dinitrobenzoát, hidroxibenzoát, metoxibenzoát, ftalát, szulfonát, xilénszulfonát, fenilacetát, fenilpropionát, fenilbutirát, citrát, laktát, gamma-hidroxibutirát, glikolát, tartarát, metánszulfonát, propánszulfonát, naftalin-1-szulfonát, naftalin-2-szulfonát, mandelát és hasonlóok.

A lúgos addíciós sók közé azok tartoznak, melyek szervesetlen bázisokból származnak, mint például ammónium vagy alkáli vagy alkáli földfém hidroxidok, karbonátok, bikarbonátok és hasonlóok. A következő bázisok a jelen találmány sóinak elkészítéséhez használhatók: nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónium-hidroxid, kálium-karbonát és hasonlóok.

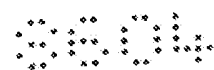
A GLP-1 vegyületek széles tartományban használhatók a betegségek és állapotok kezelésére. Úgy gondoljuk, hogy a GLP-1 vegyületek, beleértve a jelen találmány vegyületeit, biológiai hatásait a "GLP-1 receptoron" keresztül fejtik ki [Thorrens: 5,670,360 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Ezért azok a betegségek és/vagy állapotok, melyek a GLP-1 receptorok stimulálásra előnyösen reagálnak, a jelen találmány GLP-1 vegyületeivel kezelhetők. A szóban forgó szubjektumról azt mondjuk, hogy "a GLP-1 vegyületekkel való kezelésre szüksége van" vagy "a GLP-1 receptor stimulálására" igénye van. Ide tartoznak: az inzulinfüggő diabetes, az inzulinfüggetlen diabetes, a sztrók [Efendic: WO 00/16797 számú szabadalmi beje-



lentés] a miokardiális infarktus [Efendic: WO 98/08532 számú szabadalmi bejelentés], az elhízás [Efendic: WO 98/19698 számú szabadalmi bejelentés], katabolikus változások műtét után [Efendic: 6,006,753 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés], a funkcionális diszpepszia és az irritábilis bélszindróma [Efendic: WO 99/64060 számú szabadalmi bejelentés].

Azok a szubjektumok is ide tartoznak, akik a GLP-1 vegyülettel történő megelőző kezelést igényelnek, például nem inzulinfüggő diabetes kockázati tényezőjük magas [WO 00/07617 számú szabadalmi bejelentés]. A sérült glükóz toleranciát, vagy a sérült éhezési glükózt mutató szubjektumok, akik testtömege a normál testtömegnél 25 %-kal több, részleges hasnyálmirigy eltávolításon átesett betegek, olyan személyek akiknek egy vagy mindkét szülője nem inzulinfüggő diabetesben szenvedett, terhességi cukorbeteg, és akut vagy krónikus hasnyálmirigy gyulladásra átesett személyek, a nem inzulinfüggő diabetes kifejlődésének kockázatát hordozzák.

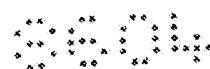
A GLP-1 vegyület "hatásos mennyisége" a kívánt terápiás és/vagy megelőző hatást elfogadhatatlan mellékhatások nélkül mutatja, ha az arra rászoruló betegbe beadva a GLP-1 receptort stimulálja. A "kívánt terápiás hatás" közé a következők közül egy vagy több tartozik: 1) az állapottal vagy betegséggel társuló szimptómák javulása; 2) a betegséggel vagy állapottal társuló szimptómák kialakulásának elhúzódása; 3) a kezelés hiányához képest megnövekedett életkor; és 4) a kezelés hiányához képest



jobb életminőség. Például a GLP-1 vegyület "hatásos mennyisége" a diabetes kezelésében az a mennyiség, mely a vér glükóz koncentráció jobb szabályozását eredményezheti mint a kezeletlen esetben, így a diabetikus komplikációk, mint például a retinopathia, neuropathia vagy veserendellenesség megjelenése elhúzódik. A GLP-1 "hatásos mennyisége" a diabetes megelőzésében az a mennyiség, mely a kezeletlen állapothoz képest a megnövekedő vércukorszint késleltetést eredményez, ezzel az anti-hipoglikémiás gyógyszerekkel, mint például szulfonil karbamidok, tiazolidindionok, inzulin és/vagy biszguanidinek, a kezelés szükségességét későbbi időre teszi.

A GLP-1 vegyület szubjektumba beadott "hatásos mennyisége" a betegség típusától, súlyosságától és a szubjektum jellemzőitől függ, mint amilyen például az általános egészségi állapot, kor, nem, testtömeg és a gyógyszertolerancia. A szakirodalomban jártas szakemberek számára a megfelelő dózis meghatározása ezektől és egyéb faktoroktól függ. Tipikusan a GLP-1 vegyület gyógyszerészetileg hatásos mennyisége felnőtt esetében körülbelül 0,01-1000 mg/nap tartományban található. Előnyösen naponta körülbelül 0,1-100 mg, előnyösebben körülbelül 1,0-10 mg.

