

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.06.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.06.2000 13.10.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/212171 2000/240349**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.05.2003**
(Věstník č. 5/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/16474**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/098331**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 4088

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/605

A 61 K 38/26

A 61 P 5/50

A 61 P 9/10

A 61 P 3/04

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Glaesner Wolfgang, Indianapolis, IN, US;

Millican Rohn Lee, Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Analogy peptidu-1 podobného glukagonu

(57) Anotace:

Peptidy podobné glukagonu typu GLP-1, které mají alespoň jednu modifikaci na následujících pozicích: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36 nebo 37. Jsou také popsány způsoby zpracování těchto GLP-1 sloučenin a jejich využití při přípravě farmaceutických prostředků pro léčení inzulinově nezávislého diabetu, obezity, infarktu myokardu a dalších nemocí.

10.02.03

PV 2002-4088

Analogy peptidu-1 podobného glukagonu

Oblast techniky

Vynález se týká peptidů, podobných glukagonu. Tento dokument chrání účinky U.S. předběžných patentových přihlášek č. 60/212 171 (podáno 16.června 2000) a 60/240 349 (13 října 2000).

Dosavadní stav techniky

Peptid 1 podobný glukagonu (dále GLP podle anglického názvu "Glucagon-Like Peptide") (GLP-1) obsahuje 37 aminokyselin, a je vylučován L-buňkami střeva podle množství přijímané potravy. Bylo zjištěno, že stimuluje vylučování inzulinu (inzulinotropní účinky), čímž způsobuje spotřebovávání glukózy buňkami a snižuje koncentraci glukózy v krevním séru (viz, např., Mojsov, S. ,Int. J. Peptide Protein Research, 40:333-343 (1992)). Nicméně, GLP-1(1-37) je málo aktivní a proto byla zaměřena pozornost na vzdálenější analogy, označované jako "GLP", což jsou sloučeniny, které mají vyšší biologický účinek podobný GLP-1. Příklady jsou GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH a -Ser-34-GLP-1(7-37)OH. Vzhledem k dobré schopnosti těchto sloučenin stimulovat vylučování inzulinu, jsou sloučeniny GLP slibné jako účinné látky pro léčení diabetu, obezity a příbuzných potíží.

Sloučeniny GLP-1 mohou existovat nejméně ve dvou různých formách. První forma je fyziologicky aktivní a snadno se rozpouští ve vodných roztocích při fyziologickém pH (7,4). V kontrastu s tím má druhá forma

slabý nebo žádný inzulinotropní účinek a v podstatě nerozpustná ve vodě při $\text{pH} = 7,4$. Bohužel, inaktivní forma se dá snadno vyrobit když se vodné roztoky GLP-1 míchají a vystaví se působení hydrofobních povrchů nebo mají velký povrch rozhraní vzduch/voda. Výrobu komerčních množství účinné GLP-1 sloučeniny silně komplikuje sklon k přeměně na nerozpustnou formu. Při výrobě větších množství se používá míchacích operací nebo kontinuálního čerpání čerpadlem. Tyto operace způsobují promísení na rozhraní vzduch/voda a/nebo kontakt s hydrofobními povrchy, což má za následek nerozpustnou formu. K přeměně na inaktivní formu může také dojít při skladování nebo po podání pacientovi, což jsou další komplikace použití těchto sloučenin jako účinných látek farmaceutických prostředků. Proto je potřeba nových biologicky aktivních analogů GLP-1, které se méně snadno mění na nerozpustnou formu, než dosud dostupné GLP-1 sloučeniny.

Nyní bylo zjištěno, že řada analogů GLP-1 s modifikacemi na jednom nebo více následujících pozicích: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 nebo 37, vykazuje ve srovnání s GLP-1(7-37)OH výrazně snížený sklon ke shlukování.

Mnoho z těchto analogů si udržuje aktivaci GLP-1 receptoru, která je srovnatelná a v některých případech i větší, než je aktivace GLP-1 sloučenin jako GLP-1(7-37)OH a Val⁸-GLP-1(7-37)OH. Například agregační doba Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH je více než dvacetkrát větší a působí aktivaci GLP-1 receptoru asi o 25% větší, než GLP-1(7-37)OH. Na základě těchto objevů byly nalezeny nové GLP-1 sloučeniny a způsoby léčení s jejich pomocí, které jsou zde uvedeny.

Podstata vynálezu

V jednom z možných provedení spočívá vynález v polypeptidu, který má sekvenci aminokyselin vzorce I (SEQ ID NO: 1)

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

Vzorec 1 (SEQ ID NO: 1)

ve kterém:

Xaa8 je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa11 je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys nebo His;

Xaa12 je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

Xaa16 je : Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,
Tyr, Glu nebo Ala;

Xaa22 je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys nebo
Cysteová Kyselina;

Xaa23 je: His, Asp, Lys, Glu, Gln nebo Arg; Xaa24 je:
Glu, Arg, Ala nebo Lys;

Xaa26 je: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa27 je : Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo Lys;

Xaa30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly nebo Glu; Xaa34
je: Glu, Lys nebo Asp;

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

Xaa36 je: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu nebo
His

R je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,
-NH₂, Gly, Gly-Pro nebo Gly-Pro-NH₂ nebo je
vypuštěn.

s podmínkou, že tato GLP-1 sloučenina neobsahuje sekvence
GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂ a s podmínkou, že touto
GLP-1 sloučeninou není Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1-
(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂,
Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH,
Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1-
(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH nebo Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂,
Ala¹¹-GLP-1(7-37)OH, Ala¹¹-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-GLP-1-
(7-37)OH, Ala¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁸-GLP-1(7-37)OH,
Ala¹⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Ala²⁷-GLP-1-
(7-36)NH₂, Ala³³-GLP-1(7-37)OH nebo Ala³³-GLP-1(7-36)NH₂.

Jiným provedením podle vynálezu je polypeptid,
obsahující sekvenci aminokyselin vzorce II (SEQ ID NO:2):

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

vzorec II (SEQ ID NO: 2)

kde:

Xaa₈ je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa₁₂ je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

Xaa₁₆ je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu
nebo Ala;

Xaa₂₂ je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys nebo
kyselina cysteová;

Xaa₂₃ je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa₂₆ je: Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa₃₀ je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

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

R je: Lys, Arg; Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,
-NH₂, Gly, Gly-Pro nebo Gly-Pro-NH₂ nebo je
vypuštěn.

s podmínkou, že GLP-1 sloučenina neobsahuje sekvence GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂ a s podmínkou, že GLP-1 sloučenina není Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂ nebo Ala¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂.

Jiným provedením podle vynálezu je polypeptid, obsahující sekvenci aminokyselin vzorce III (SEQ ID NO:3):

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
 -Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₅-Ala-Ala-Lys-Xaa₂₇-
 -Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

vzorec III (SEQ ID NO: 3)

kde :

Xaa₈ je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa₂₂ je: Gly, Asp, Glu, Gln; Asn, Lys, Arg, Cys
 nebo kyselina cysteová;

Xaa₂₃ je : His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa₂₇ je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo
 Lys Xaa₃₀ je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

R je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,
Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro nebo
Gly-Pro-NH₂ nebo je vypuštěn.

s podmínkou, že GLP-1 sloučenina neobsahuje sekvenční
GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂ a s podmínkou, že GLP-1
sloučenina není Gly⁸-GLP-1(7-7)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂,
Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH,
Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1-
(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂,
Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-GLP-1(7-37)OH,
Ala¹⁶-GLP-1(7-6)NH₂, Glu²⁷-GLP-1(7-37)OH nebo
Glu²⁷-GLP-1(7-36)NH₂.

Jiným provedením je podle vynálezu polypeptid, který má
sekvenci aminokyselin vzorce IV (SEQ ID NO: 4):

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

(SEQ ID NO: 4)

kde :

Xaa₇ je L-histidin, D-histidin, desaminohistidin,
2-aminohistidin, β-hydroxy-histidin, homohistidin,
α-fluormethylhistidin nebo α-methyl-histidin;

Xaa₈ je glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin nebo treonin.

Výhodně:

Xaa₈ je glycin, valin, leucin, isoleucin, serin nebo treonin;

Xaa₂₂ je kyselina aspartová, kyselina glutamová, glutamin, asparagin, lysin, arginin, cystein nebo kyselina cysteová.

R je -NH₂ nebo Gly(OH).

Jiným provedením podle vynálezu je glukagonu podobný peptide-1 (GLP-1) sloučenina, která obsahuje aminokyselinu jinou než alanin na pozici 8, a aminokyselinu jinou než glycin na pozici 22.

Jiným provedením podle vynálezu je způsob stimulace GLP-1 receptoru v subjektu který stimulaci GLP-1 receptoru potřebuje. Způsob zahrnuje krok, v tom, že se podává podávání účinné množství zde popsané GLP-1 sloučeniny nebo polypeptidu, obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4.

Ještě jiným provedením podle vynálezu je zde popsaná GLP-1 sloučenina nebo polypeptid, obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 nebo SEQ ID NO:4 pro použití ke stimulaci GLP-1 receptoru v subjektu, který stimulaci GLP-1 receptoru potřebuje.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu si uchovávají schopnost aktivace GLP-1 receptoru a navíc mají ve srovnání s jinými GLP-1 sloučeninami snížený sklon ke shlukování. Výsledkem jsou roztoky těchto sloučenin, které lze rozmíchávat při minimální konverzi na nerozpustnou inaktivní formu. Tato výhoda velice zjednodušuje výrobní postup. Kromě toho lze očekávat, že po podání pacientovi dojde jen k malému nebo k žádnému srážení *in vivo*, čímž se zvýší aktivita a minimalizuje se tendence k nežádoucím reakcím. Dále jsou tyto GLP-1 sloučeniny odolné vůči degradaci diaminopeptidázou IV a navázání zinku a proto se dá očekávat prodloužená doba působení *in vivo*.

Obrázek 1 znázorňuje aminokyselinové sekvence: Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 5), Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 7) a Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 8).

Obrázek 2 znázorňuje aminokyselinové sekvence Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 9), Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 10), Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 11) a Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 12).

Obrázek 3 znázorňuje sekvenci aminokyselin Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 13), Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 14), Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 15) a Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 16).

Obrázek 4 znázorňuje sekvenci aminokyselin Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 17) a Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 18).

"GLP-1 sloučenina" je polypeptid, který má od asi pětadvaceti do asi devětatřiceti přirozeně se vyskytujících nebo nepřirozeně se vyskytujících aminokyselin a má dostatečnou homologii s GLP-1(7-37)OH, takže vykazuje inzulinotropní aktivitu. Příklady nepřirozeně se vyskytujících aminokyselin jsou α -metylamínokyseliny (např. α -metylalanin), D-aminokyseliny, aminokyseliny podobné histidinu (např. 2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormetylhistidin a α -metylhistidin), aminokyseliny, které mají přidanou metylenovou skupinu v postranním řetězci ("homo" aminokyseliny) a aminokyseliny, ve kterých je karboxylová funkční skupina v postranním řetězci nahrazena kyselou sulfonovou skupinou (např. kyselina cysteová). Nicméně výhodně obsahují GLP-1 sloučeniny podle vynálezu pouze přirodně se vyskytující aminokyseliny s dalšími podmínkami, které jsou zde uvedeny.

GLP-1 sloučenina obvykle obsahuje v molekule polypeptidový řetězec, který má sekvenci aminokyselin GLP-1(7-37)OH, analog GLP-1(7-37)OH, fragment GLP-1(7-37)OH nebo fragment GLP-1(7-37)OH analogu. GLP-1(7-37)OH má sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 19:

7His-Ala-Glu-10Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-15Asp-Val-Ser-
-Ser-Tyr-20Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-25Ala-Lys-Glu-Phe-
-Ile-30Ala-Trp-Leu-Val-Lys-35Gly-Arg-37Gly
(SEQ ID NO: 19)

V oboru těchto sloučenin je zavedena praxe, že aminová terminální skupina GLP-1(7-37)OH se označuje číslem zbytku 7 a karboxylová terminální skupina má číslo 37. Další aminokyseliny polypeptidu jsou číslovány podle pořadí, jak je vidět na SEQ ID NO: 19. Například, pozice 12 je fenylalanin a pozice 22 je glycin. Pokud není uvedeno jinak, C-terminální je v tradiční formě karboxyl.

"GLP-1 fragment" je polypeptid, získaný zkrácením N-zakončení a/nebo C-zakončení GLP-1(7-37)OH nebo a GLP-1(7-37)OH analogu o jednu nebo více aminokyselin. Použité názvosloví pro tyto deriváty vychází z GLP-1(7-37)OH a specifikuje GLP-1 fragmenty. Například "GLP-1(9-36)OH" znamená GLP-1 fragment, získaný zkrácením N-zakončení o dvě aminokyseliny a C-zakončení o jednu aminokyselinu. Fragmenty aminokyselin jsou označovány stejným číslem jako odpovídající aminokyselina v GLP-1(7-37)OH. Například N-terminální glutamová kyselina v GLP-1(9-36)OH je na pozici 9; pozice 12 je obsazena fenylalaninem; a pozice 22 je obsazena glycinem, jako v GLP-1(7-37)OH.

Termín "GLP-1 sloučenina" také zahrnuje polypeptidy, ve kterých je k N-zakončení a/nebo k C-zakončení GLP-1(7-37)OH nebo jejích fragmentů přidána alespoň jedna aminokyselina. GLP-1 sloučeniny tohoto typu mají až asi třicet devět aminokyselin. Tyto aminokyseliny, "rozšiřující" GLP-1 sloučeninu, jsou číslovány stejně jako odpovídající aminokyselina v GLP-1(7-37)OH. Například druhá aminokyselina přidaná k N-zakončení GLP-1 sloučeniny, aby se získala sloučenina s dvěma přidanými aminokyselinami k N-zakončení

GLP-1(7-37)OH, je na pozici 5; a aminokyselina v GLP-1 sloučenině, získané přidáním jedné aminokyseliny k C-zakončení GLP-1(7-37)OH je na pozici 38. Tudiž v obou těchto "rozšířených" GLP-1 sloučeninách, stejně jako v GLP-1(7-37)OH je pozice 12 obsazena fenylalaninem a pozice 22 je obsazena glycinem. Aminokyseliny 1-6 rozšířené GLP-1 sloučeniny jsou výhodně stejné nebo konzervativně nahrazené aminokyselinou na odpovídající pozici GLP-1(1-37)OH. Aminokyseliny 38-45 v rozšířené GLP-1 sloučenině jsou výhodně stejné nebo konzervativně nahrazené aminokyselinou na odpovídající pozici glukagonu nebo exendinu-4.

"GLP-1 analog" má natolik dostatečnou homologii s GLP-1(7-37)OH nebo s fragmentem GLP-1(7-37)OH, že analog má inzulinotropní aktivitu. Výhodně má GLP-1 analog sekvenci aminokyselin GLP-1(7-37)OH nebo jejího fragmentu, modifikovanou že jedna, dvě, tři, čtyři nebo pět aminokyselin se liší od aminokyseliny, která je na odpovídající pozici v GLP-1(7-37)OH nebo v tomto jejím fragmentu. Při tvoření názvu, které se zde používá k označení GLP-1 sloučeniny, se uvádí náhradní aminokyselina a její pozice před základní strukturou. Například "Glu²²-GLP-1(7-37)OH" znamená GLP-1 sloučeninu, ve které glycin, který se normálně nalézá na pozici 22 v GLP-1(7-37)OH byla nahrazena kyselinou glutamovou; "Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH" znamená GLP-1 sloučeninu, ve které alanin, normálně se nalézající na pozici 8 a glycin, normálně se nalézající na pozici 22 v GLP-1(7-37)OH, byly nahrazeny valinem a kyselinou glutamovou.

N-zakončení GLP-1 sloučeniny je většinou nesubstituované, ale může také být alkylováno nebo acylováno (výhodně C^1-C_{20}). C-zakončení může být nesubstituované, jako je u GLP-1(7-37)OH, amidované $-NH_2$, $-NHR$ nebo NRR' nebo esterifikováno $-OR''$. R a R' jsou nezávisle alkylová nebo acylová skupina (výhodně C^1-C_{20}). R'' je alkyl (C^1-C_{20}). GLP-1(7-36)NH₂ je příkladem "amidované GLP sloučeniny". Výhodně jsou GLP-1 sloučeniny podle vynálezu na C-zakončení nesubstituované nebo substituované $-NH_2$.

Výhodně jsou GLP-1 sloučeniny podle vynálezu GLP-1 analogy nebo fragmenty GLP-1 analogů, přičemž kostra těchto analogů nebo fragmentů obsahuje aminokyselinu jinou než alanin na pozici 8 (analogy na pozici 8). Tento základní může také obsahovat na pozici L-histidin, D-histidin nebo modifikované formy histidinu jako je desaminohistidin, 2-aminohistidin, (β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormethylhistidin nebo α -methylhistidin. Je výhodné, když tyto analogy na pozici 8 obsahují ve srovnání s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny jednu nebo více dalších obměn na pozicích 11, 12, 16, 22, 23, 29, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 a 37. Je výhodnější, když analogy na pozici 8 obsahují jednu nebo více dalších obměn na pozicích 12, 16, 22, 23, 26, 30, 35 a 37. Je dokonce ještě výhodnější, když analogy na pozici 8 obsahují ve srovnání s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny jednu nebo více dalších obměn na pozicích 22, 23, 27 a 37.

Je také výhodné, když mají tyto analogy ve srovnání s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny 6 nebo méně změn. Výhodnější je, když mají tyto analogy ve srovnání

s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny 5 nebo méně, ještě výhodněji mají 4 nebo méně změn, ve srovnání s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny. Je dokonce ještě výhodnější, když mají tyto analogy ve srovnání s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny 3 nebo méně změn. Je nejvýhodnější, když mají tyto analogy ve srovnání s původním řetězcem nativní GLP-1(7-37)OH sloučeniny 2 nebo méně změn.

Bylo zjištěno, že tyto substituce snižují sklon GLP-1 sloučeniny k agregaci a k tvoření nerozpustné formy. GLP-1 sloučeniny podle vynálezu obecně agregují minimálně asi 5krát méně rychle, než GLP-1(7-37)OH. To lze doložit porovnávacím testem, například agregačním testem, popsáním v příkladu 3. Výhodně tyto sloučeniny podle vynálezu agregují minimálně 20krát méně rychle, výhodněji nejméně 40krát méně rychle, výhodněji nejméně asi 50krát méně rychle, dokonce výhodněji asi 60krát méně rychle, a dokonce výhodněji nejméně asi 65krát méně rychle. Výhodně jsou GLP-1 sloučeninami podle vynálezu, jak je zde popsáno, analogy GLP-1(7-36)NH₂ nebo GLP-1(7-37)OH.

