

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-629**
(22) Přihlášeno: **22.08.1997**
(30) Právo přednosti: **30.08.1996 DK 1996/931**
08.11.1996 DK 1996/1259
20.12.1996 DK 1996/1470
(40) Zveřejněno: **14.07.1999**
(Věstník č. 7/1999)
(47) Uděleno: **15.07.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **26.08.2009**
(Věstník č. 34/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/DK1997/000340**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/008871**

(11) Číslo dokumentu:

300 837

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 91/11457; US 5512549; WO 95/31214; EP 0944648.

(73) Majitel patentu:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Původce:

Knudsen Liselotte Bjerre, Valby, DK

Huusfeldt Per Olaf, Copenhagen, DK

Nielsen Per Franklin, Vaerloose, DK

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Deriváty GLP-1(7-37) nebo jeho analogy,
farmaceutický prostředek je obsahující a jejich
použití**

(57) Anotace:

Deriváty GLP-1(7-37) a jejich analogy obsahující lipofilický
substituent, které mají zajímavé farmakologické vlastnosti,
zvláště dlouhodobější profil působení než GLP-1(7-37).

CZ 300837 B6

Deriváty GLP-1(7-37) nebo jeho analogy, farmaceutický prostředek je obsahující a jejich použití

5 Oblast techniky:

Tento vynález se týká nových derivátů lidského peptidu glukagonového typu-1 (GLP-1) a jeho fragmentů a analog takových fragmentů, které mají dlouhodobý profil působení, a metody jejich přípravy a použití.

10

Dosavadní stav techniky:

Peptidy se široce využívají v lékařské praxi, a protože mohou být vyráběny technologií rekombinace DNA, tak se očekává, že se jejich význam bude zvyšovat i v příštích letech. Obecně se zjistilo, že přírodní peptidy a jejich analoga používaná v terapii mají vysokou odbouratelnost. Vysoká odbouratelnost terapeutických přípravků je nevyhovující v případech, kdy je potřeba udržovat po delší dobu jejich vysokou hladinu v krvi, protože budou nezbytná opakovaná podávání. Příklad peptidů s vysokou odbouratelností jsou: ACTH, faktor způsobující vypouštění kolikotropinu, angiotensin, kalcitonin, inzulin, glukagon, peptidy glukagonového typu-1, peptidy glukagonového typu-2, růstový faktor inzulinového typu-1, růstový faktor inzulinového typu-2, gastroinhibiční peptid, faktor způsobující vypouštění somatotropinu, hlen vyměšující peptid aktivující adenylát cyklastu, sekretin, enterogastrin, somatostatin, somatotropin, somatomedin, parathyroidní hormon, trombopoietin, erythropoietin, faktory způsobující vypouštění hypothalamu, prolaktin, hormony stimulující thyroideu, endorfíny, enkefaliny, vasopresin, oxytocin, opiátové peptidy a jejich analogy, hyperoxid dismutasy, interferon, asparginasa, arginasa, arginin dcaminasa, adenosin deaminasa a ribonukleasa. V některých případech je možné ovlivnit profil vypouštění peptidů pomocí vhodných farmaceutických přípravků, ale tento přístup má různé nedostatky a není obecně použitelný.

30

Hormony regulující sekreci inzulinu patří k tzv. ose tenkého střeva (enteroinsulární ose), označující skupinu hormonů, uvolněných z gastrointestinální sliznice jako odezva na přítomnost a absorpci živin ve střevě, což podporuje včasnost a potenciální uvolnění inzulinu. Efekt zvýšené sekrece inzulinu tzv. inkretinový efekt je pravděpodobně nezbytný pro normální toleranci glukózy. Mnoho z gastrointestinálních hormonů včetně gastrinu a sekretinu (cholecystokinin v člověku není inzulinotropický) jsou inzulinotropické, ale pouze ty fyziologicky důležité, které jsou zodpovědné za inkretinový efekt, jsou inzulinotropické glukózádependní polypeptidy a peptidy glukagonového typu-1 (GLP-1). Kvůli svému inzulinotropickému efektu ihned připoutal GIP izolovaný v roce 1973 (1) značný zájem mezi diabetology. Nicméně četné výzkumy prováděné v průběhu následujících let jasně ukazují, že defektní sekrece GIP nebyla zahrnuta v patogenesi inzulindependentního diabetes mellitus (IDDM) nebo inzulinnondependentního diabetes mellitus (NIDDM) (2). Kromě toho bylo zjištěno, že GIP jako inzulinotropický hormon je téměř neúčinný při NIDDM (2). Jiným inkretinovým hormonem je GLP-1, který je nejúčinnější známou inzulinotropickou látkou (3). Na rozdíl od GIP je překvapivě efektivní při stimulaci sekrece inzulinu u NIDDM pacientů. Navíc v kontrastu s jinými inzulinotropickými hormony (možná s výjimkou sekretinu) je potenciálním inhibítozem sekrece glukagonu. Kvůli těmto účinkům má zvláště u pacientů s NIDDM výrazné efekty snižující glukózu v krvi.

GLP-1, který je produktem proglukagonu (4), je jedním z nejmladších členů skupiny sekretin-VIP peptidů, ale je již vžitý jako důležitý střevní hormon s regulační funkcí v metabolismu glukózy a gastrointestinální sekrece a metabolismu (5). Glukagonový gen se zpracovává rozdílně ve slinivce a rozdílně ve střevě. Ve slinivce (9) vede zpracování ke vzniku a souběžné sekreci 1) samotného glukagonu obsazujícího v proglukagonu (PG) pozice 33-61; 2) N-koncového peptidu 30 aminokyselin (PG (1-30)) často nazývanému jako pankreatický peptid příbuzný s glicentinem GRPP (10, 11); 3) hexapeptidu odpovídajícímu PG (64-69) a konečně 4) tzv.

55

hlavního proglukagonového fragmentu (PG (72–158)), ve kterém jsou ukryty dvě sekvence glukagonového typu (9). Glukagon se zdá být jediným biologicky aktivním produktem. Naproti tomu ve střevní sliznici to je glukagon, který je ukryt ve větší molekule, zatímco dva peptidy glukagonového typu vznikají odděleně (8). Následující produkty jsou vytvořeny a vylučovány souběžně: 1) glicetin odpovídající PG (1–69) s glukagonovou sekvencí obsazující zbytky č. 33–61 (12); 2) GLP-1(7–36)amid (PG (78–107) amid (13), ne jako původně myšlený PG (72–107) nebo 108, který je neaktivní). Vznikají také malá množství C-koncových glycinem rozšířených ale stejně bioaktivních GLP-1(7–37), (PG (78–108)) (14); 3) zasahujícího peptidu-2 (PG (111–122)amid) (15) a 4) GLP-2 (PG (126–158)) (15, 16). Část glicetinu se dále štěpí na GRPP (PG (1–30)) a oxyntomodulin (PG (33–69)) (17, 18). V těchto peptidech má GLP-1 nejpozoruhodnější biologickou aktivitu.

Souběžné vylučování glicetinem/enteroglukagonem sleduje mnoho studií enteroglukagonové sekrece (6, 7) do jisté míry také aplikovatelných na sekreci GLP-1, ale GLP-1 se v lidech metabolizuje rychleji s plazma poločasem 2 minuty (19). Cukr nebo tučná jídla stimulují sekreci (20), pravděpodobně jako výsledek přímého působení ještě neadsorbovaných živin mikrovily otevřených L-buněk střevní sliznice. Endokrinní nebo nervové mechanismy podporující GLP-1 sekreci mohou existovat, ale v lidech dosud nebyly prokázány.

Inkretinová funkce GLP-1 (29–31) je jasně objasněna v příkladech s receptorovým antagonismem GLP-1, exendinem 9–39, který dramaticky snižuje inkretinový efekt vyvolaný orálním přijmutím glukózy u krys (21, 22). Hormon interaguje přímo s β -buňkami přes GLP-1 receptor (23), který patří k glukagon/VIP/kalcitonin skupině G-proteinem spojených 7-transmembranou položených receptorů. Důležitost GLP-1 receptoru v regulaci sekrece inzulínu byla ukázána v nedávných experimentech, ve kterých byl prováděn cílený rozpad genu GLP-1 receptoru u myši. Homozygotní živočichové měli při rozpadu značně zhoršenou toleranci glukózy a postní hyperglykémii a stejně tak heterozygotní živočichové nesnášeli glukózu (24). Podnět transdukčnímu mechanismu (25) nejdříve vyžaduje aktivaci adenylátcykasy, ale zvýšení intracelulárního Ca^{2+} je také nezbytné (25, 26). Činnost hormonu je nejlépe popsána jako schopnost glukózy stimulovat uvolnění inzulínu (25), ale mechanismus spojující stimulaci glukózou a GLP-1 není známý. Může zahrnovat vápníkem vyvolané uvolnění vápníku. Jak už bylo zmíněno inzulinotropická činnost GLP-1 se uchovává v diabetických β -buňkách. Vztah posledně jmenovaného k jeho schopnosti poskytovat „pravomoci glukózy“ izolovaným buňkám vylučujícím inzulín (26, 28), které jen chabě odpovídají glukóze nebo GLP-1 samotnému, ale úplně kombinaci těchto dvou, je také známý. Nicméně stejně důležité hormon také inhibuje sekreci glukagonu (29). Mechanismus není známý, ale zdá se být parakrinický, přes blízké inzulinové nebo somatostatinné buňky (25). Také glukagonostatická činnost je závislá na glukóze, takže inhibiční efekt klesá, když klesá glukóza v krvi. Následkem tohoto dvojitého efektu, když plazmová koncentrace GLP-1 roste buď zvýšenou sekrecí nebo exogenní infusí, molární poměr inzulínu a glukagonu v krvi, která se dostává do jater via cirkulaci jaterní branou, je značně zvýšen, čímž klesá produkce jaterní glukózy (30). Výsledkem je snížení koncentrace glukózy v krvi. Kvůli závislosti glukózy na inzulinotropické a glukagonostatické činnosti, je efekt snižující glukózu samolimitující a hormon tudíž nezpůsobuje hypoglykémii bez ohledu na dávku (31). Efekty jsou zachovány u pacientů s diabetes mellitus (32), u kterých mohou infuse poněkud suprafysiologických dávek GLP-1 úplně normalizovat hladiny glukózy v krvi navzdory chabé metabolické kontrole a sekundárnímu selhání sulfonylmočoviny (33). Důležitost glukagonostatického efektu je ilustrována zjištěním, že GLP-1 také snižuje krevní glukózu u diabetických pacientů typu-1 bez zbytkové β -buňkové vyměšovací kapacity (34). Kromě jeho efektu na pankreatické ostrůvky má GLP-1 silný účinek na gastrointestinální trakt. Ve fyziologických množstvích GLP-1 potenciálně inhibuje pentagastrinem vyvolanou stejně jako potravou vyvolanou sekreci žaludeční kyseliny (35,36). Inhibuje také rychlost žaludečního vyprazdňování a sekreci pankreatického enzymu (36). Podobné inhibiční efekty na žaludeční a pankreatickou sekreci a pohyblivost mohou být v lidech vyvolány při proniknutí roztoků obsahujících cukry nebo tuky do střeva (37, 38). Souběžně je značně stimulována sekrece GLP-1 a spekuluje se, že GLP-1 může být alespoň částečně odpovědný za tzv. efekt střevního porušení („ileal-brake“ efekt) (38). Ve skutečnosti současné

studie navrhuji, že fyziologicky může být efekt střevního porušení GLP-1 důležitější než jeho efekt na pankreatické ostrůvky. Tudiž ve studiích odezvy dávky GLP-1 ovlivňuje rychlost žaludečního vyprazdňování při rychlostech infuze alespoň tak nízkých jaké jsou požadovány pro ovlivnění ostrůvkové sekrece (39).

5

Zdá se, že GLP-1 má vliv na přijímání potravy. Intraventrikulární podávání GLP-1 vážně inhibuje přijímání potravy u krys (40,42). Tento účinek se zdá být vysoce specifický. A tak N-koncový prodloužený GLP-1 (PG 72-107)amid je inaktivní a odpovídající dávky GLP-1 antagonisty, exendinu 9-39, zruší efekt GLP-1 (41). Akutní periferní podávání GLP-1 neinhibuje akutně příjem potravy u krys (41, 42). Nicméně zůstává možnost, že GLP-1 vyloučený z intestinálních L-buněk může také působit jako signál přesycení.

10

Nikoli pouze inzulinotropické efekty, ale také efekty GLP-1 na gastrointestinální trakt jsou zachovány u diabetických pacientů (43) a mohou napomáhat snížení odchylek glukózy vyvolaných potravou, ale důležitěji mohou také ovlivňovat příjem potravy. Bylo prokázáno, že GLP-1 podávaný nitrožilně, nepřetržitě jeden týden v dávkách 4 ng/kg/min dramaticky zvyšuje glykemickou kontrolu u NIDDM pacientů bez závažných vedlejších efektů (44). Peptid je plně aktivní po podkožním podávání (45), ale rychle se znehodnocuje hlavně díky degradaci dipeptidylpeptidásovými enzymy typu IV (46, 47).

20

Sekvence aminokyselin v GLP-1 je určena Schmidtem a spol. (*Diabetologia* 28 704-707 (1985)). Ačkoli zajímavé farmakologické vlastnosti GLP-1(7-37) a jeho analog přitahovaly v posledních letech více pozornosti, je známo pouze málo o struktuře této molekuly. Sekundární struktura GLP-1 v micelách je popsána Thorntonem a spol. (*Biochemistry* 33 3532-3539 (1994)), ale v obyčejném roztoku se GLP-1 považuje za velmi flexibilní molekulu. Kupodivu jsme zjistili, že derivatizace poměrně malých a velmi flexibilních molekul vede k látkám, jejichž plazma profity byly vysoce protražované a stále měly zachovanou aktivitu.

25

GLP-1 a analogy GLP-1 a jeho fragmenty jsou potencionálně užitečné v léčbě cukrovky typu 1 a typu 2. Nicméně vysoká odbouratelnost limituje užitečnost těchto látek, a proto stále existuje potřeba zlepšování v této oblasti. Proto jedním záměrem předloženého vynálezu je poskytnout deriváty GLP-1 a jeho analogy, které mají dlouhodobý profit působení vzhledem k GLP-1(7-37). Dalším záměrem vynálezu je poskytnout deriváty GLP-1 a jeho analogy, které mají nižší odbouratelnost než GLP-1(7-37). Dalším záměrem vynálezu je poskytnout farmaceutické přípravky obsahující látku podle vynálezu a využít látku podle vynálezu k poskytnutí takového přípravku. Záměrem předloženého vynálezu je také poskytnout metodu léčby inzulindependentního diabetes mellitus a inzulinnondependentního diabetes mellitus.

30

35

Odkazy:

40

1. Pederson RA. Gastric Inhibitory Polypeptide. Ve Walsh JH, Dockray GJ (eds) Gut peptides: Biochemistry and Physiology. Raven Press, New York 1994, pp. 217-259.
2. Kralup T. Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide. *Endocr Rev* 1988; 9: 122-134.
3. Ørskov C. Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the enteroinsular axis. *Diabetologia* 1992; 35: 701-711.
4. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature* 1983; 304: 368-371.
5. Holst JJ. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-a newly discovered GI hormone. *Gastroenterology* 1994; 107: 1 848-1 855.

50

6. Holst JJ. Gut glucagon, enteroglucagon, gut GLI, glicetin—current status. *Gastroenterology* 1983; 84: 1 602–1 613.
7. Holst JJ, Ørskov C. Glucagon and other progucagon-derived peptides. Ve Walsh JH, Dockray GJ (eds) *Gut peptides: Biochemistry and Physiology*. Raven Press, New York, pp. 305–340, 1993.
8. Ørskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FGA, Poulen SS, Nielsen OV. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagone gene, are secreted separately from the pig small intestine, but not pancreas. *Endocrinology* 1986; 119: 1 467–1 475.
9. Holst JJ, Berani M, Johnsen AH, Kofod H, Hartmann B, Ørskov C. Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 1 827–1 883.
10. Moody AJ, Holst JJ, Thim L, Jensen SL. Relationship of glicetin to proglucagon and glucagon in the porcine pancreas. *Nature* 1981; 289: 514–516.
11. Thim L., Moody AJ. Purification and chemical characterisation of a glicetin-related pancreatic peptide (proglucagon fragment) from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* 1982; 703: 134–141.
12. Thim L., Moody AJ. The primary structure of glicetin (proglucagon). *Regul. Pept.* 1981; 2: 139–151.
13. Ørskov C, Berani M, Johnsen AH, Højrup P, Holst JJ. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) from human and pig small intestine. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 12 826–12 829.
14. Ørskov C, Rabenhøj L, Kofod H, Wettergren A, Holst JJ. Production and secretion of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in man. *Diabetes* 1991; 43: 535–539.
15. Buhl T, Thim L, Kofod H, Ørskov C, Harling H, Holst JJ. Naturally occurring products of proglucagon 111–160 in the porcine and human small intestine. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 8 621–8 624.
16. Ørskov C, Buhl T, Rabenhøj L, Kofod H, Holst JJ. Carboxypeptidase-B-like processing of the C-terminus of glucagon-like peptide-2 in pig and human small intestine. *FEBS Lett.* 1989; 247: 193–106.
17. Holst JJ. Evidence that enteroglucagon (II) is identical with the C-terminal sequence (residues 33–69) of glicetin. *Biochem. J.* 1980; 187: 337–343.
18. Bataille D, Tatemoto K, Gespach C, Jörnvall H, Rosselin G, Mutt V. Isolation of glukagon-37 (bioactive enteroglucagonoxintomodulin) from porcine jejuno-ileum. Characterisation of the peptide. *FEBS Lett.* 1982; 146: 79–86.
19. Ørskov C, Wettergren A, Holst JJ. The metabolic rate and the biological effect of GLP-1 736 amide and GLP-1 7–37 in healthy volunteers are identical. *Diabetes* 1993; 42: 658–661.
20. Elliot RM, Morgan LM, redger JA, Dracén S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7–36)amide and glucose-dependent inzulinotropic polypeptide secretion in respnse to

nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J. Endocrinol.* 1993; 138: 159-166.

21. Kollias F, Fehmann HC, Göke B. Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin (9-39)amide. *Diabetes* 1995; 44: 16-19.
22. Wang Z, Wang RM, Owji AA, Smith DM, Ghatti M, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 is physiological in rat. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 417-421.
23. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic β cell receptor for the glucagon-like peptide-1 hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 8641-8645.
24. Scrocchi L, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ. Diabetes in mice with targeted disruption of the GLP-1 receptor gene. *Diabetes* 1996; 45: 21A.
25. Fehmann HC, Göke R, Göke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulin releasing polypeptide (GIP). *Endocrine Reviews* 1995; 16: 390-410.
26. Gromada J, Dissing S, Bokvist K, Renström E, Frøkjær-Jensen J, Wulff BS, Rossman P. Glucagon-like peptide-1 increases cytoplasmic calcium in insulin-secreting β TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilisation. *Diabetes* 1995; 44: 767-774.
27. Holz GG, Leech CA, Habener JF. Activation of a cAMP-regulated Ca^{2+} -signaling pathway in pancreatic β -cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J. Biol. Chem.* 1996; 270: 17749-17759.
28. Holz GG, Kühlreiber WM, Habener JF. Pancreatic β -cells are rendered glucose competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). *Nature* 1993; 361: 362-365.
29. Ørskov C, Holst JJ, Nielsen OV. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide) on endocrine secretion from pig pancreas, antrum and stomach. *Endocrinology* 1988; 123: 2009-2013.
30. Hvidberg A, Toft Nielsen M, Hilsted J, Ørskov C, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide) on hepatic glucose production in healthy man. *Metabolism* 1994; 43: 104-108.
31. Qualmann C, Nauck M, Holst JJ, Ørskov C, Creutzfeldt W. Insulinotropic actions of intravenous glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) in the fasting state in healthy subjects. *Acta Diabetologica* 1995; 32: 13-16.
32. Nauck MA, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of GLP-1(7-36 amide) but not of synthetic human GIP in patients with type 2-diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 301-307.
33. Nauck MA, Kleine A, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalisation of fasting hyperglycaemia by exogenous GLP-1(7-36 amide) in type 2-diabetic patients. *Diabetologica* 1993; 36: 741-744.
34. Creutzfeldt W, Kleine A, Willms B, Ørskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996; 19: 580-586.

35. Schjoldager BTG, Mortensen PE, Christiansen J, Ørskov C, Holst JJ. GLP-1 (glucagon-like peptide-1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in man. *Dig. Dis. Sci.* 1989; 35: 703-7.
- 5 36. Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 72-107 amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig. Dis. Sci.* 1993; 38: 665-673.
- 10 37. Leyer P, Holst JJ, Grandt D, Goebell H: Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): association with inhibition of gastric acid in humans. *Dig. Dis. Sci.* 1995; 40: 1 074-1 082.
38. Leyer P, Holst JJ. GLP-1: A humoral mediator of the ileal brake in humans? *Digestion* 1993; 54: 385-386.
- 15 39. Nauck M, Ettler R, Niederechholz U, Ørskov C, Holst JJ, Schmiegeler W. Inhibition of gastric emptying by GLP-1(7-36 amide) or (7-37): effects on postprandial glycaemia and insulin secretion. *Abstract. Gut* 1995; 37(suppl. 2): A124.
- 20 40. Schick RR, vom Walde T, Zimmermann JP, Schusdzarra V, Classen M. Glucagon-like peptide-1 - a novel brain peptide involved in feeding regulation. V Ditschuneit H, Gries FA, Gauner H, Schusdzarra V, Wechsler JG (eds.) *Obesity in Europe*. John Lingey & Company Ltd, 1994; pp. 363-367.
- 25 41. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, Sheikh S. Brain GLP-1(7-36) amide receptors play a major role in regulation of food and water intake. *Am. J. Physiol.* 1996, in press.
- 30 42. Turton MD, O'Shea D, Guán I, Beak SA, Edwards CMBB, Meenan K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the regulation of feeding. *Nature* 1996; 379: 69-72.
43. Willms B, Werner J, Creutzfeldt W., Ørskov C, Holst JJ, Nauck M. Inhibition of gastric emptying by glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) in patients with type-2-diabetes mellitus. *Diabetologia* 1994; 37, suppl. 1: A118.
- 35 44. Larsen J, Jallad A, Damsbo P. One-week continuous infusion of GLP-1(7-37) improves glycaemic control in NIDDM. *Diabetes* 1996; 45, suppl. 2: 233A.
- 40 45. Ritzel R, Ørskov C, Holst JJ, Nauck MA. Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1(7-36 amide) after subcutaneous injection in healthy volunteers. Dose-response relationships. *Diabetologia* 1995; 38: 720-725.
46. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an A-terminally truncated peptide that is major endogenous metabolite in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80: 952-957.
- 45 47. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneous and intravenously administered glucagon-like peptide-1 are rapidly degraded from the amino terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 1995; 44: 1 126-1 131.
- 50

Podstata vynálezu:

Vynález se týká derivátu nativního GLP-1(7-37) nebo jeho analog, ve kterém je celkově až 6 aminokyselinových zbytků zaměněno s jakýmkoliv a aminokyselinovým zbytkem, který může
 5 být kódován genetickým kódem, kde derivát je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát má pouze jeden lipofilický substituent připojený k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncový nebo C-koncový aminokyselinový zbytek, kde lipofilní substituent obsahuje 8 až 25 atomů uhlíků a je vybrán ze skupiny obsahující:

- 10 i) substituenty obsahujícími částečně nebo zcela hydrogenované cyklopentafenantrenový skelet,
- ii) nerozvětvený nebo rozvětvený alkylový řetězec,
- 15 iii) acyl rozvětvené mastné kyseliny,
- iv) acyl nerozvětvené nebo rozvětvené mastné kyseliny vybraný $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ a $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$, a
- 20 v) acyl nerozvětvené nebo rozvětvené alkan α, ω dikarboxilové kyseliny.

Lidský GLP-1 je peptid z 37 aminokyselinových zbytků vznikající z preproglukagonu, který se syntetizuje v L-buňkách v distálním střevě, ve slinivce a v mozku. Zpracování pro glukagonu
 25 poskytující GLP-1(7-36) amid, GLP-1(7-37) a GLP-2 probíhá hlavně v L-buňkách. Pro charakterizaci fragmentů a analog tohoto peptidu se používá jednoduchý systém. Tak např. $\text{Gly}^8\text{-GLP-1(7-37)}$ označuje fragment GLP-1 formálně odvozeného od GLP-1 odstraněním aminokyselinových zbytků č. 1-6 a substitucí přirozeně se vyskytujícího aminokyselinového zbytku v pozici 8 (Ala) glycinem (Gly). Podobně $\text{Lys}^{34}(\text{N}^{\epsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$ označuje GLP-1(7-37), kde ϵ -aminoskupina Lys zbytku v poloze 34 byla tetradekanoylována. Kde je
 30 v tomto textu vytvořen odkaz na C-koncově prodloužený GLP-1 analog, tam je aminokyselinový zbytek v poloze 38 Arg, pokud není uvedeno jinak, volitelný aminokyselinový zbytek v poloze 39 je také Arg, pokud není uvedeno jinak, a volitelný aminokyselinový zbytek v poloze 40 je Asp, pokud není uvedeno jinak. Rovněž C-koncově prodloužený analog zasahuje
 35 polohy 41, 42, 43, 44 a 45, kde aminokyselinové sekvence v těchto prodlouženích jsou jako sekvence v lidském preproglukagonu, pokud není uvedeno jinak.

V nejširším aspektu se předložený vynález vztahuje k derivátům GLP-1 a jejich analog. Deriváty podle vynálezu mají zajímavé farmakologické vlastnosti, zvláště mají dlouhodobější profil působení než výchozí peptidy.
 40

V předloženém textu se označení „analog“ používá k označení peptidu, ve kterém byl jeden nebo více aminokyselinových zbytků výchozího peptidu nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo ve kterém byl jeden nebo více aminokyselinových zbytků výchozího peptidu odstraněn
 45 a/nebo ve kterém byl jeden nebo více aminokyselinových zbytků výchozího peptidu přidán k výchozímu peptidu. K takovému připojení může dojít jak na N-konci tak na C-konci výchozího peptidu nebo na obou.

Výraz „derivát“ se v předloženém textu používá k označení peptidu, ve kterém byl jeden nebo více aminokyselinových zbytků výchozího peptidu chemicky modifikován např. alkylací, acylací, vytvořením esteru nebo amidu.
 50

Výraz „GLP-1 derivát“ se v předloženém textu používá k označení derivátu GLP-1 a jeho analog. V předloženém textu je výchozí peptid, ze kterého je takový derivát odvozen, na některých místech uveden jako „GLP-1 část“ derivátu.
 55

Ve výhodném provedení, jak je popsáno v nároku 1, předložený vynález popisuje derivát GLP-1 nebo jeho analog, který je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát má pouze jeden lipofilický substituent připojený k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncový nebo
5 C-koncový aminokyselinový zbytek.

V jiném výhodném provedení, jak je popsáno v nároku 2, předložený vynález popisuje derivát GLP-1 nebo jeho analog, který je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát má pouze dva lipofilické substituenty, přičemž jeden je připojený k C-koncovému aminokyselinovému
10 zbytku, zatímco druhý je připojen k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncový nebo C-koncový aminokyselinový zbytek.

V jiném výhodném provedení, jak je popsáno v nároku 3, předložený vynález popisuje derivát GLP-1 nebo jeho analog, který je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát má pouze dva lipofilické substituenty, které jsou připojené aminokyselinovému zbytku, který není
15 N-koncový nebo C-koncový aminokyselinový zbytek.

V jiném výhodném provedení, jak je popsáno v nároku 4, předložený vynález popisuje derivát GLP-1 nebo jeho analog, který je agonista lidského GLP-1 receptoru, kde analog je GLP-1(7-C) kde C je 38 až 45, který má pouze jeden lipofilický substituent, který je připojen k C-konco-
20 věmu aminokyselinovému zbytku.

V jiném výhodném provedení, jak je popsáno v nároku 5, předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající pouze jeden lipofilický substituent, kde tento substituent může být připojen k jakémukoli jednomu aminokyselinovému zbytku, který není N-koncovým nebo C-koncovým
25 aminokyselinovým zbytkem výchozího peptidu.

V jiném výhodném provedení, předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém jsou přítomny dva lipofilické substituenty.
30

V jiném výhodném provedení, předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém jsou přítomny dva lipofilické substituenty, kde jeden je připojen k N-koncovému aminokyselinovému zbytku, zatímco druhý je připojen k C-koncovému aminokyselinovému zbytku.

V jiném výhodném provedení, předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém jsou přítomny dva lipofilické substituenty, kde jeden je připojen k N-koncovému aminokyselinovému zbytku, zatímco druhý je připojen k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncovým nebo
35 C-koncovým aminokyselinovým zbytkem.

V jiném výhodném provedení, předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém jsou přítomny dva lipofilické substituenty, kde jeden je připojen k C-koncovému aminokyselinovému zbytku, zatímco druhý je připojen k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncovým nebo
40 C-koncovým aminokyselinovým zbytkem.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém lipofilický substituent obsahuje 4 až 40 atomů uhlíku, výhodněji 8 až 25 atomů uhlíku.
45

V jiném výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k aminokyselinovému zbytku takovým způsobem, že karboxylová skupina lipofilického substituentu tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou aminokyselinového
50 zbytku.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k aminokyselinovému zbytku takovým způsobem, že amino-

skupina lipofilického substituentu tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou aminokyselinového zbytku.

5 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí vložené molekuly (spaceru).

10 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen, volitelně via spacer, k ε-aminoskupině Lys zbytku obsaženém ve výchozím peptidu.

15 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru, kterým je nerozvětvená alkanová α,ω-dikarboxylová kyselina mající 1 až 7 methylenových skupin, výhodněji dvě methylenové skupiny, ve kterých spacer tvoří můstek mezi aminoskupinou výchozího peptidu a aminoskupinou lipofilického substituentu.

20 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru, kterým je aminokyselinový zbytek kromě Cys, nebo dipeptid jako například Gly-Lys. V předloženém textu je výraz „dipeptid jako například Gly-Lys“ použit k označení dipeptidu, ve kterém C-koncový aminokyselinový zbytek je Lys, His nebo Trp, výhodně Lys, a ve kterém je N-koncový aminokyselinový zbytek vybrán ze skupiny skládající se z Ala, Arg, Asp, Asn, Gly, Glu, Gln, Ile, Leu, Val, Phe a Pro.

25 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru, kterým je aminokyselinový zbytek kromě Cys, nebo dipeptid jako například Gly-Lys a ve kterém karboxylová skupina výchozího peptidu tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou Lys zbytků nebo dipeptidu obsahujícího Lys zbytek a jiná aminoskupina Lys zbytku nebo dipeptidu obsahujícího Lys zbytek tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou lipofilického substituentu.

30 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru, kterým je aminokyselinový zbytek kromě Cys, nebo dipeptid jako například Gly-Lys a ve kterém aminoskupina výchozího peptidu tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou aminokyselinového zbytku nebo dipeptidového spaceru a aminoskupina aminokyselinového zbytku nebo dipeptidového spaceru tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou lipofilického substituentu.

40 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru, kterým je aminokyselinový zbytek kromě Cys, nebo dipeptid jako například Gly-Lys a ve kterém karboxylová skupina výchozího peptidu tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou aminokyselinového zbytku nebo dipeptidového spaceru a karboxylová skupina aminokyselinového zbytku nebo dipeptidového spaceru tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou lipofilického substituentu.

45 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je lipofilický substituent připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru, kterým je aminokyselinový zbytek kromě Cys, nebo dipeptid jako například Gly-Lys a ve kterém karboxylová skupina výchozího peptidu tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou spaceru, kterým je Asp nebo Glu, nebo dipeptidového spaceru obsahujícího Asp nebo Glu zbytek a karboxylová skupina spaceru tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou lipofilického substituentu.

55 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, který obsahuje parciálně nebo úplně hydrogenovaný cyklopentanofenanthrenový skelet.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je nerozvětvená nebo rozvětvená alkylová skupina.

5 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je acylová skupina nerozvětvené nebo rozvětvené mastné kyseliny.

10 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je acylová skupina vybraná ze skupiny zahrnující $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, ve které je n celé číslo od 4 do 38, s výhodou celé číslo od 4 do 24, výhodněji vybraná ze skupiny obsahující $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ a $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.

15 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je acylová skupina nerozvětvené nebo rozvětvené alkanové α,ω -dikarboxylové kyseliny.

20 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je acylová skupina vybraná ze skupiny zahrnující $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, ve které je m celé číslo od 4 do 38, s výhodou celé číslo od 4 do 24, výhodněji vybraná ze skupiny obsahující $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ a $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.

25 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_p((\text{CH}_2)_q\text{COOH})\text{CHNHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$, ve které p a q jsou celá čísla a $p+q$ je celé číslo od 8 do 33, s výhodou od 12 do 28.

30 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$, ve které r je celé číslo od 10 do 24.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_s\text{CO}-\text{NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$, ve které s je celé číslo od 8 do 24.

35 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $\text{COOH}(\text{CH}_2)_t\text{CO}-$, ve které t je celé číslo od 8 do 24.

40 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_u\text{CH}_3$, ve které u je celé číslo od 8 do 18.

45 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{COCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_w\text{CH}_3$, ve které w je celé číslo od 10 do 16.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$, ve které x je celé číslo od 10 do 16.

50 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, kterým je skupina vzorce $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$, ve které y je 0 nebo celé číslo od 1 do 22.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 mající lipofilický substituent, který může být záporně nabitý. Takovým lipofilickým substituentem může být např. substituent mající karboxylovou skupinu.

5 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je výchozí peptid vybrán ze skupiny obsahující GLP-1 (1-45) nebo jeho analoga.

10 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 odvozeného od GLP-1 fragmentu vybraného ze skupiny obsahující GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)-amid, GLP-1(7-37), GLP-1(7-38), GLP-1(7-39), GLP-1(7-40) a GLP-1(7-41) nebo jeho analog.

15 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1 odvozeného od GLP-1 analoga vybraného ze skupiny obsahující GLP-1(1-35), GLP-1(1-36), GLP-1(1-36)-amid, GLP-1(1-37), GLP-1(1-38), GLP-1(1-39), GLP-1(1-40) a GLP-1(1-41) nebo jeho analog.

20 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém označení analog zahrnuje deriváty, ve kterých součet do 15, výhodněji do 10 aminokyselinových zbytků byl vyměněn jakýmkoli α -aminokyselinovým zbytkem.

25 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém označení analog zahrnuje deriváty, ve kterých součet do 15, výhodněji do 10 aminokyselinových zbytků byl vyměněn jakýmkoli α -aminokyselinovým zbytkem, který může být kódován genetickým kódem.

30 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém označení analog zahrnuje deriváty, ve kterých součet do 6 aminokyselinových zbytků byl vyměněn jakýmkoli α -aminokyselinovým zbytkem, který může být kódován genetickým kódem.

35 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1(A-B), ve kterém A je celé číslo od 1 do 7 a B je celé číslo od 38 do 45, nebo jeho analog obsahující jeden lipofilický substituent připojený k C-koncovému aminokyselinovému zbytku a, volitelně, druhý lipofilický substituent připojený k jednomu ze zbývajících aminokyselinových zbytků.

V dalším výhodném provedení je výchozí peptid pro deriváty podle vynálezu vybrán ze skupiny obsahující:

Arg²⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39) a Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40).

V dalším výhodném provedení je výchozí peptid pro deriváty podle vynálezu vybrán ze skupiny obsahující

Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(7-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(7-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(7-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(7-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(7-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(1-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(1-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(1-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(1-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(1-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(1-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(2-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(2-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(2-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(2-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(2-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(2-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(2-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(2-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(3-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(3-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(3-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(3-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(3-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(3-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(3-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(3-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(4-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(4-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(4-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(4-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(4-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(4-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(4-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(4-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(5-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(5-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(5-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(5-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(5-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(5-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(5-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(5-45); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(6-38); Arg^{26,34}Lys³⁹GLP-1(6-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰GLP-1(6-40); Arg^{26,34}Lys⁴¹GLP-1(6-41); Arg^{26,34}Lys⁴²GLP-1(6-42); Arg^{26,34}Lys⁴³GLP-1(6-43); Arg^{26,34}Lys⁴⁴GLP-1(6-44); Arg^{26,34}Lys⁴⁵GLP-1(6-45); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(1-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(1-38); Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys^{36,38}GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(1-39); Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(1-39); Arg²⁶Lys³⁹GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys³⁹GLP-1(7-39) a Arg^{26,34}Lys^{36,39}GLP-1(7-39). J

- 5 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je výchozí peptid vybrán ze skupiny obsahující

Arg²⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴-GLP-1(7-37), Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37), Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁸-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37), Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37).

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je výchozí peptid vybrán ze skupiny obsahující

Arg²⁶Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38), Arg^{26,34}Lys^{36,38}-GLP-1(7-38), Gly⁸Arg²⁶Lys³⁸-GLP-1(7-38) a Gly⁸Arg^{26,34}Lys^{36,38}-GLP-1(7-38).

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je výchozí peptid vybrán ze skupiny obsahující

$\text{Arg}^{26}\text{Lys}^{39}\text{-GLP-1(7-39)}$, $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36,39}\text{-GLP-1(7-39)}$, $\text{Gly}^8\text{Arg}^{26}\text{Lys}^{39}\text{-GLP-1(7-39)}$ a $\text{Gly}^8\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36,39}\text{-GLP-1(7-39)}$.

5 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, ve kterém je výchozí peptid vybrán ze skupiny obsahující

$\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{40}\text{-GLP-1(7-40)}$, $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36,40}\text{-GLP-1(7-40)}$, $\text{Gly}^8\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{40}\text{-GLP-1(7-40)}$ a $\text{Gly}^8\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36,40}\text{-GLP-1(7-40)}$.

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje derivát GLP-1, který je vybrán ze skupiny obsahující:

$\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

$\text{Lys}^{34}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

$\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

$\text{Gly}^8\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

$\text{Gly}^8\text{Lys}^{34}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

$\text{Gly}^8\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

$\text{Arg}^{26}\text{Lys}^{34}(\text{N}^{\text{c}}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$;

Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Gly³Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);
 Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);

Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-35);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);

Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36);

Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-35);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-38);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-39);

Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);

Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);

Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);

Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly³Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(7-deoxycholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-35);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;

Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-36)amid;
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-39);

Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(choloyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(choloyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-36);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);

Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Lys²⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Gly⁸Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Gly⁸Lys^{26,34}-bis(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-35)amid;
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-37);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-37);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-38);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-39);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-39);
 Gly⁸Arg²⁶Lys³⁴(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40);
 Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Gly⁸Lys²⁶(N^ε-(lithocholoyl))Arg³⁴-GLP-1(7-40);
 Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40) a
 Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(lithocholoyl))-GLP-1(7-40).

V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje farmaceutický přípravek obsahující derivát GLP-1 a farmaceuticky vhodné přísady nebo nosiče.

5 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje použití GLP-1 derivátu podle vynálezu pro přípravu léčiva, které má dlouhodobý profil působení vzhledem k GLP-1(7-37).

10 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje použití GLP-1 derivátu podle vynálezu pro přípravu léčiva, které má dlouhodobý profil působení, k léčení diabetes inzulinnon-dependentní.

10 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje použití GLP-1 derivátu podle vynálezu pro přípravu léčiva, které má dlouhodobý profil působení, k léčení diabetes inzulin-dependentní.

15 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje použití GLP-1 derivátu podle vynálezu pro přípravu léčiva, které má dlouhodobý profil působení, k léčení obezity.

20 V dalším výhodném provedení předložený vynález popisuje způsob léčení diabetes inzulin-dependentní nebo diabetes inzulinnondependentní u pacienta vyžadujícího takovou léčbu, která zahrnuje podávání terapeuticky efektivního množství GLP-1 derivátu podle nároku 1 společně s farmaceuticky vhodným nosičem.

Detailní popis vynálezu:

25 Aby se získal dostatečně dlouhodobý profil působení GLP-1 derivátu, tak lipofilický substituent připojený k GLP-1 skupině s výhodou obsahoval 4 až 40 uhlíkových atomů, zejména 8 až 25 atomů. Lipofilický substituent může být připojen k aminoskupině GLP-1 pomocí karboxylové skupiny lipofilického substituentu, která tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou aminokyselinového zbytku, na který je připojen. Jinak může být lipofilický substituent připojen k dotyčnému aminokyselinovému zbytku takovým způsobem, že aminoskupina lipofilického substituentu tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou aminokyselinového zbytku. Jako další možnost může být lipofilický substituent spojen s GLP-1 skupinou esterovou vazbou. Formálně ester může vznikat buď reakcí mezi karboxylovou skupinou GLP-1 a hydroxylovou skupinou substituentu nebo reakcí mezi hydroxylovou skupinou GLP-1 skupiny a karboxylovou skupinou substituentu. Další možností je, že lipofilický substituent může být alkylová skupina, která je zavedena na primární aminoskupinu GLP-1.

40 V jednom z výhodných provedení vynálezu je lipofilický substituent připojen ke GLP-1 skupině pomocí spaceru takovým způsobem, že karboxylová skupina spaceru tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou GLP-1. Příklady vhodných spacerů jsou kyselina jantarová, Lys, Glu nebo Asp, nebo dipeptid jako např. Gly-Lys. Když je spacerem kyselina jantarová, tak jedna karboxylová skupina tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou aminokyselinového zbytku a druhá karboxylová skupina tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou lipofilického substituentu. Když je spacerem 45 Lys, Glu nebo Asp, tak karboxylová skupina tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou aminokyselinového zbytku a aminoskupina tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou lipofilického substituentu. Když je jako spacer použit Lys, tak může být v některých případech vsunut mezi ϵ -aminoskupinu Lys a lipofilický substituent další spacer. V jednom z výhodných provedení je takovým dalším spacerem kyselina jantarová, která tvoří amidickou vazbu s ϵ -aminoskupinou Lys a s aminoskupinou přítomnou v lipofilickém substituentu. V jiném výhodném provedení je takovým dalším spacerem Glu nebo Asp, který tvoří amidickou vazbu s ϵ -aminoskupinou Lys a jinou amidickou vazbu s karboxylovou skupinou přítomnou v lipofilickém substituentu, tzn. lipofilický substituent je N^{ϵ} -acylovaný lysinový zbytek.

V jiném výhodném provedení předloženého vynálezu obsahuje lipofilický substituent skupinu, která je záporně nabitá. Jednou z výhodných skupin, která je záporně nabitá, je karboxylová skupina.

- 5 Výchozí peptid může být vyroben metodou zahrnující kultivaci hostitelské buňky obsahující DNA sekvenci kódující peptid a schopné exprese polypeptidu ve vhodném živném médiu při podmínkách dovolujících expresi peptidu, načež se z kultury získá výsledný peptid.

- 10 Médium používané ke kultivaci buněk je běžné médium vhodné pro pěstování hostitelských buněk jako např. minimální nebo komplexní média obsahující příslušné přísady. Vhodná média jsou dostupná od komerčních dodavatelů nebo se připravují podle publikovaných návodů (např. v katalogu American Type Culture Collection). Peptid produkovaný buňkami je poté získáván ze živné půdy obvyklými postupy zahrnujícími separaci hostitelských buněk z média centrifugací nebo filtrací, srážení bílkovinných komponent supernatantu nebo filtrátu pomocí solí např. síranu amonného, čištění pomocí různých chromatografických postupů např. iontoměničová chromatografie, gelová filtrace, afinitní chromatografie nebo podobných, závislých na typu příslušného peptidu.

- 20 DNA sekvence kódující výchozí peptid je genomického nebo cDNA původu získaná např. přípravou genomické nebo cDNA knihovny a prověřením DNA sekvencí kódujících celý nebo část peptidu hybridizací používající syntetické oligonukleotidické sondy podle standardních technik (viz. např. Sambrook J, Fritsch EF a Maniatis T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). DNA sekvence kódující peptid může být také připravena synteticky zavedenými standardními způsoby např. fosfoamidová metoda popsaná v Beaucage a Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1 859–1 869, nebo metoda popsaná v Matthes a spol., *EMBO Journal* 3 (1984), 801–805. DNA sekvence může být také připravena polymerázovou řetězovou reakcí využívající specifických primerů, jak je popsáno např. v US 4 683 202 nebo v Saiki a spol., *Science* 239 (1988), 487–491.

- 30 DNA sekvence může být vložena do jakéhokoli vektoru, který může být obvyčejně vystaven postupu rekombinace DNA, a výběr vektoru bude často záviset na hostitelské buňce, do které bude zaveden. Vektor je tedy nezávisle se replikující vektor např. vektor, který existuje jako zvláštní chromozomální objekt, jehož replikace je nezávislá na chromozomální replikaci např. plasmid. Eventuelně je nosič ten, který, když je zaveden do hostitelské buňky, se začlení do genomu hostitelské buňky a replikuje se společně s chromozomem nebo chromozomy, do kterých byl začle-
- 35 něn.

- Vektor je s výhodou expresní vektor, ve kterém je sekvence kódující peptid účinně spojena s dalšími segmenty potřebnými pro transkripci DNA jako např. promotor. Promotorem je 40 jakákoli sekvence DNA, která vykazuje transkripční aktivitu ve vybraných hostitelských buňkách a je odvozena od genu kódujícího proteiny jak homologní tak heterologní k hostitelské buňce. Příklady vhodných promotorů pro řízení transkripce DNA kódující peptid podle vynálezu v různých hostitelských buňkách jsou dobře známy ze stavu techniky srov. např. Sambrook a spol., uvedeno výše.

- 45 DNA sekvence kódující peptid může být v případě potřeby účinně spojena s vhodným, terminátorem, polyadenylačními signály, transkripčně zesilujícími sekvencemi a translačně zesilujícími sekvencemi. Rekombinantní vektor podle vynálezu může dále zahrnovat DNA sekvence umožňující vektoru replikaci v příslušných hostitelských buňkách.

- 50 Vektor také může obsahovat volitelný značkovací např. gen, jehož produkt doplňuje defekty v hostitelských buňkách nebo produkt, který uděluje resistenci vůči lékům např. ampicilinu, kanamycinu, tetracyklinu, chloramfenikolu, neomycinu, hygromycinu nebo methotrexatu.

K zacílení výchozího peptidu předloženého vynálezu do sekrečních cest v hostitelské buňce je rekombinantním nosičem poskytnuta sekreční signální sekvence (nazývaná také vedoucí sekvence, prepro sekvence nebo pre sekvence). Sekreční signální sekvence je navázána na DNA sekvenci kódující peptid ve správném čtecím uspořádání. Sekreční signální sekvence je obvykle v 5' pozici vůči DNA sekvenci kódující peptid. Sekreční signální sekvence je obvykle sdružena s peptidem, nebo je z genu kódujícího jiný sekreční protein.

Postupy používané ke spojení DNA sekvencí kódujících tento peptid, promotor a volitelně terminator a/nebo sekreční signální sekvence a jejich zavedení do vhodných vektorů obsahujících informaci nezbytnou pro replikaci jsou dobře známy odborníkům (srov. např. Sambrook a spol., uvedeno výše).

Hostitelská buňka, do které je zavedena DNA sekvence nebo rekombinantní nosič, je jakákoli buňka, která je schopná produkovat popsané peptidy a zahrnuje bakterie, kvasinky, houby a vyšší eukaryotické buňky. Příklady vhodných, dobře známých a používaných hostitelských buněk jsou bez omezení *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, nebo buňky savců rodiny BHK nebo CHO.

Příklady látek, které mohou být použity jako GLP-1 skupiny podle předloženého vynálezu jsou popsány v mezinárodní patentové přihlášce WO 87/06941 (The General Hospital Corporation), která popisuje peptidové fragmenty obsahující GLP-1(7-37) a jeho funkční deriváty a jeho použití jako inzulinotropické látky.

Další GLP-1 analogy jsou popsány v mezinárodní patentové přihlášce 90/11296 (The General Hospital Corporation), která popisuje peptidové fragmenty obsahující GLP-1(7-36) a jeho funkční deriváty mající aktivitu, která převyšuje inzulinotropickou aktivitu GLP-1(1-36) nebo GLP-1(1-37), a jejich použití jako inzulinotropické látky.

Mezinárodní patentová přihláška 91/11457 (Buckley a spol.) zveřejňuje analogy aktivních GLP-1 peptidů 7-34, 7-35, 7-36 a 7-37, které mohou být také použity jako GLP-1 skupiny podle předloženého vynálezu.

Farmaceutické přípravky

Farmaceutické přípravky obsahující GLP-1 derivát podle předloženého vynálezu mohou být podávány parenterálně pacientům vyžadujícím takovou léčbu. Parenterální podávání může být prováděno podkožně, nitrosvalově nebo nitrožilně pomocí injekcí, volitelně pomocí tužkových injekcí. Eventuelně může být parenterální podávání prováděno pomocí infúzních pump. Další možností je práškový nebo kapalný přípravek pro podávání GLP-1 derivátu ve formě nosního nebo plicního spreje. Jako další možnost mohou být deriváty GLP-1 podle vynálezu podávány také transdermálně např. náplastí, volitelně iontoforetickou náplastí, nebo transmukosálně např. ústně.

Farmaceutické přípravky obsahující GLP-1 derivát podle předloženého vynálezu mohou být připraveny použitím obvyklých technik popsaných např. v Remingtonově *Pharmaceutical Sciences*, 1985 nebo v Remingtonově *The Science and Practice of Pharmacy*, 19 vydání, 1995.

Přípravky GLP-1 derivátu podle vynálezu vhodné pro injekci mohou být připraveny použitím obvyklých technik farmaceutického průmyslu, které zahrnují rozpouštění a mísení příslušných přísad poskytující požadovaný konečný produkt.

Podle jednoho postupu se GLP-1 derivát rozpustí ve vodě, jejíž objem je o něco menší než celkový objem připravovaného přípravku. Přidává se požadované izotonické činidlo, konzervační prostředek a pufr a, když je potřeba, tak se upravuje hodnota pH roztoku použitím kyseliny např. kyseliny chlorovodíkové nebo báze např. vodného roztoku hydroxidu sodného. Nakonec se vodou upraví objem roztoku tak, aby se dosáhlo požadované koncentrace přísad.

Příkladem izotonických činidel jsou chlorid sodný, mannitol a glycerol.

5 Příkladem konzervačních činidel jsou fenol, m-kresol, methyl p-hydroxybenzoat a benzylalkohol.

Příkladem vhodných pufrů jsou octan sodný a fosforečnan sodný.

10 Aby se zlepšila rozpustnost a/nebo stabilita GLP-1 derivátu, tak může roztok obsahující GLP-1 derivát podle předloženého derivátu, jako další složku k výše zmíněným složkám, také obsahovat tenzid.

15 Přípravek pro nosní podávání určitých peptidů může být připraven např. podle Evropského Patentu 272097 (Novo Nordisk NS) nebo podle WO 93/18785.

Podle jednoho výhodného provedení předloženého vynálezu je GLP-1 derivát připraven ve formě přípravku vhodného k injekčnímu podávání. Takový přípravek může být buď roztok vhodný pro injekci nebo určité množství tuhého přípravku např. lyofilizovaný produkt, který se před použitím rozpustí v rozpouštědle. Roztok vhodný pro injekci obsahuje minimálně 2 mg/ml, s výhodou minimálně 5 mg/ml, výhodněji minimálně 10 mg/ml GLP-1 derivátu a s výhodou maximálně 100 mg/ml GLP-1 derivátu.

25 GLP-1 deriváty tohoto vynálezu mohou být použity k léčení různých chorob. Použití jednotlivého GLP-1 derivátu a optimální dávka pro jakéhokoli pacienta bude záviset na léčené nemoci a na různých faktorech zahrnujících působení specifického peptidu použitého derivátu, věk, tělesná hmotnost, fyzická činnost, strava pacienta, na možné kombinaci s jinými léky a na závažnosti případu. Doporučuje se, aby bylo dávkování GLP-1 derivátu tohoto vynálezu pro každého jednotlivého pacienta určeno odborníkem.

30 Zvláště se předpokládá, že GLP-1 derivát bude užitečný pro přípravu medikamentu s dlouhodobým profilem působení pro léčení diabetes inzulinnondependentní a/nebo pro léčení obezity.

35 Předložený vynález je dále objasněn následujícími příklady, které nicméně nemají být vytvořeny jako omezení oblasti ochrany. Části zveřejněné v předcházejícím popisu a v následujících příkladech jsou, buď samostatně nebo v jakékoli jejich kombinaci, materiálem pro uskutečnění tohoto vynálezu v jeho různých formách.

Příklady provedení vynálezu:

40 Pro komerčně dostupné chemikálie je použito následujících akronymů:

DMF:	N,N-dimethylformamid
NMP:	N-methyl-2-pyrrolidon
45 EDPA:	N-ethyl-N,N-diizopropylamin
EGTA:	ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
GTP:	guanosin 5'-trifosfát
TFA:	kyselina trifluoroctová
50 THF:	tetrahydrofuran
Myr-ONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny tetradekanové
Pal-ONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny hexadekanové
Ste-ONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny oktadekanové
HOOC-(CH ₂) ₆ -COONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny ω-karboxyheptanové
55	

	HOOC-(CH ₂) ₁₀ COONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny ω-karboxyundekanové
	HOOC-(CH ₂) ₁₂ COONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny ω-karboxytridekanové
5	HOOC-(CH ₂) ₁₄ COONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny ω-karboxypetadekanové
	HOOC-(CH ₂) ₁₆ COONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny ω-karboxyheptadekanové
10	HOOC-(CH ₂) ₁₈ COONSu:	2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester kyseliny ω-karboxynonadekanové

Zkratky:

	PDMS:	plazmová desorbční hmotnostní spektrometrie
	MALDI-MS:	matricová laserově desorbční/ionizační hmotnostní spektrometrie
15	HPLC:	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
	amu:	atomová hmotnostní jednotka

Analytika

20 Plazmová desorbční hmotnostní spektrometrie

Příprava vzorku:

25 Vzorek byl rozpuštěn v 0,1% TFA/EtOH (1:1) na koncentraci 1 µg/µl. Roztok vzorku (5–10 µl) byl umístěn na nitrocelulový terčík (Bio-ion AB, Uppsala, Švédsko) a po dobu 2 minut se adsorboval na povrch terčíku. Terčík byl následně promyt 2x25 µl 0,1% TFA a byl odstředivě vysušen. Nakonec byl nitrocelulový terčík umístěn do terčového kolotoče a zaveden do hmotnostního spektrometru.

30 MS analýza:

PDMS analýza se prováděla za použití Bio-ion 20 přístroje měření doby průletu (Bio-ion Nordic AB, Uppsala, Švédsko). bylo použito urychlovací napětí 15 kV a molekulové ionty vzniklé bombardováním povrchu nitrocelulosity pomocí 252-Cf atomových fragmentů byly urychleny směrem k stop detektoru. Výsledné spektrum měření doby průletu bylo kalibrováno na skutečné hmotnostní spektrum pomocí H⁺ a NO⁺ iontů při m/z 1 a 30. Hmotnostní spektrum bylo obecně akumulováno pro 1,0x10⁶ štěpení odpovídajících 15 až 20 minutám. Všechny výsledné stanovené hmotnosti odpovídají průměrným molekulovým hmotnostem izotopů. Přesnost stanovení hmotnosti je obecně lepší než 0,1 %.

40

MALDI-MS

MALDI-TOF MS analýza se prováděla za použití Voyager RP přístroje (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA) vybaveného zdržovanou extrakcí a pracujícím při lineárním módu. Jako matrice byla použita α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina a přiřazení hmotnosti bylo založeno na externí kalibraci.

45

Příklad 1

50

Syntéza Lys²⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37).

Titulní sloučenina byla připravena z GLP-1(7-37) Směs GLP-1(7-37) (25 mg; 7,45 µmol), EDPA (26,7 mg; 208 µmol), NMP (520 µl) a vody (260 µl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok Myr-ONSu (2,5 mg; 7,67 µmol) v NMP

55

(62,5 μ l) a reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána 20 minut stát. bylo přidáno další množství Myr-ONSu (2,5 mg; 7,67 μ mol) v NMP (62,5 μ l) a výsledná směs byla mírně třepána 5 minut. Po celkové reakční době 40 minut byla reakce ukončena přidáním roztoku glycinu (12,5 mg; 166 μ mol) v 50% vodném ethanolu (12,5 ml). Titulní sloučenina byla izolována z reakční směsi pomocí HPLC využívající kyanopropyllovou kolonu (Zorbax 300SB-CN) a standardní systém acetonitril/TFA. Výtěžek byl 1,3 mg, což odpovídá 4,9 % teoretického výtěžku. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Izolovaný produkt byl analyzován PDMS a m/z hodnota pro protonovaný molekulový ion byla 3567,9 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 3566,9 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3565,9 amu). Pozice acylace (Lys26) byla ověřena enzymatickým štěpením titulní sloučeniny pomocí *Staphylococcus aureus* V8 proteasy a následným určením hmotnosti peptidového fragmentu pomocí PDMS. Kromě titulní sloučeniny byly z reakční směsi izolovány dva další GLP-1 deriváty použitím stejné chromatografické kolony a slabšího gradientu (35 až 38 % acetonitrilu za 60 minut), viz. příklady 2 a 3.

Příklad 2

Syntéza Lys³⁴(N^e-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37).

Titulní sloučenina byla izolována z reakční směsi popsané v příkladu 1 pomocí HPLC. PDMS analýza poskytla protonovaný molekulový ion m/z 3567,7 $\pm$ 3. Molekulová hmotnost je tedy 3566,7 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3565,9 amu). Poloha acylace byla určena na základě charakteru fragmentace.

Příklad 3

Syntéza Lys^{26,34}-bis(N^e-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37).

Titulní sloučenina byla izolována z reakční směsi popsané v příkladu 1 pomocí HPLC. PDMS analýza poskytla protonovaný molekulový ion m/z 3778,4 $\pm$ 3. Molekulová hmotnost je tedy 3777,4 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3776,1 amu).

Příklad 4

Syntéza Lys²⁶(N^e-tetradekanoyl)Arg³⁴-GLP-1(7-37).

Titulní sloučenina byla připravena z Arg³⁴-GLP-1(7-37). Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37) (5 mg; 1,47 μ mol), EDPA (5,3 mg; 41,1 μ mol), NMP (105 μ l) a vody (50 μ l) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok Myr-ONSu (0,71 mg; 2,2 μ mol) v NMP (17,8 μ l) a reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána 20 minut stát. Po celkové reakční době 30 minut byla reakce ukončena přidáním roztoku glycinu (25 mg; 33,3 μ mol) v 50% vodném ethanolu (2,5 ml). Reakční směs byla čištěna pomocí HPLC, jako v příkladu 1. PDMS analýza poskytla protonovaný molekulový ion m/z 3594,9 $\pm$ 3. Molekulová hmotnost je tedy 3593,9 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3593,9 amu).

Příklad 5

Syntéza Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶(NE-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37).

Titulní sloučenina byla připravena z Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37), který byl koupen od QCB. Směs Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37) (1,3 mg; 0,39 μmol), EDPA (1,3 mg; 10 μmol), NMP (125 μl) a vody (30 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok Myr-ONSu (0,14 mg; 0,44 μmol) v NMP (3,6 ml) a reakční směs byla mírně třepána 15 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (0,1 mg; 1,33 μmol) v 50% vodném ethanolu (10 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí HPLC a byla izolována titulní sloučenina (60 μg, 4 %).

10 Příklad 6

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-tetradekanoyl)-GLP-1(7-37)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37)-OH (5 mg; 1,477 μmol) EDPA (5,4 mg; 41,78 μmol), NMP (105 μl) a vody (50 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok Myr-ONSu (0,721 mg; 2,215 μmol) v NMP (18 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 45 minut. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,5 mg; 33,3 μmol) v 50% vodném ethanolu (250 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolo nové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (1,49 mg, 28 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3595±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3594±3 amu (teoretická hodnota: 3594 amu).

25

Příklad 7

Syntéza Lys^{26,34}bis(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

Směs GLP-1(7-37)-OH (70 mg; 20,85 μmol), EDPA (75,71 mg; 585,8 μmol), NMP (1,47 ml) a vody (700 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu (27,44 mg; 62,42 μmol) v NMP (686 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 50 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (34,43 mg; 458,7 μmol) v 50% vodném ethanolu (3,44 ml). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (8,6 mg, 10 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 4006±3. Výsledná molekulová hmotnost je 4005±3 amu (teoretická hodnota: 4005 amu).

40

Příklad 8

45 Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxynonadekanoyl))-GLP-1(7-36)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (5,06 mg; 1,52 μmol), EDPA (5,5 mg; 42,58 μmol), NMP (106 μl) a vody (100 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₈COONSu (1,33 mg; 3,04 μmol) v NMP (33,2 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2,5 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,50 mg; 33,34 μmol) v 50% vodném ethanolu (250 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla

50

izolována titulní sloučenina (0,46 mg, 8 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3652 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3651 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3651 amu).

5

Příklad 9

Syntéza $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxynonadekanoyl})\text{)-GLP-1(7-38)-OH}$.

- 10 Směs $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ (5,556 mg; 1,57 μmol), EDPA (5,68 mg; 43,96 μmol), NMP (116,6 μl) a vody (50 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-COONSu}$ (1,38 mg; 3,14 μmol) v NMP (34,5 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2,5 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,5 mg; 33,3 μmol) v 50% vodném ethanolu (250 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,7 mg, 12 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3866 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3865 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3865 amu).
- 20

Příklad 10

- 25 Syntéza $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxynonadekanoyl})\text{)-GLP-1(7-37)-OH}$.

- Směs $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1(7-37)-OH}$ (5,04 mg; 1,489 μmol), EDPA (5,39 mg; 41,70 μmol), NMP (105 μl) a vody (50 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-COONSu}$ (1,31 mg; 2,97 μmol) v NMP (32,8 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 30 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,46 mg; 32,75 μmol) v 50% vodném ethanolu (246 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (1,2 mg, 22 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3709 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3708 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3708 amu).
- 30
- 35

40 Příklad 11

Syntéza $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxyheptadekanoyl})\text{)-GLP-1(7-37)-OH}$.

- Směs $\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1(7-37)-OH}$ (5,8 mg; 1,714 μmol), EDPA (6,20 mg; 47,99 μmol), NMP (121,8 μl) a vody (58 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COONSu}$ (2,11 mg; 5,142 μmol) v NMP (52,8 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,83 mg; 37,7 μmol) v 50% vodném ethanolu (283 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,81 mg, 13 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3681 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3680 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3680 amu).
- 45
- 50

Příklad 12

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxyheptadekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

- 5 Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37)-OH (3,51 mg; 1,036 μmol), EDPA (3,75 mg; 29,03 μmol), NMP (73,8 μl) a vody (35 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₆-COONSu (1,80 mg; 4,37 μmol) v NMP (45 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2 hodiny a 10 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (1,71 mg; 22,79 μmol) v 50% vodném ethanolu (171 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,8 mg, 21 %) a produkt byl analyzován PDMS. 15 Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3682±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3681±3 amu (teoretická hodnota: 3681 amu).

Příklad 13

- 20 Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxyheptadekanoyl))-GLP-1(7-38)-OH.

- Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (5,168 mg; 1,459 μmol), EDPA (5,28 mg; 40,85 μmol), NMP (108,6 μl) a vody (51,8 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₆COONSu (1,80 mg; 4,37 μmol) v NMP (45 μl). Reakční směs byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2 hodiny a 15 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,41 mg; 32,09 μmol) v 50% vodném ethanolu (241 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,8 mg, 14 %) a produkt byl analyzován PDMS. 30 Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3838±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3837±3 amu (teoretická hodnota: 3837 amu).

- 35 Příklad 14

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxyheptadekanoyl))-GLP-1(7-36)-OH.

- 40 Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (24,44 mg; 7,34 μmol), EDPA (26,56 mg; 205,52 μmol), NMP (513 μl) a vody (244,4 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₆COONSu (9,06 mg; 22,02 μmol) v NMP (1,21 ml). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 30 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (12,12 mg; 161,48 μmol) v 50% vodném ethanolu (1,21 ml). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (7,5 mg, 28 %) a produkt byl analyzován PDMS. 45 Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3625±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3624±3 amu (teoretická hodnota: 3624 amu). 50

Příklad 15

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxyundekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

- 5 Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(3-37)-OH (4,2 mg; 1,24 μmol), EDPA (4,49 mg; 34,72 μmol), NMP (88,2 μl) a vody (42 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₀-COONa (1,21 mg; 3,72 μmol) v NMP (30,25 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 40 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,04 mg; 27,28 μmol)
- 10 v 50% vodném ethanolu (204 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,8 mg; 18 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonový molekulový ion byla 3598±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3597±3 amu
- 15 (teoretická hodnota: 3597 amu).

Příklad 16

- 20 Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxyundekanoyl))-GLP-1(7-38)-OH.

- Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (5,168 mg; 1,46 μmol), EDPA (5,28 mg; 40,88 μmol), NMP (108,6 μl) a vody (51,7 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě, k výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₀-COONa (1,43 mg; 4,38 μmol) v NMP (35,8 μl).
- 25 Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 50 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,41 mg; 32,12 μmol) v 50% vodném ethanolu (241 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za
- 30 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,85 mg, 16 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3753±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3752±3 amu (teoretická hodnota: 3752 amu).

35 Příklad 17

Syntéza Lys^{26,34}bis(N^ε-(ω-karboxyundekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

- Směs GLP-1(7-37)-OH (10,0 mg; 2,98 μmol), EDPA (10,8 mg; 83,43 μmol), NMP (210 μl)
- 40 a vody (100 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₀-COONa (2,92 mg; 8,94 μmol) v NMP (73 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 50 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (4,92 mg; 65,56 μmol) v 50% vodném ethanolu (492 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní
- 45 sloučenina (1,0 mg, 9 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3781±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3780±3 amu (teoretická hodnota: 3780 amu).

50

Příklad 18

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω-karboxyundekanoyl))-GLP-1(7-36)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (15,04 mg; 4,52 μmol), EDPA (16,35 mg; 126,56 μmol), NMP (315,8 μl) a vody (150,4 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₀-COONSu (4,44 mg; 13,56 μmol) v NMP (111 μl).
 5 Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 40 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (7,5 mg; 99,44 μmol) v 50% vodném ethanolu (750 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za
 10 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (3,45 mg, 22%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3540±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3539±3 amu (teoretická hodnota: 3539 amu).

15 Příklad 19

Syntéza Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxyundekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (5,87 mg; 1,73 μmol), EDPA (6,27 mg; 48,57 μmol), NMP
 20 (123,3 μl) a vody (58,7 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₀-COONSu (1,70 mg; 5,20 μmol) v NMP (42,5 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 40 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,86 mg; 286 μmol) v 50% vodném ethanolu (286 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za pou-
 25 žití kyanopropylové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (1,27 mg, 20%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3597±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3596±3 amu (teoretická hodnota: 3596 amu).

30

Příklad 20

Syntéza Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(ω-karboxyheptanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

35

Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (4,472 mg; 1,32 μmol), EDPA (4,78 mg; 36,96 μmol), NMP
 (94 μl) a vody (44,8 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₆-COONSu (1,07 mg; 3,96 μmol) v NMP (26,8 μl). Reakční směs
 40 byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 1 hodinu a 50 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,18 mg; 29,04 μmol) v 50% vodném ethanolu (218 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,5 mg, 11%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro
 45 protonovaný molekulový ion byla 3540±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3539±3 amu (teoretická hodnota: 3539 amu).

Příklad 21

50

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxyheptanoyl))-GLP-1(7-38)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (5,168 mg; 1,459 μmol), EDPA (5,28 mg; 40,85 μmol), NMP (108,6 μl) a vody (51,6 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné

směsi byl přidán roztok $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6-\text{COONSu}$ (1,18 mg; 4,37 μmol) v NMP (29,5 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 1 hodinu a 50 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,40 mg; 39,09 μmol) v 50% vodném ethanolu (240 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,5 mg, 9%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3697 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3695 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3695 amu).

Příklad 22

Syntéza $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxyheptanoyl}))\text{-GLP-1(7-37)-OH}$.

Směs $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}\text{-GLP-1(7-37)-OH}$ (5,00 mg; 1,47 μmol), EDPA (5,32 mg; 41,16 μmol), NMP (105 μl) a vody (50 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6-\text{COONSu}$ (1,19 mg; 4,41 μmol) v NMP (29,8 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,42 mg; 32,34 μmol) v 50% vodném ethanolu (242 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,78 mg, 15%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3542 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3541 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3541 amu).

Příklad 23

Syntéza $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxyheptanoyl}))\text{-GLP-1(7-36)-OH}$.

Směs $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}\text{-GLP-1(7-36)-OH}$ (5,00 mg; 1,50 μmol), EDPA (5,44 mg; 42,08 μmol), NMP (210 μl) a vody (50 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6-\text{COONSu}$ (1,22 mg; 4,5 μmol) v NMP (30,5 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,47 mg; 33,0 μmol) v 50% vodném ethanolu (247 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,71 mg, 14%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3484 ± 3 . Výsledná molekulová hmotnost je 3483 ± 3 amu (teoretická hodnota: 3483 amu).

Příklad 24

Syntéza $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxyheptanoyl}))\text{-GLP-1(7-37)-OH}$.

Směs GLP-1(7-37)-OH (10 mg; 2,5 μmol), EDPA (10,8 mg; 83,56 μmol) NMP (210 μl) a vody (100 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6-\text{COONSu}$ (2,42 mg; 8,92 μmol) v NMP (60,5 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 2 hodiny a 35 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (4,92 mg; 65,54 μmol) v 50% vod-

ném ethanolu (492 μ l). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována tituliní sloučenina (2,16 mg, 24%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3669 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 3668 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3668 amu).

Příklad 25

Syntéza Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(ω -karboxypentadekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (4,472 mg; 1,321 μ mol), EDPA (4,78 mg; 36,99 μ mol), NMP (93,9 μ l) a vody (44,7 μ l) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu (1,519 mg; 3,963 μ mol) v NMP (38 μ l). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,18 mg; 29,06 μ mol) v 50% vodném ethanolu (218 μ l). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována tituliní sloučenina (0,58 mg, 12%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3654 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 3653 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3653 amu).

Příklad 26

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁶(N^ε-(ω -karboxyheptanoyl))-GLP-1(7-36)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-OH (5,00 mg; 1,50 μ mol), EDPA (5,44 mg; 42,08 μ mol), NMP (210 μ l) a vody (50 μ l) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu (1,72 mg; 4,5 μ mol) v NMP (43 μ l). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,48 mg; 33 μ mol) v 50% vodném ethanolu (248 μ l). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována tituliní sloučenina (0,58 mg, 11%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3596 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 3595 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3595 amu).

Příklad 27

Syntéza 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl esteru kyseliny lithocholové.

Ke směsi lithocholové kyseliny (5,44 g; 14,34 mmol), N-hydroxysukcinimidu (1,78 g; 15,0 mmol), bezvodého THF (120 ml) a bezvodého acetonitrilu (30 ml), jejíž teplota byla udržována okolo 10 °C, byl přidán roztok N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (3,44 g; 16,67 mmol) v bezvodém THF. Reakční směs byla míchána 16 hodin při okolní teplotě, filtrována a vakuově zakoncentrována. Zbytek byl rozpuštěn v dichlormethanu (450 ml), promyt 10% vodným roztokem Na₂CO₃ (2 x 150 ml) a vysušen (MgSO₄). Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl vakuově zakoncentrován za vzniku krystalického zbytku. Zbytek byl překrystalován ze směsi

dichlormethanu (30 ml) a n-heptanu (30 ml) za vzniku titulní sloučeniny (3,46 g; 51 %) jako krystalické tuhé látky.

5 Příklad 28

Syntéza Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-lithocholyl)-GLP-1(7-37)-OH.

Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (4,472 mg; 1,32 μmol), EDPA (4,78 mg; 39,69 μmol), NMP (94 μl) a vody (44,8 μl) byla mírně třepána 10 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl esteru kyseliny lithocholové (1,87 mg; 3,96 μmol) v NMP (46,8 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (2,18 mg; 29,04 μmol) v 50% vodném ethanolu (218 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (1,25 mg, 25%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3744±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3743±3 amu (teoretická hodnota: 3743 amu).

Příklad 29

Syntéza N^α-tetradekanoyl-Glu(ONSu)-Obu^t.

Roztok Myr-ONSu (4,0 g; 12,3 mmol) v DMF (59 ml) byl po kapkách přidán k suspenzi H-Glu(OH)-Obu^t (2,5 g; 12,3 mmol), DMF (283 ml) a EDPA (1,58 g; 12,3 mmol). Reakční směs byla míchána 16 hodin při pokojové teplotě a poté byla vakuově zakonzentrována na celkový objem 20 ml. Zbytek byl rozdělen mezi 5% vodný roztok kyseliny citrónové (250 ml) a ethylacetát (150 ml) a obě fáze byly odděleny. Organická vrstva byla vakuově zakonzentrována a zbytek byl rozpuštěn v DMF (40 ml). Výsledný roztok byl po kapkách přidán do 10% vodného roztoku kyseliny citrónové (300 ml), který byl udržován při teplotě 0 °C. Sraženina byla shromážděna a promyta ledovou vodou a sušena ve vakuové sušárně. Vysušená látka byla rozpuštěna v DMF (23 ml) a k roztoku byl přidán HONSu (1,5 g; 13 mmol), k této směsi byl přidán roztok N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (2,44 g; 11,9 mmol) v dichlormethanu (47 ml). Reakční směs byla míchána 16 hodin při pokojové teplotě a vzniklá sraženina byla odfiltrována. Sraženina byla překrystalována ze směsi n-heptan/2-propanol za vzniku titulní sloučeniny (3,03 g; 50%).

Příklad 30

Syntéza Glu^{22,23}Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(γ-glutamyl(N^α-tetradekanoyl))-GLP-1(7-38)-OH.

Směs Glu^{22,23,30}Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (1,0 mg; 0,272 μmol), EDPA (0,98 mg; 7,62 μmol), NMP (70 μl) a vody (70 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě, k výsledné směsi byl přidán roztok N^α-tetradekanoyl-Glu(ONSu)-Obu^t připraveného podle příkladu 29 (0,41 mg; 0,816 μmol) v NMP (10,4 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 45 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (0,448 mg; 5,98 μmol) v 50% vodném ethanolu (45 μl). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (0,9 ml) a výsledná směs byla imobilizována na Varian 500 mg C8 Mega Bond Elut[®] náplni, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (10 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (10 ml). Eluát by vakuově zakonzentrován a reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za

použití kyanopropylové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,35 mg, 32%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 4012±3. Výsledná molekulová hmotnost je 4011±3 amu (teoretická hodnota: 4011 amu).

Příklad 31

10 Syntéza $\text{Glu}^{22,26}\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl})))\text{-GLP-1(7-38)-OH}$.

Směs $\text{Glu}^{22,26}\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{38}\text{-GLP-1(7-38)-OH}$ (6,07 mg; 1,727 μmol), EDPA (6,25 mg; 48,36 μmol), NMP (425 μl) a vody (425 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl-Glu(ONSu)-OBU}^1$ připraveného podle příkladu 29 (2,65 mg; 5,18 μmol) v NMP (66,3 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 45 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (2,85 mg; 38,0 μmol) v 50% vodném ethanolu (285 μl). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (5,4 ml) a výsledná směs byla imobilizována na Varian 500 mg C8 Mega Bond Elut[®] náplni, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (10 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (10 ml). Eluát byl vakuově zakonzentrován a reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,78 mg, 12%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3854±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3853±3 amu (teoretická hodnota: 3853 amu).

Příklad 32

30 Syntéza $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxytridekanoyl}))\text{-GLP-1(7-37)-OH}$.

Směs GLP-1(7-37)-OH (30 mg; 8,9 μmol), EDPA (32,3 mg; 250 μmol), NMP (2,1 ml) a vody (2,1 ml) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-COONSu}$ (12,7 mg; 35,8 μmol) v NMP (318 μl). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 40 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (3,4 mg; 44,7 μmol) v 50% vodném ethanolu (335 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (10 mg, 29%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3840±3, Výsledná molekulová hmotnost je 3839±3 amu (teoretická hodnota: 3839 amu).

Příklad 33

Syntéza $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl})))\text{-GLP-1(7-37)-OH}$. (NNC 90-1167).

Směs GLP-1(7-37)-OH (300 mg; 79,8 μmol), EDPA (288,9 mg; 2,24 mmol), NMP (21 μl) a vody (21 ml) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok $\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl-Glu(ONSu)-OBU}^1$ připraveného podle příkladu 29 (163 mg; 319,3 μmol) v NMP (4,08 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát další 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (131,8 mg; 1,76 mmol) v 50% vodném ethanolu (13,2 ml). Byl přidán 0,5% vod-

ný roztok octanu amonného (250 ml) a výsledná směs byla rozdělena na čtyři stejné části. Každá část byla vymyta na Varian 500 mg C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 0,1% vodným roztokem TFA (3,5 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí 70% vodným roztokem acetonitrilu (4 ml). Spojené eluáty byly zředěny 0,1% vodným roztokem TFA (300 ml). Sraženina byla shromážděna centrifugací, promyta 0,1 % vodným roztokem TFA a nakonec izolována centrifugací. Ke sraženině byla přidána TFA (60 ml) a výsledná reakční směs byla míchána 1,5 hodiny při pokojové teplotě. Přebytek TFA byl vakuově odstraněn a zbytek byl nalit do vody (50 ml). Sraženina byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (27,3 mg, 8 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 4036±3. Výsledná molekulová hmotnost je 4035±3 amu (teoretická hodnota: 4035 amu).

15

Příklad 34

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxypentadekanoyl))-GLP-1(7-38)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (30 mg; 8,9 μmol), EDPA (32,3 mg; 250 μmol), NMP (2,1 ml) a vody (2,1 ml) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě, k výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu (13,7 mg; 35,8 μmol) v NMP (343 μl). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (3,4 mg; 44,7 μmol) v 50% vodném ethanolu (335 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (4,8 mg, 14%) a produkt byl analyzován PDMS, Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3894±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3893±3 amu (teoretická hodnota: 3893 amu).

30

Příklad 35

Syntéza N^α-hexadekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t.

35

Roztok Pal-ONSu (7,3 g; 20,6 mmol) v DMF (100 ml) byl po kapkách přidán k suspenzi H-Glu(OH)-OBu^t (4,2 g; 20,6 mmol), DMF (500 ml) a EDPA (2,65 g; 20,6 mmol). Reakční směs byla míchána 64 hodin při pokojové teplotě a poté vakuově zakoncentrována na celkový objem 20 ml. Zbytek byl rozdělen mezi 10% vodný roztok kyseliny citrónové (300 ml) a ethylacetát (250 ml) a obě fáze byly odděleny. Organická vrstva byla vakuově zakoncentrována a zbytek byl rozpuštěn v DMF (50 ml). Výsledný roztok byl po kapkách přidán do 10% vodného roztoku kyseliny citrónové (500 ml), který byl udržován při teplotě 0 °C. Sraženina byla shromážděna a promyta ledovou vodou a sušena ve vakuové sušárně. Vysušená látka byla rozpuštěna v DMF (45 ml) a k roztoku byl přidán HONSu (2,15 g; 18,7 mmol). K této směsi byl přidán roztok N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu (3,5 g; 17 mmol) v dichlormethanu (67 ml). Reakční směs byla míchána 16 hodin při pokojové teplotě a vzniklá sraženina byla odfiltrována. Sraženina byla překrystalována ze směsi n-heptan/2-propanol za vzniku titulní sloučeniny (6,6 g; 72%).

50 Příklad 36

Syntéza Lys^{26,34}-bis(N^ε-(γ-glutamyl(N^α-hexadekanoyl)))-GLP-1(7-37)-OH.

Směs GLP-1(7-37)-OH (10 mg; 2,9 μmol), EDPA (10,8 mg; 83,4 μmol), NMP (0,7 ml) a vody (0,7 ml) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok

55

N^{α} -hexadekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t připraveného podle příkladu 33 (163 mg; 319,3 μ mol) v NMP (4,08 ml). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 20 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (4,9 mg; 65,6 μ mol) v 50% vodném ethanolu (492 μ l). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (9 ml) a výsledná směs byla eluována na Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (10 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (10 ml). Eluát byl vakuově zakoncentrován a reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (2,4 mg, 20%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 4092 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 4091 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 4091 amu).

15 Příklad 37

Syntéza Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(γ -glutamyl(N^{α} -hexadekanoyl)))-GLP-1(7-37)-OH.

Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (3,7 mg; 1,1 μ mol), EDPA (4,0 mg; 30,8 μ mol), acetonitrilu (260 μ l) a vody (260 μ l) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě, k výsledné směsi byl přidán roztok N^{α} -hexadekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t připraveného podle příkladu 35 (1,8 mg; 3,3 μ mol) v acetonitrilu (44,2 μ l). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 20 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (1,8 mg; 24,2 μ mol) v 50% vodném ethanolu (181 μ l). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (12 ml) a NMP (300 μ l) a výsledná směs byla eluována na Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (10 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (6 ml). Eluát byl ponechán stát 2 hodiny při pokojové teplotě a vakuově zakoncentrován. Zbytek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,23 mg, 6%) a produkt byl analyzován PDMS, Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3752 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 3751 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3751 amu).

35 Příklad 38

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(γ -glutamyl(N^{α} -tetradekanoyl)))-GLP-1(7-38)-OH.

Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (14 mg; 4,0 μ mol), EDPA (14,3 mg; 110,6 μ mol), NMP (980 μ l) a vody (980 μ l) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok N^{α} -tetradekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t připraveného podle příkladu 29 (12,1 mg; 23,7 μ mol) v NMP (303 μ l). Reakční směs byla mírně třepána 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidavkem roztoku glycinu (6,5 mg; 86,9 μ mol) v 50% vodném ethanolu (652 μ l). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (50 ml) a výsledná směs byla eluována na Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (15 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (6 ml). Eluát byl ponechán stát 1 hodinu a 45 minut při pokojové teplotě a poté vakuově zakoncentrován. Zbytek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (3,9 mg, 26 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3881 $\pm$ 3. Výsledná molekulová hmotnost je 3880 $\pm$ 3 amu (teoretická hodnota: 3880 amu).

Příklad 39

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxypentadekanoyl))-GLP-1(7-38)-OH.

- 5 Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (14 mg; 4,0 μmol), EDPA (14,3 mg; 111 μmol), NMP (980 μl) a vody (980 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě, k výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu (4,5 mg; 11,9 μmol) v NMP (100 μl). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 45 minut při pokojové teplotě. Byl přidán další roztok HOOC-(CH₂)₁₄-COONSu (4,0 mg; 10,4 μmol) v NMP (100 μl). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 30 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (1,5 mg; 19,8 μmol) v 50% vodném ethanolu (148 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (3,9 mg, 26 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3809±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3808±3 amu (teoretická hodnota: 3808 amu).

Příklad 40

- 20 Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(γ-glutamyl(N^α-hexadekanoyl)))-GLP-1(7-38)-OH.

- Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (14 mg; 4,0 μmol), EDPA (14,3 mg; 110,6 μmol), NMP (980 μl) a vody (980 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě, k výsledné směsi byl přidán roztok N^α-hexadekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t připraveného podle příkladu 35 (6,4 mg; 11,9 μmol) v NMP (160 μl). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 20 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (6,5 mg; 87 μmol) v 50% vodném ethanolu (653 μl). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (50 ml) a výsledná směs byla eluována na Varian lg C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (10 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (6 ml). Eluát byl ponechán stát 1 hodinu a 30 minut při pokojové teplotě a poté vakuově zakonzentrován. Zbytek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (7,2 mg, 47%) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3881±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3880±3 amu (teoretická hodnota: 3880 amu).

Příklad 41

- 40 Syntéza Arg^{18,23,26,30,34}Lys³⁸(N^ε-hexadekanoyl)-GLP-1(7-38)-OH.

- Směs Arg^{18,23,26,30,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (1,0 mg; 0,27 μmol), EDPA (0,34 mg; 2,7 μmol) a DMSO (600 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok Pal-ONSu (0,28 mg; 0,8 μmol) v NMP (7 μl). Reakční směs byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě a poté ponechána stát dalších 6 hodin při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (1,6 mg; 21,7 μmol) v 50% vodném ethanolu (163 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (0,17 mg, 16 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3961±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3960±3 amu (teoretická hodnota: 3960 amu).

Příklad 42

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(ω-karboxytridekanoyl)-GLP-1(7-38)-OH.

- 5 Směs Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38)-OH (14 mg; 4,0 μmol), EDPA (14,3 mg; 111 μmol), NMP (980 μl) a vody (980 μl) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok HOOC-(CH₂)₁₂-COONSu (4,2 mg; 11,9 μmol) v NMP (105 μl). Reakční směs byla mírně třepána 1 hodinu a 50 minut při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (6,5 mg; 87 μmol) v 50% vodném ethanolu (652 μl). Reakční směs byla čištěna pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřívána na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100 % za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (5,8 mg, 39 %) a produkt byl analyzován PDMS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3780±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3779±3 amu (teoretická hodnota: 3781 amu).

15

Příklad 43

Syntéza Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(γ-glutamyl(N^α-tetradekanoyl))-GLP-1(7-37)-OH.

20

- Směs Arg³⁴-GLP-1(7-37)-OH (15 mg; 4,4 μmol), EDPA 16 mg; 124 μmol), NMP (2 ml) a vody (4,8 ml) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok N^α-tetradekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t připraveného podle příkladu 29 (12,1 mg; 23,7 μmol) v NMP (303 μl). Reakční směs byla mírně třepána 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (6,5 mg; 86,9 μmol) v 50% vodném ethanolu (652 μl). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (50 ml) a výsledná směs byla eluována na Varian 1g C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (15 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (6 ml). Eluát byl ponechán stát 1 hodinu a 45 minut při pokojové teplotě a poté vakuově zakoncentrován. Zbytek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA. Kolona byla vyhřívána na 65 °C a acetonitrilový gradient bylo až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (3,9 mg, 26%) a produkt byl analyzován MALDI-MS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3723±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3722±3 amu (teoretická hodnota: 3723 amu).

35

Příklad 44

Syntéza N^α-oktadekanoyl-Glu(ONSu)-OBu^t.

40

- Roztok Ste-ONSu (5,3 g; 13,9 mmol) v DMF (60 ml) byl po kapkách přidán k suspenzi H-Glu(OH)-OBu^t (2,82 g; 13,9 mmol), DMF (370 ml) a EDPA (1,79 g; 13,9 mmol). Byl přidán dichlormethan (35 ml) a reakční směs byla míchána 24 hodin při pokojové teplotě a poté vakuově zakoncentrována. Zbytek byl rozdělen mezi 10% vodný roztok kyseliny citrónové (330 ml) a ethylacetát (200 ml) a obě fáze byly odděleny. Organická vrstva byla vakuově zakoncentrována a zbytek byl rozpuštěn v DMF (60 ml). Výsledný roztok byl po kapkách přidán do 10% vodného roztoku kyseliny citrónové (400 ml), který byl udržován při teplotě 0 °C. Sraženina byla shromážděna a promyta ledovou vodou a sušena ve vakuové sušárně. Vysušená látka byla rozpuštěna v DMF (40 ml) a k roztoku byl přidán HONSu (1,63 g; 14,2 mmol). K výsledné směsi byl přidán roztok DCC (2,66 g; 12,9 mmol) v dichlormethanu (51 ml). Reakční směs byla míchána 64 hodin při pokojové teplotě a vzniklá sraženina byla odfiltrována. Sraženina byla překrystalována ze směsi n-heptan/2-propanol za vzniku titulní sloučeniny (4,96 g; 68 %).

50

Příklad 45

Syntéza Arg^{26,34}Lys³⁸(N^ε-(γ-glutamyl(N^α-oktadekanoyl)))-GLP-1(7-38)-OH.

- 5 Směs Arg^{26,34}-GLP-1(7-38)-OH (28 mg; 7,9 μmol), EDPA (28,6 mg; 221,5 μmol), NMP (1,96 ml) a vody (1,96 ml) byla mírně třepána 5 minut při pokojové teplotě. K výsledné směsi byl přidán roztok N^α-oktadekanoyl-Glu(ONSu)-OBu¹ připraveného podle příkladu 44 (17,93 g; 31,6 μmol) v NMP (448 μl). Reakční směs byla mírně třepána 2 hodiny při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním roztoku glycinu (13,1 mg; 174 μmol) v 50% vodném ethanolu (1,3 ml). Byl přidán 0,5% vodný roztok octanu amonného (120 ml) a výsledná směs byla rozděle-
- 10 na na dvě stejné části. Každá část byla eluována na Varian 5g C8 Mega Bond Elut[®] náplň, imobilizovaná sloučenina byla promyta 5% vodným roztokem acetonitrilu (25 ml) a nakonec uvolněna z náplně vymytím pomocí TFA (25 ml). Eluát byl ponechán stát 1 hodinu a 25 minut při pokojové teplotě a poté vakuově zakonzentrován. Zbytek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie za použití kyanopropylkové kolony (Zorbax 300SB-CN) a standardního systému acetonitril/TFA.
- 15 Kolona byla vyhřátá na 65 °C a acetonitrilový gradient byl 0 až 100% za 60 minut. Byla izolována titulní sloučenina (3,6 mg, 11%) a produkt byl analyzován MALDI-MS. Hodnota m/z pro protonovaný molekulový ion byla 3940±3. Výsledná molekulová hmotnost je 3939±3 amu (teoretická hodnota: 3937 amu).

20

Biologické nálezy

Protrakce GLP-1 derivátů po s.c. podání

- 25 Protrakce mnoha GLP-1 derivátů vynálezu byla stanovena monitorováním jejich koncentrace v plazmě po s.c. podání zdravým vepřům za použití metody popsané níže. Pro srovnání byla sledována koncentrace GLP-1(7-37) v plazmě po s.c. podání. Výsledky jsou ukázány v tabulce 1. Protrakce dalších GLP-1 derivátů vynálezu může být stanovena stejným způsobem.
- 30 Vepři (50% Duroc, 25% Yorkshire, 25% Danish Landrace, přibližně 40 kg) byli před experimentem lační. Každému vepři bylo podáno 0,5 nmol testované látky na kilogram tělesné hmotnosti v 50 μM izotonickém roztoku (5 mM fosforečnan; pH 7,4; 0,02% Tween[®] 20 (Merck); 45 mg/ml mannitolu (bez pyrogener, Novo Nordisk)). Krevní vzorky byly odebrány z katétru ve vena jugularis po době vyznačené v tabulce 1. 5 ml krevních vzorků bylo nalito do ochlazených
- 35 nádobek obsahujících 175 μl následujícího roztoku: 0,18 M EDTA, 1500 KIE/ml aprotininu (Novo Nordisk) a 3% bacitracin (Sigma), pH 7,4. Po 30 minutách byly vzorky centrifugovány 10 minut při 5 až 6000 G. Teplota byla udržována při 4 °C. Supernatant byl pipetován do různých skleněných nádobek a uchováván před použitím při -20 °C.
- 40 Koncentrace peptidů v plazmě byla stanovena pomocí RIA využívající monoklonální protilátku specifickou pro N-koncovou část GLP-1(7-37). Zkřížené reaktivity byly menší než 1 % u GLP-1(1-37) a GLP-1(8-36)amidu a menší než 0,1 % u GLP-1(9-37), GLP-1(10-36)amidu a GLP-1(11-36)amidu. Všechny postupy byly prováděny při 4 °C.
- 45 Zkouška byla provedena následovně: 100 μl plazmy bylo smícháno pomocí vířivého směšovače s 271 μl 96% ethanolu a centrifugováno 30 minut při 2600 G. Supernatant byl dekantován do Minisorp zkumavek a úplně odpařen (Savant Speedvac AS290). Odpařený zbytek byl rekonstituován v analytickém pufru obsahujícím 80 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; 0,1% HSA (Orpha 20/21, Behring); 10 mM EDTA; 0,6 mM thiomersal (Sigma); pH 7,5. Vzorky byly rekonstituovány
- 50 v objemech vhodných pro jejich očekávané koncentrace a ponechány rekonstituovat 30 minut. 100 μl roztoku protilátky ve zředěném pufru obsahujícím 40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; 0,1% HSA; 0,6 mM thiomersal; pH 7,5 bylo přidáno k 300 μl vzorku. Nespecifický vzorek byl připraven 300 μl pufru se 100 μl zředěného pufru. Jednotlivé standardy byly připraveny ze zmrazeného vysušeného výchozího materiálu rozpuštěného v 300 μl analytického pufru. Všechny vzorky byly

preinkubovány protilátkou 72 hodin v Minisorb zkumavkách, jak je uvedeno výše. bylo přidáno 200 μ l indikátoru ve zředěném pufru obsahujícím 6 až 7000 CPM, vzorky byly smíchány a inkubovány 48 hodin. Do každé zkumavky bylo přidáno 1,5 ml suspenze 200 ml/l heparinem stabilizované hovězí plazmy a 18 g/l aktivního uhlí (Merck) v 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 0,6 mM thiomersal; pH 7,5. Před použitím byla suspenze smíchána a ponechána stát 2 hodiny při 4 °C. Všechny vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 4 °C. a poté centrifugovány 25 minut při 3400 g. Ihned po centrifugaci byl supernatant dekantován a spočítán v γ -počítadle. Koncentrace ve vzorku byla vypočtena z jednotlivých standardních křivek. Byly nalezeny následující koncentrace plazmy, vypočtené jako % maximální koncentrace pro jednotlivé sloučeniny (n = 2).

Tabulka 1

Testovaná sloučenina ^{*)}	Doba po se podání v hodinách								
	0,75	1	2	4	6	8	10	12	24
GLP-1(7-37)		100	9	1					
Příklad 25	73	92	100	98	82	24	16	16	16
Příklad 17	76	71	91	100	84	68	30		9
Příklad 43		39	71	93	100	91	59	50	17
Příklad 37		26	38	97	100	71	81	80	45
Příklad 11	24	47	59	71	100	94	100		94
Příklad 12	36	54	65	94	80	100	85		93
Příklad 32	55	53	90	83	88	70	98	100	100
Příklad 14	18	25	32	47	98	83	97		100
Příklad 13	15	22	38	59	97	85	100		76
Příklad 38	60	53	100	66	48	39	25	29	0
Příklad 39	38	100	70	47	33	33	18	27	14
Příklad 40	47	19	50	100	51	56	34	14	0
Příklad 34	19	32	44	84	59	66	83	84	100

^{*)} Testované sloučeniny jsou titulní sloučeniny jednotlivých příkladů daných čísel.

Jak vyplývá z tabulky 1, GLP-1 deriváty vynálezu mají dlouhodobý profil působení vzhledem k GLP-1(7-37) a jsou v plazmě více stálé než GLP-1(7-37). Z tabulky 1 také vyplývá, že doba, při které je v plazmě dosaženo maximální koncentrace, kolísá v širokých mezích závislých zejména na vybraném GLP-1 derivátu.

Stimulace vzniku cAMP v linii buněk specifických klonovaným lidským GLP-1 receptorem

Za účelem důkazu účinnosti GLP-1 derivátů byla testována jejich schopnost stimulovat vznik cAMP v linii buněk specifických klonovaným lidským GLP-1 receptorem. Byly vypočteny EC_{50} z křivky odezvy na dávku.

Byly použity ledvinové buňky mláďete křečka (BHK) specifické lidským pankreatickým GLP-1 receptorem (Knudsen a Pridal, 1996, Eur. J. Pharm. 318, 429-435). Plazmatické membrány byly připraveny (Adelhorst a spol, 1994, 1. Biol. Chem. 269, 6 275) homogenizací v pufru (10 mmol/l Tris-HCl a 30 mmol/l NaCl pH 7,4; obsahující navíc 1 mmol/l dithiothreitolu, 5 mg/l leupeptinu (Sigma, St. Louis, MO, USA), 5 mg/l pepstatinu (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 mg/l

bacitracinu (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 16 mg/l aprotininu (Novo Nordisk NS, Bagsvaerd, Denmark)). Homogenát byl centrifugován na vrchu vrstvy 41% (m/V) sacharosy. Bílý pás mezi dvěma vrstvami byl zředěn pufrům a centrifugován. Plazmatické membrány byly před použitím skladovány při -80°C .

5

Zkouška byla prováděna na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami s celkovým objemem 140 μl . Byl použit pufr 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4 s přídavkem 1 mmol/l EGTA; 1,5 mmol/l MgSO_4 , 1,7 mmol/l ATP; 20 mM GTP; 2 mmol/l 3-izobutyl-1-methylxanthinu; 0,01% Tween-20 a 0,1% lidského sérového albuminu (Reinst, Behringwerke AG, Marburg, Germany).
 10 Látky testované na agonistickou aktivitu byly rozpuštěny ve zředěném pufru, přidány k připravené membráně a směs byla inkubována 2 hodiny při 37°C . Reakce byla zastavena přidáním 25 μl 0,05 mol/l HCl. Vzorky byly před analýzou 10 x zředěny a cAMP stanoveno scintilační proximitní zkouškou (RPA 538, Amersham, UK). Byly zjištěny následující výsledky:

Testovaná sloučenina ^{*)}	EC_{50} , pM	Testovaná sloučenina ^{*)}	EC_{50} , pM
GLP-1(7-37)	61	Příklad 31	96
Příklad 45	120	Příklad 30	41
Příklad 43	24	Příklad 26	8,8
Příklad 40	55	Příklad 25	99
Příklad 39	5,1	Příklad 19	79
Příklad 38	54	Příklad 16	3,5
Příklad 37	60		

15 ^{*)} Testované sloučeniny jsou titulní sloučeniny jednotlivých příkladů daných čísel.

Průmyslová využitelnost:

20 Vynález popisuje deriváty GLP-1 a jejich analoga, které obsahují lipofilický substituent a mají zajímavé farmakologické vlastnosti, zvláště mají dlouhodobější profil působení než GLP-1(7-37). Vynález také popisuje farmaceutický přípravek obsahující GLP-1 derivát a použití tohoto přípravku k léčbě diabetes inzulindependentní, diabetes inzulinnondependentní a obezity.

25

PATENTOVÉ NÁROKY

30

1. Derivát nativního GLP-1(7-37) nebo jeho analog, ve kterém je celkově až 6 aminokyselinových zbytků zaměněno s jakýmkoliv α -aminokyselinovým zbytkem, který může být kódován genetickým kódem, kde derivát je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát
 35 má pouze jeden lipofilický substituent připojený k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncový nebo C-koncový aminokyselinový zbytek, kde lipofilní substituent obsahuje 8 až 25 atomů uhlíků a je vybrán ze skupiny obsahující:

- i) substituenty obsahujícími částečně nebo zcela hydrogenovaný cyklopentanofenantrenový skelet,
- 40 ii) rozvětvený nebo rozvětvený alkylový řetězec,
- iii) acyl rozvětvené mastné kyseliny,

iv) acyl nerozvětvené nebo rozvětvené mastné kyseliny vybraný z $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ a $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$, a

v) acyl nerozvětvené nebo rozvětvené alkan ε,ω -dikarboxylové kyseliny.

5

2. Derivát nativního GLP-1(7-37) nebo jeho analog, ve kterém je celkově až 6 aminokyselinových zbytků zaměněno s jakýmkoliv α -aminokyselinovým zbytkem, který může být kódován genetickým kódem, kde derivát je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát má pouze dva lipofilické substituenty, přičemž jeden je připojený k C-koncovému aminokyselinovému zbytku, zatímco druhý je připojen k aminokyselinovému zbytku, který není N-koncový nebo C-koncový aminokyselinový zbytek.

3. Derivát nativního GLP-1(7-37) nebo jeho analog, ve kterém je celkově až 6 aminokyselinových zbytků zaměněno s jakýmkoliv α -aminokyselinovým zbytkem, který může být kódován genetickým kódem, kde derivát je agonista lidského GLP-1 receptoru, přičemž derivát má pouze dva lipofilické substituenty, které jsou připojené ke dvěma různým aminokyselinovým zbytkům, které nejsou N-koncový nebo C-koncový aminokyselinový zbytek.

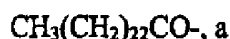
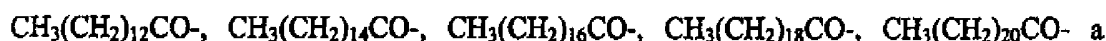
4. Derivát analogu GLP-1(7-37), ve kterém je celkově až 6 aminokyselinových zbytků zaměněno s jakýmkoliv α -aminokyselinovým zbytkem, které mohou být kódovány genetickým kódem, kde derivát je agonista lidského GLP-1 receptoru, kde analog je GLP-1(7-C), kde C je 36 až 38, který má pouze jeden lipofilický substituent, který je připojen k C-koncovému aminokyselinovému zbytku a kde lipofilní substituent obsahuje 8 až 25 atomů uhlíků a je vybrán ze skupiny obsahující:

i) substituenty obsahujícími částečně nebo zcela hydrogenovaný cyklopentanofenantrenový skelet,

ii) nerozvětvený nebo rozvětvený alkylový řetězec,

iii) acyl rozvětvené mastné kyseliny,

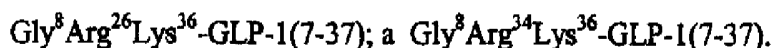
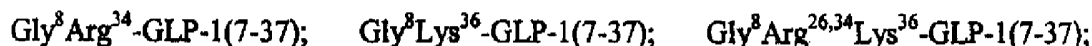
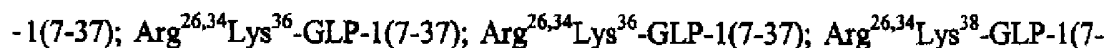
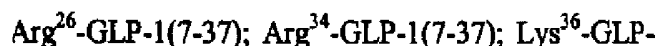
iv) acyl nerozvětvené nebo rozvětvené mastné kyseliny vybraný z



30

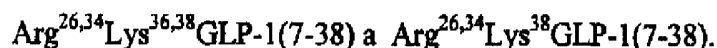
v) acyl nerozvětvené nebo rozvětvené alkan ε,ω -dikarboxylové kyseliny.

5. Derivát GLP-1(7-37) podle některého z nároků 1 až 4, kde analog GLP-1(7-37) je vybrán ze skupiny skládající se z



35

6. Derivát GLP-1(7-37) podle některého z nároků 1 až 4, kde analog GLP-1(7-37) je vybrán ze skupiny skládající se z



7. Derivát GLP-1(7-37) podle některého z nároků 2, 3, 5 a 6, kde lipofilní substituent obsahuje 4 až 40 atomů uhlíků, výhodně 8 až 25 atomů uhlíku.
8. Derivát podle jakéhokoli předcházejícího nároku, ve kterém je lipofilický substituent
5 připojen k aminokyselinovému zbytku takovým způsobem, že karboxylová skupina lipofilického substituentu tvoří amidickou vazbu s aminoskupinou aminokyselinového zbytku.
9. Derivát podle jakéhokoli předcházejícího nároku, ve kterém je lipofilický substituent
10 připojen k výchozímu peptidu pomocí spaceru.
10. Derivát podle nároku 9, ve kterém spacer je dipeptid jako je Gly-Lys nebo aminokyselinový zbytek kromě Cys.
11. Derivát podle nároku 10, ve kterém aminoskupina výchozího peptidu tvoří amidickou vazbu
15 s karboxylovou skupinou aminokyselinového zbytku nebo dipeptidového spaceru a aminoskupina aminokyselinového zbytku nebo dipeptidového spaceru tvoří amidickou vazbu s karboxylovou skupinou lipofilického substituentu.
12. Derivát podle jakéhokoli z nároků 2, 3, 5 až 11, ve kterém lipofilický substituent obsahuje
20 částečně nebo úplně hydrogenovaný cyklopentanofenanthrenový skelet.
13. Derivát podle jakéhokoli z nároků 2, 3, 5 až 11, ve kterém lipofilický substituent je acylová skupina nerozvětvené nebo rozvětvené mastné kyseliny.
14. Derivát podle nároku 13, ve kterém je acylová skupina vybraná ze skupiny obsahující
25 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, ve které je n celé číslo od 4 do 38, výhodněji $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CO}-$ a $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ a $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.
15. Derivát podle jakéhokoli z nároků 2, 3, 5 až 11, ve kterém je lipofilický substituent acylová
30 skupina nerozvětvené nebo rozvětvené alkan ε,ω -dikarboxylové kyseliny.
16. Derivát podle nároku 15, ve kterém je acylová skupina vybraná ze skupiny obsahující
35 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, ve které je m celé číslo od 4 do 38, s výhodou celé číslo od 4 do 24, výhodněji vybraná ze skupiny obsahující $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ a $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.
17. Derivát podle jakéhokoli z nároků 1 až 11 a 13 až 16, ve kterém lipofilický substituent se
40 spacerem je skupina vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_z\text{CO}-$, ve které r je celé číslo od 10 do 24.
18. Derivát podle jakéhokoli z nároků 1 až 11 a 13 až 16, ve kterém lipofilický substituent se
45 spacerem je skupina vzorce $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_s\text{CO}-\text{NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$, ve které s je celé číslo od 8 do 24.
19. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\varepsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
20. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Lys}^{34}(\text{N}^{\varepsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
21. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\varepsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
50
22. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\varepsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{Arg}^{34}\text{-GLP-1(7-37)}$.
23. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Gly}^8\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\varepsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
55

24. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{24,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
25. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxynonadekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 5 26. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxynonadekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)}$.
27. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxynonadekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 10 28. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptadekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
29. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptadekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 15 30. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptadekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)}$.
- 20 31. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyundekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
32. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyundekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)}$.
33. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyundekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 25 34. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyundekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
35. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 30 36. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptanoyl})\text{-GLP-1(7-38)}$.
37. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
38. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxyheptanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 35 39. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxypentadekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
40. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}\text{-lithocholyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 40 41. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Glu}^{22,23,30}\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)})$.
42. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Glu}^{23,26}\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)})$.
- 45 43. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxytridekanoyl})\text{-GLP-1(7-37)}$.
44. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl}))\text{-GLP-1(7-37)}$.
- 50 45. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\omega\text{-karboxypentadekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)}$.
46. Derivát podle nároku 3, kterým je $\text{Lys}^{26,34}\text{-bis}(\text{N}^{\epsilon}\text{-}\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-hexadekanoyl}))\text{-GLP-1(7-37)}$.

47. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-hexadekanoyl})))\text{-GLP-1(7-37)}$.
48. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl})))\text{-GLP-1(7-38)}$.
- 5 49. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxypentadekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)})$.
50. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-hexadekanoyl})))\text{-GLP-1(7-38)}$.
51. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{18,23,26,30,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}\text{-hexadekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)}$.
- 10 52. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\omega\text{-karboxytridekanoyl})\text{-GLP-1(7-38)})$.
53. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-tetradekanoyl})))\text{-GLP-1(7-37)}$.
54. Derivát podle nároku 1, kterým je $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{38}(\text{N}^{\epsilon}-(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-oktadekanoyl})))\text{-GLP-1(7-38)}$.
- 15 55. Farmaceutický přípravek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje derivát podle jakéhokoli předcházejícího nároku a farmaceuticky přijatelnou přísadu nebo nosič.
56. Použití derivátu podle jakéhokoli z nároků 1 až 54 pro přípravu léčiva, které má dlouhodobý profil působení vzhledem k GLP-1(7-37).
57. Použití derivátu podle jakéhokoli z nároků 1 až 54 pro přípravu léčiva k léčení inzulinne-
20 pendentní diabetes mellitus.
58. Použití derivátu podle jakéhokoli z nároků 1 až 54 pro přípravu léčiva k léčení inzulinde-
pendentní diabetes mellitus.
59. Použití derivátu podle jakéhokoli z nároků 1 až 54 pro přípravu léčiva k léčení obezity.
60. Použití derivátu podle jakéhokoli z nároků 1 až 54 pro přípravu léčiva k léčení jedné nebo
25 více potíží vybraných z inzulinneindependentní diabetes mellitus, inzulindependentní diabetes mellitus a obezity.
61. Derivát podle jakéhokoliv z nároků 1 až 54 pro použití jako léčivo.
62. Derivát podle jakéhokoliv z nároků 1 až 54 pro použití jako léčivo k léčení jedné nebo více
30 potíží vybraných z inzulinneindependentní diabetes mellitus, inzulindependentní diabetes mellitus a obezity.

Konec dokumentu