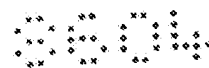
A jelen találmány GLP-1 vegyületei például orálisan, nazálisan, inhalációval vagy parenterálisan adhatók be. A parenterális beadás közé tartozik például a szisztémás beadás, mint például az intramuszkuláris, intravénás, szubkután vagy intraperitoneális injekció. A GLP-1 vegyület a szubjektumba gyógyszerészetileg



elfogadható hordozóval, hígítóval, kötőanyaggal együtt a gyógyszerészeti összetétel részeként beadható, a fentiekben megvitatott betegségek kezelésekor. A gyógyszerészeti összetétel lehet oldat, vagy ha parenterálisan adják be, akkor a GLP-1 vegyület szuszpenziója vagy a GLP-1 vegyület kétértékű fémion komplexének szuszpenziója, ahogy azt az alábbiakban leírtuk. A megfelelő gyógyszerészeti hordozó inert alkotórészeket tartalmazhat, melyek a peptiddel vagy a peptid származékkal nem lépnek kölcsönhatásba. A standard gyógyszerészeti kiszerelési technikákat a szakirodalomban leírták [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA.]. A megfelelő parenterális gyógyszerészeti hordozók például a következők: steril víz, fiziológiás sóoldat, bakteriosztatikus sóoldat, (sóoldat, mely körülbelül 0,9 % mg/ml benzilalkoholt tartalmaz), foszfáttal pufferealt sóoldat, Hank-féle oldat, Ringer-féle laktát és hasonló. A megfelelő kötőanyagok példái a következők: laktóz, dextróz, szukróz, trehalóz, szorbit, és mannit.

A "szubjektum" szakkifejezés jelentése emlős, előnyösen humán, de lehet állat például házi kedvenc (például kutya, macska és hasonló), háziállatok (például tehén, juh, sertés, ló és hasonló) laboratóriumi állatok (például patkány, egér, tengerimalac és hasonló).

A jelen találmány GLP-1 vegyületei megfelelő kétértékű fém kationnal komplexbe vihetők. A GLP-1 vegyületek kétértékű fémkomplexei általában vizes oldatban körülbelül fiziológiás pH-n oldhatatlanok. Így ezek a komplexek szuszpenzióban szubkután



beadhatók, és *in vivo* csökkentett kibocsátást mutatnak, ezért a vegyület hatástartamát megnyújtják. A megfelelő kétértékű fém kationok közé a következők tartoznak: Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} és hasonlók. Előnyben részesítjük a Zn^{++} -t.

A jelen találmány GLP-1 vegyületei és a kétértékű fém kationok közötti komplexek nyeréséhez a GLP-1-t a megfelelő pufferben és a fémion jelenlétében feloldjuk. A keveréket a komplex kicsapódásának kialakításához környezeti hőmérsékleten inkubáljuk. A megfelelő pufferek azok, melyek az elegy pH-tartományát körülbelül 3,0-9,0 között tartják, és amelyek a komplexképződést nem befolyásolják. A példák a következők: foszfát pufferek, acetát pufferek, citrát pufferek és Goode-féle pufferek, például HEPES, trisz és trisz-acetát. A megfelelő fémsók azok, melyekben a fém a komplexképzéshez rendelkezésre áll. A megfelelő cinksók a következők: cink-klorid, cink-acetát, cink-oxid és cink-szulfát. Előnyösen a kétértékű fémkation sóit, mint például a cink-kloridot feleslegben adjuk, a fémionra nézve a GLP-1 vegyület moláris arányának körülbelül 50-szeres mennyiségben.

Az "inzulinotróp aktivitás" a megnövekedett glükóz szintre adott inzulin szekréció stimulálására vonatkozik, ezzel a sejt glükóz felvételét és a szérum glükóz szintjének csökkenését eredményezi. Az inzulinotróp aktivitás a szakirodalomban ismert eljárásokkal meghatározható, beleértve az *in vivo* kísérleteket és azokat az *in vitro* módszereket, melyekkel a GLP-1 receptorkötő aktivitását mérhetjük, vagy a receptor aktiválását, például a hasnyálmirigy szigeti sejtjeit vagy az inzulinóma sejteket alkalmazó

eljárásokat [Gelfand és mtsai: EP 619,322 számú szabadalmi bejelentés, Gelfand és mtsai: 5,120,712 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés], amelyeket itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be.

A jelen találmány GLP-1 vegyületei a szilárdfázisú peptid-szintézis technikák standard eljárásaival állíthatók elő. A kereskedelemben beszerezhetők peptid-szintetizátorok, például az Applied Biosystems készülékei (Foster City CA). A szilárdfázisú szintézis reagensei szintén beszerezhetők a kereskedelemben (például Midwest Biotech, Fishers, IN). A szilárdfázisú peptid szintetizálók a gyártók előírásainak megfelelően használhatók a interferáló csoportok blokkolására, a reagáló aminosavak védésére, kapcsolásra, a kapcsolat megszüntetésére és a nem reagált aminosavak fedésére.

Tipikusan az α -N-karbamoillal védett aminosavak és az N-terminális aminosavak a gyanta növekvő peptidláncán szobahőmérsékleten inert oldószerben kapcsolhatók, mint például dime-tilformamid, N-metilpirrolidon vagy metilén-klorid, kiegészítve kapcsolószerekkel, mint például diciklohexilkarbodiimid és 1-hidroxibenzotriazol, valamint bázisokkal, mint például diizopropiletilamin. Az α -N-karbamoil védőcsoportot az eredményül kapott peptid gyantáról például trifluorecetsavval vagy piperidinnel eltávolítjuk és a kapcsolási reakciót a következő N-védett aminosavval megismételjük, így a peptidlánchoz újabb aminosav kapcsolódik.

A megfelelő amin védőcsoportok a szakirodalomban jól ismertek [Green és Wuts: "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, (1991), amelyet itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be]. A példák a következők: t-butiloxikarbonil (tBoc) és fluorenilmetoxikarbonil (Fmoc).

A peptideket standard automatizált szilárdfázisú szintézis protokollok alapján is szintetizálhatjuk, felhasználva a t-butoxikarbonil- vagy fluorenilmetoxikarbonil-alfa-aminosavakat megfelelően védett oldalláncokkal. Miután a szintézis befejeződött, a peptideket a szilárd fázisról lehasítjuk, miközben oldallánc védelem mentesítést standard hidrogén-fluorid eljárással elvégezzük. A nyers peptideket ezek után fordított fázisú kromatográfiával tovább tisztítjuk, Vydac C18 oszlopokon acetonitril gradienssel, mely 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmaz. Az acetonitril eltávolításához a peptideket az oldatból liofilezzük, mely 0,1 % TFA-t, acetonitrilt és vizet tartalmazott. A tisztítást fordított fázisú analitikai kromatografálással ellenőrizhetjük. A peptidek azonosítása tömegspektrográffal elvégezhető. A peptidek vizes pufferekkel semleges pH-n oldatba vihetők.

A találmányt a következő példákon keresztül mutatjuk be, melyek szándékunknak megfelelően a jelen találmány oltalmi körét semmilyen módon nem korlátozzák.

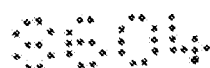


1. Példa

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek előállítása szilárdfázisú t-Boc kémiával

Hozzávetőleg 0,5-0,6 gramm (0,38-0,45 mmol) Boc Gly-PAM gyantát standard 60 ml-es reakcióedénybe helyeztünk és kettős kapcsolást végeztünk Applied Biosystems A81430A peptid-szintetizálóval. A következő oldallánc védett aminosavakat szereztük be a Midwest Biotech-től (Fishers, IN) (2 mmol Boc aminosav töltet) és a szintézisben a következőket használtuk fel: Arg-Tosyl (TOS), Asp-8-ciklohexil-észter(CHXL), Glu-δ-ciklohexil-észter (CHXL), His-benziloximetil(BOM), Lys-2-klórbenziloxikarbonil (2Cl-Z), Met-szulfoxid (O), Ser-O-benzil-éter (OBzl), Thr-O-benzil-éter (OBzl), Trp-formil (CHO) és Tyr-2-brómbenziloxikarbonil (2Br-Z), valamint Boc Gly PAM gyantát alkalmaztunk. A trifluorecetsavat (TFA), diizopropiletilamint (DIEA), 0,5 M hidroxibenzotriazolt (HOBt) DMF-ben és a 0,5 M diciklohexilkarbodiimidet (DCC) diklórmétánban a PE-Applied Biosystems cégtől (Foster City, CA) vásároltuk. A dimetilformamidot (DMF-Burdick and Jackson) és a diklórmétánt (DCM-Mallinkrodt) a Mays Chemical cégtől (Indianapolis, IN) vásároltuk.

A standard kettős kapcsolásokat vagy szimmetrikus anhidriddel, vagy HOBt észterekkel futtattuk, mindkettő DCC felhasználással kialakult. A kettős kapcsolás második fordulóját (TFA a védelem megszüntetése nélkül) Trp31, Thr13 és Thr11 futtatással végeztük. A szintézis végén az N-terminális Boc csoportot eltávolítottuk és a peptidil gyantákat DMF-ben lévő 20 % piperidinnel



kezeltük a Trp oldallánc deformilezéséhez. Miután DCM-mel mostuk, a gyantákat TEFLON reakcióedényekbe átvittük és vákuumban szárítottuk.