Ve výhodném provedení má v GLP-1 sloučenině podle vynálezu aminokyselina na pozici 22 postraní řetězec, který zahrnuje nejméně dva uhlíkové atomy a polární nebo iontovou funkční skupinu. Mezi tyto postraní řetězce patří kyselina aspartová, která obsahuje metylen a karboxylový uhlík. Výhodněji je na aminokyselině na pozici 22 postraní řetězec lineární nebo rozvětvená alkylová skupina, která má od dvou do šesti uhlíkových atomů a funkční skupinu se sklonem k disociaci, například karboxylovou skupinu, aminoskupinu, guanidinoskupinu nebo sulfonovou skupinu. Příklady výhodných

aminokyselin na pozici 22 jsou glutamová kyselina, aspartová kyselina, arginin a lysin. Když je na pozici 22 aspartová kyselina, glutamová kyselina, arginin nebo lysin, pak je výhodně na pozici 8 glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin a výhodněji valin nebo glycin. Příklad aminokyseliny se sulfonovou skupinou v postranním řetězci je kyselina cysteová ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{SO}_3)-\text{CO}-$, zkracovaná jako "Cya"). Když na pozici 22 je sulfonová kyselina jako je kyselina cysteová, pakl na pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin a výhodněji valin nebo glycin.

V jiném výhodném provedení, je aminokyselina na pozici 8 výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin a výhodněji valin nebo glycin a na pozici 30 je kyselina glutamová, aspartová, serin nebo histidin a výhodněji kyselina glutamová.

V jiném výhodném provedení je aminokyselinou na pozici 8 výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin a výhodněji valin nebo glycin a na pozici 37 je histidin, lysin, arginin, treonin, serin, kyselina glutamová, kyselina aspartová, tryptofan, tyrosin, fenylalanin a výhodněji histidin.

V jiném výhodném provedení je aminokyselinou v pozici je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin a výhodněji valin nebo glycin a na pozici 22 je kyselina glutamová, lysin, kyselina aspartová nebo arginin a výhodněji kyselina glutamová nebo lysin a pozice 23 je lysin, arginin, kyselina glutamová, kyselina

aspartová, a histidin a výhodněji lysin nebo kyselina glutamová.

V jiném výhodném provedení, aminokyselina na pozici 8 je výhodně glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin a výhodněji valin nebo glycin a pozice 22 je kyselina glutamová, lysin, kyselina aspartová nebo arginin a výhodněji kyselina glutamová nebo lysin a pozice 27 je alanin, lysin, arginin, tryptofan, tyrosin, fenylalanin nebo histidin a výhodněji alanin.

V jiném výhodném provedení GLP-1 sloučenin podle vynálezu je aminokyselina na pozici 8 a dvě nebo tři aminokyseliny vybrané ze souboru, do kterého patří aminokyselina na pozicích 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 a 37 jsou odlišné od původních aminokyselin na odpovídajících pozicích v nativní GLP-1(7-37)OH.

V jiném výhodném provedení, GLP-1 sloučeniny podle vynálezu mají kromě aminokyseliny na pozici 8 ještě jednu nebo dvě aminokyseliny, které jsou vybrány ze souboru, do kterého patří pozice 11, pozice 12, pozice 16, pozice 22, pozice 23, pozice 24, pozice 26, pozice skupinu, pozice 30, pozice 33, pozice 34, pozice 35, pozice 36 a pozice 37, která(é) se liší od aminokyseliny na odpovídající pozici nativní GLP-1(7-37)OH.

Jak je popsáno shora, GLP-1 sloučeniny podle vynálezu mohou mít kromě aminokyselin na pozici 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 a 37 ještě další obměněnou aminokyselinu, která se liší od aminokyseliny na

odpovídající pozici GLP-1(7-37) nebo fragmentu GLP-1(7-37). Aminokyselinami, jinými než jsou ty na pozicích 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 a 37 v původní GLP sloučenině, jsou výhodně takzvanými "konzervativními substitucemi" a výhodněji jsou "vysoce konzervativními substitucemi".

Výhodně mají GLP-1 sloučeniny podle vynálezu kromě aminokyselin na pozicích 8 a 22 ještě žádnou, jednu, dvě nebo tři další obměněné aminokyseliny, které se liší od aminokyselin na odpovídajících pozicích GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-37)OH fragmentu. Například se může, kromě obměn aminokyselin na pozicích 8 a 22, ještě alespoň jedna aminokyselina na pozicích 7, 21 a 27 GLP-1 sloučeniny lišit od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH nebo v GLP-1(7-37)OH fragmentu.

Výhodně se liší pouze aminokyseliny na pozicích 7, 8 a 22 liší od aminokyselin, které jsou na odpovídajících pozicích GLP-1(7-37)OH (nebo jeho fragmentu). Dá se očekávat, že lze ze známých, biologicky aktivních GLP-1 sloučenin získat další vylepšené GLP-1 sloučeniny se sníženou tendencí k agregaci, nahrazením glycinu na pozici 22 a výhodně alaninu na pozici 8 těchto sloučenin vhodnou aminokyselinou, jak je zde popsáno. Známé biologicky aktivní GLP-1 sloučeniny jsou uvedeny v U.S. patentu 5 977 071 Hoffmanna, et al., U.S. patentu 5 545 618 Buckleyho, et al., a v publikaci Adelhorst, et al., J. Biol. Chem. 269:6275 (1994). Celý obsah těchto publikací se začleňuje do popisu formou odkazu.

Termín "konzervativní substituce" je nahrazení aminokyseliny jinou aminokyselinou, která má stejný elektrický náboj a přibližně stejnou velikost a tvar. Aminokyselina s alifatickým nebo substituovaným alifatickým aminokyselinovým řetězcem mají přibližně stejnou velikost, pokud celkový počet uhlíkových atomů a heteroatomů v jejich postranním řetězcem se neliší o více než asi čtyři. Mají přibližně stejný tvar tehdy, když se počet větví v jejich postranních řetězcích odlišný o ne více než jedno. Aminokyselina s fenylovou nebo substituovanou fenylovou skupinou v postranním řetězcem tam patří, neboť má zhruba stejnou velikost a tvar. Dále je uvedeno pět souborů aminokyselin. Nahrazením aminokyseliny v GLP-1 sloučenině jinou aminokyselinou ze stejného souboru má za následek konzervativní substituci:

Soubor I: glycín, alanín, valín, leucín, isoleucín, serín, treonín, cystein a nepřírodně se vyskytující aminokyseliny s C^1-C^9 alifatickým nebo C^1-C^4 hydroxylem substituovanými alifatickými postranními řetězcem (lineárními nebo jednou rozvětvenými).

Soubor II: kyselina glutamová, kyselina aspartová a nepřírodně se vyskytující aminokyseliny s C^1-C^4 alifatickými postranními řetězcem, (nerozvětvenými nebo jednou rozvětvenými) substituovanými karboxylovou skupinou.

Soubor III: lysín, ornitin, arginin a nepřírodně se vyskytující aminokyselina s C^1-C^4 alifatickými postranními řetězcem (nerozvětvenými nebo jednou

rozvětvenými), substituovanými aminem nebo guanidinoskupinou

Soubor IV: glutamin, asparagin a nepřírozně se vyskytující aminokyselina s amidovanými C¹-C⁴ alifatickými postranními řetězci (nerozvětvenými nebo jednou rozvětvenými).

Soubor V: fenylalanin, fenylglycin, tyrosin a tryptofan.

Pokud není uvedeno jinak v podmínce, konzervativní substituce jsou výhodně provedeny přírodně se vyskytující aminokyselinou.

"Vysoce konzervativní substituce" je nahrazení aminokyseliny jinou aminokyselinou tak, že má stejnou funkční skupinu v postranním řetězci a téměř stejnou velikost a tvar. Aminokyseliny s alifatickými nebo substituovanými alifatickými postranními řetězci na aminokyselině mají téměř stejnou velikost tehdy, když celkový počet uhlíkových atomů a heteroatomů v jejich postranním řetězci se liší ne více než dvojnásobně. Mají téměř stejný tvar, když mají v postranních řetězcích stejný počet větví. Příklady vysoce konzervativních substitucí jsou valin místo leucinu, treonin místo serinu, kyselina aspartová místo kyseliny glutamové a fenylglycin místo fenylalaninu. Příklady substitucí, které jsou nepříliš vysoce konzervativní jsou alanin místo valinu, alanin místo serinu a kyselina aspartová místo serinu.

Příkladem GLP-1 sloučeniny podle vynálezu je polypeptid, který obsahuje sekvenci aminokyselin SEQ ID NO:1. Ve výhodném příkladě je GLP-1 taková GLP-1(7-37)OH sloučenina, ve které Xaa₈ je Gly nebo Val, Xaa₂₂ je Glu nebo Lys a Xaa₂₃ je Glu nebo Lys. V jiném příkladě je GLP-1 sloučeninou GLP-1(7-37)OH kde Xaa₈ je Gly nebo Val a Xaa₃₀ je Glu. Další příklad je GLP-1 sloučenina, kterou je GLP-1(7-37)OH, ve kterém Xaa₈ je Gly nebo Val a Xaa₃₇ je His.

Jiný příklad GLP-1 sloučeniny podle vynálezu je polypeptid, který obsahuje sekvenci aminokyselin SEQ ID. NO. 4. Ve výhodném příkladě pak Xaa₇ je L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-amino-histidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluormetyl-histidin a α -methylhistidin, Xaa₈ je glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin nebo treonin, a výhodně, glycin, valin, leucin, isoleucin, serin nebo treonin, R je -NH₂ nebo Gly(OH) a Xaa₂₂ je lysin, kyselina glutamová, kyselina aspartová nebo arginin v SEQ ID NO:4. Ve výhodnějším příkladě: Xaa₇ je L-histidin, Xaa₈ je glycin nebo valin, Xaa₂₂ je lysin, kyselina glutamová, kyselina aspartová nebo arginin a R je Gly(OH). Alternativně mají Xaa₇, Xaa₈ a R v SEQ ID NO: 4, jak je popsáno shora, následující významy: Xaa₂₂ je aminokyselinu s postranním řetězcem, obsahujícím sulfonovou skupinu, například kyselina cysteová.

V jiném příkladě GLP-1 sloučeniny podle vynálezu není aminokyselinou na pozici 8 D-aminokyselina a postranní řetězec neobsahuje glycin, serin, treonin, cystein nebo

beta-alanin a zároveň aminokyselina na pozici 22 má C¹-C² alkylový postranní řetězec, C¹-C² hydroxylovaný alkylový postranní řetězec nebo C¹-C² thiolovaný alkylový postranní řetězec (např. cystein). Ve výhodném příkladě GLP-1 sloučeniny podle vynálezu aminokyselinou na pozici 8 není D-aminokyselina a postranní řetězec neobsahuje glycin, serin, treonin, cystein nebo beta-alanin přičemž zároveň aminokyselina na pozici 22 má C¹-C⁴ alkylový postranní řetězec, C¹-C⁴ hydroxyalkylový postranní řetězec nebo C¹-C⁴ thiolový alkylový řetězec.

V jiném příkladě GLP-1 sloučeniny podle vynálezu je aminokyselinou na pozici 8 glycin, valin, leucin, isoleucin, metionin, serin, treonin, cystein, kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin, arginin, asparagin, glutamin, fenylalanin, tyrosin, histidin nebo tryptofan; a aminokyselinou na pozici 22 je kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin, arginin, asparagin, glutamin nebo histidin.

Specifické příklady GLP-1 sloučenin podle vynálezu jsou Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 20), Asp²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 21), Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 22), Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 23), Cya²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 24), Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 5), Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 7), Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 8), Val⁸-Cya²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID, NO: 25),

Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 9), Gly⁸-Asp²²-GLP-1-
(7-37)OH (SEQ ID NO: 10), Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH
(SEQ ID NO: 11), Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 12),
Gly⁸-Cya²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 26), Glu²²-GLP-1-
(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 27), Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂
(SEQ ID NO: 28), Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 29),
Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 30), Cya²²-GLP-1-
(7-36)NH₂. (SEQ ID NO: 31), Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂
(SEQ ID NO: 32), Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 33),
Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 34), Val⁸-Lys²²GLP-1-
(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 35) Val⁸-Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂
(SEQ ID NO: 36), Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 37),
Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 38), Gly⁸-Arg²²-GLP-1-
(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 39), Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂
(SEQ ID NO: 40) Gly⁸-Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 41),
Val⁸Lys²³-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 42), Val⁸-Ala²⁷-GLP-1-
(7-37)OH (SEQ ID NO: 43), Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH
(SEQ ID NO: 44), Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 45),
Val⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 46), Val⁸-His³⁷-GLP-1-
(7-37)OH (SEQ ID NO: 47), Val⁸-Glu²²-Lys²³-GLP-1(7-37)OH
(SEQ ID NO: 48), Val⁸Glu²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID-
NO: 49), Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 50),
Val⁸-Gly³⁴-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 51), Val⁸-His³⁷-
-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 52), Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH
(SEQ ID NO: 53).

Termín "GLP-1 sloučenina", jak se zde používá, zahrnuje také farmaceuticky přijatelné soli sloučenin podle vynálezu. GLP-1 sloučenina podle vynálezu může mít dostatečně kyselé a dostatečně zásadité nebo i obojí funkční skupiny, a podle toho mohou reagovat s jakýmkoliv počtem anorganických bází a anorganických a organických kyselin, a tím tvořit soli.

Kyselinami, které se k tomu obvykle používají, a které tvoří adiční soli, jsou anorganické kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina jodovodíková, kyselina sírová, fosforečná kyselina, a podobně a organické kyseliny jako je kyselina p-toluensulfonová, kyselina fosforečná, kyselina metansulfonová, kyselina šťavelová, kyselina p-bromfenylsulfonová, kyselina uhličitá, kyselina jantarová, kyselina citrónová, kyselina benzoová, kyselina octová a podobně. Příklady těchto solí pak jsou: síran, pyrosíran, hydrogensíran, siřičitan, hydrogensiřičitan, fosforečnan, monohydrogenfosforečnan, dihydrogenfosforečnan, metafosforečnan, pyrofosforečnan, chlorid, bromid, jodid, octan, propionan, dekanoát, kaprylát, akrylát, mravenčan, isobutyrylát, kaproát, heptanoát, propiolát, šťavelan, malonát, jantaran, suberát, sebakát, fumarát, maleát, butin-1,4-dioát, hexin-1,6-dioát, benzoát, chlorbenzoát, metylbenzoát, dinitrobenzoát, hydroxybenzoát, metoxybenzoát, ftalát, sulfonát, xylensulfonát, fenylacetát, fenylpropionát, fenylbutyrát, citrát, laktát, gama-hydroxybutyrát, glykolát, vinan, metansulfonát, propansulfonát, naftalen-1-sulfonát, naftalen-2-sulfonát, mandelát a podobně.

Adiční soli se zásadami jsou soli odvozené od anorganických bází, jako jsou amonné soli, alkalické soli nebo soli kovů alkalických zemin, soli s hydroxidy kovů, uhličitany, hydrogenuhličitany a podobně. Tyto báze, použitelné pro přípravu solí podle vynálezu jsou například hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid amonný, uhličitán amonný a podobně.

GLP-1 sloučeniny se dají používat k léčení subjektů se širokým rozsahem nemocí a stavů. Lze očekávat, že GLP-1 sloučeniny podle vynálezu budou projevovat biologické účinky, spočívající v působení na receptor, označovaný jako "GLP-1 receptor" (viz U.S. Patent 5 670 360 Thorrens). Subjekty trpící chorobami a/nebo stavy, které jsou žádoucím způsobem ovlivnitelné stimulací GLP-1 receptoru nebo podáváním GLP-1 sloučeniny se tudíž mohou GLP-1 sloučeninami podle vynálezu léčit. Tyto subjekty jsou označovány jako že "potřebují léčení stimulací GLP-1 sloučeninami" nebo "potřebují stimulaci GLP-1 receptoru". Patří mezi ně subjekty s inzulinově nezávislý diabetes, na inzulinu závislý diabetes, mrtvice (viz WO 00/16 797 Efendic), infarkt myokardu (viz WO 98/08 531 Efendic), obezita (viz WO 98/19 698 Efendic), pooperační katabolické změny (viz U.S. Patent 6 006 753 Efendic), funkční dyspepsie a syndrom dráždivého střeva (viz WO 99/64 060 Efendic). Patří sem také subjekty, které potřebují profylaktické léčení GLP-1 sloučeninou, například subjekty kterým hrozí, že se u nich vyvine inzulinově nezávislý diabetes (viz WO 00/07 617). Subjekty s porušenou tolerancí ke glukóze nebo se změněnou hladinou glukózy na lačno, subjekty, jejichž tělesná hmotnost je asi o 25% nad normální tělesnou hmotností podle

výšky daného subjektu a jeho tělesné stavby, subjekty s parciální pankreatektomií, subjekty, které mají jednoho nebo více rodičů trpících inzulinově nezávislým diabetem, subjekty, které měly gestační diabetes a subjekty, které měly akutní nebo chronickou pankreatitidu jsou ohroženy tím, že se u nich vyvine inzulinově nezávislý diabetes.

Termín "účinné množství" ve vztahu k GLP-1 sloučeninám znamená množství, které má, pokud je podáno subjektu, který stimulaci GLP-1 receptoru potřebuje, za následek terapeutický a/nebo profylaktický efekt bez nepříjemných vedlejších účinků. Termín "požadovaný terapeutický účinek" má alespoň jeden následující význam: 1) zlepšení příznaků, spojených s chorobou nebo stavem; 2) odložení nástupu příznaků, spojených s chorobou nebo stavem; 3) prodloužení délky života ve srovnání s absencí daného léčení; a 4) zlepšení kvality života ve srovnání s absencí daného léčení. Například "účinné množství" GLP-1 sloučeniny při léčení cukrovky je množství, které způsobí větší kontrolu koncentrace glukózy v krvi, než by byla při absenci léčení, což vede k oddálení nástupu diabetických komplikací jako je retinopatie, neuropatie nebo choroba ledvin. "Účinné množství" GLP-1 sloučeniny pro prevenci cukrovky je množství, které oddálí ve srovnání se stavem při absenci léčení, nástup zvýšených koncentrací glukózy v krvi na takové hodnoty, při kterých by bylo nutné léčení antihypoglykemickými léky jako jsou sulfonylmočoviny, thiazolidindiony, inzulin a/nebo bisguanidiny.

"Účinné množství" GLP-1 sloučeniny, podávané subjektu bude také záviset na typu a závažnosti léčené choroby a na vlastnostech léčeného subjektu jako je všeobecné zdraví,

věk, pohlaví, tělesná hmotnost a tolerance k lékům. Odborník v oboru bude již schopen stanovit potřebné dávkování v závislosti na těchto i jiných faktorech. Obvykle se může terapeuticky účinné množství GLP-1 sloučeniny pohybovat v rozmezí od asi 0,01 mg denně do asi 1000 mg denně pro dospělého. Výhodně je dávka v rozmezí od asi 0,1 mg denně do asi 100 mg denně, výhodněji od asi 1,0 mg/den do asi 10 mg/den.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu se mohou podávat například orálně, nasálně, inhalačně nebo parenterálně. Parenterální podávání může být například systémické jako intramuskulární, intravenózní, subkutánní nebo intraperitoneální injekcí. GLP-1 sloučeniny se mohou podat subjektu spolu s přijatelným farmaceutickým nosičem, ředidlem nebo excipientem jako součást farmaceutické kompozice k léčení shora diskutovaných nemocí. Farmaceutická kompozice může být roztok nebo, pokud se podává parenterálně, suspenze GLP-1 sloučeniny nebo suspenze GLP-1 sloučeniny v komplexu s dvojmocným kationtem kovu, jak je popsáno dále. Vhodné farmaceutické nosiče mohou obsahovat inertní přísady, které neinteragují s peptidem nebo peptidovým derivátem. Pro přípravu léků se dají použít standardní farmaceutické techniky tak, jak jsou popsány v "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, PA. Vhodné farmaceutické nosiče pro parenterální podávání jsou například sterilní voda, fyziologický roztok, bakteriostatická solanka (solanka obsahující asi 0,9 mg/ml benzylalkoholu), fosfátem pufrovaná solanka, Hankův roztok, Ringerův mléčnan a podobně. Některé příklady vhodných excipientů jsou laktóza, dextróza, sacharóza, trehalóza, sorbitol a manitol.

Termín "subjekt" znamená savce, výhodně člověka, ale může jít o zvířata, například domácí zvířata (např. psi, kočky a podobně), hospodářská zvířata (např. krávy, ovce, prasata, koně a podobně) a laboratorní zvířata (např. krysy, myši, morčata a podobně).

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu se dají uvést do komplexu s vhodným dvojmocným kationtem kovu. Dvojmocné kovové komplexy GLP-1 sloučenin jsou obecně ve vodném roztoku s pH kolem fyziologického nerozpustné. Tudíž tyto komplexy mohou být podávány subkutánně jako suspenze a vykazují sníženou rychlost uvolňování účinné látky *in vivo*, čímž se prodlouží doba jejího působení. Příklady vhodných dvojmocných iontů kovů jsou Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} a podobně. Výhodný je Zn^{++} .

Aby se připravily komplexy GLP-1 sloučenin podle vynálezu s dvojmocným kationtem kovu, rozpustí se GLP-1 ve vhodném pufru a v přítomnosti soli kovu. Směs se nechá inkubovat za okolní teploty, čímž se umožní srážení komplexu. Vhodné pufrы jsou ty, které udržují pH směsi na hodnotě pH v rozmezí asi 3,0 až asi 9,0 a neruší komplexační reakci. Příklady jsou fosfátové pufrы, acetátové pufrы, citrátové pufrы a Goodeovy pufrы, např. HEPES, Tris a Tris acetát. Vhodné soli kovů jsou ty, ve kterých je kov vhodný pro komplexaci. Příklady vhodných zinkových solí jsou chlorid zinečnatý, octan zinečnatý, oxid zinečnatý a síran zinečnatý. Výhodnou je solí s dvojmocným kationtem kovu je chlorid zinečnatý, pokud se přidává v přebytku, aby se dosáhl molární poměr do asi 50 molekul dvojmocného kationtu kovu na každou molekulu GLP-1 sloučeniny.

"Inzulinotropní aktivita" znamená stimulaci vylučování inzulinu jako odpověď na zvýšení hladiny glukózy, což pak způsobí odebrání glukózy buňkami a snížení její hladiny. Inzulinotropní aktivita se dá posoudit metodami, které jsou v oboru známe, včetně použití experimentů *in vivo* a *in vitro* testů, které měří vazací aktivitu GLP-1 receptoru nebo aktivaci receptoru, např. test používající pankreatické buňky Langerhansových ostrůvků nebo buňky inzulinomu, jak je popsáno v EP 619 322 Gelfand, et al., a U.S. patentu 5 120 712. Celé obsahy těchto referencí jsou začleněny do tohoto popisu.

GLP-1 sloučeniny podle vynálezu se dají připravit s použitím standardních způsobů syntézy peptidů v pevné fázi. Peptidové syntezátory jsou komerčně dostupné například od firmy Applied Biosystems ve Foster City, CA. Reakční činidla pro syntézu v pevné fázi jsou komerčně dostupná například od Midwest Biotech (Fishers, V). Syntezátory peptidů v pevné fázi se dají používat podle instrukcí výrobce k blokování rušících skupin, přičemž se uvádí do reakce chráněná aminokyselina, provádí se kopulace, odštěpení kopulované kyseliny a zakončení nezreagované aminokyseliny.

Obvykle se na N-koncovou aminokyselinu na prodlužovaném peptidovém řetězci, který je navázán na pryskyřici, kopuluje při pokojové teplotě další aminokyselina chráněná na α -N-karbamoylu, což se provádí v inertním rozpouštědle jako je dimetylformamid, N-metylpyrrolidon nebo metylenchlorid za přítomnosti kopulačních činidel jako je dicyklohexylkarbodiimid a 1-hydroxybenzotriazol a báze jako je diisopropyletylamin. α -N-karbamoylová chránicí skupina se z

výsledného peptidu na pryskyřici odštěpí pomocí reakčního činidla jako je kyselina trifluoroctová nebo piperidin a kopulační reakce se opakuje s další požadovanou N-chráněnou aminokyselinou, která se má do řetězce přidat. Vhodné skupiny chránící aminoskupinu jsou v oboru dostatečně známy a jsou popsány například v publikaci Green a Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1991, jejíž veškeré údaje jsou začleněny tímto odkazem do popisu. Příklady jsou t-butyloxykarbonyl (tBoc) a fluorenylmetoxykarbonyl (Fmoc).

Peptidy se také syntetizují standardními automatizovanými protokoly syntézy v pevné fázi, při čemž se používá t-butoxykarbonyl- nebo fluorenylmetoxykarbonyl-alfa-aminokyselin s vhodnou ochranou postranního řetězce. Po dokončení syntézy se peptid odštěpí od pevného podkladu a současně se provede odstranění skupin, chránících postraní řetězce standardní fluorovodíkovou metodou. Surové peptidy se pak dále čistí s použitím chromatografie na reverzní fázi na kolonách Vydac C₁₈ přičemž se používá acetonitrilových gradientů v 0,1% kyselině trifluoroctové (TFA). Acetonitril se pak odstraní tak, že se peptidy lyofilizují z roztoku, který obsahuje 0,1 % TFA, acetonitril a vodu. Čistota produktu se dá ověřit analytickou chromatografií na reverzní fázi. Identita peptidů se dá ověřit hmotnostní spektrometrií. Peptidy se dají solubilizovat ve vodných pufrách při neutrálním pH.

Vynález je dále ilustrován příklady, které nejsou míněny v žádném směru jako omezující.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Příprava GLP-1 sloučenin podle vynálezu "t-Boc chemií" v pevné fázi

Do 60 ml standardní reakční bylo naváženo přibližně 0,5-0,6 gramů (0,38-0,45 mmol) pryskyřice Boc-Gly-PAM a byla provedena dvojí kopulace na syntezátoru peptidů Applied Biosystems ABI430A. K chránění postraních řetězců byly použity Boc aminokyseliny ve 2 milimolových kazetách, které byly získány od Midwest Biotech (Fishers, V), přičemž byly syntetizovány:

Arg-Tosyl (TOS), Asp- δ -cyklohexylester (CHXL), Glu- δ -cyklohexylester (CHXL), His-benzyloxymetyl (BOM), Lys-2-chlorbenzyloxykarbonyl (2Cl-Z), Met-sulfoxid (O), Ser-O-benzyléter (OBzl), Thr-O-benzyléter (OBzl), Trp-formyl (CHO) a Tyr-2-brombenzyloxykarbonyl (2Br-Z) a pryskyřice Boc-Gly-PAM. Kyselina trifluoroctová (TFA), diisopropyletylamin (DIEA), 0,5 M hydroxybenzotriazol (HOBt) v DMF a 0,5 M dicyklohexylkarbodiimid (DCC) v dichlormetanu byly získány od PE-Applied Biosystems (Foster City, CA). Dimetylformamid (DMF-Burdick a Jackson) a dichlormetan (DCM-Mallinkrodt) byly získány od Mays Chemical Co. (Indianapolis, V).

Byla prováděna standartní dvojité kopulace buď pomocí symetrického anhydridu nebo pomocí HOBt-esterů, v obou případech s použitím DCC. Druhá dvojité kopulace (bez odstranění TFA chránicí skupiny) byla provedena s Trp³¹, Thr¹³ a Thr¹¹. Při ukončení syntéz byla N-koncová Boc

skupina odstraněna a peptidylové pryskyřice byly ošetřeny 20% piperidinem v DMF, aby se deformyloval postraní řetězec Trp. Po promytí DCM, byly pryskyřice přemístěny do teflonové reakční nádoby a sušeny ve vakuu.

Pro přípravu analogů obsahujících Met byly postupem "na pryskyřici" prováděny redukce pomocí TFA/10% dimetylsulfidu (DMS)/2% konc. HCl. Odštěpování bylo prováděno připojením reakční nádoby k zařízení na aplikaci HF (kyselina fluorovodíková) od Penninsula Laboratories. Vždy byl přidán 1 ml m-kresolu na 1 gram pryskyřice a v předchlazené nádobě bylo zkondenzováno 10 ml HF (získán od firmy AGA, Indianapolis, IN). Za přítomnosti metioninu byl pak vždy přidán 1 ml DMS na 1 gram pryskyřice. Reakční směsi byly pak vždy hodinu míchány na ledové lázni a pak z nich byl pod vakuem odstraněn HF. Odparky byly rozmíchávány v etyléteru a pevné podíly byly odfiltrovány a promývány éterem. Každý peptid byl extrahován do vodné kyseliny octové a buď sušen za mrazu nebo přímo nanášen na kolonu s náplní pro reverzní fázi a chromatografován.

Čištění bylo prováděno na 5cm koloně VYDAC C₁₈ v pufru A (0,1% kyselina trifluorooctová ve vodě, B: 0,1% TFA v acetonitrilu). Chromatografie byla A: gradientová od 20% do 90%, B: HPLC (Waters) v průběhu 120 minut při rychlosti 10 ml/minutu, přičemž obsah látek byl sledován UV zářením při 280 nm (4,0 A) a frakce byly odebírány vždy po 1 minutě. Frakce s obsahem požadovaných látek byly spojeny, zmrazeny a lyofilizovány. Vysušené produkty byly analyzovány HPLC (0,46 x 15 cm METASIL AQ C₁₈) a hmotnostní spektrometrií (MALDI).

Příklad 2 - Příprava GLP-1 sloučenin podle vynálezu F-Moc chemií v pevné fázi

Do jamek 96jamkového reakčního bloku na programovatelném syntezátoru peptidů "Advanced ChemTech 396" bylo umístěno přibližně 119 mg (50 mmol) pryskyřice Fmoc-Gly WANG (získána od NovaBiochem, LaJolla, CA) a byly provedeny dvojí kopulace. Analogy s C-koncovým amidem byly připraveny s použitím 75 mg (50 mol) pryskyřice "Rink Amide AM" (NovaBiochem, LaJolla, CA).

Následující Fmoc aminokyseliny byly získány od Advanced ChemTech (Louisville, KY), NovaBiochem, (La Jolla, CA), a Midwest BioTech (Fishers, V): Arg-2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), Asn-trityl (Trt), Asp- β -t-Butylester (tBu), Glu- δ -t-butyl-ester (tBu), Gln-trityl (Trt), His-trityl (Trt), Lys-t-butyloxykarbonyl (Boc), Ser-t-butyléter (OtBu), Thr-t-butyléter (OtBu), Trp-t-butyloxykarbonyl (Boc), Tyr-t-butyléter (OtBu).

Rozpouštědla dimethylformamid (DMF-Burdick and Jackson), N-methylpyrrolidon (NMP-Burdick a Jackson), dichlormetan (DCM-Mallinkrodt) byla získána od Mays Chemical Co. (Indianapolis, V).

Hydroxybenzotriazol (HOBt), diisopropylkarbodiimid (DIC), diisopropyletylamin (DIEA) a piperidin (Pip) byly získány od firmy Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI).

Všechny aminokyseliny byly rozpuštěny v 0,45 M HOBt v NMP a 50 minut aktivovány DIC/HOBt, kopulace byly prováděny po 20 minutách, odstraňování chránících skupin s použitím 20% Pip/DMF. Každá pryskyřice byla po odstranění chránících skupin a kopulačních činidel promyta DMF. Po poslední

kopulaci a odstranění chránicích skupin byly peptidylové pryskyřice promyty DCM a sušeny pod vakuem ještě v reakčním bloku.

Do každé jamky bloku sestavy pro provádění reakcí a štěpení byly umístěny 2 ml "Reagentu K" a štěpící reakční směs byla prováděna 2 hodiny ["Reagent K" = 0,75 g fenolu, 0,5 ml thioanisolu, 0,25 ml etanditiolu, 0,5 ml vody s 10 ml trifluoroctovou kyselinou (TFA), přičemž všechny tyto chemikálie byly získány od firmy Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI]. TFA filtráty byly přidány k 40 ml etyléteru a sraženiny byly odstředěny po dobu 2 minut při 2000 otáčkách za minutu. Supernatanty byly dekantovány, pelety byl opět rozmíchány ve 40 ml éteru, opět odstředěny, opět dekantovány, sušeny pod dusíkem a pak *in vacuo*.

Dávky po 0,3-0,6 mg každého produktu byly rozpuštěny v 1 ml 0,1% směsi TFA/acetonitril (ACN) a 20 μ l získaného roztoku bylo analyzováno HPLC [0,46 x 15 cm METASIL AQ C₁₈, 1 ml/min, 45C°, 214 nM (0,2A), A=0,1% TFA, B=0,1% TFA/50%ACN. Gradient = 50% B až 90% B v průběhu 30 minut].

Čistící operace byly prováděny na koloně 2,2 x 25 cm VYDAC C₁₈ v pufru A (0,1% kyselina trifluoroctová ve vodě, B: 0,1% TFA v acetonitrilu). Byl použit gradient od 20% do 90% B na HPLC (Waters) v průběhu 120 minut při rychlosti průtoku 10 ml/minutu přičemž vymývané látky byly monitorovány UV zářením o vlnové délce 280 nm (4,0A) a frakce byly odebírány po 1 minutě. Požadované frakce byly spojeny, zmrazeny a lyofilizovány. Sušené produkty byly

analyzovány HPLC (0,46 x 15 cm METASIL AQ C₁₈) a hmotnostní spektrometrií MALDI.

Příklad 3 - Test agregace GLP:

GLP peptidy podle tohoto vynálezu byly analyzovány z hlediska jejich sklonu k agregaci v roztoku. Obecně byly peptidy v roztoku míchány při zvýšené teplotě ve vhodném pufru, přičemž byl zaznamenáván zákal, zjišťovaný při světle o vlnové délce 350 nm jako funkce času. Byla také měřena doba, která uplynula do začátku agregace, aby se kvantitativně vyjádřil sklon daných GLP molekul ke shlukování za těchto obtížných podmínek.

Typový protokol při provádění měření:

GLP-1 sloučenina byla nejprve rozpuštěna za alkalických podmínek (pH 10,5) přičemž byla míchána 30 minut aby se rozpustily veškeré před tím agregované podíly. Získaný roztok byl pak upraven na pH 7,4 a zfiltrován. Konkrétně bylo použito 4 mg lyofilizované GLP-1 sloučeniny ve 3 ml pufru s obsahem 10 mM fosfátu/10 mM citrátu. pH pak bylo upraveno na 10,0-10,5 a udržováno 30 minut. Roztok pak byl upraven přidáním HCl na pH 7,4 a filtrován na vhodném filtru, například filtru pro injekční stříkačky Millex GV (Millipore Corporation, Bedford, MA). Tento roztok pak byl ředěn na finální vzorek, obsahující 0,3 mg/ml proteinu v pufru s obsahem 10 mM citrátu, 10 mM fosfátu, 150 mM NaCl, a upraven na pH 7,4 až 7,5. Vzorek byl inkubován při 37°C v křemenné kyvetě. Každých pět minut pak byl stanovován zákal roztoku při 350 nm na spektrofotometru AVIV Model 14DS UV-VIS (Lakewood, NJ). Po dobu 30 vteřin před měřením a v

průběhu měření byl roztok míchán pomocí magnetického míchadla od firmy Starna Cells, Inc. (Atascadero, CA). Zvyšování zákalu (OD) při 350 nm indikuje agregaci GLP-peptidu. Doba po kterou se dostaví určitá agregace byla mezi měřeními odhadnuta lineární interpolací a byla stanovena předrůstová a růstová fáze metodou Drakea (Arvinte T, Cudd A a Drake AF. (1993) J. Bio. Chem. 268, 6415-6422).

Kyveta byla mezi experimenty čištěna roztokem zásaditého mýdla (např. Contrad-70).

Výsledky pro řadu GLP-1 sloučenin podle vynálezu jsou uvedeny v tabulce 1 jako doba v hodinách, potřebná k agregaci sloučeniny do shluku. Jak lze vidět z této tabulky, sloučeniny podle vynálezu vykazují výrazně zvýšenou agregační dobu oproti GLP-1 sloučeninám, které byly známy podle stavu techniky před vynálezem.

Příklad 4 - Aktivace GLP-1 receptoru GLP-1 sloučeninami podle vynálezu

Schopnost GLP-1 sloučenin podle vynálezu aktivovat GLP-1 receptor byla posouzena *in vitro* testem, který je popsán v EP 619 322 autorů Gelfand, et al., a v U.S. Patentu 5 120 712. Celý obsah těchto odkazů je začleněn do tohoto popisu formou odkazu. Aktivita těchto sloučenin ve srovnání s aktivitou GLP-1(7-37)OH je uvedena v tabulce 1. Jak je vidět z těchto výsledků, účinek GLP-1 sloučenin podle vynálezu je obecně asi stejně dobrý nebo lepší než GLP-1(7-37)OH.

Tabulka 1

GLP-1 Sloučenina	Agregace Čas v hodinách	Aktivace GLP-1 receptoru
GLP-1(7-37)OH	1	1,0
Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH	0,9±0,2 (n=6)	0,47
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	9*	0,282
Val ⁸ -Alan-GLP-1(7-37)OH	10	0,021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1(7-37)OH	13	0,001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH	6	0,81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	12	0,047
Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	16	0,112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH	5	1,175
Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1(7-37)OH	5	0,33
Gln ²² -GLP-1(7-37)OH	7	0,42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37)OH	19	0,56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37)OH	22	0,50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37)OH	>90	0,40

Tabulka 1 pokračování

Val ⁸ -Glu ²² -GLP-2(7-37)OH	72	1,29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH	100,54	0,58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37)OH	>75	0,01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37)OH	>75	0,14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	24	0,53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	>65	1,0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	19	1,07
Val ⁸ -Glu ²³ -GLP-1(7-36)OH	65	0,28
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	>45	0,18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	3	0,007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	22	0,02
Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>24	0,8
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	3	0,007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	22	0,02
Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>24	0,8
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	3	0,007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH	22	0,02
Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>24	0,8
Ala ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>24	0,7
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	10	0,37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	2	0,47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	>40	0,29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	30	0,29

Tabulka 1 pokračování

Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	>45	0,15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	8	0,19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	13	0,19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH	>70	0,039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1(7-37)OH	20	0,1
Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1(7-37)OH	9	0,01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	>40*	0,17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	14	0,094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	>45,30	0,41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	63	0,15
Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	>45	0,11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1(7-37)OH	8	0,22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1(7-37)OH	>40	0,33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH	>20	0,23
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH	4	0,37
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1(7-37)OH	>30	0,35
Val ⁸ -Glu ²² -Gln ²³ -GLP-1(7-37)OH	>20	0,47
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH	>45	1,02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH	>65	1,43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1(7-37)OH	22	0,08
Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁹ -GLP-1(7-37)OH	>48	0,09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1(7-37)OH	27	0,34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1(7-37)NH ₂	2	0,53

* = Agregační doba stanovená při 30°C

Příklad 5 - Srážení GLP-1 sloučeniny zinkem

Jednotlivé GLP-1 sloučeniny byly připraveny jak je popsáno v příkladech 1 nebo 2. 3 mg jednotlivých lyofylizovaných látek s GLP molekulou bylo vždy rozmícháno v 3 ml 0,1 M pufru HEPES s pH 10,5. Pak bylo pH výsledného roztoku upraveno na hodnotu mezi 10,0 a 10,5 pomocí 0,2N NaOH. Roztok byl míchán při teplotě okolí po dobu 30 minut a pak bylo jeho pH upraveno na 7,4 pomocí 0,2N HCl. Tento roztok byl pak přefiltrován přes vhodný filtr pro injekční stříkačku, například přes filtr injekční stříkačky Millex GV (Millipore Corporation, Bedford, MA) a koncentrace GLP-1 sloučeniny byla odhadnuta měřením absorpce při 280 nm ve spektrofotometru, například značky Beckman DU540. Koncentrace proteinu pak byla upravena na 200 μ M v HEPES při pH 7,4.

Přefiltrované roztoky GLP-1 (po 100 μ l) pak byly zředěny na destičkách ELISA (např. Falcon MicrotestTM 96) přidavky 100 μ l 0,1 M HEPES pH 7,4 s různou koncentrací chloridu zinečnatého, čímž byly získány 200 μ l vzorky roztoku s různým obsahem chloridu zinečnatého a s koncentrací 100 μ M GLP-1 sloučeniny. Tyto roztoky byly pak inkubovány při teplotě okolí (22 °C) po dobu 18 hodin a pak odstředěny, například na odstředivce Jouan CR412 s mikrodestičkovými adaptéry. 150 μ l supernatantů, získaných po odstředění, bylo pak přeneseno do UV-čtečky pro mikrotitrové destičky ELISA (např. UV destičky Costar) a bylo vyhodnoceno OD při 280, stanovitelné v čtečce mikrodestiček (např. Molecular Devices SPECTRAMax PLUS, SOFTmax PRO).

Výsledky experimentu jsou znázorněny v tabulce 2. Hodnoty A 280 jsou průměrné hodnoty ze dvou nezávislých stanovení.

Tabulka 2

molární poměr Zn/ GLP-1	GLP-1- (7- -37)- OH A 280	Gly ⁸ GLP-1 (7- -37)OH A 280	Val ⁸ GLP-1 -1(7- -37)OH A 280	Gln ²² - -GLP- -1(7- -37)OH A 280	Val ⁸ - -Glu ²² GLP-1(7- -37)-OH A 280	Val ⁸ - -Ala ²² GLP-1- (7-37)OH A 280
0	0,337	0,32	0,3	0,290	0,295	0,289
0,3	0,318	0,166	0,27	0,390	0,291	0,202
0,5	0,329	0,151	0,26	0,123	0,292	0,107
0,7	0,253	0,156	0,129	0,076	0,293	0,104
1	0,148	0,119	0,06	0,074	0,26	0,110
2	0,092	0,089	0,025	0,095	0,078	0,110
3	0,081	0,085	0,021	0,095	0,052	0,104
5	0,074	0,078	0,019	0,097	0,035	0,119

Tabulka 2 (pokračování)

molární poměr Zn/GLP-1	Val ⁸ - -Ser ²² - -GLP-1- (7-37)OH A 280	Val ⁸ - -Phe ²² - -GLP-1- (7-37)OH A 280	Val ⁸ - -Pro ²² - -GLP-1- (7-37)OH A 280	Val ⁸ - -Lys ²² - -GLP-1- (7-37)OH A 280	Val ⁸ - -Asp ²² - -GLP-1- (7-37)OH A 280
0	0,2855	0,31	0,2595	0,299	0,288
0,3	0,2805	0,1485	0,2455	0,0825	0,2785
0,5	0,2665	0,1165	0,2325	0,0905	0,2845
0,7	0,1825	0,1015	0,219	0,1195	0,287
1	0,149	0,1265	0,1905	0,1225	0,291
2	0,0935	0,092	0,1695	0,1675	0,184
3	0,101	0,061	0,1615	0,1475	0,1485
5	0,0615	0,00795	0,171	0,142	0,1675

Tyto výsledky ukazují, že ke vzniku komplexu a k vysrážení signifikantního množství různých GLP-1 sloučenin ze zředěných roztoků jsou potřebná jen malá množství zinku.

Ekvivalenty

Přestože byl vynález konkrétně ukázán a popsán s odkazem na jeho výhodná provedení, je třeba tomu rozumět tak, že odborník v oboru může uskutečnit různé změny v formě a detailech, aniž by se odchýlil od myšlenky vynálezu spirit a aniž by se tím dostal mimo rozsah vynálezu, jak je definován připojenými nároky. Odborník v oboru rozpozná nebo je schopen zjistit pomocí pouhých rutinních experimentů mnoho ekvivalentů popsaných konkrétních provedení vynálezu. Takovéto ekvivalenty jsou zahrnuty do rozsahu nároků.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. GLP-1 sloučenina obsahující sekvenci aminokyselin
vzorce 1 (SEQ ID NO:1)

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

Vzorec 1 (SEQ ID NO: 1)

ve kterém:

Xaa₈ je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa₁₁ je: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys nebo His;

Xaa₁₂ je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

Xaa₁₆ je : Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Tyr,
Glu nebo Ala;

Xaa₂₂ je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys nebo
Cysteová Kyselina;

Xaa₂₃ je: His, Asp, Lys, Glu, Gln nebo Arg; Xaa₂₄ je:
Glu, Arg, Ala nebo Lys;

Xaa₂₆ je: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa₂₇ je : Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo Lys;

Xaa30 je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

Xaa33 je: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly nebo Glu; Xaa34
je: Glu, Lys nebo Asp;

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

Xaa36 je: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu nebo
His

R je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,
-NH₂, Gly, Gly-Pro nebo Gly-Pro-NH₂ nebo je
vypuštěn.

s podmínkou, že tato GLP-1 sloučenina neobsahuje sekvence
GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂ a s podmínkou, že touto
GLP-1 sloučeninou není Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1-
(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-
-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH,
Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1-
(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH nebo Thr⁸GLP-1(7-36)NH₂,
Ala¹¹-GLP-1(7-37)OH, Ala¹¹-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-GLP-1-
(7-37)OH, Ala¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁸-GLP-1(7-37)OH,
Ala¹⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH, Ala²⁷-GLP-1-
(7-36)NH₂, Ala³³-GLP-1(7-37)OH nebo Ala³³-GLP-1(7-36)NH₂.

2. GLP-1 sloučenina obsahující sekvenci aminokyselin
vzorce II (SEQ ID NO:2):

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

vzorec II (SEQ ID NO: 2)

kde:

Xaa₈ je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa₁₂ je: His, Trp, Phe nebo Tyr;

Xaa₁₆ je: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu
nebo Ala;

Xaa₂₂ je: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys nebo
kyselina cysteová;

Xaa₂₃ je: His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa₂₆ je: Asp, Lys, Glu nebo His;

Xaa₃₀ je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

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

R je: Lys, Arg; Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,
-NH₂, Gly, Gly-Pro nebo Gly-Pro-NH₂ nebo je
vypuštěn.

s podmínkou, že GLP-1 sloučenina neobsahuje sekvence
GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂ a s podmínkou, že GLP-1
sloučenina není Gly⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂,
Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH,
Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1-
(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-
-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸GLP-1(7-36)NH₂ nebo Ala¹⁶-GLP-1-
(7-36)NH₂.

3. GLP-1 sloučenina obsahující sekvenci aminokyselin
vzorce III (SEQ ID NO:3):

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-
-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₅-Ala-Ala-Lys-Xaa₂₇-
-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

vzorec III (SEQ ID NO: 3)

kde :

Xaa₈ je: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser nebo Thr;

Xaa₂₂ je: Gly, Asp, Glu, Gln; Asn, Lys, Arg, Cys
nebo kyselina cysteová;

Xaa₂₃ je : His, Asp, Lys, Glu nebo Gln;

Xaa₂₇ je: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg nebo

Lys Xaa₃₀ je: Ala, Glu, Asp, Ser nebo His;

R je: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr,

Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro nebo

Gly-Pro-NH₂ nebo je vypuštěn.

s podmínkou, že GLP-1 sloučenina neobsahuje sekvence GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂ a s podmínkou, že GLP-1 sloučenina není Gly⁸-GLP-1(7-7)OH, Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1(7-37)OH, Leu⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1(7-37)OH, Ile⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1(7-37)OH, Ser⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1(7-37)OH, Thr⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Ala¹⁶-GLP-1(7-37)OH, Ala¹⁶-GLP-1(7-36)NH₂, Glu²⁷-GLP-1(7-37)OH nebo Glu²⁷-GLP-1(7-36)NH₂.

4. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3, přičemž ne více než 6 aminokyselin GLP-1 sloučeniny se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)NH₂.

5. GLP-1 sloučenina podle nároku 4, přičemž ne více než 5 aminokyselin v GLP-1 sloučenině se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)NH₂.

6. GLP-1 sloučenina podle nároku 5, přičemž ne více než 4 aminokyseliny GLP-1 sloučeniny se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)-NH₂.

7. GLP-1 sloučenina podle nároku 6, přičemž ne více než 3 aminokyseliny GLP-1 sloučeniny se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-1(7-36)NH₂.

8. GLP-1 sloučenina podle nároku 7, přičemž ne více než 2 aminokyseliny GLP-1 sloučeniny se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH nebo GLP-2(7-36)NH₂.

9. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, ve které Xaa₈ je glycin nebo valin.

10. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 8, ve které Xaa₈ je glycin nebo valin a Xaa₃₀ je alanin, kyselina glutamová, kyselina aspartová, serin nebo histidin.

11. GLP-1 sloučenina podle nároku 10, ve které Xaa₃₀ je kyselina glutamová.

12. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 8, ve které Xaa₈ je glycin nebo valin a Xaa₃₇ je histidin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, kyselina aspartová, kyselina glutamová, serin, treonin, arginin nebo lysin.

13. GLP-1 sloučenina podle nároku 12, ve které Xaa₃₇ je histidin.

14. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 8, ve které Xaa₈ je glycin nebo valin a Xaa₂₂ je kyselina aspartová, kyselina glutamová, glutamin, asparagin, lysin, arginin, cystein nebo cysteová kyselina.

15. GLP-1 sloučenina podle nároku 14, ve které Xaa₂₂ je kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin.

16. GLP-1 sloučenina podle nároku 15, ve které Xaa₂₂ je kyselina glutamová.

17. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 7, ve které Xaa₈ je glycin nebo valin, Xaa₂₂ je kyselina glutamová nebo lysin, a Xaa₂₃ je kyselina glutamová nebo lysin.

18. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 4 až 7, ve které Xaa₈ je glycin nebo valin, Xaa₂₂ je kyselina glutamová a Xaa₂₇ je alanin.

19. Glukagonu podobný peptid-1(GLP-1), který obsahuje na pozici 8 aminokyselinu jinou než alanin a na pozici 22 aminokyselinu jinou než glycin.

20. GLP-1 sloučenina podle nároku 19, která kromě aminokyselin na pozicích 8 a 22 má nejvýše 3 další aminokyseliny, které se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂ nebo jejich fragmentu.

21. GLP-1 sloučenina podle nároku 20, která kromě aminokyselin na pozicích 8 a 22 má ne více než 2

aminokyselin, které se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂ nebo v jejich fragmentu.

22. GLP-1 sloučenina podle nároku 21, která má kromě aminokyselin na pozicích 8 a 22 nejvýše 1 další aminokyselinu, která se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂ nebo v jejich fragmentu.

23. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 20 až 22, ve které aminokyseliny, které se liší od odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂ nebo v jejich fragmentu, jsou konzervativními substitucemi odpovídajících aminokyselin v GLP-1(7-37)OH, GLP-1(7-36)NH₂ nebo v jejich fragmentu.

24. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, přičemž postranní řetězec aminokyseliny na pozici 22 obsahuje nejméně dva uhlíkové atomy a polární nebo polarizovanou funkční skupinu.

25. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, kde:

a) aminokyselinou na pozici B je glycin, valin, leucin, isoleucin, metionin, serin, treonin, cystein, kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin, arginin, asparagin, glutamin, fenylalanin, tyrosin, histidin nebo tryptofan; a

b) aminokyselinou na pozici 22 je kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin, arginin, asparagin, glutamin nebo histidin.

26. Peptid-1 (GLP-1) podobný glukagonu podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, ve kterém aminokyselina na pozici 22 obsahuje lineární nebo rozvětvený alkylový postranní řetězec, který má dva až šest uhlíkových atomů, substituovaný polarizovanou funkční skupinou.

27. GLP-1 sloučenina podle nároku 26, ve které aminokyselinou na pozici 22 je kyselina aspartová, kyselina glutamová, lysin nebo arginin.

28. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, ve které aminokyselinou na pozici 8 je glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin nebo metionin.

29. GLP-1 sloučenina podle nároku 28, ve které aminokyselinou na pozici 8 je glycin nebo valin.

30. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 19 až 23, která má na pozici 22 aminokyselinu s postranním řetězcem, který je substituován sulfonovou skupinou.

31. GLP-1 sloučenina podle nároku 29, ve které aminokyselinou s postranním řetězcem je kyselina cysteová a aminokyselinou na pozici 8 není alanin.

32. GLP-1 sloučenina obsahující sekvenci aminokyselin
SEQ ID NO: 4:

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

(SEQ ID NO: 4)

kde:

Xaa7 je L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β -hydroxyhistidin, homohistidin, α -fluor-metyl-histidin a α -methylhistidin;

Xaa8 je glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin nebo treonin;

Xaa22 je kyselina aspartová, kyselina glutamová, glutamin, asparagin, lysin, arginin, cystein nebo cysteová kyselina; a

R je NH_2 nebo Gly(OH).

33. GLP-1 sloučenina podle nároku 32, přičemž Xaa8 je glycin, valin, leucin, isoleucin, serin nebo treonin.

34. GLP-1 sloučenina podle nároku 33, přičemž Xaa22 je lysin, kyselina aspartová, kyselina glutamová nebo arginin.

35. GLP-1 sloučenina podle nároku 34, přičemž Xaa7 je L-histidin, Xaa8 je glycin nebo valin a R je Gly(OH).

36. GLP-1 sloučenina podle nároku 34, přičemž GLP-1 sloučenina je vybrána ze souboru, do kterého patří:

- a) Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 5);
- b) Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 6);
- c) Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 7); a
- d) Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 8).

37. GLP-1 sloučenina podle nároku 34, přičemž GLP-1 sloučenina je vybrána ze souboru, do kterého patří:

- a) Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 9);
- b) Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 10);
- c) Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 11); a
- d) Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 12)

38. GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1-37, přičemž uvedená GLP-1 sloučenina je v komplexu s dvojmocným kationtem kovu.

39. GLP-1 sloučenina podle nároku 38, přičemž uvedená GLP-1 sloučenina je v komplexu s dvojmocným kationtem zinku.

40. Způsob stimulace GLP-1 receptoru u subjektu, který takovou stimulaci potřebuje, přičemž uvedený způsob zahrnuje krok, ve kterém se subjektu podává účinné množství GLP-1 sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1-39.

41. Způsob podle nároku 40, přičemž subjekt se léčí na inzulinově-nezávislý diabetes.

42. Způsob podle nároku 41, přičemž subjekt se léčí profylakticky na inzulinově nezávislý diabetes.

43. Způsob podle nároku 90, přičemž subjekt se léčí na obezitu, mrtvici, infarkt myokardu, katabolické pooperační změny nebo syndrom dráždivého střeva.

44. Použití GLP-1 sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 39 k přípravě farmaceutického prostředku pro léčení inzulinově nezávislého diabetu.

45. Použití GLP-1 sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 39 k přípravě farmaceutického prostředku pro léčení obezity, infarktu myokardu, katabolických pooperačních změn nebo syndromu dráždivého střeva.

10.02.03

PV 2002 - 40PP

1/4

Obr. 1

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

Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH

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

Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH

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

Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH

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

Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH

10.02.03

PV 2002 - 4088

2/4

Obr. 2

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

Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH

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

Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH

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

Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH

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

Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH

10.02.03

PV 2002 - 4088

3/4

Obr. 3

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

Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH

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

Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH

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

Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH

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

Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH

10.02.03

PV 2002-40PP

4/4

Obr. 4

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

Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH

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

Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH