

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 952536 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **952536**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.05.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.05.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.09.1996**

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

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

21.03.1995 US 407831 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Galloway, John Allison, Indianapolis, IN 46260, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Hoffmann, James Arthur, Greenwood, IN 46143, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Glukagonia muistuttavia insulintrooppisia komplekseja, koostumuksia ja menetelmiä

Glukogonartande insulinotropa komplex, kompositioner och förfaranden

Glukagonia muistuttavia insulintrooppisia komplekseja, koostumuksia ja menetelmiä

5 Keksintö liittyy farmaseuttisen ja orgaanisen kemian alaan ja siitä saadaan käyttöön uusia yhdisteitä ja näiden farmaseuttisia koostumuksia, jotka ovat käyttökelpoisia tehostamaan insuliinin ilmentymistä nisäkkäiden haiman B-tyypin solusaarekkeiden soluista ja käytettäväksi nisäkkäällä olevan aikuistyyppin diabetes mellituksen vaatimaan hoitoon.

10 Haiman solusaarekkeiden sisäeritystuotteiden muodostumista säätelee monimutkainen säätelyjärjestelmä, jossa vaikuttavina tekijöinä eivät ainoastaan ole verestä peräisin olevat metaboliitit (glukoosi, aminohapot, katekoliamiinit ja niin edelleen) vaan myös paikalliset parakriinisesti vaikuttavat tekijät. Tärkeimmillä haiman solusaarekkeiden hormoneilla (glukagonilla, insuliinilla ja somatostatiinilla) on vuorovaikutuksia niille spesifisten solutyyppeiden kanssa (A-, B- ja D-solut, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna) niiden eritysvasteiden moduloimiseksi, jotka syntyvät edellä mainittujen metaboliittien välityksellä. Vaikkakin insuliinin erityis on pääasiallisesti veren glukoosipitoisuuksien säätelemää, niin somatostatiini inhiboi glukoosin välityksellä tapahtuvia insuliinin eritysvasteita. Sen parakriinisen säätelyn lisäksi, jonka on esitetty olevan insuliinin erittymiseen vaikuttavaa solusaarekkeiden välistä säätelyä, on saatu todisteita, jotka tukevat käsitystä suolen insulintrooppisten tekijöiden olemassaolosta. Tämä käsitys on lähtöisin havainnoista, joiden mukaan oraalisesti nautittu glukoosi stimuloi insuliinin eritystä voimakkaammin kuin vastaava suonensisäisesti annettu glukoosimäärä.

30 Ihmisen glukagonihormoni on haiman A-soluissa muodostuva 29 aminohapon suuruinen peptidihormoni. Tämä hormoni kuuluu rakenteeltaan toisiaan muistuttavien peptidien

multigeeniseen ryhmään, johon kuuluvat sekretiini, mahan inhibitorinen peptidi, vasoaktiivinen suolipeptidi ja glisentiini. Nämä peptidit säätelevät useilla eri tavoilla hiilihydraattien metaboliaa, gastrointestinaalista liikku-
 5 vuutta ja erityksen prosessointia. Haiman glukagonin tärkeimmät tunnistetut vaikutukset ovat kuitenkin maksan glykogenolyysin ja glukoneogeneesin edistäminen, joka joh-
 10 ttaa veren sokeripitoisuuksien kohoamiseen. Tässä suhteessa glukagonin vaikutukset ovat insuliinin vaikutuksille vastavaikutteisia säätelyvaikutuksia ja ne voivat myötä-
 vaikuttaa diabetes mellitukseen liittyvään hyperglykemiaan [Lund, P.K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (1982) 345 - 349].

Glukagonin on havaittu kykenevän sitoutumaan insu-
 15 liinia tuottavien solujen pinnalla oleviin spesifisiin reseptoreihin. Glukagoni stimuloi näihin reseptoreihin liittyttyään näitä soluja syntetöimaan nopeasti cAMP:ta. cAMP:n on puolestaan havaittu stimuloivan insuliinin il-
 20 mentymistä [Korman, L.Y., et al., Diabetes 34 (1985) 717 - 722]. Insuliini vaikuttaa glukagonin synteesiä inhiboivas-
 ti [Ganong, W.F., Review of Medical Physiology, Lange Publications, Los Altos, California, p. 273 (1979)]. Siten glukagonin ilmentyminen on insuliinin, ja pohjimmiltaan seerumin glukoosipitoisuuden, tarkasti säätelemää.

Glukagonigeenin translaatio tapahtuu aluksi 360 emäsparin suuruisesta prekursorimolekyylistä, josta muo-
 dostuu proglukagoni-polypeptidi [Lund, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (1982) 345 - 349]. Tämä poly-
 30 peptidi muokkautuu myöhemmässä vaiheessa proglukagoniksi. Patzelt, C., et al., Nature 282 (1979) 260 - 266, ovat osoittaneet, että proglukagoni pilkkoutuu myöhemmässä vai-
 heessa glukagoniksi ja toiseksi polypeptidiksi. Tämän jäl-
 keen ovat tutkijaryhmät Lund, P.K., et al., Lopez L.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 (1983) 5 485 - 5 489
 35 ja Bell, G.I., et al., Nature 302 (1983) 716 - 718 osoit-

taneet, että proglukagoni pilkkoutuu välittömästi lysiini-arginiini-dipeptidiryhmien jälkeen. Jokimonnin (Ictalurus punctata) tuottamasta proglukagonista suoritettut tutkimukset ovat osoittaneet, että tästä eläimestä peräisin oleva glukagoni pilkkoutuu myös proteolyttisesti vierekkäisten lysiini-arginiini-dipeptidiryhmien jälkeen [Andrews, P.C., et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 3 910 - 3 914, Lopez, L.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 (1983) 5 485 - 5 489]. Bell, G.I., et al., edellä, ovat tehneet sen löydön, että nisäkkäiden proglukagoni pilkkoutuu lysiini-arginiini- tai arginiini-arginiini-dipeptidien kohdalta ja he ovat osoittaneet, että proglukagonimolekyyli sisältää kolme erillistä ja erittäin homologista peptidimolekyyliä, joille on annettu nimitykset glukagoni, glukagonia muistuttava peptidi 1 (GLP-1) ja glukagonia muistuttava peptidi 2 (GLP-2). Lopez, et al. ovat tulleet siihen johtopäätökseen, että glukagonia muistuttava peptidi 1 on 37 aminohapporyhmän mittainen ja glukagonia muistuttava peptidi 2 on 34 aminohapporyhmän mittainen. Analogiset tutkimukset rotan preproglukagonin rakenteesta ovat paljastaneet samanlaisen vierekkäisten glysiini-arginiini- tai arginiini-arginiini-dipeptidiryhmien välistä tapahtuvan protolyttisen pilkkoutumistyyppin, josta muodostuu glukagonia, GLP-1:tä ja GLP-2:ta [[Heinrich, G., et al., Endocrinol. 115 (1984) 2 176 - 2 181]. Ihmisen, rotan, naudan ja hamsterin GLP-1:n sekvenssien on havaittu olevan identtiset [Ghiglione, M., et al., Diabetologia 27 (1984) 599 - 600].

Lopez, et al.':n GLP-1:n kokoa koskeva johtopäätös on vahvistettu Uttenthal, L.O., et al.':n tekemässä tutkimuksessa, J. Clin. Endocrinol. Metabol. 61 (1985) 472 - 479. Uttenthal, et al. ovat tutkineet ihmisen haimassa esiintyvän GLP-1:n molekulaarisia muotoja. Heidän tutkimuksensa on osoittanut, että GLP-1 esiintyy haimassa

37 aminohapon suuruisena peptidinä ja GLP-2 34 aminohapon suuruisena peptidinä.

GLP-1:n ja glukagonin välinen samanlaisuus antoi kysymystä ensiksi tutkineille aiheen otaksua, että GLP-1:llä saattaisi olla biologista aktiivisuutta. Vaikkakin jotkin tutkijoista ovat havainneet GLP-1:n kykenevän indusoimaan rotan aivosolut syntetisoimaan cAMP:ta [Hoosein, N.M., et al., *Febs Lett.* 178 (1984) 83 - 86], eivät muut tutkijat ole kyenneet löytämään GLP-1:lle minkäänlaista fysiologista tehtävää (Lopez, L.C., et al.). Koska GLP-1:lle ei oltu kyetty löytämään mitään fysiologista tehtävää, niin tämä on saanut jotkin tutkijoista asettamaan kyseenalaiseksi sen, onko GLP-1 itse asiassa hormoni ja onko glukagonin ja GLP-1:n välinen sukulaisuus mahdollisesti artefakti.

On myös kuvattu GLP-1 (7-37):n variantteja ja näiden analogeja. Näitä variantteja ja analogeja ovat esimerkiksi Gln⁹-GLP-1 (7-37), D-Gln⁹-GLP-1 (7-37), asetyyli-Lys⁹-GLP-1 (7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37), Lys¹⁸-GLP-1 (7-37) ja muut näitä muistuttavat variantit ja näiden johdannaiset, joihin kuuluvat esimerkiksi happoadditiosuolat, karboksylaattisuolat, alempialkyyliesterit ja amidit [tätä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa WO 91/11 457]. Useiden erilaisten kuvattujen GLP-1:n muotojen tiedetään stimuloivan tavallisesti insuliinin erittymistä (insulinotrooppinen vaikutus) ja cAMP:n muodostumista [näitä kysymyksiä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research* 40 (1992) 333 - 343].

Vielä merkittävämpää on, että useat tutkijat ovat osoittaneet yhteyden laboratoriossa suoritettujen kokeiden ja sellaisten nisäkkäiden, erityisesti ihmisten, insulino-
trooppisten vasteiden välillä, jotka on saatu elimistön ulkopuolelta annetulla GLP-1:llä, erityisesti GLP-1 (7-36) NH₂:lla ja GLP-1 (7-37):llä [tätä kysymystä on käsitelty

esimerkiksi julkaisuissa Nauck, M.A., et al., Diabetologia 36 (1993) 741 - 744; Gutniak, M., et al., New England J. of Medicine 326(20) (1992) 1 316 - 1 322; Nauck, M.A., et al., J. Clin. Invest. 91 (1993) 301 - 307; ja Thorens, B., et al., Diabetes 42 (1993) 1 219 - 1 225].

Hyperglykemiaa aiheuttaviksi perustavanlaatuisiksi vaurioiksi on aikuistyyppin diabeteksessa tunnistettu tarkemmin sanottuna heikentynyt endogeenisen insuliinin erittyminen ja lihaksen ja maksan resistenssi insuliinin vaikutuksille [Galloway, J.S., Diabetes Care 13 (1990) 1 209 - 1 239]. Viimeksi mainittu puute johtaa glukoosin liialliseen muodostumiseen maksasta käsin. Kun normaali henkilö vapauttaa glukoosia nopeudella noin 2 mg/kg minuutissa, niin aikuistyyppin diabetespotilailla tämä nopeus tavallisesti ylittää arvon 2,5 mg/kg minuutissa, joka johtaa ainakin 70 glukoosigramman nettoylimäärään 24 tuntia kohti. Se tosiseikka, että maksan glukoosin tuoton, veren paastoglukoosiarvon ja glykohemoglobiinin määritysten osoittaman yleisen metabolian säätelyn välillä esiintyy erittäin voimakkaita korrelaatioita [Galloway, J.A., edellä, ja Galloway, J.A., et al., Clin. Therap. 12 (1990) 460 - 472], on poikkeuksitta havaittavissa, että veren paastoglukoosiarvon säätely on sine quo non mahdollisuuksille koko metabolian normalisoimiseen riittävässä määrin hyperglykemiakomplikaation ehkäisemiseksi. Siihen nähden, että glukoosin muodostuminen maksassa saadaan nykyisillä insuliinimuodoilla harvoin normaaliksi merkittävää hyperinsulinemiaa ja hypoglykemiaa aiheuttamatta (Galloway, J.A., ja Galloway, J.A., et al., edellä), ovat vaihtoehtoiset ratkaisutavat tarpeellisia.

GLIP-1 (7-36)NH₂:n suonensisäisellä infuusiolla kaksi kertaa normaaleja seerumikonsentraatioita suurempien konsentraatioiden aikaansaamiseksi on osoitettu saatavan seuraavassa taulukossa esitetyt vaikutukset.

	Normaalit koehenkilöt	Aikuistyyppin diabetespo- tilaat	
5	Ateriaglykemia (1)	ei muutoksia	pienentynyt
	Paastoglykemia (2)	ei muutoksia	pienentynyt
	Paastoglykemia (2)	ei muutoksia	pienentynyt
	Aterioinnin jäl- keinen glukagoni	ei muutoksia	pienentynyt
	Edogeenisen insu- liinin erittymi- nen vasteena ateriointiin (1)	ei muutoksia	lisääntynyt
	Vapaat rasvahapot	vähentyneet (3)	vähentyneet (2)

(1) Gutniak, M., et al., edellä.

(2) Nauck, M.A., et al., Diabetologia, edellä.

15 (3) Orskov, C., et al., Diabetes 42 (1993) 658 - 661.

GLP-1:n ja erityisesti nisäkkäille annettavissa farmaseuttisissa koostumuksissa komponenttina käytettävän GLP-1:n pysyvyys pitkällä aikavälillä on kuitenkin kyseen-
20 alaista. Matalassa 4 °C:n lämpötilassa varastoituna on GLP-1 (7-37):n sivutuotteita havaittu itse asiassa niinkin aikaisin kuin 11 kuukautta näytteen valmistamisesta (Mojsov, S., edellä). On siten tarvetta saada käyttöön pysyvämpi GLP-1-yhdiste, jota voidaan antaa turvallisesti
25 tällaisen hoidon tarpeessa oleville nisäkkäille.

Lisäksi GLP-1-molekyylien biologinen puoliintumisaika on melko lyhyt, mikä pitää erityisesti paikkansa niiden molekyylien suhteen, joihin dipeptidyylipeptidaasi IV (DPP IV) -aktiivisuudella on vaikutusta. Esimerkiksi GLP-1
30 (7 - 37):n biologinen puoliintumisaika on ainoastaan 3 - 5 minuuttia ja siihen vaikuttaa lisäksi sen nopea absorptio sen jälkeen kun sitä on annettu parenteraalisesti nisäkkäälle. Siten on myös olemassa tarvetta saada käyt-

töön GLP-1-yhdiste, joka viivästää tällaisen antamisen jälkeen tapahtuvaa absorptiota.

Tämän mukaisesti tällä keksinnöllä on saatu ratkaistua natiiveihin GLP-1-molekyyleihin liittyvä pysymättömyys seerumissa ja lyhyt puoliintumisaika seerumissa. Tämän keksinnön mukaisella yhdisteillä on lisäksi myös mahdollista saada viivästettyä absorptiota niiden parenteraalisen annostelun jälkeen, minkä johdosta niiden biologisten puoliintumisaikojen tulisi olla pitkiä. Keksinnöstä saadaan myös käyttöön myös tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden farmaseuttisia koostumuksia sekä menetelmiä näiden yhdisteiden käyttämiseksi.

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön kompleksi, joka muodostuu divalenttisesta metallikationista ja tähän liittyvästä ja tämän kanssa yhtäaikaan saostumaan kykenevästä yhdisteestä, jolla on kaava:

R_1 -X-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Y-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Z-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg- R_2

jossa:

R_1 on L-histidiini, D-histidiini, desaminohistidiini, 2-aminohistidiini, β -hydroksihistidiini, homohistidiini, alfafluorimetyylihistidiini tai alfametyylihistidiini;

X on Ala, Gly, Val, Thr, Ile tai alfa-metyyli-Ala;

Y on Glu, Gln, Ala, Thr, Ser tai Gly;

Z on Glu, Gln, Ala, Thr, Ser tai Gly;

R_2 on NH_2 tai Gly-OH; edellyttäen, että yhdisteen isoelektrinen piste on alueella noin 6,0 - noin 9,0 ja lisäksi edellyttäen, että silloin kun R_1 on His, X on Ala, Y on Glu ja Z on Glu, niin R_2 :n on oltava NH_2 .

Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön sellainen farmaseuttinen koostumus, joka sisältää tämän keksinnön mukaista yhdistettä yhdessä yhden tai useamman farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen, laimentimen tai lisäaineen kanssa.

Tästä keksinnöstä saadaan vielä käyttöön menetelmä insuliinin ilmentymisen tehostamiseksi, menetelmä käsittää sen, että tehokas määrä tämän keksinnön mukaista yhdistettä saatetaan vaikuttamaan nisäkkäiden haiman B-tyyppiseen solusaarekesoluun, sekä menetelmä aikuistyyppin diabetes mellituksen hoitamiseksi, joka menetelmä käsittää sen, että tällaisen hoidon tarpeessa olevalle nisäkkäälle annetaan tehokas määrä tämän keksinnön mukaista yhdistettä.

Yhdestä tämän keksinnön kohteesta saadaan käyttöön kompleksi, joka koostuu divalenttisen metallikationin kanssa kompleksina esiintyvistä GLP-1-molekyylistä, jonka isoelektrinen piste on alueella noin 6,0 - noin 9,0.

Tässä keksinnössä termi "GLP-1-molekyyli" tarkoittaa luonnossa esiintyvää GLP-1 (7-36)NH₂:ta, GLP-1 (7-37):ää, näiden luonnollisia ja luonnossa esiintymättömiä toiminnallisia analogeja ja johdannaisia sekä näiden suo-
loja. GLP-1 (7-36)NH₂:n aminohapposekvenssi on tällä alalla tunnettu, mutta se on lukijaa ajatellen esitetty tässä uudelleen:

His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-NH₂.

GLP-1 (7-37):n kyseessä ollessa tulee GLP-1 (7-36) NH₂-molekyylin karboksiterminaalisen Arg³⁶:n funktionaalisen aminoryhmän tilalle asemaan 37 Gly.

Tällä alalla on lisäksi kuvattu useita GLP-1 (7-36)NH₂- ja GLP-1 (7-37) -molekyylien suojattuja, suojaamattomia ja osittain suojattuja luonnollisia ja luonnossa esiintymättömiä toiminnallisia analogeja ja johdannaisia ja valmistusta [näitä on käsitelty esimerkiksi US-patenttijulkaisuissa nro 5 120 712 ja 5 118 666, jotka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säädösten nojalla, sekä julkaisuissa Orskov, C., et al., J. Biol. Chem. 264(22) (1989) 12 826 - 12 829 ja WO 91/11 457 (Buckley, D.I., et al., julkaistu 8.8.1991)].

Kuten tällä alalla on tunnettua, voivat aminohapporyhmät olla suojatussa muodossaan, jossa sekä amino- että karboksiryhmien suojana ovat asianmukaiset suojaavat ryhmät, osittain suojatussa muodossa, jossa joko amino- tai karboksiryhmien suojana ovat asianmukaiset suojaavat ryhmät tai suojaamattomassa muodossa, jossa mitään aminoryhmää eikä mitään karboksiryhmää ole suojattu asiaankuuluvalla suojaavalla ryhmällä. Useita reaktioita tällaisten suojaavien ryhmien muodostamiseksi ja poistamiseksi on kuvattu useissa oppikirjoissa, mukaanlukien esimerkiksi "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press (London and New York, 1973); Green, T.H., "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley (New York, 1981); ja "The Peptides", Vol. I, Schröder and Lübke, Academic Press (London and New York, 1965).

Edustavia aminoryhmää suojaavia ryhmiä ovat esimerkiksi formyylili, asetyyli, isopropyyli, butoksikarbonyyli, fluorenyylimetoksikarbonyyli, karbobentsyylioksi ja muut näitä muistuttavat ryhmät.

Edustavia karboksiryhmää suojaavia ryhmiä ovat esimerkiksi bentsyyliesteri, metyyliesteri, etyyliesteri, t-butyliesteri, p-nitrofenyyliesteri ja muut näitä muistuttavat ryhmät.

Termi "suojattu" tarkoittaa niiden suojattujen muotojen lisäksi, joissa sekä amino- että karboksiryhmissä on asiaankuuluvat suojaavat ryhmät, niitä GLP-1-molekyylejä, joihin dipeptidyylipeptidaasi IV -aktiivisuudella ei ole vaikutusta tai jotka ovat inhibitorisia tälle aktiivisuudelle [näitä kysymyksiä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Mentlein, R., et al., Eur. J. Biochem. 214 (1993) 829 - 835]. GLP-1 (7-36)NH₂:n lisäksi edullisia ovat DPP IV -aktiivisuutta vastaan suojatut molekyylit, ja edullisempia ovat Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, α-metyyli-Ala⁸-GLP-1 (7-36)NH₂ ja Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37)OH .

Luonnossa esiintyvien GLP-1-molekyylien johdannaiset ovat niitä peptidejä, jotka on saatu fragmentoimalla luonnossa esiintyvää sekvenssiä tai jotka on syntetioitu sillä perusteella, että tunnetaan se luonnossa esiintyvän aminohapposekvenssin sekvenssi, joka sisältyy tätä sekvenssiä koodaavaan geneettiseen materiaaliin (DNA tai RNA). Termi "johdannaiset" sisältää myös luonnossa esiintyvien tai luonnossa esiintymättömien GLP-1-molekyylien kemiallisen modifioinnin. Menetelmät näiden johdannaisten valmistamiseksi ovat tunnettuja orgaanisen kemian ja peptidikemian tavanomaisen ammattitaidon perusteella (tätä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa WO 91/11 457, edellä).

Tämän keksinnön mukaisia GLP-1-molekyyliä ovat myös GLP-1 (7-36)NH₂:n ja GLP-1 (7-37):n analogit sekä näiden johdannaiset, joihin on lisätty yksi tai useampi aminohappo, jota ei esiinny alkuperäisessä sekvenssissä, tai joista yksi tai useampi tällainen aminohappo on poistettu. R₁:tä edustavia ryhmiä ovat edullisesti His ja desaminohistidiini jos vain koko molekyylin isoelektrinen piste on alueella noin 6 - 9. "X"-asemassa olevia edullisia ryhmiä ovat Ala, Gly ja Val jos vain koko molekyylin isoelektrinen piste on alueella noin 6 - 9. Samoin "Y"-asemassa ovat edullisia Glu ja Gln, jos vain koko molekyylin isoelektrinen piste on alueella noin 6 - 9. "Z"-asemassa ovat myös edullisia Glu ja Gln, jos vain koko molekyylin isoelektrinen piste on alueella noin 6 - 9. Lopuksi R₂:n kyseessä ollessa edullinen ryhmä on Gly-OH, jos vain koko molekyylin isoelektrinen piste on alueella noin 6 - 9.

Tämä keksintö sisältää lisäksi GLP-1-molekyylin suolamuodon. Tämän keksinnön mukaisessa GLP-1:ssä voi olla riittävän happamia, riittävän emäksisiä tai kumpaakin tällaista tyyppiä olevia funktionaalisia ryhmiä ja tämän mukaisesti se reagoi minkä tahansa usean epäorgaanisen emäk-

sen ja epäorgaanisen sekä orgaanisen hapon kanssa muodostaen suolan. Happoadditiosuolojen muodostamiseen tavallisesti käytetyt hapot ovat epäorgaanisia happoja, kuten suolahappo, hydrobromihappo, hydrojodihappo, rikkihappo, fosforihappo ja muut näitä vastaavat hapot, ja orgaanisia happoja, kuten p-tolueenisulfonihappo, metaanisulfonihappo, oksaalihappo, p-bromifenyyli-sulfonihappo, hiilihappo, meripihkahappo, sitruunahappo, bentsoehappo, etikkahappo ja muut näitä vastaavat hapot. Esimerkkejä tällaisista suoloista ovat sulfaatti, pyrosulfaatti, bisulfaatti, sulfiitti, bisulfiitti, fosfaatti, monovetyfosfaatti, divetyfosfaatti, metafosfaatti, pyrofosfaatti, kloridi, bromidi, jodidi, asetaatti, propionaatti, deka-

15 ti, kaproaatti, heptanoaatti, propiolaatti, oksalaatti, malonaatti, sukkinaatti, suberaatti, sebakaatti, fumaraatti, maleaatti, butyyni-1,4-dioaatti, heksyyni-1,6-dioaatti, bentsoaatti, klooribentsoaatti, metyylibentsoaatti, dinitrobentsoaatti, hydroksibentsoaatti, metoksibentsoaatti, ftalaatti, sulfonaatti, ksyleenisulfonaatti, fenyyli-

20 asetaatti, fenyyli-propionaatti, fenyylibutyraatti, sitraatti, laktaatti, gamma-hydroksibutyraatti, glykolaatti, tartraatti, metaanisulfonaatti, propaanisulfonaatti, naftaleeni-1-sulfonaatti, naftaleeni-2-sulfonaatti, mande-

25 laatti ja muut näitä vastaavat suolat. Edullisia happoadditiosuoloja ovat mineraalihappojen, kuten suolahapon ja hydrobromihapon ja erityisesti suolahapon kanssa muodostetut suolat.

Emäsadditiosuoloja ovat sellaiset suolat, jotka ovat peräisin epäorgaanisista emäksistä, kuten ammoniumista tai alkali- tai maa-alkalimetallihydroksideista, karbonaateista, bikarbonaateista ja muista näistä vastaavista emäksistä. Siten tällaisten tämän keksinnön mukaisten suolojen valmistamiseksi käyttökelpoisia emäksiä ovat

35 natriumhydroksidi, kaliumhydroksidi, ammoniumhydroksidi,

kaliumkarbonaatti ja muut vastaavat emäkset. Suolamuodot ovat erityisen edullisia.

Käytettäessä tämän keksinnön mukaisia yhdisteitä farmakoterapeuttisiin tarkoituksiin voivat nämä yhdisteet
5 olla luonnollisesti myös suolan muodossa, mutta suolan on oltava farmaseuttisesti hyväksyttävä.

Tämän keksinnön mukaisia GLP-1-molekyylejä ovat siten muun muassa ne GLP-1-molekyylit, joissa on osoitettu olevan toimivaa insulिनotrooppista aktiivisuutta. Termi
10 "insulिनotrooppinen aktiivisuus" tarkoittaa aineen kykyä stimuloida insuliinihormonin synteesiä tai ilmentymistä tai saada aikaan synteesin tai ilmentymisen stimulaatio.

Yhdisteen insulिनotrooppinen ominaisuus voidaan määrittää käsittelemällä eläinsolua tällä yhdisteellä ja
15 seuraamalla immunoreaktiivisen insuliinin (IRI) vapautumista kasvatusliuokseen tai tai ruiskuttamalla tätä yhdistettä eläimiin ja seuraamalla immunoreaktiivisen insuliinin vapautumista eläimen verenkiertoon. IRI havaitaan käyttämällä radioimmunomäärittystä, jolla insuliini kyetään
20 spesifisesti havaitsemaan.

Vaikka voidaankin käyttää mitä tahansa sellaista radioimmunomäärittystä, jolla IRI kyetään havaitsemaan, on edullista käyttää julkaisun Albano, J.D.M., et al., Acta Endocrinol. 70 (1972) 487 - 509 mukaisen määrittämen modifikaatiota. Tässä modifikaatiossa käytetään fosfaatti/albumiini-puskuria, jonka pH on 7,4. Inkubointiseos valmistetaan lisäämällä 10 x 75 mm suuruiseen kertakäyttöiseen lasiseen koeputkeen peräkkäin 500 µl fosfaattipuskuria, 50 µl perfusaattinäytettä tai perfusaattiin valmistettua rotan insuliinistandardia, 100 µl anti-insuliini-antiseerumia (Wellcome Laboratories; laimennos 1 : 40 000) ja 100 µl [¹²⁵I]-insuliinia, jolloin kokonaistilavuudeksi muodostuu 750 µl. Kun seosta on inkuboitu 2 - 3 päivää 4 °C:ssa, niin vapaa insuliini erotetaan vasta-aineeseen
35 sitoutuneesta insuliinista erottamalla tämä aktiivihiltä

käyttäen. Määrityksen herkkyys on 1 - 2 $\mu\text{U/ml}$. Kudosvil-
 jelmässä kasvatettuista soluista soluviljelymediumiin va-
 pautuneen IRI:n määrittämiseksi lisätään radioaktiivinen
 leima edullisesti proinsuliiniin. Vaikka voidaankin käyt-
 5 tää mitä tahansa sellaista radioaktiivista leimaa, jolla
 polypeptidi kyetään varustamaan leimalla, on leimalla va-
 rustetun proinsuliinin aikaansaamiseksi edullista käyttää
 ^3H -leusiinia. Leimalla varustamiseen voidaan varata mikä
 tahansa sellainen riittävän pituinen aika, että sillä saa-
 10 daan syntymään havaitsemisen mahdollistava leimalla varus-
 tettu erä proinsuliinimolekyylejä; soluja on kuitenkin
 edullista inkuboida radioaktiivisen leiman läsnäollessa
 60 minuutin ajan.

Vaikka molekyylin insulintrooppisen vaikutuksen
 15 määrittämiseen voidaankin käyttää useita insuliinin ilmen-
 tämiseen kykeneviä solulinjoja, on edullista käyttää rotan
 insulinoomasoluja, erityisesti rotan RIN-38-insulinooma-
 soluja. Tällaisia soluja voidaan kasvattaa missä tahansa
 sopivassa mediumissa; on kuitenkin edullista käyttää DME-
 20 mediumia, joka sisältää 0,1 % BSA:ta ja 25 mM glukosia.

Yhdisteen insulintrooppinen ominaisuus voidaan
 myös määrittää infusoimalla haimaa. in situ -olosuhteissa
 eristetty perfusoitu rotan haimapreparaatti on modifika-
 tio julkaisussa Penhos, J.C., et al., Diabetes 18 (1969)
 25 733 - 738 esitetystä menetelmästä. Ravinnotta pidettyjä
 urospuolisia 350 - 600 g painoisia Charles River -kannan
 albinorottia nukutetaan ruiskuttamalla niihin intraperi-
 toneaalisesti amytaalinatriumia (Eli Lilly & Co: 160 ng/
 kg). Munuaisten, lisämunuaisten, mahan ja koolonin alaosan
 30 verisuonet suljetaan. Koko suoli typistetään pohjukaissuo-
 len noin 4 cm suuruista osaa sekä laskevaa koolonia ja
 rektumia lukuunottamatta. Tämän johdosta perfuusiassa on
 ainoastaan pieni osa suolesta, mikä minimoi suolistope-
 räisten aineiden glukagonityyppistä immunoreagoivuutta
 35 mahdollisesti estävän vaikutuksen. Perfusaatti on modifi-

oitu Krebs-Ringer-bikarbonaattipuskuri, joka sisältää 4 % dekstraani T70:aa ja 0,2 % naudan seerumialbumiinia (fraktio V), ja sitä kuplitetaan 95 % O₂:ta ja 5 % CO₂:ta sisältävällä seoksella. Perfusointiin käytetään 4-kanavaista pulssittoman virtauksen antavaa letkupumppua (Buchler polystatic, Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp.) ja tuleva perfusaatti vaihdetaan toiseen kolmitiehanaa käyttäen. Perfuusion suoritus, monitorointi ja analysointitapa on julkaisussa Weir, G.C., et al., J. Clin. Inestigat. 54 (1974) 1 403 - 1 412 kuvatun menetelmän mukainen, joka menetelmä on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säädösten nojalla.

Tämän keksinnön mukaisissa GLP-1-molekyyleissä on oltava niiden aminoterminalisessa päässä sijaitseva toiminnallinen histidiiniryhmä. Tämän keksinnön mukaisissa GLP-1-molekyyleissä voi tarvittavan toiminnallisen histidiiniryhmän tilalla olla modifioitu histidiiniryhmä.

Termi "modifioitu histidiini" tarkoittaa toiminnallista histidiiniryhmää, jota on kemiallisesti tai biologisesti muutettu, tai muutettua toiminnallista histidiiniryhmää, joka on syntetioitu de novo, mutta jossa sen metallia sitovat ominaisuudet ovat säilyneet.

Tällä alalla tunnetaan useita tällaisia modifioituja funktionaalisia histidiiniryhmiä sekä tapoja niiden valmistamiseksi ja näitä ovat esimerkiksi D-histidiini (WO 91/11457), desaminohistidiini (WO 92/18531), 2-aminohistidiini [Levine-Pinto, H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 103(4) (1981) 1 121 - 1 130], hydroksi-L-histidiini [Owa, T, et al., Chemistry Letters (1988) pp. 1 873 - 1 874], L-homohistidiini [Altman, J., et al., Synthetic Commun. 19(11&12) (1989) 2 069 - 2 076], α -fluorimetyylihistidiini (US-patenttijulkaisu nro 4 347 374) ja α -metyylihistidiini [O'Donnell, M.J., Synthetic Commun., 19(7&8) (1989) 1 157 - 1 165].

Tämän keksinnön mukaisten GLP-1-molekyylien isoelektrisen pisteen on oltava alueella noin 6,0 - noin 9,0. On kuvattu useita GLP-1-molekyyliä, joiden isoelektrinen piste on tällä alueella ja näitä ovat esimerkiksi

- 5 GLP-1 (7-36)NH₂
- Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂
- Gln⁹-GLP-1 (7-37)
- D-Gln⁹-GLP-1 (7-37)
- asetyyli-Lys⁹-GLP-1 (7-37)
- 10 Thr⁹-GLP-1 (7-37)
- D-Thr⁹-GLP-1 (7-37)
- Asn⁹-GLP-1 (7-37)
- D-Asn⁹-GLP-1 (7-37)
- Ser²²-Arg²³-Arg²⁴-Gln²⁶-GLP-1 (7-37)
- 15 Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)
- Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)
- Arg²³-GLP-1 (7-37)
- Arg²⁴-GLP-1 (7-37),

- ja muut näitä vastaavat molekyylit (näitä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa WO 91/11 457, edellä). Tämän keksinnön mukaisten GLP-1-molekyylien isoelektriset pisteet ovat lisäksi edellä mainitulla alueella silloin, kun niissä toiminnallisen histidiiniryhmän tilalla on kukin edellä mainituista modifioiduista toiminnallisista histidiiniryhmistä. Menetelmät muiden GLP-1-molekyylien isoelektrisen pisteen laskemiseksi tai tämän kokeelliseksi määrittämiseksi ovat alan ammattikokemuksen perusteella tunnettuja.

- Menetelmät tämän keksinnön mukaisten GLP-1-molekyylien valmistamiseksi ovat myös peptidikemian alan tavanomaisen ammattikokemuksen perusteella tunnettuja.

- Yhdessä menetelmässä valmistetaan GLP-1-molekyylit käyttämällä tunnettua kiinteän faasin peptidisynteesikavioita, joita on kuvattu julkaisuissa Merrifield, J.M., Chem. Soc. 85 (1962) 2 149 ja Stewart ja Young, Solid

Phase Peptide Synthesis, pp. 24 - 66, Freeman (San Francisco, 1969). Proglukagonipolypeptidin tai GLP-1 (1-37):n fragmentteja on myös mahdollista saada aikaan fragmentoimalla luonnossa esiintyviä aminohapposekvenssejä käyttäen esimerkiksi proteolyyttistä entsyymiä. Lisäksi on mahdollista saada aikaan proglukagonipeptidin tai GLP-1 (1-37):n haluttuja fragmentteja käyttämällä yhdistelmä-DNA-tekniikkaa teoksessa Maniatis, T., et al., Molecular Biology: A Laboratory Manual, CSH (Cold Spring Harbor, 1982), kuvatulla tavalla.

Samoin molekyylibiologian tekniikan tason mukaan on mahdollista alan ammattikokemuksen perusteella käyttää muita keinoja tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden aikaansaamiseksi. Vaikka käyttöön soveltuvia tuotantomahdollisuuksia ovatkin kiinteän faasin peptidisynteesi tai yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttö, niin yhdistelmä-tekniikkaan perustuvat menetelmät voivat olla edullisia, koska niillä on mahdollista saada suurempia saantoja. Perusvaiheet yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettaessa ovat:

20 a) eristetään luonnollinen GLP-1-molekyyliä koodaava DNA-sekvenssi tai konstruoidaan GLP-1-molekyyliä koodaava synteettinen tai puolisynteettinen DNA-sekvenssi,

b) sijoitetaan koodaava sekvenssi ilmentämisvektoriin sillä tavalla, joka soveltuu proteiinien ilmentämiseen joko yksinään tai fuusioproteiineina,

25 c) transformoidaan asiaankuuluva eukaryoottinen tai prokaryoottinen isäntäsolu ilmentämisvektorilla,

d) viljellään transformoitua isäntäsolua olosuhteissa, jotka tekevät GLP-1-molekyylin ilmentymisen mahdolliseksi,

30 e) otetaan yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettu GLP-1-molekyyli talteen ja puhdistetaan tämä.

Kuten aikaisemmin mainittiin, voivat koodaavat sekvenssit olla täysin synteettisiä tai aikaansaatuja modifioimalla suurempaa natiivia glukagonia koodaavaa DNA:ta.

Preproglukagonia koodaava DNA-sekvenssi on esitetty julkaisussa Lund, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 345 - 349, ja sitä voidaan käyttää lähtömateriaalina tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden puolisynteettisessä tuotannossa muuntamalla natiivia sekvenssiä haluttujen tulosten aikaansaamiseksi.

Synteettisiä geenejä, joiden transkriptio tai translaatio in vitro- tai in vivo -olosuhteissa johtaa GLP-1-molekyylin syntymiseen, voidaan konstruoida tällä alalla tunnetuilla menetelmillä. Tämän alan ammattikokemuksen perusteella tiedetään, että geneettisen koodin luonnollisen degeneratiivisuuden vuoksi voidaan konstruoida huomattava, mutta kuitenkin rajallinen, määrä DNA-sekvenssejä, jotka kaikki koodaavat GLP-1-molekyyliä.

Synteettisten geenien konstruointiin käytetyt menetelmät ovat tällä alalla tunnettuja. Näitä on käsitelty julkaisussa Brown, et al. (1979) Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol 68 pgs. 109 - 151. GLP-1-molekyyliä koodaavia DNA-sekvenssejä voidaan suunnitella tässä keksinnössä kuvattujen aminohapposekvenssien perusteella. Sitten kun sekvenssi on suunniteltu, niin varsinainen sekvenssi voidaan valmistaa käyttäen DNA:n syntetointilaitetta, kuten mallin 380A tai mallin 380B DNA-syntetointilaitteita (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404).

GLP-1-molekyylin ilmentämistä varten muokattu synteettinen DNA-sekvenssi liitetään mihin tahansa monista asiaankuuluvista yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektoreista käyttämällä asiaankuuluvia restriktioendonukleaseja. Näitä on käsitelty yleisesti teoksessa Maniatis, et al. (1989) Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1 - 3. GLP-1-molekyyliä koodaavan DNA:n molempiin päihin muokataan kohdat niiden pilkkomiseksi restriktioendonukleasilla, mikä tarkoituksena on helpottaa molekyylien eristämistä tunne-

tuista monistus- ja ilmentämisvektoreista ja molekyylien liittämistä näihin. Tiettyjen nimenomaisten endonukleaasi- en käytöstä määräävät lähtömuotona käytettävän ilmentämis-vektorin pilkkomismahdollisuudet restriktioendonukleaa-
 5 seilla. Restriktiokohdat valitaan siten, että koodaava sekvenssi tulee oikeaan orientaatioon ohjaavien sekvenssi- en suhteen, jotta kyseessä olevan proteiinin lukeminen ja ilmentäminen saadaan tapahtumaan oikeassa lukukehyksessä. Koodaava sekvenssi on sijoitettava oikeaan lukukehykseen
 10 ilmentämisvektorin promoottorin ja ribosomin sitoutumis- kohdan suhteen, jotka kumpikin ovat toiminnallisia isäntä- solussa, jossa proteiinia on määrä ilmentää.

Synteettisen geenin tehokkaan transkription aikaan- saamiseksi on tämän geenin oltava toiminnallisessa yhtey-
 15 dessä promoottori-operaattorialueeseen. Tästä syystä syn- teettisen geenin promoottori-operaattorialue sijoitetaan samaan peräkkäiseen orientaatioon synteettisen geenin ATG- aloituskodonin suhteen.

Tällä alalla tunnetaan useita erilaisia ilmentämis-
 20 vektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia prokaryoottisten ja eukaryoottisten solujen transformoimiseen. Niistä on tie- toja tuoteluetteloissa The Promega Biological Research Products Catalogue (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53 711 - 5 399); ja The Strata-
 25 gene Cloning Systems Catalogue (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037). Myös US-patenttijulkaisussa nro 4 710 473 on kuvattu rengasmai- sia DNA-plasmiditransformaatiovektoreita, jotka ovat käyt- tökelpoisia ulkopuolisten geenien voimakkaaseen ilmentämi-
 30 seen E. colissa. Nämä plasmidit ovat käyttökelpoisia transformaatiovektoreina yhdistelmä-DNA-menetelmissä ja

(a) antavat plasmidille kyvyn replikoitua itsenäi- sesti isäntäsolussa;

(b) säätelevät autonomista plasmidin replikaatiota sen lämpötilan suhteen, jossa isäntäsoluviljelmiä kasvatetaan;

5 (c) stabiloivat plasmidin pysyvyyttä isäntäsolupopulaatioissa;

(d) ohjaavat proteiinituotteen synteesiä, mikä antaa osoituksen plasmidin pysymisestä isäntäsolupopulaatiossa;

10 (e) antavat käyttöön ryhmän restriktioendonukleaa-sien tunnistuskohtia, jotka esiintyvät ainutkertaisesti tässä plasmidissa;

(f) lopettavat mRNA:n transkription.

15 Nämä rengasmaiset DNA-plasmidit ovat käyttökelpoisia vektoreina yhdistelmä-DNA-menetelmissä ulkopuolisten geenien voimakkaan ilmentymisen aikaansaamiseksi.

20 Kun GLP-1-molekyyliä varten on konstruoitu ilmentämisvektori, niin seuraava vaihe on siirtää vektori sopivaan soluun ja konstruoida näin yhdistelmä-isäntäsolu, joka on käyttökelpoinen tämän polypeptidin ilmentämisessä. Menetelmät solujen transformoimiseksi yhdistelmä-DNA-vektoreilla ovat tällä alalla tunnettuja ja niitä on esitetty yleisteoksissa, kuten Maniatis, et al. edellä. Isäntäsoluja voidaan konstruoida joko eukaryoottisista tai prokaryoottisista soluista.

25 Prokaryoottiset isäntäsolut tuottavat tavallisesti suurehkoja määriä proteiineja ja niiden viljely on melko helppoa. Voimakkaissa bakteerien ilmentämisjärjestelmissä ilmentyvät proteiinit aggregoituvat tunnusomaisesti ylimäärin ilmennettyä proteiinia sisältäviksi rakeiksi eli inkluusiokappaleiksi. Tällaiset proteiiniaggregaatit on 30 tyypillisesti solubilisoitava, denaturoitava ja laskostettava uudelleen käyttäen tällä alalla tunnettuja menetelmiä. Näitä kysymyksiä on käsitelty julkaisuissa Kreuger, et al. (1990) teoksessa Protein Folding, Gierasch ja King, 35 eds., pgs 136 - 142, American Association for the Advance-

ment of Science Publication nro 89 - 18S, Washington, D.C.; ja US-patenttijulkaisu nro 4 923 967.

5 Kun haluttu GLP-1-molekyyli on valmistettu, niin edellyttäen, että sen isoelektrinen piste on alueella noin 6,0 - noin 9,0, tämän keksinnön mukaiset kompleksit valmistetaan muodostamalla halutun GLP-1-molekyylin kompleksidivalenttisen metallikationin kanssa tällä alalla tunnettuja menetelmiä käyttäen. Näitä metallikationeja ovat esimerkiksi Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} ja muut näitä vastaavat kationit. Metallikationeista ovat edullisia Zn^{++} -kationit.

15 Haluttu GLP-1-molekyyli, jonka isoelektrinen piste on halutunlainen, yhdistetään tavallisesti seokseen, joka sisältää asiaankuuluvaa puskuria ja asiaankuuluvaa metallikationin muotoa.

20 Asiaankuuluvat puskurit ovat sellaisia puskureita, jotka pitävät seoksen pH:n noin 6,0:sta noin 9,0:aan mutta jotka eivät häiritse reaktiota. Edullisia puskureita ovat Goode'n puskurit, erityisesti HEPES, sekä Tris ja Tris-asetaatti.

25 Asianmukaiset metallikationin muodot voivat olla mikä tahansa sellainen divalenttisen metallikationin muoto, joka on käytettävissä kompleksin muodostamiseen tämän keksinnön mukaisen GLP-1-molekyylin kanssa. Edullisesti käytetään ylimäärin divalenttisen metallin kationin suolaa, kuten sinkkikloridia, sellaisen moolisuhteen aikaansaamiseksi, joka on korkeintaan noin 50 molekyyliä divalenttista metallikationia kutakin GLP-1-substraattimolekyyliä kohti.

30 Tässä vaiheessa käytetty lämpötila on sellainen, joka on riittävää luokkaa reaktion loppuun menemisen aikaansaamiseksi. Reaktio suoritetaan tyypillisesti ympäristön lämpötilassa.

Tämän reaktion tuote, kiteinen tai amorfinen suspensio, eristetään ja puhdistetaan vakiomenetelmiä käyttäen.

5 Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät tämän keksinnön mukaista yhdistettä yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen, laimentimen tai lisäaineen kanssa. Tällaisia farmaseuttisia koostumuksia valmistetaan farmaseuttisten aineiden valmistuksen alalla tunnetulla tavalla ja
10 niitä annetaan yksittäin tai muihin terapeuttisiin aineisiin yhdistettynä, edullisesti parenteraalisia antoteitä käyttäen. Erityisen edullisia antoteitä ovat antaminen lihaksensisäisesti ja ihonalaisesti.

Päivittäin käytettävät parenteraaliset annostukset,
15 edullisesti yksittäinen päivittäisannos, ovat alueella noin 1 pg - noin 1 000 µg ruumiinpainokiloa kohti, vaikka yhtä hyvin voidaan käyttää pienempiä tai suurempia annostuksia. Tarvittava annostus on riippuvainen potilaan tilan vakavuudesta ja sellaisista arvosteluperusteista, kuten
20 potilaan pituus, paino, sukupuoli, ikä ja anamneesi.

Tämän keksinnön mukaisia koostumuksia valmistettaessa yhdistetään tavallisesti ainakin yhtä tämän keksinnön mukaista yhdistettä sisältävä aktiivinen ainesosa
25 lisäaineeseen tai se laimennetaan lisäaineella. Kun lisäainetta käytetään laimentimena, se voi olla kiinteää, puolikiinteää tai nestemäistä materiaalia, joka toimii aktiivisen ainesosan kantaja-aineena, väliaineena tai laimentimena.

Formulaatiota valmistettaessa voi olla tarpeellista
30 jauhatta aktiivinen yhdiste asianomaisen partikkelikoon aikaansaamiseksi ennen tämän yhdistämistä muihin ainesosiin. Jos aktiivinen yhdistelmä on huomattavassa määrin veteen liukenematon, niin se jauhetaan tavallisesti partikkelikooltaan noin 200 mesh-yksikköä pienemmäksi. Jos
35 aktiivinen yhdiste on huomattavassa määrin veteen liukene-

va, niin partikkelikoko säädetään tavallisesti jauhattamalla esimerkiksi noin 40 mesh-yksikköiseksi sen lopputuloksen aikaansaamiseksi, että yhdiste jakautuu tasaisesti formulaatioon.

5 Joitakin esimerkkejä sopivista lisäaineista ovat laktoosi, dekstroosi, sakkaroosi, trehaloosi, sorbitoli ja mannitoli. Tämän keksinnön mukaiset koostumukset voidaan formuloida sellaisiksi, että ne vapauttavat aktiivista ainesosaa nopeasti, pitkään tai viivästyneesti sen jälkeen
10 kun niitä on annettu potilaalle tällä alalla tunnettuja menetelmiä käyttäen.

Koostumukset formuloidaan edullisesti kerta-annosmuotoon, jossa kukin annos sisältää normaalisti noin 50 µg - noin 100 mg, tavallisimmin noin 1 mg - noin 10 mg
15 aktiivista ainesosaa. Termi "kerta-annos" tarkoittaa fyysikaalisesti erillisiä yksiköitä, jotka soveltuvat yksittäiseksi annoksiksi potilaille ja muille nisäkkäille, ja kukin yksikkö sisältää ennakolta määrätyn määrän aktiivista materiaalia, jonka on laskettu saavan halutun terapeuttisen vaikutuksen yhdessä sopivan farmaseuttisen lisäaineen
20 kanssa.

Parenteraalista annostelutarkoitusta varten tämän keksinnön mukaista yhdistettä sisältävät koostumukset yhdistetään edullisesti tislattuun veteen ja pH säädetään
25 arvoon noin 6,0 - noin 9,0.

Vaikutuksen keston säätelyyn voidaan käyttää muita farmaseuttisia menetelmiä. Lääkeainetta säännösteltysti vapauttavia preparaatteja voidaan valmistaa käyttämällä polymeereja muodostaman kompleksin tämän keksinnön mukaisen
30 yhdisteen kanssa tai absorboimaan sitä. Lääkeainetta voidaan antaa säännösteltysti valitsemalla makromolekyylit (näitä ovat esimerkiksi polyesterit, polyaminohapot, polyvinyylipyrrolidoni, etyyli-
vinyyliasetatti, metyyliiselluloosa, karboksimeyyliiselluloosa ja protamiinisulfaatti)

ja makromolekyylien konstrengtaatiot sekä lisäysmenetelmät asiaankuuluvalla tavalla vapautumisen säännöstelemiseksi.

Vielä yksi mahdollinen menetelmä lääkeainetta säännöstellysti vapauttavien preparaattien vaikutuksen keston säännöstelemiseksi on yhdistää tämän keksinnön mukaista yhdistettä polymeerimateriaalista, kuten polyestereistä, polyaminohapoista, hydrogeeleistä, polymaitohaposta tai etyyliivinyyliasetaattikopolymeeristä muodostettuihin partikkeleihin.

Vaihtoehtona tämän keksinnön mukaisen yhdisteen yhdistämiselle näihin polymeeripartikkeleihin on mahdollista pidättää yhdiste esimerkiksi koaservaatiomenetelmällä tai rajapintapolymeroinnilla valmistettuihin mikrokapseleihin, esimerkiksi hydroksimetyyliseluloosaan tai gelatiinimikrokapseleihin, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna, tai kolloidisiin lääkeaineannostelujärjestelmiin, esimerkiksi liposomeihin, albumiinimikropallosiin, mikroemulsioihin, nanopartikkeleihin ja nanokapseleihin tai makroemulsioihin. Näitä menetelmiä on kuvattu teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

Tämän keksinnön mukaiset yhdisteet ovat insulino-
trooppisesti aktiivisia yhdisteitä. Siten tämän keksinnön toisesta kohteesta saadaan käyttöön menetelmä insuliinin ilmentymisen tehostamiseksi, joka menetelmä käsittää sen, että tehokas määrä tämän keksinnön mukaista yhdistettä saatetaan vaikuttamaan nisäkkään haiman B-tyyppisiin solusaarekesoluihin.

Tästä keksinnöstä saadaan samoin käyttöön menetelmä hoidon tarpeessa olevalla nisäkkäällä, edullisesti ihmisellä, olevan aikuistyyppin diabetes mellituksen hoitamiseksi, ja joka menetelmän käsittää sen, että tällaiselle nisäkkäälle annetaan tehokas määrä tämän keksinnön mukaista yhdistettä tai koostumusta.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on kuvata tätä keksintöä tarkemmin. Mikään seuraavista esimerkeistä ei

ole tarkoitettu antamaan aihetta rajoittaa tämän keksinnön suojapiiriä.

Esimerkki 1

Yksittäisiä näytteitä viidestä erilaisesta GLP-1-molekyylistä valmistettiin tunnetulla kiinteän faasin peptidisynteesillä ja nämä lyofilisoitiin pienissä pulloissa. Näihin näytteisiin lisättiin erää 0,1 M HEPES (N-[2-hydroksietyyli]piperatsiini-N'-[2-etaanisulfonihappo]) puskureita, joiden pH oli 7,4 ja jotka sisälsivät useita eri määriä sinkkikloridia, suuruudeltaan noin 0,1 mg/ml proteiinkonsentraation aikaansaamiseksi. Näytteitä sekoitettiin ja niitä varastoitiin ympäristön lämpötilassa (22 °C) noin 18 tunnin ajan. Tämän jälkeen seoksia sentrifugoitiin (Fisher'in mallin 235C mikrosentrifugi) 5 minuutin ajan. Selkeytetyt supernatantit pipetoitiin putkista. Supernatanttien proteiinipitoisuus arvioitiin määrittämällä niiden absorbanssi 280 nm:n kohdalta spektrofotometrillä (Gilford 260). GLP-1-molekyylien teoreettinen absorbanssiarvo liuokselle, jonka konsentraatio on 0,1 mg/ml, on tällä aallonpituudella 1 cm kyveteissä 0,207. Tämän kokeen tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

5	Zn/Glp-1-molekyyli	Absorbanssi 280 nm:n kohdalta				
	Mooli-suhde	GLP-1 (7-36) NH ₂	Gly ⁸ -GLP-1 (7-36) NH ₂	Val ⁸ -GLP-1 (7-37) OH	α-me-tyyli-Ala ⁸ -GLP-1 (7-36) NH ₂	Gly ⁸ -Gln ²¹ -GLP-1 (7-36) OH
	0	0,172	0,136	0,187	0,163	0,167
	0,3	0,099	0,079	0,191	0,134	0,113
	0,5	0,057	0,070	0,184	0,098	0,082
10	0,7	0,035	0,058	0,180	0,079	0,069
	1,0	0,039	0,057	0,173	0,076	0,065
	3,0	0,048	0,044	0,110	0,055	0,055

15 Tämä esimerkki osoittaa, että ainoastaan pieni määrä sinkkiä tarvitaan kompleksoimaan merkittävä osa GLP-1-molekyyliä näistä laimeista liuoksista ja saostamaan sen.

Esimerkki 2

20 5 mg GLP-1 (7-36)NH₂:ta liuotettiin täysin 2,5 ml:aan 0,1 M HEPES-puskuria, joka ei sisältänyt sinkkiä ja jonka pH oli 7,4. Seokseen lisättiin nopeasti vielä uusi 2,5 ml:n suuruinen erä 0,1 M HEPES-puskuria, jonka pH oli 7,4 ja joka sisälsi 0,6 mM sinkkikloridia. Sinkin ja GLP-1 (7-36)NH₂:n likimääräinen moolisuhde tässä näytteessä on 1 : 1. Liuos tuli välittömästi hahtuvamaiseksi ja saostuma muodostui nopeasti. Seos varastoitiin ympäristön lämpötilassa (22 °C) 18 tunnin ajan.

25 Saostuma kiinnittyi tiukasti lasipullon pohjaan. Supernatantti saatiin dekantoitua täydellisesti pipetillä. Tämän jälkeen saostuma liuotettiin täydellisesti 5,0 ml:aan 0,01 N suolahappoa. Sekä supernatanttiliuoksista että saostuman uudelleen liuotetuista liuoksista määritettiin absorbanssi 280 nm:n kohdalta. Näissä liuoksissa ole-

30

vat sinkkipitoisuudet kvantitoitiin atomiabsorptiospektrofotometrialla. Tämän kokeen tulokset on esitetty taulukossa 2.

5

Taulukko 2

10

Absorbanssi 280 nm:n kohdalta		Sinkkikonsentraatio miljoonasosina
Supernatantti	0,118	9,02
Uudelleen liuotettu saostuma	1,932	13,3

15

Tämä esimerkki osoittaa, että suuri osa GLP-1 (7-36)NH₂:sta saostui liuoksesta lisättäessä tähän sinkkiä sisältävää HEPES-liuosta. 280 nm:n kohdalta määritetty absorbanssiarvo 1,932 viittaa siihen, että uudelleen liuotetun saostuman GLP-1 (7-36)NH₂-konsentraatio on 0,933 mg/ml, eli 283 µM. Tämän liuoksen sinkkikonsentraatio, 13,3 miljoonasosaa, vastaa 203 µM suuruista sinkkikonsentraatiota. Tästä syystä sinkin ja GLP-1 (7-36)NH₂:n moolisuhde saostumassa oli 0,717 : 1.

20

Patenttivaatimukset

1. GLP-1-molekyylikompleksi, joka koostuu divalent-
tisesta metallikationista, joka on liittynyt sen kanssa
5 samanaikaisesti saostumaan kykenevään yhdisteeseen,
t u n n e t t u siitä, että yhdisteellä on kaava:

R_1 -X-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Y-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Z-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-
Gly-Arg- R_2

10 jossa R_1 on L-histidiini, D-histidiini, desamino-
histidiini, 2-aminohistidiini, β -hydroksihistidiini, homo-
histidiini, α -fluorimetyylihistidiini tai α -ametyylihisti-
diini;

X on Ala, Gly, Val, Thr, Ile tai alfa-metyyli-Ala;

15 Y on Glu, Gln, Ala, Thr, Ser tai Gly;

Z on Glu, Gln, Ala, Thr, Ser tai Gly;

R_2 on NH_2 tai Gly-OH;

20 edellyttäen, että yhdisteen isoelektrinen piste on
alueella noin 6,0:sta noin 9,0:aan ja lisäksi edellyttäen,
että silloin kun R_1 on His, X on Ala, Y on Glu ja Z on Glu,
niin R_2 :n on oltava NH_2 .

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompleksi,
t u n n e t t u siitä, että mainittu divalenttinen metal-
likationi on sinkki.

25 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi,
t u n n e t t u siitä, että R_1 on His tai desamino-
histidiini.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi,
t u n n e t t u siitä, että X on Ala, Gly tai Val.

30 5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi,
t u n n e t t u siitä, että Y on Glu tai Gln.

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi,
t u n n e t t u siitä, että Z on Glu tai Gln.

35 7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi,
t u n n e t t u siitä, että R_1 on His, X on Val, Y on Glu,
Z on Glu ja R_2 on Gly-OH.

8. Patenttivaatimuksen 2 mukainen kompleksi, tunnettu siitä, että R_1 on His, X on Gly, Y on Gln, Z on Glu ja R_2 on Gly-OH.

5 9. Farmaseuttinen formulaatio, tunnettu siitä, että se sisältää aktiivisena ainesosana minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 8 mukaisen kompleksin tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suolan yhdessä yhden tai useamman tälle soveltuvan farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen, laimentimen tai lisäaineen kanssa.

10 10. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen GLP-1-molekyylikompleksi tai tämän farmaseuttisesti hyväksyttävä suola, tunnettu siitä, että se on tarkoitettu käytettäväksi diabeteksen hoidossa.

15 11. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 8 mukaisen GLP-1-molekyylikompleksin valmistamiseksi, tunnettu siitä, että se käsittää sen, että GLP-1-molekyyli yhdistetään divalenttiseen metallikationiin.

20 12. Patenttivaatimuksessa 1 määritelty yhdiste, tunnettu siitä, että R_1 on L-histidiini, X on Val, Y on Glu, Z on Glu ja R_2 on Gly-OH.

13. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 8 mukainen kompleksi, tunnettu siitä, että R_1 on L-histidiini, X on Val, Y on Glu, Z on Glu ja R_2 on Gly-OH.

25 14. Patenttivaatimuksen 9 mukainen formulaatio, tunnettu siitä, että se on muodostettu käyttämällä patenttivaatimuksen 12 mukaista yhdistettä.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukaisen GLP-1-yhdisteen tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan käyttö lääkeaineen valmistukseen diabeteksen hoitamiseksi.

Viitejulkaisut

WO 95/05848 (NOVO NORDISK A/S) 2.3.1995

EP 0658568 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 21.6.1995

EP 0619322 A2 (PFIZER INC.) 12.10.1994

EP 0587255 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 16.3.1994

WO 87/06941 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 19.11.1987

WO 91/11457 (BUCKLEY, D.I. ET AL) 8.8.1991

WO 93/25579 (PFIZER INC.) 23.12.1993

17.12.2007 John T. K.