A Met-et tartalmazó analógokhoz a gyantán a redukálást TFA/10% dimetil-szulfiddal (DMS)/2% koncentrált HCl-lel végeztük. A hasításokat a reakcióedények HF (hidrogénfluorid) készülékhez kapcsolásával végeztük (Penninsula Laboratories). 1 ml m-krezol per gramm gyantát adtunk hozzá, és 10 ml HF-et (amit az AGA-tól vásároltunk, Indianapolis, IN) az előhűtött edényekre rákondenzáltunk. Metionin jelenlétében 1 ml DMS per gramm gyantát adtunk hozzá. A reakciót egy óráig jégfürdőn kevertettük és a HF-t vákuumban eltávolítottuk. A maradékot etiléterben felfuszpendáltuk és a szilárd anyagot szűrtük és éterrel mostuk. Mindegyik peptidet vizes ecetsavba kivonatoltuk és vagy fagyasztva szárítottuk, vagy közvetlenül fordított fázisú oszlopra töltöttük.

A tisztításokat 2,2 x 25 cm VYDAC C18 oszlopon A pufferben (0.1% trifluorecetsav vízben, B: 0,1 % TFA acetonitrilben) végeztük. A B. gradienst 20-90 %-ig HPLC-n (Waters) 120 percig 10 ml/perc áramlásnál alkalmaztuk, miközben az eluenst UV 280 nm-en (4,0 A) mértük, és egyperces frakciókat gyűjtöttünk. A megfelelő frakciókat összeöntöttük, lefagyasztottuk és liofileztük. A száraz termékeket HPLC-vel (0,46 x 15 cm METASIL AQ C18) és MALDI tömegspektrográfiával analizáltuk.

2. Példa

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek elkészítése szilárdfázisú F-Moc kémiával

Hozzávetőleg 114 mg (50 mM) FMOC Gly WANG gyantát (amelyet a NovaBiochem-től vásároltunk, LaJolla, CA) egy 96 lyukú reakció blokk programozott lyukaiba helyeztünk, és a kettős kapcsolást Advanced ChemTech 396 peptid szintetizálón végeztük. A C-terminális amid analógokat elkészítettük, felhasználva 75 mg (50 μ mol) Rink Amide AM gyantát (NovaBiochem, LaJolla, CA).

A következő FMOC aminosavakat a következő cégektől vásároltuk: Advanced ChemTech (Louisville, KY), NovaBiochem (La Jolla, CA), and Midwest BioTech (Fishers, IN): Arg-2,2,4,6,7-pentametildihidrobenezofurán-5-szulfonil (Pbf), Asn-tritil (Trt), Asp- β -t-butil-észter (tBu), Glu- β -t-butil-észter (tBu), Gln-tritil (Trt), His-tritil (Trt), Lys-t-butiloxikarbonil -(Boc), Ser-t-butil-éter (OtBu), Thr-t-butil-éter (OtBu), Trp-t-butiloxikarbonil (Boc), Tyr-t-butil-éter (OtBu).

Az oldószereket: dimetilformamid (DMF-Burdick and Jackson), N-metil-pirrolidon (NMP-Burdick and Jackson), diklórmetán (DCM-Mallinkrodt) a Mays Chemical cégtől (Indianapolis, IN) vásároltuk.

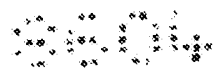
A hidroxibenzotrizolt (HOBt), a diizopropilkarbodiimidet (DIC), a diizopropiletilamint (DIEA) és a piperidint (Pip) az Aldrich Chemical cégtől (Milwaukee, WI) vásároltuk.

Az összes aminosavat 0,45 M HOBt/NMP-ben feloldottuk és 50 percig DIC/HOBt-vel aktivált kapcsolást végeztünk 20 perces védőcsoport eltávolítás után, felhasználva 20 % Pip/DMF-t. Mindegyik gyantát a védőcsoport-eltávolítás és a kapcsolás után DMF-vel mostuk. Az utolsó kapcsolás és védőcsoport eltávolítás után a peptidil gyantákat DCM-mel mostuk és a reakcióblokkokat vákuumban szárítottuk.

A reakció/hasítás blokk összeállítással helyben 2 ml K reagenst adtunk mindegyik lyukba és a hasítási reakciót 2 óráig keveréssel végeztük (K reagens = 0,75 g fenol, 0,5 ml tioanizol, 0,25 ml etánditiol, 0,5 ml víz per 10 ml trifluorecetsav (TFA), mindegyiket az Aldrich Chemical cégtől (Co., Milwaukee, WI) vásároltuk). A TFA filtrátumokat 40 ml etiléterhez adtuk és a csapadékot 2 percig 2000 rpm-mel centrifugáltuk. A felülúszókat dekantáltuk, az üledéket 40 ml éterben felvettük és ismét centrifugáltuk, majd nitrogén alatt dekantáltuk, majd vákuumban szárítottuk.

A termékből 0,3-0,6 mg-ot 1 ml 0,1 % TFA/acetonitrilben (ACN) feloldottunk és 20 μ l-t HPLC-n analizáltunk [0,46 x 15 cm METASIL AQ C18, 1 ml/perc, 45 °C, 214 nM (0,2 A, A = 0,1 % TFA, B= 0,1 % TFA/50 % ACN). Gradiens = 50-90 % B 30 perc alatt.

A tisztításokat 2,2 x 25 cm VYDAC C18 oszlopon A pufferben (0,1 % trifluorecetsav vízben, B: 0,1 % TFA acetonitrilben) végeztük. A gradienst 20-90 % B-vel HPLC-n (Waters) 120 percig 10 ml/perc áramlásnál alkalmaztuk, miközben az eluenst 280



nm-en (4,0 Å) mértük, és egyperces frakciókat gyűjtöttünk. A megfelelő frakciókat összegyűjtöttük, fagyasztottuk és liofileztük. A száraz termékeket HPLC-n (0.46 x 15 cm METASIL AQ C18) és MALDI tömegspektrométeren analizáltuk.

3. Példa

GLP aggregációs vizsgálat

A jelen találmány GLP peptidjeit oldatban való aggregálódási képességükre nézve analizáltuk. Általában a peptideket az oldatokban megemelt hőmérsékleten a megfelelő pufferben kevertettük, miközben a zavarosságot az idő függvényében 350 nm-en mértük. E körülmények között az aggregáció beindulási ideje az adott GLP molekula minőségére jellemző.

Protokoll:

A GLP-1 vegyületet először lúgos körülmények (pH = 10,5) között 30 percig oldottuk, az összes aggregálódott anyag feloldását elősegítve. Az oldat pH-ját ezek után 7,4-re állítottuk és szűrtük. Részletesebben, 4 mg liofilezett GLP-1 vegyületet 3 ml 10 mM foszfát/10 mM citrátban feloldottunk. A pH-t 10,0-10,5 közé beállítottuk és az oldatot 30 percig inkubáltuk. Az oldat pH-ját sósavval 7,4-re beállítottuk, megfelelő szűrőn, például Millex GV fecskendőszűrőn (Millipore Corporation, Bedford, MA) szűrtük. Ezt az oldatot ezek után hígítottuk, így a végső minta 0,3 mg/ml fehérjét tartalmazott a következő összetételű oldatban: 10 mM citrát, 10 mM foszfát, 150 mM NaCl, és a pH-t 7,9-7,5 közé

állítottuk. A mintát 37 °C kvarc küvettában inkubáltuk. Minden ötödik percben az oldat zavarosodását 350 nm-en AVIV Model 14DS UV-VIS spektrofotométerrel (Lakewood, NJ) meghatároztuk. A mérés előtt 30 másodpercig és a mérés alatt az oldatot mágneses keverővel kevertettük (Starna Cells, Inc., Atascadero, CA). Az OD 350 nm-en mért növekedése a GLP peptid aggregálódását jelzi. Az aggregálódási időt az elő-növekedési és a növekedési fázishoz Draka-féle módszerrel lineárisan illesztettük [Arvinte és mtsai: J. Bio. Chem., 268, 6415-6422 (1993)].

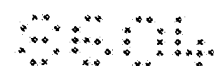
A küvettát a kísérletek között szappan oldattal (például Contrad-70) kimostuk.

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek szükséges aggregálódási idejét az 1. táblázatban adtuk meg. Ahogy az látható, a jelen találmány vegyületei nagymértékben növekvő aggregációs idővel rendelkeznek a szakirodalomból ismert más GLP-1 vegyületekhez képest.

4. Példa

A GLP-1 receptor aktiválás a jelen találmány GLP-1 vegyületeivel

A jelen találmány GLP-1 vegyületeinek GLP-1 receptor aktiváló képességét a szakirodalomban leírtaknak megfelelően meghatároztuk [Gelfand és mtsai: EP 619,322 számú szabadalmi bejelentés, és 5,120,712 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés], amelyeket itt teljes egészében hivatkozásként építettünk be. E vegyületek aktivitását a GLP-1(7-37)OH aktivitásához képest az 1. táblázatban adtuk meg. Ahogy



az eredményekből látható a jelen találmány GLP-1 vegyületeinek aktivitása általában olyan jó, vagy jobb mint a GLP-1(7-37)OH aktivitása.

1. Táblázat

A GLP-1 receptor aggregálása

GLP-1 vegyület	Idő (óra)	Aktiválás
GLP-1(7-37)OH	1	1,0
Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,9 ± 0,2 (n = 6)	0,47
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	9*	0,282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	10	0,021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	13	0,001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH	6	0,81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	12	0,047
Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	16	0,112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	5	1,175
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH	5	0,33
Gln ²² -GLP-1(7-37)OH	7	0,42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37)OH	19	0,56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37)OH	22	0,50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37)OH	>90	0,40
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	72	1,29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH	100, 54	0,58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37)OH	>75	0,01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37)OH	>75	0,14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	24	0,53

Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	>65	1,0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	19	1,07
Val ⁸ -Glu ²³ -GLP-1(7-36)OH	65	0,28
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	>45	0,18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	3	0,007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	22	0,02
Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>24	0,8
Ala ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>24	0,7
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	10	0,37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	2	0,47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	>40	0,29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	30	0,29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	>45	0,15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	8	0,19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	13	0,19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH	>70	0,039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1(7-37)OH	20	0,1
Val ⁸ -Gly ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	9	0,01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	>40*	0,17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	14	0,094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	>45, 30	0,41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	63	0,15
Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	>45	0,11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	8	0,22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1(7-37)OH	>40	0,33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>20	0,23

Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	4	0,37
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1(7-37)OH	>30	0,35
Val ⁸ -Glu ²² -Gln ²³ -GLP-1(7-37)OH	>20	0,47
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	>45	1,02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	>65	1,43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	22	0,08
Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	>48	0,09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	27	0,34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1(7-37)NH ₂	2	0,53

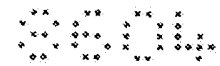
*Az aggregálódási időt 30 °C-on határoztuk meg.

5. Példa

A GLP-1 vegyület cink-kloriddal végzett kicsapása

Az 1. vagy a 2. példa alapján elkészített egyes GLP-1 vegyületekből 3 mg liofilizált egyedi GLP molekulát 3 ml 0,1 M HEPES pufferben pH = 10,5 feloldottunk. Az eredményül kapott oldat pH-ját 0,2 mol/l NaOH-val 10,0-10,5 közé beállítottuk. Az oldatot környezeti hőmérsékleten 30 percig kevertettük, majd az oldat pH-ját 0,2 mol/l HCl-lel 7,4-re beállítottuk. Az oldatot megfelelő méretű szűrőn, például Millex GV fecskendőszűrőn (Millipore Corporation, Bedford, MA) átengedtük, és a GLP-1 vegyület koncentrációját spektrofotométerrel (BeclQnan DU640) 280 nm-en abszorpciós méréssel meghatároztuk. A fehérje koncentrációt ezután 200 µM-ra 1 M HEPES-sel pH 7,4-en beállítottuk.

A szűrt GLP-1 oldatokat (100 µl) ELISA lemezeken (például Falcon Microtest™96) 100 µl 0,1 M HEPES-sel (pH = 7,4) hígított-

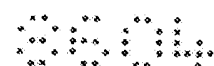


tuk, mely különböző koncentrációjú cink-kloridot tartalmazott, az eredményül kapott 200 μ l oldat, így különböző koncentrációjú cink-kloridot és 100 μ M GLP-1 vegyületet tartalmazott. Ezeket az oldatokat környezeti hőmérsékleten (22 °C) 18 óráig inkubáltuk, majd centrifugáltuk, például Jouan CR412 centrifugában mikrolemez adapterrel. A centrifugálás után 150 μ l felülúszót UV-ben olvasható ELISA mikrolemezekbe átvittünk (például Costar UV lemez), és az OD-t 280 nm-en mikrolemez leolvasóban meghatároztuk (például Molecular Devices SPECTRAMax PLUS, SOFTmax PRO).

A kísérlet eredményeit a 2. táblázatban mutattuk be. Az A280 értékek két független meghatározás értékei.

2. Táblázat

Zn/ GLP-1 moláris arány	GLP-1 (7- 37)OH A280	Gly ⁸ GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ GLP-1 (7- 37)OH A280	Gln ²² - GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ - Glu ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ - Ala ²² GLP-1 (7-37)OH A280
0	0,337	0,32	0,3	0,290	0,295	0,289
0,3	0,318	0,166	0,27	0,390	0,291	0,202
0,5	0,329	0,151	0,26	0,123	0,292	0,107
0,7	0,253	0,156	0,124	0,076	0,293	0,104
1	0,148	0,119	0,06	0,074	0,26	0,110
2	0,092	0,089	0,025	0,095	0,078	0,110
3	0,081	0,085	0,021	0,095	0,052	0,104
5	0,074	0,078	0,019	0,097	0,035	0,119



2. Táblázat folytatása

Zn/ GLP-1 moláris arány	Val ⁸ - Ser ²² - GLP-1(7- 37)OH A280	Val ⁸ - Phe ²² - GLP-1(7- 37)OH A280	Val ⁸ - Pro ²² - GLP-1 (7-37)OH A280	Val ⁸ - Lys ²² - GLP-1 (7-37)OH A280	Val ⁸ - Asp ²² - GLP-1 (7-37)OH A280
0	0,2855	0,31	0,2595	0,299	0,288
0,3	0,2805	0,1485	0,2455	0,0825	0,2785
0,5	0,2665	0,1165	0,2325	0,0905	0,2845
0,7	0,1825	0,1015	0,219	0,1195	0,287
1	0,149	0,1265	0,1905	0,1225	0,291
2	0,0935	0,092	0,1695	0,1675	0,189
3	0,101	0,061	0,1615	0,1475	0,1485
5	0,0615	0,00795	0,171	0,142	0,1675

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a hígított oldatokból csak a cink kis mennyisége szükséges a különböző GLP-1 vegyületek jelentős részének a komplexbe viteléhez és kicsapásához.

Egyenértékű változatok

Miközben a jelen találmányt az előnyben részesített megvalósítási formákra hivatkozva részleteiben bemutattuk, meg kell értenünk, hogy a szakirodalomban jártas szakemberek számára különböző változtatások tehetők melyek részletei a jelen találmány szellemének és oltalmi körének megfelel, ahogy azt a csatolt igénypontokban meghatároztuk. A szakirodalomban

jártas szakemberek számára nyilvánvaló, illetve képesek arra, hogy rutin kísérletekkel a leírt specifikus megvalósítási formák számos egyenértékű változatát létrehozzák. Az ilyen egyenértékű változatok szándékunknak megfelelően az igénypontok oltalmi körébe tartoznak.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.

SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

- <110> Eli Lilly and Company
- <120> Glukagonszerű peptid-1 analógok
- <130> X-13989
- <160> 53
- <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 31
- <212> FEHÉRJE
- <213> mesterséges
- <220>
- <223> szintetikus konstrukció
- <220>
- <221> változat
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa a 2. helyzetben Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;
- <220>
- <221> változat
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa az 5. helyzetben Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys vagy His;
- <220>
- <221> változat
- <222> (6)..(6)
- <223> Xaa a 6. helyzetben His, Trp, Phe vagy Tyr;

<220>

<221> változat

<222> (10)..(10)

<223> Xaa a 10. helyzetben Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp,
Val, Glu vagy Ala;

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
vagy Cys;

<220>

<221> változat

<222> (17)..(17)

<223> Xaa a 17. helyzetben His, Asp, Lys, Glu vagy Gln;

<220>

<221> változat

<222> (18)..(18)

<223> Xaa a 18. helyzetben Glu, His, Ala vagy Lys;

<220>

<221> változat

<222> (20)..(20)

<223> Xaa a 20. helyzetben Asp, Lys, Glu vagy His;

<220>

<221> változat

<222> (21)..(21)

<223> Xaa a 21. helyzetben Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg vagy
Lys;

<220>

<221> változat

<222> (25)..(25)

<223> Xaa a 25. helyzetben Ala, Glu, Asp, Ser vagy His;

<220>

<221> változat

<222> (27)..(27)

<223> Xaa a 27. helyzetben Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly vagy Glu;

<220>

<221> változat

<222> (28)..(28)

<223> Xaa a 28. helyzetben Glu, Lys vagy Asp;

<220>

<221> változat

<222> (29)..(29)

<223> Xaa a 29. helyzetben Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe,
Asp, Gly, Pro, His vagy Glu;

<220>

<221> változat

<222> (30)..(30)

<223> Xaa a 30. helyzetben Arg, Glu vagy His;

<220>

<221> változat

<222> (31) . . (31)

<223> Xaa a 31. helyzetben Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro vagy Gly-Pro-NH₂, vagy hiányzik.

<400> 1

His	Xaa	Glu	Gly	Xaa	Xaa	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Xaa
1				5					10				15		
Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Xaa	Phe	Ile	Ala	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
			20					25					30		

<210> 2

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (2)..(2)

<223> Xaa a 2. helyzetben Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;

<220>

<221> változat

<222> (6)..(6)

<223> Xaa a 6. helyzetben His, Trp, Phe vagy Tyr;

<220>

<221> változat

<222> (10)..(10)

<223> Xaa a 10. helyzetben Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu vagy Ala;

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
vagy Cys;

<220>

<221> változat

<222> (17)..(17)

<223> Xaa a 17. helyzetben His, Asp, Lys, Glu vagy Gln;

<220>

<221> változat

<222> (20)..(20)

<223> Xaa a 20. helyzetben Asp, Lys, Glu vagy His;

<220>

<221> változat

<222> (24)..(24)

<223> Xaa a 24. helyzetben Ala, Glu, Asp, Ser vagy His;

<220>

<221> változat

<222> (29)..(29)

<223> Xaa a 29. helyzetben Thr, Ser, LyS, Arg, Tip, Tyr, Phe,
Asp, Gly, Pro, His vagy Glu;

<220>

<221> változat

<222> (31) . . (31)

<223> Xaa a 31. helyzetben Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,

Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro vagy Gly-Pro-NH₂, vagy hiányzik.

<400> 2

His Xaa Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1

5

10

15

Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Xaa Arg Xaa

20

25

30

<210> 3

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (2)..(2)

<223> Xaa a 2. helyzetben Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg
vagy Cys;

<220>

<221> változat

<222> (17)..(17)

<223> Xaa a 17. helyzetben His, Asp, Lys, Glu vagy Gln;

<220>

<221> változat

<222> (21)..(21)

<223> Xaa a 21. helyzetben Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg,
vagy Lys;

<220>

<221> változat

<222> (24)..(24)

<223> Xaa a 24. helyzetben Ala, Glu, Asp, Ser vagy His;

<220>

<221> változat

<222> (31)..(31)

<223> Xaa a 31. helyzetben Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro vagy Gly-Pro-NH₂, vagy hiányzik.

<400> 3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1

5

10

15

Xaa Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa

20

25

30

<210> 4

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (1)..(1)

<223> Xaa az 1. helyzetben L-hisztidin, D-hisztidin, dezamino-hisztidin, 2-amino-hisztidin, béta-hidroxi-hisztidin, homohisztidin, alfa-fluorometil-hisztidin vagy alfa-metil-hisztidin;

<220>

<221> változat

<222> (2)..(2)

<223> Xaa a 2. helyzetben Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Thr;

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben Asp, Glu, Gln, Asp, Lys, Arg vagy Cys;

<220>

<221> változat

<222> (31) .. (31)

<223> Xaa a 31. helyzetben -NH₂ vagy Gly.

<400> 4

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 5

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 5

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 6

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 6

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 7

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 7

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 8

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 8

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 9

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 9

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15



Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 10

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 10

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 11

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 11

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 12

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 12

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 13

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 13

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 14

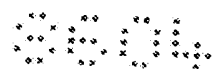
<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció



<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 15

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His

20 25 30

<210> 16

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció



<400> 16

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His

20 25 30

<210> 17

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 17

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His

20 25 30

<210> 18

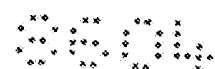
<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció



<400> 18

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His

20 25 30

<210> 19

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 20

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 21

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 21

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 22

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 22

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 23

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>



<223> szintetikus konstrukció

<400> 23

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 24

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa jelentése a 16. helyzetben ciszteinsav.

<400> 24

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 25

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben ciszteinsav.

<400> 25

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 26

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben ciszteinsav.

<400> 26

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 27

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 27

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 28

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 28

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 29

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 29

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 30

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 30

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 31

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben ciszteinsav.

<400> 31

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 32

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 32

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 33

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 34

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 34

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 35

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<900> 35

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 36

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben ciszteinsav.

<400> 36

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 37

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 37

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 38

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 38

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 39

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 39

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 40

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 41

<211> 30

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<220>

<221> változat

<222> (16)..(16)

<223> Xaa a 16. helyzetben ciszteinsav.

<400> 41

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 42

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 42

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 43

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 43

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30



<210> 44

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 44

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 45

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 45

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 46

<211> 31

<212> FEHÉRJE



<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 46

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys His Arg Gly

20 25 30

<210> 47

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 47

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His

20 25 30

<210> 48

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 48

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1

5

10

15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 49

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 49

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1

5

10

15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 50

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 50



His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25 30

<210> 51

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 51

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Gly Lys Arg Gly

20 25 30

<210> 52

<211> 31

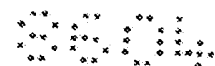
<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 52



His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
			20					25					30		

<210> 53

<211> 31

<212> FEHÉRJE

<213> mesterséges

<220>

<223> szintetikus konstrukció

<400> 53

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	His	
			20					25					30		

P0301212

1330812

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

Szabadalmi leírás

1. GLP-1 vegyület, amely vegyületet a következők közül választjuk ki: Val¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (a szekvencia száma: 5) és Val¹⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (a szekvencia száma: 32).
2. Az 1. igénypont szerinti GLP-1 vegyület, melyben a szóban forgó GLP-1 vegyület kétértékű fémionnal alkot komplexet.
3. A 2. igénypont szerinti GLP-1 vegyület, melyben a szóban forgó GLP-1 vegyület kétértékű cink-kationnal alkot komplexet.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti GLP-1 vegyület gyógyszerként történő alkalmazásra.
5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti GLP-1 vegyület nem inzulin-függő diabétesz kezelésénél történő alkalmazásra.
6. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti GLP-1 vegyület nem inzulin-függő diabétesz megelőző kezelésénél történő alkalmazásra.
7. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti GLP-1 vegyület elhízás, sztrók, miokardiális infarktus, sebészeti beavatkozást követő katabolikus változások vagy irritábilis bélszindróma kezelésénél történő alkalmazásra.
8. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti GLP-1 vegyület alkalmazása nem inzulin-függő diabétesz kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.
9. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti GLP-1 vegyület alkalmazása elhízás, sztrók, miokardiális infarktus, sebészeti beavatkozást követő katabolikus változások vagy irritábilis bélszindróma kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

Szentpéteri Zsolt
Szabadalmi ügyvivő
Szentpéteri Zsolt ügyvivői Iroda
H-1067 Budapest, József kör. 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099
E-mail: szentpeteri_zs@szpk.hu

Szabadalmi leírás

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGALO VÁLTOZAT

1. ÁBRA

NYOMDAPÉLDÁNY

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Asp-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Arg-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH

2. ÁBRA

NYOMDAPÉLDÁNY

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Asp-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Arg-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH

3. ÁBRA

NYOMDAPÉLDÁ

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH

His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH

P03 01212

4. ÁBRA

NYOMDAPÉLDÁNY

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Ala-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH