(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 868 T2** 2005.12.01

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 708 179 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 868.4**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 307 299.8**
(96) Europäischer Anmeldetag: **13.10.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.04.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **22.12.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.12.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/16**
C07K 14/605, A61K 38/26

(30) Unionspriorität:
324960 **18.10.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US

(74) Vertreter:
Spott & Weinmiller, 80336 München

(72) Erfinder:
Chen, Victor John, Indianapolis, Indiana 46140, US; Dimarchi, Richard D., Carmel, Indiana 46033, US; Kriauciunas, Aidas V., Indianapolis, Indiana 46254, US; Smiley, David L., Greenfield, Indiana 46140, US; Stucky, Russell D., Indianapolis, Indiana 46227, US

(54) Bezeichnung: **Glucagon-ähnliche insulinotrope Peptid-Analoge, Zusammensetzungen und Verwendungsverfahren**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die organische Chemie und die Peptidchemie mit einer Anwendung auf pharmazeutische Forschung und Entwicklung. Die Erfindung liefert neue Peptidderivate und Zusammensetzungen, die zur Heraufregulierung der Insulinexpression bei Säugern und zur Behandlung von Diabetes brauchbar sind.

[0002] Endokrine Sekretionen von Pankreasinselzellen werden durch komplexe Kontrollmechanismen reguliert, die nicht nur durch aus dem Blut stammende Metaboliten gesteuert werden, wie Glucose, Aminosäuren und Katecholamine, sondern auch durch lokale parakrine Einflüsse. Die hauptsächlichen Pankreasinselzellhormone, nämlich Glucagon, Insulin und Somatostatin, wechselwirken mit spezifischen Pankreaszelltypen (jeweils A, B und D Zellen), um die Sekretionsreaktion zu modulieren. Obwohl die Insulinsekretion vorwiegend durch die Blutglucosespiegel kontrolliert wird, hemmt Somatostatin die durch Glucose vermittelte Insulinsekretion. Zusätzlich zur parakrinen Regulation der Insulinsekretion zwischen den Inselzellen gibt es Hinweise, dass im Dünndarm insulinotrope Faktoren vorkommen. Dieses Konzept geht von den Beobachtungen aus, dass oral aufgenommene Glucose ein viel stärkerer Stimulus für die Insulinsekretion ist, als eine vergleichbare Menge an Glucose, die intravenös verabreicht wird.

[0003] Das humane Hormon Glucagon ist ein 29 Aminosäuren langes Hormon, das in Pankreas-A-Zellen gebildet wird. Das Hormon gehört zu einer Multigenfamilie an strukturell verwandten Peptiden, die Sekretin, Enterogastron, vasoaktives-intestinales Peptid und Glicentin umfassen. Diese Peptide regulieren den Kohlenhydratmetabolismus, die gastrointestinale Motilität und die sekretorische Prozessierung auf verschiedene Weise. Jedoch sind die vorwiegend wahrgenommenen Wirkungen des Pankreasglucagons die Förderung der hepatischen Glycogenolyse und Glyconeogenese, was zu einer Erhöhung der Blutzuckerspiegel führt. Diesbezüglich wirken die Aktivitäten von Glucagon denen von Insulin entgegen und können zur Hyperglykämie beitragen, die Diabetes mellitus begleitet (P. K. Lund et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 345–349 (1982)).

[0004] Wenn Glucagon an den Rezeptor auf Insulin-produzierenden Zellen bindet, steigt die cAMP Bildung an, die wiederum die Insulinexpression stimuliert (L. Y. Korman et al., Diabetes 34: 717–722 (1985)). Darüberhinaus regulieren große Mengen an Insulin die Glucagonsynthese durch einen zurückwirkenden Hemmmechanismus nach unten (W. F. Ganong, Review of Medical Physiology, Lange Publications, Los Altos, California, Seite 273 (1979)). Daher wird die Expression von Glucagon sorgfältig von Insulin und letztlich durch die Serumglucosespiegel reguliert.

[0005] Präproglucagon, die Vorläuferform von Glucagon, wird aus einem 360 Basenpaaren langen Gen translatiert und wird unter Bildung von Proglucagon prozessiert (Lund et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 345–349 (1982)). Patzelt et al., (Nature, 282: 260–266 (1979)) zeigen, dass Proglucagon weiter zu Glucagon und einem zweiten Peptid prozessiert wird. Spätere Experimente haben gezeigt, dass Proglucagon auf der Carboxylseite von Lys-Arg oder Arg-Arg Resten gespalten wird (P. K. Lund et al., L. C. Lopez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 5485–5489 (1983) und G. I. Bell et al., Nature 302: 716–718 (1983)). G. I. Bell et al., haben auch festgestellt, dass das Proglucagon 3 diskrete und hoch homologe Peptidregionen enthält, die als Glucagon, Glucagon-ähnliches Peptid 1 (GLP-1) und Glucagon-ähnliches Peptid 2 (GLP-2) bezeichnet werden. Lopez et al. haben gezeigt, dass GLP-1 ein 37 Aminosäuren langes Peptid ist und dass GLP-2 ein 34 Aminosäuren langes Peptid ist. Analoge Untersuchungen bezüglich der Struktur von Rattenpräproglucagon haben ein ähnliches Muster an proteolytischer Spaltung an Lys-Arg oder Arg-Arg Resten gezeigt, was zur Bildung von Glucagon, GLP-1 und GLP-2 führt (G. Heinrich et al. Endocrinol., 115: 2176–2181 (1984)). Schließlich wurde festgestellt, dass GLP-1-Sequenzen aus dem Menschen, der Ratte, dem Rind und dem Hamster identisch sind (M. Ghiglione et al., Diabetologia, 27: 599–600 (1984)).

[0006] Die von Lopez et al. gezogene Schlussfolgerung bezüglich der Größe von GLP-1 wird durch die Untersuchung der molekularen Formen von GLP-1 bestätigt, die im humanen Pankreas gefunden werden (L. O. Uttenthal et al., J. Clin. Endocrinol. Metabol., 61: 472–479 (1985)). Ihre Forschung zeigt, dass GLP-1 und GLP-2 im Pankreas als Peptide mit jeweils 37 und 34 Aminosäuren vorkommen.

[0007] Die Ähnlichkeit zwischen GLP-1 und Glucagon hat die ersten Forscher vermuten lassen, dass GLP-1 eine biologische Aktivität haben könnte. Obwohl einige Forscher festgestellt haben, dass GLP-1 Rattenhirnzellen zur Synthese von cAMP induzieren können (N. M. Hoosein et al., Febs. Lett 178: 83–86 (1984)) ist es anderen Forschern nicht gelungen, eine physiologische Rolle für GLP-1 zu finden (L. C. Lopez et al., siehe obige Literaturstelle). Das Versagen eine physiologische Rolle für GLP-1 zu identifizieren, veranlasste einige Forscher zu der Frage, ob GLP-1 tatsächlich ein Hormon ist und ob die Beziehung zwischen Glucagon und

GLP-1 nicht ein Artefakt sein könnte.

[0008] Es wurde nun gezeigt, dass die biologisch prozessierten Formen von GLP-1 insulinotrope Eigenschaften haben und die Magenentleerung verzögern können. GLP-1(7-34) und GLP-1(7-35) sind in US 5 118 666 A beschrieben. GLP-1(7-37) ist in US 5 120 712 A beschrieben.

[0009] Die Varianten und Analoga von GLP-1 sind in der Technik bekannt. Diese Varianten und Analoga umfassen beispielsweise GLP-1(7-36), Gln^{9}-GLP-1(7-37), D-Gln^{9}-GLP-1(7-37), Acetyl-Lys^{9}-GLP-1(7-37), Thr^{16}-Lys^{18}-GLP-1(7-37) und Lys^{18}-GLP-1(7-37). Derivate von GLP-1 umfassen beispielsweise Säureadditionssalze, Carboxylatsalze, Niederalkylester und Amide (siehe beispielsweise WO91/11457 A). Im allgemeinen stimulieren die verschiedenen beschriebenen Formen von GLP-1 die Insulinsekretion (insulinotrope Wirkung) und cAMP Bildung [siehe beispielsweise S. Mojsov, Int. J. Peptide Protein Research, 40: 333–343 (1992)].

[0010] Die nach dem Prioritätsdatum der vorliegenden Patentanmeldung offengelegte EP 0 685 568 A betrifft Moleküle des Glucagon-ähnlichen Peptid 1 mit einer modifizierten Histidinfunktionalität an der Position 7.

[0011] Wichtiger ist, dass mehrere Autoren eine vorhersagbare Beziehung zwischen verschiedenen in vitro Laborexperimenten und den insulinotropen Reaktionen beim Säuger, insbesondere dem Menschen, auf die exogene Verabreichung von GLP-1, GLP-1 (7-36)Amid und GLP-1 (7-37)-Säure gezeigt haben (siehe beispielsweise M. A. Nauck et al., Diabetologia, 36: 741–744 (1993), M. Gutniak et al., New England J. of Medicine, 326 (20): 1316–1322 (1992), M. A. Nauck et al., J. Clin. Invest., 91: 301–307 (1993) und B. Thorens et al., Diabetes, 42: 1219–1225 (1993)).

[0012] Die fundamentalen Defekte, die für die Verursachung der Hyperglykämie beim altersbedingten Diabetes verantwortlich sind, umfassen eine gestörte Sekretion des endogenen Insulins und eine Resistenz gegenüber den Wirkungen von Insulin durch Muskel- und Lebergewebe (J. S. Galloway, Diabetes Care, 13: 1209–1239 (1990)). Der letztere Defekt führt zu einer exzessiven Produktion der Glucose durch die Leber. Während ein normales Individuum Glucose mit einer Geschwindigkeit von etwa 2 mg/kg/Minute freisetzt, übersteigt diese Menge bei Patienten mit altersbedingtem Diabetes gewöhnlich 2,5 mg/kg/Minute, was zu einem Nettoüberschuss von zumindest 70 Gramm Glucose pro 24 Stunden führt.

[0013] Aufgrund der Tatsache, dass überaus hohe Korrelationen zwischen der Glucosebildung der Leber, dem Glucosespiegel im nüchternen Zustand und der gesamten metabolischen Kontrolle bestehen, wie sie durch die Glycohämoglobinmessungen anzeigt werden (J. A. Galloway, siehe obige Literaturstelle und J. A. Galloway et al., Clin. Therap. 12: 460–472 (1990)) ist es naheliegend, dass die Kontrolle der Blutglucose im nüchternen Zustand essentiell zur Erreichung der gesamten Normalisierung des Metabolismus ist, die ausreicht, um die Komplikation der Hyperglykämie zu verhindern. Da existierende Insulintherapien selten die Glucoseproduktion der Leber normalisieren ohne eine signifikante Hyperinsulinämie und Hypoglykämie zu verursachen (J. A. Galloway und J. A. Galloway et al., siehe obige Literaturstellen), sind alternative Ansätze erforderlich. Eine auf die Verabreichung von GLP-1 Analoga basierende Therapie ist ein solcher Ansatz und ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung.

[0014] Derzeit weist die Therapie unter Verwendung der Moleküle vom GLP-1 Typ ein signifikantes Problem auf, da die Serumhalbwertszeit von solchen Peptiden ziemlich kurz ist. Beispielsweise hat GLP-1(7-37) eine Serumhalbwertszeit von nur 3 bis 5 Minuten. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand dürfte die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) GLP-1(7-37) leicht zusätzlich zur schnellen Absorbtion und Clearance nach einer parenteralen Verabreichung inaktivieren. Daher besteht ein dringender Bedarf für biologisch aktive GLP-1(7-37) Analoga, die ausgedehnte pharmakodynamische Profile nach einer parenteralen Verabreichung aufweisen.

[0015] Demnach ist es ein primäres Ziel der Erfindung, neue, chemisch modifizierte Peptide bereitzustellen, die nicht nur die Insulinsekretion bei Typ II Diabetes stimulieren, sondern auch andere nützliche insulinotrope Reaktionen hervorrufen. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung persistieren im Serum für längere Zeiträume als natives GLP-1(7-37) entweder durch eine Resistenz gegenüber DPP IV oder durch eine langsamere Absorption und Clearance als natives GLP-1(7-37) nach einer parenteralen Verabreichung. Höchst überraschend zeigen einige Verbindungen der vorliegenden Erfindung einen synergistischen Effekt, da einzelne Veränderungen gegenüber GLP-1(7-37) die biologische Performance von Verbindungen nicht wettmachen können, die die gesamten Veränderungen enthalten.

[0016] Die vorliegende Erfindung liefert Verbindungen der allgemeinen Formel:

R^1-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-

Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe-Ile-

Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R^3

|

R^2

(Formel 1)

worin R^1 ausgewählt ist aus 4-Imidazopropionyl (Desaminohistidyl), 4-Imidazoacetyl oder 4-Imidazo-α,α-dimethylacetyl,
R^2 ausgewählt ist aus unverzweigtem C_6-C_{10} Acyl oder fehlt,
R^3 ausgewählt ist aus Gly-OH oder NH_2, und
Xaa für Lys oder Arg steht, mit der Maßgabe, dass wenn R^1 für 4-Imidazopropionyl steht und Xaa für Lys steht, R^2 dann aus unverzweigtem C_6-C_{10} Acyl ausgewählt ist.

[0017] Die vorliegende Erfindung liefert auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine erfindungsgemäße Verbindung in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Verdünnungsmittel oder Hilfsstoff umfassen. Die vorliegende Erfindung liefert ferner die Verwendung einer Verbindung der vorliegenden Erfindung zur Behandlung des nicht-Insulin-abhängigen Diabetes mellitus bei einem Säuger, der einer solchen Behandlung bedarf, die die Verabreichung einer wirksamen Menge einer Verbindung der vorliegenden Erfindung an diesen Säuger umfasst.

[0018] In einer Ausführungsform liefert die vorliegende Erfindung Analoga von natürlich vorkommendem GLP-1(7-37), die durch die Anfügung von verschiedenen R-Gruppen über eine Peptidbindung an den Aminoterminus des Peptidteils der Formel 1 entstehen. Wahlweise werden weitere erfindungsgemäße Verbindungen durch die Acylierung der ε-Aminogruppe des Lys^{34} Rests und durch Ausführung limitierter Aminosäuresubstitutionen an der Position 26 oder durch Veränderung des Carboxyterminus hergestellt. Daher ist die Herstellung des Polypeptidrückgrads der Formel 1 ein logischer erster Schritt bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen.

[0019] Es sollte erwähnt werden, dass diese Spezifikation das Nomenklaturschema verwendet, das für die prozessierten Formen von GLP-1 entwickelt wurde. In diesem Schema wird dem Aminoterminus des bekannten GLP-1(7-37) die Nummer 7 und dem Carboxyterminus die Nummer 37 zugeordnet. Daher entspricht der erste Ala Rest der Formel 1 dem Rest 8 von GLP-1(7-37)OH. Ähnlich entspricht Xaa in Formel 1 dem Rest 26 von GLP-1(7-37)OH und so weiter.

[0020] Mit der hierin beschriebenen Sequenzinformation und dem Stand der Technik in der Festphasenproteinsynthese kann der Proteinteil der Formel 1 durch chemische Synthese hergestellt werden. Es können auch rekombinante DNA Techniken zur Expression des Proteinrückgrads der Formel 1 verwendet werden.

[0021] Die Prinzipien der chemischen Festphasensynthese von Polypeptiden sind in der Technik gut bekannt und können in allgemeinen Texten im Fachgebiet gefunden werden, wie H. Dugas und C. Penney, Bioorganic Chemistry (1981) Springer-Verlag, New York, Seiten 54–92, J. M. Merrifield Chem. Soc., 85: 2149 (1962) und Stewart und Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Seiten 24–66, Freeman (San Francisco, 1969).

[0022] Beispielsweise kann der Proteinteil der Formel 1 durch Festphasenmethodik mittels eines 430A Peptidsynthesegeräts (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) und Synthesezyklen, die von PE-Applied Biosystems bereitgestellt werden, synthetisiert werden. BOC-Aminosäuren und andere Reagenzien sind im Handel von PE-Applied Biosystems und anderen chemischen Herstellern erhältlich. Sequentielle BOC-Chemie mittels Doppelkupplungsprotokollen wird auf die p-Methylbenzhydrylaminausgangsharze zur Herstellung der C-terminalen Carboxamide angewendet. Zur Herstellung der C-terminalen Säuren wird das entsprechende PAM Harz verwendet. Asn, Gln und Arg werden mittels vorgefertigter Hydroxybenzotriazolester gekuppelt. Die folgenden Seitenkettenschutzgruppen können verwendet werden:
Arg, Tosyl
Asp, Cyclohexyl
Glu, Cyclohexyl
Ser, Benzyl
Thr, Benzyl
Tyr, 4-Bromcarbobenzoxy

[0023] Die Abspaltung der BOC-Gruppe kann mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid erreicht werden. Nach der Vervollständigung der Synthese können mit wasserfreiem Fluorwasserstoff (HF), der 10% meta-Cresol enthält, die Schutzgruppen entfernt und die Peptide vom Harz abgespalten werden. Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen und des Peptids vom Harz wird bei –5°C bis 5°C, vorzugsweise auf Eis für 60 Minuten durchgeführt. Nach der Entfernung des HF wird das Peptid/Harz mit Ether gewaschen und das Peptid wird mit Eisessig extrahiert und lyophilisiert.

[0024] Die Herstellung von geschützten, ungeschützten und partiell geschützten GLP-1 Molekülen wurde in der Technik beschrieben. Siehe US 5 120 712 A und US 5 118 666 A und C. Orskov et al., J. Biol. Chem., 264 (22); 12826–12829 (1989) und WO 91/11457 A (D. I. Buckley et al. vom B. August 1991).

[0025] Ähnlich liefert der Stand der Technik in der Molekularbiologie dem Fachmann ein weiteres Mittel, durch das der Proteinteil der Formel 1 erhalten werden kann. Obwohl er durch Festphasenpeptidsynthese oder rekombinante Verfahren hergestellt werden kann, können rekombinante Verfahren bevorzugt sein, da höhere Ausbeuten möglich sind. Die grundlegenden Schritte bei der rekombinanten Herstellung sind:

a) Isolierung einer natürlichen DNA Sequenz, die für GLP-1 kodiert, oder Konstruktion einer synthetischen oder semisynthetischen für GLP-1 kodierenden DNA Sequenz,

b) Plazieren der kodierenden Sequenz in einen Expressionsvektor in einer Weise, die zur Expression der Proteine entweder alleine oder als Fusionsproteine geeignet ist,

c) Transformation einer geeigneten eukaryotischen oder prokaryotischen Wirtszelle mit dem Expressionsvektor,

d) Kultivierung der transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die die Expression eines GLP-1 Zwischenprodukts erlauben, und

e) Gewinnung und Reinigung des rekombinant hergestellten Proteins.

[0026] Wie vorher erwähnt können die kodierenden Sequenzen vollkommen synthetisch sein oder das Ergebnis von Modifikationen der längeren, für natives Glucagon kodierenden DNA sein. Eine DNA Sequenz, die für Präproglucagon kodiert, ist in Lund et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 345–349 (1982) beschrieben und kann als Ausgangsmaterial bei der semisynthetischen Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen durch Veränderung der nativen Sequenz zur Erreichung der gewünschten Ergebnisse verwendet werden.

[0027] Synthetische Gene, deren in vitro oder in vivo Transkription und Translation zur Bildung des Proteinteils der Formel 1 führen, können durch Techniken konstruiert werden, die in der Technik gut bekannt sind. Aufgrund der natürlichen Degeneriertheit des genetischen Codes erkennt der Fachmann, dass eine beträchtliche aber definierte Anzahl an DNA Sequenzen konstruiert werden kann, die alle für das Polypeptid der Formel 1 kodieren.

[0028] Die Methodik der Konstruktion von synthetischen Genen ist in der Technik gut bekannt. Siehe Brown et al., (1979) Methods in Enzymology, Academic Press, N. Y., Band 68, Seiten 109–151. DNA Sequenzen, die für das Proteinrückgrad der Formel 1 kodieren, können aufgrund der hierin beschriebenen Aminosäuresequenzen entworfen werden. Einmal entworfen, kann die Sequenz an sich mittels herkömmlicher DNA Synthesegeräte hergestellt werden, wie den Modell 380A oder 380B DNA Synthesegeräten (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404).

[0029] Um die Expression des Polypeptids der Formel 1 zu bewirken, inseriert man die hergestellte synthetische DNA Sequenz in einem von vielen geeigneten rekombinanten DNA Expressionsvektoren durch die Verwendung von geeigneten Restriktionsendonukleasen. Siehe allgemein Maniatis et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., Band 1–3. Es werden Restriktionsschnittstellen an jedes Ende der für das GLP-1 Zwischenprodukt kodierenden DNA angebracht, um die Isolierung aus und die Integration in bekannte Amplifizierungs- und Expressionsvektoren zu erleichtern. Die im einzelnen verwendeten Endonukleasen werden durch das Restriktionsmuster des verwendeten Ausgangsexpressionsvektors vorgegeben. Die Wahl der Restriktionsschnittstellen erfolgt so, dass die kodierende Sequenz mit den Kontrollsequenzen richtig orientiert wird, um eine im Leserahmen korrekte Ablesung und Expression des Proteins von Interesse zu erreichen. Die kodierende Sequenz muss so positioniert werden, dass sie im richtigen Leserahmen mit dem Promotor und der Ribosomenbindungsstelle des Expressionsvektors liegt, die beide in der Wirtszelle funktionsfähig sind, in der das Protein exprimiert werden soll.

[0030] Um eine effiziente Transkription des synthetischen Gens zu erreichen, muss es funktionsfähig mit einer Promotor-Operator Region verbunden sein. Daher wird die Promotor-Operator Region des Gens in derselben sequenziellen Orientierung in Bezug auf das ATG Startcodon des synthetischen Gens plaziert.

[0031] Es ist eine Vielzahl an Expressionsvektoren in der Technik gut bekannt, die zur Transformation von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen brauchbar sind. Siehe The Promega Biological Research Products Catalogue (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399) und The Stratagene Cloning Systems Catalogue (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037). Die US-A 4 710 473 beschreibt zirkuläre Plasmidtransformationsvektoren aus zirkulärer DNA, die zur Expression von exogenen Genen in E. coli in hohen Mengen brauchbar sind. Diese Plasmide sind als Transformationsvektoren in rekombinanten DNA Verfahren brauchbar und

(a) verleihen dem Plasmid die Fähigkeit zur autonomen Replikation in einer Wirtszelle,
(b) kontrollieren die autonome Plasmidreplikation in Bezug zur Temperatur, bei der die Wirtszellkulturen gehalten werden,
(c) stabilisieren den Erhalt des Plasmids in den Wirtszellpopulationen,
(d) steuern die Synthese eines Proteinprodukts, das den Plasmiderhalt in einer Wirtszellpopulation anzeigt,
(e) liefern eine Reihe von Restriktionsschnittstellen, die in dem Plasmid nur einmal vorkommen, und
(f) beenden die mRNA Transkription.

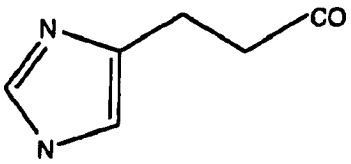
[0032] Diese zirkulären DNA Plasmide sind als Vektoren in rekombinanten DNA Verfahren zur Sicherstellung von hohen Expressionsspiegeln von exogenen Genen brauchbar.

[0033] Nach der Konstruktion eines Expressionsvektors für das Protein der Formel 1 ist der nächste Schritt die Plazierung des Vektors in eine geeignete Zelle und die Konstruktion einer rekombinanten Wirtszelle hierdurch, die zur Expression des Polypeptids brauchbar ist. Techniken zur Transformation von Zellen mit rekombinanten DNA Vektoren sind in der Technik gut bekannt und können in allgemeinen Literaturen, wie Maniatis et al., siehe obige Literaturstelle gefunden werden. Wirtszellen können entweder aus eukaryotischen oder prokaryotischen Zellen konstruiert werden.

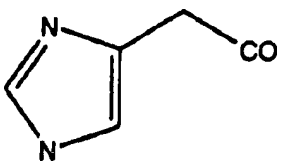
[0034] Prokaryotische Wirtszellen bilden im allgemeinen das Protein mit größeren Geschwindigkeiten und sind leichter zu kultivieren. Proteine, die in hohem Maß in bakteriellen Exressionssystemen exprimiert werden, aggregieren charakteristischerweise in Granula oder Einschlusskörperchen, die hohe Mengen des überexprimierten Proteins enthalten. Solche Proteinaggregate müssen typischerweise mittels in der Technik gut bekannter Verfahren aufgelöst, denaturiert und rückgefaltet werden. Siehe Kreuger et al., (1990) in Protein Folding, Gierasch und King, Herausgeber, Seiten 136–142, American Association for the Advancement of Science Publication Nr. 89–18S, Washington, D. C. und US 4 923 967 A.

[0035] Nach der Herstellung des Polypeptidrückgrads der Formel 1 wird ein Imidazol, wie dies oben in der "Zusammenfassung der Erfindung" definiert ist, an den Aminoterminus unter Bildung von verschiedenen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung angefügt. Die Kupplung der Imidazolgruppe an das Polypeptid der Formel 1 wird durch chemische Synthesemittel erreicht. Da alle der verschiedenen organischen Gruppen, die von der Erfindung umfasst werden, eine Carbonsäure enthalten, kann die Imidazolgruppe durch eine Festphasenproteinsynthese analog zur Anfügung einer Aminosäure an den N-Terminus eines Polypeptids angefügt werden. Alternativ dazu kann ein aktivierter Ester der Imidazolgruppe durch chemische Standardreaktionsverfahren angefügt werden.

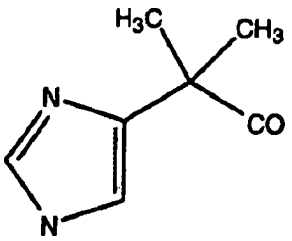
[0036] Bevorzugte Imidazolgruppen der vorliegenden Erfindung sind:
4-Imidazopropionyl (Desaminohistidyl)



4-Imidazoacetyl



und 4-Imidazo-α,α-dimethylacetyl



[0037] Die am meisten bevorzugte Gruppe ist 4-Imidazopropionyl.

[0038] Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden durch Acylierung der ε-Aminogruppe des Lys^{34} Rests hergestellt. Geradkettige Acylanfügungen, die zwischen 6 bis 10 Kohlenstoffatome enthalten, sind bevorzugt und unverzweigtes C_8 ist am meisten bevorzugt.

[0039] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst Aminosäuresubstitutionen an der Position 26 (Xaa) der Formel 1. Lys und Arg sind an dieser Position möglich, wobei Arg bevorzugt ist.

[0040] Die Modifikationen am Carboxyterminus werden auch von der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0041] So kann R^3 für Gly-OH oder NH_2 stehen, wobei Gly-OH gegenüber den carboxyterminalen Amidausführungsformen bevorzugt ist.

[0042] Die Anfügung einer Acylgrupe an die ε-Aminogruppe von Lys^{34} kann mittels jedem einer Vielzahl an in der Technik bekannten Verfahren erreicht werden. Siehe Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications", Seiten 1, 2–12 (1990), Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity", Band 6, Nr. 2, Seiten 171–176 (1989).

[0043] Beispielsweise kann der N-Hydroxysuccinimidester der Octansäure an das Lysyl-ε-amin mittels 50% Acetonitril in Boratpuffer angefügt werden. Das Peptid kann entweder vor oder nach der Anfügung der Imidazolgruppe acyliert werden. Darüberhinaus ist eine Acylierung vor der enzymatischen Spaltung möglich, falls das Peptid rekombinant hergestellt wird.

[0044] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Salzformen der GLP-1(7-37) Analoga. Die Verbindungen der Erfindung können ausreichend sauer oder ausreichend basisch sein, um mit einer Vielzahl an anorganischen Basen und anorganischen und organischen Säuren unter Bildung eines Salzes zu reagieren. Säuren, die herkömmlich zur Bildung von Säureadditionssalzen verwendet werden, sind anorganische Säuren, wie Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Iodwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure und dergleichen und organischen Säuren, wie p-Toluolsulfonsäure, Methansulfonsäure, Oxalsäure, p-Bromphenylsulfonsäure, Kohlensäure, Bernsteinsäure, Citronensäure, Benzoesäure, Essigsäure und dergleichen. Beispiele für solche Salze umfassen Sulfat, Pyrosulfat, Eisulfat, Sulfit, Bisulfit, Phosphat, Monohydrogenphosphat, Dihydrogenphosphat, Metaphosphat, Pyrophosphat, Chlorid, Bromid, Iodid, Acetat, Propionat, Decanoat, Caprylat, Acrylat, Formiat, Isobutyrat, Caproat, Heptanoat, Propiolat, Oxalat, Malonat, Succinat, Suberat, Sebacat, Fumarat, Maleat, Butin-1,4-dioat, Hexin-1,6-dioat, Benzoat, Chlorbenzoat, Methylbenzoat, Dinitrobenzoat, Hydroxybenzoat, Methoxybenzoat, Phthalat, Sulfonat, Xylolsulfonat, Phenylacetat, Phenylpropionat, Phenylbutyrat, Citrat, Lactat, γ-Hydroxybutyrat, Glycolat, Tartrat, Methansulfonat, Propansulfonat, Naphthalin-1-sulfonat, Naphthalin-2-sulfonat, Mandelat und dergleichen. Bevorzugte Säureadditionssalze sind die, die mit Mineralsäuren gebildet werden, wie Chlorwasserstoffsäure und Bromwasserstoffsäure, und speziell Chlorwasserstoffsäure.

[0045] Basenadditionssalze umfassen die, welche von anorganischen Basen stammen, wie Ammonium- oder Alkali- oder Erdalkalimetallhydroxide, -carbonate, -bicarbonate und dergleichen. Solche zur Herstellung der erfindungsgemäßen Salze brauchbaren Basen sind unter anderem Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniumhydroxid, Kaliumcarbonat und dergleichen. Die Salzformen der GLP-1(7-37) Analoga sind besonders bevorzugt. Wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen für therapeutische Zwecke verwendet werden, können diese Verbindungen auch in Form eines Salzes vorliegen, aber das Salz muss pharmazeutisch annehmbar sein.

[0046] GLP-1(7-37) Analoga der vorliegenden Erfindung zeigen eine insulinotrope Aktivität. Der Ausdruck "insulinotrope Aktivität" betrifft die Fähigkeit einer Substanz, die Synthese oder Expression des Hormons Insulin zu stimulieren oder eine Stimulierung zu verursachen.

[0047] Die insulinotrope Eigenschaft einer Verbindung kann durch die Bereitstellung der Verbindung an Tierzellen oder durch die Injektion der Verbindung in Tiere und der Verfolgung der Freisetzung von immunreaktivem Insulin (IRI) jeweils in das Medium oder das Kreislaufsystem des Tieres bestimmt werden. Das Vorkommen von IRI wird durch die Verwendung eines Radioimmuntests detektiert, der spezifisch Insulin detektieren kann.

[0048] Obwohl jeder Radioimmuntest zur Bestimmung des Vorkommens von IRI verwendet werden kann, kann auch eine Modifikation des Tests verwendet werden. Siehe J. D. M. Albano et al., Acta Endocrinol., 70: 487–509 (1972). Die insulinotrope Eigenschaft einer Verbindung kann auch durch die Pankreasinfusion bestimmt werden. Siehe J. C. Penhos, et al., Diabetes, 18: 733–738 (1969).

[0049] Die vorliegende Erfindung liefert auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine Verbindung der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Verdünnungsmittel oder Hilfsstoff enthalten. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen werden auf eine in der pharmazeutischen Technik bekannte Weise hergestellt und werden einzeln oder in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln vorzugsweise über parenterale Wege verabreicht. Ein besonders bevorzugter Weg ist die subkutane Verabreichung.

[0050] Parenterale Dosierungen liegen im Bereich von etwa 1 pg/kg bis etwa 1000 µ Körpergewicht, obwohl geringere oder höhere Dosierungen verabreicht werden können. Die erforderliche Dosis hängt von der Schwere des Zustands des Patienten und von Kriterien ab, wie der Größe, dem Gewicht, dem Geschlecht, dem Alter und der Krankengeschichte des Patienten.

[0051] Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen wird der Wirkstoff, der zumindest eine Verbindung der vorliegenden Erfindung umfasst, gewöhnlich mit einem Hilfsstoff gemischt oder mit einem Hilfsstoff verdünnt. Wenn ein Hilfsstoff als Verdünnungsmittel verwendet wird, kann dies ein festes, halbfestes oder flüssiges Material sein, das als Vehikel, Träger oder Medium für den Wirkstoff dient. Flüssige Hilfsstoffe sind bevorzugt.

[0052] Bei der Herstellung einer Formulierung kann es notwendig sein, den Wirkstoff zu mahlen, um die geeignete Partikelgröße vor der Kombination mit den anderen Inhaltsstoffen bereitzustellen. Falls der Wirkstoff im wesentlichen unlöslich ist, wird er gewöhnlich auf eine Partikelgröße von weniger als etwa 200 Mesh gemahlen. Falls der Wirkstoff im wesentlichen wasserlöslich ist, wird die Partikelgröße normalerweise durch Mahlen eingestellt, um eine im wesentlichen gleichförmige Verteilung in der Formulierung bereitzustellen, beispielsweise etwa 40 Mesh.

[0053] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können so formuliert werden, dass sie eine schnelle, anhaltende oder verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs nach der Verabreichung an den Patienten durch Verwendung von in der Technik bekannten Verfahren bereitstellen. Die Zusammensetzungen werden vorzugsweise in einer Einheitsdosierungsform formuliert, wobei jede Dosierung normalerweise etwa 50 µg bis etwa 100 mg, gewöhnlicher etwa 1 mg bis etwa 10 mg des Wirkstoffs enthält. Der Ausdruck "Einheitsdosierungsform" bezieht sich auf physikalisch getrennte Einheiten, die als einmalige Dosierungen für den Menschen oder andere Säuger geeignet sind, wobei jede Einheit eine vorbestimmte Menge an Wirkstoff, die zur Herstellung des gewünschten therapeutischen Effekts berechnet wurde, zusammen mit einem geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoff enthält.

[0054] Für die parenterale Verabreichung werden Zusammensetzungen, die eine erfindungsgemäße Verbindung enthalten, vorzugsweise mit destilliertem Wasser bei einem geeigneten pH kombiniert. Es können zusätzliche pharmazeutische Verfahren verwendet werden, um die Wirkdauer zu kontrollieren. Kontrolliert freisetzende Präparationen können durch die Verwendung von Polymeren erreicht werden, um eine Verbindung der vorliegenden Erfindung zu komplexieren oder zu absorbieren. Die kontrollierte Abgabe kann durch die Auswahl von geeigneten Makromolekülen (beispielsweise Polyestern, Polyaminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Ethylenvinylacetat, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose und Protaminsulfat) und die Konzentration von Makromolekülen, wie auch der Verfahren der Einarbeitung, um die Freisetzung zu kontrollieren, erreicht werden.

[0055] Ein weiteres mögliches Verfahren zur Verlängerung der Wirkdauer durch kontrolliert freisetzende Präparationen ist die Einarbeitung einer Verbindung der vorliegenden Erfindung in Partikel aus einem polymeren Material, wie Polyestern, Polyaminosäuren, Hydrogelen, Polymilchsäure oder Ethylenvinylacetatcopolymeren.

[0056] Alternativ dazu ist es anstelle der Einarbeitung einer Verbindung in diese polymeren Partikel möglich eine in der vorliegenden Erfindung verwendete Verbindung in Mikrokapseln, die beispielsweise durch Koazervationstechniken oder durch Grenzflächenpolymerisation hergestellt werden, beispielsweise jeweils Hydroxymethylcellulose- oder Gelatinemikrokapseln oder in kolloidalen Arzneimittelabgabesystemen, beispielsweise Liposomen, Albuminmikrokugeln, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln oder in Makroemulsionen einzuschließen. Solche Techniken sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980 beschrieben.

[0057] Die erfindungsgemäßen Verbindungen haben eine insulinotrope Aktivität. Daher liefert ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Steigerung der Insulinexpression, das die Bereitstellung einer wirksamen Menge einer Verbindung der vorliegenden Erfindung an eine Säugerpankreasinselzelle vom B-Typ umfasst.

[0058] Ähnlich liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Diabetes mellitus bei einem Säuger, vorzugsweise einem Menschen, der einer solchen Behandlung bedarf, das die Verabreichung einer wirksamen Menge einer Verbindung oder Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung an einen solchen Säuger umfasst.

[0059] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um bei der Beschreibung zu helfen, wie die verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung herzustellen und auszuführen sind. Diese Beispiele sollen den Schutzumfang der Erfindung nicht beschränken.

Beispiel 1

Synthese von (Arg 26) GLP-1(8-37)OH

[0060] Der Polypeptidteil der Formel 1, worin Xaa für Arg steht und R^3 für Gly-OH steht, wird durch Festphasensynthese auf einem Modell 430A Peptidsynthesegerät (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) mittels der Boc Schutzgruppenstrategie hergestellt. Die Schutzgruppen der Seitenketten sind: Asp (Chxl), Glu (OBzl), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Lys (Cl-Z), His (BOM), Trp (CHO), Tyr (Br-Z) und Arg (Tos). Alle außer Asp (Chxl) (Peptides International) werden von PE-Applied Biosystems erhalten. Jeder Rest wird unter Verwendung von entweder durch DCC initiiertem symmetrischem Anydrid oder HOBt Aktivierung doppelt gekuppelt. Das Zwischenprodukt mit den 30 Aminosäuren bleibt am Harz.

Beispiel 2

Synthese von N-Imidazogropionyl(Arg26)GLP-1(8-37)OH

[0061] N-Cbz-Imidazol-4-ylpropansäure (R. G. Jones, J. Amer. Chem. Soc. 71, 383 (1949)) wird an das (8-37)Peptidylharz gekuppelt, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist, indem man 0,5 g (1,8 mmol) an N-Cbz-Imidazol-4-ylpropansäure in jede von zwei Histidinkartuschen gibt und den normalen Histidindoppelkupplungszyklus am Modell 430A Peptidsynthesegerät ausführt.

[0062] Das präparierte modifizierte Peptidylharz wird mit 20 ml an 20% Piperidin in DMF (Dimethylformamid) bei 4°C für 1 Stunde unter Entfernung der Trp(CHO) Schutzgruppe behandelt. Etwa 2,6 g des modifizierten Peptidylharzes werden mehrmals mit CH_2Cl_2 gewaschen, in ein Teflon (eingetragenes Warenzeichen) Reaktionsgefäß überführt und im Vakuum getrocknet. Es werden 2 ml m-Cresol und ein Magnetrührstab zum Gefäß gegeben, das an ein HF Gerät (Pennisula Laboratories, Inc.) angeschlossen, auf –78°C abgekühlt und evakuiert wird und 20,25 ml HF werden in das Gefäß kondensiert. Das Reaktionsgefäß wird für 60 Minuten in einem Eisbad gerührt und der HF wird dann durch Vakuum entfernt. Der modifizierte Peptidrest (GLP-1 Analogon) wird in 200 ml Ethylether suspendiert und kurz gerührt. Das feste Material wird dann mittels einer 60 ml fassenden Glasnutsche filtriert. Nach dem zweimaligen Waschen der Feststoffe mit Ethylether wird das GLP-1 Analogon durch Waschen der Feststoffe mit jeweils 40 ml an 50% wässriger Essigsäure und 10% wässriger Essigsäure solubilisiert. 100 µl des vereinigten wässrigen Filtrats werden entfernt und für eine Standard HPLC Analyse mittels der folgenden Bedingungen präpariert:

Puffer:	A) 0,1% TFA B) 0,1% TFA/50% CH_3CN
Säule:	Vydac C18 (0,46 × 15 cm)
Temperatur:	45°C
Flussrate:	1,0 ml/min
Detektor:	214 nm
Gradient:	0% B für 5 Minuten, dann 0 bis 100% B über 60 Minuten

[0063] Das verbleibende, wässrige Filtrat (etwa 90 ml) wird in zwei Portionen aufgeteilt und jeweils auf eine 2,2 × 25 cm Vydac C18 Säule aufgetragen und bei Raumtemperatur unter Verfolgung bei 214 nm präparativ chromatographiert (Pharmacia FPLC). Die Fraktionen werden alle 5 Minuten bei einer Flussrate von 4 ml/min in einem Gradienten, der mit 20% B (A und B sind dieselben wie oben) beginnt und mit 100% B endet über 790 Minuten bei Raumtemperatur gesammelt.

[0064] Die UV absorbierenden Fraktionen werden durch HPLC analysiert und ausgewählte Fraktionen (61–67) werden vereinigt und unter Bildung von 114 mg der Titelverbindung lyophilisiert. Auf ähnliche Weise werden 175 mg aus dem zweiten Teil erhalten. Das GLP-1 Analogon wird durch Massenspektrumanalyse mittels schnellem Atombeschuss (FAB) und Aminosäureanalyse charakterisiert. Der gefundene molekulare Ionenpeak (3369,2) stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht (3368,7) + 1 überein. Die Aminosäureverhältnisse stimmen mit dem gewünschten Produkt überein:

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

Beispiel 3

Synthese von N-Imidazopropionyl(Arg26(N^{ε}-Octanoyl(lysyl34)))GLP-1(8-37))OH

[0065] N-Imidazolpropyl((Arg26)GLP-1(8-37)OH wird mit N-Succinimidyloctanoat am N^{ε}-Amin von Lys^{34} auf folgende Weise acyliert.

[0066] N-Imidazopropionyl((Arg26)GLP-1(8-37)OH (70,5 mg, 0,021 mmol), das wie in den Beispielen 1 und 2 hergestellt wird, wird in 25 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. N-Succinimidyloctanoat (19,1 mg, 0,079 mmol) wird dann zugegeben und bis zur Lösung gerührt. Ein zehnfacher molarer Überschuss an Tetramethylguanidin (26,2 ml, 0,21 mmol) wird zugegeben, um eine volle Deprotonierung der ε-Aminogruppe sicherzustellen. Das Reaktionsgemisch wird bei Umgebungstemperatur gerührt und durch HPLC verfolgt. Nach 45 Minuten wird die Reaktion mit 100 ml an 0,1 N HCl gestoppt. Gelartige Partikel werden durch die Passage des Gemisches durch einen Glaswollstopfen in einem Glastrichter entfernt.

[0067] Eine Trennung des Titelprodukts von den Ausgangsmaterialien wird auf einer präparativen C4 Umkehrphasen HPLC Säule mittels der folgenden Bedingungen erreicht:

Puffer:	A) 0,1% TFA, 5% Acetonitril B) 0,1% TFA/95% Acetonitril
Säule:	Vydac C4 (2,2 × 25 cm)
Temperatur:	Umgebungstemperatur
Flussrate:	2,0 ml/min
Detektor:	280 nm
Gradient:	25–55% B über 300 Minuten

[0068] Das Titelprodukt eluiert bei 44,6 bis 46,7% Acetonitril, wie dies durch analytische HPLC der einzelnen Fraktionen bestimmt wird. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt, eingefroren und lyophilisiert. Die Reaktion ergibt 22,7 mg (32%) mit einer ungefähren Reinheit von 87% gemäß HPLC.

[0069] Eine zusätzliche Reinigung wird mittels eines zweiten präparativen HPLC Schritts bei pH = 7,7 mit den folgenden Bedingungen erreicht:

Puffer:	A) 0,1 M $(NH_4)HCO_3$, 10% Acetonitril B) 0,1 M $(NH_4)HCO_3$, 50% Acetonitril
Säule:	Vydac C18 (2,2 × 25 cm)
Temperatur:	Umgebungstemperatur
Flussrate:	2,0 ml/min
Detektor:	280 nm
Gradient:	50 bis 90% B über 300 Minuten

[0070] Die Probe (22,7 mg) wird in 20 ml an Puffer A gelöst und auf die Säule aufgetragen. Eine Trennung der Komponenten wird mittels des obigen Gradienten erreicht. Das Titelprodukt eluiert zwischen 34,8 und 35,6% Acetonitril, wie dies durch analytische HPLC bestimmt wird. Geeignete Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute beträgt 10,46 mg (46,1%) des Titelprodukts mit einer HPLC Reinheit von etwa 99%. Die Gesamtausbeute für beide RP-HPLC Schritte beträgt auf Gewichtsbasis 14,8%.

Beispiel 4

Synthese von N-Imidazoacetyl(Arg 26)GLP-1(8-37)OH

[0071] [N-(tert-Butoxycarbonyl)imidazol-4-yl]essigsäure wird aus 4-Imidazolessigsäure durch Schutz des Imidazolrings mit tert-Butoxycarbonyl auf folgende Weise hergestellt. Di-tert-Butyldicarbonat (1,1 Äqu./Äqu. des Amins) wird zu einem Gemisch des freien Amins, Kaliumcarbonat (1,1 Äquivalente) und 50% wässriges Dioxan gegeben und das Ganze wird bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Das entstehende Gemisch wird mit Diethylether verdünnt und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird mit 0,33 M (1,0 N) wässrige Citronensäure angesäuert und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die Extrakte werden getrocknet ($MgSO_4$) und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Das entstehende Öl wird aus einem geeigneten Lösemittel kristallisiert.

[0072] Die [N-(tert-Butoxycarbonyl)imidazol-4-yl]essigsäure wird dann an das (8-37)-Peptidylharz gekuppelt, wie dies in Beispiel 1 beschrieben ist, wobei etwa 0,5 g (1,8 mmol) in jeweils zwei Histidinkartuschen gegeben werden und der normale Histidindoppelkupplungszyklus am Modell 430A Peptidsynthesegerät ausgeführt wird, wie dies in Beispiel 2 beschrieben ist.

[0073] Das modifizierte Pepidylharz wird vom Harz freigesetzt und im wesentlichen gemäß dem Beispiel 2 gereinigt. Die UV absorbierenden Fraktionen werden durch HPLC analysiert und werden dann vereinigt und unter Bildung von etwa 100 mg der Titelverbindung lyophilisiert. Eine Probe wird dann durch schnellen Atombeschuss (FAB) und Massenspektralanalyse analysiert. Der gefundene molekulare Ionenpeak stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht überein.

Beispiel 5

Synthese von N-[Imidazol-α,α-dimethylacetyl]GLP-1(8-37)OH

[0074] α,α-Dimethyl-α-[N-(tert-butoxycarbonyl)imidazol-4-yl]essigsäure wird aus N-Trityl-α,α-dimethyl-4-imi-

dazolacetonitril [J. I. DeGraw, et al., JMC, 20, 1671 (1977)] folgendermaßen hergestellt.

[0075] N-Trityl-α,α-dimethyl-4-imidazolacetonitril (3,97 g, 10,5 mmol) werden zu 5% konzentrierter HCl/Methanollösung (25 ml) gegeben und das Ganze wird für 3 Stunden am Rückfluss gekocht, bevor es im Vakuum konzentriert wird. Das verbleibende Material wird zwischen 5 M (5 N wässrig) HCl (25 ml) und Ethylacetat (50 ml) aufgeteilt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und für 24 Stunden am Rückfluss gekocht. Nach einer Konzentrierung im Vakuum wird die rohe α,α-Dimethyl-4-imidazolessigsäure in Wasser gelöst und erneut konzentriert. Die Titelverbindung (1,88 g, Smp. 155°C (Zers.)) wird aus dieser rohen Säure durch das allgemeine oben beschriebene Verfahren hergestellt.

[0076] Die α,α-Dimethyl-α-[N-(tertbutoxycarbonyl)imidazol-4-yl]essigsäure wird dann an das (8-37)-Peptidylharz im wesentlichen gemäß den vorhergehenden Beispielen gekuppelt.

Beispiel 6

Synthese von N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2

[0077] GLP-1(8-36)NH_2 wird durch Festphasenpeptidchemie auf einem Applied Biosystems (ABI) 460A Peptidsynthesegerät mittels eines MBHA Harzes hergestellt (ABI, Lotnummer A1A023, 0,77 mmol/g). Bei allen Aminosäuren sind die α-Aminogruppen durch die tert-Butoxycarbonylgruppe (t-Boc) geschützt. Die mit reaktiven Seitenketten sind folgendermaßen geschützt: Arg(Tos), Lys(Cl-Z), Trp(CHO), Glu(CHex), Tyr(Br-Z), Ser(Bzl), Asp(OBzl), Thr(Bzl).

[0078] Die geschützten Aminosäuren werden in Dichlormethan (DCM) mit einem halben Äquivalent an Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) pro Äquivalent der Aminosäure unter Bildung des symmetrischen Anhydrids der Aminosäure aktiviert. Jedoch werden Arginin-, Glutamin- und Glycinreste durch die Bildung der 1-Hydroxybenzotriazolester (HOBt Ester) der Aminosäuren geschützt (1 : 1 : 1 Äquivalente der Aminosäure, HOBt und DCC in Dimethylformamid (DMF)).

[0079] Die Reste werde nacheinander vom C-terminalen Ende zum N-terminalen Ende mit einer Reihe an Kupplungs- und Schutzgruppenentfernungszyklen zusammengebracht. Ein Kupplungszyklus besteht aus der aktivierten Aminosäure, die einer nukleophilen Substitution über das freie primäre Amin der vorher gekuppelten Aminosäure unterzogen wird. Die Schutzgruppenentfernung ist die Entfernung der N-terminalen Schutzgruppe Boc mit wasserfreier Trifluoressigsäure (TFA). Dies erzeugt eine freie Amingruppe nach einer Neutralisierung mit Diisopropylethylamin (DIEA).

[0080] Der Synthesemaßstab beträgt 0,5 mmol. Die Konzentration der funktionellen Stellen am MBHA-Harz beträgt 0,77 mmol/g und 649 mg des Harzes werden verwendet. Ein zweifacher molarer Überschuss des symmetrischen Anhydrids wird für alle Aminosäuren verwendet. Das C-terminale Arginin wird durch Standardprotokolle an das MBHA-Harz gekuppelt. Alle Reste werden doppelt gekuppelt, das heißt, dass jeder Rest zweimal an das Harz gekuppelt wird. Die zweite Kupplung wird ohne einen Boc Schutzgruppenabspaltungsschritt vor der erneuten Zugabe der Aminosäure ausgeführt. Dies hilft, alle freien Amingruppen am Harz reagieren zu lassen. Der Tryptophanrest wird vierfach gekuppelt.

[0081] Die Titelverbindung wird mittels des Peptidylharzes und der R-Gruppe von Beispiel 4 im wesentlichen gemäß der vorhergehenden Beispiele hergestellt. Nachdem die R-Gruppe an den Aminoterminus angefügt wurde und die Formylgruppen entfernt wurden, wird das Peptid vom Harz durch die Hydrolyse mit flüssigem Fluorwasserstoff (HF) bei 0°C für 1 Stunde unter Verwendung eines Teflonreaktionsgefäßes freigesetzt. Für jedes Gramm Peptidylharz wird 1 ml m-Kresolfänger zugegeben und es werden 10 ml flüssiger HF verwendet. Der Fänger verhindert die erneute Bindung der Seitenkettenschutzgruppen (freigesetzt als Carbokationen) an das Peptid. Nach 1 Stunde wird HF durch Vakuum entfernt, was eine Aufschlämmung des Peptids, der Harzes und des m-Kresols zurücklässt.

[0082] Das Peptid wird dann im HF Reaktionsgefäß mit eiskaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wird in eine 150 ml Glasnutsche zusammen mit mehreren Etherwaschschritten überführt. Das physikalische Gemisch aus Peptid und Harz wird mehrmals mit kaltem Ether unter Entfernung des restlichen HF und m-Kresols gewaschen. Der zweite Schritt ist die Extraktion des Peptids weg vom Harz mittels 10 Essigsäure in Wasser (V/V). Eine Vakuumfiltration in einen sauberen Rundbodenkolben führt zu einer rohen Peptidlösung.

Beispiel 7

In vitro Rezeptorbindungstest (cAMP Test)

a) GLP-1 Rezeptor-Membranpräparation aus der Ratte

[0083] Die veröffentlichte DNA Sequenz für den GLP-1 Rattenrezeptor (B. Thorens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8641–8645 (1992) und das Dihydrofolatreduktaseresistenzmarkergen werden zusammen mit PCR Techniken verwendet, um einen Expressionsvektor zu konstruieren. Die DXB-11 Variante der Ovarzelllinie des Chinesischen Hamsters (CHO) wird mit dem Vektor transformiert, was zu einer rekombinanten CHO Zellinie führt, die den GLP-1 Membranrezeptor der Ratte exprimiert.

[0084] Die Zellen werden angezogen und geerntet und man erhält eine Membranpräparation, indem man zuerst die Zellen mit PBS Puffer und dann zweimal mit kaltem Puffer wäscht (25 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 20 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 50 µg/ml Trypsininhibitor pH 8,0) und in Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in einem Glasteflonhomogenisiergerät lysiert und die entstehende Probe wird dann bei 35 300 × g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet wird in kaltem Puffer resuspendiert und homogenisiert. Es werden Aliquots bei –80°C gelagert.

b) Test auf cyclisches AMP (cAMP)

[0085] Eine Probe der Membranpräparation wird mit einer Testverbindung oder einer Kontrollverbindung in Puffer (25 mM HEPES, 0,2% (G/V) BSA, pH 7,6) bei 32°C für 10 Minuten vorinkubiert. Es wird Reaktionspuffer (Endkonzentration: 25 mM HEPES, 0,2% (G/V) BSA, 2,6 mM Mg, 0,8 mM ATP, 0,1 mM GTP, 5 mM Creatinphosphat, Creatinkinase 50 E/ml, 0,2 mM IBMX, pH 7,6) zugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Die Inkubationen werden durch die Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt.

[0086] Die Bildung von cAMP wird mittels eines Fluoreszenztracerimmuntestverfahrens gestoppt. Kurz gesagt wird nach dem Stoppen der Inkubation der Fluoreszenztracer (cAMP-b-Phycoeyrthrinkonjugat) zugegeben, wonach die Zugabe von Affinitäts-gereinigtem anti-cAMP Kaninchenantiserum erfolgt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 45 Minuten werden mit anti-Kaninchen IgG beschichtete Testkügelchen zugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Die Platten werden dann evakuiert und auf einem Pandex PFCIA Lesegerät ausgelesen.

[0087] In diesem Test zeigt ein bekanntes insulinotropes Mittel, wie GLP-1(7-37)OH eine abnehmende Fluoreszenzintensität aufgrund einer erhöhten cAMP Konzentration. Die Fluoreszenzintensitätswerte werden mit der Geschwindigkeit der cAMP Bildung (pmol/min/mg) korreliert. Im Gegensatz dazu können Mittel ohne insulinotrope Wirkung die Bildung von cAMP nicht stimulieren und zeigen daher keine Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Tabelle 1
cAMP Test

Verbindung	% relative Stärke
GLP-1(7-37)OH	100,0 ± 18
Arg^{26}-GLP-1(7-37)OH	140,8 ± 28,7
N-Imidazopropionyl-GLP-1(8-37)OH	21,9 ± 7,8
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	89,0 ± 12,6
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(8-37)OH	8,8 ± 1,4[a]
GLP-1(7-36)NH_2	88,4 ± 29,4
N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	24,2 ± 9,8
N-Imidazoacetyl-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	95,0 ± 14,3
α,α-Imidazoacetyl-GLP-1(8-37)OH	108,2 ± 22,4

[a]Acylierte Verbindungen ergeben im allgemeinen artifiziell geringe Werte aufgrund der unspezifischen Bindung.

Beispiel 8

In vitro Test bei Hunden

a) Hyperglykämische Arretierungsstudien

[0088] Die Experimente werden bei erwachsenen (1–2 Jahre alten) männlichen und weiblichen Beagles getestet, die 8–15 kg wiegen und über Nacht gefastet haben und bei Bewusstsein sind. Zumindest 10 Tage vor der Studie werden die Tiere mit Isofluran betäubt und es wird ein Schnitt in die linke oder rechte Inguinalregion gemacht. Es werden silastische Katheter in die Arteria femoralis und in die proximale kaudale Vena femoralis eingebracht und mit einem 4-0 Faden befestigt. Die freien Enden der Katheter werden subkutan (s. c.) mittels eines Trokars auf den Rücken geführt. Die Katheter werden dann mit einer Glycerin/Heparin-Lösung (3 : 1, V/V, Heparinendkonzentration von 250 KIU/ml) gefüllt und die freien Enden werden verknotet und in eine subkutane Tasche gegeben, um das vollständige Verschließen der Haut zu erlauben. Keflex® wird sowohl präoperativ (20 mg/kg, i. v. und 20 mg/kg intramuskulär (i. m.)) als auch postoperativ (250 mg p. o. einmal am Tag für sieben Tage) verabreicht, um Infektionen zu vermeiden. Torbugesic (1,5 mg/kg i. m.) wird postoperativ verabreicht, um die Schmerzen zu kontrollieren.

[0089] Es wird Blut direkt vor dem Untersuchungstag entnommen, um die Gesundheit des Tieres zu bestimmen. Es werden nur Tiere mit Hämatokriten über 38% und Leukozytenzahlen unter 16 000 pro mm^3 verwendet.

[0090] Am Nachmittag vor dem Experiment werden die freien Enden der Katheter aus der subkutanen Tasche durch einen kleinen Schnitt freigelegt, der unter einer lokalen Betäubung (2% Lidocain) ausgeführt wird und der Hund wird mit einer Leinensystemjacke und einer Halsbandausstattung versehen.

[0091] Am Morgen des Experiments wird der Inhalt der Katheter abgesaugt, die Katheter werden mit Kochsalzlösung gespült und es werden Verlängerungsleitungen (geschützt durch ein Edelstahlband) an den Katheter angebracht. An den Morgenden der i. v. Injektionsexperimente wird ein über die Nadel Teflonkatheter perkutan in die Vena cephalica zur Vorbereitung der Verabreichung eines intravenösen (i. v.) Bolus der Testsubstanz perkutan eingeführt. Der Hund wird in einem metabolischen Käfig gegeben und die Katheterverlängerungsleitung und die Leinen werden an ein Schwenksystem angebracht, um es dem Hund zu ermöglichen, sich frei im Käfig zu bewegen. Zu dieser Zeit (–60 Minuten) wird eine exogene Glucoseinfusion (50% G/V in Wasser) über den venösen Dauerkatheter begonnen. Die Glucose wird auf eine stufenweise absteigende Art über die ersten 6 Minuten der Studie infundiert, um die Plasmaglucosekonzentration schnell auf 150 mg/dl anzuheben. Die Plasmaglucosekonzentrationen werden alle 2,5 bis 7,5 Minuten während der Studie bestimmt und die Glucoseinfusionsrate wird entsprechend angepasst, um die Plasmaglucosekonzentration auf 150 mg/dl zu halten.

[0092] 60 Minuten nach dem Start der Glucoseinfusion (Zeitpunkt 0) wird die Testsubstanz entweder intravenös (1,0, 2,9, 5,0 oder 10,0 µg/kg, Dosis gelöst in 2 ml Kochsalzlösung, worin 0,3% Hundealbumin G/V enthalten sind) über den vorher eingebrachten Teflonkatheter oder subkutan (10 µg/kg, 150 µM in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung) im dorsalen Bereich des Halses verabreicht.

[0093] Es werden arterielle Blutproben (3,5 ml) nach –30, –15, 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 Minuten während der i. v. Studien und nach –30, –15, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 Minuten während der s. c. Studien entnommen. Die Proben werden in Vakuumblutsammelröhrchen gesammelt, die Dinatrium-EDTA enthalten und sofort auf Eis gestellt. Um eine proteolytische Spaltung von GLP-1(7-37) in den Plasmaproben zu verhindern, werden 1,5 ml des EDTA enthaltenden Bluts in ein Polypropylenröhrchen überführt, das 40 µl Aprotinin (10 000 KIU/ml) enthält und gut gemischt. Die Proben werden zentrifugiert und das entstehende Plasma wird in Polypropylenteströhrchen überführt und für die Dauer der Studie auf Eis gelagert.

[0094] Nach dem Abschluss des Experiments werden die Tiere betäubt (Isofluran), die Katheter werden mit frischer Kochsalzlösung gespült und mit einem Gemisch aus Glycerin/Heparin gefüllt, wobei die freien Enden der Katheters verknotet und subkutan plaziert werden, wie dies vorher beschrieben wurde und das Antibiotikum wird verabreicht (300 mg Keflex, i. m.).

[0095] Die Plasmaglucosekonzentrationen werden am Tag der Studie mittels eines Glucoseoxidaseverfahrens in einem Beckman Glucoseanalysegerät bestimmt. Die Proben für andere Tests werden bei –70°C bis zur Analyse gelagert. Die Insulinkonzentrationen werden mittels eines im Handel erhältlichen Radioimmuntestkits

mit Schweineinsulin als Standard bestimmt. Die GLP-1(7-37) Spiegel werden mittels eines Immuntests mit 2 Antikörpern bestimmt.

[0096] Die Veränderung beim Insulin wird als Unterschied der Insulinkonzentration zum Zeitpunkt t und der über die Zeit gemittelten Insulinkonzentration vor der Injektion der Testsubstanz (Basislinie) berechnet. Die Fläche unter der Insulinveränderungskurve wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Veränderung der Glucoseinfusionsrate wird als Unterschied der Glucoseinfusionsrate während dem Zeitintervall x und der mittleren Glucoseinfusionsrate während der 30 Minuten vor der Injektion der Testsubstanz (Basislinie) berechnet. Die Fläche unter der Glucoseinfusionsratenveränderungskurve wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Werte werden als Mittel ± der Standardabweichung vom Mittel (SEM) aufgeführt.

b) Euglykämische Arretierungsstudien

[0097] Die euglykämischen Arretierungsstudien werden auf eine Weise ausgeführt, die zu den hyperglykämischen s. c. Studien identisch ist, mit der Ausnahme, dass die Plasmaglucosekonzentration bei oder nahe der normalen Basalspiegel während der Studie gehalten wird. Um dies zu erreichen werden die Plasmaglucosekonzentrationen alle 2,5 bis 5 Minuten nach der Injektion der Testsubstanz bestimmt. Wenn die Plasmaglucosekonzentration um mehr als 5 mg/dl gegenüber den Vorbehandlungswerten abnimmt, wird eine exogene Glucoseinfusion (wässrige Lösung mit 50% Glucose, G/V) über den venösen Dauerkatheter gestartet, um die Plasmaglucosekonzentration nahe der Basislinie zu halten. Da die venöse Linie und deren Verlängerung mit heparinisierter Kochsalzlösung und nicht mit Glucose gefüllt sind, gibt es eine signifikante Verzögerungsperiode zwischen der Zeit, zu der die Infusion gestartet wird und der Zeit, zu der die Glucose tatsächlich in den Hund gelangt. Aus diesem Grund fallen die Glucosekonzentrationen für eine kurze Zeit nach der Arzneimittelbehandlung unter die Grundlinie. Um eine genauere Abschätzung der Menge an Glucose zu erhalten, die tatsächlich in die Hunde infundiert wird, nimmt man eine Abschätzung des Totvolumens vor (930 µl) und die Glucoseinfusionsraten werden dementsprechend angepasst.

[0098] Die Veränderung im Insulin wird als Unterschied zwischen der Insulinkonzentration zum Zeitpunkt t und der über der Zeit gemittelten Insulinkonzentration vor der Injektion der Testsubstanz (Basislinie) berechnet. Die Fläche unter der Insulinveränderungskurve wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Werte sind als Mittel ± Standardabweichung des Mittels (SEM) aufgeführt.

c) Orale Glucosetoleranztests

[0099] Es werden orale Glucosetoleranztests in einer Gruppe aus vier männlichen und weiblichen Beagles ausgeführt, die 12–14 kg wiegen und über Nacht gefastet haben. Die Vorbereitung der Tiere ist identisch zu der oben beschriebenen. Nach der Plazierung im metabolischen Käfig können die Tiere 20 Minuten ausruhen, bevor mit dem Experiment begonnen wird. Am Ende dieser Akklimatisierungsperiode wird eine Nullprobe gezogen, ein 76,2 cm (30 Inch) langer 24 Fr. Gummischlauch wird durch den Ösophagus in den Magen des Tieres geschoben, ein Glucosebolus (1,5 g/kg, 50% Glucose G/V in Wasser) wird gefolgt von einem 20 ml Bolus destilliertem Wasser über den Schlauch in den Magen eingebracht und es wird die Uhr gestartet. Zwei Minuten später wird ein subkutaner Bolus der Testsubstanz (3 nmol/kg oder etwa 10 µg/kg, 150 µM in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung) in den dorsalen Bereich des Halses injiziert.

[0100] Zusätzlich zur Nullprobe werden arterielle Blutproben (3,5 ml) 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210, 225 und 240 Minuten nach der Verabreichung der Glucose entnommen. Die Proben werden in Vakuumblutsammelröhrchen gesammelt, die Dinatrium-EDTA enthalten, und wie oben beschrieben bearbeitet.

[0101] Nach dem Abschluss des Experiments wird das Tier betäubt (Isofluran), die Katheter werden mit frischer Kochsalzlösung gespült und mit einem Gemisch aus Glycerin/Heparin gefüllt, wobei die freien Enden der Katheters verknotet und subkutan plaziert werden, wie dies vorher beschrieben wurde und das Antibiotikum wird verabreicht (300 mg Keflex®, i. m.).

[0102] Jeder der vier Hunde wird unter drei getrennten Bedingungen untersucht: Eine mit einer subkutanen Verabreichung von Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, eine mit GLP-1(7-37)OH und eine mit N-Imidazopropionyl-(Arg26(N^{ε}-octanoyl(lysyl34)))GLP-1(8-37))OH. Die Experimente in Tieren, die erneut getestet werden, werden mindestens 1 Woche später ausgeführt. Am Tag vor dem Ende aller Experimente werden die Leukozytenzahl und der Hämatokrit bestimmt.

[0103] Die Insulinfläche unter der Kurve über der Grundlinie (Insulinwert zum Zeitpunkt 0) wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Glucosefläche unter der Kurve über der Grundlinie (Glucosewert zum Zeitpunkt 0) wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Werte werden als Mittel ± Standardabweichung vom Mittel (SEM) angegeben.

Tabelle 2
Hyperglykämischer (150 mg/dl) Arretierungstest i. v. beim Hund

Verbindung	Dosis (µg/kg)	n	Dauer des Insulineffekts (min)[a]	Maximale Insulinveränderung (ng/ml)[b]	Insulinveränderung AUC (ng/ml x min, 0-60 Minuten)[c]	GIR Veränderung AUC (mg/kg, 0-60 min)[d]
Träger	0	7	nicht aktiv	0,8 ± 0,2	7 ± 14	238 ± 46
GLP-1(7-36)NH_2	1,0	7	2,5	3,4 ± 0,6	32 ± 8	414 ± 73
N-Imidazopropionyl-GLP-1(8-37)OH	1,0	3	7,5	3,1 ± 0,8	52 ± 18	399 ± 63
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	1,0	3	12,5	2,6 ± 0,6	38 ± 16	419 ± 122
Lys^{34}-N^{ε}-Octanoyl-GLP-1(7-37)OH	1,0	3	15	3,8 ± 1,0	50 ± 2	463 ± 12
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	1,0	4	42,5	2,3 ± 0,8	90 ± 40	350 ± 93
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	5,0	3	72,5	3,8 ± 0,2	132 ± 7	568 ± 126
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-decanoyl-GLP-1-(8-37)OH	5,0	2	nicht aktiv	0,9 ± 0,9	14 ± 10	236 ± 58

[a]Dauer des Insulineffekts: Die Zeit, während der die mittlere Insulinveränderung konsistent ≥ 0,5 ng/ml beträgt.
[b]Maximale Insulinveränderung: Maximale Insulinzunahme gegenüber der Grundlinie während der Testperiode von 120 Minuten.
[c]Insulinveränderung AUC: Fläche unter der Insulinveränderungskurve stellt den gesamten insulinotropen Effekt des Peptids dar.
[d]GIR Veränderung AUC: Fläche unter der Kurve der Glucoseinfusionsratenänderung, stellt den gesamten metabolischen Effekt des Peptids dar.

Tabelle 3
Hyperglykämischer (150 mg/dl) Arretierungstest s. c. beim Hund

Verbindung	Dosis (µg/kg)	n	Dauer des Insulineffekts (min)[a]	Maximale Insulinveränderung (ng/ml)[b]	Insulinveränderung AUC (ng/ml x min, 0-120 Minuten)[c]	GIR Veränderung AUC (mg/kg, 0-120 min)[d]
Träger	0	5	nicht aktiv	0,4 ± 0,2	11 ± 20	528 ± 224
GLP-1(7-36)NH_2	10	5	27	1,6 ± 0,8	64 ± 33	696 ± 145
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	10	4	42	3,6 ± 1,0	97 ± 39	811 ± 216
Lys^{34}-N^{ε}-Octanoyl-GLP-1-(7-37)OH	10	5	nicht aktiv	0,6 ± 0,3	29 ± 8	532 ± 112
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(8-37)OH	10	4	nicht aktiv	0,6 ± 0,4	11 ± 26	659 ± 182
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	10	5	> 90	2,0 ± 0,4	113 ± 24	926 ± 268

[a]Dauer des Insulineffekts: Die Zeit, während der die mittlere Insulinveränderung konsistent > 0,5 ng/ml beträgt.
[b]Maximale Insulinveränderung: Maximale Insulinzunahme gegenüber der Grundlinie während der Testperiode von 120 Minuten.
[c]Insulinveränderung AUC: Fläche unter der Insulinveränderungskurve stellt den gesamten insulinotropen Effekt des Peptids dar.
[d]GIR Veränderung AUC: Fläche unter der Kurve der Glucoseinfusionsratenänderung, stellt den gesamten metabolischen Effekt des Peptids dar.

Beispiel 9

In vivo Test bei Ratten

a) Glucosetoleranztests

[0104] Die Experimente werden in bewussten, männlichen Sprague Dawley (Charles River) oder Zucker Diabetic Fatty (Genetic Moels, Inc.) Ratten ausgeführt, die etwa 250 g (Sprague Dawley Ratten) oder 300 g (Zucker Diabetic Fatty Ratten) wiegen und über Nacht gefastet haben. 4 bis 5 Tage vor der Studie werden die Ratten mit Isofluran betäubt und es wird ein Polyethylenkatheter (PE50) in die rechte Jugularvene eingeführt. Der Katheter wird mit einer Wundklammer gesichert ist mit Kochsalzlösung gefüllt, worin Heparin (2% Natriumheparin) enthalten ist und mit einem kleinen Edelstahlstopfen verschlossen.

[0105] Nach 16 stündigem Fasten werden 12 dauerhaft kanülierte Ratten in vier Gruppen mit je drei Ratten pro Gruppe aufgeteilt. Es werden 0,4 ml Blut aus der Schwanzvene entnommen, in einem Mikrobehälterröhrchen gesammelt, das Lithiumheparin enthält, und unmittelbar auf Eis gestellt (Probe zum Zeitpunkt 0). Es wird ein Glucosebolus (1,0 g/kg, 50% Glucose (G/V) in Wasser) über die Jugulardauerkanüle verabreicht und die Kanüle wird mit 200 µl Kochsalzlösung gespült. 20 Sekunden später wird ein Bolus der Testsubstanz [100 µl/100 g Körpergewicht an entweder Träger (Kochsalzlösung, die 0,3% (G/V) Rinderserumalbumin enthält) oder Träger, der das Analogon enthält] über die Jugularkanüle verabreicht und die Kanüle wird wie vorher gewaschen. Die Ratten lässt man aus der Schwanzvene erneut 2, 5,10, 20 und 30 Minuten nach der Verabreichung des Glucosebolus bluten und die Proben werden wie oben beschrieben behandelt. Am Ende des Experiments werden die Blutproben zentrifugiert und das Plasma wird gewonnen.

[0106] Die Plasmaglucosekonzentrationen werden am Tag des Experiments mittels eines gekuppelten Hexokinaseverfahrens in einem klinischen Analysegerät bestimmt. Das Plasma für die Insulinbestimmungen wird mit Nullkalibrator verdünnt und bei –20°C bis zum Analysezeitpunkt eingefroren. Die Insulinkonzentrationen

werden mittels eines kommerziellen Radioimmuntestkits mit Ratteninsulin als Standard bestimmt.

[0107] Die Insulinveränderung (die Veränderung im Insulin gegenüber dem Grundlinienwert) wird als Unterschied zwischen der Insulinkonzentration zum Zeitpunkt t und der Insulinkonzentration zum Zeitpunkt 0 berechnet. Die Fläche unter der Insulinveränderungskurve wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Plasmaglucoseveränderung (die Erhöhung der Plasmaglucose über dem Grundlinienwert) wird als Unterschied zwischen der Plasmaglucosekonzentration zum Zeitpunkt t und der Plasmaglucosekonzentration zum Zeitpunkt 0 berechnet. Die Fläche unter der Plasmaglucoseveränderungskurve wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Werte sind als Mittel ± Standardabweichung des Mittels (SEM) angegeben.

b) Hyperglykämische Arretierungsstudien

[0108] Die Experimente werden in dauerhaft mit Kathetern versehenen normalen, männlichen Ratten ausgeführt, die etwa 350 g wiegen. Mindestens eine Woche vor den Untersuchungen wird an den Ratten eine Operation unter Isofluranbetäubung ausgeführt. Es werden zwei Katheter in die Jugularvene für Infusionen von Glucose und Peptid und ein Katheter in die Ateria carotis zur Blutentnahme implantiert. Die Katheter werden durch die Haut am Vertex des Kopfes nach außen geführt, mit Glycerin/Heparinlösung (3 : 1, V/V) gefüllt und mit einem 1 cm langen Edelstahlstopfen verschlossen. Die Tiere werden einzeln in Maschendrahtkäfigen gehalten und haben freien Zugang zu einer Standardrattennahrung und Wasser.

[0109] Die mit Kathetern versehenen Ratten lässt man über Nacht vor den Studien fasten. Am Morgen des Experiments werden die Ratten gewogen und Probenahmeschläuche an die Dauerkatheter angeschlossen. Die Schläuche werden in eine Leichtgewichtsedelstahlfeder als Schutz eingeschlossen. Während der Studie werden die Ratten frei in einer Plastikschuhkartonschachtel mit 30,48 × 25,4, × 30,48 cm (12" × 10" × 12") mit einer Polsterung von 2,54 cm (einem Inch) gehalten. Nach 15 Minuten Akklimatisierung wird eine grundlegende Probe zur Messung von Insulin- und Glucosespiegeln entnommen. Zum Zeitpunkt –60 Minuten wird den Ratten ein Bolus mit 20% Glucose verabreicht, um die Plasmaglucose auf 150 mg/dl anzuheben. Die Plasmglucosekonzentration wird auf diesem Wert für die Dauer der Studie durch Messen der Plasmaglucosekonzentration alle 5 Minuten und einer dementsprechenden Einstellung der kalibrierten, variablen Infusionspumpe aufrechterhalten. Es werden Blutproben bei –15 und 0 Minuten für Basislinienmessungen gewonnen. Unmittelbar nach der Entnahme der Probe bei Null Minuten wird das Peptid (130–155 μM Stammlösung, verdünnt in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung) in den Jugularvenenkatheter injiziert und mit Kochsalzlösung nachgespült. Es werden Blutproben für Glucose- und Insulinbestimmungen bei 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 90 Minuten entnommen. Es werden alle Blutproben in Spritzen gesammelt, die mit Natriumheparin beschichtet sind, in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die Blutproben werden dann in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die Plasmakomponente abzutrennen.

[0110] Die Plasmaglucosespiegel werden am Tag der Studie durch das Glucoseoxidaseverfahren mittels eines Beckman Glucose Analyser 2 bestimmt, während die Insulinkonzentrationen mit einem im Handel erhältlichen Kit (Diagnostic Products Corporation) mit Ratteninsulin als Standard gemessen werden.

[0111] Die Insulinveränderung (die Veränderung des Insulins gegenüber dem Basiswert) wird als Differenz zwischen der Insulinkonzentration zum Zeitpunkt t und der mittleren Insulinkonzentration vor der Injektion der Testsubstanz berechnet. Die Fläche unter der Insulinveränderungskurve wird mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Veränderung der Glucoseinfusionsrate (die prozentuale Veränderung der Glucoseinfusionsrate gegenüber dem Basiswert) wird als Unterschied zwischen dem Glucoseinfusionsratenwert zum Zeitpunkt t und der mittleren Glucoseinfusionsrate vor der Injektion der Testsubstanz dividiert durch die mittlere Glucoseinfusionsrate vor der Injektion der Testsubstanz mal 100 berechnet. Die Fläche unter der Glucoseinfusionsratenveränderungskurve wird anhand der absoluten Glucoseinfusionsratenveränderungswerte (berechnet als Differenz zwischen dem Glucoseinfusionsratenwert zum Zeitpunkt t und der Glucoseinfusionsrate vor der Injektion der Testsubstanz) mittels der Trapezoidregel berechnet. Die Werte sind als Mittel ± Standardabweichung vom Mittel (SEM) aufgeführt.

Tabelle 4
Glucosetoleranztest (1 g/kg) i. v. in der Ratte

Verbindung	Dosis mg/kg	n	Insulinveränderung AUC ng/ml x min 0-15 min[a]	Max. Insulinveränderung (ng/ml)[b]	Insulinveränderung nach 10 min (ng/ml)[c]
Träger	0	196	33 ± 1	2,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1
GLP-1(7-36)NH_2	0,2	5	34 ± 4	4,0 ± 0,8	1,8 ± 0,5
GLP-1(7-36)NH_2	0,3	4	50 ± 13	6,1 ± 0,7	2,2 ± 1,2
GLP-1(7-36)NH_2	0,4	5	73 ± 14	7,7 ± 1,0	3,8 ± 1,0
GLP-1(7-36)NH_2	0,6	6	67 ± 11	7,7 ± 1,2	3,4 ± 0,9
GLP-1(7-36)NH_2	0,8	3	97 ± 25	11,3 ±2,8	4,1 ± 1,8
GLP-1(7-36)NH_2	1,0	8	89 ± 16	11,4 ± 2,3	3,9 ± 0,7
GLP-1(7-36)NH_2	2,0	5	106 ± 11	11,7 ± 1,3	4,9 ± 0,7
GLP-1(7-36)OH	0,6	3	79 ± 8	7,8 ± 1,1	5,4 ± 1,2
GLP-1(7-36)OH	0,92	2	75 ± 12	8,4 ± 0,2	3,5 ± 1,2
GLP-1(7-36)OH	1,2	3	77 ± 17	8,4 ± 1,6	4,2 ± 1,3
N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	0,05	3	49 ± 6	4,9 ± 0,9	2,5 ± 0,2

N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	0,15	3	55 ± 8	5,9 ± 1,4	2,8 ± 0,1
N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	0,3	3	98 ± 29	10,5 ± 2,3	5,5 ± 1,4
N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	0,6	3	105 ± 4	13,0 ± 0,4	4,8 ± 0,1
N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	0,92	3	95 ± 11	12,0 ± 1,2	4,0 ± 0,5
N-Imidazoacetyl-GLP-1(8-36)NH_2	1,2	2	117 ± 6	13,7 ± 0,5	6,0 ± 0,4
N-Imidazoacetyl-Arg^{26}- GLP-1-(8-37)OH	1,2	2	85 ± 13	9,8 ± 2,5	3,6 ± 0,5
N-Imidazoacetyl-Arg^{26}- GLP-1-(8-37)OH	2,4	3	170 ± 16	16,5 ± 3,9	9,8 ± 2,5
N-Imidazopropionyl-GLP-1-(8-37)OH	0,1	3	70 ± 4	7,8 ± 0,3	3,2 ± 0,5
N-Imidazopropionyl-GLP-1-(8-37)OH	0,2	9	92 ± 6	10,2 ± 0,6	5,0 ± 0,6
N-Imidazopropionyl-GLP-1-(8-37)OH	0,4	6	74 ± 12	7,7 ± 1,6	4,8 ± 0,7
N-Imidazopropionyl-GLP-1-(8-37)OH	0,8	6	121 ± 16	13,3 ± 1,8	7,5 ± 1,1
N-Imidazopropionyl-GLP-1-(8-37)OH	1,0	4	98 ± 11	12,4 ± 1,6	5,4 ± 0,4
N-Imidazopropionyl-GLP-1-(8-37)OH	2,0	4	127 ± 24	16,1 ± 3,0	5,9 ± 1,1
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1-(8-37)OH	0,6	2	114 ± 13	11,8 ± 2,1	7,7 ± 0,8
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1-(8-37)OH	0,92	3	85 ± 7	9,2 ± 1,8	5,5 ± 0,9
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1-(8-37)OH	1,2	6	127 ± 13	12,9 ± 1,8	8,2 ± 1,1
Lys^{34}-N^{ε}-Octanoyl-GLP-1(7-37)OH	0,6	3	33 ± 8	5,0 ± 2,3	1,3 ± 0,2
Lys^{34}-N^{ε}-Octanoyl-GLP-1(7-37)OH	1,2	3	136 ± 30	13,1 ± 2,0	10,0 ± 2,8
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(8-37)OH	1,2	6	100 ± 18	8,5 ± 1,7	8,3 ± 1,5
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(8-37)OH	1,6	3	60 ± 11	5,9 ± 1,6	4,3 ± 0,7
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(8-37)OH	2,4	3	128 ± 22	12,9 ± 2,5	10,1 ± 1,6

[a]Insulinveränderung AUC: Die Fläche unter der Insulinveränderungskurve stellt die gesamte insulinotrope Aktivität des Peptids dar.

[b]Maximale Insulinveränderung: Die maximale Zunahme beim Insulin gegenüber der Basislinie (gewöhnlich fünf Minuten nach der Injektion)

[c]Insulinveränderung nach 10 Minuten: Die Veränderung beim Insulin gegenüber der Basislinie 10 Minuten nach der Injektion gemessen. Bei wirksamen Analoga gilt, je näher der Wert bei der maximalen Insulinveränderung liegt (prozentual), desto länger ist die Wirkdauer des Analogons.

Tabelle 5
Hyperglykämischer (150 mg/dl) Arretierungstest i. v. bei der Ratte

Verbindung	Dosis (µg/kg)	n	Dauer des Insulin-effekts (min)[a]	Maximale Insulinver-änderung (ng/ml)[b]	Insulinverände-rung AUC[c] (ng/ml x min, 0-15 Minuten)[c]	GIR Verän-derung AUC (mg/kg, 0-30 min)[d]
Träger	0	4	nicht aktiv	0,1 ± 0,1	0,5 ± 1,7	39 ± 10
GLP-1(7-37)OH	0,05	4	6	1,6 ± 0,3	3,0 ± 1,6	48 ± 22
GLP-1(7-37)OH	0,1	4	6	3,6 ± 1,2	7,3 ± 2,8	150 ± 25
GLP-1(7-37)OH	0,2	3	6	2,8 ± 0,1	5,8 ± 0,9	154 ± 10
GLP-1(7-37)OH	0,6	4	6	4,9 ± 1,3	14,9 ± 2,9	151 ± 46
GLP-1(7-37)OH	1,0	5	6	7,7 ± 0,8	16,7 ± 4,0	131 ± 29
GLP-1(7-37)OH	2,0	4	6	3,6 ± 0,9	11,5 ± 1,0	152 ± 36
GLP-1(7-37)OH	4,0	4	40	2,0 ± 0,4	10,4 ± 5,0	139 ± 27
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-GLP-1(8-37)OH	1,0	5	15	6,6 ± 2,2	25,6 ± 3,6	324 ± 45
Lys^{34}-N^{ε}-Octanoyl-GLP-1-(7-37)OH	1,0	4	4	2,4 ± 0,8	13,2 ± 2,5	132 ± 38
N-Imidazopropionyl-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(8-37)OH	1,0	5	5	1,0 ± 0,2	7,6 ± 2,5	183 ± 38
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(7-37)OH	0,05	4	30	0,7 ± 0,2	6,3 ± 1,4	75 ± 32
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(7-37)OH	1,0	4	20	5,2 ± 1,8	35,5 ± 10,9	294 ± 25
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(7-37)OH	2,0	5	10	3,8 ± 0,9	32,5 ± 10,4	245 ± 58
Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1(7-37)OH	4,0	5	20	4,7 ± 0,8	35,7 ± 4,8	274 ± 71
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	0,05	4	8	0,5 ± 0,2	3,3 ± 1,4	124 ± 34
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N^{ε}-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	1,0	5	30	4,2 ± 1,3	26,5 ± 7,8	218 ± 41

N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N$^{\varepsilon}$-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	2,0	4	60	5,2 ± 2,1	45,4 ± 15,5	351 ± 66
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N$^{\varepsilon}$-octanoyl-GLP-1-(8-37)OH	4,0	4	40	6,0 ± 3,0	45,5 ± 13,8	380 ± 40
N-Imidazopropionyl-Arg^{26}-Lys^{34}-N$^{\varepsilon}$-decanoyl-GLP-1-(8-37)OH	1,0	4	15	0,8 ± 0,1	4,5 ± 2,0	83 ± 17

[a]Dauer des Insulineffekts: Die Zeit, während der die mittlere Insulinveränderung ≥ 0 ng/ml beträgt.
[b]Maximale Insulinveränderung: Maximale Insulinzunahme gegenüber der Grundlinie während der Testperiode von 90 Minuten.
[c]Insulinveränderung AUC: Fläche unter der Insulinveränderungskurve stellt den gesamten insulinotropen Effekt des Peptids dar.
[d]GIR Veränderung AUC: Fläche unter der Kurve der Glucoseinfusionsratenänderung (in mg/kg/min), stellt den gesamten metabolischen Effekt des Peptids dar.

Sequenzliste

(1) Allgemeine Information:

(i) Anmelder: Eli Lilly and Company

(B) Straße: Lilly Corporate Center

(C) Stadt: Indianapolis

(D) Staat: Indiana

(E) Land: Vereinigte Staaten von Amerika

(F) Postleitzahl: 46285

(ii) Titel der Erfindung: Glucagon-ähnliche insulinotrope Peptidanaloga, Zusammensetzungen und Verwendungsverfahren

(iii) Anzahl an Sequenzen: 1

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: K.G. Tapping

(B) Straße: Erl Wood Manor

(C) Stadt: Windlesham

(D) Staat: Surrey

(E) Land: Vereinigtes Königreich

(F) Postleitzahl: GU20 6PH

(v) Computerlesbare Form:

(A) Mediumtyp: Diskette

(B) Computer: Macintosh

(C) Betriebssystem: Macintosh 7.0

(D) Software: Microsoft Word 5.1

(2) Information für SEQ ID Nr.1

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 29 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(iii) Hypothetisch: Nein

(iv) Antisense: Nein

(ix) Merkmal:

(A) Name / Schlüssel: Protein

(B) Ort: < 1

(D) Andere Information: Markierung = Veränderter Rest

Anmerkung = "Desaminohistidin"

(ix) Merkmal:

(A) Name / Schlüssel: Protein

(B) Ort: 19

(D) Andere Information: Markierung = Alternative

Anmerkung = "Xaa = Lysin oder Arginin"

(ix) Merkmal:

(A) Name / Schlüssel: Protein

(B) Ort: 27

(D) Andere Information: Markierung = Acylierung

Anmerkung = "Epsilonaminogruppe ist mit einer geradkettigen C_6-C_{10} Fettsäure acyliert"

(ix) Merkmal:

(A) Name / Schlüssel: Protein

(B) Ort: 29

(D) Andere Information: Markierung = N-Terminus

Anmerkung = "N-Terminus ist NH_2 oder Glycin-OH"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.1

Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Ala

1 5 10 15 20

Trp Leu Val Lys Gly Arg

25

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel

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

(Formel I)

oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon, worin R^1 ausgewählt ist aus 4-Imidazopropionyl, 4-Imidazoacetyl oder 4-Imidazo-α,α-dimethylacetyl,
R^2 ausgewählt ist aus unverzweigtem C_6-C_{10}Acyl oder fehlt,
R^3 ausgewählt ist aus Gly-OH oder NH_2, und
Xaa für Lys oder Arg steht, mit der Maßgabe, dass wenn R^1 für 4-Imidazopropionyl steht und Xaa für Lys steht, R^2 dann aus unverzweigtem C_6-C_{10} Acyl ausgewählt ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, worin R^1 für 4-Imidazoacetyl steht und R^2 für unverzweigtes C_8 Acyl steht.

3. Verbindung nach Anspruch 1, worin R^1 für 4-Imidazoacetyl steht und R^2 fehlt.

4. Verbindung nach Anspruch 1, worin R^1 für 4-Imidazopropionyl steht, R^2 für unverzweigtes C_8 Acyl steht, R^3 für Gly-OH steht und Xaa für Arg steht.

5. Verbindung nach Anspruch 1, worin R^1 für 4-Imidazo-α,α-dimethylacetyl steht und R^2 für unverzweigtes C_8 Acyl steht.

6. Verbindung nach Anspruch 1, worin R^1 für 4-Imidazo-α,α-dimethylacetyl steht und R^2 fehlt.

7. Pharmazeutische Formulierung, die als Wirkstoff eine Verbindung nach den Ansprüchen 1 bis 6 oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz hiervon zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägern hierfür enthält.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung bei der Behandlung von Diabetes.

9. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, das umfasst
Herstellung eines geeigneten Proteinrückgrads der Formel I entweder durch synthetische oder rekombinante Mittel,
Kupplung dieses Proteinrückgrads an ein Carbonsäurederivat einer R^1 Verbindung und wahlweise Acylierung der ε-Aminogruppe von Lys(27).

Es folgt kein Blatt Zeichnungen