



(12) PATENT

(11) 343825

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 47/60 (2017.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20061722	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.09.17 PCT/DK2004/00624
(22)	Inng.dag	2006.04.19	(85)	Videreføringsdag	2006.04.19
(24)	Løpedag	2004.09.17	(30)	Prioritet	2003.09.19, DK, 2003 01367 2003.12.04, DK, 2003 01789 2003.09.25, US, 60/505,739 2003.12.04, US, 60/526,847
(41)	Alm.tilgj	2006.06.12			
(45)	Meddelt	2019.06.17			
(73)	Innehaver	Novo Nordisk A/S, Postboks 3000, 2880 BAGSVÆRD, Danmark			
(72)	Oppfinner	Nils Langeland Johansen, Niels W Gades gade 45, 2100 KØBENHAVN, Danmark Kjeld Madsen, Ny Vestergårdsvej 3, 3500 VÆRLØSE, Danmark Thomas Kruse Hansen, Tibbevangen 78, 2730 HERLEV, Danmark Florencio Zaragoza Dörwald, Højagerparken 30, 1, 2750 BALLERUP, Danmark Paw Bloch, Solbærhegnet 2, 2630 TÅSTRUP, Danmark Jesper Lau, Rosenvænget 3, 3520 FARUM, Danmark			
(74)	Fullmektig	ONSAGERS AS, Postboks 1813, Vika, 0123 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	GLP-1-derivater og farmasøytisk sammensetninger og medisinske anvendelser derav.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9943707 A1 WO 0104156 A1 SHEFFIELD W.P., "Modification of clearance of therapeutic and potentially therapeutic proteins", Current Drug Targets-Cardiovascular and Haematological Disorders, vol. 1, nr. 1, 2001, side 1-22 OSTROVSKII YU M., "Comparative characteristics of the hydrophobic nature of certain proteins by their interaction with 2-p toluidino naphthalene-6-sulfonate", Ukrayins' Kyi Biokhimichnyi Zhurnal, vol. 47, nr. 6, 1975, side 701-707			
(57)	Sammendrag				

Nye polypeptidderivater med forlenget virkningsprofil.

Den foreliggende oppfinnelsen angår nye derivater av glukagonlignende peptid-1 (GLP-1) med forlenget virkningsprofil og anvendelse av dem som et medikament. Heri beskrives videre nye derivater av eksendin og bruken av slike derivater.

5 Peptider har bred anvendelse innenfor den medisinske praksis, og ettersom de kan fremstilles ved rekombinant DNA-teknologi, er det forventet at de stadig vil bli viktigere i de kommende år. Når naturlige peptider og analoger av disse brukes i terapi, vil man vanligvis finne at de fjernes relativt rask. Rask fjerning av et terapeutisk middel er uhensiktsmessig og ufordelaktig i de tilfeller hvor det er ønskelig å opprettholde et høyt blodnivå med hensyn til nevnte middel over et
10 lengre tidsrom, ettersom det da vil være nødvendig med flere gjentatte administreringer. Eksempler på peptider med rask fjerning er følgende: ACTH, kortikotropinfrigjørende faktor, angiotensin, kalsitonin, insulin, glukagon, glukagonlignende peptid-1, glukagonlignende peptid-2, insulinlignende vekstfaktor-1, insulinlignende vekstfaktor-2, gastrisk hemmende peptid,
15 veksthormonfrigjørende faktor, hypofyseadenylatsyklaseaktiverende peptid, sekretin, enterogastrin, somatostatin, somatropin, somatomedin, paratyroid hormon, trombopoietin, erytropoietin, hypotalamisk frigjørende faktorer, prolaktin, tyroidstimulerende hormoner, endorfiner, enkefaliner, vasopressin, oksytocin, opioider og deres analoger, superoksiddismutase, interferon, asparaginase, arginase,
20 arginindeaminase, adenosindeaminase og ribonuklease. I enkelte tilfeller er det mulig å påvirke peptidenes frigjøringsprofil ved å anvende egnede farmasøytiske sammensetninger, men denne fremgangsmåten har forskjellige ulemper og er generelt ikke anvendbar.

Antall kjente endogene peptider og proteiner med interessante biologiske aktiviteter
25 øker svært raskt, også som et resultat av den pågående undersøkelsen av det humane genom. På grunn av deres biologiske aktiviteter, kan mange av disse polypeptidene i prinsippet brukes som terapeutiske midler. Endogene peptider er imidlertid ikke alltid egnet som medikamentkandidater, ettersom slike peptider ofte har halvliv på et par minutter på grunn av rask nedbrytning av peptidaser og/eller på grunn av
30 nyrefiltrering og utskillelse i urinen. Polypeptidenes halvliv i humant plasma varierer meget sterkt (fra et par minutter til mer enn en uke). På lignende måte er også halvlivet til småmolekylmedikamenter meget variabelt. Denne sterke variabiliteten i plasmahalvlivene for peptider, proteiner og andre forbindelser er imidlertid ikke særlig godt forstått. Det er således et behov for å kunne modifisere
35 terapeutiske forbindelser slik at disse får lengre virkningstid in vivo samtidig som det opprettholdes lav toksitet og terapeutiske fordeler.

Serumalbumin har et halvliv på mer enn en uke, og en fremgangsmåte for å øke plasmahalvlivet for peptider har vært å derivatisere peptidene med en kjemisk gruppe eller enhet som binder seg til serumalbumin.

Knudsen et al. (*J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1664-1669) har vist at acylerte GLP-1-peptider har høy reseptorstyrke og en ti gangers økning av plasmahalvlivet i svin.

- 5 Zobel et al. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1513-1515) har vist at plasmahalvlivet for et antikoagulerende peptid i kaniner økte med 10-50 ganger ved derivatisering av aminotermius med fosfaterbaserte små molekyler som binder seg til serumalbumin.

WO 9943707 A1 beskriver N-terminal modifiserte derivater av human GLP-1 og analoger derav til bruk i behandling av overvekt og diabetes.

- 10 WO 0104156 A1 beskriver peptidkonjugater med øket stabilitet og bruk av disse in behandling av overflødig nivå av blodglukose.

Sheffield (*Current Drug Targets - Cardiovascular and Haematological Disorders* **2001**, *1*, 1-22) beskriver terapeutiske proteiner som har blitt modifisert kjemisk ved kovalent tilføyning av PEG eller dextrankjeder eller ved kryssbinding til andre proteiner med det formål å forlenge halveringstiden.

- 15 Ostrovskii (Ukrayins`Kyj Biokhimichniy Zhurnal **1975**, *47*(6), 701-707) beskriver at de hydrofobe egenskapene til proteiner karakteriseres av graden av at 2-p-toluidino-naftalen-6-sulfonat-affiniteten.

Heri beskrives en forbindelse som omfatter et terapeutisk polypeptid forbundet med en albuminbindende rest via en hydrofil avstandsgruppe.

- 20 Heri beskrives også en forbindelse som omfatter et terapeutisk polypeptid forbundet med en albuminbindende rest via en hydrofil avstandsgruppe som skiller polypeptidet og den albuminbindende resten med en kjemisk gruppe som omfatter minst 5 ikke-hydrogenatomer hvor 30-50% av disse atomene er enten N eller O.

- 25 I en utførelse er avstandsgruppen definert som $-(CH_2)_lD[(CH_2)_nE]_m(CH_2)_pQ_q-$ hvor

l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-Z-(CH_2)_lD[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$,

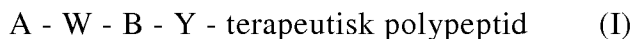
q er et helt tall fra 0 til 5,

- 30 hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-O-$, $-NR^3-$, $-N(COR^4)-$, $-PR^5(O)-$, og $-P(OR^6)(O)-$ hvor R^3 , R^4 , R^5 og R^6 uavhengig av hverandre representerer hydrogen eller C_{1-6} -alkyl,

Z er valgt fra $-C(O)NH-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-OC(O)NH-$, $-C(O)NHCH_2CH_2-$, $-C(O)CH_2-$, $-C(O)CH=CH-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$ eller $-NHC(O)-$ hvor s er 0 eller 1

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller formedikament av denne.

Den foreliggende oppfinnelsen angår en forbindelse med formel (I).



5 Hvor nevnte polypeptid er et GLP-1-peptid omfattende aminosyresekvensen med formel (V):

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈

Formel (V) (SEQ ID No: 3)

Hvor

10 Xaa₇ er L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β-hydroksyhistidin, homohistidin, Nα-acetylhistidin, α-fluormetylhistidin, α-metylhistidin, 3-pyridylalanin, 2-pyridylalanin eller 4-pyridylalanin;

15 Xaa₈ er Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, (1-aminocyclopropyl)-karboksylsyre, (1-aminocyclobutyl)-karboksylsyre, (1-aminocyclopentyl)-karboksylsyre, (1-aminocyclohexyl)-karboksylsyre, (1-aminocycloheptyl)-karboksylsyre, eller (1-aminocyclooctyl)-karboksylsyre;

Xaa₁₈ er Ser, Lys eller Arg;

Xaa₂₂ er Gly, Glu eller Aib;

Xaa₂₃ er Gln, Glu, Lys eller Arg;

20 Xaa₂₆ er Lys, Glu eller Arg;

Xaa₃₀ er Ala, Glu eller Arg;

Xaa₃₄ er Lys, Glu eller Arg;

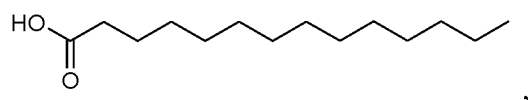
Xaa₃₅ er Gly eller Aib;

Xaa₃₆ er Arg eller Lys;

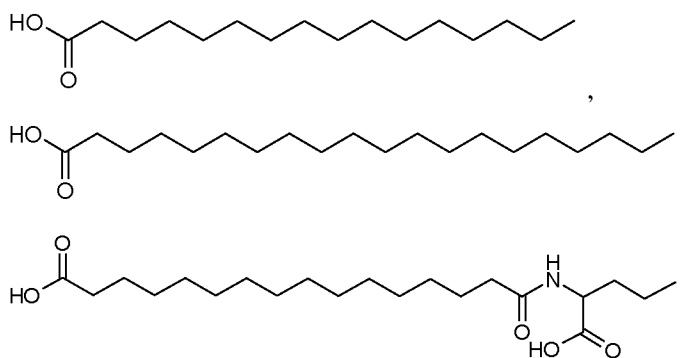
25 Xaa₃₇ er Gly, Ala, Glu eller Lys;

Xaa₃₈ er Lys, amid eller er fraværende

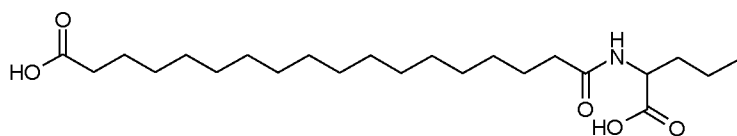
A er en albumbindende rest valg fra gruppen bestående av



4

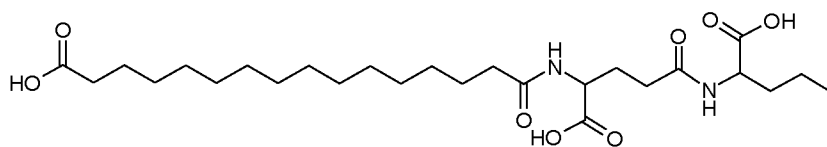


hvor det kirale karbonatomet enten er R eller S,



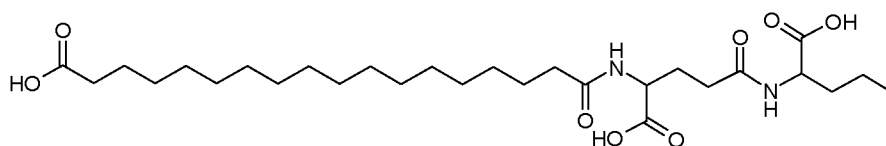
5

hvor det kirale karbonatomet enten er R eller S,

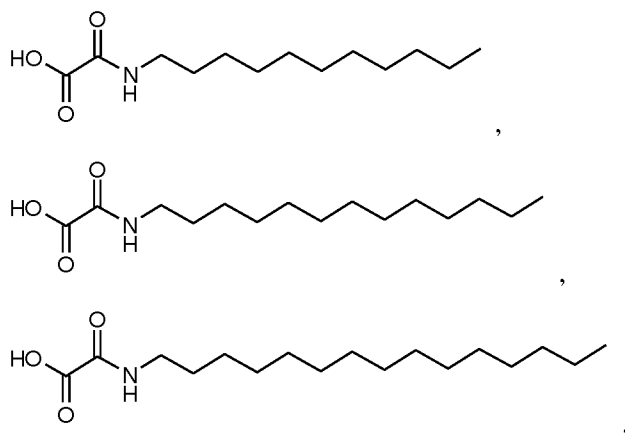


hvor de to kirale karbonatomene enten er R eller S,

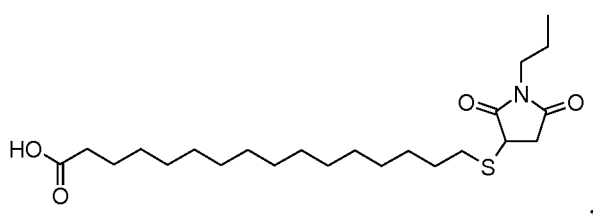
10



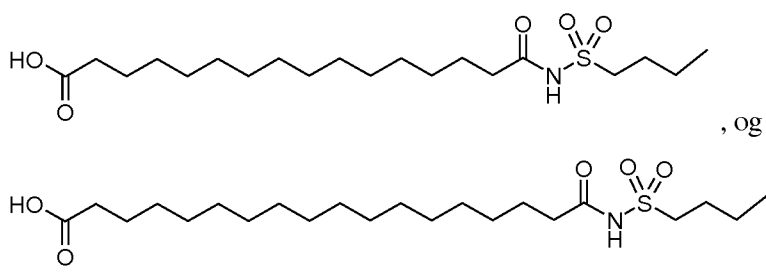
hvor de to kirale karbonatomene enten er R eller S,



15

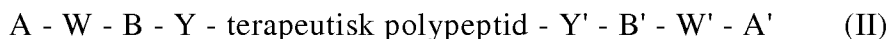


5



B er $-(\text{CH}_2)_l\text{-O-}[(\text{CH}_2)_n\text{-O}]_m\text{-(CH}_2)_p\text{-[C(O)NH-(CH}_2)_l\text{-O-}[(\text{CH}_2)_n\text{-O}]_m\text{-(CH}_2)_p\text{]}_q\text{-}$,
 hvor l, m, n, og p uavhengig er 1-5, og q er 0-5;

- 5 Y er en kjemisk gruppe som forbinder B og det terapeutiske middelet, valgt fra gruppen bestående av $-\text{C(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{NHC(O)-}$, $-\text{OC(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)O-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{NHC(O)-}$, $-\text{C(O)CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)CH=CH-}$, $-\text{CH=CHC(O)-}$, $-(\text{CH}_2)_s\text{-}$, $-\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)O-}$, $-\text{OC(O)-}$, $-\text{NHC(O)-}$ and $-\text{C(O)NH-}$, hvori s is 0 eller 1; og
- 10 W er en kjemisk gruppe som forbinder A og B, valgt fra gruppen bestående av $-\text{C(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{NHC(O)-}$, $-\text{OC(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)O-}$, $-\text{C(O)CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)CH=CH-}$, $-\text{CH=CHC(O)-}$, $-(\text{CH}_2)_s\text{-}$, $-\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)O-}$, $-\text{OC(O)-}$, $-\text{NHC(O)-}$ og $-\text{C(O)NH-}$, hvori s er 0 eller 1;
- eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller forløpermedikament derav.
- 15 Heri beskrives også en forbindelse med formel (II)



hvor

A og A' er albuminbindende rester,

B og B' er hydrofile avstandsgrupper uavhengig av hverandre valgt fra

- 20 $-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q\text{-}$ hvor

l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-\text{Z-}(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p\text{-}$,

q er et helt tall fra 0 til 5,

- 25 hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-\text{O-}$, $-\text{NR}^3\text{-}$, $-\text{N(COR}^4\text{)-}$, $-\text{PR}^5(\text{O)-}$, og $-\text{P(OR}^6\text{)(O)-}$ hvor R^3 , R^4 , R^5 og R^6 uavhengig av hverandre representerer hydrogen eller C_{1-6} -alkyl,

Z er valgt fra $-\text{C(O)NH-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $-\text{OC(O)NH-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{C(O)CH}_2\text{-}$, $-\text{C(O)CH=CH-}$, $-(\text{CH}_2)_s\text{-}$, $-\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)O-}$ eller $-\text{NHC(O)-}$ hvor s er 0 eller 1,

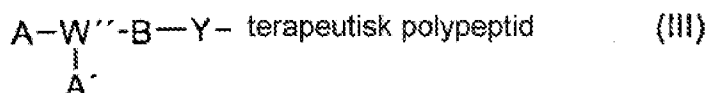
Y er en kjemisk gruppe som forbinder B og det terapeutiske middelet, og

Y' er en kjemisk gruppe som forbinder B' og det terapeutiske middelet, og

W er en kjemisk gruppe som forbinder A og B, og

W' er en kjemisk gruppe som forbinder A' og B'.

- 5 I et annet aspekt beskrives heri en forbindelse med formel (III)



hvor

A og A' er albuminbindende rester,

- 10 B er hydrofil en avstandsgruppe uavhengig valgt fra $-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$ hvor

l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$,

q er et helt tall fra 0 til 5,

- 15 hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-\text{O}-$, $-\text{NR}^3-$, $-\text{N}(\text{COR}^4)-$, $-\text{PR}^5(\text{O})-$, og $-\text{P}(\text{OR}^6)(\text{O})-$ hvor R^3 , R^4 , R^5 og R^6 uavhengig av hverandre representerer hydrogen eller C_{1-6} -alkyl,

Z er valgt fra $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_s-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ eller $-\text{NHC}(\text{O})-$ hvor s er 0 eller 1,

20

Y er en kjemisk gruppe som forbinder B og det terapeutiske middelet, og

W'' er en kjemisk gruppe som forbinder B med A og A'.

Heri beskrives en forbindelse som omfatter en hydrofil avstandsgruppe mellom et terapeutisk peptid og en eller flere albuminbindende rester og hvor nevnte

- 25 forbindelse har forlenget virkningsprofil i forhold til terapeutiske polypeptidet, og hvor den albuminbindende delen så vel som den frie delen av nevnte forbindelse begge er i stand til å binde seg til denne reseptoren som styrer effekten av det terapeutiske polypeptidet.

- 30 I en utførelse er den hydrofile avstandsgruppen en ugrenet oligoetylenglykolgruppe med passende funksjonelle grupper i begge terminalene og som danner en bro

mellom en aminogruppe i det terapeutiske polypeptidet og en funksjonell gruppe i den albuminbindende resten.

I et annet aspekt er det terapeutiske polypeptidet et GLP-1-peptid.

DEFINISJONER

I den foreliggende beskrivelsen har de anvendte begreper de definisjoner som er angitt i det etterfølgende.

5 Begrepet "albuminbindende rest" slik det brukes her, betyr en rest som ikke-kovalent binder seg til humant serumalbumin. Den albuminbindende resten som er knyttet til det terapeutiske polypeptidet har typisk en affinitet under 10 μ M til humant serumalbumin og fortrinnsvis under 1 μ M. Det er kjent en rekke albuminbindende rester så som lineære og grenede lipofile grupper med 4-40 karbonatomer, forbindelser med et syklopentanfenantrenskjelett, peptider med 10-10 30 aminosyrerester, osv.

Begrepet "hydrofil avstandsgruppe" slik det brukes her, betyr en avstandsgruppe som skiller et peptid og en albuminbindende rest med en kjemisk gruppe som omfatter minst 5 ikke-hydrogenatomer hvor 30-50% av disse enten er N eller O.

15 Begrepet "terapeutisk polypeptid" slik det brukes her, betyr et polypeptid som er blitt utviklet for terapeutisk bruk.

Begrepene "polypeptid" og "peptid" slik de brukes her, betyr en forbindelse som er sammensatt av minst fem sammenhengende aminosyrer forbundet med peptidbindinger. De bestående aminosyrer kan være fra gruppen av aminosyrer som kodes av den genetiske koden og de kan være naturlige aminosyrer som ikke kodes 20 av den genetiske koden, så vel som syntetiske aminosyrer. Naturlige aminosyrer som ikke kodes av den genetiske koden er for eksempel hydroksyprolin, γ -karboksylglutamat, ornitin, fosfoserin, D-alanin og D-glutamin. Syntetiske aminosyrer omfatter aminosyrer som er fremstilt ved kjemisk syntese, for eksempel D-isomerer av de aminosyrene som kodes av den genetiske koden så som D-alanin 25 og D-leukin, Aib (α -aminoisosmørsyre), Abu (α -aminosmørsyre), Tle (tert-butylglysin), β -alanin, 3-aminometylbenzosyre og antranilinsyre.

Begrepet "analog" slik det brukes her, betyr et modifisert peptid hvor en eller flere aminosyrerester i peptidet er blitt erstattet med andre aminosyrerester og/eller hvor en eller flere aminosyrerester er blitt fjernet fra peptidet og/eller hvor en eller flere 30 aminosyrerester er blitt fjernet fra peptidet og/eller hvor en eller flere aminosyrerester er blitt tillagt peptidet. Slik tillegging eller fjerning av aminosyrerester kan finne sted ved N-terminalen i peptidet og/eller ved peptidets C-terminal. Det brukes et enkelt system for å beskrive analoger: For eksempel [Arg³⁴]GLP-1(7-37)Lys betegner en GLP-1-analog hvor det naturlig forekommende lysinet i posisjon 34 er blitt erstattet med arginin og en lysinrest er blitt tillagt ved 35 C-terminalen (posisjon 38). Formler for peptidanaloger og derivater av disse tegnes ved å bruke den enkeltbokstavsforkortelsen for aminosyrer som anvendt i IUPAC-IUB-nomenklaturen.

Begrepet "derivat" slik det brukes her i forhold til et peptid, betyr et kjemisk modifisert peptid eller en analog av dette hvor minst én substituent ikke er tilstede i det umodifiserte peptidet eller en analog av dette, det vil si et peptid som er kovalent modifisert. Typiske modifikasjoner er amider, karbohydrater, alkylgrupper, acylgrupper, estere og lignende. Et eksempel på et derivat av GLP-1(7-37) er N^{ε26}-(γ-Glu(N^α-heksadekanoyl))-[Arg³⁴, Lys²⁶]GLP-1(7-37).

Begrepet "GLP-1-peptid" slik det brukes her, betyr GLP-1(7-37) (SEKV.ID. NR. 1), en GLP-1-analog, et GLP-1-derivat eller et derivat av en GLP-1-analog. I en utførelse er GLP-1-peptidet et insulinotropisk middel.

Begrepet "insulinotropisk middel" slik det brukes her, betyr en forbindelse som er en agonist av den humane GLP-1-reseptoren, det vil si en forbindelse som stimulerer dannelsen av cAMP i et egnet medium som inneholder den humane GLP-1-reseptoren. Styrken på et insulinotropisk middel bestemmes ved å beregne EC₅₀-verdien fra en doseresponskurve slik det er beskrevet i det etterfølgende.

Rensede plasmamembraner fra en stabil transfektet cellelinje, BHK467-12A (tk-ts13), som uttrykker den humane GLP-1-reseptoren, ble stimulert med GLP-1 og peptidanaloger og styrken på cAMP-produksjonen ble målt ved å bruke AlphaScreenTM cAMP-prøvesettet fra Perkin Elmer Life Sciences.

En stabil transfektet cellelinje var blitt fremstilt ved NN og en klon med høy ekspresjon ble valgt ut for screening. Cellene ble dyrket ved 5% CO₂ i DMEM, 5% FCS, 1% Pen/Strep og 0,5 mg/ml G418.

Celler med omtrent 80% sammenflytning ble vasket 2 ganger med PBS og høstet med Versene, sentrifugert 5 minutter ved 1000 rpm hvorefter supernatanten ble fjernet. Alle de etterfølgende trinnene ble utført på is. Cellepelletten ble homogenisert ved hjelp av Ultrathurax i 20-30 sekunder i 10 ml buffer 1 (20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH = 7,4), sentrifugert i 15 minutter ved 20000 rpm hvorefter pelletten på nytt ble suspendert i 10 ml buffer 2 (20 mM Na-HEPES, 0,1 mM EDTA, pH = 7,4). Suspensjonen ble homogenisert i 20-30 sekunder og så sentrifugert i 15 minutter ved 20000 rpm. Suspenderingen i buffer 2, homogeniseringen og sentrifugeringen ble gjentatt en gang, hvorefter membranene på nytt ble suspendert i buffer 2 og gjort ferdig for ytterligere analyse eller lagret ved -80°C.

Den funksjonelle reseptorprøven ble utført ved å måle den peptidinduserte cAMP-produksjonen ved hjelp av AlphaScreen-teknologien. Det grunnleggende prinsippet i AlphaScreen-teknologien er en konkurranse mellom endogent cAMP og eksogent tilsatt biotin-cAMP. Innfangningen av cAMP utføres ved å bruke et spesifikt antistoff som er konjugert til akseptorperler. Dannet cAMP ble telt og målt ved hjelp av en

AlphaFusion mikroplateanalysator. EC₅₀-verdiene ble beregnet ved å bruke dataprogrammet Graph-Pad Prism.

Begrepet "GLP-2-peptid" slik det brukes her, betyr GLP-2(1-33), en GLP-2-analog, et GLP-2-derivat eller et derivat av en GLP-2-analog.

- 5 Begrepet "eksendin-4-peptid" slik det brukes her, betyr eksendin-4(1-39), en eksendin-4-analog, et eksendin-4-derivat eller et derivat av en eksendin-4-analog. I en utførelse er eksendin-4-peptidet et insulinotropisk middel.

- 10 Begrepene "stabilt eksendin-4-peptid" og "stabile GLP-1-peptider" slik de brukes her, betyr kjemisk modifiserte peptider som er avledet fra eksendin-4(1-39) eller GLP-1(7-37), det vil si en analog eller et derivat som har et in vivo plasmaelimineringshalvliv på minst 10 timer i mennesker, slik dette kan bestemmes ved hjelp av den etterfølgende fremgangsmåten. Fremgangsmåten for bestemmelse av plasmaelimineringshalvlivet for et eksendin-4-peptid eller et GLP-1-peptid i mennesker er som følger: Peptidet ble løst i en isoton buffer, pH 7,4, PBS eller
15 enhver annen egnet buffer. Dosen injiseres perifert, fortrinnsvis i buken eller øverst på låret. Blodprøver for bestemmelse av aktivt peptid tas med jevne mellomrom og med tilstrekkelig langt tidsrom til også å dekke den avsluttende elimineringsdelen (for eksempel predose 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 (dag 2), 36 (dag 2), 48 (dag 3), 60 (dag 3), 72 (dag 4) og 84 (dag 4) timer etter dosering). Bestemmelse av
20 konsentrasjonen av aktivt peptid ble utført som beskrevet i Wilken et al., Diabetologia 43(51): A143, 2000. Deriverte farmakokinetiske parametere ble beregnet ut fra konsentrasjons-tidsdata for hver enkelt pasient ved å bruke ikke-kompartementale fremgangsmåter og ved å bruke det kommersielt tilgjengelige programmet WinNonlin versjon 2.1 (Pharsight, Cary, NC, USA). Den terminale elimineringshastighetskonstanten ble beregnet ved en log-lineær regresjon av den terminale log-lineære delen av konsentrasjons-tidskurven og ble så brukt for å beregne elimineringshalvlivet.

- 30 Begrepet "DPP-IV-beskyttet" slik det brukes her, refererer seg til et polypeptid som er blitt kjemisk modifisert for å gjøre nevnte forbindelse resistent for plasmapeptidasedipeptidylaminopeptidase-4 (DPP-IV). DPP-IV-enzymet i plasma er kjent for å gå inn i nedbrytningen av flere peptidhormoner, for eksempel GLP-1, GLP-2, eksendin-4, osv. Det er således gjort betydelige anstrengelser for å utvikle analoger og derivater og polypeptider som er følsomme for en DPP-IV-kontrollert eller -styrt hydrolyse for å redusere nedbrytningshastigheten som skyldes DPP-IV.

- 35 Et peptids resistens mot nedbrytning av dipeptidylaminopeptidase IV kan bestemmes ved hjelp av den følgende nedbrytningsprøven:

Porsjoner av peptidene blir innkubert ved 37°C med en porsjon av rensset dipeptidylaminopeptidase IV i 4-22 timer i en passende buffer ved pH 7-8 (bufferen

er ikke albumin). De enzymatiske reaksjonene avsluttes ved å tilsette trifluoreddiksyre og peptidnedbrytningsproduktene blir skilt ut og kvantifisert ved å bruke HPLC- eller LC-MS-analyse. En fremgangsmåte for å gjennomføre denne analysen er som følger: Blandingene ble påsatt en Zorbax 300SB-C18-kolonne (30
 5 nm porer, 5 µm partikler) 150 x 2,1 mm og eluert med en strømhastighet på 0,5 ml/minutt med en lineær gradient av acetonitril i 0,1% trifluoreddiksyre (0%-100% acetonitril i løpet av 30 minutter). Peptidene og deres nedbrytningsprodukter kan kontrolleres ved deres absorpsjon ved 214 nm (peptidbindinger) eller 280 nm (aromatiske aminosyrer) og kan kvantifiseres ved integrering av deres topparealer.
 10 Nedbrytningsmønsteret kan bestemmes ved å bruke LC-MS hvor MS-spektraene for den utskilte toppen kan bestemmes. Prosentsatsen intakte/nedbrutte forbindelser på et gitt tidspunkt kan så brukes for å bedømme peptidenes DPPIV-stabilitet.

Et peptid er definert som DPPIV-stabilisert når det er 10 ganger mer stabilt enn det naturlige peptidet, basert på prosenten av intakte forbindelser på et gitt tidspunkt.
 15 En DPPIV-stabilisert GLP-1-forbindelse er således minst 10 ganger mer stabil enn GLP-1(7-37).

Begrepet "C₁₋₆-alkyl" slik det brukes her, betyr en mettet, grenet, rett eller syklisk hydrokarbongruppe med fra 1 til 6 karbonatomer. Representative eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, butyl,
 20 isobutyl, *sec*-butyl, *tert*-butyl, n-pentyl, isopentyl, neopentyl, *tert*-pentyl, n-heksyl, isoheksyl, sykloheksan og lignende.

Heri beskrives en forbindelse som omfatter et terapeutisk polypeptid forbundet med en albuminbindende rest via en hydrofil avstandsgruppe.

Heri beskrives også en forbindelse som omfatter et terapeutisk polypeptid forbundet
 25 med en albuminbindende rest via en hydrofil avstandsgruppe som skiller polypeptidet og den albuminbindende resten med en kjemisk gruppe som omfatter minst 5 ikke-hydrogenatomer hvorfra 30-50% av disse atomene er enten N eller O.

I en utførelse er romgruppen definert som
 $-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$ hvor

30 l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$,

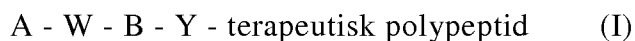
q er et helt tall fra 0 til 5,

hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-\text{O}-$, $-\text{NR}^3-$, $-\text{N}(\text{COR}^4)-$, $-\text{PR}^5(\text{O})-$, og $-\text{P}(\text{OR}^6)(\text{O})-$ hvor R³, R⁴, R⁵ og R⁶ uavhengig av hverandre
 35 representerer hydrogen eller C₁₋₆-alkyl,

Z er valgt fra $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_s-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ eller $-\text{NHC}(\text{O})-$ hvor s er 0 eller 1

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller forløpermedikament av denne.

- 5 Heri beskrives også en forbindelse som har formel (I):



hvor

A er en albumbindende rest,

B er en hydrofil avstandsgruppe med formel $-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$ hvor

- 10 l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$,

q er et helt tall fra 0 til 5,

hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-\text{O}-$, $-\text{NR}^3-$, $-\text{N}(\text{COR}^4)-$, $-\text{PR}^5(\text{O})-$, og $-\text{P}(\text{OR}^6)(\text{O})-$ hvor R^3 , R^4 , R^5 og R^6 uavhengig av hverandre representerer hydrogen eller C_{1-6} -alkyl,

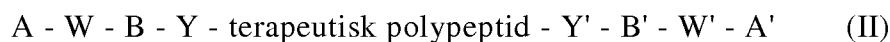
- 15

Z er valgt fra $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_s-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ eller $-\text{NHC}(\text{O})-$ hvor s er 0 eller 1,

Y er en kjemisk gruppe som forbinder B og det terapeutiske middelet, og

- 20 W er en kjemisk gruppe som forbinder A og B.

Heri beskrives også en forbindelse med formel (II)



hvor

A og A' er albuminbindende rester,

- 25 B og B' er hydrofile avstandsgrupper uavhengig av hverandre valgt fra $-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$ hvor

l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$,

q er et helt tall fra 0 til 5,

hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-O-$, $-NR^3-$, $-N(COR^4)-$, $-PR^5(O)-$, og $-P(OR^6)(O)-$ hvor R^3 , R^4 , R^5 og R^6 uavhengig av hverandre representerer hydrogen eller C_{1-6} -alkyl,

- 5 Z er valgt fra $-C(O)NH-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-OC(O)NH-$, $-C(O)NHCH_2CH_2-$, $-C(O)CH_2-$, $-C(O)CH=CH-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$ eller $-NHC(O)-$ hvor s er 0 eller 1,

Y er en kjemisk gruppe som forbinder B og det terapeutiske middelet, og

Y' er en kjemisk gruppe som forbinder B' og det terapeutiske middelet, og

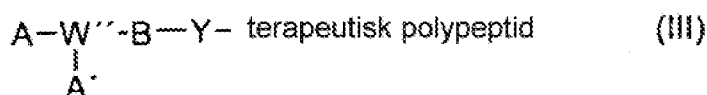
W er en kjemisk gruppe som forbinder A og B, og

- 10 W' er en kjemisk gruppe som forbinder A' og B'.

- I en utførelse er Y' valgt fra gruppen bestående av $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)NHCH_2-$, $CH_2NHC(O)-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(I)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$ og $-C(O)NH-$ hvor s er 0 eller 1.
- 15

I en ytterligere utførelse er W' valgt fra gruppen bestående av $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$ og $-C(O)NH-$ hvor s er 0 eller 1.

- 20 Heri beskrives også en forbindelse med formel (III)



hvor

A og A' er albuminbindende rester,

- 25 B er hydrofil en avstandsgruppe uavhengig valgt fra $-(CH_2)_lD[(CH_2)_nE]_m(CH_2)_pQ_q-$ hvor

l, m og n uavhengig av hverandre er 1-20 og p er 0-10,

Q er $-Z-(CH_2)_lD[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$,

q er et helt tall fra 0 til 5,

hver D, E og G er uavhengig av hverandre valgt fra $-O-$, $-NR^3-$, $-N(COR^4)-$, $-PR^5(O)-$, og $-P(OR^6)(O)-$ hvor R^3 , R^4 , R^5 og R^6 uavhengig av hverandre representerer hydrogen eller C_{1-6} -alkyl,

- 5 Z er valgt fra $-C(O)NH-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-OC(O)NH-$, $-C(O)NHCH_2CH_2-$, $-C(O)CH_2-$, $-C(O)CH=CH-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$ eller $-NHC(O)-$ hvor s er 0 eller 1,

Y er en kjemisk gruppe som forbinder B og det terapeutiske middelet, og

W" er en kjemisk gruppe som forbinder B med A og A'.

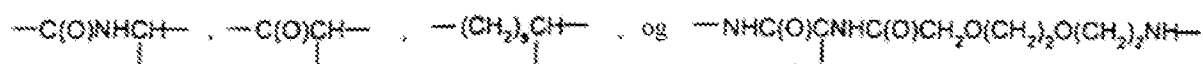
- 10 I et annet aspekt beskrives heri en forbindelse som omfatter en hydrofil romgruppe mellom et terapeutisk peptid og en eller flere albuminbindende rester hvor nevnte forbindelse har forlenget virkningsprofil i forhold til det terapeutiske polypeptidet og hvor den albuminbindende fraksjonen så vel som den frie fraksjonen av nevnte forbindelse begge er i stand til å binde seg til den reseptoren som styrer eller kontrollerer effekten av det terapeutiske polypeptidet.

- 15 I en utførelse er den hydrofile romgruppen en ugrenet oligoetylenglykolgruppe med passende funksjonelle grupper ved begge terminalene som danner en bro mellom en aminogruppe i det terapeutiske polypeptidet og en funksjonell gruppe i den albuminbindende resten.

- 20 I en utførelse er Y valgt fra gruppen bestående av $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)NHCH_2-$, $CH_2NHC(O)-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(I)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$ og $-C(O)NH-$ hvor s er 0 eller 1.

- 25 I en annen utførelse er W valgt fra gruppen bestående av $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_s-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)-$ og $-C(O)NH-$ hvor s er 0 eller 1.

I en annen utførelse er W" valgt fra gruppen bestående av



hvor s er 0, 1 eller 2.

- 30 I en annen utførelse er l 1 eller 2, n og m er uavhengig av hverandre 1-10 og p er 0-10.

I en annen utførelse er D $-O-$.

I en annen utførelse er E $-O-$.

I en ytterligere utførelse er den hydrofile romgruppen
 $-\text{CH}_2\text{O}[(\text{CH}_2)_2\text{O}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q^-$, hvor m er 1-10, p er 1-3 og Q er $-\text{Z}-$
 $\text{CH}_2\text{O}[(\text{CH}_2)_2]_m(\text{CH}_2)_p^-$.

I en annen utførelse er q 1.

5 I en annen utførelse er G $-\text{O}-$.

I en ytterligere utførelse er Z valgt fra gruppen bestående av
 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ og $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$.

I en ytterligere utførelse er q lik 0.

I en annen utførelse er l lik 2.

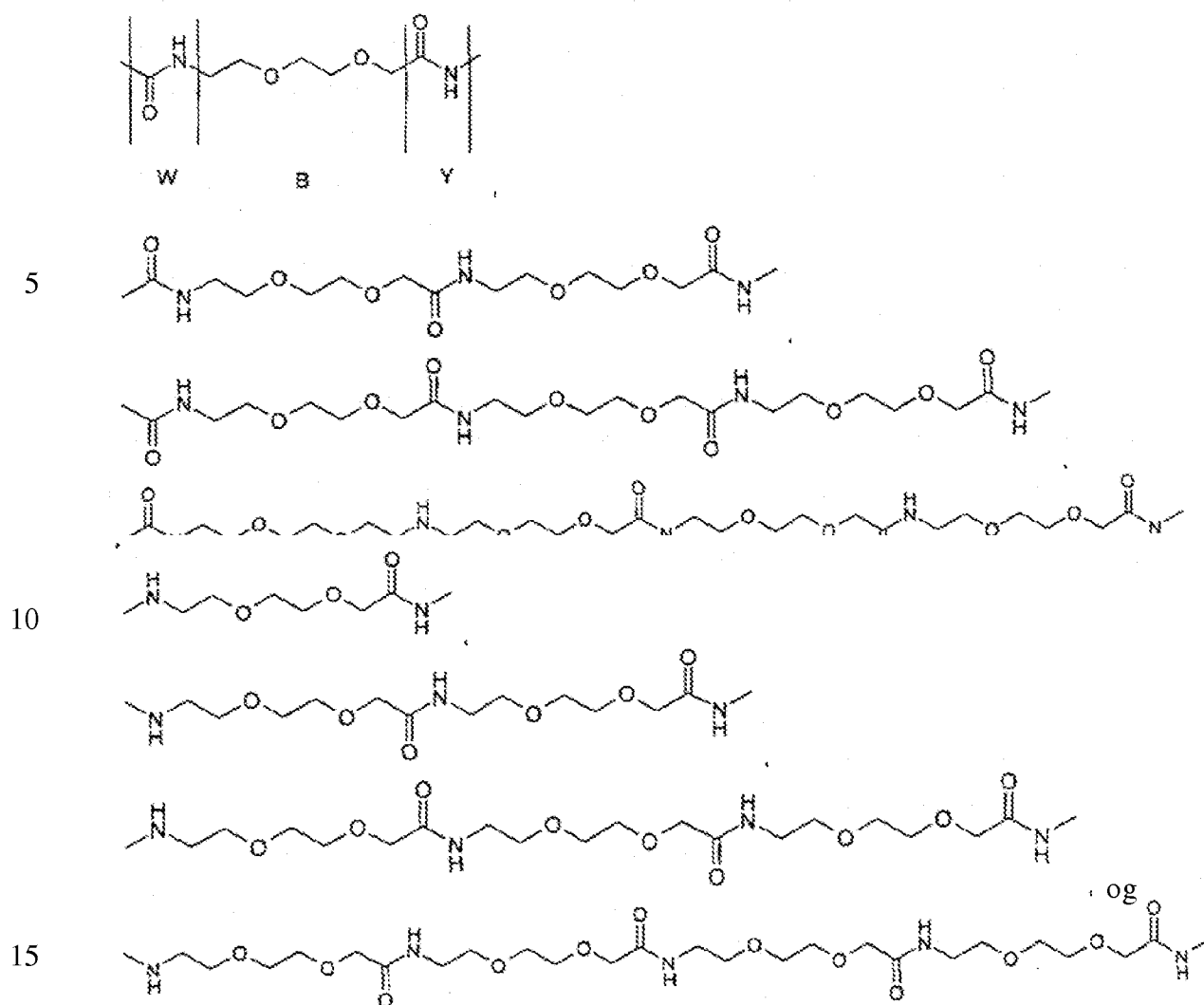
10 I en annen utførelse er n lik 2.

I nok en utførelse er den hydrofile romgruppen B $-\text{[CH}_2\text{CH}_2\text{O]}_{m+1}(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q^-$.

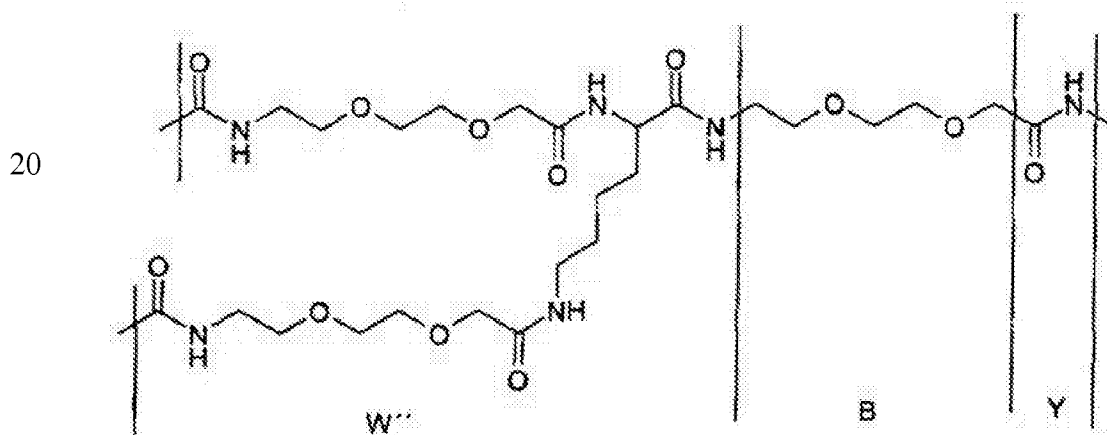
I nok en ytterligere utførelse er den hydrofile romgruppen B $-(\text{CH}_2)_l-\text{O}-[(\text{CH}_2)_n-\text{O}]_m-(\text{CH}_2)_p-\text{[C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_l-\text{O}-[(\text{CH}_2)_n-\text{O}]_m-(\text{CH}_2)_p]_q^-$, hvor l , m , n og p uavhengig av hverandre er 1-5 og q er 0-5.

15 I en ytterligere utførelse er $-\text{W}-\text{B}-\text{Y}-$ valgt fra gruppen bestående av

16



I en ytterligere utførelse er $>W''$ -B-Y

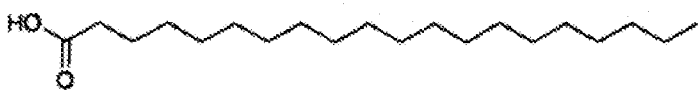


25 I nok en ytterligere utførelse er den albuminbindende resten A valgt fra gruppen bestående av

17



5



10



hvor det kirale karbonatomet er enten R eller S,

15

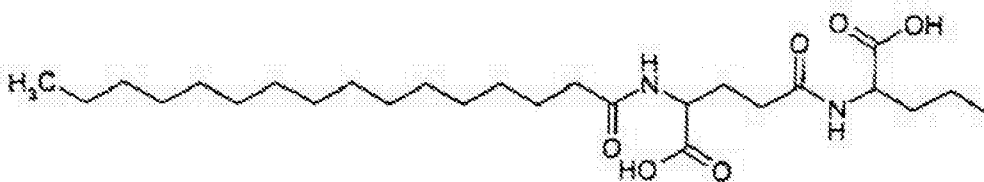


hvor det kirale karbonatomet er enten R eller S,

20

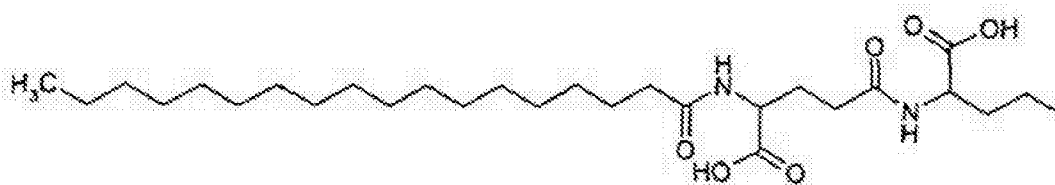


hvor det kirale karbonatomet er enten R eller S,



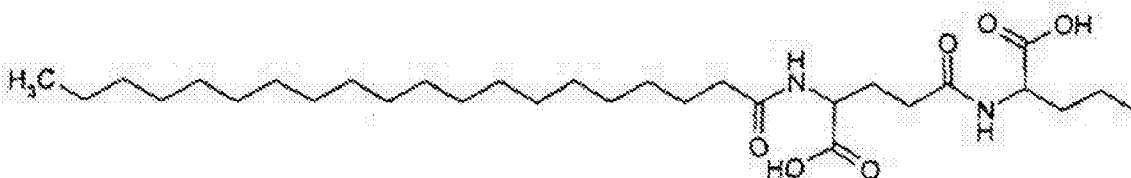
25 hvor de to kirale karbonatomene uafhængig af hverandre er enten R eller S,

18



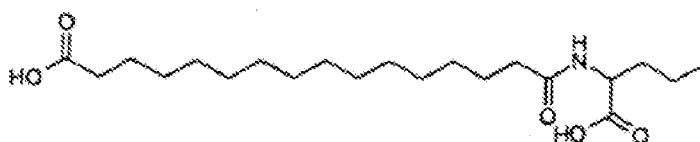
hvor de to kirale karbonatomene uavhengig av hverandre er enten R eller S,

5



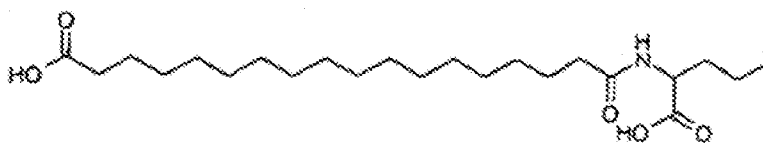
hvor de to kirale karbonatomene uavhengig av hverandre er enten L eller D,

10



hvor det kirale karbonatomet er enten R eller S,

15



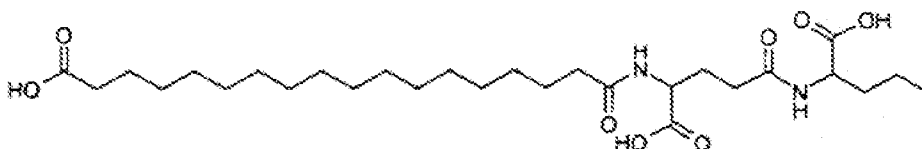
hvor det kirale karbonatomet er enten R eller S,

20



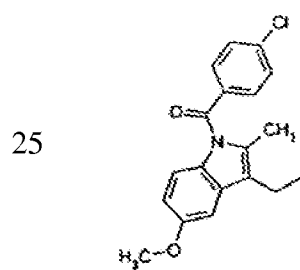
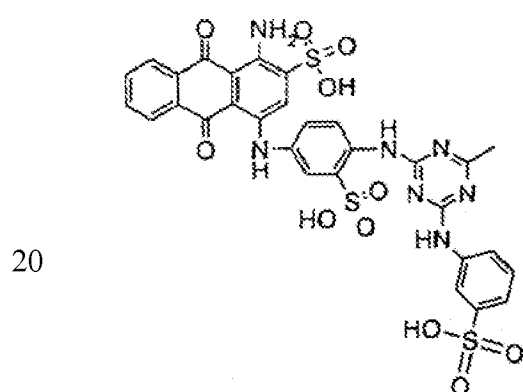
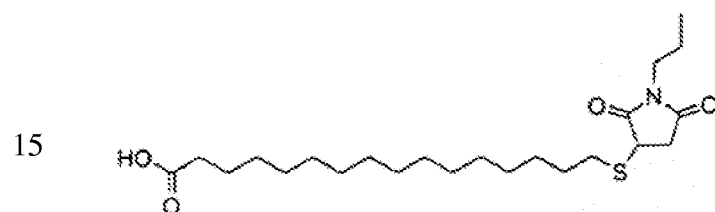
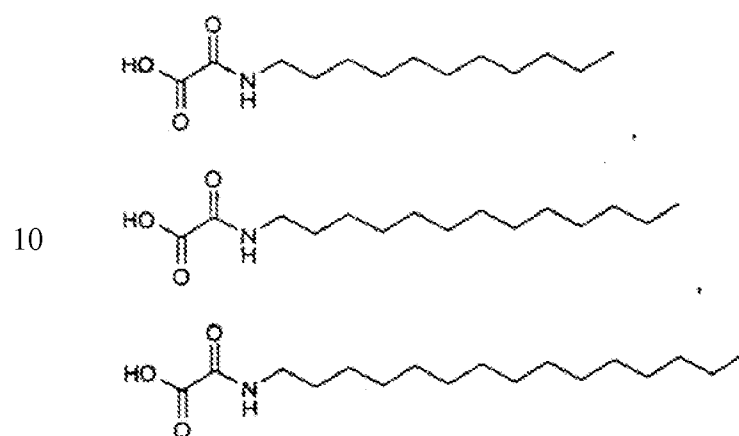
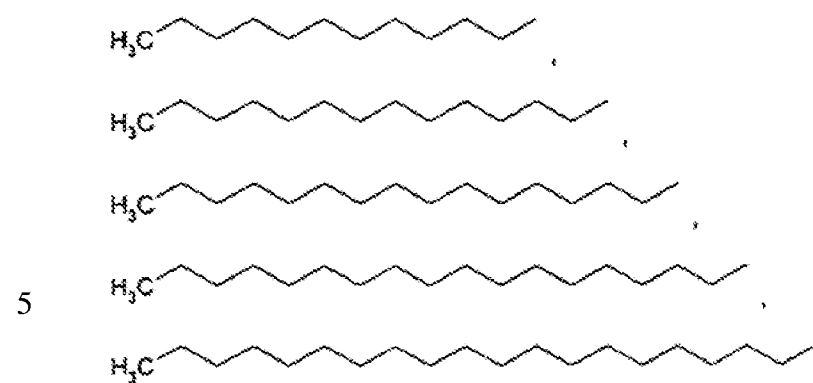
hvor de to kirale karbonatomene uavhengig av hverandre er enten R eller S,

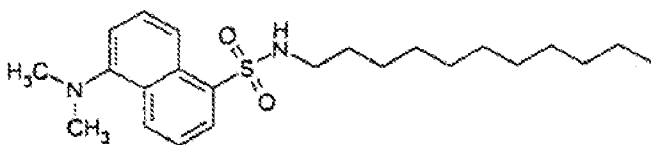
25



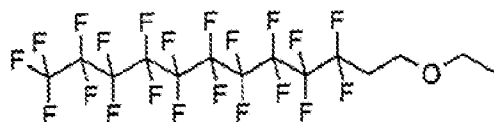
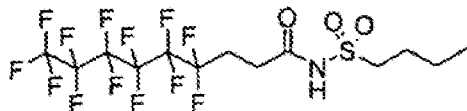
hvor de to kirale karbonatomene uavhengig av hverandre er enten R eller S,

19

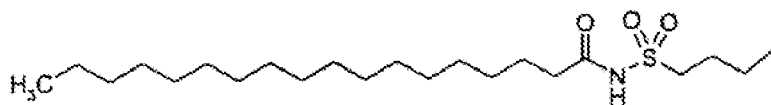
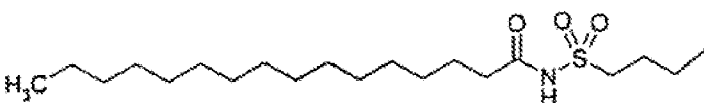




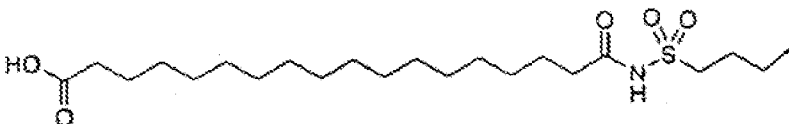
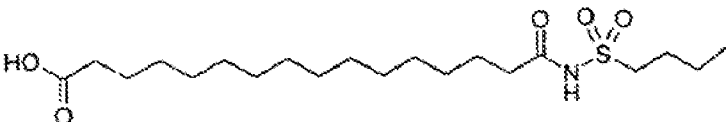
5



10

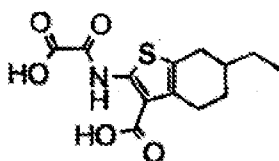


15



og

20



I en ytterligere utførelse ligger molekylvekten på den hydrofile avstandsgruppen i området fra 80D til 1000D eller i området fra 80D til 300D.

I en annen utførelse er den albuminbindende resten en lipofil rest.

25 I en annen utførelse er den albuminbindende resten negativt ladet ved fysiologisk pH. I en annen utførelse omfatter den albuminbindende resten en gruppe som kan være negativt ladet. En foretrukket gruppe som kan være negativt ladet er en karboksylsyregruppe.

- I en annen utførelse så binder den albuminbindende resten seg ikke-kovalent til albumin. I en annen utførelse har den albuminbindende resten en bindingsaffinitet i forhold til humant serumalbumin som ligger under 10 μM eller under omtrent 1 μM .
- I en ytterligere utførelse er den albuminbindende resten valgt fra en rettkjede
- 5 alkylgruppe, en grenet alkylgruppe, en gruppe som har en ω -karboksylsyregruppe, et delvis eller fullstendig hydrogenert syklopentanfenantrenskjelett.
- I en ytterligere utførelse er den albuminbindende resten en cibakronylrest.
- I en ytterligere utførelse har den albuminbindende resten fra 6 til 40 karbonatomer, fra 8 til 26 karbonatomer eller fra 8 til 20 karbonatomer.
- 10 I en ytterligere utførelse er den albuminbindende resten en acylgruppe valgt fra gruppen som omfatter $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-$ hvor r er et helt tall fra 4 til 38, fortrinnsvis fra 4 til 24, og fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ og $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.
- 15 I en annen utførelse er den albuminbindende resten en acylgruppe av en rettkjedet eller grenet alkan α,ω -dikarboksylsyre.
- I en annen utførelse er den albuminbindende resten en acylgruppe valgt fra gruppen som omfatter $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_s\text{CO}-$ hvor s er et helt tall fra 4 til 38, fortrinnsvis fra 4 til 24, mer foretrukket valgt fra gruppen bestående av $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$,
- 20 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ og $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.
- I en annen utførelse er den albuminbindende resten en gruppe med formelen $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_v\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ hvor v er et helt tall fra 10 til 24.
- I en annen utførelse er den albuminbindende resten en gruppe med formelen $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_w\text{CO}-\text{NHCH}((\text{CH}_2)_2\text{COOH})\text{CO}-$ hvor w er et helt tall fra 8 til 24.
- 25 I en annen utførelse er den albuminbindende resten en gruppe med formelen $\text{COOH}(\text{CH}_2)_x\text{CO}-$ hvor x er et helt tall fra 8 til 24.
- I en annen utførelse er den albuminbindende resten en gruppe med formelen $-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}-\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$ hvor y er et helt tall fra 8 til 18.
- I en annen utførelse er den albuminbindende resten et peptid så som et peptid som
- 30 omfatter mindre enn 40 aminosyrerester. En rekke mindre peptider som er albuminbindende rester så vel som en fremgangsmåte for deres identifikasjon, er beskrevet i J. Biol. Chem. 277, 38 (2002) 35035-35043.
- I en annen utførelse er den albuminbindende resten via en romgruppe og linkere knyttet til nevnte terapeutiske polypeptid via ϵ -aminogruppen i en lysinrest.

I en annen utførelse er den albuminbindende resten via en romgruppe og linkere knyttet til nevnte terapeutiske polypeptid via en aminosyrerest valgt fra cystein, glutamat og aspartat.

I en utførelse er det terapeutiske polypeptidet et GLP-1-peptid.

- 5 I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet et GLP-1-peptid som omfatter aminosyresekvensen med formel (IV):

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀-Xaa₄₁-Xaa₄₂-Xaa₄₃-Xaa₄₄-Xaa₄₅-Xaa₄₆

- 10 Formel (IV) (SEKV.ID. NR. 2)

hvor

Xaa₇ er L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β-hydroksyhistidin, homohistidin, N^α-acetylhistidin, α-fluormetylhistidin, α-metylhistidin, 3-pyridylalanin, 2-pyridylalanin eller 4-pyridylalanin;

- 15 Xaa₈ er Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib (1-aminosyklopropyl)karboksylsyre, (1-aminosyklobutyl)karboksylsyre, (1-aminosyklopentyl)karboksylsyre, (1-aminosykloheksyl)karboksylsyre, (1-aminosykloheptyl)karboksylsyre eller (1-aminosyklooktyl)karboksylsyre;

Xaa₁₆ er Val eller Leu;

- 20 Xaa₁₈ er Ser, Lys eller Arg;

Xaa₁₉ er Tyr eller Gln;

Xaa₂₀ er Leu eller Met;

Xaa₂₂ er Gly, Glu eller Aib;

Xaa₂₃ er Gln, Glu, Lys eller Arg;

- 25 Xaa₂₅ er Ala eller Val;

Xaa₂₆ er Lys, Glu eller Arg;

Xaa₂₇ er Glu eller Leu;

Xaa₃₀ er Ala, Glu eller Arg;

Xaa₃₃ er Val eller Lys;

- 30 Xaa₃₄ er Lys, Glu, Asn eller Arg;

Xaa₃₅ er Gly eller Aib;

Xaa₃₆ er Arg, Gly eller Lys;

Xaa₃₇ er Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amid eller er fraværende;

Xaa₃₈ er Lys, Ser, amid eller er fraværende;

- 35 Xaa₃₉ er Ser, Lys, amid eller er fraværende;

Xaa₄₀ er Gly, amid eller er fraværende;

Xaa₄₁ er Ala, amid eller er fraværende;

Xaa₄₂ er Pro, amid eller er fraværende;

Xaa₄₃ er Pro, amid eller er fraværende;

Xaa₄₄ er Pro, amid eller er fraværende;

Xaa₄₅ er Ser, amid eller er fraværende;

5 Xaa₄₆ er amid eller er fraværende;

forutsatt at hvis Xaa₃₈, Xaa₃₉, Xaa₄₀, Xaa₄₁, Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ eller Xaa₄₆ er fraværende, så er hver aminosyrerest nedstrøms også fraværende.

I en utførelse av oppfinnelsen er polypeptidet et GLP-1-peptid som omfatter aminosyresekvensen med formel (V):

10 Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-
Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈

Formel (V) (SEKV.ID. NR. 3)

hvor

15 Xaa₇ er L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β -hydroksyhistidin, homohistidin, N ^{α} -acetylhistidin, α -fluormetylhistidin, α -metylhistidin, 3-pyridylalanin, 2-pyridylalanin eller 4-pyridylalanin;

20 Xaa₈ er Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib (1-aminosyklopropyl)karboksylsyre, (1-aminosyklobutyl)karboksylsyre, (1-aminosyklopentyl)karboksylsyre, (1-aminosykloheksyl)karboksylsyre, (1-aminosykloheptyl)karboksylsyre eller (1-aminosyklooktyl)karboksylsyre;

Xaa₁₈ er Ser, Lys eller Arg;
Xaa₂₂ er Gly, Glu eller Aib;
Xaa₂₃ er Gln, Glu, Lys eller Arg;
Xaa₂₆ er Lys, Glu eller Arg;
25 Xaa₃₀ er Ala, Glu eller Arg;
Xaa₃₄ er Lys, Glu eller Arg;
Xaa₃₅ er Gly eller Aib;
Xaa₃₆ er Arg eller Lys;
Xaa₃₇ er Gly, Ala, Glu eller Lys;
30 Xaa₃₈ er Lys, amid eller er fraværende.

I en ytterligere utførelse er GLP-1-peptidet valgt fra GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)amid, GLP-1(7-37), GLP-1(7-38), GLP-1(7-39), GLP-1(7-40) og GLP-1(7-41) eller en analog av disse.

I en ytterligere utførelse er GLP-1-peptidet et fragment av et peptid valgt fra gruppen bestående av GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-36)amid, GLP-1(7-37), GLP-1(7-38), GLP-1(7-39), GLP-1(7-40) og GLP-1(7-41) eller en analog av disse.

5 I en ytterligere utførelse er GLP-1-peptidet GLP-1(A-B) hvor A er et helt tall fra 1 til 7 og B er et helt tall fra 38 til 45 eller en analog av dette, som omfatter en albuminbindende rest som via en hydrofil romgruppe er knyttet til den C-terminale aminosyreresten og eventuelt, en andre albuminbindende rest knyttet til en av de andre aminosyrerestene.

10 I en annen utførelse omfatter GLP-1-peptidet ikke mer enn femten aminosyrerester som er blitt byttet ut, tillagt eller fjernet sammenlignet med GLP-1(7-37) (SEKV.ID. NR. 1) eller ikke mer enn ti aminosyrerester som er blitt byttet ut, tillagt eller fjernet sammenlignet med GLP-1(7-37) (SEKV.ID. NR. 1).

15 I en annen utførelse så omfatter GLP-1-peptidet ikke mer enn seks aminosyrerester som er blitt byttet ut, tillagt eller fjernet sammenlignet med GLP-1(7-37) (SEKV.ID. NR. 1).

I en annen utførelse omfatter GLP-1-peptidet ikke mer enn 4 aminosyrerester som ikke er kodet av den genetiske koden.

I en annen utførelse er GLP-1-peptidet et DPPIV-beskyttet GLP-1-peptid.

I en annen utførelse er forbindelsen DPPIV-stabilisert.

20 I en annen utførelse omfatter GLP-1-peptidet en Aib-rest i posisjon 8.

I en annen utførelse er aminosyreresten i posisjon 7 i nevnte GLP-1-peptid valgt fra gruppen bestående av D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β -hydroksyhistidin, homohistidin, N $^{\alpha}$ -acetylhistidin, α -fluormetylhistidin, α -metylhistidin, 3-pyridylalanin, 2-pyridylalanin og 4-pyridylalanin.

25 I en annen utførelse er GLP-1-peptidet valgt fra gruppen bestående av

Arg³⁴GLP-1(7-37), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38), Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1(7-38)-OH, Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1(7-36), Aib^{8,22,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,22}GLP-1(7-37), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1(7-37), Aib^{8,35}Lys³⁷GLP-1(7-37) og Aib^{8,22}Lys³⁷GLP-1(7-38).

30

35

I en annen utførelse er GLP-1-peptidet knyttet til nevnte hydrofile romgruppe via aminosyreresten i posisjon 23, 26, 34, 36 eller 38 i forhold til aminosyresekvensen SEKV.ID. NR. 1.

I en annen utførelse er GLP-1-peptidet eksendin-4 (SEKV.ID. NR. 4).

- 5 I en annen utførelse er GLP-1-peptidet ZP-10, det vil si HEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKKK-amid (SEKV.ID. NR. 5).

- 10 I en annen utførelse er GLP-1-peptidet HEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGX hvor X = P eller Y eller et fragment eller en analog av denne.

I en annen utførelse er GLP-1-peptidet Arg¹⁸, Leu²⁰, Gln³⁴, Lys³³ (N^ε-(γ-aminobutyroyl(N^α-heksadekanoyl)))eksendin-4-(7-45)-amid eller Arg³³, Leu²⁰, Gln³⁴, Lys¹⁸ (N^ε-(γ-aminobutyroyl(N^α-heksadekanoyl)))eksendin-4-(7-45)-amid.

- 15 I en annen utførelse av oppfinnelsen er en albuminbindende rest knyttet til den C-terminale aminosyreresten i GLP-1-peptidet via den hydrofile romgruppen.

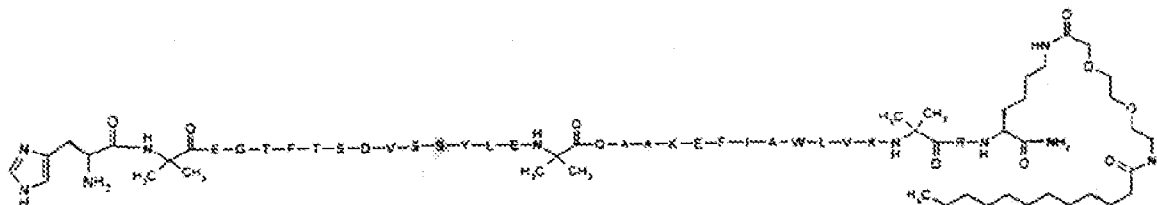
I en annen utførelse er den andre albuminbindende resten knyttet til en aminosyrerest som ikke er den C-terminale aminosyreresten i GLP-1-peptidet.

- 20 I en annen utførelse er den lipofile substituenten knyttet til GLP-1-peptidet ved en hydrofil romgruppe på en slik måte at en karboksylgruppe i romgruppen danner en amidbinding med en aminogruppe i GLP-1-peptidet.

I en annen utførelse er forbindelsen valgt fra gruppen bestående av

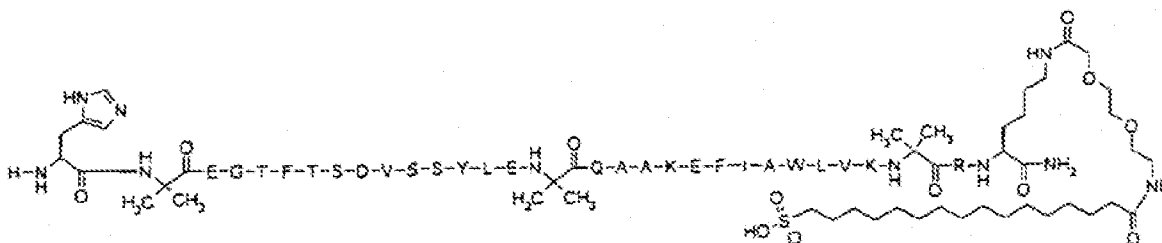
N^{ε37}-(2-(2-(2-(dodekylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid

25

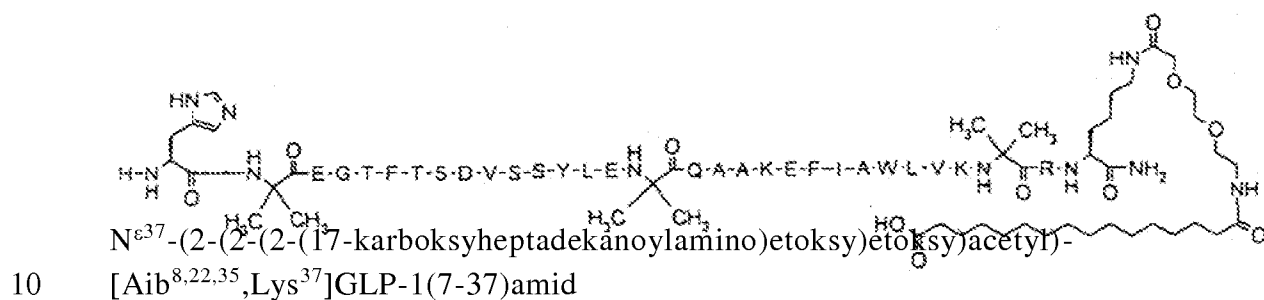


N^{ε37}-(2-(2-(2-(17-sulfoheksadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid

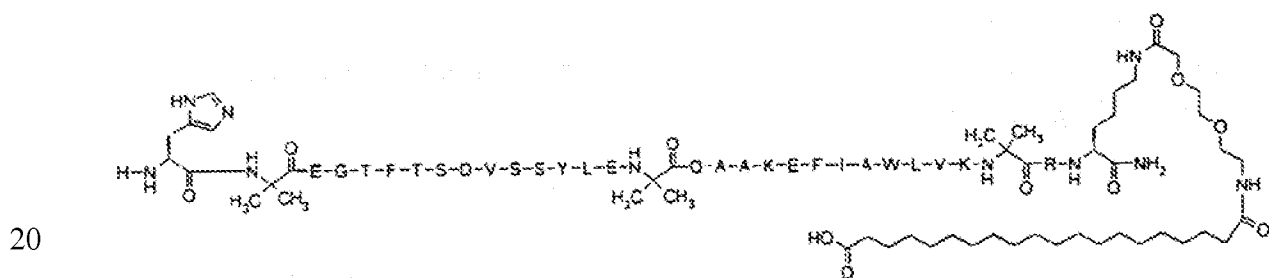
30



- 5 N^{ε37}-{2-[2-(2-(15-karboksy-pentadekanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl}-
[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid

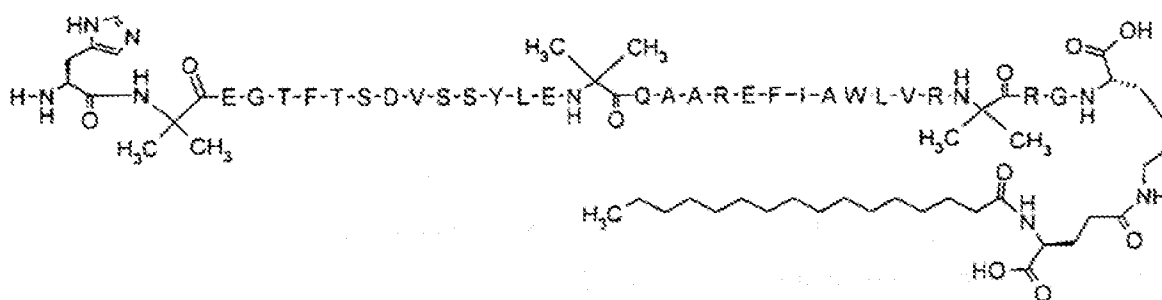


- 15 N^{ε37}-(2-(2-(2-(19-karboksy-nonadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-
[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid



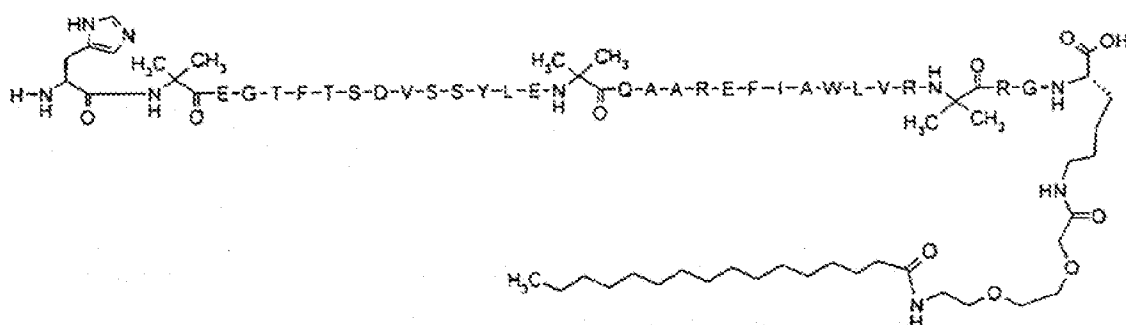
[Aib^{8,22,35},Arg^{26,34}]GLP-1-(7-37)Lys(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-
karboksybutyryl)-OH

27



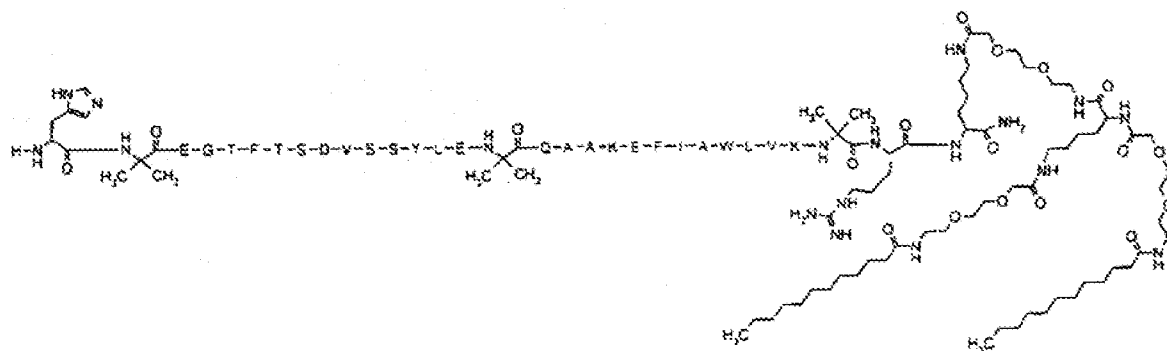
5

[Aib^{8,22,35},Arg^{26,34}]GLP-1-(7-37)Lys(2-(2-(2-(heksadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetyl)-OH



10

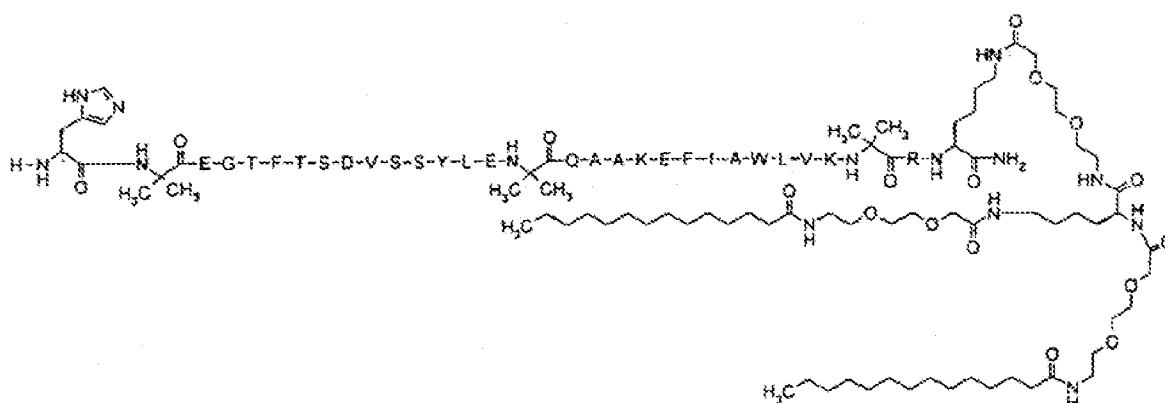
N³⁷-(2-[2-(2,6-(S)-bis-{2-[2-(2-(dodekanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl-amino}-heksanoylamino)etoksy]etoksy))acetyl-[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)amid



20

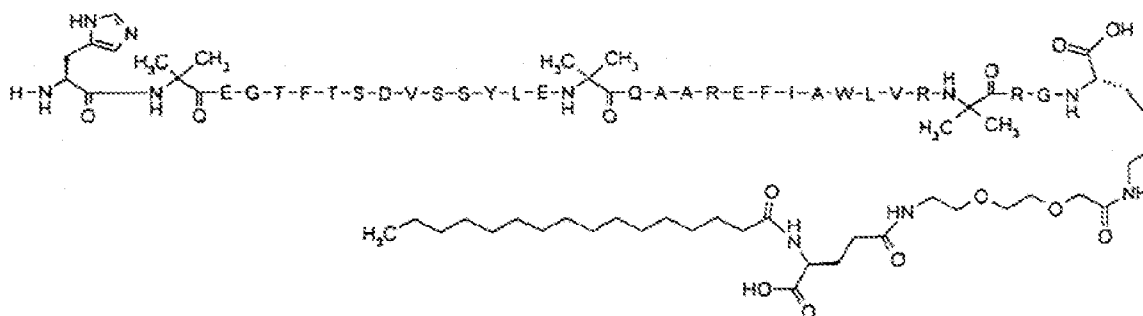
N³⁷-(2-[2-(2,6-(S)-bis{2-[2-(2-(tetradekanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl-amino}-heksanoylamino)etoksy]etoksy))acetyl-[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)amid

5



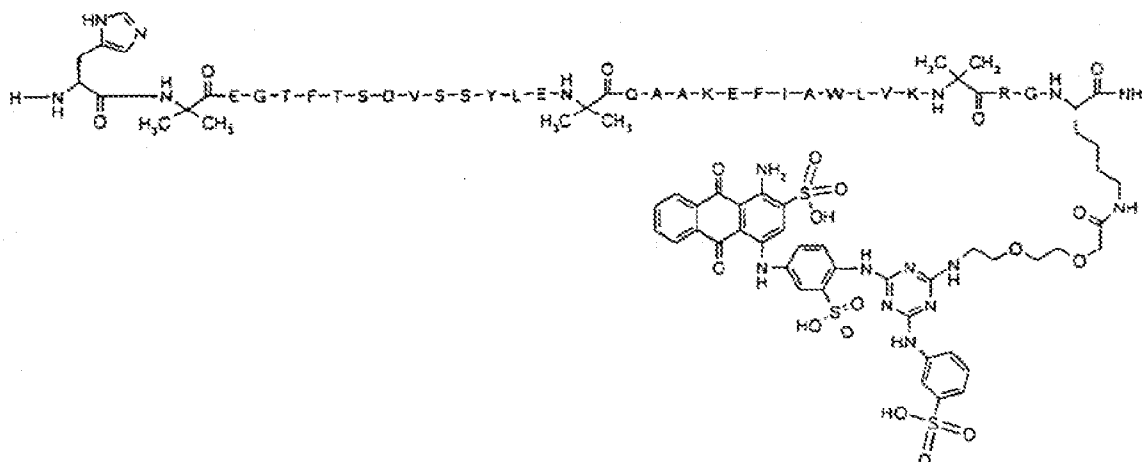
[Aib^{8,22,35},Arg^{26,34}]GLP-1-(7-37)Lys(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH

10



15 [Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)Lys((2-{2-[4-[4-(4-amino-9,10-diokso-3-sulfo-9,10-dihydroantracen-1-ylamino)-2-sulfofenylamino]-6-(2-sulfofenylamino)-[1,3,5]triazin-2-ylamino]etoksy}etoksy)acetyl))amid

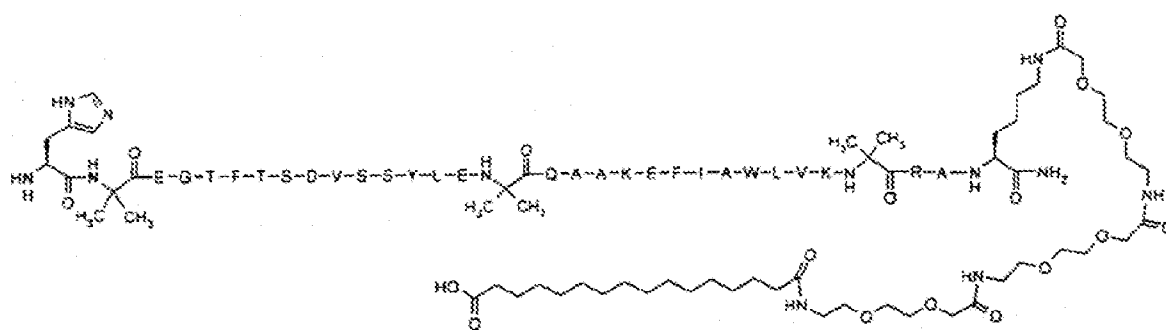
20



25

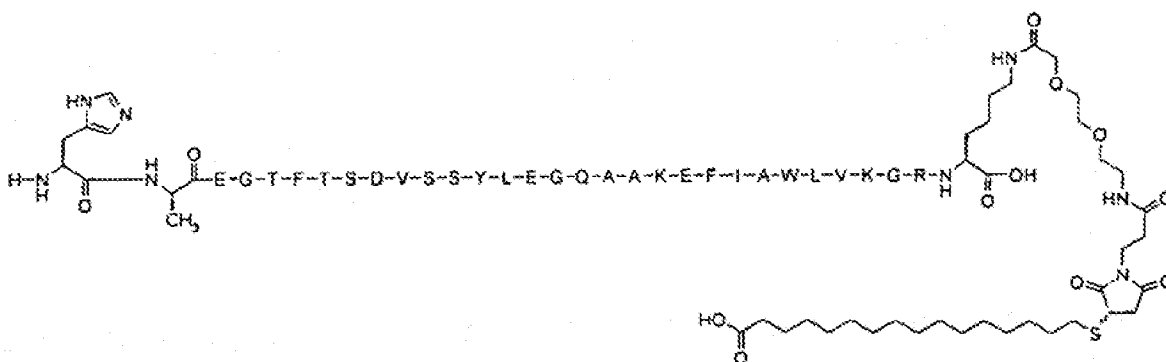
[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)Lys(((2-[2-(2-(2-[2-(2-(2-[2-(15-karboksypentadekanoylamino)etoksy]etoksy}acetyl)amino)etoksy]etoksy}-acetyl)amino)etoksy]etoksy}acetyl))amid

5



N^{ε37}-([2-(2-{3-[2,5-diokso-3-(15-karboksy-pentadecylsulfanyl)pyrrolidin-1-yl]-propionylamino}etoksy)etoksy)acetyl]-[D-Ala⁸,Lys³⁷]-GLP-1-[7-37]amid

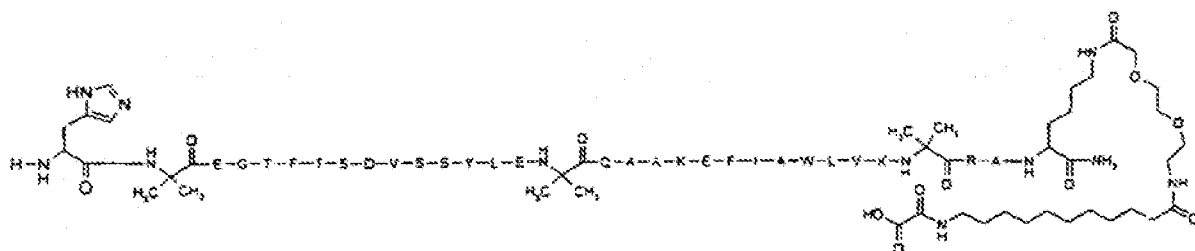
10



15

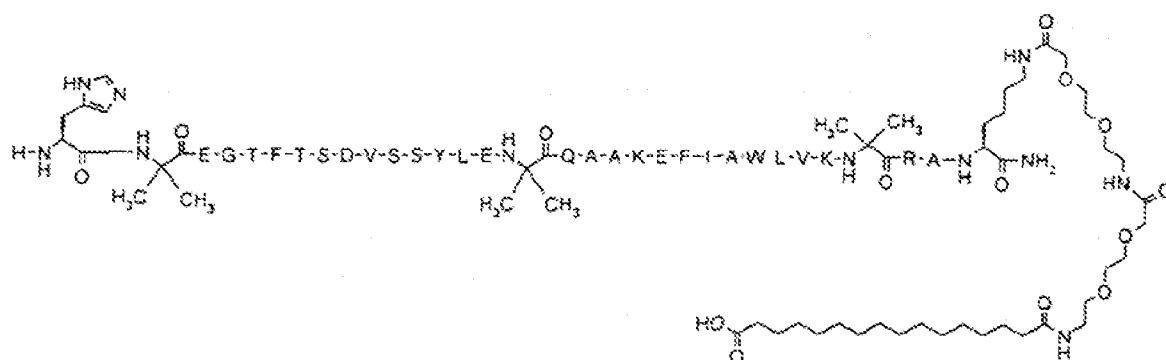
[Aib^{8,22,35}Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(2-(11-(oksalylamino)undekanoylamino)-etoksy)etoksy)acetyl)))amid

20



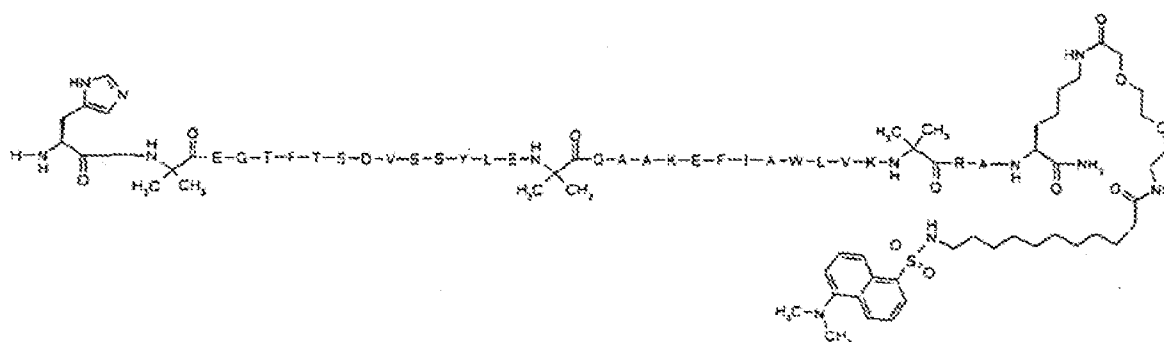
[Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys({2-[2-(2-{2-[2-(2-(15-karboksy-pentadekanoylamino)etoksy]etoksy}acetyl)amino)etoksy]etoksy}acetyl)amid

25



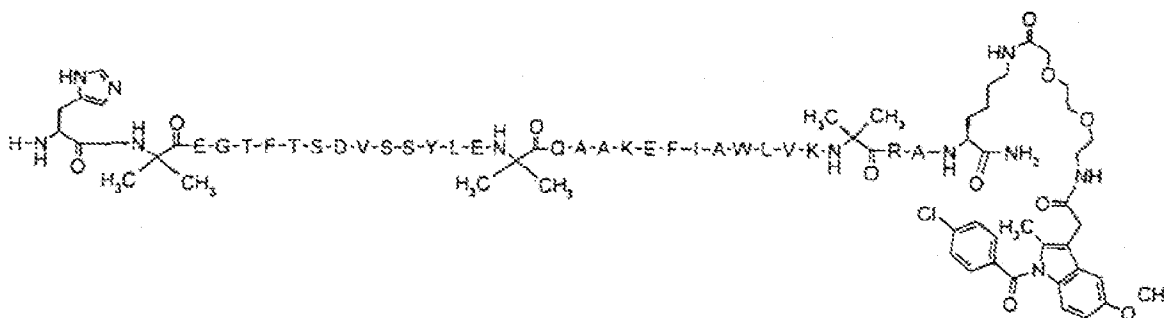
[Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys((2-{2-[11-(5-dimetylamino)naftalen-1-sulfonylamino]undekanoylamino}etoksy)etoksy)acetyl)amid

5



10

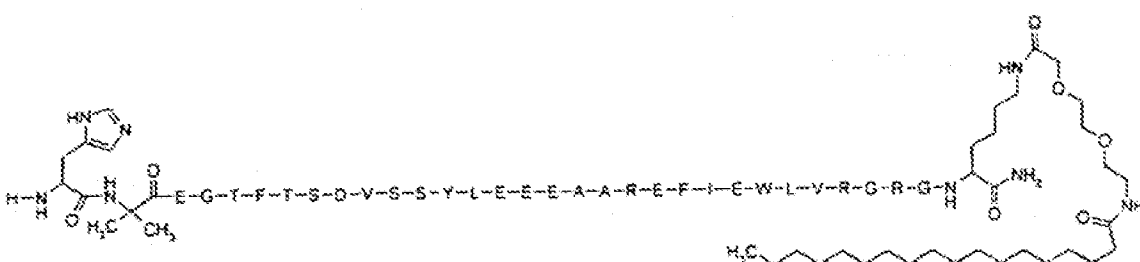
[Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys((2-(2-{2-[1-(4-klorbenzoyl)-5-metoksy-2-metyl-1H-indol-3-yl]acetylamino}etoksy)etoksy)acetyl))amid



15

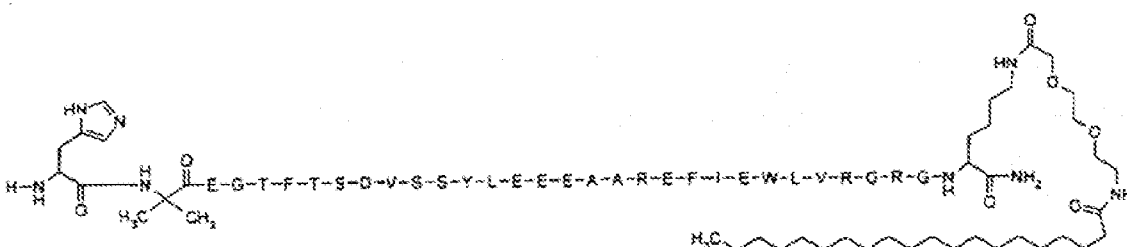
[Aib⁸,Arg^{26,34},Glu^{22,23,30}]GLP-1 H(7-37)Lys(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)amid

20



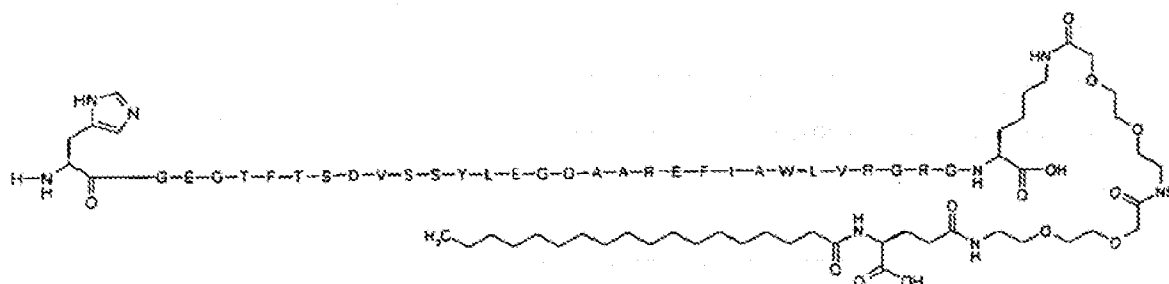
[Aib⁸,Arg^{26,34},Glu^{22,23,30}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(2-(eikosanoylamino)etoksy)etoksy)-acetyl)amid

25



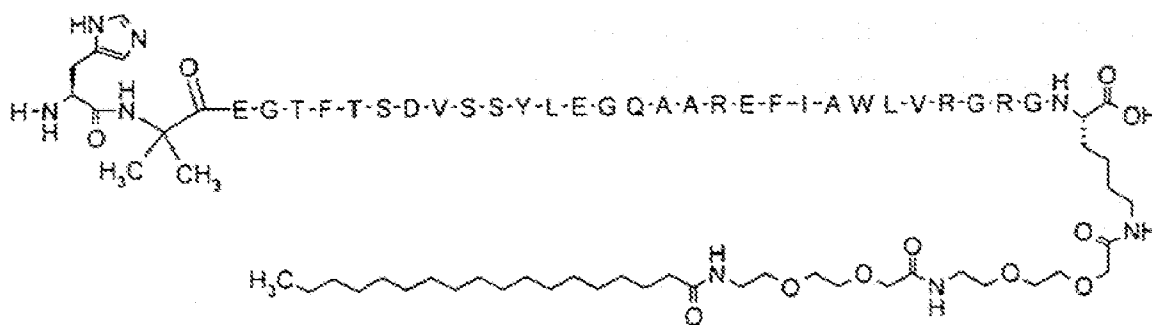
[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1 H-(7-37)Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)-OH

5



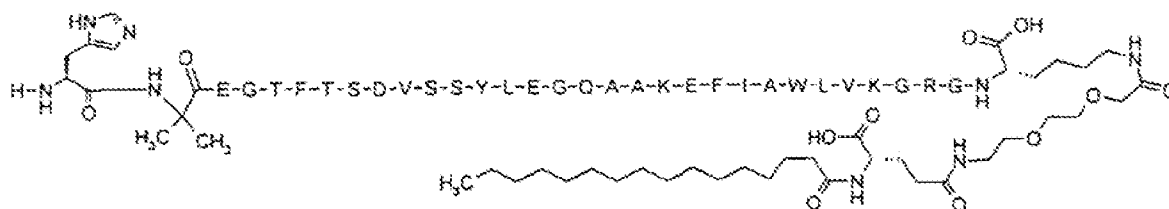
[Aib⁸,Arg^{26,34}]GLP-1 (7-37)Lys{2-(2-(2-(2-(2-[2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)-etoksy]acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH

10



15

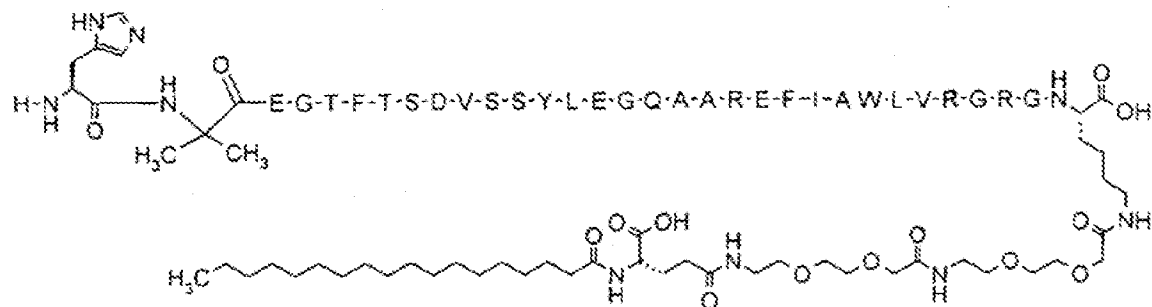
[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)Lys (2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH



20

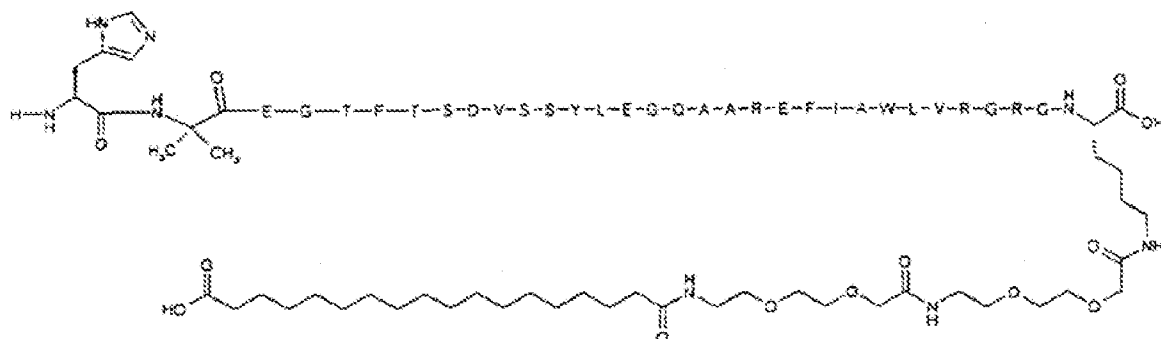
[Aib⁸,Arg^{26,34}] GLP-1(7-37) Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy]acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH

25



[Aib⁸,Arg^{26,34}] GLP-1(7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboksyheptanoylamino)-etoksy)etoksy]acetyl)amino)etoksy)acetyl)}-OH

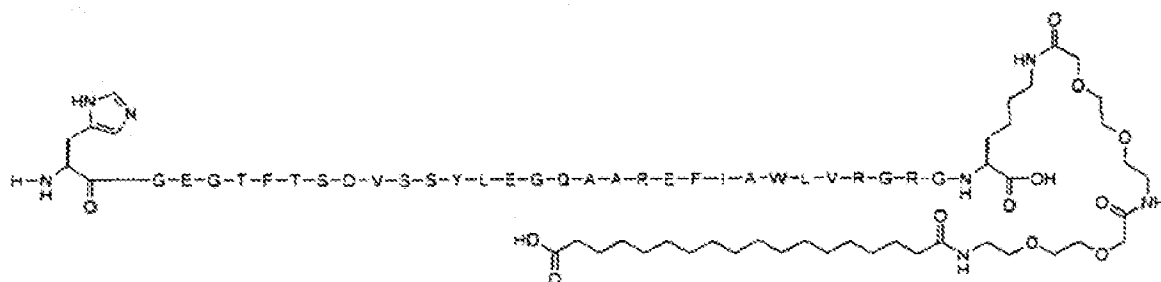
5



10

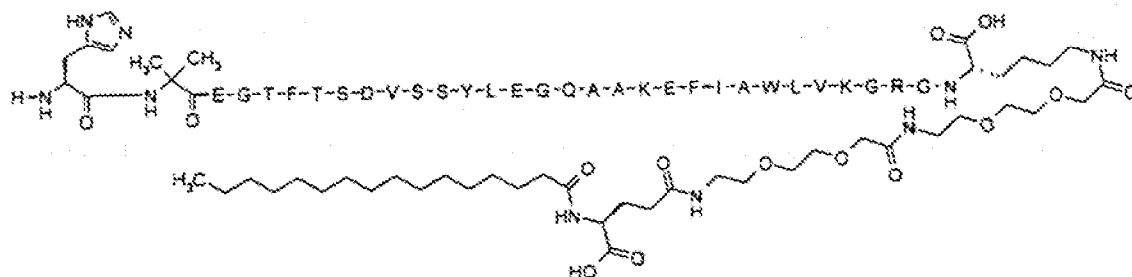
[Gly⁸,Arg^{26,34}] GLP-1-(7-37) Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH

15



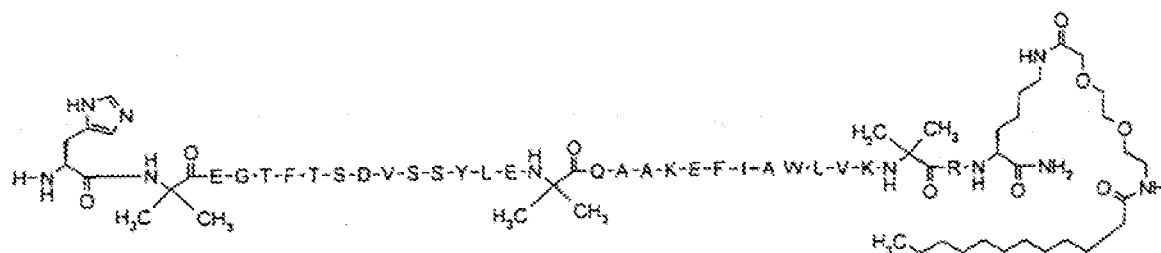
[Aib⁸]GLP-1-(7-37)Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH

20



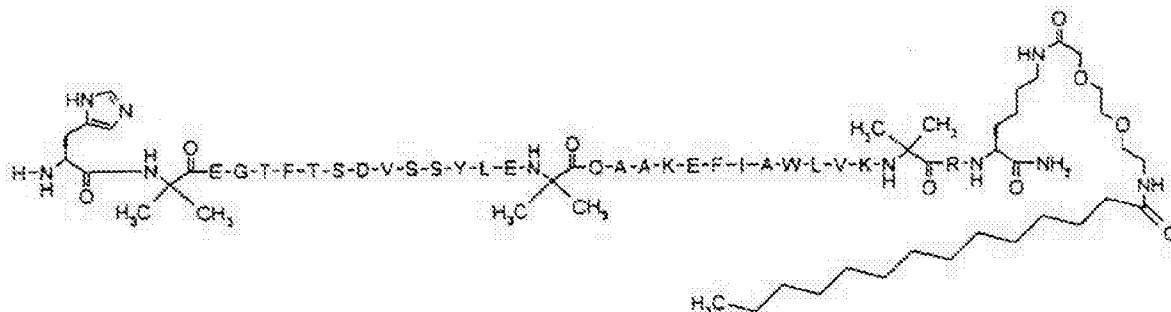
N^{ε37}-(2-(2-(2-(dodekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8 22 35}Lys³⁷] GLP-1 H(7-37)amid

25



N^{637} -(2-(2-(2-(tetradekanoylamino)etoksy)etoksy)actyl-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1 H(7-37)amid

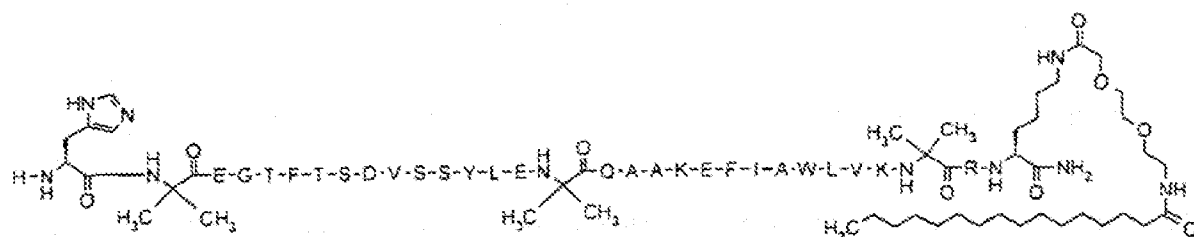
5



10

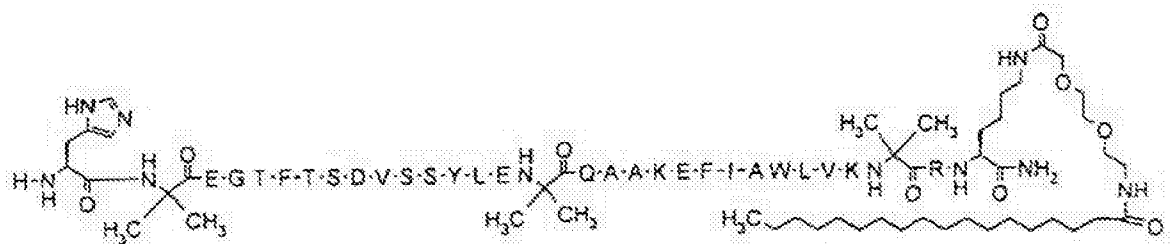
N^{637} -(2-(2-(2-(heksadekanoylamino)etoksy)etoksy)actyl-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1 (7-37)amid

15



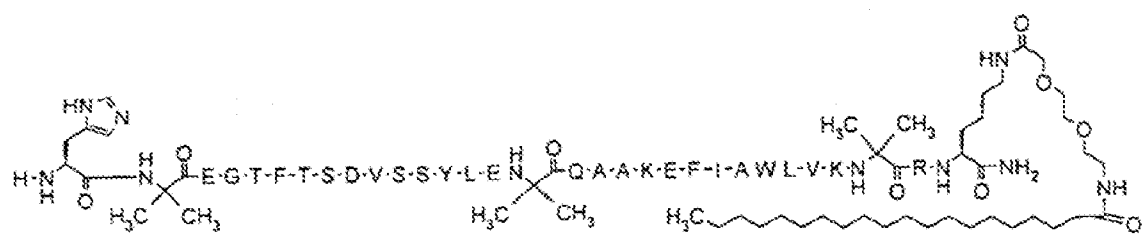
20

N^{637} -(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)actyl-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1 (7-37)amid



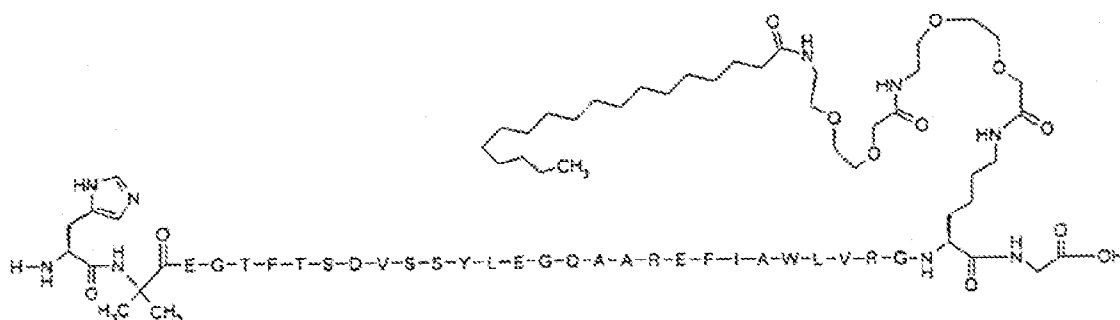
N^{637} -(2-(2-(2-(eikosanoylamino)etoksy)etoksy)actyl-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1(7-37)-amid

25



N^{ε37}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)-
etoksy)acetyl))-[Aib⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH

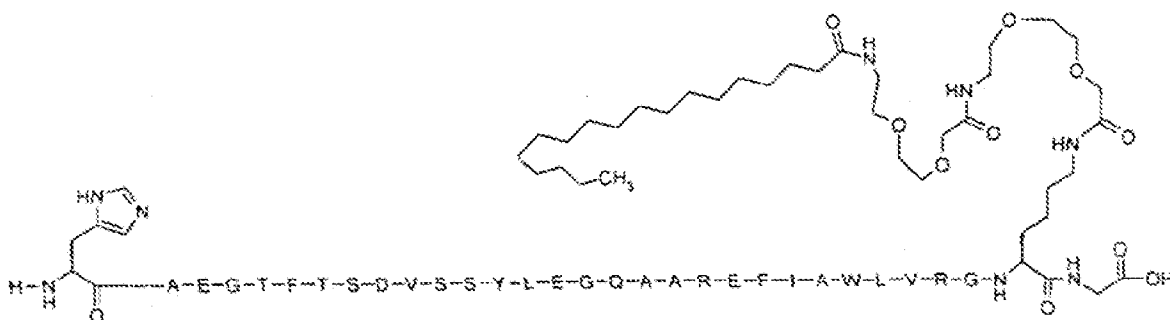
5



10

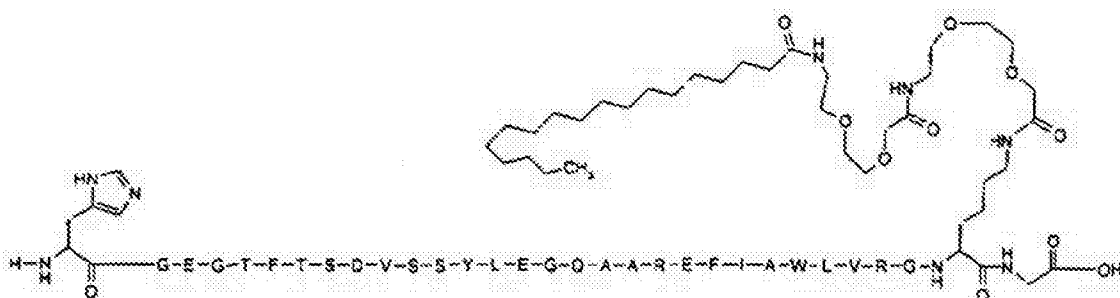
N^{ε37}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)-
etoksy)acetyl))[Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH

15



20

N^{ε37}-(2-(2-(2-(2-[2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy)-
etoksy)acetyl))-[Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH

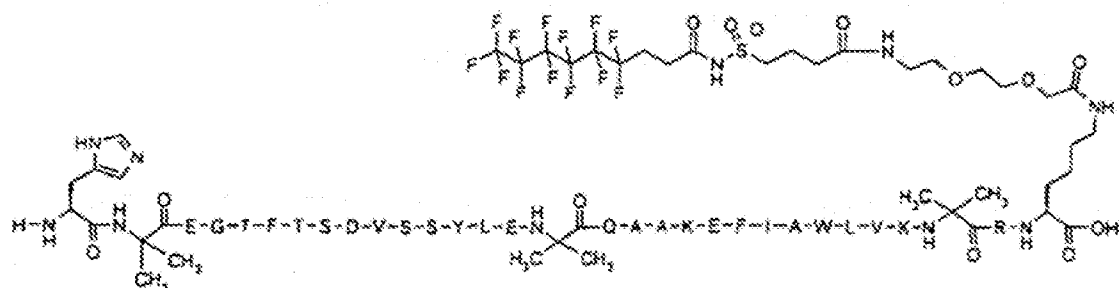


25

N^{ε37}-(2-(2-(2-(4-4(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridekafluornonanoylsulfamoylbutyryl-
amino)etoksy)etoksy)acetyl))[Aib^{8,22,35},Lys³⁷] GLP-1-(7-37)-OH

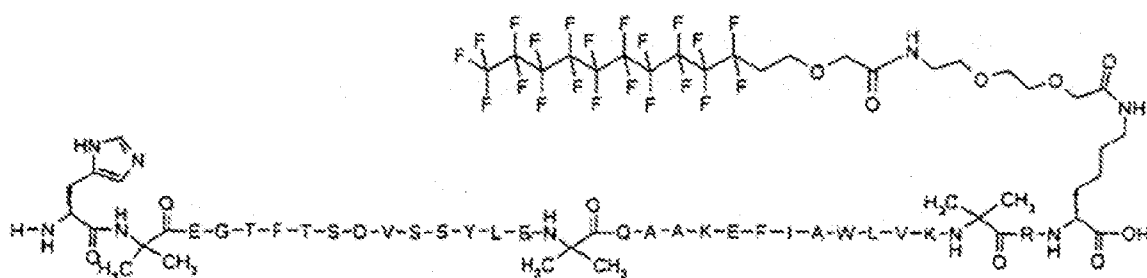
35

5



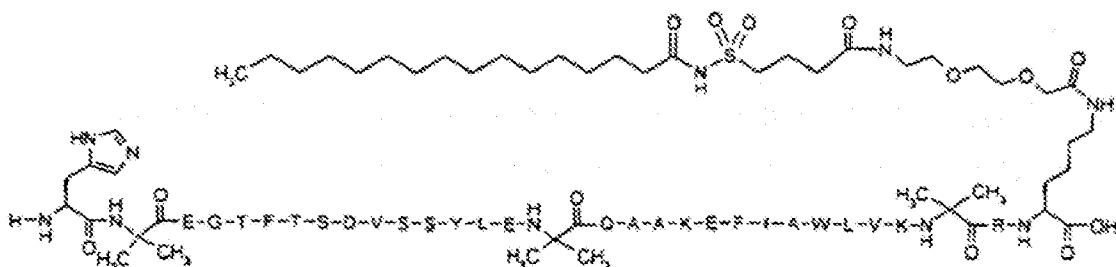
N^{ε37}-(2-(2-(2-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-heneikosafluorododecyloxyacetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl)[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-OH

10



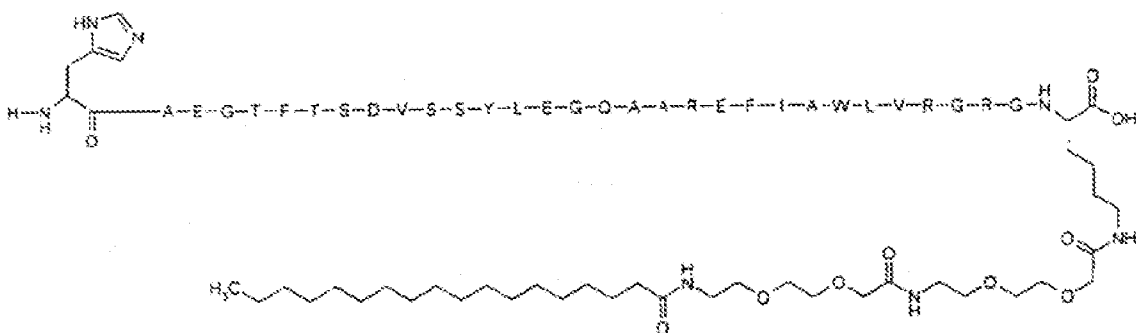
N^{ε37}-(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylsulfamoyl)butyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-OH

15



20

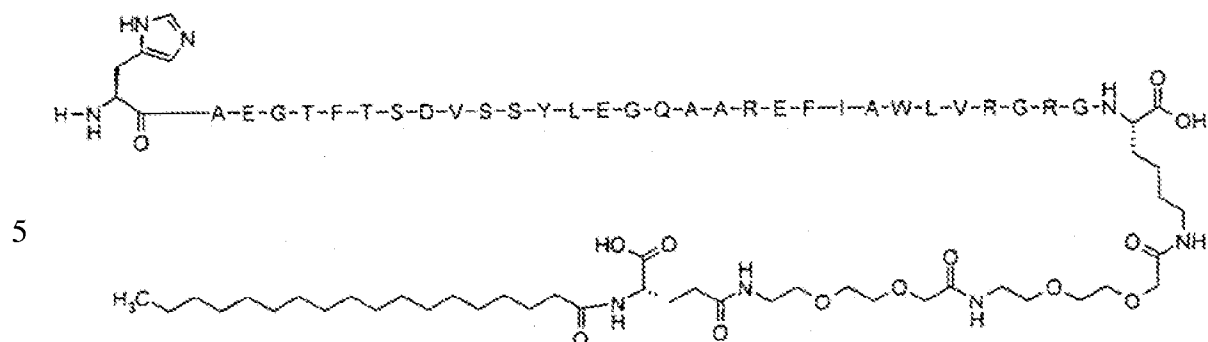
[Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys({2-(2-(2-(2-[2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy]-acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl))-OH



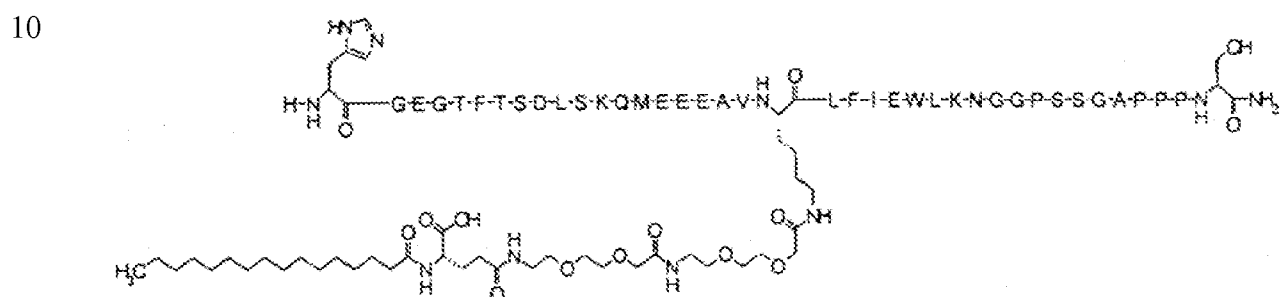
25

[Arg^{26,34}] GLP-1(7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4-

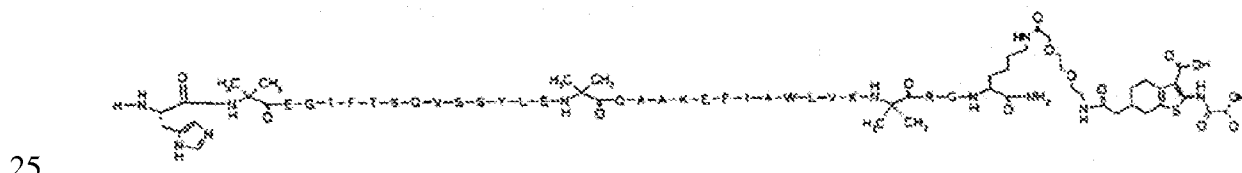
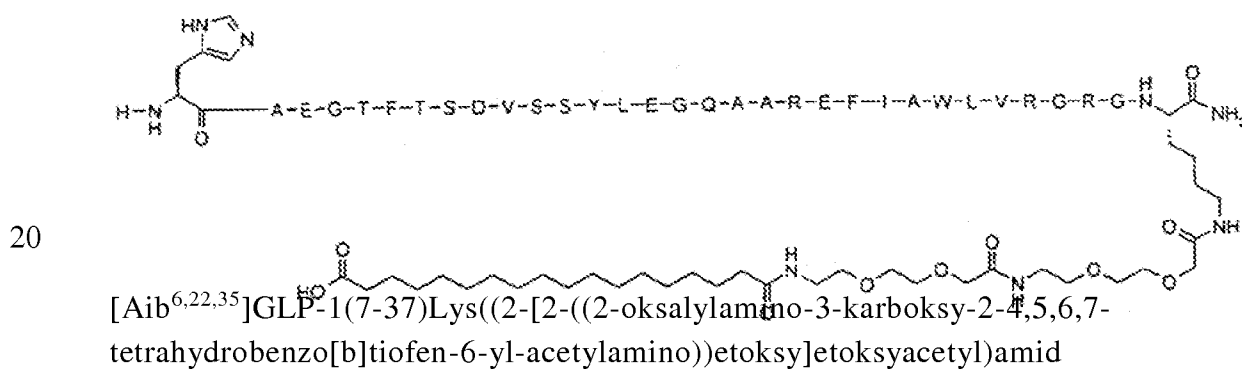
karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH



N^{ε20}-(2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy]-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)}-eksendin(1-39)



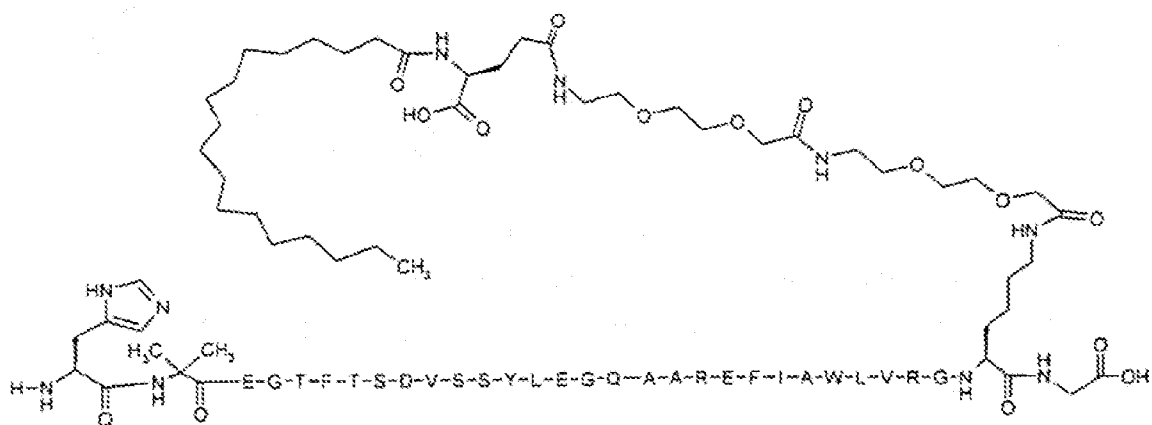
15 [Ala⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys((2-[2-((2-oksalylamino-3-karboksy-2-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]tiofen-6-yl-acetylamino))etoksy]etoksyacetyl)amid



N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH

37

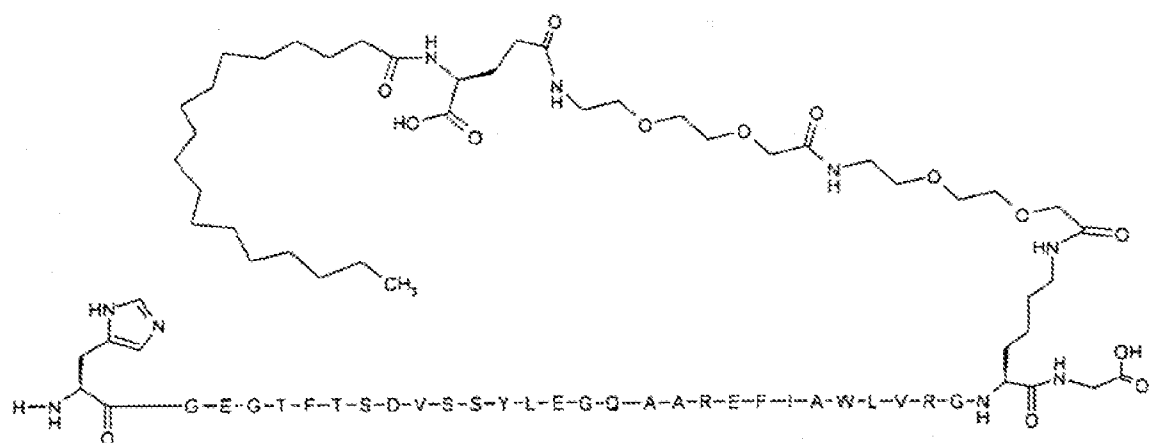
5



N⁶³⁶-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH

10

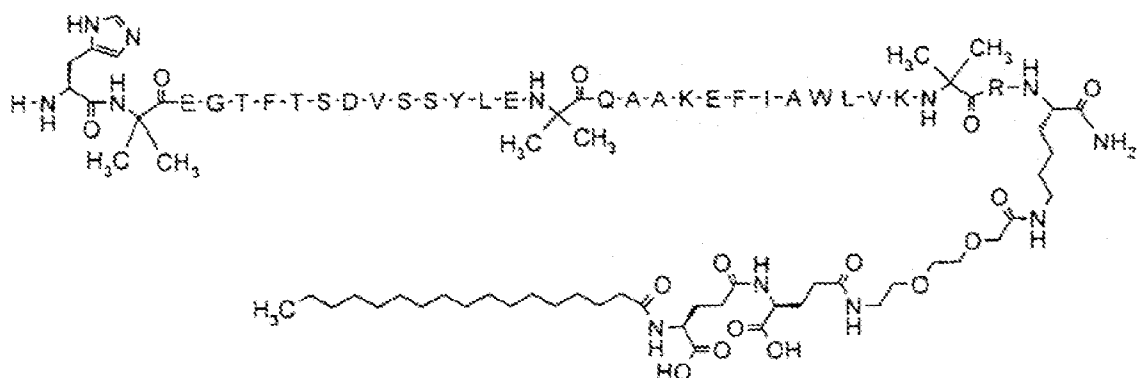
15



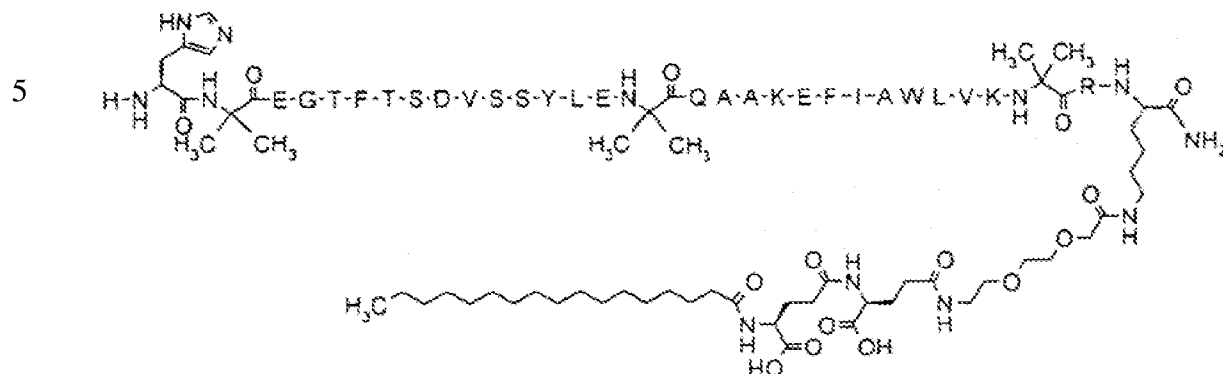
N⁶³⁷-2-(2-(2-(4-(4-(heptadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-NH₂

20

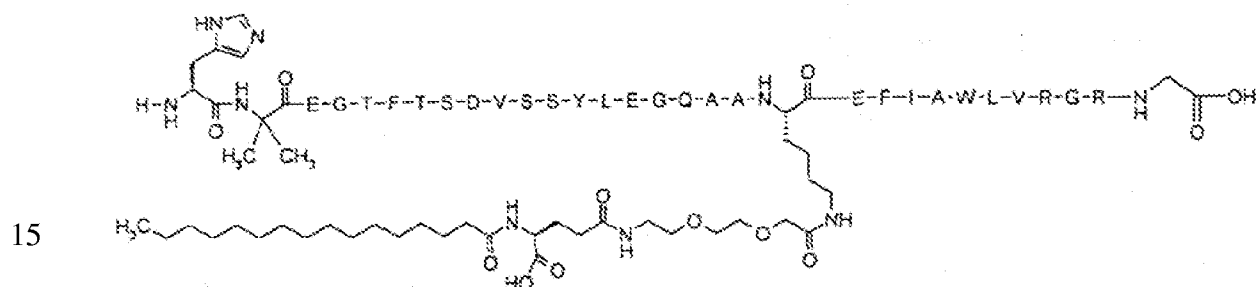
25



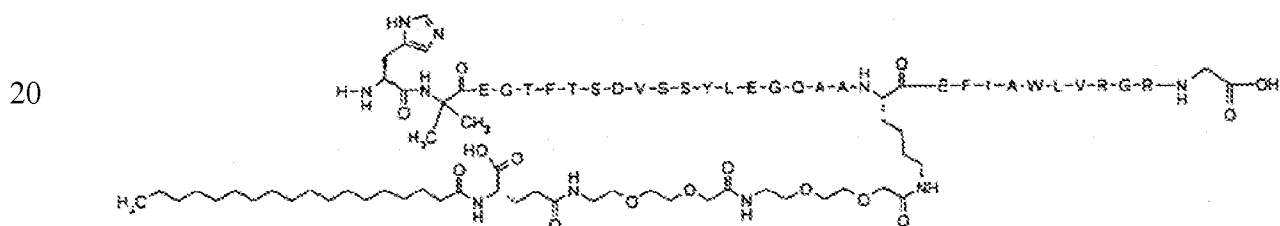
N^{ε37}-2-(2-[2-(2-[2-(4-[4-(heptadekanoylamino)-4-(S)-karboksybutyrylamino]-4-(S)-karboksybutyrylamino)etoksy]etoksy)acetylamin]etoksy]etoksy)acetyl-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-NH₂



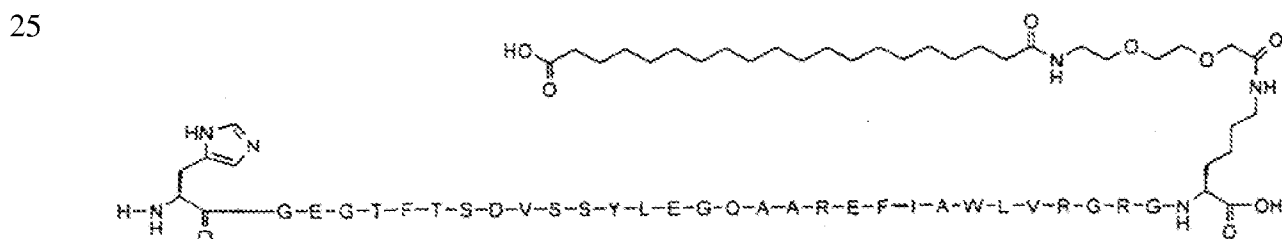
10 N^{ε26}-(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)-acetyl)-[Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH



N^{ε26}-2-(2-2(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-etoksy)acetylamin]etoksy)etoksy)acetyl-[Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH

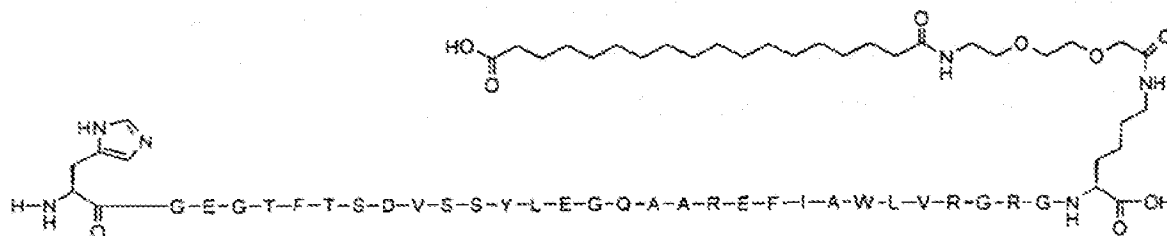


[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(19-(karboksy)nonadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)-OH



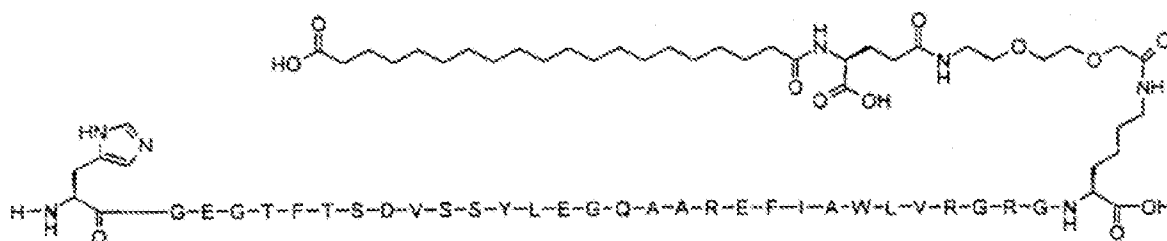
[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(17-(karboksy)heptadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl))-OH

5



10

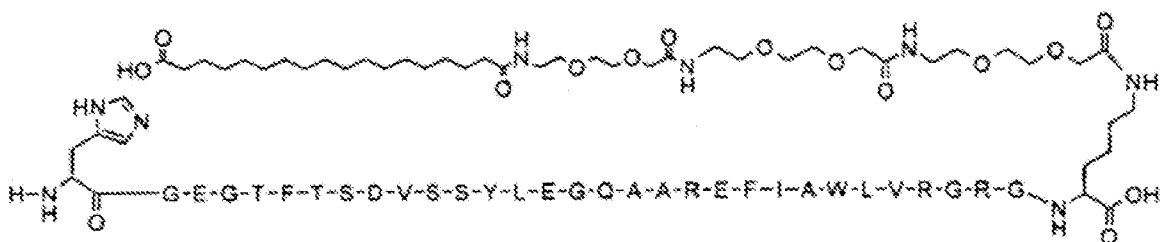
[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(2-(4-(19-(karboksy)nonadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl))-OH



15

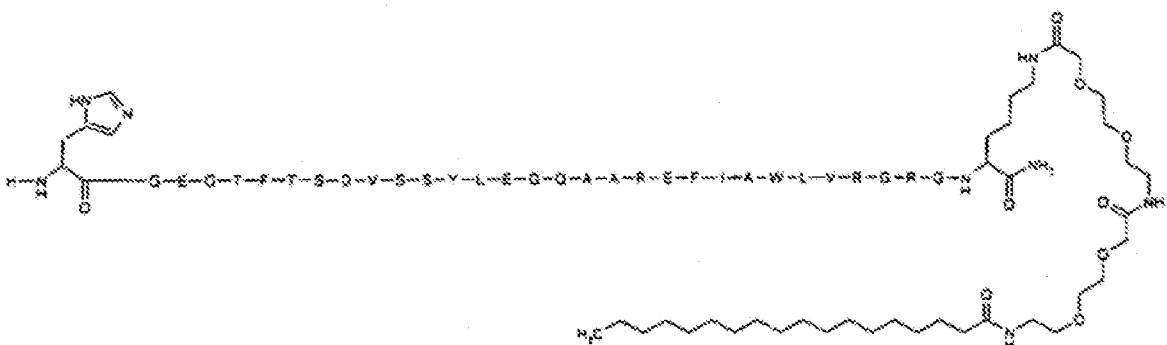
[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(heksadekanoylamino)-etoksy)etoksy)acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl))-OH

20

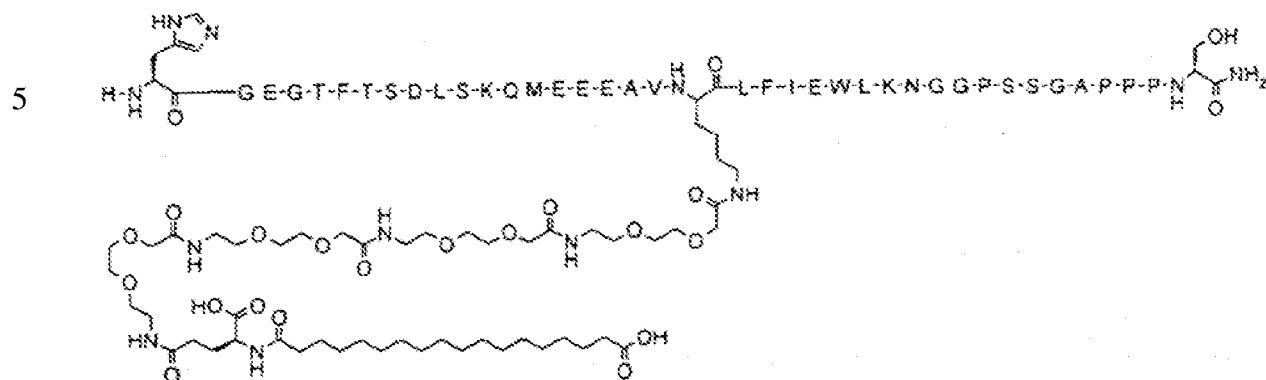


[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1 (7-37)Lys (2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl) NH₂

25



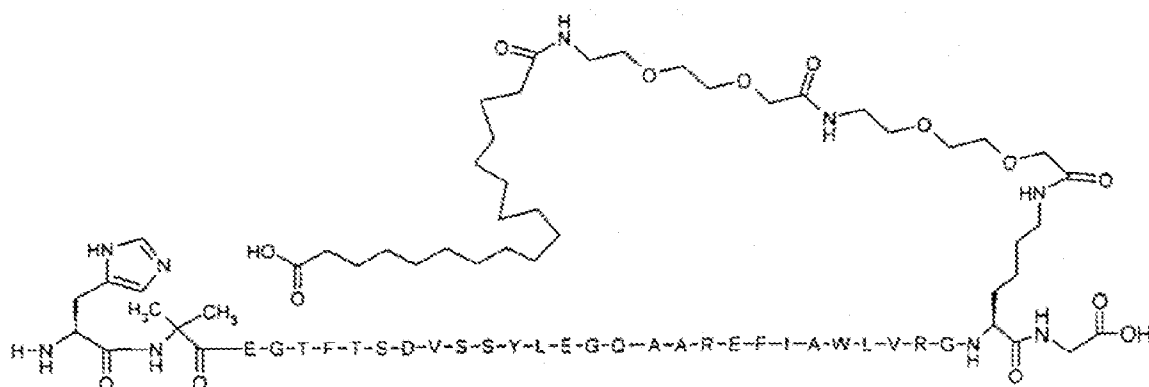
N^{ε20}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(17-(karboksy)heptadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)actylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)-etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl [Lys²⁰]eksendin-4 (1-39)-NH₂



10

N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl [Aib⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶] GLP-1 (7-37)

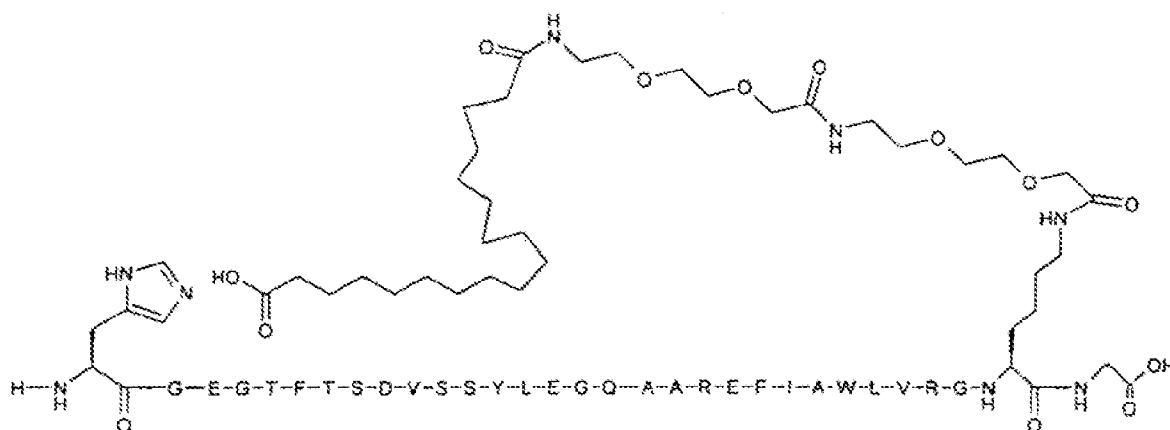
15



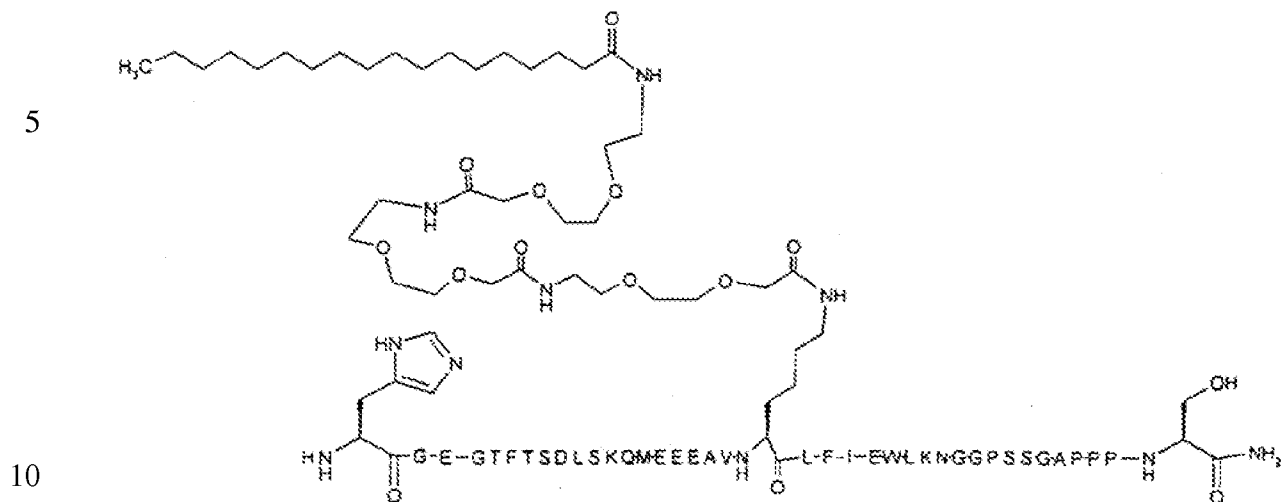
20

N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl [Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶] GLP-1 (7-37)

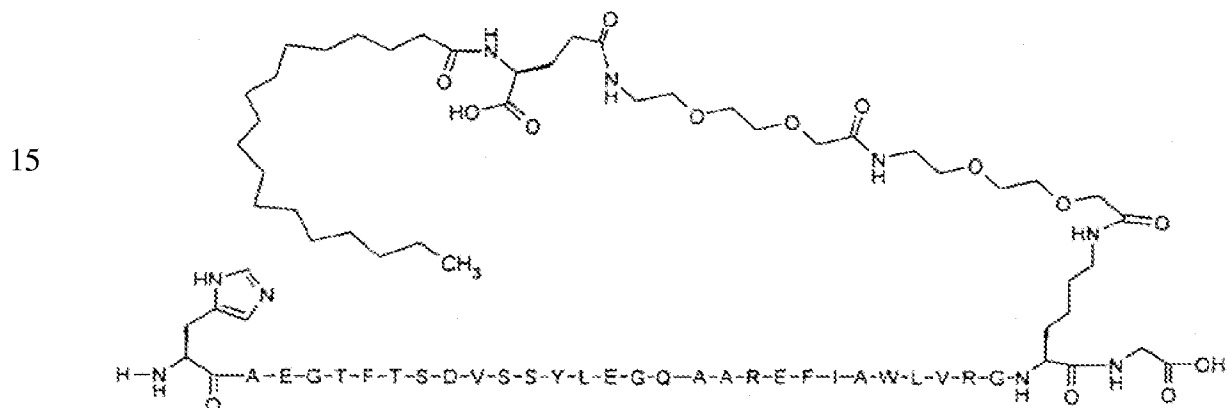
25



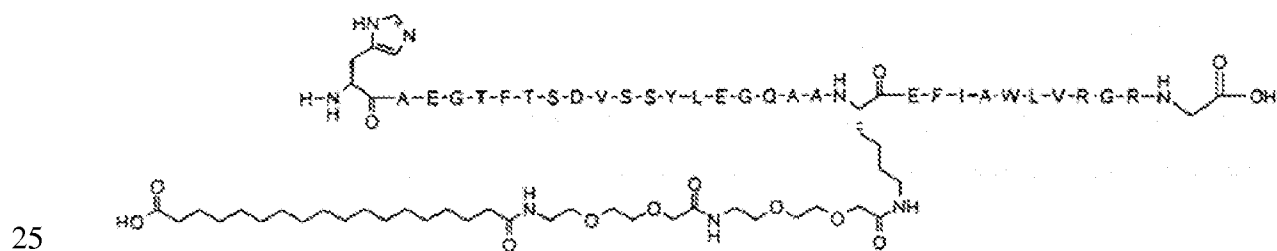
N^{ε20}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)acetylamino)etoksy)-
etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)[Lys²⁰] eksendin-4 (1-39)amid



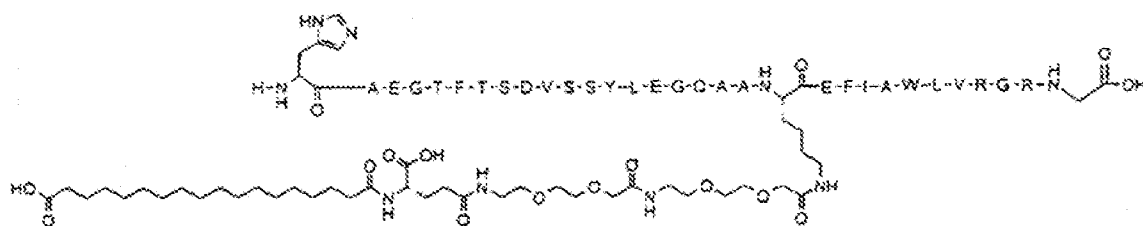
N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-
etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)



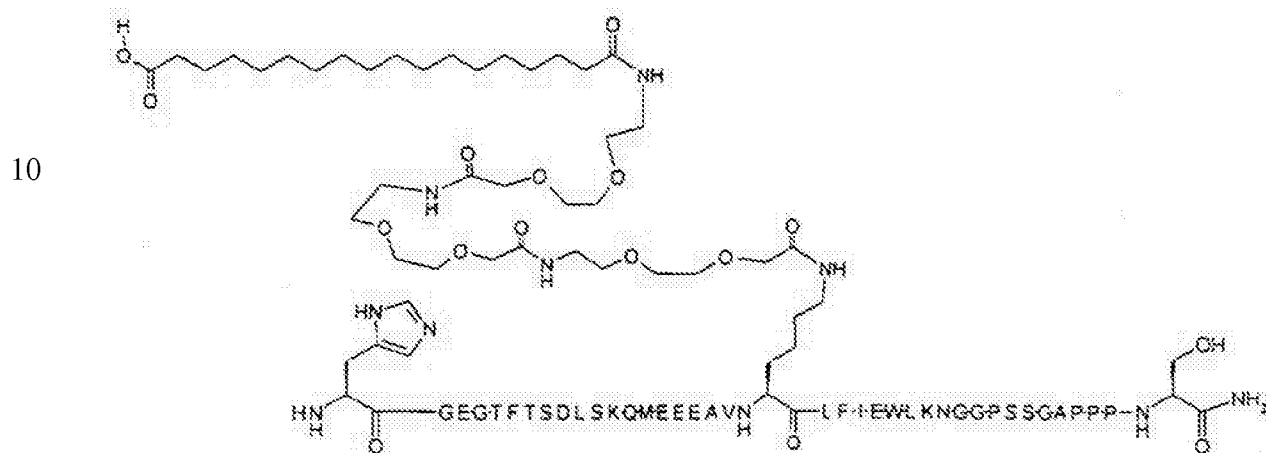
20 N^{ε26}-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy]etoksy)-
acetylamino]etoksy)etoksy]acetyl)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH



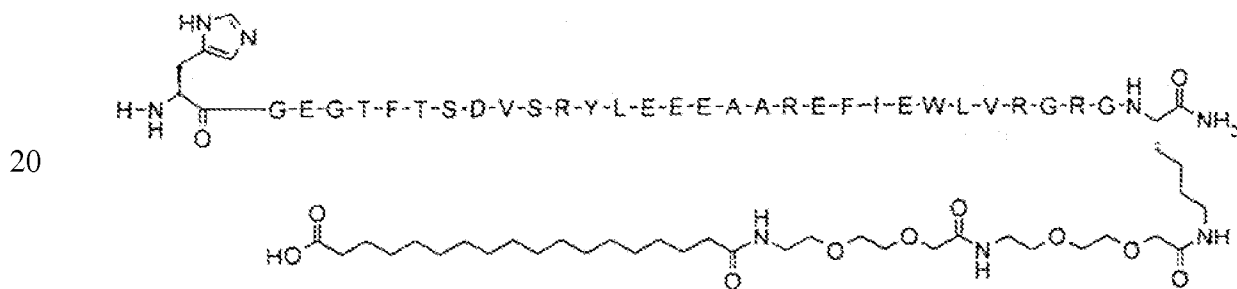
N^{ε26}-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-karboksyheptadekanoylamino)-4(S)-
karboksybutyrylamino]etoksy]acetylamino)etoksy]etoksy)acetyl)][Arg³⁴]GLP-1-(7-
37)-OH



- 5 N^{ε20}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)-
acetylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)[Lys²⁰] eksendin-4 (1-
39) amid



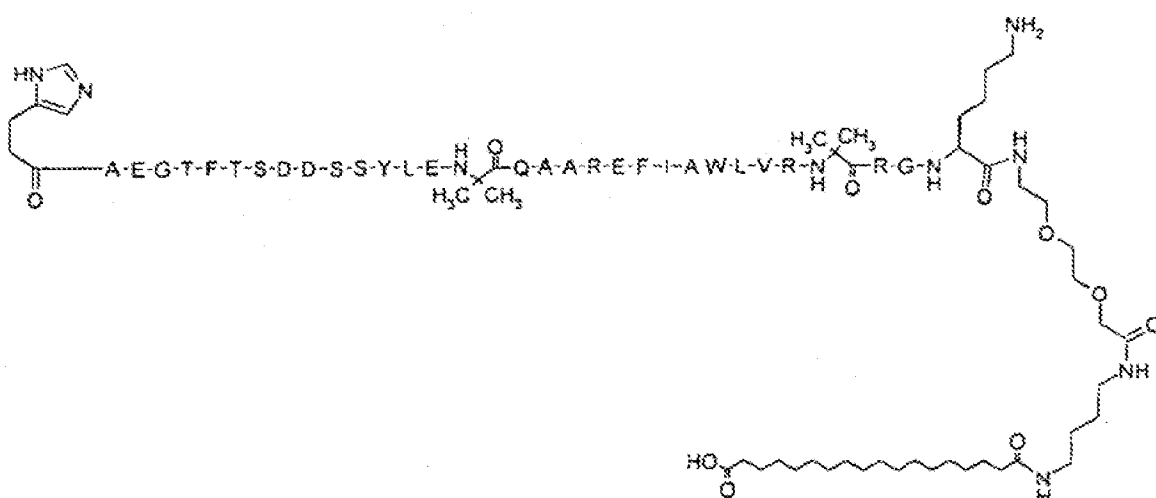
- 15 [Gly⁸,Glu^{22,23,30},Arg^{18,26,34}]GLP1 (7-37) Lys(2-(2-(2-(2-(2-(17-
karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy))etoksy)acetyl-
NH₂



- [imidazolylpropionsyre⁷, Asp¹⁶, Aib^{22,35}]GLP1(7-37)Lys NH((2-{[4-(17-karboksyheptadekanoylamino)butylkarbamoyl]metoksy}etoksy)etoksy))

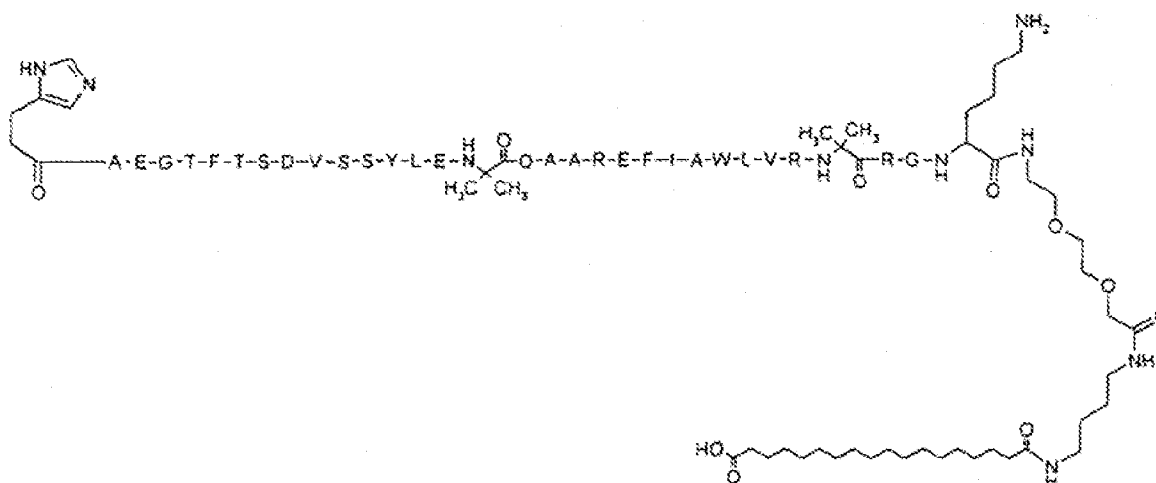
- 25

5



10 [imidazolylpropionsyre⁷, Aib^{22,35}]GLP1(7-37)Lys NH((2-{[4-(17-
karboksyheptadekanoylamino)butylkarbamoyl]metoksy}etoksy)etoksy))

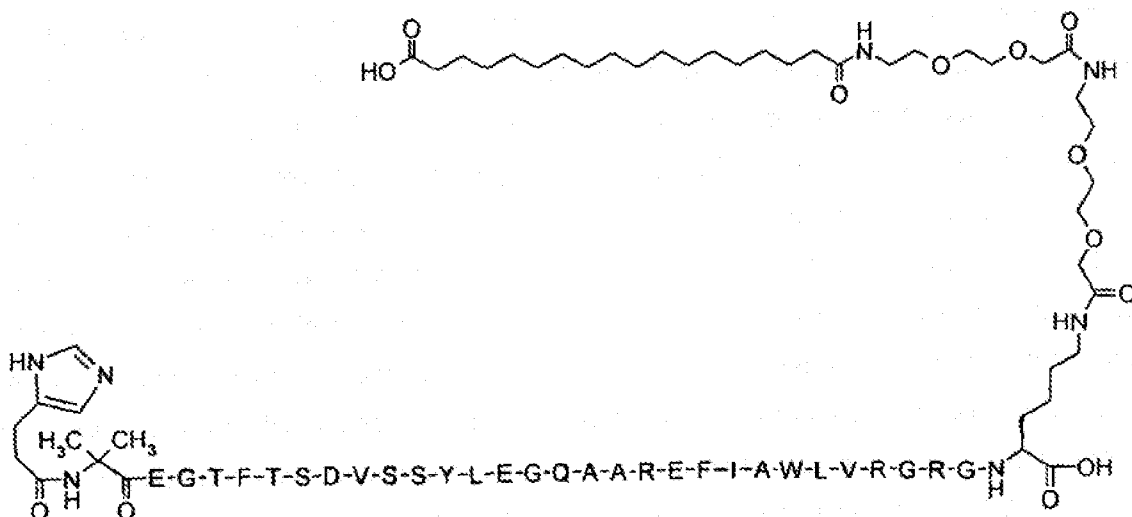
15



20 ' og

20 [3-(5-imidazolyl)propionyl⁷, Aib⁸, Arg^{26,34}] GLP-1 (7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-
karboksyheptanoylamino)etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH

25



I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet et GLP-2-peptid.

I en annen utførelse er GLP-2-peptidet et DPPIV-beskyttet GLP-2-peptid.

I en annen utførelse er GLP-2-peptidet Gly²-GLP-2(1-33).

I en ytterligere utførelse er GLP-2-peptidet Lys¹⁷Arg³⁰-GLP-2(1-33).

- 5 I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet humant insulin eller en analog av dette.

I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet valgt fra gruppen bestående av Asp^{B28}-humant insulin, Lys^{B28}, Pro^{B29}-humant insulin, Lys^{B3}, Glu^{B29}-humant insulin, Gly^{A21}, Arg^{B31}, Arg^{B32}-humant insulin og des(B30)-humant insulin.

- 10 I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet et humant veksthormon eller en analog av dette.

I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet et paratyroid hormon eller en analog av dette.

- 15 I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet et humant follikkelstimulerende hormon eller en analog av dette.

I en annen utførelse har det terapeutiske polypeptidet en molekylvekt som er mindre enn 100 kDa, mindre enn 50 kDa eller mindre enn 10 kDa.

- 20 I en annen utførelse er det terapeutiske polypeptidet valgt fra gruppen bestående av en vekstfaktor så som en blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktor α (TGF- α), transformerende vekstfaktor β (TGF- β), epidermal vekstfaktor (EGF), vaskulær endotelisk vekstfaktor (VEGF), et somatomedin så som insulinvekstfaktor I (IGF-I), insulinvekstfaktor II (IGF-II), erythropoietin (EPO), trombopoietin (TPO) eller angiopoietin, interferon, pro-urokinase, urokinase, vevsplasminogenaktivator (t-PA), plasminogenaktivatorhemmer 1, plasminogenaktivatorhemmer 2, von Willebrandt-faktor, et cytokin, for eksempel et interleukin så som interleukin (IL) 1, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20 eller IL-21, en kolonistimulerende faktor (CFS) så som GM-CSF, stamcellefaktor, en tumornekrosefaktor så som TNF- α , lymfotoksin- α , lymfotoksin- β , CD40L eller CD30L, en proteasehemmer, for eksempel aprotinin, et enzym så som superoksiddismutase, asparaginase, arginase, arginindeaminase, adenosindeaminase, ribonuklease, katalase, urikase, bilirubinoksidase, trypsin, papain, alkalisk fosfatase, β -glukoronidase, purinnukleosidfosforylase eller batroksobin, et opioid, for eksempel endorfiner, enkefaliner eller ikke-naturlige opioider, et hormon eller neuropeptid, for eksempel kalsitonin, glukagon, gastriner, adrenokortikotropisk hormon (ACTH),
- 25
- 30
- 35

- kolecystokininer, luteniserende hormon, gonadotropinfrigjørende hormon, korionisk gonadotropin, kortikotrofinfrigjørende faktor, vasopressin, oksytocin, antidiuretiske hormoner, tyroidstimulerende hormon, tyrotropinfrigjørende hormon, relaksin, prolaktin, peptid YY, neuropeptid Y, pankreatisk polypeptid, leptin, CART (kokain- og amfetaminregulert transkript), et CART-relatert peptid, perilipin, melanokortiner (melanocytstimulerende hormoner) så som MC-4, melaninkonsentrerende hormoner, natriuretiske peptider, adrenomedullin, endotelin, sekretin, amylin, vasoaktivt intestinalt peptid (VIP), hypofyseadenylatsyklaseaktiverende polypeptid (PACAP), bombesin, bombesinlignende peptider, tymosin, heparinbindende protein, løselig CD4, hypotalmisk frigjørende faktor, melatonin og analoger av disse.
- I et annet aspekt angår oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning som omfatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen og et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel.
- I en utførelse er den farmasøytiske sammensetningen egnet for parenteral administrering.
- I et annet aspekt angår oppfinnelsen bruken av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et medikament.
- I en utførelse av oppfinnelsen blir en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen, hvor det terapeutiske polypeptidet er et GLP-1-peptid, brukt for fremstillingen av et medikament for behandling eller forebygging av hyperglykemi, type 2 diabetes, svekket glukosetoleranse, type 1 diabetes, overvekt, hypertensjon, syndrom X, dyslipidemi, kognitive lidelser, aterosklerose, myokardialt infarkt, koronar hjertesykdom og andre kardiovaskulære lidelser, slag, inflammatorisk tarmsyndrom, dyspepsi og magesår.
- I en annen utførelse av oppfinnelsen blir en forbindelse ifølge oppfinnelsen, hvor det terapeutiske polypeptidet er et GLP-1-peptid, brukt for fremstillingen av et medikament for å forsinke eller for å forebygge sykdomsprogresjon i type 2 diabetes.
- I en annen utførelse av oppfinnelsen blir en forbindelse ifølge oppfinnelsen, hvor det terapeutiske polypeptidet er et GLP-1-peptid, brukt for fremstillingen av et medikament for å minske matinntaket, minske β -celleapoptose, øke β -cellefunksjon og β -cellemasse og/eller for å gjenopprette glukosefølsomhet for β -celler.

Heri beskrives en forbindelse hvor det terapeutiske polypeptidet er et GLP-2-peptid, brukt for fremstillingen av et medikament for behandling av tynntarmsyndrom, inflammatorisk tarmsyndrom eller Crohns sykdom.

- 5 Heri beskrives en forbindelse hvor det terapeutiske polypeptidet er et insunlinpeptid, brukt for fremstillingen av et medikament for behandling eller for å forebygge hyperglykemi, type 1 diabetes, type 2 diabetes eller β -cellesvikt.

- 10 Det terapeutiske polypeptidet kan fremstilles ved en fremgangsmåte som omfatter å dyrke en vertscelle som inneholder en DNA-sekvens som koder polypeptidet og som er i stand til å uttrykke polypeptidet i et egnet næringsmedium under betingelser som gjør det mulig å uttrykke peptidet, hvorefter det resulterende peptidet innvinnes fra kulturen.

- 15 Det medium som brukes for å dyrke cellene kan være ethvert vanlig kjent medium som er egnet for dyrking av vertscellene så som minimale eller komplekse media som inneholder passende tilsetninger. Egnede medier er tilgjengelige fra kommersielle kilder eller kan fremstilles ved å følge publiserte oppskrifter (for eksempel i katalogene til American Type Culture Collection). Peptidet som blir fremstilt av cellene kan så innvinnes fra dyrkningsmediet ved hjelp av vanlige fremgangsmåter som inkluderer å skille vertscellene fra mediet ved sentrifugering eller filtrering, utfelle de proteinholdige komponentene fra supernatantene eller 20 filtratet ved hjelp av et salt, for eksempel ammoniumsulfat, rensing ved forskjellige kromatografiske metoder, for eksempel ionutbyttingskromatografi, gelfiltreringskromatografi, affinitetskromatografi eller lignende, avhengig av det angjeldende peptidet.

- 25 DNA-sekvensen som koder det terapeutiske polypeptidet kan egnet være av genomisk eller cDNA-opprinnelse, for eksempel oppnådd ved å fremstille et genomisk eller cDNA-bibliotek og så screene for DNA-sekvenser som koder hele eller en del av polypeptidet ved hybridisering ved å bruke syntetiske oligonukleotidprober ved å bruke standardteknikker (se for eksempel Sambrook, J, Fritsch, EF og Maniatis, T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). DNA-sekvensen som koder polypeptidet kan også fremstilles syntetisk ved hjelp av standardmetoder, for eksempel den fosfoamidittmetoden som er beskrevet av Beaucage og Caruthers, *Tetrahedron Letters* **22** (1981), 1859-1869 eller den fremgangsmåten som er beskrevet av Matthes *et al.*, *EMBO Journal* **3** (1984), 801-805. DNA-sekvensen kan 35 også fremstilles ved polymerasekjedereaksjoner ved å bruke spesifikke primere, for eksempel de som er beskrevet i US 4,683,202 eller Saiki *et al.*, *Science* **293** (1988), 487-491.

DNA-sekvensen kan innsettes i enhver vektor som hensiktsmessig så kan underkastes rekombinante DNA-prosedyrer og valget av vektor vil ofte være

avhengig av den vertscelle i hvilken vektoren skal innføres. Vektoren kan således være en autonom replikerende vektor, det vil si en vektor som eksisterer som en ekstrakromosomal enhet, og hvis replikasjon er uavhengig av den kromosomale replikasjonen, for eksempel et plasmid. Alternativt kan vektoren være en som når

5 den innføres i en vertscelle blir integrert i vertscellens genom og replikeres sammen med den eller de kromosomer i hvilke vektoren er blitt integrert.

Vektoren er fortrinnsvis en ekspresjonsvektor hvor DNA-sekvensen som koder peptidet er operativt forbundet med ytterligere segmenter som er nødvendige for transkripsjon av nevnte DNA så som en promoter. Promoteren kan være enhver

10 DNA-sekvens som har transkriberende aktivitet i den valgte vertscellen og kan være avledet fra gener som koder proteiner som enten er homologe eller heterologe i forhold til vertscellen. Eksempler på egnede promotere som styrer transkriberingen av det DNA som koder peptidet ifølge den foreliggende oppfinnelsen i en rekke forskjellige vertsceller, er velkjente innenfor bioteknologien, se for eksempel

15 Sambrook *et al.*, *supra*.

DNA-sekvensen som koder peptidet kan også, hvis det er nødvendig, være operativt forbundet med en egnet terminator, polyadenyleringssignaler, transkriberende forsterkersekvenser og translaterende forsterkersekvenser. Den rekombinante vektoren beskrevet heri kan ytterligere omfatte en DNA-sekvens som gjør at

20 vektoren kan replikere seg i den angjeldende vertscellen.

Vektoren kan også omfatte en selekterbar markør, for eksempel et gen hvis produkt komplementerer en svikt i vertscellen eller et som gir resistens mot et medikament, for eksempel ampicillin, kanamycin, tetrasyklin, kloramfenikol, neomycin, hygromycin eller metotreksat.

25 For å styre et grunnpeptid i det sekretoriske sporet eller reaksjonsveien i vertscellene, kan en sekretorisk signalsekvens (også kjent som ledersekvens, preprosekvens eller presekvens) være tilveiebrakt i den rekombinante vektoren. Den sekretoriske signalsekvensen blir knyttet til DNA-sekvensen som koder peptidet i den riktige leserammen. Sekretoriske signalsekvenser blir vanligvis plassert 5' til

30 DNA-sekvensen som koder peptidet. Den sekretoriske signalsekvensen kan være den som normalt er forbundet eller assosiert med peptidet eller kan være fra et gen som koder et annet utskilt protein.

De fremgangsmåter som brukes for å ligere DNA-sekvensene som koder det foreliggende peptidet, promoteren og eventuelt terminator- og/eller den sekretoriske signalsekvensen henholdsvis, og for å innsette dem i egnede vektorer som

35 inneholder den nødvendige informasjonen for replikasjon, er velkjente for personer med faglig innsikt i bioteknologi (se for eksempel Sambrook *et al.*, *supra*).

- Den vertscelle i hvilken DNA-sekvensen eller den rekombinante vektoren skal innføres kan være enhver celle som er i stand til å produsere det foreliggende peptidet og inkluderer bakterier, gjær, sopp og høyere eukaryote celler. Eksempler på egnede vertsceller er velkjente innenfor bioteknologien og er, uten begrensning,
- 5 *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* eller pattedyr BHK- eller CHO-cellelinjer.

Eksempler på forbindelser som kan brukes som GLP-1-grupper er beskrevet i internasjonal patentsøknad nr. WO 87/06941 (The General Hospital Corporation) som angår et peptidfragment som omfatter GLP-1(7-37) og funksjonelle derivater av dette og dets anvendelse som et insulinotropisk middel.

- 10 Ytterligere GLP-1-analoger er beskrevet i internasjonal patentsøknad nr. 90/11296 (The General Hospital Corporation) som angår peptidfragmenter som omfatter GLP-1(7-36) og funksjonelle derivater av dette, og med en insulinotropisk aktivitet som overstiger den insulinotropiske aktiviteten til GLP-1(1-36) eller GLP-1(1-37) og deres anvendelse som insulinotropiske midler.
- 15 Internasjonal patentsøknad nr. 91/11457 (Buckley *et al.*) beskriver analoger av aktive GLP-1-peptider 7-34, 7-35, 7-36 og 7-37 som også kan brukes som GLP-1-grupper.

Farmasøytiske sammensetninger

- 20 Farmasøytiske sammensetninger som inneholder en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fremstilles ved vanlig kjent teknikk, for eksempel som beskrevet i Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 1985 eller i Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19. utgave, 1995.

- 25 Det er en hensikt å tilveiebringe en farmasøytisk formulering som omfatter en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen og som er tilstede i en konsentrasjon på fra omtrent 0,1 mg/ml til omtrent 25 mg/ml og hvor nevnte formulering har en pH på fra 2,0 til 10,0. Den farmasøytiske formuleringen kan omfatte en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen og som er tilstede i en konsentrasjon på fra omtrent 0,1 mg/ml til omtrent 50 mg/ml, og hvor nevnte formulering pH på fra 2,0 til 10,0. Formuleringen kan ytterligere omfatte et
- 30 buffersystem, konserveringsmidler, ett eller flere isotoniseringsmidler, gelaterende midler, stabilisatorer og overflateaktive midler. I en utførelse er den farmasøytiske formuleringen en vandig formulering, det vil si en formulering som omfatter vann. En slik formulering er typisk en løsning eller en suspensjon. I en ytterligere
- 35 utførelse er den farmasøytiske formuleringen en vandig løsning. Begrepet "vandig formulering" er her definert som en formulering som omfatter minst 50% vekt/vekt vann. På lignende måte er begrepet "vandig løsning" definert som en løsning som omfatter minst 50% vekt/vekt vann og begrepet "vandig suspensjon" er definert som en suspensjon som omfatter minst 50% vekt/vekt vann.

I en annen utførelse er den farmasøytiske formuleringen en frysetørket formulering hvor legen eller pasienten tilsetter løsemidler og/eller fortynningsmidler før bruk.

I en annen utførelse er den farmasøytiske formuleringen en tørket formulering (for eksempel frysetørket eller forstøvningstørket) som er ferdig til bruk uten foregående oppløsning.

5

Beskrevet heri er en farmasøytisk formulering som omfatter en vandig løsning av en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen og en buffer hvor nevnte forbindelse er tilstede i en konsentrasjon fra omtrent 0,1 mg/ml eller over, og hvor nevnte formulering har en pH fra omtrent 2,0 til omtrent 10,0.

10

Beskrevet heri er en farmasøytisk formulering som omfatter en vandig løsning av en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen og en buffer hvor nevnte forbindelse er tilstede i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml og over, og hvor nevnte formulering har en pH fra omtrent 7,0 til 8,5.

15

Formuleringens pH valgt fra listen som består av 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 og 10,0.

20

Formuleringens pH er fortrinnsvis minst 1 pH-enhet fra det isoelektriske punktet for forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen, eller enda mer foretrukket så er formuleringens pH minst 2 pH-enheter fra det isoelektriske punktet for forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

25

Bufferen utvalgt fra gruppen bestående av natriumacetat, natriumkarbonat, citrat, glysylglysin, histidin, glysin, lysin, arginin, natriumdihydrogenfosfat, dinatriumhydrogenfosfat, natriumfosfat og tris(hydroksymetyl)aminometan, hepes, bicin, tricin, malinsyre, succinat, maleinsyre, fumarsyre, tartarsyre, aspartinsyre eller blandinger av disse. Hver enkelt av disse spesifikke buffere utgjør en alternativ utførelse.

30

I en ytterligere utførelse omfatter formuleringen et farmasøytisk akseptabelt konserveringsmiddel. Konserveringsmiddelet er valgt fra gruppen bestående av fenol, o-kresol, m-kresol, p-kresol, metyl p-hydroksybenzoat, propyl p-hydroksybenzoat, 2-fenoksyetanol, butyl p-hydroksybenzoat, 2-fenyletanol, benzylalkohol, etanol, klorbutanol og timerosal, bronopol, benzosyre, imidurea, klorheksidin, natriumdehydroacetat, klorkresol, etyl p-hydroksybenzoat,

35

benzetoniumklorid, klorfenesin (3p-klorfenoksypropan-1,2-diol) eller blandinger av disse. Konserveringsmiddelet er tilstede i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml til 30 mg/ml. Konserveringsmiddelet er tilstede i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml til 20 mg/ml. Konserveringsmiddelet er tilstede i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml til 5

mg/ml. Konserveringsmiddelet er tilstede i en konsentrasjon fra 5 mg/ml til 10 mg/ml. Konserveringsmiddelet tilstede i en konsentrasjon fra 10 mg/ml til 20 mg/ml. Hver enkelt av disse spesifikke konserveringsmidlene utgjør en alternativ utførelse. Bruken av et konserveringsmiddel i farmasøytiske sammensetninger er velkjente innenfor den farmasøytiske industrien. Hensiktsmessig kan det refereres til Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19. utgave, 1995.

Formuleringen beskrevet heri kan videre omfatte et isotont middel. I en ytterligere utførelse er det isotone middelet valgt fra gruppen bestående av et salt (for eksempel natriumklorid), et sukker eller sukkeralkohol, en aminosyre (for eksempel L-glysin, L-histidin, arginin, lysin, isoleukin, aspartinsyre, tryptofan, treonin), en alditol (for eksempel glyserol (glyserin), 1,2-propandiol (propylenglykol), 1,3-propandiol, 1,3-butandiol), polyetylglykol (for eksempel PEG400) eller blandinger av disse. Ethvert sukker så som mono-, di- eller polysakkarider eller vannløselige glukaner, for eksempel fruktose, glukose, mannose, sorbose, xylose, maltose, laktose, sukrose, trehalose, dekstran, pullulan, dekstrin, syklodekstrin, løselig stivelse, hydroksyetylstivelse og karboksymetylcellulose-Na kan brukes. I en utførelse er sukkeradditivet sukrose. En sukkeralkohol er definert som et C4-C8-hydrokarbon med minst én -OH-gruppe og inkluderer for eksempel mannitol, sorbitol, inositol, galasitol, dulcitol, xylitol og arabitol. I en utførelse er sukkeralkoholadditivet mannitol. De sukkere og sukkeralkoholer som er nevnt ovenfor kan brukes individuelt eller i kombinasjon. Det er ingen fast grense med hensyn til den anvendte mengden, så lenge sukkeret eller sukkeralkoholen er løselig i det flytende preparatet og ikke skadelig påvirker de stabiliseringseffekter som oppnås ved å bruke fremgangsmåter beskrevet heri. I en utførelse er sukker- eller sukkeralkoholkonsentrasjonen mellom omtrent 1 mg/ml og omtrent 150 mg/ml. I en ytterligere utførelse er det isotone middelet tilstede i en konsentrasjon fra omtrent 1 mg/ml til 50 mg/ml. I en ytterligere utførelse er det isotone middelet tilstede i en konsentrasjon fra omtrent 1 mg/ml til 7 mg/ml. I en ytterligere utførelse er det isotone middelet tilstede i en konsentrasjon fra omtrent 8 mg/ml til 24 mg/ml. I en ytterligere utførelse er det isotone middelet tilstede i en konsentrasjon fra omtrent 25 mg/ml til 50 mg/ml. Hvert av disse spesifikke isotone midlene utgjør en alternativ utførelse. Bruken av et isotont middel i farmasøytiske sammensetninger er velkjent innenfor den farmasøytiske industrien. Av hensiktsmessighetsgrunner refereres det til Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19. utgave, 1995.

Formuleringen beskrevet heri omfatter videre et gelaterende middel. Det gelaterende middelet er valgt fra salter av etyldiamintetraeddiksyre (EDTA), sitronsyre og aspartinsyre og blandinger av disse. I en ytterligere utførelse er gelateringsmiddelet tilstede i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml til 5 mg/ml. I en ytterligere utførelse er gelateringsmiddelet tilstede i en konsentrasjon fra 0,1 mg/ml

til 2 mg/ml. I en ytterligere utførelse er gelateringsmiddelet tilstede i en konsentrasjon fra 2 mg/ml til 5 mg/ml. Hvert enkelt av disse spesifikke gelateringsmidlene utgjør en alternativ utførelse. Bruken av et gelaterende midler i farmasøytiske sammensetninger er velkjent innenfor den farmasøytiske industrien.

- 5 Av hensiktsmessighetsgrunner refereres det til Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19. utgave, 1995.

- I en ytterligere utførelse omfatter formuleringen beskrevet heri videre en stabilisator. Bruken av en stabilisator i farmasøytiske sammensetninger er velkjent innenfor den farmasøytiske industrien. Av hensiktsmessighetsgrunner refereres det
10 til Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19. utgave, 1995.

- Mer spesielt er sammensetninger beskrevet heri stabiliserte flytende farmasøytiske sammensetninger hvis terapeutisk aktive komponenter inkluderer et polypeptid som muligens kan oppvise aggregatdannelse under lagring i de flytende farmasøytiske formuleringene. Med begrepet "aggregatdannelse" forstås en fysisk interaksjon
15 mellom polypeptidmolekylene som resulterer i dannelse av oligomerer som kan forbli løselige eller som kan opptre som store synlige aggregater som utfelles fra løsningen. Begrepet "under lagring" betyr at en flytende farmasøytisk sammensetning eller formulering, så snart den er fremstilt, ikke umiddelbart blir administrert en pasient. Snarere vil den etter fremstilling bli pakket for lagring,
20 enten i flytende form, i frosset tilstand eller i tørket form for senere rekonstituering i en flytende form eller en annen form som er egnet for administrering til en pasient. Med "tørket form" forstås at den flytende farmasøytiske sammensetningen eller formuleringen blir tørket, enten ved frysetørking (se for eksempel Williams og Polli (1984) *J. Parental Sci. Technol.* 38: 48-59), forstøvningstørking (se Masters (1991) i
25 *Spray-Drying Handbook* (5. utgave; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), sidene 491-676; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18: 1169-1206; og Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11: 12-29) eller lufttørking (Carpenter og Crowe (1988) *Cryobiology* 25: 459-470; og Roser (1991) *Biopharm.* 4: 47-53). Aggregatdannelse av et polypeptid under lagring av en flytende
30 farmasøytisk sammensetning kan skadelig påvirke polypeptidets biologiske aktivitet og resultere i et tap av den terapeutiske effekten av den farmasøytiske sammensetningen. Videre kan aggregatdannelse forårsake andre problemer så som blokkering av rør, membraner og pumper når den polypeptidholdige farmasøytiske sammensetningen administreres ved hjelp av et infusjonssystem.
- 35 De farmasøytiske sammensetningene beskrevet heri kan videre omfatte en mengde av en aminosyrebase som er tilstrekkelig til å minske aggregatdannelsen av polypeptidet under lagring av sammensetningen. Med begrepet "aminosyrebase" forstås en aminosyre eller en kombinasjon av aminosyrer hvor enhver gitt aminosyre er tilstede enten i sin frie baseform eller saltform. Når det brukes en
40 kombinasjon av aminosyrer, så kan alle aminosyrene være tilstede i sine frie

baseformer, alle kan være tilstede i sine saltformer, eller noen kan være tilstede i sine frie baseformer mens andre er tilstede i sine saltformer. I en utførelse er de aminosyrer som brukes for fremstilling av sammensetningene de som har en ladet sidekjede så som arginin, lysin, aspartinsyre og glutaminsyre. I en utførelse er den aminosyren som brukes for fremstilling av sammensetninger glysin. Enhver stereoisomer (det vil si L eller D) av en spesiell aminosyre (for eksempel metionin, histidin, imidazol, arginin, lysin, isoleukin, aspartinsyre, tryptofan, treonin og blandinger av disse) eller kombinasjoner av disse isomerene, kan være tilstede i de farmasøytiske sammensetningene så lenge den spesielle aminosyren som er tilstede enten er i sin frie baseform eller i sin saltform. I en utførelse blir L-stereoisomeren brukt. Sammensetninger som beskrevet heri kan også formuleres med analoger av disse aminosyrene. Med "aminosyreanalog" forstås et derivat av den naturlig forekommende aminosyren som frembringer den forønskede effekt ved å nedsette aggregatdannelsen av polypeptidet under lagringen av de flytende farmasøytiske sammensetningene. Egnede argininanaloger inkluderer for eksempel aminoguanidin, ornitin og N-monoetyl L-arginin, egnede metioninanaloger inkluderer etionin og butionin og egnede cysteinanaloger inkluderer S-metyl-L-cystein. Som med de andre aminosyrene, kan aminosyreanalogene inkorporeres i sammensetningene enten i sin frie baseform eller i sin saltform. I en ytterligere utførelse blir aminosyrene eller aminosyreanalogene brukt i en konsentrasjon som er tilstrekkelig til å forebygge eller å forsinke aggregering av proteinet.

I en ytterligere utførelse beskrevet heri kan metionin (eller andre egnede svovelholdige aminosyrer eller aminosyreanaloger) tilsettes for å hemme oksidasjon av metioninrestene til metionsulfoksid når det polypeptidet som virker som det terapeutiske middelet er et polypeptid som omfatter minst én metioninrest som er følsom for slik oksidasjon. Med "hemme" forstås en minimal akkumulering av metioninoksiderte forbindelser over tid. Hemming av metioninoksidasjon resulterer i bedre retensjon av polypeptidet i dets passende molekylære form. Enhver stereoisomer av metionin (L, D eller en blanding av disse) kan brukes. Den mengden som tilsettes bør være tilstrekkelig til å hemme oksidasjon av metioninrestene slik at mengden av metioninsulfoksid er akseptabel for de regulerende myndigheter. Typisk betyr dette at sammensetningen ikke inneholder mer enn omtrent 10% til omtrent 30% metioninsulfoksid. Vanligvis kan dette oppnås ved å tilsette metionin slik at forholdet mellom tilsatt metionin og metioninrester varierer fra omtrent 1:1 til omtrent 1000:1, så som 10:1 til omtrent 100:1.

I en ytterligere utførelse omfatter formuleringen videre en stabilisator valgt fra gruppen av høymolekylære polymerer eller lavmolekylære forbindelser. I en ytterligere utførelse blir stabilisatoren valgt fra polyetylenglykol (for eksempel PEG 3350), polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon, karboksy-/hydroksycellulose

eller derivater av slike (for eksempel HPC, HPC-SL, HPC-L og HPMC), syklodekstriner, svovelholdige stoffer så som monotioglyserol, tioglykolinsyre og 2-metyltioetanol og forskjellige salter (for eksempel natriumklorid). Hver enkelt av disse spesifikke stabilisatorene utgjør en alternativ utførelse.

- 5 De farmasøytiske sammensetningene kan også omfatte ytterligere stabiliserende midler som ytterligere bedrer eller forsterker stabiliteten til et foreliggende terapeutisk aktivt polypeptid. Stabiliserende midler av spesiell interesse inkluderer, men er ikke begrenset til, metionin og EDTA, som beskytter polypeptidet mot metioninoksidasjon og et ikke-ionisk overflateaktivt middel som beskytter
- 10 polypeptidet mot aggregering som er assosiert med frysing-opptining eller mekanisk skjæring.

- I en ytterligere utførelse beskrevet heri omfatter formuleringen videre et overflateaktivt middel. I en ytterligere utførelse er det overflateaktive middelet valgt fra et rensemiddel, etoksylert risinusolje, polyglykolyserte glyserider,
- 15 acetylte monoglyserider, sorbitanfettsyreestere, polyoksypropylen- polyoksyetylenblokkpolymerer (for eksempel poloksamerer så som Pluronic® F68, poloksamer 188 og 407, Triton X-100), polyoksyetylen-sorbitan fettsyreestere, stjerneformet PEO, polyoksyetylen- og polyetylanderivater så som alkylerte og alkoksylerte derivater (tweens, for eksempel Tween-20, Tween-40, Tween-80 og
- 20 Brij-35), polyoksyetylenhydroksystearat, monoglyserider eller etoksylerte derivater av disse, diglyserider og polyoksyetylanderivater av disse, alkoholer, glyserol, lecitiner og fosfolipider (for eksempel fosfatidylserin, fosfatidylkolin, fosfatidyletanolamin, fosfatidylinositol, difosfatidylglyserol og sfingomyelin), derivater av fosfolipider (for eksempel dipalmitoylfosfatidinsyre) og
- 25 lysofosfolipider (for eksempel palmitoyllysofosfatidyl-L-serin og 1-acyl-sn-glysero-3-fosfatestere av etanolamin, colin, serin eller treonin) og alkyl, alkoksy (alkylester), alkoksy (alkyleter) -derivater av lysofosfatidyl og fosfatidylkolin, for eksempel lauroyl- og myristoylderivater av lysofosfatidylcolin, dipalmitoylfosfatidylkolin og modifikasjoner av den polare toppgruppen, det vil si
- 30 koliner, etanolaminer, fosfatidinsyre, seriner, treoniner, glyserol, inositol og positivt ladet DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lysofosfatidylserin og lysofosfatidyltreonin og glyserofosfolipider (for eksempel cefaliner), glyseroglykolipider (for eksempel galaktopyransoid), sfingoglykolipider (for eksempel ceramider, gangliosider), dodecylfosfokolin, høneegglysolecitin,
- 35 fusidinsyrederivater (for eksempel natriumtaurodihydrofusidat, osv.), langkjedede fettsyrer og salter av disse C6-C12 (for eksempel oleinsyre og kaprylsyre), acylkarnitiner og derivater, N^α-acylerte derivater av lysin, arginin eller histidin, eller sidekjedeacylerte derivater av lysin eller arginin, N^α-acylerte derivater av dipeptider som omfatter enhver kombinasjon av lysin, arginin eller histidin og en
- 40 nøytral eller sur aminosyre, N^α-acylerte derivater av tripeptider som omfatter

enhver kombinasjon av en nøytral aminosyre og to ladde aminosyrer, DSS (dukusatnatrium, CAS-registrering nr. [577-11-7]), dokusatkalsium (CAS-registrering nr. [128-49-4]), dokusatkali (CAS-registrering nr. [7491-09-0]), SDS (natriumdodecylsulfat eller natriumlaurylsulfat), natriumkaprylat, colinsyre eller
 5 derivater av denne, gallesyrer og salter av disse og glysin- eller taurinkonjugater, ursodeoksykolinsyre, natriumkolat, natriumdeoksykolat, natriumtaurokolat, natriumglykokolat, N-heksadecyl-N,N-dimetyl-3-ammonio-1-propansulfonat, anioniske (alkylarylsulfonater) monovalente overflateaktive midler, zwitterioniske overflateaktive midler (for eksempel N-alkyl-N,N-dimetylammonio-1-
 10 propansulfonater, 3-kolamido-1-propyldimetylammonio-1-propansulfonat), kationiske overflateaktive midler (kvaternære ammoniumbaser) (for eksempel cetyltrimetylammoniumbromid, cetylpyridiniumklorid), ikke-ioniske overflateaktive midler (for eksempel dodecyl β -D-glukopyranosid), poloksaminer (for eksempel Tetronic's) som er tetrafunksjonelle blokkampolymerer avledet fra en
 15 sekvensmessig addering av propylenoksid og etylenoksid til etylendiamin, eller det overflateaktive middelet kan velges fra gruppen av imidazolinderivater og blandinger av slike. Hvert enkelt av disse spesifikke overflateaktive midlene utgjør en alternativ utførelse.

20 Bruken av et overflateaktivt middel i farmasøytiske sammensetninger er velkjente innenfor den farmasøytiske industrien. Av hensiktsmessighetsgrunner henvises det til Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19. utgave, 1995.

En sammensetning for parenteral administrering av GLP-1-forbindelser kan for eksempel fremstilles som beskrevet i WO 03/002136.

25 Det er også mulig at andre bestanddeler kan være tilstede i den peptidfarmasøytiske formuleringen beskrevet heri. Slike ytterligere bestanddeler kan inkludere fuktemidler, emulgeringsmidler, antioksidanter, volumskapende midler, tonisitetmodifiserende forbindelser, gelateringsmidler, metallioner, oljeaktige bærervæsker, proteiner (for eksempel humant serumalbumin, gelatin eller proteiner) og et zwitterion (for eksempel en aminosyre så som betain, taurin, arginin, glysin,
 30 lysin og histidin). Slike ytterligere bestanddeler må selvsagt ikke skadelig påvirke den generelle stabiliteten til den farmasøytiske formuleringen.

Farmasøytiske sammensetninger som inneholder en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres en pasient som har behov for en slik behandling på flere forskjellige steder, for eksempel topiske steder så som huden
 35 eller slimhinnene, steder hvor man unngår absorpsjon, for eksempel administrering i en arterie, i en vene, i hjertet, foruten steder som innbefatter absorpsjon, for eksempel administrering i huden, under huden eller i en muskel eller i buken.

Administrering av farmasøytiske sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan utføres på mange forskjellige måter, for eksempel lingualt,

sublinguallt, bukkalt, i munnen, oralt, i magen eller i tarmkanalen, nasalt, i lungene, for eksempel gjennom bronkiene og alveoli eller en kombinasjon av slik, epidermalt, dermalt, transdermalt, vaginallt, rektalt, okulært, for eksempel gjennom bindevev, uretalt og parenteralt til pasienter som har behov for en slik behandling.

- 5 Sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres i flere forskjellige doseringsformer, for eksempel som løsninger, suspensjoner, emulsjoner, mikroemulsjoner, multiple emulsjoner, skum, salver, pastaer, plastre, brannsalver, tabletter, belagte tabletter, rensevæsker, kapsler, for eksempel harde gelatinkapsler og myke gelatinkapsler, stikkpiller, rektale kapsler, dråper, geler, sprayer, pulvere,
- 10 aerosoler, inhaleringspreparater, øyedråper, øyesalver, rensevæsker for øyet, vaginale pessarer, vaginale ringer, vaginale salver, injeksjonsløsning, in situ transformerende løsninger, for eksempel in situ geldannelse, in situ herding, in situ utfelling, in situ utkrystallisering, infusjonsløsninger eller ved hjelp av implanteringer.
- 15 Sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan videre opparbeides i, eller festes til, for eksempel gjennom kovalente, hydrofobe eller elektrostatiske interaksjoner, til en medikamentbærer, et medikamentleveringssystem og avanserte medikamentleveringssystemer for ytterligere å bedre stabiliteten til forbindelsen, bedre biotilgjengeligheten, bedre løseligheten, minske skadelige effekter, oppnå
- 20 kronoterapi av velkjent type og for å bedre pasientens aksept av sammensetningen eller enhver kombinasjon av disse. Eksempler på bærere, medikamentleveringssystemer og avanserte medikamentleveringssystemer inkluderer, men er ikke begrenset til, polymerer, for eksempel cellulose og dens derivater, polysakkarider, for eksempel dekstran og derivater, stivelse og derivater,
- 25 poly(vinylalkohol), akrylat- og metakrylatpolymerer, polymelkesyre og polyglykolinsyre og blokkampolymerer av disse, polyetylenglykoler, bærerproteiner, for eksempel albumin, geler, for eksempel termogeldannende systemer, for eksempel blokkampolymere systemer av velkjent type, miceller, liposomer, mikrokuler, nanopartikler, flytende krystaller og dispersjoner av disse,
- 30 L2-fase og dispersjoner av disse, noe som tør være velkjent for personer med faglig innsikt i fasereaksjoner eller forekomst i lipid-vannsystemer, polymere miceller, multiple emulsjoner, selvemulgerende, selvmikroemulgerende, syklodekstriner og derivater av disse og dendrimerer.
- 35 Sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen som kan brukes for formulering av faste, halvfaste, pulveraktige og løsninger for lungeadministrering av forbindelsen kan for eksempel bruke et doseinhaleringsapparat med en måledyse, en tørrpulverinhaleringsanordning eller en forstøvningsanordning, og alle disse anordningene er velkjente innenfor den farmasøytiske industrien.

Sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen er spesifikt brukbare i formuleringer for kontrollerte, vedvarende forlengede, forsinkede eller langsomt frigjørende medikamentleveringssystemer. Mer spesifikt, men ikke begrenset til, sammensetninger som kan brukes ved formuleringen av parenteralt kontrollerende og frigjørende og vedvarende frigjørende systemer (begge systemene fører til en mange gangers reduksjon i antall administreringer), er velkjente for personer med faglig innsikt. Enda mer foretrukket er kontrollert frigjørende eller vedvarende frigjøringsystemer som administreres subkutant. Uten å begrense oppfinnelsens omfang, så omfatter eksempler på brukbare kontrollert frigjørende systemer og sammensetninger hydrogeler, oljeaktige geler, flytende krystaller, polymere miceller, mikrokuler og nanopartikler.

Fremgangsmåter for å fremstille kontrollerte frigjørende systemer som kan brukes for sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, utkrystallisering, kondensering, samutkrystallisering, utfelling, samutfelling, emulgering, dispergering, høytrykks homogenisering, innkapsling, forstøvningstørking, mikroinnkapsling, coacervering, faseseparasjon, løsemiddelfordampning for å få fremstilt mikrokuler, ekstrudering og superkritiske væskeprosesser. I så henseende refereres det generelt til Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., red. Marcel Dekker, New York, 2000) og Drug and the Pharmaceutical Sciences bind 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., red. Marcel Dekker, New York, 2000).

Parenteral administrering kan utføres subkutant, intramuskulært, intraperitonealt eller ved intravenøs injeksjon ved hjelp av en sprøyte, eventuelt ved hjelp av en blyantlignende sprøyte. Alternativt kan parenteral administrering utføres ved hjelp av en infusjonspumpe. En videre mulighet er en sammensetning som kan være en løsning eller suspensjon for administrering av forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen i form av en nasal eller lungespray. En annen mulighet er videre farmasøytiske sammensetninger som inneholder forbindelsen ifølge den foreliggende oppfinnelsen og som kan tilpasses transdermal administrering, for eksempel ved nålefri injeksjon eller fra et plaster, eventuelt et iontoforetisk plaster, eller via en slimhinne, for eksempel bukal administrering.

Begrepet "stabilisert formulering" refererer seg til en formulering med bedret fysisk stabilitet, bedret kjemisk stabilitet eller bedret fysisk og kjemisk stabilitet.

Begrepet "fysisk stabilitet" for en proteinformulering slik dette begrepet brukes her, refererer seg til proteinets tendens til å danne biologisk inaktive og/eller uløselige aggregater av proteinet som et resultat av at proteinet har blitt eksponert for varmemekanisk stress og/eller interaksjon med indre overflater eller overflater som er destabiliserende så som hydrofobe overflater og interfaser. Fysisk stabilitet for vandige proteinformuleringer kan bedømmes ved hjelp av visuell undersøkelse

og/eller turbiditetsmålinger etter at formuleringen i egnede beholdere (for eksempel patroner eller sprøyter) har vært eksponert for mekanisk/fysisk stress (for eksempel røring) ved forskjellige temperaturer i forskjellige tidsrom. Visuell undersøkelse av formuleringene utføres i et skarpt fokusert lys mot en mørk bakgrunn.

- 5 Formuleringens turbiditet karakteriseres ved en visuell score hvor graden av turbiditet varierer på en skala fra 0 til 3 (en formulering hvor det er ingen turbiditet tilsvarer en visuell score på 0 og en formulering med sterk visuell turbiditet i dagslys tilsvarer en visuell score på 3). En formulering klassifiseres som fysisk ustabil med hensyn til proteinaggregering når den viser visuell turbiditet i dagslys.
- 10 Alternativt kan formuleringens turbiditet bedømmes ved hjelp av enkle turbiditetsmålinger slik disse er kjent for personer med faglig innsikt. Fysisk stabilitet for vandige proteinformuleringer kan også bedømmes ved å bruke et spektroskopisk middel eller en probe på proteinets konformelle status. Proben er fortrinnsvis et lite molekyl som fortrinnsvis binder seg til en ikke-naturlig konform
- 15 utgave av proteinet. Et eksempel på en liten molekylær spektroskopisk probe for oppklaring av proteinstruktur, er til tioflavin T. Tioflavin T er et fluorescerende fargestoff som har vært mye anvendt for påvisning av amyloide fibriller. I nærvær av fibriller og dessuten også muligens andre proteinkonfigurasjoner, vil tioflavin T gi opphav til et nytt eksitasjonsmaksimum på omtrent 450 nm og forsterket
- 20 emulsjon ved omtrent 482 nm når det er bundet til fibrilproteinformen. Ubundet tioflavin T er i alt vesentlig ikke-fluorescerende ved nevnte bølgelengder.

- Andre små molekyler kan brukes som prober for å påvise forandringer i proteinstrukturen fra naturlige til ikke-naturlige tilstander. For eksempel vil "hydrofobe flekk"-prober fortrinnsvis binde seg til eksponerte hydrofobe flekker i et
- 25 protein. De hydrofobe flekkene forekommer generelt inne i proteinets tertiære struktur i dets naturlige tilstand, men blir eksponert når proteinet begynner å folde seg ut eller blir denaturert. Eksempler på disse småmolekylære spektroskopiske probene er aromatiske, hydrofobe fargestoffer så som antracen, akridin, fenantrolin eller lignende. Andre spektroskopiske prober er metall-aminosyrekomplekser så
- 30 som koboltmetallkomplekser av hydrofobe aminosyrer så som fenylalanin, leukin, isoleukin, metionin og valin eller lignende.

- Begrepet "kjemisk stabilitet" for en proteinformulering slik det brukes her, refererer seg til kjemisk kovalente forandringer i proteinstrukturen som fører til dannelse av kjemisk nedbrytningsprodukter med potensielt mindre biologisk styrke og/eller
- 35 potensielt forsterkede immunogene egenskaper sammenlignet med den naturlige proteinstrukturen. Det kan danne seg forskjellige kjemiske nedbrytningsprodukter avhengig av det naturlige proteinets type og natur og det miljø for hvilket proteinet blir eksponert. En fullstendig eliminering av kjemisk nedbrytning vil sannsynligvis ikke kunne oppnås, og økende mengder av kjemiske nedbrytningsprodukter vil ofte
- 40 kunne observeres under lagring og bruk av proteinformuleringen, noe som tør være

velkjent for personer med faglig innsikt. De fleste proteiner er utsatt for deamidering, en prosess hvor sidekjedeaminggruppen i glutaminyll- eller asparaginyllrestene blir hydrolysert slik at det dannes en fri karboksylsyre. Andre nedbrytningsreaksjonsveien innbefatter dannelse av høymolekylære transformeringsprodukter hvor to eller flere proteinmolekyler blir kovalent bundet til hverandre ved transamidering og/eller disulfidinteraksjoner, noe som fører til dannelse av kovalent bundne dimer-, oligomer- og polymernedbrytningsprodukter (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Oksidasjon (for eksempel av metioninrester) kan nevnes som en annen variant av kjemisk nedbrytning. Den kjemiske stabiliteten til proteinformuleringen kan bedømmes ved å måle mengden av kjemiske nedbrytningsprodukter på forskjellige tidspunkter etter eksponering overfor forskjellige miljøbetingelser (dannelsen av nedbrytningsprodukter kan ofte akselereres, for eksempel ved å øke temperaturen). Mengden av hvert enkelt nedbrytningsprodukt blir ofte bestemt ved å skille nedbrytningsproduktene, avhengig av molekulstørrelse og/eller ladning, ved å bruke forskjellige typer kromatografiteknikker (for eksempel SEC-HPLC og/eller RP-HPLC).

Som nevnt ovenfor, så refererer en "stabilisert formulering" seg følgelig til en formulering med bedret fysisk stabilitet, bedret kjemisk stabilitet eller bedret fysisk og kjemisk stabilitet. Generelt må en formulering være stabil under bruk og lagring (i overensstemmelse med anbefalte bruks- og lagringsbetingelser) inntil den dato da den utgår.

I en utførelse er den farmasøytiske formuleringen som omfatter en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen stabil under mer enn 6 ukers bruk og mer enn 3 års lagring.

I en annen utførelse er den farmasøytiske formuleringen som omfatter en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen stabil under mer enn 4 ukers bruk og mer enn 3 års lagring.

I en annen utførelse er den farmasøytiske formuleringen som omfatter en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen stabil under mer enn 4 ukers bruk og mer enn 2 års lagring.

I nok en ytterligere utførelse er den farmasøytiske formuleringen som omfatter forbindelsen stabil under mer enn 2 ukers bruk og mer enn 2 års lagring.

Farmasøytiske sammensetninger som inneholder et GLP-1-derivat ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres parenteralt til pasienter som har behov for en slik behandling. Parenteral administrering kan utføres subkutant, intramuskulært eller ved intravenøs injeksjon ved hjelp av en sprøyte, eventuelt en blyantlignende sprøyte. Alternativt kan parenteral administrering utføres ved hjelp

av en infusjonspumpe. En ytterligere mulighet er at en sammensetning som kan være i pulverform eller i form av en væske for administrering av GLP-1-derivatet, kan være i form av en nese- eller lungespray. En ytterligere mulighet er at GLP-1-derivatene ifølge oppfinnelsen også kan administreres transdermalt, for eksempel fra et plaster, eventuelt et iontoforetisk plaster eller gjennom slimhinnene, for eksempel bukalt.

Injiserbare sammensetninger av GLP-1-derivatet kan således fremstilles ved å bruke vanlig kjente teknikker fra den farmasøytiske industrien som involverer løsning og blanding av bestanddelene slik det passer seg til det forønskede sluttproduktet.

10 Ifølge en fremgangsmåte, blir GLP-1-derivatet løst i en vannmengde som er noe mindre enn sluttvolumet for den sammensetningen som skal fremstilles. Et isotont middel, et konserveringsmiddel og en buffer tilsettes etter behov, hvorefter løsningsens pH-verdi blir justert - hvis dette er nødvendig - ved å bruke en syre, for eksempel saltsyre eller en base, for eksempel vandig natriumhydroksid, etter behov.

15 Endelig blir løsningsens volum justert med vann til den forønskede konsentrasjonen av bestanddelene.

I tillegg til de ovennevnte komponentene, kan løsninger som inneholder et GLP-1-derivat ifølge den foreliggende oppfinnelsen også inneholde et overflateaktivt middel for å bedre GLP-1-derivatets løselighet og/eller stabilitet.

20 En sammensetning for nasal administrering av visse peptider kan for eksempel fremstilles slik det er beskrevet i europeisk patent nr. 272097 (til Novo Nordisk A/S) eller i WO 93/18785.

Ifølge en foretrukket utførelse beskrevet heri, blir GLP-1-derivatet tilveiebrakt i form av en sammensetning som er egnet for administrering ved injeksjon. En slik sammensetning kan enten være en injiserbar løsning som er ferdig til bruk eller det kan være en mengde av en fast sammensetning, for eksempel et frysetørket produkt som må løses i et løsemiddel før det kan injiseres. Den injiserbare løsningen inneholder fortrinnsvis ikke mindre enn omtrent 2 mg/ml, fortrinnsvis ikke mindre enn omtrent 5 mg/ml og mest foretrukket ikke mindre enn omtrent 10 mg/ml av

30 GLP-1-derivatet, og fortrinnsvis ikke mer enn omtrent 100 mg/ml av GLP-1-derivatet.

GLP-1-derivatene ifølge oppfinnelsen kan brukes for behandling av forskjellige sykdommer. Det spesielle GLP-1-derivatet som skal brukes og det optimale dosenivået for enhver pasient vil være avhengig av den sykdom som skal behandles

35 og en rekke andre faktorer som inkluderer effekten av det spesifikke peptidderivatet som brukes, pasientens alder, kroppsvekt, fysiske aktivitet og diett og en mulig kombinasjon av andre medikamenter, foruten graden av den sykdommen som skal

behandles. Det er anbefalt at dosen av GLP-1-derivatet ifølge oppfinnelsen bør bestemmes for hver individuelle pasient av den behandlende legen.

- 5 Spesielt ser man for seg at GLP-1-derivatet kan brukes for fremstillingen av et medikament med forlenget virkningsprofil for behandling av ikke-insulinavhengig diabetes mellitus og/eller for behandling av overvekt.

Et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen angår bruken av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et medikament.

- 10 En utførelse av den foreliggende oppfinnelsen angår bruken av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for behandling av hyperglykemi, type 2 diabetes, svekket glukosetoleranse, type 1 diabetes, overvekt, hypertensjon, syndrom X, dyslipidemi, β -celleapoptose, β -cellesvikt, myokardialt infarkt, inflammatorisk tarmsyndrom, dyspepsi, kognitive lidelser, for eksempel kognitiv forsterkning, nevrobeskyttelse, aterosklerose, koronar hjertesykdom og andre kardiovaskulære lidelser.

- 15 En annen utførelse av den foreliggende oppfinnelsen angår bruken av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et medikament for behandling av tynntarmsyndrom, inflammatorisk tarmsyndrom eller Crohns sykdom.

- 20 En annen utførelse av den foreliggende oppfinnelsen angår bruken av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et medikament for behandling av hyperglykemi, type 1 diabetes, type 2 diabetes eller β -cellesvikt.

- Behandlingen med en forbindelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også kombineres med andre eller flere farmakologisk aktive stoffer, for eksempel valgt fra antidiabetiske midler, midler mot overvekt, appetittregulerende midler, antihypertensive midler, midler for behandling og/eller for å forebygge
- 5 komplikasjoner som er et resultat av eller som er assosiert med diabetes og midler for å behandle og/eller forebygge komplikasjoner og lidelser som er et resultat eller som er assosiert med overvekt. I denne sammenhengen inkluderer uttrykket "antidiabetisk middel" forbindelser for å behandle og/eller å forebygge insulinresistens og sykdommer hvor insulinresistens er den patofysiologiske
- 10 mekanismen.
- Eksempler på disse farmakologisk aktive stoffene er: Insulin, GLP-1-agonister, sulfonylureaforbindelser (for eksempel tolbutamin, glibenklamid, glipizid og gliklazid), biguanider, for eksempel metformin, meglitinider, glukosidasehemmere (for eksempel akorbose), glukagonantagonister, DPP-IV (dipeptidylpeptidase-IV)
- 15 -hemmere, hemmere av nyreenzymer som innbefatter stimulering av glukoneogenese og/eller glykogenolyse, glukoseopptaksmodulatorer, tiazolidindioner så som troglitazon og ciglitazon, forbindelser som modifiserer lipidmetabolismen så som antihyperlipidemiske midler som HMG CoA-hemmere (statiner), forbindelser som svekker matinntaket, RXR-agonister og midler som
- 20 virker på den ATP-avhengige kaliumkanalen i β -cellene, for eksempel glibenklamid, glipizid, gliklazid og repaglinid; kolestyramin, kolestipol, klofibrat, gemfibrozil, lovastatin, pravastatin, simvastatin, probukol, dekstrotyroksin, neteglinid, repaglinid; β -blokkere så som alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol og metoprolol, ACE (angiotensinomdannende enzym) -hemmere så som
- 25 benazepril, kaptopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, kinapril og ramipril, kalsiumkanalblokkere så som infedipin, felodipin, nikardipin, isradipin, nimodipin, diltiazem og verapamil og α -blokkere så som doksazosin, urapidil, prazosin og terazosin; CART (kokainamfetaminregulert transkript) -agonister, NPY (neuropeptid Y) -antagonister, MC4 (melanokortin 4) -agonister,
- 30 oreksinantagonister, TNF (tumornekrosefaktor) -agonister, CRF (kortikotropinfrigjørende faktor) -agonister, CRF BP (kortikotropinfrigjørende faktorbindende protein) -antagonister, urokortinagonister, β 3-agonister, MSH (melanocytstimulerende hormon) -agonister, MCH (melanocyttskonsentrerende hormon) -antagonister, CCK
- 35 (kolecystokinin) -agonister, hemmere av fornyet opptak av serotonin, hemmere av fornyet opptak av serotonin og noradrenalin, blandede serotonin- og noradrenerge forbindelser, 5HT (serotonin) -agonister, bombesinagonister, galaninantagonister, veksthormon, veksthormonfrigjørende forbindelser, TRH (tyreotropinfrigjørende hormon) -agonister, UCP 2 eller 3 (avkoblenende protein 2 eller 3) -modulatorer,
- 40 leptinagonister, DA-agonister (bromkriptin, dopreksin), lipase/amylasehemmere,

RXR (retinoid X-reseptor) -modulatorer, TR β -agonister og histamin H₃-antagonister.

Det skal understrekes at enhver egnet kombinasjon av forbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelsen med en eller flere av de ovennevnte forbindelsene og eventuelt ett eller flere ytterligere farmakologisk aktive stoffer, anses å ligge innenfor den foreliggende oppfinnelsen.

Den foreliggende oppfinnelsen er ytterligere illustrert ved hjelp av de følgende eksemplene, som imidlertid ikke må være å anse som begrensende for oppfinnelsens intensjon som sådan. De trekk og detaljer som er beskrevet i den foregående beskrivelsen og i de etterfølgende eksemplene, vil både separat og i enhver kombinasjon kunne brukes for å realisere oppfinnelsen i dens diverse former.

EKSEMPLER

De følgende akronymer er brukt for kommersielt tilgjengelige kjemikalier:

	DMF	:	N,N-dimetylformamid
15	DCC	:	N,N-disykloheksylkarbodiimid
	NMP	:	N-metyl-2-pyrrolidon
	TFA	:	Trifluoreddiksyre
	THF	:	Tetrahydrofuran
	DIEA	:	Diisopropyletylamin
20	H ₂ O	:	Vann
	CH ₃ CN	:	Acetonitril
	HBTU	:	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluor-fosfat
	Fmoc	:	9H-fluoren-9-ylmetoksykarbonyl
25	Boc	:	Tert-butyloksykarbonyl
	OtBu	:	Tert-butylester
	tBu	:	Tert-butyl
	Trt	:	Trifenylmetyl
	Pmc	:	2,2,5,7,8-pentametylkroman-6-sulfonyl
30	Dde	:	1-(4,4-dimetyl-2,6-dioksosykloheksyliden)etyl
	DCM	:	Diklormetan
	TIS	:	Triisopropylsilan
	Et ₂ O	:	Dietyler
	H-Glu(OH)-OBu ^t : L-glutaminsyre α -tert-butylester		
35	HOOC-(CH ₂) ₁₂ -COONSu:	ω -karboksytridekanoinsyre 2,5-dioksopyrrolidin-1-ylester	
	HOOC-(CH ₂) ₁₄ -COONSu:	ω -karboksypentadekanoinsyre 2,5-dioksopyrrolidin-1-ylester	

HOOC-(CH₂)₁₆-COONSu: ω-karboksyheptadekanoinsyre 2,5-dioksopyrrolidin-1-ylester

HOOC-(CH₂)₁₈-COONSu: ω-karboksynonadekanoinsyre 2,5-dioksopyrrolidin-1-ylester

- 5 r.t. : Romtemperatur
 PDMS : Plasmadesorpsjonsmassespektrometri
 MALDI-MS: Matriseassistert laserdesorpsjon/ioniseringsmassespektrometri
 HPLC : Høytrykks væskekromatografi
 amu : atommasseenheter

10 **Analyse:**

Et peptids resistens mot nedbrytning av dipeptidylaminopeptidase IV ble bestemt ved hjelp av den følgende nedbrytningsprøven:

- 15 Porsjoner av peptidene ble innkubert ved 37°C med en porsjon av rensed dipeptidylaminopeptidase IV i 4-22 timer i en passende buffer ved pH 7-8 (bufferen er ikke albumin). Den enzymatiske reaksjonene ble avsluttet ved å tilsette
 trifluoreddiksyre og peptidnedbrytningsproduktene ble skilt og kvantifisert ved å
 bruke HPLC- eller LC-MS-analyse. En fremgangsmåte for gjennomføring av denne
 analysen er som følger: Blandingene ble påsatt en Zorbax 300SB-C18 (30 nm porer,
 5 µm partikler) 150 x 2,1 mm kolonne og eluert med en strømhastighet på 0,5
 20 ml/minutt med en lineær gradient av acetonitril i 0,1% trifluoreddiksyre (0%-100%
 acetonitril i løpet av 30 minutter). Peptidene og deres nedbrytningsprodukter kan
 kontrolleres ved sin absorpsjon ved 214 nm (peptidbindinger) eller 280 nm
 (aromatiske aminosyrer) og kan kvantifiseres ved integrering av deres toppområder.
 25 Nedbrytningsmønsteret kan bestemmes ved å bruke LC-MS hvor man kan
 bestemme MS-spektrene for den utskilte toppen. Prosenten av hele/nedbrutte
 forbindelser på et gitt tidspunkt kan så brukes for å bedømme peptidenes DPPIV-
 stabilitet.

- 30 Et peptid er definert som DPPIV-stabilisert når det er 10 ganger mer stabilt enn det naturlige peptidet basert på prosenten av den intakte forbindelsen på et gitt
 tidspunkt. En DPPIV-stabilisert GLP-1-forbindelse er således minst 10 ganger mer
 stabil enn GLP-1(7-37).

Generelle syntesemetoder

- 35 Peptidene kan syntetiseres på en Fmoc-beskyttet Rink-amidharpiks (Novabiochem) eller klortritylharpiks eller en tilsvarende harpiks som er egnet for fastfase
 peptidsyntese. Boc-kjemi kan brukes, men det er mer hensiktsmessig å bruke Fmoc-
 strategi, eventuelt i et Applied Biosystems 433A peptidsynteseapparat i en 0,25
 mmol skala ved å bruke FastMoc UV-protokoller som anvender HBTU (2-(1H-

benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorfosfat) -kontrollerte koblinger i N-metylpyrrolidon (N-metylpyrrolidon) (HATU er bedre egnet for hindrede koblinger) og UV-kontroll av avbeskyttelsen av den Fmoc-beskyttende gruppen. Andre koblingsreagenser bortsett fra HBTU og HATU kan også brukes, for eksempel slik det er beskrevet i Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8: 211-221. De beskyttede aminosyrederivatene som brukes kan være standard Fmoc-aminosyrer som leveres i på forhånd oppveide patroner (Applied Biosystems) som er egnet for bruk i ABI433A-synteseapparatet med unntak av unaturlige aminosyrer så som Fmoc-Aib-OH (Fmoc-aminoisosmørsyre) som kan kjøpes fra en fabrikant så som Bachem og overføres til tomme patroner. Den sist tilkoblede aminosyren kan være Boc-beskyttet.

Tilfesting av sidekjeder og linkere til spesifikke lysinrester til det urene harpiksbundne og beskyttede peptidet kan eventuelt innføres i en spesifikk posisjon ved inkorporering av Fmoc-Lys(Dde)-OH under den automatiserte syntesen, fulgt av en selektiv avbeskyttelse med hydrazin. Andre ortogonale beskyttende grupper kan brukes på lysin.

Fremgangsmåte for fjerning av Dde-beskyttelse. Harpiksen (0,25 mmol) kan plasseres i et manuelt riste/filtreringsapparat og behandles med 2% hydrazin i N-metylpyrrolidon (20 ml, 2 x 12 minutter) for å fjerne DDE-gruppen, og deretter vaskes med N-metylpyrrolidon (4 x 20 ml).

Fremgangsmåte for tilknytning av sidekjeder til lysinrester.

Aminosyren (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) kan løses i N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1, 10 ml). Hydroksybenzotriazol (HOBt) (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) og diisopropylkarbodiimid (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) tilsettes, og løsningen røres i 15 minutter. Den tilsettes harpiksen, hvorefter det tilsettes diisopropyletylamin (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen). Harpiksen ristes i 24 timer ved romtemperatur. Den ble så vasket med 2 x 20 ml N-metylpyrrolidon, 2 x 20 ml N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1) og 2 x 20 ml metylenklorid.

Fremgangsmåte for fjerning av Fmoc-beskyttelse: Harpiksen (0,25 mmol) blir plassert i en filterkolbe i et manuelt risteapparat og behandlet med N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1) (2 x 20 ml) og med 20 ml N-metylpyrrolidon og en løsning av 20% piperidin i N-metylpyrrolidon (3 x 20 ml, 10 minutter hver gang). Harpiksen ble så vasket med 2 x 20 ml N-metylpyrrolidon, 2 x 20 ml N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1) og 2 x 20 ml metylenklorid.

Fremgangsmåte for spalting av peptidet fra harpiksen:

Peptidet spaltes fra harpiksen ved røring i 180 minutter ved romtemperatur med en blanding av trifluoreddiksyre, vann og triisopropylsilan (95:2,5:2,5).

- 5 Spaltingsblandingen blir filtrert og filtratet blir konsentrert til en olje ved hjelp av en nitrogenstrøm. Det urene peptidet blir utfelt fra denne oljen med 25 ml dietyleter og så vasket 3 ganger med 45 ml dietyleter.

Rensing: Det urene peptidet kan renses ved semipreparativ HPLC på en 20 mm x 250 mm kolonne pakket med 7 μ C-18-silika. Avhengig av peptidet kan ett av to rensesystemer brukes:

- 10 Ammoniumsulfat: Kolonnen ekvibreres med 40% CH₃CN i 0,05 M (NH₄)₂SO₄ som justeres til pH 2,5 med konsentrert svovelsyre. Etter tørking blir det urene peptidet løst i 5 ml 50% eddiksyre/vann og fortynnet med 20 ml vann og injisert i kolonnen som så blir eluert med en gradient fra 40%-60% CH₃CN i 0,05 M (NH₄)₂SO₄, pH 2,5 med en strømhastighet på 10 ml/minutt i løpet av 50 minutter
- 15 ved 40°C. De peptidholdige fraksjonene blir oppsamlet og fortynnet med 3 volumer vann og ført gjennom en Sep-Pak® C18-patron (Waters delenr. 51910) som er blitt ekvibrert med 0,1% TFA. Peptidet blir så eluert med 70% CH₃CN-holdig 0,1% TFA, hvorefter det rensede peptidet blir isolert ved frysetørking etter fortynning v eluatet med vann.
- 20 FTA: Etter tørking ble det urene peptidet løst i 5 ml 50% eddiksyre H₂O og fortynnet til 20 ml med vann og injisert i kolonnen som så ble eluert med en gradient på 40-60% CH₃CN i 0,1% TFA med en strømhastighet på 10 ml/minutt i løpet av 50 minutter ved 40°C. De peptidholdige fraksjonene ble oppsamlet.

- 25 Det rensede peptidet ble frysetørket etter fortynning av eluatet med vann. Det fremstilte sluttproduktet kan karakteriseres ved analytisk RP-HPLC (retensjonstid) og ved hjelp av LCMS.

- 30 De RP-HPLC-analyser som ble utført som beskrevet i eksperimentavsnittet, ble utført ved å bruke UV-påvisning ved 214 nm og en Vydac 218TP54 4,6 mm x 250 mm 5 μ C-18 silikakolonne (The Separations Group, Hesperia, USA) som ble eluert med en strømhastighet på 1 ml/minutt ved 42°C. De forskjellige elueringsbetingelsene var som følger:

A1: Ekvilibrering av kolonnen med en buffer bestående av 0,1 M (NH₄)₂SO₄ som var justert til pH 2,5 med konsentrert svovelsyre og eluering med en gradient fra 0% til 60% CH₃CN i den samme bufferen i løpet av 50 minutter.

B1: Ekvilibrering av kolonnen med 0,1% TFA/H₂O og eluering med en gradient fra 0% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O til 60% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O i løpet av 50 minutter.

5 B6: Ekvilibrering av kolonnen med 0,1% TFA/H₂O og eluering med en gradient fra 0% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O til 90% CH₃CN/0,1% TFA/H₂O i løpet av 50 minutter.

Et alternativt system er som følger:

10 B4: RP-analysen ble utført ved å bruke et Alliance Waters 2695-system utstyrt med en Waters 2487 dobbeltbåndsdetektor. De fraksjonene som ble UV-påvist ved 214 nm og 254 nm ble oppsamlet ved å bruke en Symmetry300 C18, 5 µm, 3,9 mm x 150 mm kolonne, 42°C. Eluert med en lineær gradient fra 5-95% acetonitril, 90-0% vann og 5% trifluoreddiksyre (1,0%) i vann i løpet av 15 minutter med en strømhastighet på 1,0 ml/minutt.

15 LCMS ble utført med et oppsett som besto av Hewlett Packard-serien 1100 G1312A Bin-pumpe, Hewlett Packard-serien 1100 kolonneavdeling, Hewlett Packard-serie 1100 G1315A DAD diodematrisedetektor, Hewlett Packard-serien 1100 MSD og Sedere 75 fordampende lysspredning som var detektorkontrollert ved hjelp av HP Chemstation-programvaren. HPLC-pumpen var forbundet med to elueringsmiddelholdige reservoarer:

20 A: 0,05% TFA/vann
B: 0,05% TFA/acetonitril

Eller alternativt kan de to systemene være:

A: 10 mM NH₄OH i vann
B: 10 mM NH₄OH i 90% acetonitril

25 Analysen ble utført ved 23°C ved å injisere et passende volum av prøvene (fortrinnsvis 20 µl) inn i kolonnen som ble eluert med en gradient av A og B.

HPLC-betingelsene, detektorinnstillingene og massespektrometerinnstillingene som ble brukt er gitt i den følgende tabellen.

Kolonne	Waters Xterra MS C-18 (50 x 3 mm id 5 µm)
30 Gradient	5%-100% acetonitril lineær i løpet av 6,5 minutter ved en strømhastighet på 1,5 ml/minutt

Påvisning 210 nm (analogt uttak fra DAD)

ELS (analogt uttak fra ELS)

MS-ioniseringsmetode API-ES, skann 550-1500 amu trinn 0,1 amu.

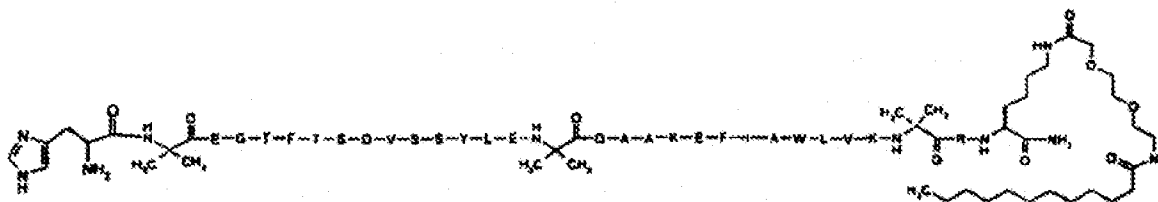
Alternativt kan LC-MS-analysen utføres i et PE-Sciex API 100 massespektrometer utstyrt med to Perkin Elmer serie 200 mikropumper, en Perkin Elmer serie 200 automatisk prøveoppsamler, en Applied Biosystems 785A UV-detektor og en Sedex 75 fordampende lysspredningsdetektor. En Waters Xterra 3,0 mm x 50 mm 5 μ C-18 silikakolonne ble eluert med 1,5 ml/minutt ved romtemperatur. Den ble ekvilibrert med 5% CH₃CN/0,05% TFA/H₂O og eluert i 1,0 minutt med 5% CH₃CN/0,05% TFA/H₂O og så med en lineær gradient til 90% CH₃CN/0,05% TFA/H₂ i løpet av 7 minutter. Påvisning ble utført ved hjelp av UV-påvisning ved 214 nm og fordampende lysspredning. En fraksjon av kolonneeluatet ble ført inn på ioneforstøvningsinterfasen i et PE-Sciex API 100 massespektrometer. Masseområdet fra 300 til 2000 amu ble skannet hvert 2. sekund under analysen.

MALDI-TOF MS-analyse ble utført ved å bruke et Voyager RP-instrument (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA) utstyrt med forsinket ekstraksjon og operert på en lineær måte. Alfa-cyano-4-hydroksykaneltsyre ble brukt som matrise og masseangivelsene var basert på ekstern kalibrering.

Eksempel 1

N^ε³⁷-(2(2(2(-dodekylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid

20



En harpiks (Rink-amid, 0,68 mmol/g Novabiochem 0,25 mmol) ble brukt for å fremstille den primære sekvensen i en ABI433A-maskin ved å følge fabrikantens retningslinjer. Alle beskyttende grupper var syrelabile, unntatt den resten som ble brukt i posisjon 37 (FmocLys(ivDde)-OH, Novabiochem), noe som muliggjorde spesifikk avbeskyttelse av dette lysinet snarere enn ethvert annet lysin.

Fremgangsmåte

Den ovenfor fremstilte harpiksen (0,25 mmol) som inneholdt den GLP-1-analoge aminosyresekvensen ble plassert i et manuelt riste/filtreringsapparat og behandlet med 2% hydrazin i N-metylpyrrolidon i (2 x 12 minutter, 2 x 20 ml) for å fjerne Dde-gruppen. Harpiksen ble så vasket med 4 x 20 ml N-metylpyrrolidon. Fmoc-8-amino-3,6-dioksaoktansyre (Neosystem FA03202) (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble løst i N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1, 20 ml). Hydroksybenzotriazol (HOBt) (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) og

diisopropylkarbodiimid (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble tilsatt og løsningen ble rørt i 15 minutter. Løsningen ble tilsatt harpiksen, hvorefter diisopropyletylamin (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble tilsatt.

- 5 Harpiksen ble så ristet i 24 timer ved romtemperatur. Den ble deretter vasket med 4 x 20 ml N-metylpyrrolidon. En løsning av 20% piperidin i N-metylpyrrolidon (3 x 20 ml, 10 minutter hver gang) ble tilsatt harpiksen under risting. Harpiksen ble så vasket med 4 x 20 ml N-metylpyrrolidon.

- 10 Dodekansyre (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble løst i N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1, 20 ml). Hydroksybenzotriazolhydrat (HOBt; H₂O) (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) og diisopropylkarbodiimid (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble tilsatt og løsningen ble rørt i 15 minutter. Den ble tilsatt harpiksen og så tilsatt diisopropyletylamin (4 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen). Harpiksen ble ristet i 24 timer ved romtemperatur. Den ble så vasket med N-metylpyrrolidon (2 x 20 ml), N-metylpyrrolidon/metylenklorid (1:1) (2 x 20 ml) og metylenklorid (2 x 20 ml).
15 Peptidet ble avspaltet fra harpiksen med risting i 180 minutter ved romtemperatur med en blanding av trifluoreddiksyre, vann og triisopropylsilan (95:2,5:2,5, 15 ml). Spaltingsblandingen ble filtrert og filtratet ble konsentrert til en olje i vakuum. Det urene peptidet ble utfelt fra denne oljen med 45 ml dietyleter og vasket 3 ganger
20 med 45 ml dietyleter. Det urene peptidet ble rensset ved preparativ HPLC på en 20 mm x 250 mm kolonne pakket med 7µ C-18-silika. Det urene peptidet ble løst i 5 ml 50% eddiksyre i vann og fortynnet til 20 ml med vann og så injisert i kolonnen som så ble eluert med en gradient fra 40-60% (CH₃CN i vann med 0,1% TFA) ved 10 ml/minutt i løpet av 50 minutter ved 40°C. De peptidholdige fraksjonene ble så
25 oppsamlet. Det rensede peptidet ble frysetørket etter fortynning av eluatet med vann.

HPLC: (Metode B6): RT = 32,8 minutter.

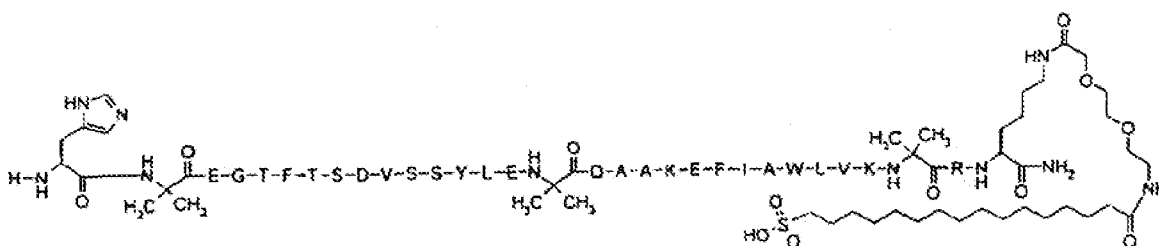
HPLC: (Metode A1): RT = 43,6 minutter.

- 30 LCMS: m/z = 765,0 (M+5H)⁵⁺, 957,0 (M+4H)⁴⁺, 1275,0 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3825,0.

Eksempel 2

N⁶³⁷-(2-(2-(2-(17-sulfoheksadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷] GLP-1 (7-37)amid

35



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 45,5 minutter.

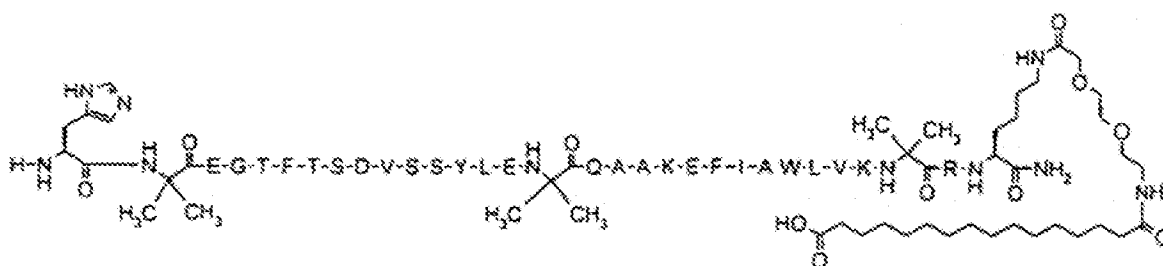
LCMS: $m/z = 792,9$ ($M+5H$)⁵⁺, $990,9$ ($M+4H$)⁴⁺, $1320,9$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3959,9.

5

Eksempel 3

N^ε³⁷-{2-[2-(2-(15-karboksy-pentadekanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl}-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷] GLP-1(7-37)amid

10



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

15

HPLC: (Metode B1): RT = 43,8 minutter.

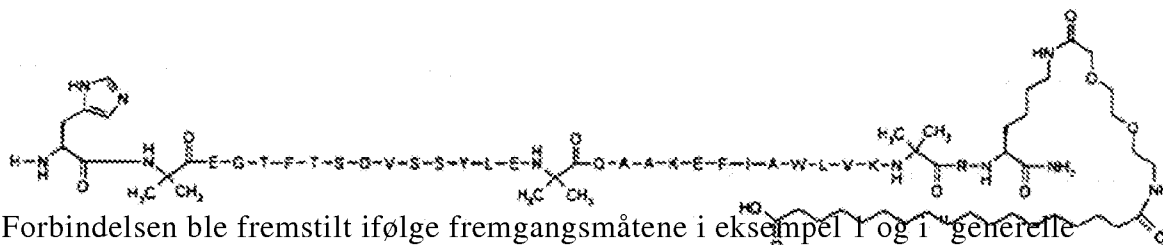
HPLC: (Metode A1): RT = 42,0 minutter.

LCMS: $m/z = 978,3$ ($M+4H$)⁴⁺, $1303,8$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3909,6.

Eksempel 4

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(17-karboksy-heptadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid

20



25

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B1): RT = 46,4 minutter.

HPLC: (Metode A1): RT = 44,4 minutter.

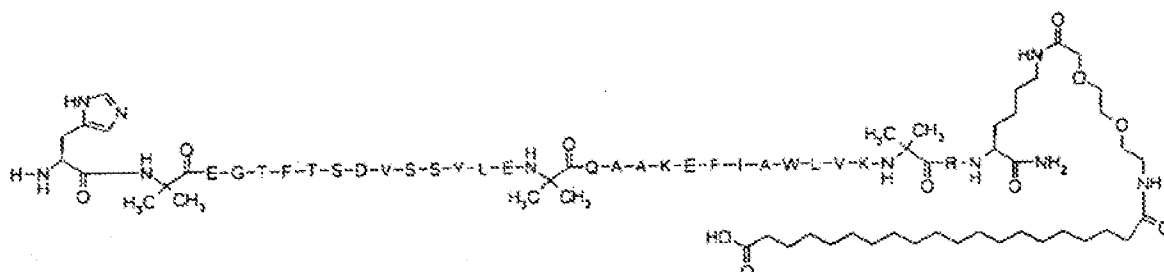
LCMS: $m/z = 985,5$ ($M+4H$)⁴⁺, $1313,4$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3937,6.

30

Eksempel 5

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(19-karboksynonadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-
[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid

5



10

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B1): RT = 49,5 minutter.

HPLC: (Metode A1): RT = 47,1 minutter.

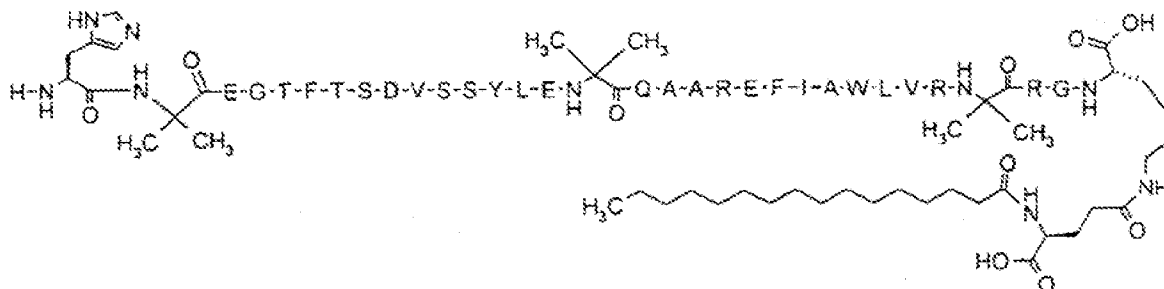
LCMS: m/z = 992,5 (M+4H)⁴⁺, 1322,6 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3965,7.

Eksempel 6

15

[Aib^{8,22,35},Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-
karboksybutyryl)-OH

20



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

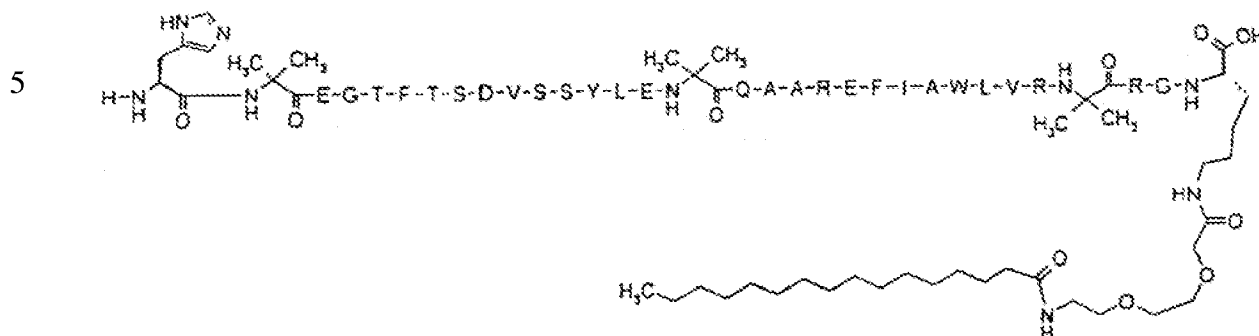
HPLC: (Metode B6): RT = 36,28 minutter.

25

LCMS: m/z = 995 (M+4H)⁴⁺, 1326 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3977,6.

Eksempel 7

[Aib^{8,22,35},Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(2-(heksadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetyl)-OH



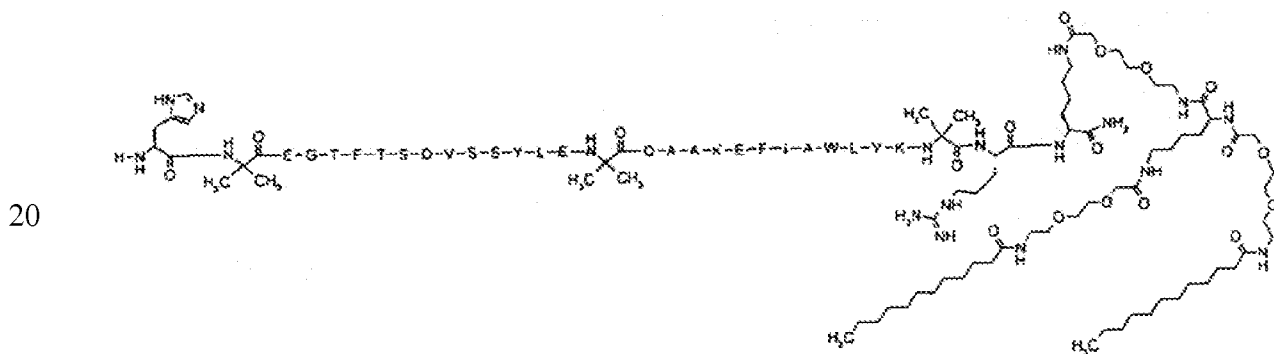
- 10 Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 37,1 minutter.

LCMS: m/z = 999 (M+4H)⁴⁺, 1332 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3993,7.

Eksempel 8

- 15 N^{ε37}-(2-[2-(2,6-(S)-bis-{2-[2-(2-(dodekanoylamino)etoksy)etoksy]-heksanoylamino)etoksy}])acetyl-[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)amid



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

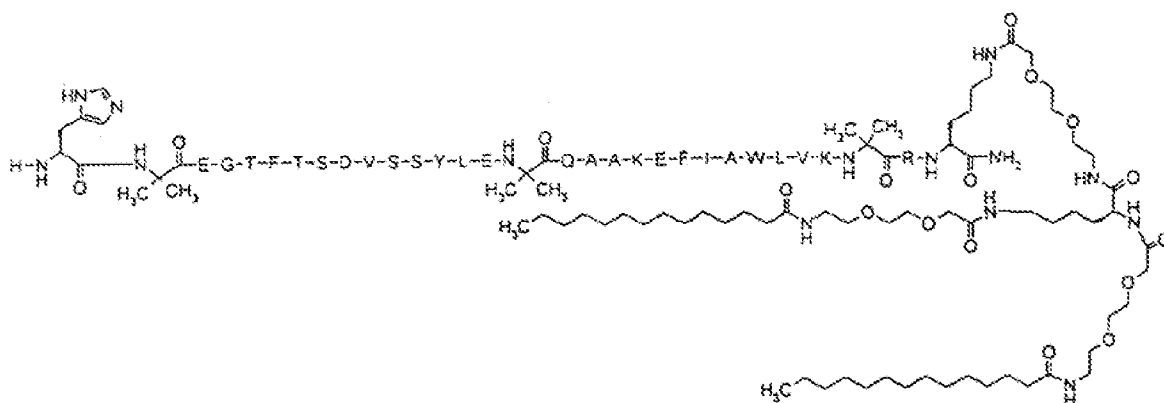
- 25 HPLC: (Metode B6): RT = 38,2 minutter.

LCMS: m/z = 1106,7 (M+4H)⁴⁺, 1475,3 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4433,0.

Eksempel 9

$N^{\epsilon 37}$ -(2-[2-(2,6-(S)-bis-{2-[2-(2-(tetradekanoylamino)etoksy)etoksy]acetylamin}-etoksy)etoksy))-[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)amid

5



10

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 42,9 minutter.

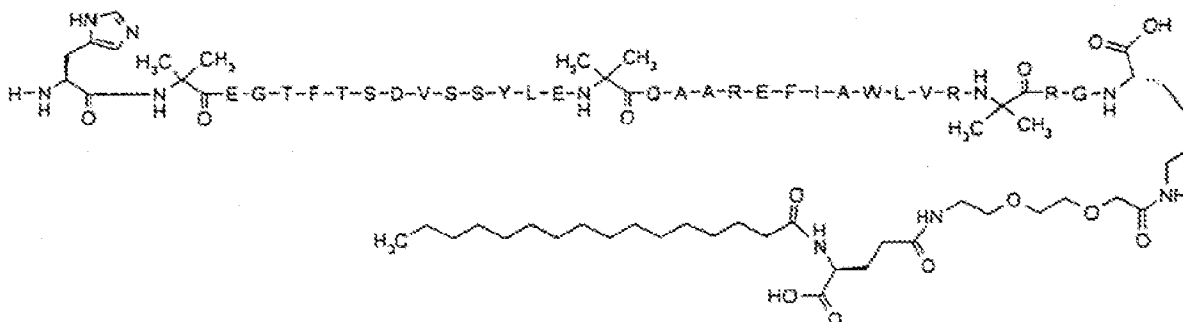
LCMS: $m/z = 1120,9$ ($M+4H$)⁴⁺, $1494,2$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4480,4.

15

Eksempel 10

[Aib^{8,22,35},Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH

20



25

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

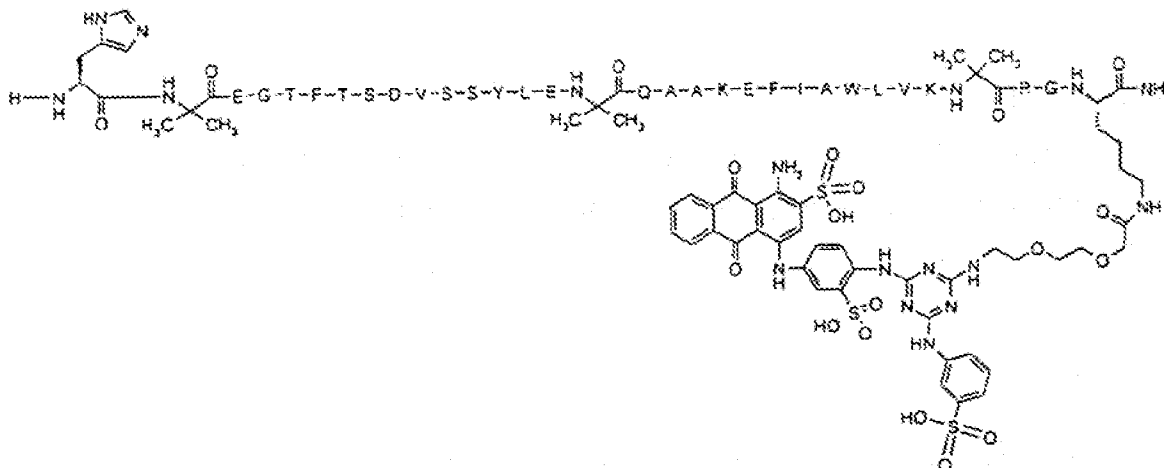
HPLC: (Metode B6): RT = 36,0 minutter.

LCMS: $m/z = 1032,0$ ($M+4H$)⁴⁺, $1374,0$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4122,8.

Eksempel 11

[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)Lys((2-{2-[4-[4-(4-amino-9,10-diokso-3-sulfo-9,10-dihydroantracen-1-ylamino)-2-sulfofenylamino]-6-(2-sulfofenylamino)-[1,3,5]triazin-2-ylamino]etoksy}etoksy)acetyl)amid

5



10

Fremstilt ved å feste DdeLys(Fmoc)-OH på Rink-harpiks. Harpiksen ble så behandlet med piperidin som beskrevet i "syntetiske metoder" for å selektivt fjerne Fmoc. 2-(2-(2-(Fmoc-amino)etoksy)etoksy)eddiksyre ble koblet på epsilon-aminogruppen i lysin og Fmoc ble fjernet. DMSO og Cibacronblått 3GA (17 ekvivalenter) (Sigma C-9534) ble tilsatt og blandingen ble holdt på 60°C i 15 minutter, vasket 3 ganger med vann og 2 ganger med metanol, 2 ganger med THF og 2 ganger med dietyleter. Den Dde-beskyttende gruppen ble fjernet og de gjenværende aminosyrene ble tilført som beskrevet i "syntetiske metoder".

20

HPLC: (Metode A1): RT = 38,1 minutter.

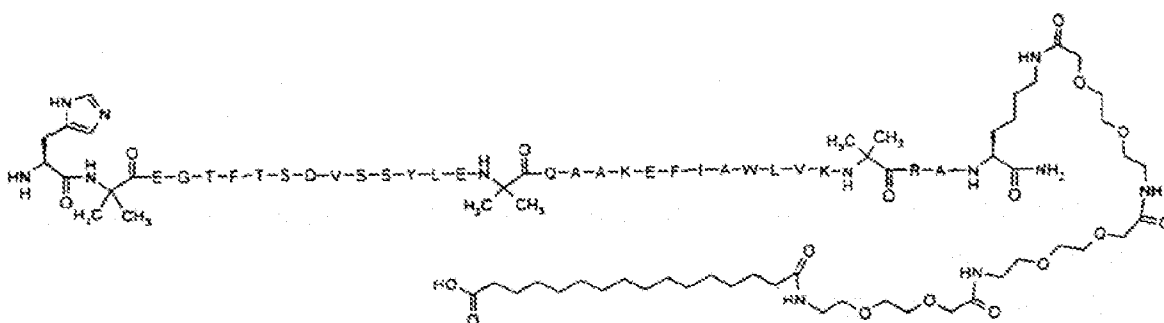
LCMS: m/z = 1110,4 (M+4H)⁴⁺, 1436,4 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4435,9.

Eksempel 12

[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)Lys(((2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(15-karboxypentadekanoylamino)etoksy]etoksy}acetyl)amino)etoksy]etoksy}-acetyl)amino)etoksy]etoksy}acetyl))amid

25

30



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 41,2 minutter.

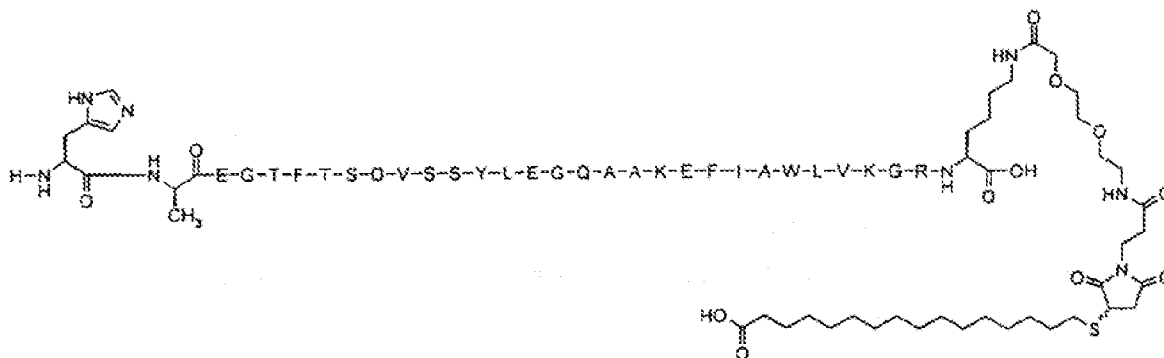
5 HPLC: (Metode B6): RT = 30,7 minutter.

LCMS: $m/z = 1069,1$ ($M+4H$)⁴⁺, $1424,6$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4271.

Eksempel 13

N^ε³⁷-([2-(2-{3-[2,5-diokso-3-(15-karboksy-pentadecylsulfanyl)pyrrolidin-1-yl]-propionylamino}etoksy)etoksy)acetyl]-[D-Ala⁸,Lys³⁷]-GLP-1-[7-37]amid

10



15

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 45,2 minutter.

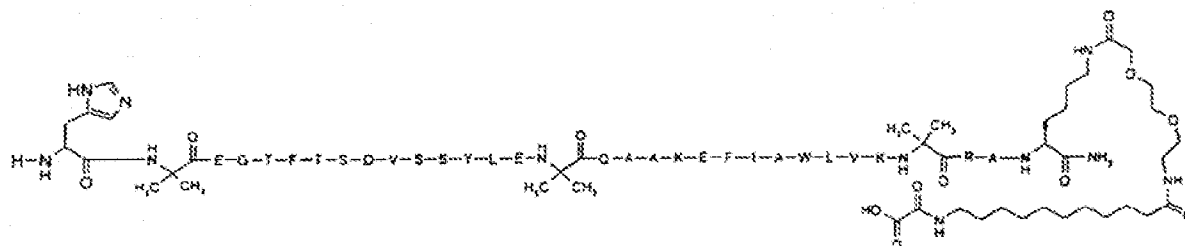
LCMS: $m/z = 1004,0$ ($M+4H$)⁴⁺, $1338,2$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4010,7.

20

Eksempel 14

[Aib^{8,22,35},Ala³⁷]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(2-(11-(oksalylamino)undekanoylamino)-etoksy)etoksy)acetyl)))amid

25



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 37,9 minutter.

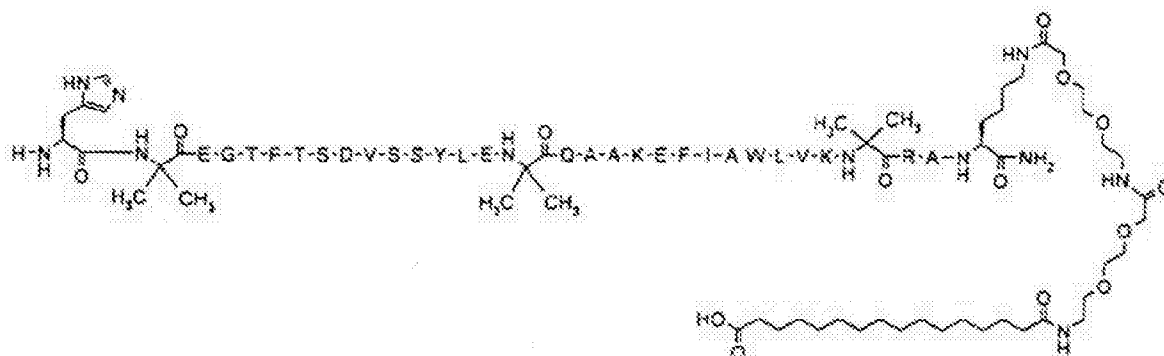
HPLC: (Metode B6): RT = 39,5 minutter.

LCMS: $m/z = 993,3 (M+4H)^{4+}$, $1323,9 (M+3H)^{3+}$. Beregnet $(M+H)^+ = 3967,6$.

Eksempel 15

- 5 [Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys({2-[2-(2-{2-[2-(2-(15-karboksy-pentadekanoyl-amino)etoksy]etoksy}acetyl-amino)etoksy]etoksy}acetyl)amid

10



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

- 15 HPLC: (Metode B6): RT = 31,1 minutter.

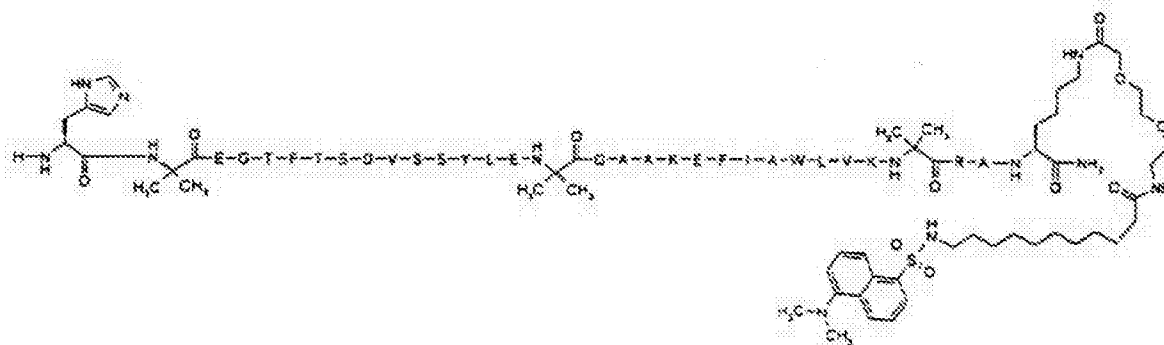
HPLC: (Metode A1): RT = 41,9 minutter.

LCMS: $m/z = 1376,3 (M+3H)^{3+}$. Beregnet $(M+H)^+ = 4125,8$.

Eksempel 16

- 20 [Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys((2-{2-[11-(5-dimetylamino-naftalen-1-sulfonylamino)undekanoylamino]etoksy}etoksy)acetyl)amid

25



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 42,6 minutter.

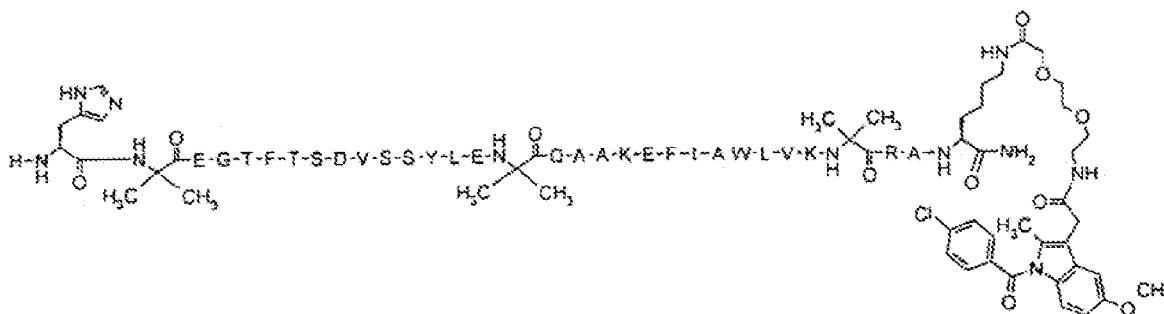
HPLC: (Metode B6): RT = 30,4 minutter.

LCMS: $m/z = 1377,3$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4128,8.

Eksempel 17

- 5 [Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys((2-(2-{2-[1-(4-klorbenzyl)-5-metoksy-2-metyl-1H-indol-3-yl]acetylamino}etoksy)etoksy)acetyl))amid

10



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 41,1 minutter.

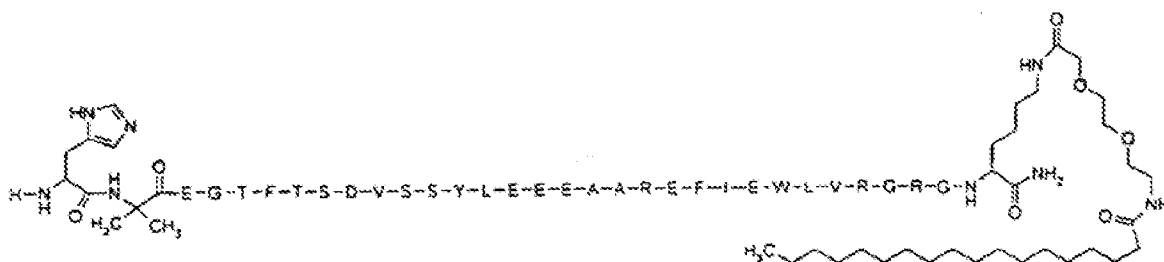
- 15 HPLC: (Metode B6): RT = 31,1 minutter.

LCMS: $m/z = 1351,8$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4052,0.

Eksempel 18

[Aib⁸,Arg^{26,34},Glu^{22,23,30}]GLP-1 H(7-37)Lys(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)amid

20



- 25 Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

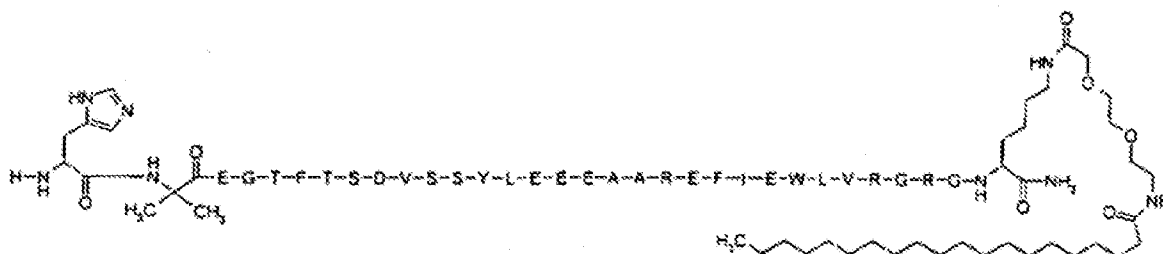
HPLC: (Metode B6): RT = 39,3 minutter.

LCMS: $m/z = 1366,6$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4095,6.

Eksempel 19

[Aib⁸,Arg^{26,34},Glu^{22,23,30}]GLP-1 H(7-37)Lys(2-(2-(2-(eikosanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)amid

5



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

10

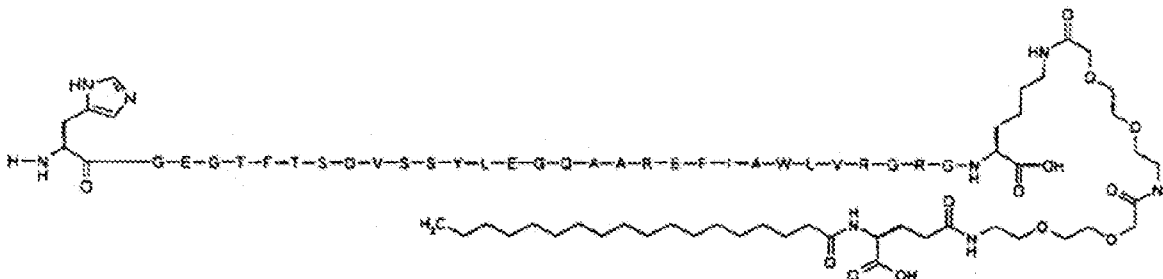
HPLC: (Metode B6): RT = 42,6 minutter.

LCMS: m/z = 1375,7 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4123,7.

Eksempel 20

[Gly⁸,Arg^{26,34}] GLP-1 H-(7-37)Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)etoksy)acetyl)-OH

15



20

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 38,0 minutter.

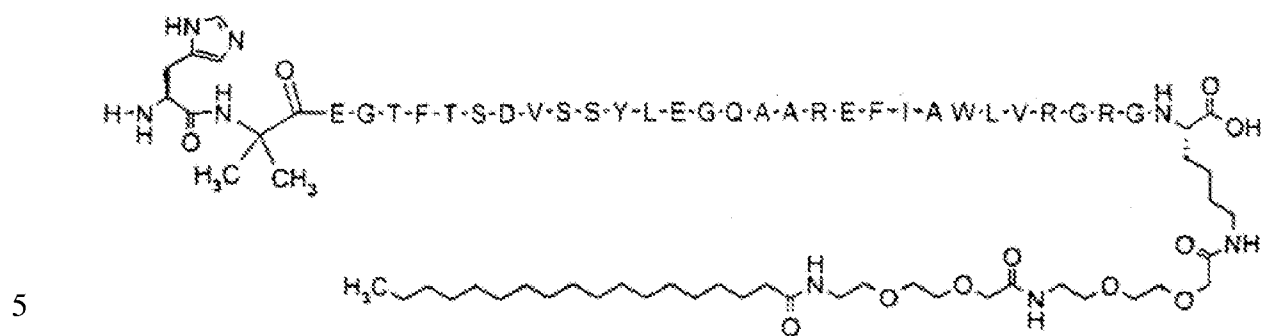
HPLC: (Metode A1): RT = 49,0 minutter.

LCMS: m/z = 1054,6 (M+4H)⁴⁺, 1405,3 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4211,8.

25

Eksempel 21

[Aib⁸,Arg^{26,34}]GLP-1 (7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy]-acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH



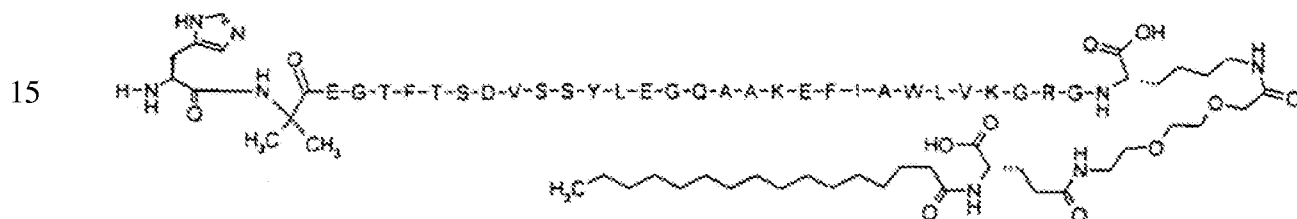
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 38,7 minutter.

10 LCMS: $m/z = 1029,2 (M+4H)^{4+}$, $1371,4 (M+3H)^{3+}$. Beregnet $(M+H)^+ = 4110,8$.

Eksempel 22

[Aib⁸]-GLP-1-(7-37)Lys (2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH



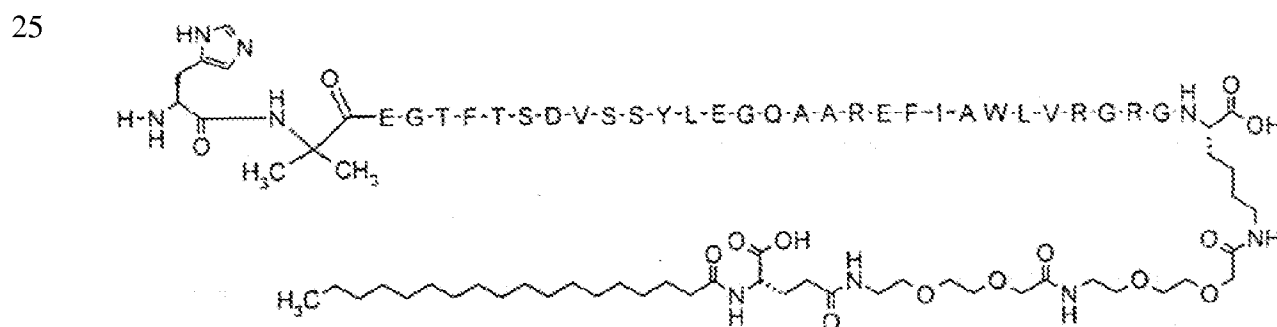
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

20 HPLC: (Metode B6): RT = 34,7 minutter.

LCMS: $m/z = 1000,3 (M+4H)^{4+}$, $1337,4 (M+3H)^{3+}$. Beregnet $(M+H)^+ = 4110,8$.

Eksempel 23

[Aib⁸,Arg^{26,34}] GLP-1-(7-37) Lys{ 2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy]acetyl)etoksy)etoksy)acetyl} -OH



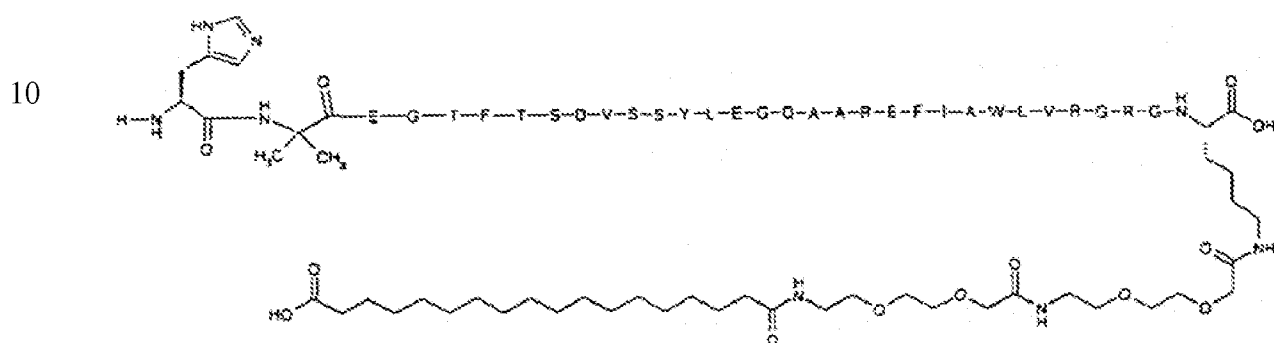
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 37,5 minutter.

5 LCMS: $m/z = 1414,9$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4239,8.

Eksempel 24

[Aib⁸,Arg^{26,34}] GLP-1-(7-37) Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboksyheptanoylamino)-etoksy)etoksy]acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH



15 Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

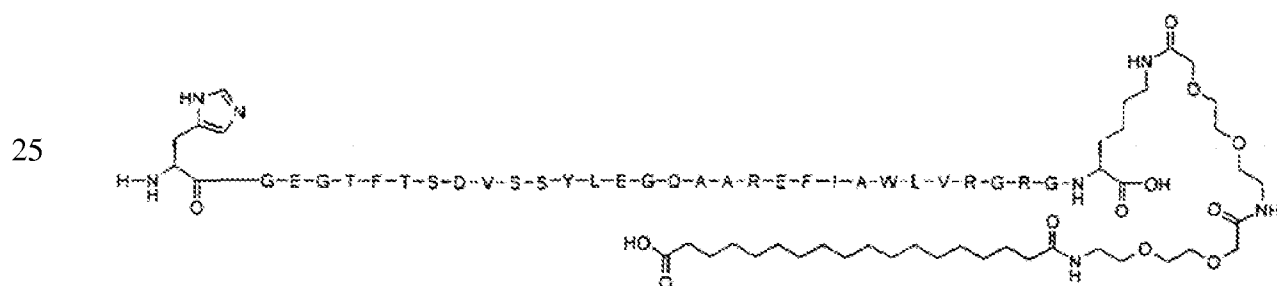
HPLC: (Metode B6): RT = 32,4 minutter.

HPLC: (Metode A1): RT = 43,8 minutter.

LCMS: $m/z = 1381,3$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4140,0.

20 Eksempel 25

[Gly⁸,Arg^{26,34}] GLP-1-(7-37) Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH



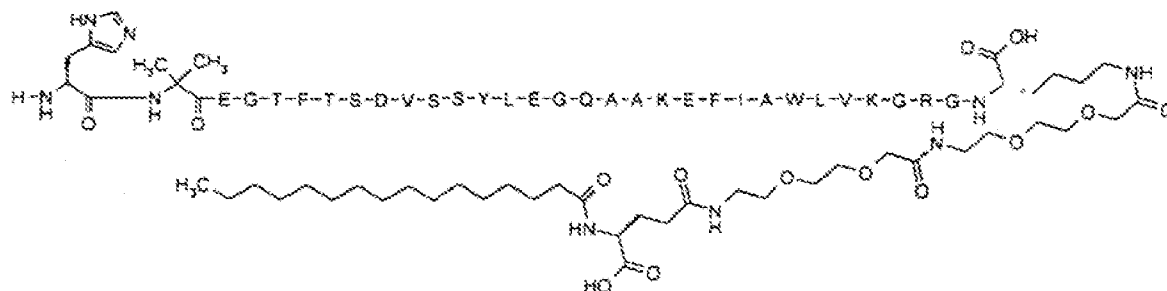
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode A1): RT = 42,3 minutter.

LCMS: $m/z = 1372,3$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4112,7.

Eksempel 26

- 5 [Aib⁸]GLP-1-(7-37)Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-
karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH



10

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

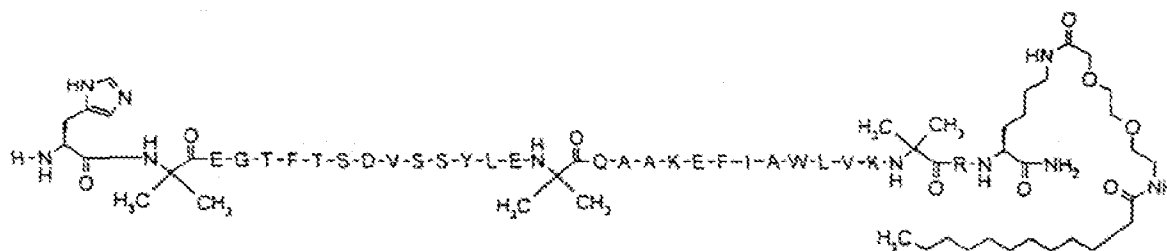
HPLC: (Metode B6): RT = 33,5 minutter.

LCMS: $m/z = 1040,3$ ($M+4H$)⁴⁺, 1386,6 ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4155,8.

15 Eksempel 27

N⁸³⁷-(2-(2-(2-(dodekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1 H(7-37)-amid

20



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

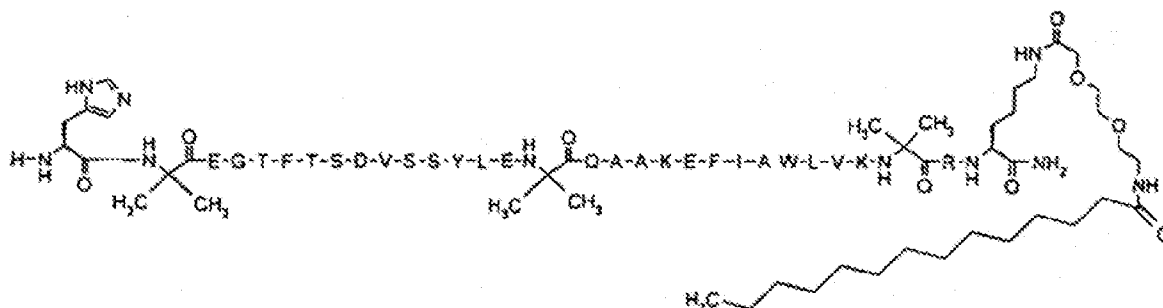
25 HPLC: (Metode B6): RT = 32,8 minutter.

LC-MS: $m/z = 756,7$ ($M+H$)⁵⁺, 957,0 ($M+H$)⁴⁺, 1275,7 ($M+H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3822,9.

Eksempel 28

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(tetradekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1
H(7-37)amid

5



10

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

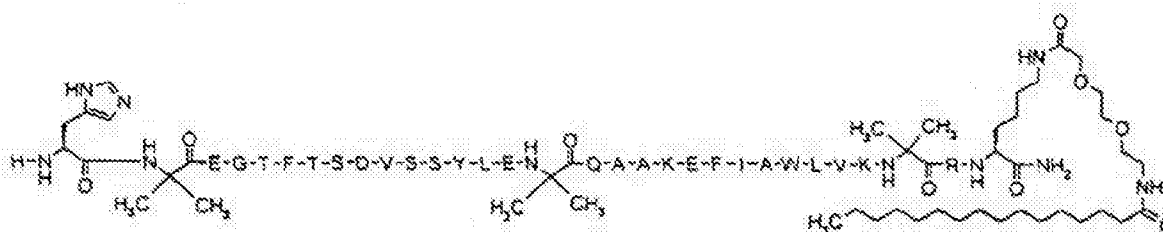
HPLC: (Metode B6): RT = 34,6 minutter.

LC-MS: m/z = 771,4 (M+5H)⁵⁺, 964,1 (M+4H)⁴⁺, 1284,9 (M+H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3851,5.

Eksempel 29

15 N^ε³⁷-(2-(2-(2-(heksadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1
(7-37)amid

20



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

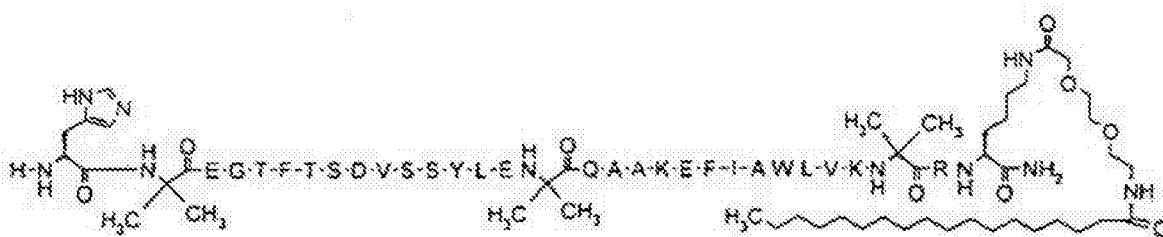
HPLC: (Metode B6): RT = 36,8 minutter.

LC-MS: m/z = 970,7 (M+4H)⁴⁺, 1294,3 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3879,6.

25

Eksempel 30

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1 (7-37)amid



5

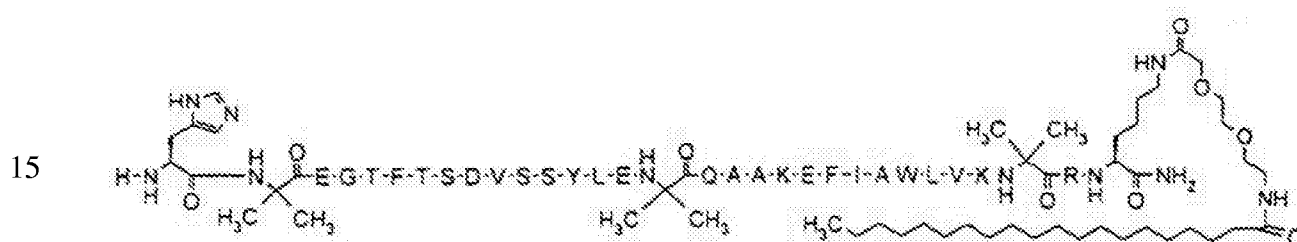
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 39,4 minutter.

LC-MS: $m/z = 977,9$ ($M+4H$)⁴⁺, $1303,7$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3907,6.

10 Eksempel 31

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(eikosanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-[Aib^{8,22,35}Lys³⁷] GLP-1(7-37)amid



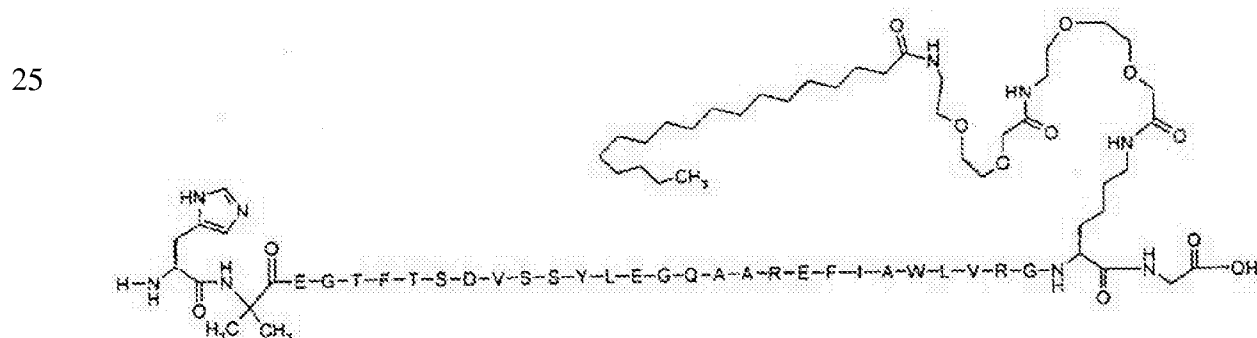
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 42,7 minutter.

20 LC-MS: $m/z = 984,8$ ($M+4H$)⁴⁺, $1312,8$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3935,7.

Eksempel 32

N^{ε37}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamin)etoksy)-etoksy)acetyl))[Aib⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH



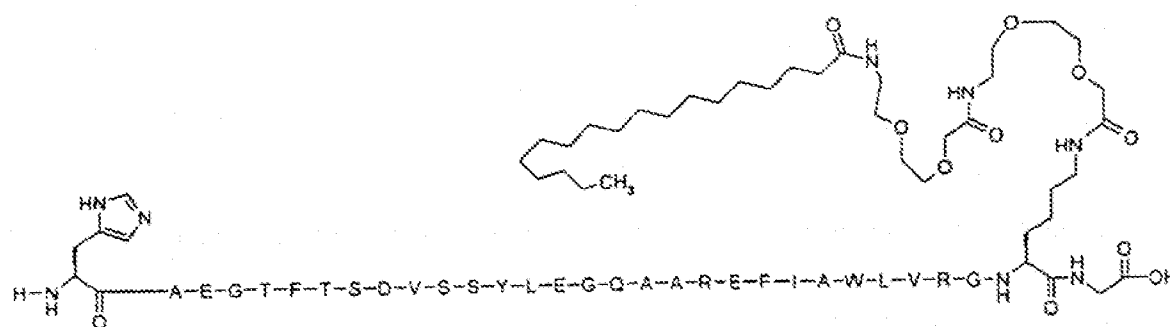
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 40,7 minutter.

LC-MS: $m/z = 792,3 (M+5H)^{5+}$, $989,8 (M+4H)^{4+}$, $1319,2 (M+3H)^{3+}$. Beregnet $(M+H)^+ = 3955,5$.

Eksempel 33

$N^{\epsilon 37}$ -(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamin)etoksy)-etoksy)acetyl))[Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1(7-37)-OH



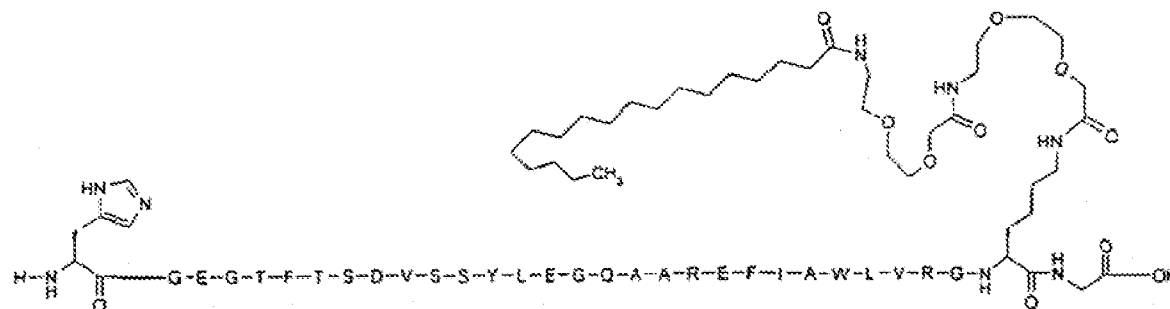
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 40,5 minutter.

LC-MS: $m/z = 789,5 (M+5H)^{5+}$, $986,3 (M+4H)^{4+}$, $1314,8 (M+3H)^{3+}$. Beregnet $(M+H)^+ = 3941,5$.

Eksempel 34

$N^{\epsilon 37}$ -(2-(2-(2-(2-[2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy]acetylamin)etoksy)-etoksy)acetyl))-[Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH



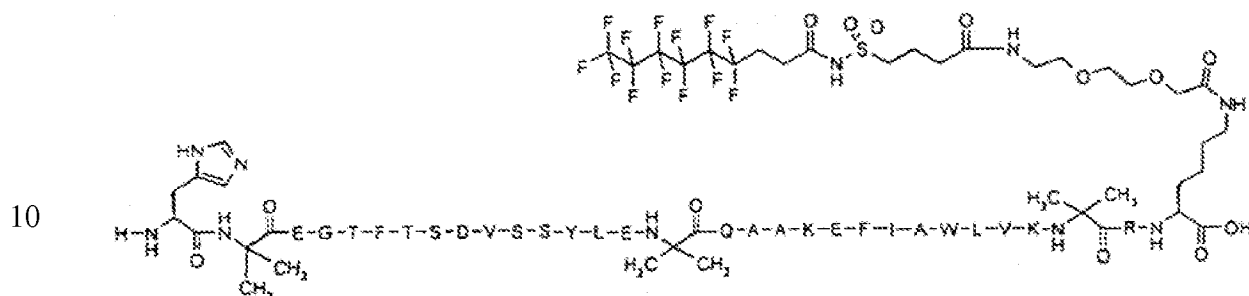
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 38,3 minutter.

LC-MS: $m/z = 786,8$ ($M+5H$)⁵⁺, $982,8$ ($M+4H$)⁴⁺, $1310,1$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3927,5.

Eksempel 35

- 5 N^ε³⁷-(2-(2-(2-(4-4(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridekafluornonanoylsulfamoylbutyryl-amino)etoksy)etoksy)acetyl)[Aib^{8,22,35},Lys³⁷] GLP-1-(7-37)-OH

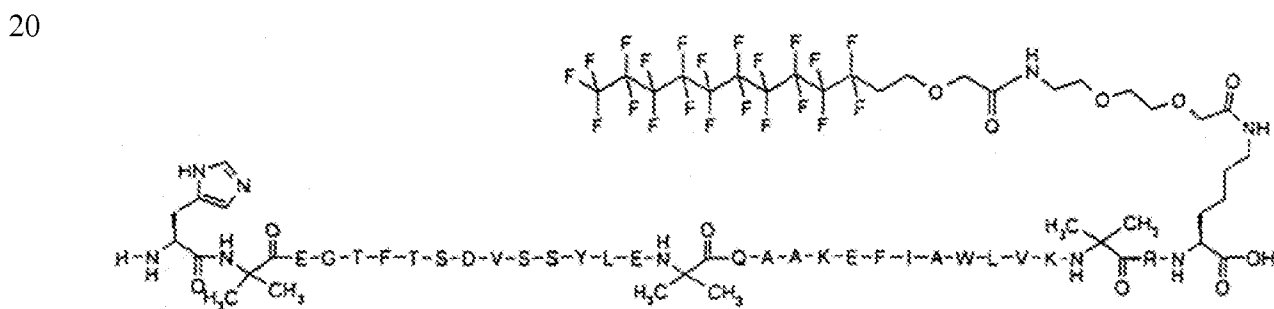


Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

- 15 HPLC: (Metode B6): RT = 32,4 minutter.
LC-MS: $m/z = 1042,7$ ($M+4H$)⁴⁺, $1389,9$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4166,4.

Eksempel 36

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-heneikosafluor-dodecyloksyacetyl-amino)etoksy)etoksy)acetyl)[Aib^{8,22,35},Lys³⁷] GLP-1-(7-37)-OH



- 25 Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

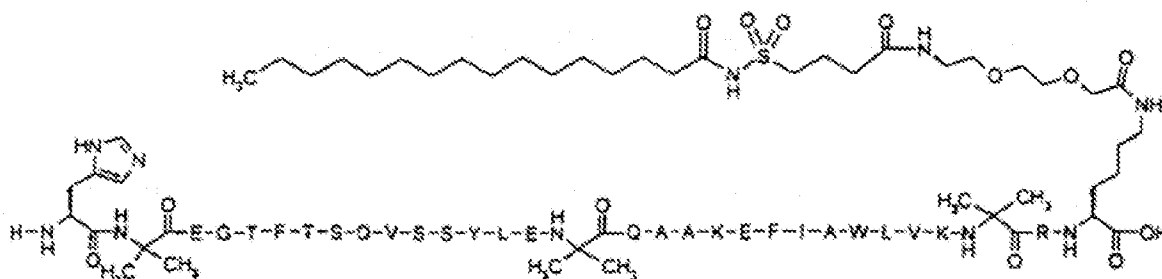
HPLC: (Metode B6): RT = 36,7 minutter.

LC-MS: $m/z = 1062,8$ ($M+4H$)⁴⁺, $1416,9$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4247,3.

Eksempel 37

N^ε³⁷-(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylsulfamoyl)butyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-
[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-OH

5



10

Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 37,4 minutter.

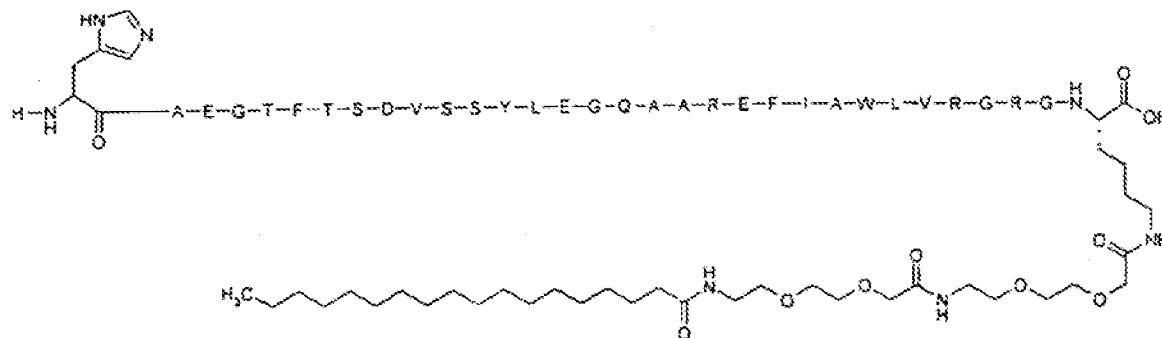
LC-MS: m/z = 1008,8 (M+4H)⁴⁺, 1344,3 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4030,7.

Eksempel 38

15

[Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys({2-(2-(2-(2-[2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy]-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)})-OH

20



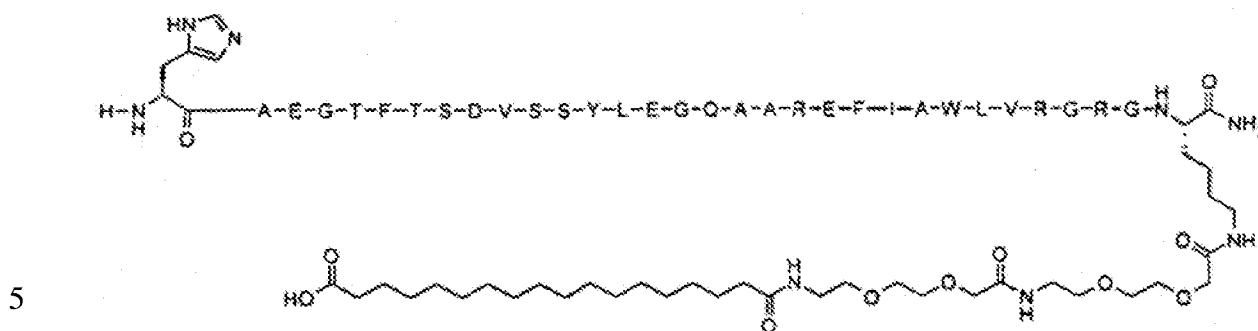
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 38,5 minutter.

25 LCMS: m/z = (M+4H)⁴⁺, 1025,1 (M+3H)³⁺, 1366,7. Beregnet (M+H)⁺ = 4096,0.

Eksempel 39

[Arg^{26,34}] GLP-1(7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 32,1 minutter.

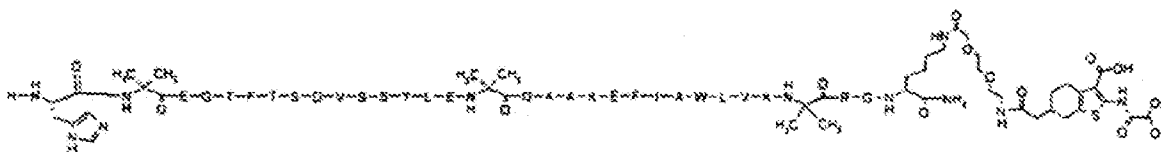
10 HPLC: (Metode A1): RT = 42,2 minutter.

LCMS: $m/z = 1033,3$ ($M+4H$)⁴⁺, $1376,6$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4126,7.

Eksempel 42

[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)Lys((2-[2-((2-oksalylamino-3-karboksy-2-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]tiofen-6-ylacetylamin))etoksy]etoksyacetyl)amid

15



Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

20 HPLC: (Metode B1): RT = 37,4 minutter.

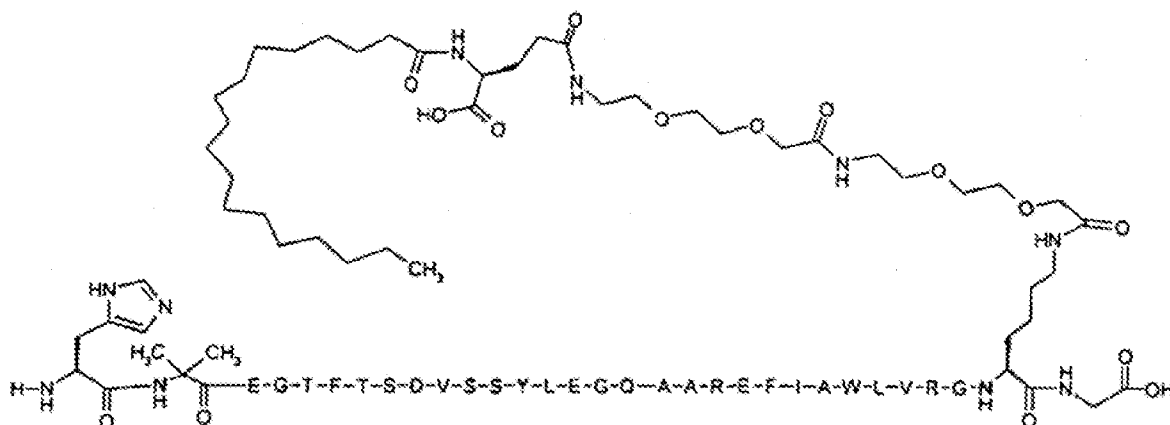
HPLC: (Metode A1): RT = 35,5 minutter.

LCMS: $m/z = 1002,5$ ($M+4H$)⁴⁺, $1336,7$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4007,5.

Eksempel 43

N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-etoksy)acetylamin)etoksy)etoksy)acetyl)[Aib⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)-OH

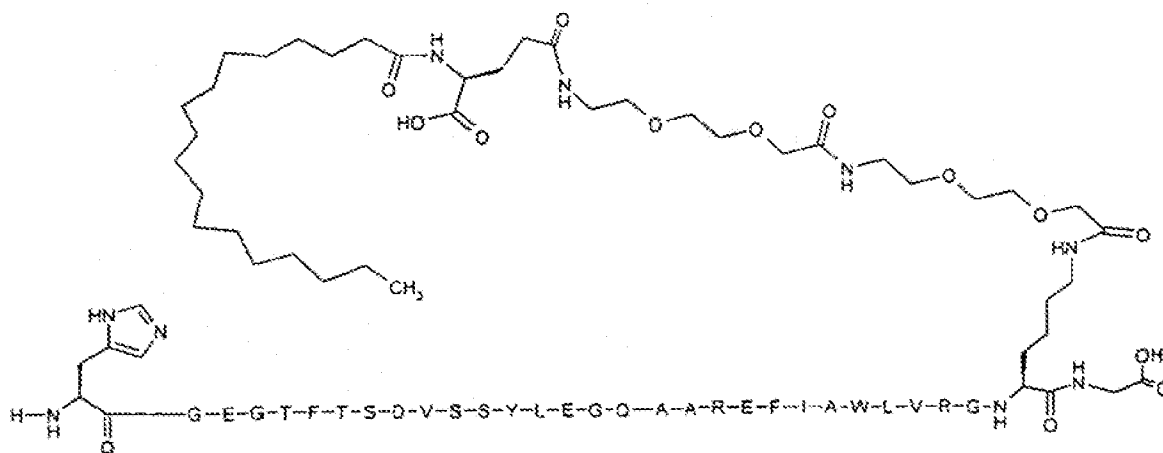
25



10 HPLC: (Metode B6): RT = 39,0 minutter.

Eksempel 44

15

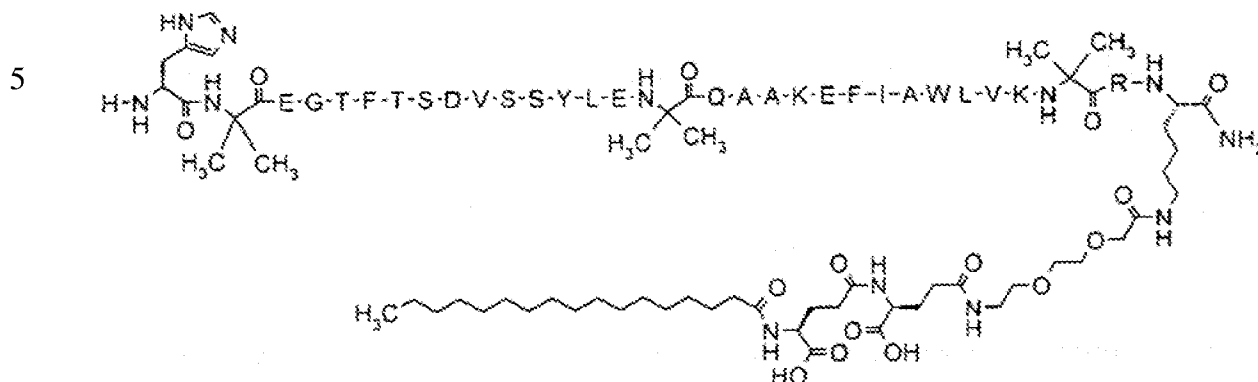


HPLC: (Metode B6): RT = 38,6 minutter.

25 LC-MS: $m/z = 1015,2$ ($M+4H$)⁴⁺, $1353,4$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4056,6.

Eksempel 45

N^ε³⁶-2-(2-(2-(4-(4-(heptadekanoylamino)-4-(S)-karboksybutyrylamino)-4-(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-NH₂



10

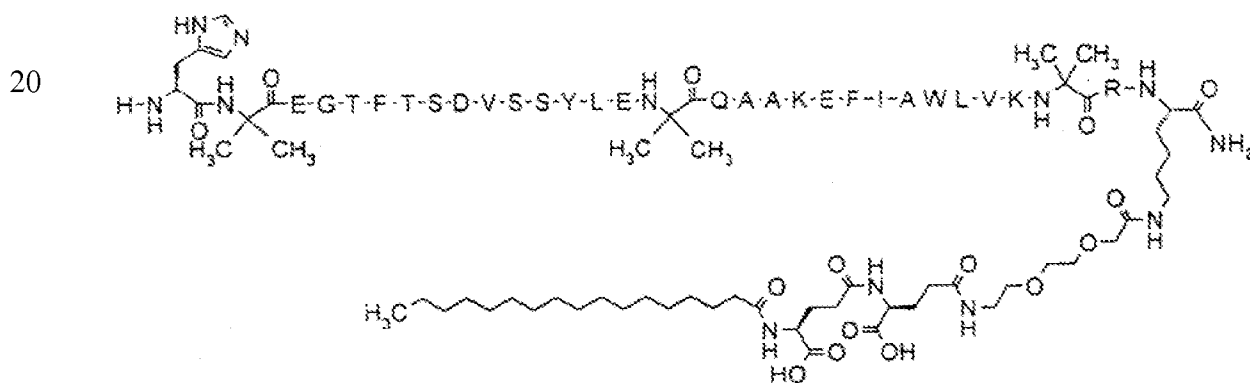
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B4): RT = 10,72 minutter.

LCMS: m/z = 1039,0 (M+4H)⁴⁺, 1385,0 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4152,0.

Eksempel 46

N^ε³⁷-2-(2-[2-(2-[2-(4-[4-(heptadekanoylamino)-4-(S)-karboksybutyrylamino]-4-(S)-karboksybutyrylamino)etoksy]etoksy)acetyl]amino)etoksy]etoksy)acetyl-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1-(7-37)-NH₂



25

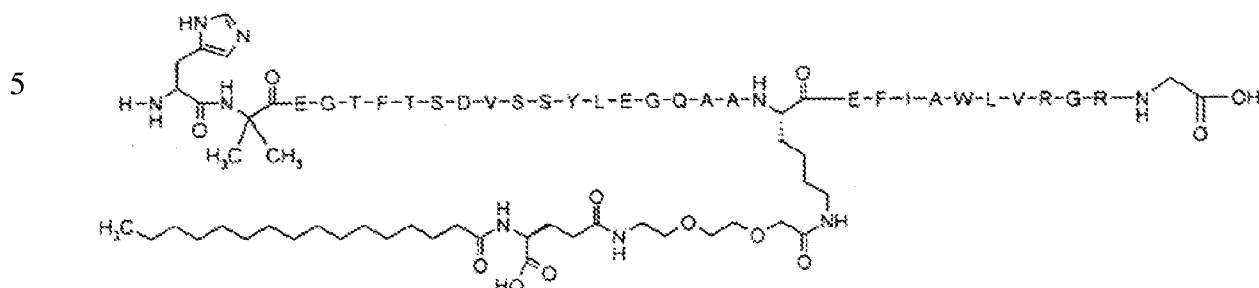
Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B4): RT = 10,74 minutter.

LCMS: m/z = 1074 (M+4H)⁴⁺, 1433 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4297.

Eksempel 47

N^ε²⁶-(2-(2-(2-(4-(heksadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)-acetyl)-[Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH



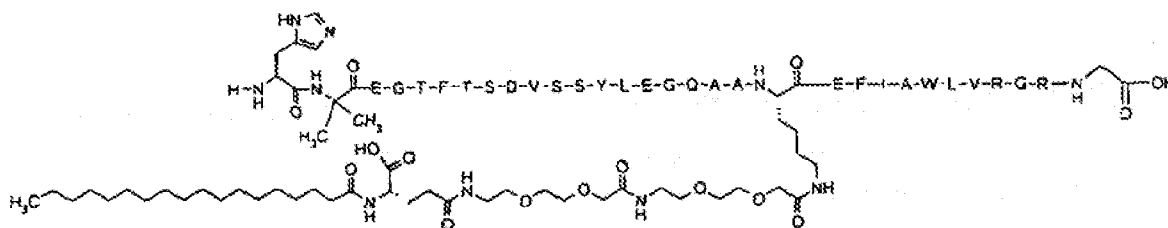
10 Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B4): RT = 10,71 minutter.

LCMS: m/z = 979,0 (M+4H)⁴⁺, 1304,0 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 3910,0.

Eksempel 48

15 N^ε²⁶-2-(2-2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-etoksy)acetylamin)etoksy)etoksy)acetyl-[Aib⁸,Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH



20 Forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåtene i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B4): RT = 11,32 minutter.

LCMS: m/z = 1021 (M+4H)⁴⁺, 1362 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4084.

25 Peptidet ble syntetisert på en klortritylharpiks (Novabiochem) ved å bruke Fmoc-strategien i et Advanced Chemtech 348 peptidsynteseapparat (det ble brukt 0,5 mmol/g, 100 mg harpiks/hull og 10 hull). Koblingene ble kontrollert i diisopropylkarbodiimid (DIC) (Fluka) og 1-hydroksybenzotriazol (HOBt)/1-hydroksy-7-azabenzotriazol (HOAt) (2:1) (Senn Chemicals) i 1-metylpyrrolidin-2-on (NMP) og det ble anvendt 10 molare ekvivalenter av aminosyre og
30 koblingsreagensene. De brukte beskyttede aminosyrederivatene var standard Fmoc-aminosyrer (Advanced Chemtech) med unntak av aminosyrene Fmoc-Lys(ivDde)

(Novabiochem) og Fmoc-Glu-OtBu (Bachem). Harpiksen ble deretter oppdelt i 5 porsjoner (0,1 mmol) og N-terminalen ble så behandlet med (Boc)₂O og DIEA (5 molare ekvivalenter) i NMP.

- 5 Tilknytning av sidekjeder og linkere til spesifikke lysinrester på det urene harpiksbundne beskyttede peptidet ble utført i en spesifikk posisjon ved inkorporering av Fmoc-Lys(ivDde)-OH under en automatisert syntese fulgt av selektiv avbeskyttelse med hydrazin.

- 10 Fremgangsmåte for fjerning av Dde-beskyttelse. Harpiksen (0,1 mmol) ble plassert i en sprøyte og behandlet med 3% hydrazin og 3% piperidin i NMP (50 minutter ved r.t.) for å fjerne Dde-gruppen og vasking med NMP (4 x 5 ml).

Fremgangsmåte for tilknytning av sidekjeder til lysinrester.

- 15 OEG eller aminosyren (7 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble løst i NMP. HOAt (7 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) og diisopropylkarbodiimid (7 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble tilsatt og løsningen ble rørt i 15 minutter. Den ble så tilsatt harpiksen. Harpiksen ble ristet over natten ved romtemperatur og så vasket med 3 x 5 ml NMP.

Fremgangsmåte for fjerning av Fmoc-beskyttelse: Harpiksen (0,1 mmol) ble plassert i en sprøyte og behandlet med en løsning av 30% piperidin i NMP (5 ml i løpet av 20 minutter). Harpiksen ble så vasket med 2 x 5 ml NMP og 2 x 5 ml metylenklorid.

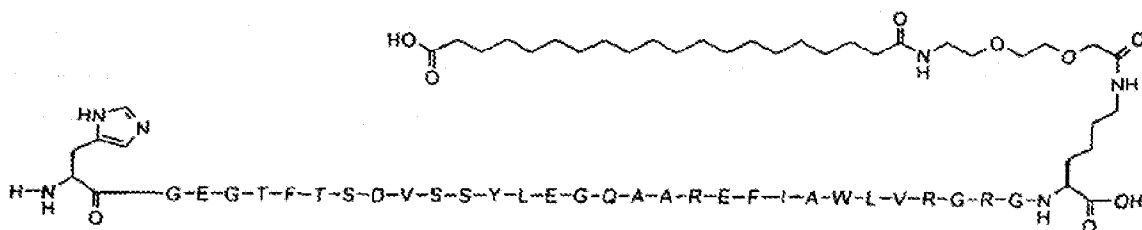
- 20 Fremgangsmåte for avspalting av peptidet fra harpiksen:

- Peptidet ble avspaltet fra harpiksen ved røring i 120 minutter ved romtemperatur med en blanding av trifluoreddiksyre, vann og triisopropylsilan (94:3:3). Spaltingsblandingen ble filtrert og filtratet ble konsentrert til en olje i en strøm av nitrogen. Det urene peptidet ble utfelt fra denne oljen med 10 ml dietyleter og så vasket 2 ganger med 10 ml dietyleter.
- 25

Eksempel 49

[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(19-(karboksy)nonadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)-OH

30



- En klortritylharpiks (0,5 mmol/g, Novabiochem, 0,1 mmol) ble brukt for å fremstille den primære sekvensen i en Advanced Chemtech 348-maskin. Alle beskyttende grupper var syrelabile med unntak av resten som ble brukt i posisjon 37 (FmocLys(ivDde)-OH, Novabiochem), noe som muliggjorde spesifikk avbeskyttelse av dette lysinet snarere enn et ethvert annet lysin.

Fremgangsmåte

- Den ovenfor fremstilte harpiksen (0,1 mmol) som inneholdt GLP-1-analogaminosyresekvensen ble plassert i en sprøyte og behandlet med 3% hydrazin og 3% piperidin i N-metylpyrrolidon (50 minutter) for å fjerne Dde-gruppen.
- Harpiksen ble vasket med 4 x 5 ml NMP. Fmoc-8-amino-3,6-doksaoktansyre (Neosystem FA03202) (7 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble løst i NMP. HOAt (7 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) og diisopropylkarbodiimid (7 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble tilsatt og løsningen ble rørt i 15 minutter. Den ble så til satt harpiksen som ble ristet over natten ved romtemperatur. Den ble så vasket med 4 x 5 ml NMP. En løsning av 30% piperidin i NMP (5 ml, 20 minutter) ble så tilsatt harpiksen som så igjen ble vasket med 4 x 5 ml NMP. N-hydroksysuccinimidesteren av C20 (6 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen, KJ. Ross-Petersen A/S) og DIEA løst i NMP ble tilsatt harpiksen. Denne ble så ristet over natten ved romtemperatur og så vasket med 3 x 5 ml NMP og 2 x 5 ml metylenklorid. Peptidet ble avspaltet fra harpiksen ved røring i 120 minutter ved romtemperatur med en blanding av trifluorediksyre, vann og triisopropylsilan (94:3:3, 3 ml). Avspaltingsblandingen ble filtrert og filtratet ble konsentrert til en olje i vakuum. Det urene peptidet ble utfelt fra denne oljen med 10 ml dietyleter og så vasket 2 ganger med 10 ml dietyleter.

25 Rensing

- Det urene peptidet ble løst i DMSO i en konsentrasjon på 5-10 mg/200 µl og påsatt en 7,8 x 300 mm X-Terra Prep MS C18 10 µm kolonne som ble kjørt ved 40°C. Etter 5 minutter ved 30% CH₃CN, 0,08% TFA, 4 ml/minutt, ble kolonnen eluert med en lineær gradient fra 30 til 65% CH₃CN i løpet av 35 minutter. Hoved UV-toppfraksjonene ble oppsamlet manuelt og den forønskede toppen ble identifisert ved MALDI-MS.

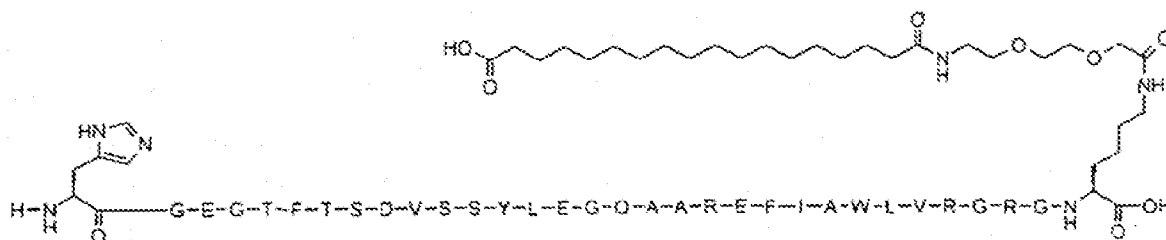
- Konsentrasjonen av peptidet i eluatet ble bestemt ved å måle UV-absorpsjonen ved 280 nm, idet man antok at de molare ekstinksjonskoeffisientene var 1280 og 3690 for henholdsvis tyrosin og tryptofan.
- Etter konsentrasjonsbestemmelsen ble eluatet oppdelt og plassert i ampuller som inneholdt den forønskede mengden også tørket ved vakuumsentrifugering.

HPLC: Eluerer ved 27,9 minutter = 52,9% CH₃CN.

MALDI-MS: 3996 (MH⁺).

Eksempel 50

5 [Gly⁸,Arg^{26 34}]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(17-(karboksy)heptadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl))-OH



10

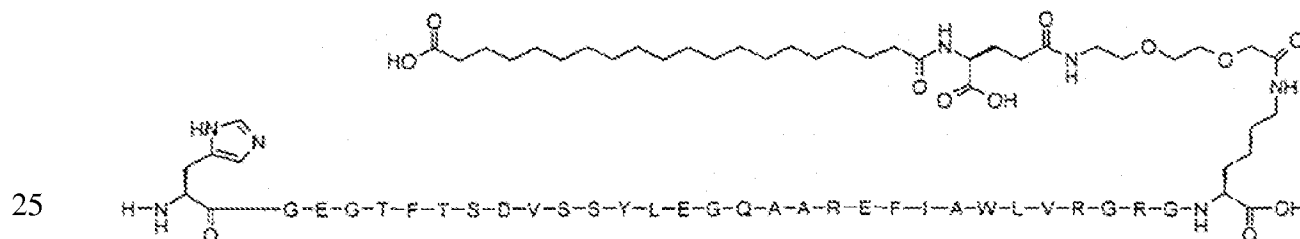
Forbindelsen ble fremstilt som beskrevet i de tidligere eksemplene og ifølge "syntetiske metoder", bortsett fra at oktadekandionsyre C18 ble tilknyttet som en monobeskyttet tert-butylester (3 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) og koblingen ble utført ved hjelp av HOAt og DIC (også 3 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) i NMP. Det urene peptidet ble løst i 22,5% CH₃CN, 0,1 N NaOH for rensing.

HPLC: Eluerer ved 25,4 minutter = 50,4% CH₃CN.

MALDI-MS: 3969 (MH⁺).

Eksempel 51

20 [Gly⁸,Arg^{26 34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(2-(4-(19-(karboksy)nonadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl))-OH



25

Forbindelsen ble fremstilt som beskrevet i de to tidligere eksemplene og ifølge "syntesemetoder". Aminosyren Fmoc-Glu(OtBu) (6 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) ble koblet til harpiksen med HOAt og DIC (6 molare ekvivalenter i forhold til harpiksen) i NMP. Det urene peptidet ble løst i 22,5% CH₃CN, 0,1 N NaOH for rensing.

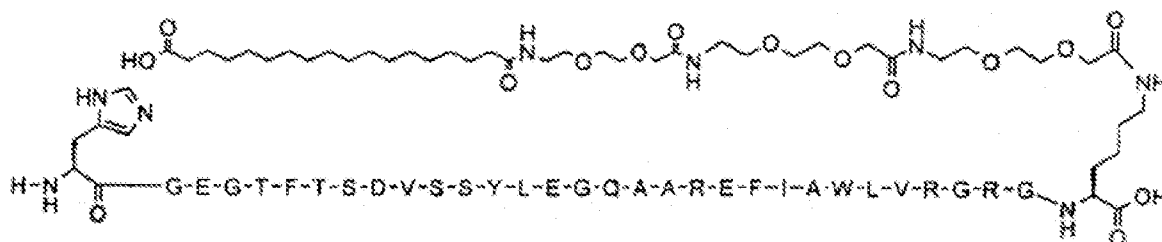
30

HPLC: Eluerer ved 27,2 minutter = 52,2% CH₃CN.

MALDI-MS: 4124 (MH⁺).

Eksempel 52

- 5 [Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(heksadekanoylamino)-etoksy)acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH



10

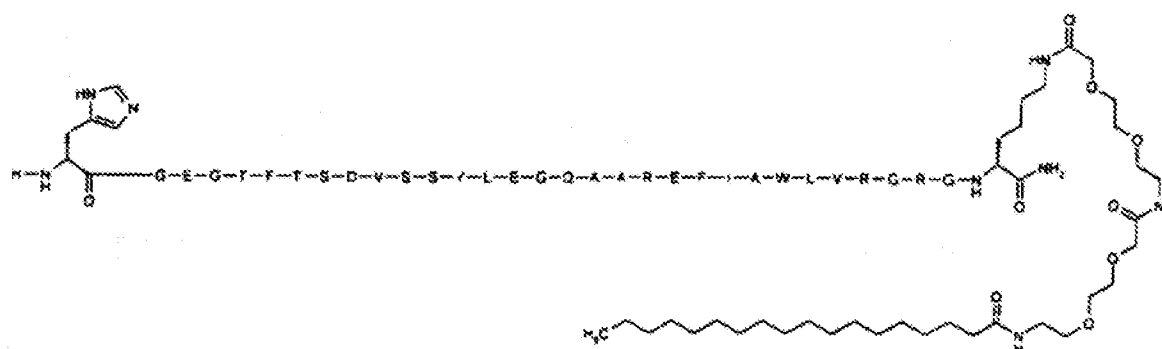
Denne forbindelse blev fremstillet som beskrevet i de tre foregående eksemplene og ifølge "syntesemetoder", bortsett fra at ytterligere to OEG ble koblet til sidekjeden i Lys.

HPLC: Eluerer ved 25,0 minutter = 50,0% CH₃CN.

- 15 MALDI-MS: 4259 (MH⁺).

Eksempel 53

- [Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1 (7-37)Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl)NH₂



20

- 25 Denne forbindelse blev fremstillet som beskrevet i eksempel 1 og ifølge "syntesemetoder".

HPLC (metode B6): RT = 38,8 minutter.

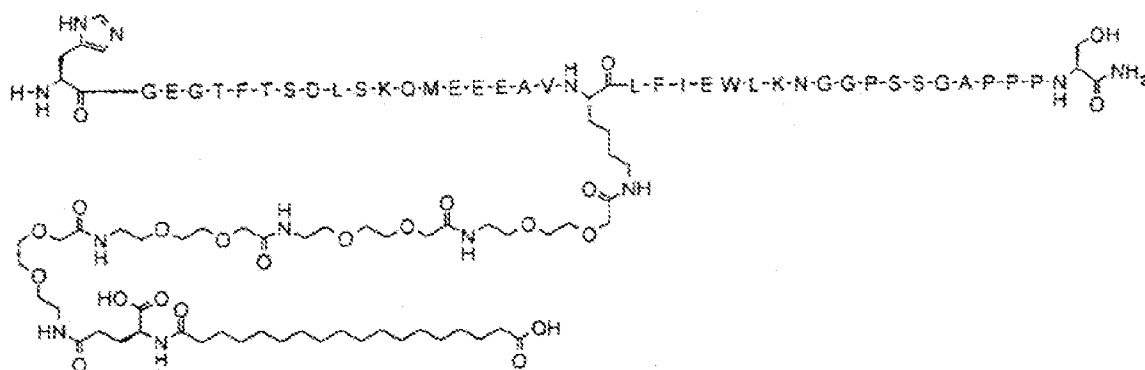
LCMS: m/z = 1022,3 (M+4H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4081,7.

Eksempel 54

N^ε²⁰-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(17-(karboksy)heptadekanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)-etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl [Lys²⁰]eksendin-4 (1-39)-NH₂

5

10



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntesemetoder".

HPLC (metode A1): RT = 41,9 minutter.

15 HPLC (metode B6): RT = 31,3 minutter.

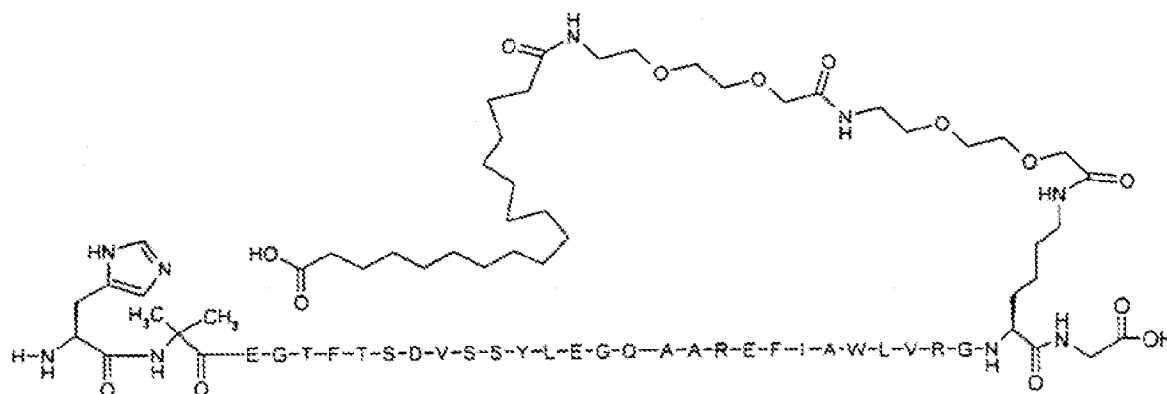
LCMS: m/z = 1722,7 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 5164,9.

Eksempel 55

N^ε³⁶-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl) [Aib⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶] GLP-1 (7-37)

20

25



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

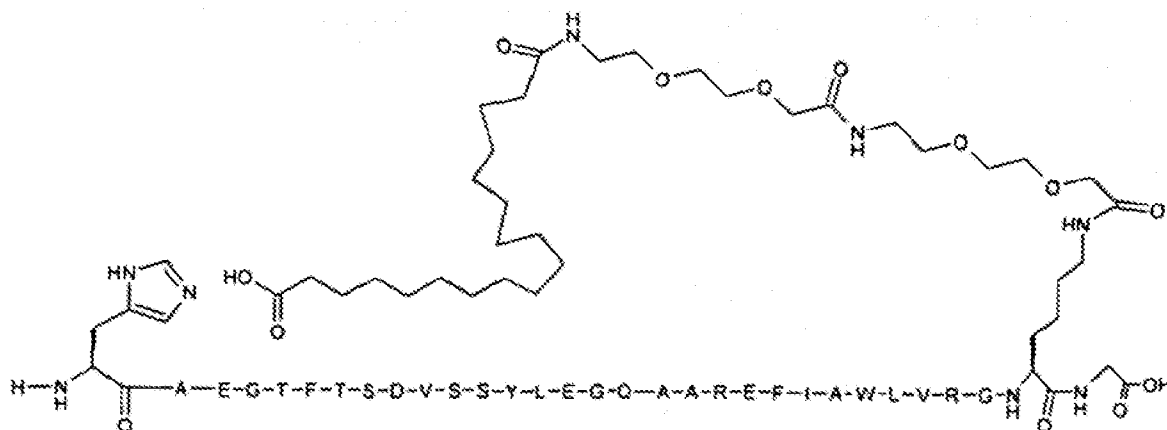
HPLC: (Metode B6): RT = 34,2 minutter.

LC-MS: $m/z = 997,2$ ($M+4H$)⁴⁺, $1329,4$ ($M+3H$)³⁺, $1993,2$ ($M+2H$)²⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3985,5.

Eksempel 56

- 5 N^ε³⁶-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl) [Arg^{26,34},Lys³⁶] GLP-1 (7-37)

10



15

Denne forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåten i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

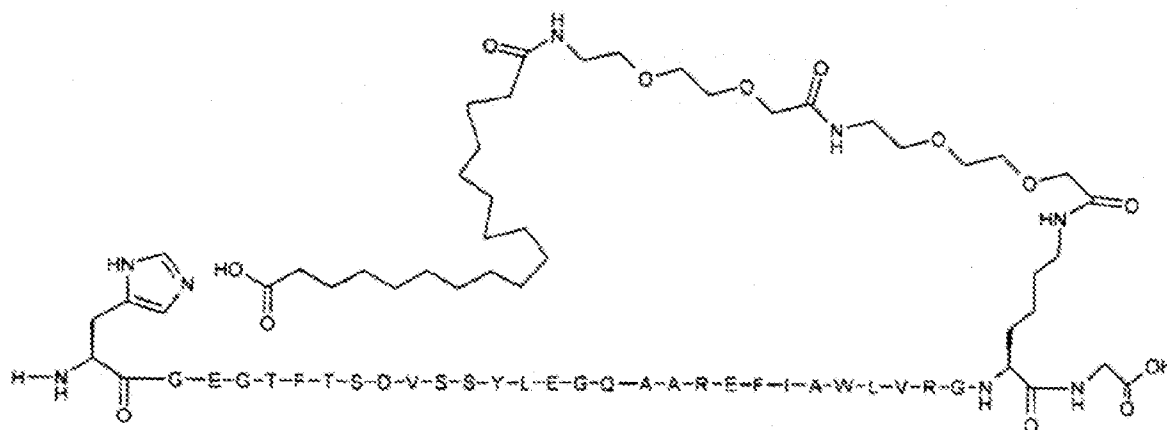
HPLC: (metode B6): RT = 34,2 minutter.

LC-MS: $m/z = 993,8$ ($M+4H$)⁴⁺, $1324,6$ ($M+3H$)³⁺, $1987,2$ ($M+2H$)²⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3971,5.

Eksempel 57

- 20 N^ε³⁶-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl) [Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶] GLP-1 (7-37)

25



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåten i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 34,2 minutter.

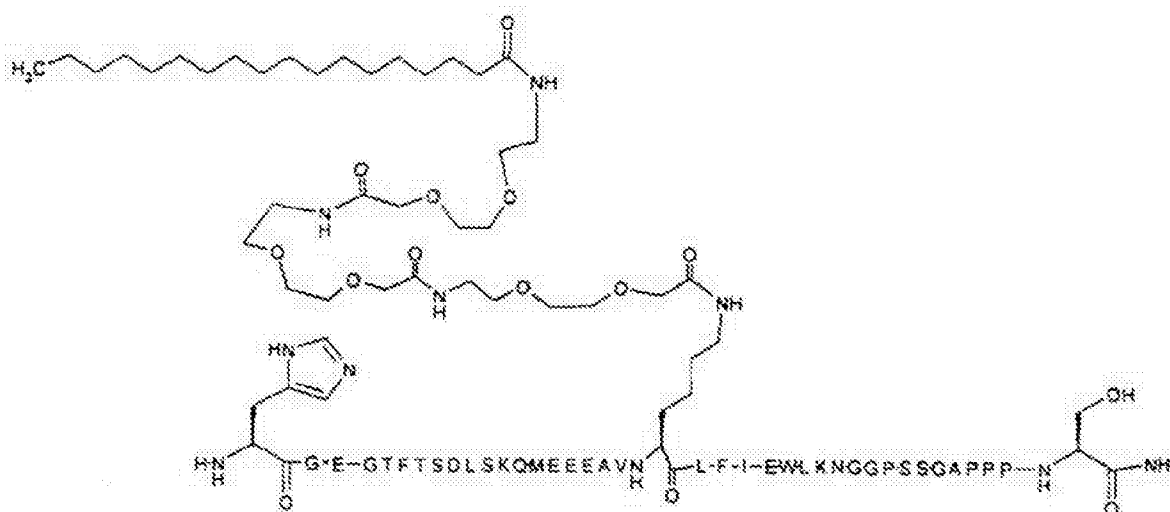
LC-MS: $m/z = 990,3$ ($M+4H$)⁴⁺, $1320,3$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3957,4.

5 Eksempel 58

N^ε²⁰-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(oktadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamin)-etoksy)etoksy)acetylamin)-etoksy)etoksy)acetyl[Lys²⁰] eksendin-4 (1-39)amid

10

15



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåten i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

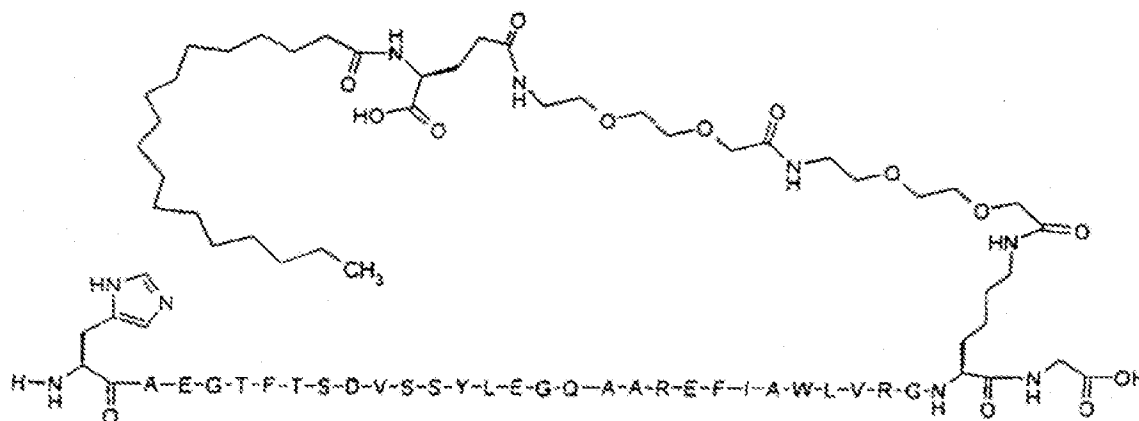
HPLC: (Metode B6): RT = 37,7 minutter.

LC-MS: $m/z = 1216,6$ ($M+4H$)⁴⁺, $1621,4$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4861,5.

20 Eksempel 59

N^ε³⁶-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(oktadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino)etoksy)-etoksy)acetylamin)-etoksy)etoksy)acetyl)-[Arg^{26,34},Lys³⁶]GLP-1-(7-37)

25



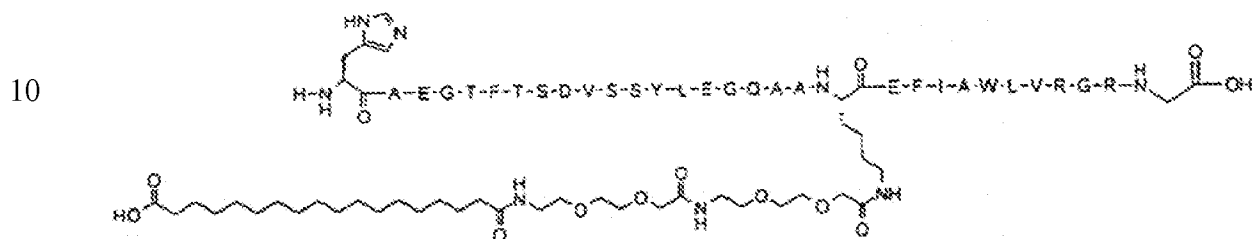
Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 39,1 minutter.

5 LC-MS: $m/z = 1018,8$ ($M+4H$)⁴⁺, $1357,6$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4070,6.

Eksempel 60

N^ε²⁶-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy]etoksy)-acetylamino]etoksy)etoksy]acetyl)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

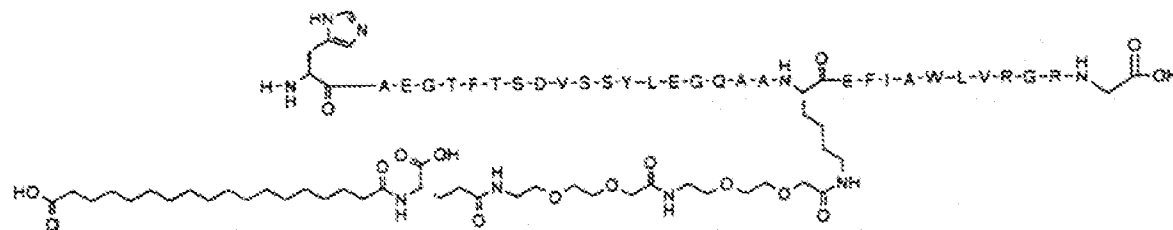
15 HPLC: (Metode B4): RT = 12,1 minutter.

LC-MS: $m/z = 993,0$ ($M+4H$)⁴⁺, $1325,0$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 3970,0.

Eksempel 61

N^ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-karboksyheptadekanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino]etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy]etoksy]acetyl)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH

20



25

Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

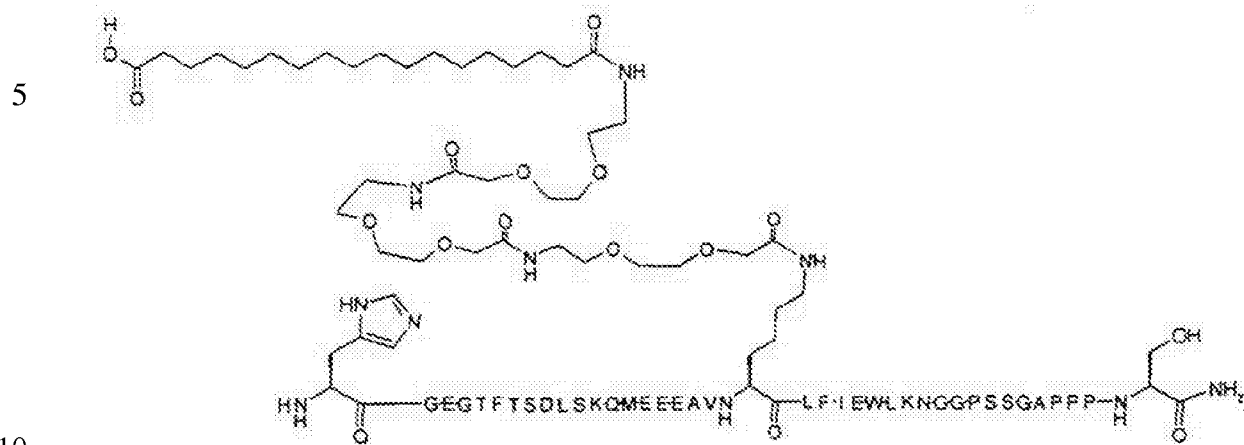
HPLC: (Metode B4): RT = 11,8 minutter.

LC-MS: $m/z = 1026$ ($M+4H$)⁴⁺, 1368 ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4100.

30

Eksempel 62

N^ε²⁰-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)-acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)[Lys²⁰] eksendin-4 (1-39)amid



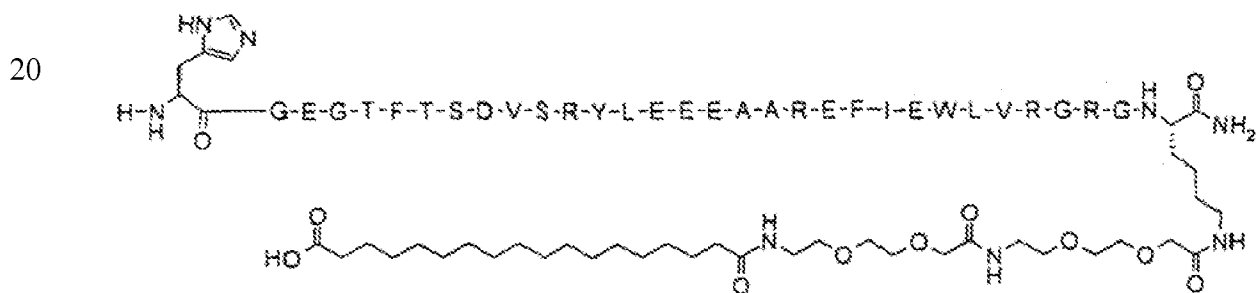
Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 32,3 minutter.

LC-MS: m/z = 1223,9 (M+4H)⁴⁺, 1630,8 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4891,5.

Eksempel 63

[Gly⁸,Glu^{22,23,30},Arg^{18,26,34}]GLP1 (7-37) Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadekanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-NH₂



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

HPLC: (Metode B6): RT = 32,0 minutter.

HPLC: (Metode A1): RT = 43,4 minutter.

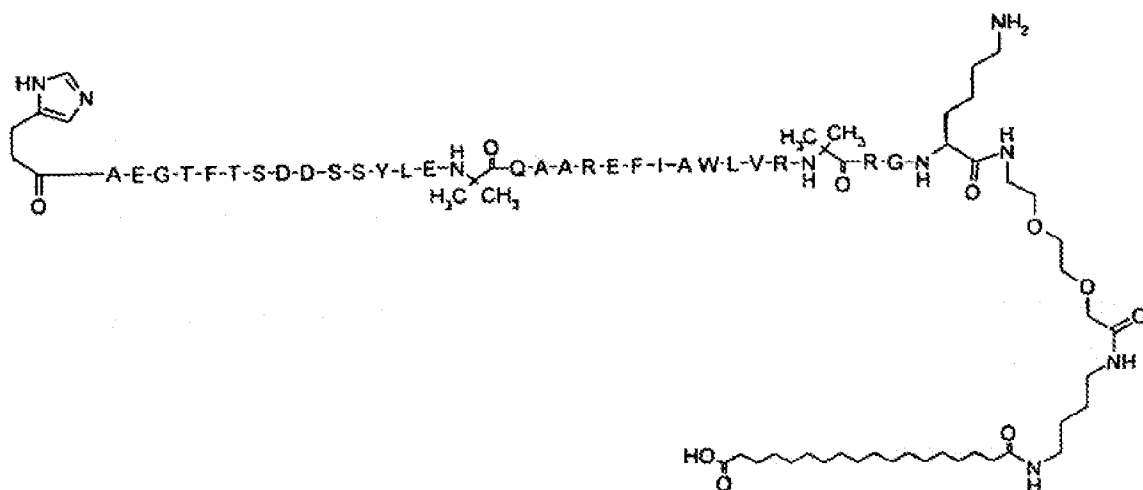
LCMS: m/z = 1438,7 (M+3H)³⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4311,8.

Eksempel 64

[Imidazolylpropionsyre⁷, Asp¹⁶, Aib^{22,35}]GLP1(7-37)Lys NH((2-{[4-(17-karboksyheptadekanoylamino)butylkarbamoyl]metoksy}etoksy)etoksy))

5

10



Denne forbindelse blev fremstillet ifølge fremgangsmåden i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

15

HPLC: (Metode B1): RT = 32,5 minutter.

HPLC: (Metode A1): RT = 43,5 minutter.

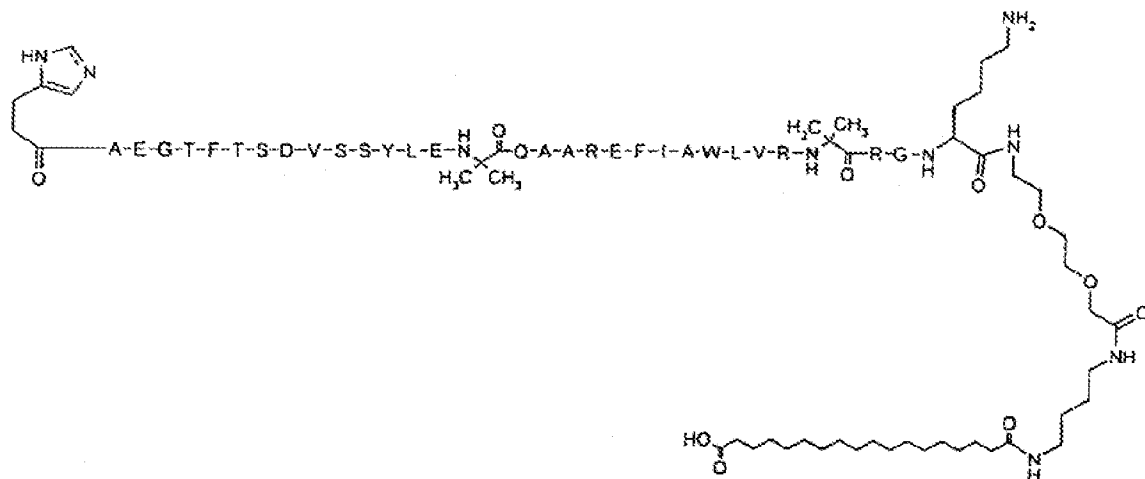
LCMS: m/z = 1028,8 (M+4H)⁴⁺. Beregnet (M+H)⁺ = 4108,7.

Eksempel 65

20

[Imidazolylpropionsyre⁷, Aib^{22,35}]GLP1(7-37)Lys NH((2-{[4-(17-karboksyheptadekanoylamino)butylkarbamoyl]metoksy}etoksy)etoksy))

25



Denne forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåten i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

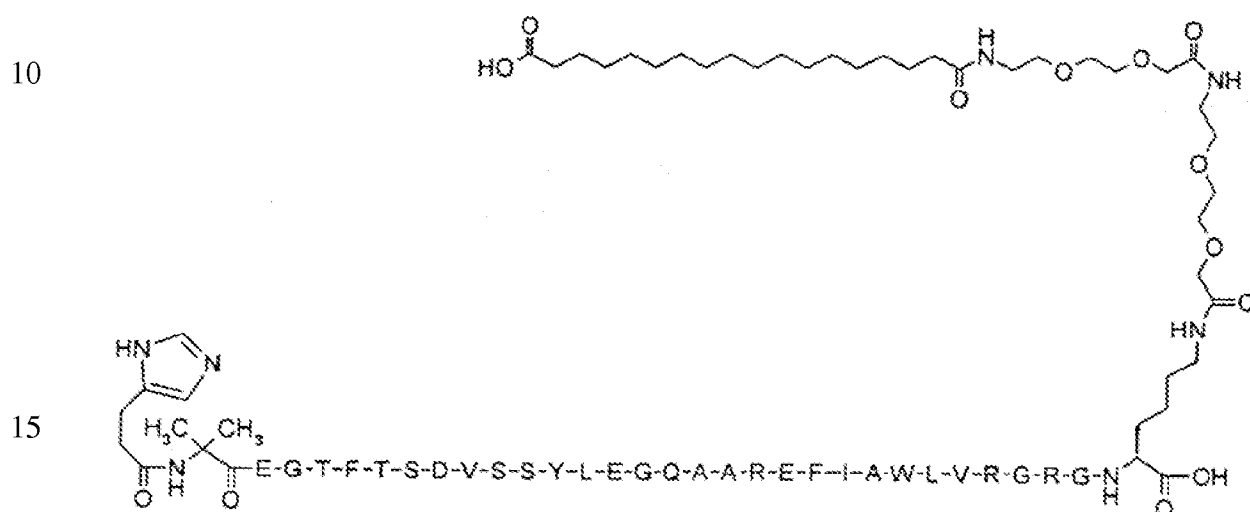
HPLC: (Metode B6): RT = 33,7 minutter.

HPLC: (Metode A1): RT = 44,8 minutter.

5 LCMS: $m/z = 1024,8$ ($M+4H$)⁴⁺, $1365,4$ ($M+3H$)³⁺. Beregnet ($M+H$)⁺ = 4092,8.

Eksempel 66

[3-(5-imidazolyl)propionyl⁷, Aib⁸, Arg^{26,34}]GLP-1 (7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboxyheptanoylamino)etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH



Denne forbindelsen ble fremstilt ifølge fremgangsmåten i eksempel 1 og i "generelle syntetiske metoder".

20 MALDI-MS: 4217 (MH⁺).

HPLC: Eluerer: 25,5 minutter = 50,6% CH₃CN.

BIOLOGISKE OBSERVASJONER

Forlenget virkning av GLP-1-derivater etter i.v. eller s.c. administrering

25 Den forlengede virningen av en rekke GLP-1-derivater ble bestemt ved å undersøke konsentrasjonen av disse i plasma etter sc-administrering i friske griser ved å bruke de fremgangsmåter som er beskrevet i det etterfølgende. For sammenligning undersøkte man også konsentrasjonen i plasma av GLP-1(7-37) etter sc-administrering. Den forlengede virkningen av andre GLP-1-derivater kan bestemmes på samme måte.

Farmakokinetisk testing av GLP-1-analoger i minigriser

Prøvestoffene ble løst i en bærervæske som er egnet for subkutan eller intravenøs administrering. Konsentrasjonen ble justert slik at doseringsvolumet var tilnærmet 1 ml.

- 5 Undersøkelsen ble utført i 12 Göttingen hannminigriser fra Ellegaard Göttingen Minipigs ApS. Dyrene fikk en akklimatiseringsperiode på tilnærmet 10 dager før undersøkelsen startet. Ved begynnelsen av akklimatiseringsperioden var minigrisene omtrent 5 måneder gamle og hadde en vekt på 8-10 kg.

- 10 Undersøkelsen ble utført i et egnet dyrerom med en temperatur på 21-23°C og en relativ fuktighet som var $\geq 50\%$. Rommet var belyst slik at det var en syklus med 12 timers lys og 12 timers mørke. Lyset var på fra kl 06:00 til kl 18:00.

- 15 Dyrene ble holdt i åpne båser med halm på gulvet og det var seks dyr i hver åpne bås. Dyrene hadde fri adgang til vanlig drikkevann under undersøkelsen, men ble fastet fra omtrent kl 16:00 dagen før doseringen til omtrent 12 timer etter doseringen.

Dyrene ble veid ved ankomst og på doseringsdagen.

- 20 Dyrene fikk en enkelt intravenøs eller subkutan injeksjon. Den subkutane injeksjonen ble gitt på høyre side av nakken, omtrent 5-7 cm fra høyre øre og 7-9 cm fra midten av nakken. Injeksjonene ble gitt med en stoppeanordning på nålen, noe som gjorde at bare 0,5 cm av nålen kunne innføres i dyret.

Hvert teststoff ble gitt tre dyr. Hvert dyr mottok en dose på 2 nmol/kg kroppsvekt.

Seks dyr ble dosert hver uke, mens de gjenværende seks dyrene hvilte.

Det ble oppnådd en full plasmakonsentrasjons-tidsprofil fra hvert dyr. Det ble tatt blodprøver ved å anvende det følgende tidsskjema:

- 25 Etter intravenøs administrering:

Predose (0), 0,17 (10 minutter), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 og 120 timer etter injeksjon.

Etter subkutan administrering:

Predose (0), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 og 120 timer etter injeksjon.

- 30 På hvert prøvetidspunkt ble det tatt 2 ml blod fra hvert dyr. Blodprøvene ble tatt fra lårvenen.

Blodprøvene ble oppsamlet i testrør som inneholdt en buffer for stabilisering for å hindre enzymatisk nedbrytning av GLP-1-analogene.

Plasma ble umiddelbart overført til Micronic-rør. Tilnærmet 200 µl plasma ble overført til hvert Micronic-rør. Plasma ble lagret ved -20°C inntil det ble analysert.

- 5 Plasmaprøvene ble analysert for innholdet av GLP-1-analoger ved å bruke en immunoprøve. Plasmakonsentrasjons-tidsprofilene ble analysert ved hjelp av en ikke-kompartemental farmakokinetisk analyse. De følgende farmakokinetiske parametere ble beregnet i hvert enkelt tilfelle: AUC, AUC/dose, AUC%_{Extrap}, C_{max}, t_{max}, λ_z, t_{1/2}, CL, CL/f, V_z, V_z/f og MRT.

- 10 Utvalgte forbindelser ble testet i danske landrasegriser.

Farmakokinetisk testing av GLP-1-analoger i griser

- Griser (50% Duroc, 25% Yorkshire og 25% dansk landrase, omtrent 40 kg) ble fastet fra begynnelsen av eksperimentet. Hver enkelt gris ble administrert 0,5 nmol av testforbindelsen pr kg kroppsvekt i en 50 µM isoton løsning (5 mM fosfat, pH 7,4, 15 0,02% Tween[®]-20 (Merck), 45 mg/ml mannitol (pyrogenfritt, Novo Nordisk)). Blodprøvene ble tatt fra et kateter i vena jugularis. 5 ml av blodprøvene ble helt over i avkjølte glass som inneholdt 175 µl av den følgende løsningen: 0,18 M EDTA, 15000 KIE/ml aprotinin (Novo Nordisk) og 0,30 mM valin-pyrrolidid (Novo Nordisk), pH 7,4. I løpet av 30 minutter ble prøvene sentrifugert i 10 minutter ved 20 5-6000* g. Temperaturen ble holdt på 4°C. Supernatanten ble pipettert over i forskjellige glass og holdt på minus 20°C inntil de skulle brukes.

- Plasmakonsentrasjonene av peptidene ble bestemt i en sandwich ELISA eller ved hjelp av RIA ved å bruke forskjellige mono- eller polyklonale antistoffer. Valg av antistoffer var avhengig av GLP-1-derivatene. Tidspunktet hvor hvilket 25 toppkonsentrasjonen i plasma ble oppnådd varierer innenfor vide grenser, avhengig av det valgte spesielle GLP-1-derivatet.

Generell prøveprotokoll for sandwich ELISA i 96 brønners mikrotiterplate

- Beleggende buffer (PBS) : Fosfatbufret saltløsning, pH 7,2
- 30 Vaskebuffer (PBS-vask) : Fosfatbufret saltløsning, 0,05% volum/volum Tween 20, pH 7,2
- Prøvebuffer (BSA-buffer) : Fosfatbufret saltløsning, 10 g/l storfeserumalbumin (Fluka 05477), 0,05% volum/volum Tween 20, pH 7,2
- Streptavidinbuffer : Fosfatbufret saltløsning, 0,5 M NaCl, 0,05% volum/volum Tween 20, pH 7,2
- 35 Standard : Individuelle forbindelser i en plasmamatrikse

A-TNP	: Nonsens antistoff
AMDEX	: Streptavidin-pepperrotperoksidase (Amersham RPN4401V)
5 TMB-substrat	: 3,3',5,5'tetrametylbenzidin (<0,02%), hydrogenperoksid

Prøven ble utført som følger (volum/brønn):

- 1.) Belegging med 100 µl innfangende antistoff 5 µg/ml i PBS-buffer
→ innkuber o/n, 4°C
→ 5x PBS-vasking → blokkert med siste vasking i minimum 30 minutter
10 → tøm platen
- 2.) 20 µl prøve + 100 µl biotinyllert påvisende antistoff 1 µg/ml i BSA-buffer med 10 µg/ml A-TNP
→ innkubering i 2 timer, ved romtemperatur, i risteapparat → 5x PBS-vasking, platen tømmes
- 15 3.) 100 µl AMDEX 1:8000 i streptavidinbuffer
→ innkubering i 45-60 minutter ved romtemperatur i et risteapparat
→ 5x PBS-vasking, tøm platen
- 4.) 100 µl TMB-substrat
→ innkuber x minutter ved romtemperatur i et risteapparat
20 → stopp reaksjonen med 100 µl 4 M H₃PO₄

Avles absorpsjonen ved 450 nm med 620 nm som referanse.

Konsentrasjonen i prøvene ble beregnet ut fra standardkurver.

Generell prøveprotokoll for RIA

25 DB-buffer	: 80 mM fosfatbuffer, 0,1% humant serumalbumin, 10 mM EDTA, 0,6 mM tiomersal, pH 7,5
FAM-buffer	: 40 mM fosfatbuffer, 0,1% humant serumalbumin, 0,6 mM tiomersal, pH 7,5
30 Trekull	: 40 mM fosfatbuffer, 0,6 mM tiomersal, 16,7% storfeplasma, 15 g/l aktivert karbon, pH 7,5 (bland suspensjonen i minimum 1 time før bruk ved 4°C)
Standard	: Individuelle forbindelser i en plasmamatrikse

Prøven ble utført i minisorprør 12 x 75 ml (volum/rør) som følger:

	Db- buffer	PRØVE	Antistoff	FAM- buffer	Tracer	Trekull	H ₂ O
Dag 1							
Totalt					100 µl		
NSB	330 µl			100 µl			
Prøve	330 µl	30 µl	100 µl		100 µl		
Bland, innkubert o/n ved 4°C							
Dag 2							
Totalt							1,5 ml
NSB						1,5 ml	
Prøve						1,5 ml	

Bland - innkubert 30 minutter ved 4°C - sentrifuger ved 3000 rpm, 30 minutter - overfør supernatanten umiddelbart til nye rør, lukk disse med en kork og utfør tellingen på en gammateller i 1 minutt. Konsentrasjonen i prøvene blir beregnet ut fra individuelle standardkurver.

5

GLP-1 radioreseptorprøve (RRA):

Denne metoden er en radiometrisk ligandbindingsprøve som bruker LEADseeker billeddannende partikler. Prøven er sammensatt av membranfragmenter som inneholder GLP-1-reseptoren, umerkede GLP-1-analoger, humant GLP-1 merket med ¹²⁵I og PS LEADseeker-partikler belagt med hvetekimagglutinin (WGA). Kald og ¹²⁵I-merket GLP-1 vil konkurrere om binding til reseptoren. Når LEADseeker-partiklene blir tilsatt, vil de binde seg til karbohydratrester på membranfragmentene via WGA-restene. Nærkontakt mellom ¹²⁵I-molekylene og LEADseeker-partiklene vil gi en lysemisjon fra partiklene. LEADseekeren vil gi et bilde av det emitterte lyset og vil være revers korrelert til mengden av GLP-1-analogen som er tilstede i prøven.

10

15

Reagenser & materialer:

Forbehandling av dyreplasma: Dyreplasma ble holdt på 50°C i 4 timer og så sentrifugert ved 10000 rpm i 10 minutter. Deretter ble Val-Pyr (10 µM) og aprotenin (500 KIE/ml) tilsatt og blandingen ble lagret ved < -18°C inntil den skulle brukes.

20

GLP-1-analogkalibratorer: GLP-1-analogene ble overført til varmebehandlet plasma for å fremstille fortynningsløsninger som varierte fra tilnærmet 1 μM til 1 pM.

- 5 *GLP-1 RRA-prøvebuffer:* 25 mM Na-HEPES (pH = 7,5), 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 0,1% ovalbumin, 0,003% tween 20, 0,005% bacitracin, 0,05% NaN_3 .

GLP-1-reseptorsuspensjon: GLP-1-reseptormembranfragmentene ble rensset fra nyfødt hamsternyre (BHK) -celler som uttrykte den humane pankreatiske GLP-1-reseptoren. Lagret ved $< -80^\circ\text{C}$ inntil bruk.

- 10 *WGA-koblet polystyren LEADseeker billeddannende perler (RPNQ0260, Amersham):* Perlene ble rekonstituert med GLP-1 RRA-prøvebuffer til en konsentrasjon på 13,3 mg/ml. GLP-1-reseptormembransuspensjonen ble så tilsatt og blandingen ble innkubert kaldt ($2-8^\circ\text{C}$) ved end-over-end i minst 1 time før bruk.

[^{125}I]-GLP-1(736)amid (Novo Nordisk A/S): Lagret ved $< -18^\circ\text{C}$ inntil bruk.

- 15 *Etanol 99,9 volum% (De Danske Spritfabrikker A/S):* Lagret ved $< -18^\circ\text{C}$ inntil bruk.

MultiScreen® Solvinert 0,45 μm hydrofobe PTFE-plater (MSRPN0450, Millipore Corp)

Polypropylenplater (katalog nr. 650201, Greiner Bio-One)

- 20 *Hvite polystyren 384-brønners plater (katalog nr. 781075, Greiner Bio-One)*

Apparater:

Horisontal plateblander

Sentrifuge med standard svingbøtte mikrotitreringsplaterotorsammensetning

UltraVap - nedtørkings prøvekonsentrator (Porvair)

- 25 LEADseeker™ multimodalitets billedsystem (Amersham)

Prøveprosedyre:

Prøvefremstilling:

Plasser MultiScreen® Solvinert filterplaten på en kjemisk sammenlignbar mottakerplate (det vil si polypropylenplater for oppsamling av filtratet).

- 30 Tilsett 150 μl iskald etanol 99,9% i de tomme brønnene på MultiScreen® Solvinert filterplaten fulgt av 50 μl kalibrator eller plasmaprøve. Plasser lagringslokket på filterplaten. Innkuber platene i 15 minutter ved $18-22^\circ\text{C}$ på en horisontal plateblander.

Plasser den sammensatte filter- og mottakerplaten med lokket i en standard svingbøtte mikrotitreringsplaterotors sammensetning. Filtratet blir så oppsamlet i de tomme brønnene på mottakerplaten ved 1500 rpm i 2 minutter.

- 5 Tørk filtratet ved å bruke nevnte UltraVap-apparat ved oppvarming (40°C) i nitrogen i 15 minutter. Rekonstituert det tørre materialet ved å tilsette 100 µl GLP-1 RRA-prøvebuffer i hver brønn. Innkubert platen i 5 minutter på en horisontalblander.

GLP-1 radioreseptorprøve:

Bruk det følgende pipetteringsskjema og hvite polystyren 384 brønners plater:

- 10
- 35 µl GLP-1 RRA-prøvebuffer.
 - 5 µl rekonstituert filtrat.
 - 10 µl [¹²⁵I]-GLP-1(7-36)amid. Lagerløsningen ble fortynnet i GLP-1 RRA-prøvebuffer til 20000 cpm/brønn før bruk.
 - 15 µl GLP-1 reseptormembranfragmenter (≈ 0,5 µg/brønn) på forhånd belagt
- 15 på WGA-polystyren LEADseeker billedperler (0,2 mg/brønn).

Forsegl platene og innkubert over natten ved 18-22°C.

Lysemisjonen fra hver brønn ble påvist ved å bruke LEADseeker™ multimodalitetsbilledsystemet i 10 minutter.

20 **Stimulering av cAMP-dannelse i en cellelinje som uttrykker den klonede humane GLP-1-reseptoren**

Rensede plasmamembraner fra en stabil transfektert cellelinje, BHK467-12A (tk-ts13) som uttrykker den humane GLP-1-reseptoren, ble stimulert med GLP-1 og peptidanaloger og størrelsen på cAMP-produksjonen ble målt ved å bruke AlphaScreen™ cAMP-prøvesettet fra Perkin Elmer Life Sciences.

- 25 En stabil transfektert cellelinje ble fremstilt ved NN og en klon med høyt ekspresjonsnivå ble valgt for screening. Cellene ble dyrket ved 5% CO₂ i DMEM, 5% FCS, 1% Pen/Strep og 0,5 mg/ml G418.

- 30 Celler ved tilnærmet 80% sammenflytning ble vasket 2 ganger med PBS og høstet med Versene, sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm hvoretter supernatanten ble fjernet. Alle de ytterligere trinnene ble utført på is. Cellepelletten ble homogenisert ved hjelp av Ultrathurax i 20-30 sekunder i 10 ml buffer 1 (20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH = 7,4), sentrifugert i 15 minutter ved 20000 rpm, hvoretter pelletten på nytt ble suspendert i buffer 2 (20 mM Na-HEPES, 0,1 mM EDTA, pH = 7,4).

Suspensjonen ble homogenisert i 20-30 sekunder og sentrifugert i 15 minutter ved 20000 rpm. Suspendering i buffer 2, homogenisering og sentrifugering ble gjentatt en gang og membranene ble på nytt suspendert i buffer 2 og var da ferdig for analyse eller ble lagret ved -80°C. Den funksjonelle reseptorprøven ble utført ved å

5 måle den peptidinduserte cAMP-produksjonen ved hjelp av AlphaScreen-teknologi. Det grunnleggende prinsippet ved AlphaScreen-teknologien er en konkurranse mellom endogent cAMP og eksogent tilsatt biotin-cAMP. Innfangingen av cAMP ble oppnådd ved å bruke et spesifikt antistoff som var konjugert til akseptorperler. Dannet cAMP ble telt og målt i en AlphaFusion mikroplateanalysator. EC₅₀-

10 verdiene ble beregnet ved å bruke Graph-Pad Prisme-programvaren.

PATENTKRAV

1. Forbindelse,
karakterisert ved formelen (I):

A - W - B - Y - terapeutisk polypeptid (I)

5 hvori nevnte polypeptid er et GLP-1-peptid omfattende aminosyresekvensen med formel (V):

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈

Formel (V) (SEQ ID No: 3)

10 hvori

Xaa₇ er L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β-hydroksyhistidin, homohistidin, N^α-acetylhistidin, α-fluormetylhistidin, α-metylhistidin, 3-pyridylalanin, 2-pyridylalanin eller 4-pyridylalanin;

15 Xaa₈ er Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, (1-aminocyclopropyl)-karboksylsyre, (1-aminocyclobutyl)-karboksylsyre, (1-aminocyclopentyl)-karboksylsyre, (1-aminocyclohexyl)-karboksylsyre, (1-aminocycloheptyl)-karboksylsyre, eller (1-aminocyclooctyl)-karboksylsyre;

Xaa₁₈ er Ser, Lys eller Arg;

Xaa₂₂ er Gly, Glu eller Aib;

20 Xaa₂₃ er Gln, Glu, Lys eller Arg;

Xaa₂₆ er Lys, Glu eller Arg;

Xaa₃₀ er Ala, Glu eller Arg;

Xaa₃₄ er Lys, Glu eller Arg;

Xaa₃₅ er Gly eller Aib;

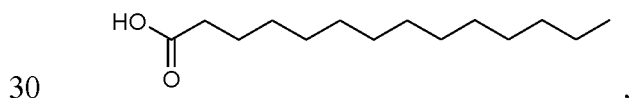
25 Xaa₃₆ er Arg eller Lys;

Xaa₃₇ er Gly, Ala, Glu eller Lys;

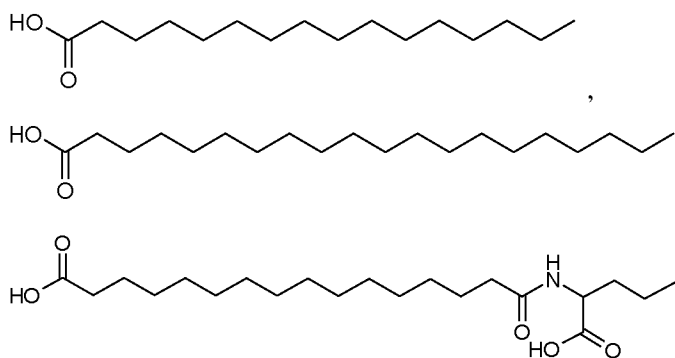
Xaa₃₈ er Lys, amid eller er fraværende

hvor

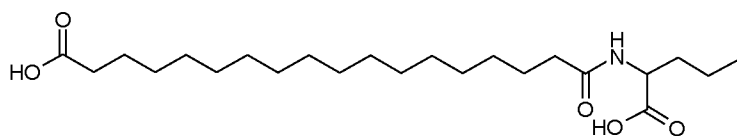
A er en albumbindende rest valg fra gruppen bestående av



110

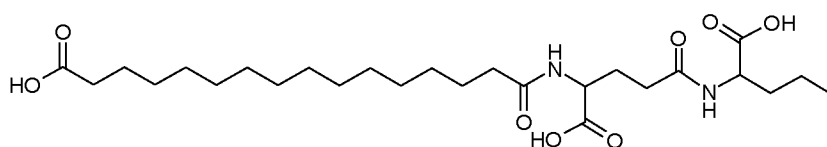


hvor det kirale karbonatomet enten er R eller S,



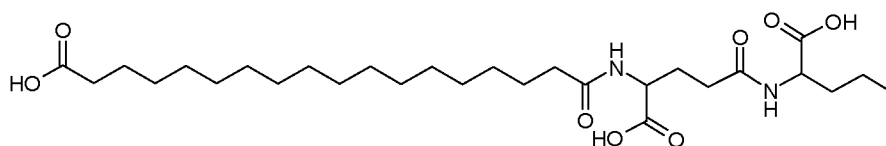
5

hvor det kirale karbonatomet enten er R eller S,

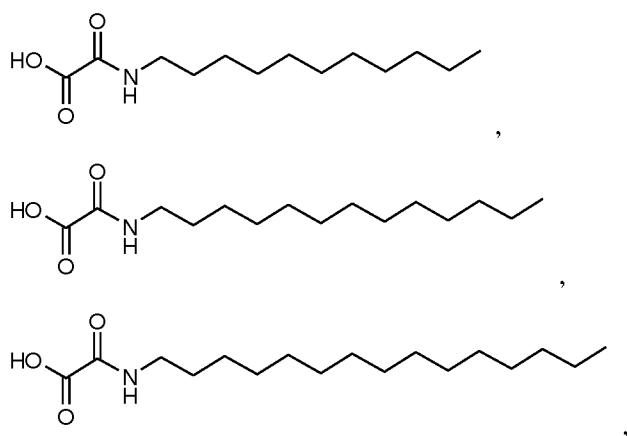


hvor de to kirale karbonatomene enten er R eller S,

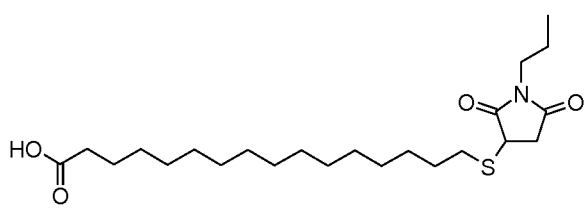
10



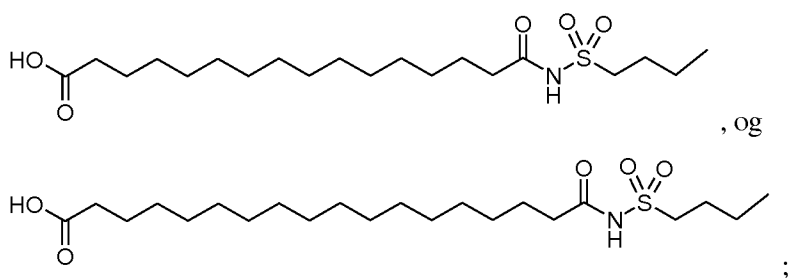
hvor de to kirale karbonatomene enten er R eller S,



15



111



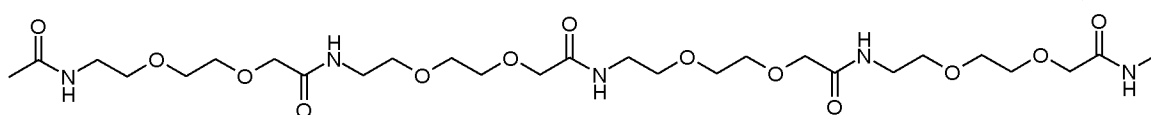
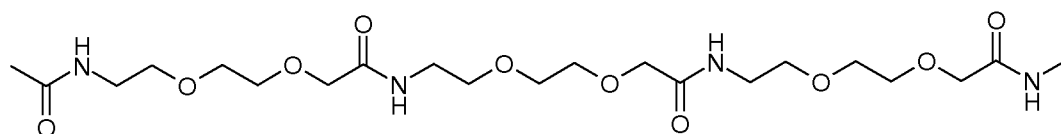
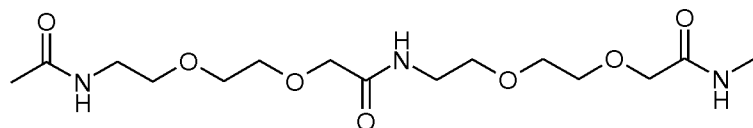
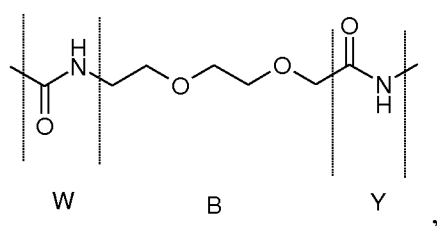
- 5 B er $-(\text{CH}_2)_l\text{-O-}[(\text{CH}_2)_n\text{-O}]_m\text{-(CH}_2)_p\text{-[C(O)NH-(CH}_2)_l\text{-O-}[(\text{CH}_2)_n\text{-O}]_m\text{-(CH}_2)_p\text{]}_q\text{-}$,
 hvor l, m, n, og p uavhengig er 1-5, og q er 0-5;

- Y er en kjemisk gruppe som binder B og det terapeutiske middelet, valgt fra gruppen bestående av $-\text{C(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{NHC(O)-}$, $-\text{OC(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)O-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{NHC(O)-}$, $-\text{C(O)CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)CH=CH-}$, $-\text{CH=CHC(O)-}$, $-(\text{CH}_2)_s\text{-}$, $-\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)O-}$, $-\text{OC(O)-}$, $-\text{NHC(O)-}$ and $-\text{C(O)NH-}$, hvori s is
 10 0 eller 1; og

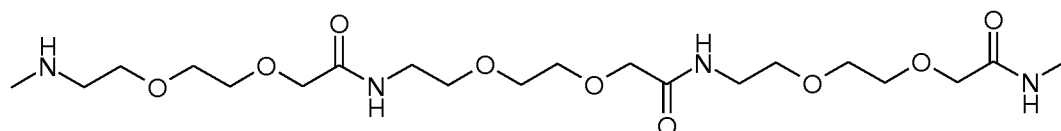
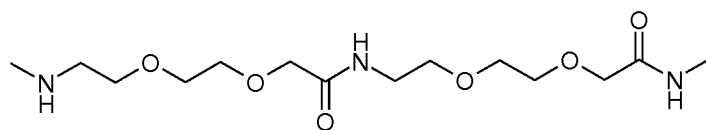
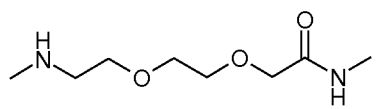
- W er en kjemisk gruppe som binder A og B, valgt fra gruppen bestående av $-\text{C(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)-}$, $-\text{C(O)NHCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{NHC(O)-}$, $-\text{OC(O)NH-}$, $-\text{NHC(O)O-}$, $-\text{C(O)CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}_2\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)CH=CH-}$, $-\text{CH=CHC(O)-}$, $-(\text{CH}_2)_s\text{-}$, $-\text{C(O)-}$, $-\text{C(O)O-}$, $-\text{OC(O)-}$, $-\text{NHC(O)-}$ og $-\text{C(O)NH-}$, hvori s er 0 eller 1;
 15

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller forløpermedikament derav.

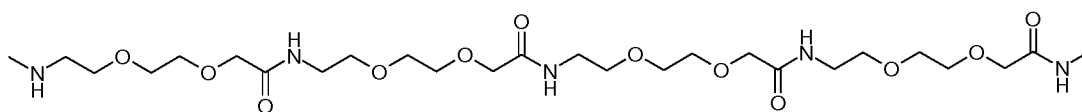
2. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,
 20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t i) q er 0 eller 1; ii) q er 1; eller iii) q er 0. .
3. Forbindelse ifølge ethvert av kravene 2-13,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t l er 2; og/eller hvori n er 2.
4. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t -W-B-Y- er valgt fra gruppen bestående av



5



, og



10

5. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,

karakterisert ved at den albuminbindende resten i) via avstandsgruppe og
linkere er knyttet til nevnte terapeutiske polypeptid via ϵ -aminogruppen på en
lysinerest; og/eller ii) via en linker til en aminosyrerest valgt fra cystein, glutamat og
aspartat.

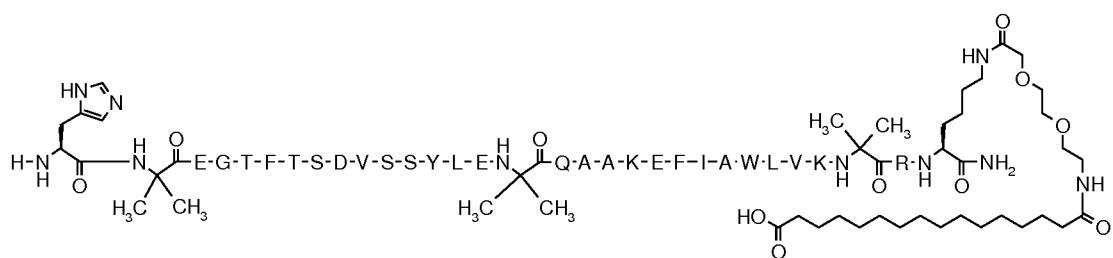
15

6. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvori nevnte GLP-1-peptid
omfatter i) ikke mer enn 10 aminosyrerester som har blitt erstattet, tilført eller
fjernet sammenliknet med GLP-1 (7-37) (SEQ ID Nr. 1); ii) fortrinnsvis ikke mer
enn 6 aminosyrerester som har blitt erstattet, tilført eller fjernet sammenliknet med

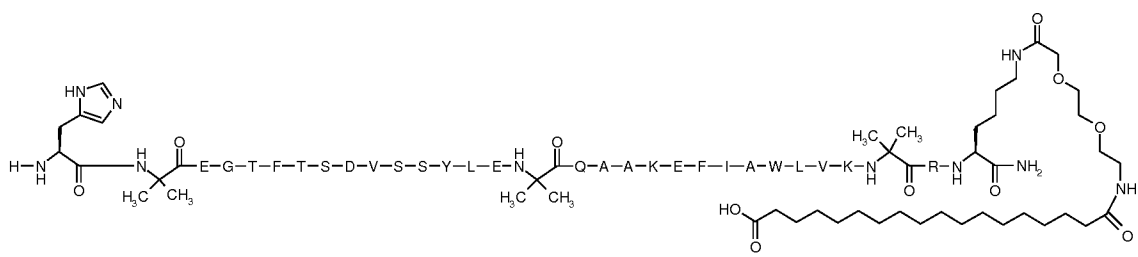
20

GLP-1 (7-37) (SEQ ID Nr. 1); og/eller iii) ikke mer enn 4 aminosyrerester som ikke er kodet av den genetiske kode.

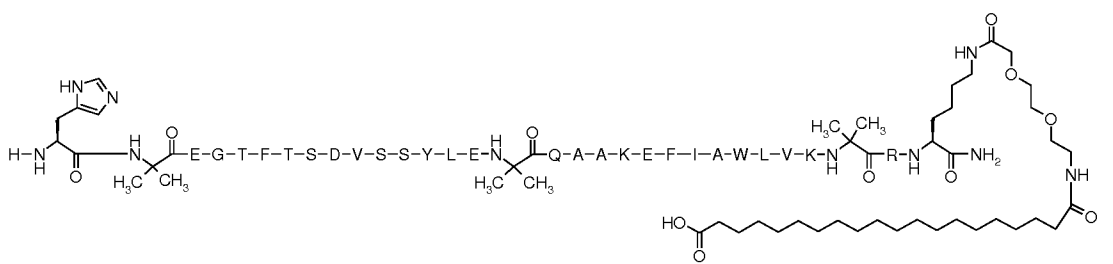
7. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvori i) nevnte GLP-1-peptid omfatter en Aib-rest i posisjon 8; og/eller ii) hvori aminosyreresten i posisjon 7 i
 5 nevnte GLP-1-peptid er valgt fra gruppen bestående av D-histidin, desaminohistidin, 2-aminohistidin, β -hydroksyhistidin, homohistidin, N^{α} -acetylhistidin, α -fluormetylhistidin, α -metylhistidin, 3-pyridylalanin, 2-pyridylalanin og 4-pyridylalanin.
8. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,
 10 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte GLP-1-peptid er valgt fra gruppen bestående av Arg³⁴GLP-1(7-37),
 Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38), Lys³⁸Arg^{26,34}GLP-1(7-38)-OH, Lys³⁶Arg^{26,34}GLP-1(7-36),
 Aib^{8,22,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,35}GLP-1(7-37), Aib^{8,22}GLP-1(7-37),
 Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38),
 15 Aib^{8,22}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38),
 Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38),
 Aib^{8,35}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg²⁶Lys³⁸GLP-1(7-38),
 Aib^{8,22,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Arg³⁴Lys³⁸GLP-1(7-38),
 Aib^{8,22,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,35}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38), Aib^{8,22}Ala³⁷Lys³⁸GLP-1(7-38),
 20 Aib^{8,22,35}Lys³⁷GLP-1(7-37), Aib^{8,35}Lys³⁷GLP-1(7-37) and Aib^{8,22}Lys³⁷GLP-1(7-38).
9. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte GLP-1-peptid er knyttet til nevnte hydrofile avstandsgruppe via aminosyreresten i posisjon 23, 26, 34, 36 eller 38 i forhold til aminosyresekvensen SEKV.ID. NR. 1.
- 25 10. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at en albuminbindende rest via nevnte hydrofile avstandsgruppe er knyttet til den C-terminale aminosyreresten i nevnte GLP-1-peptid.
11. Forbindelse ifølge krav 10,
 30 k a r a k t e r i s e r t v e d at en annen albuminbindende rest er knyttet til en aminosyrerest som ikke er den C-terminale aminosyreresten.
12. Forbindelse ifølge ethvert av de foregående krav,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte forbindelse er valgt fra gruppen bestående av
 N⁶³⁷-{2-[2-(2-(15-karboksy-pentadecanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl}-[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]
 35 GLP-1(7-37)amid,



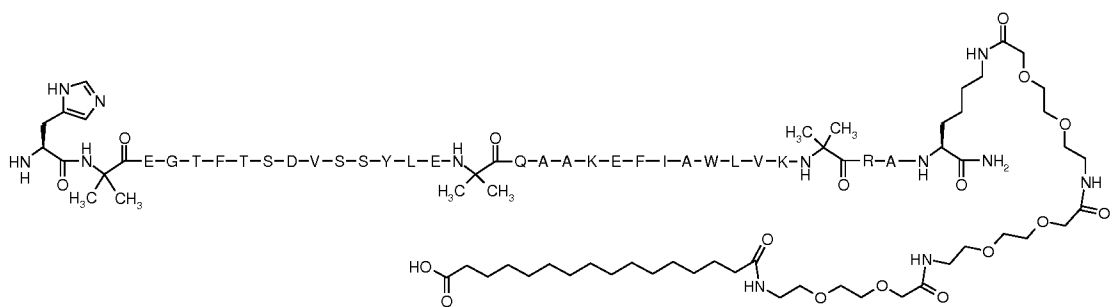
N⁶³⁷-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid,



5 N⁶³⁷-(2-(2-(2-(19-karboksynonadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetyl)[Aib^{8,22,35},Lys³⁷]GLP-1(7-37)amid,



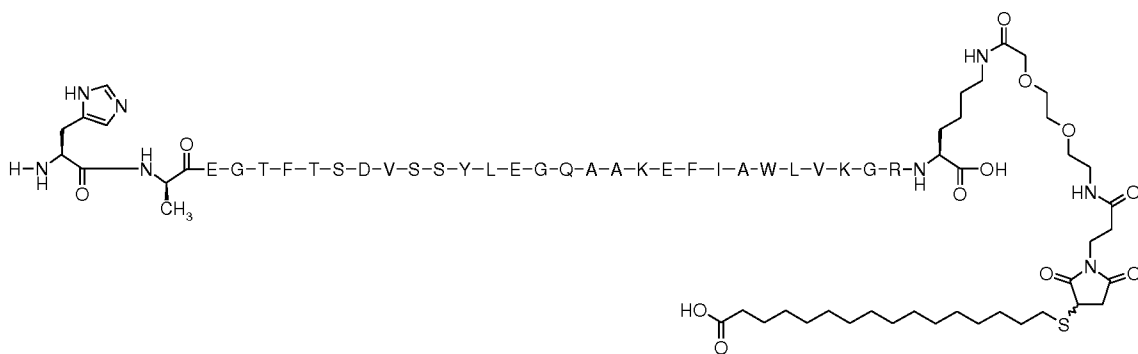
[Aib^{8,22,35}]GLP-1(7-37)Lys(((2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(15-karboksyptadecanoylamino)-etoksy]etoksy}acetyl)amino)etoksy]etoksy}acetyl)amino)etoksy]etoksy}acetyl)amid,



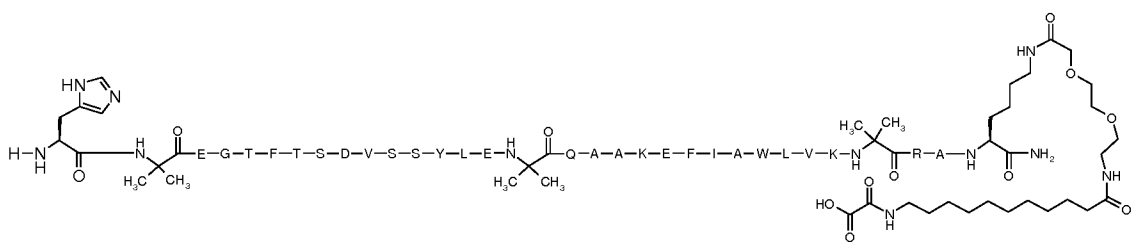
10

N⁶³⁷-([2-(2-{3-[2,5-dioxo-3-(15-karboksyptadecylsulfanyl)-pyrrolidin-1-yl]-propionylamino}etoksy)etoksy)acetyl)-[D-Ala⁸,Lys³⁷]-GLP-1-[7-37]amid,

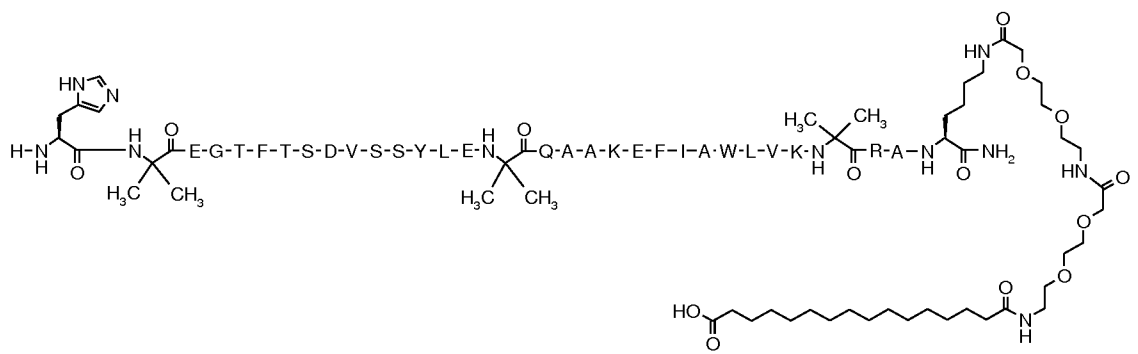
115



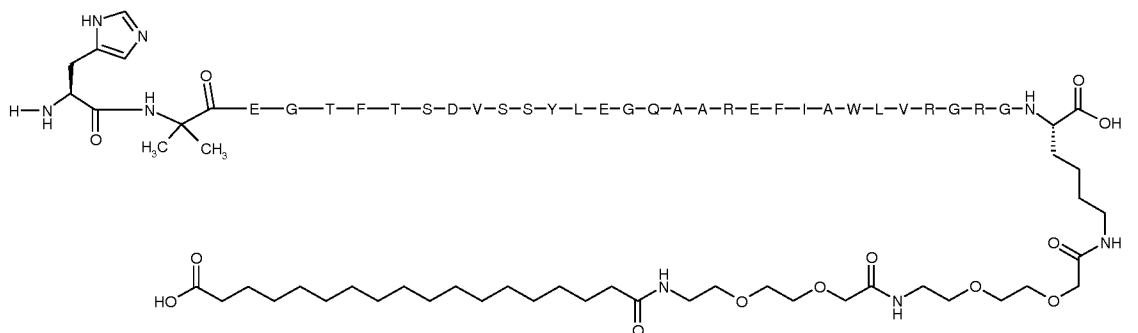
[Aib^{8,22,35}Ala³⁷]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(2-(11-(oxalylamino)undecanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl-)))amid,



5 [Aib^{8,22,35},Ala³⁷]-GLP-1(7-37)Lys({2-[2-(2-{2-[2-(2-(15-karboksy-pentadecanoylamino)-etoksy]etoksy}acetylamin)etoksy]etoksy}acetyl)amid,



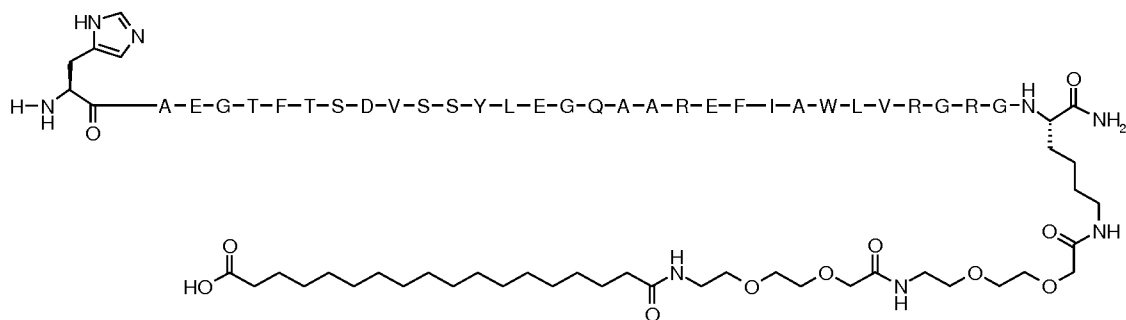
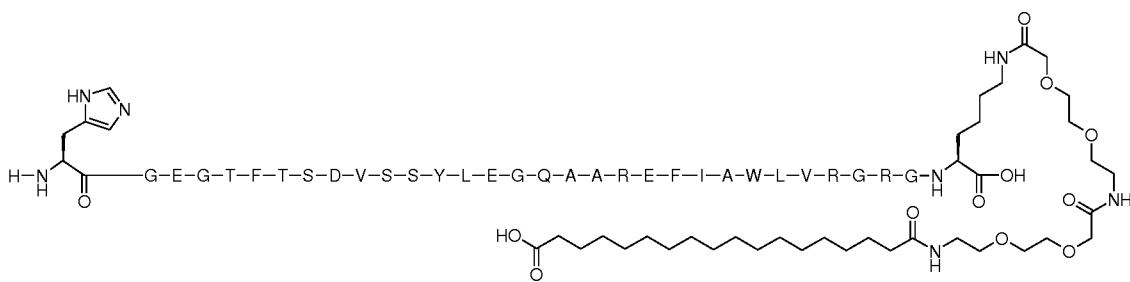
[Aib⁸,Arg^{26,34}] GLP-1 (7-37)Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboksyheptanoylamino)etoksy)etoksy]acetylamin)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH,



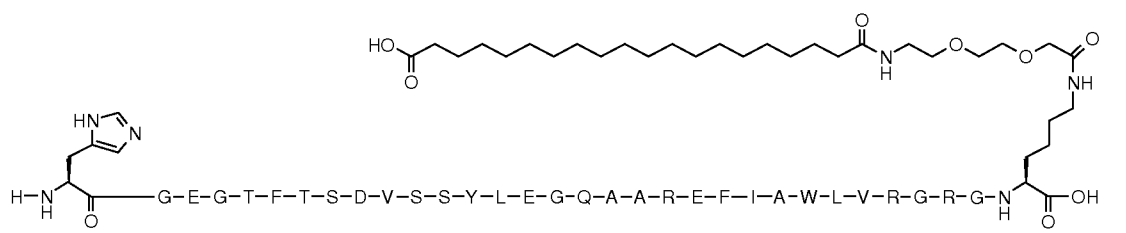
10

[Gly⁸, Arg^{26,34}] GLP1-(7-37) Lys{2-(2-(2-(2-[2-(2-(17-karboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy]acetyl)etoksy)etoksy)acetyl)}-OH,

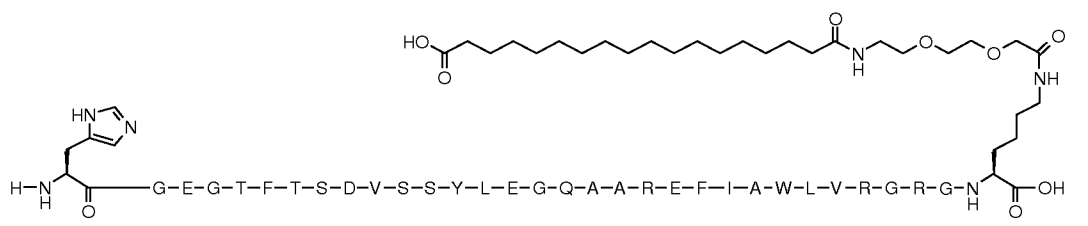
116



5 [Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(19-(karboksy)nonadecanoylamino)etoksy)-etoksy)acetyl)-OH,

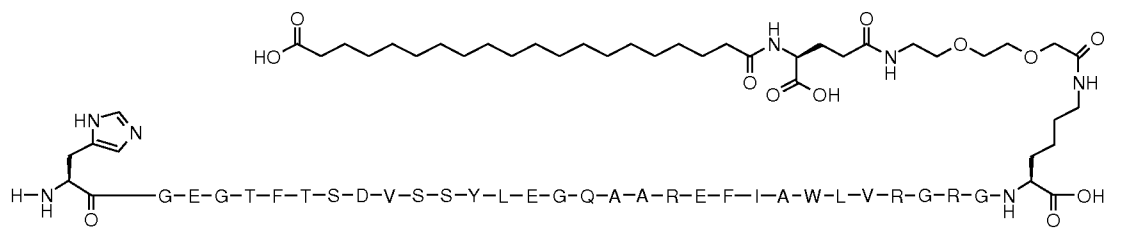


[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys((2-(2-(17-(karboksy)heptadecanoylamino)etoksy)etoksy)-acetyl))-OH,

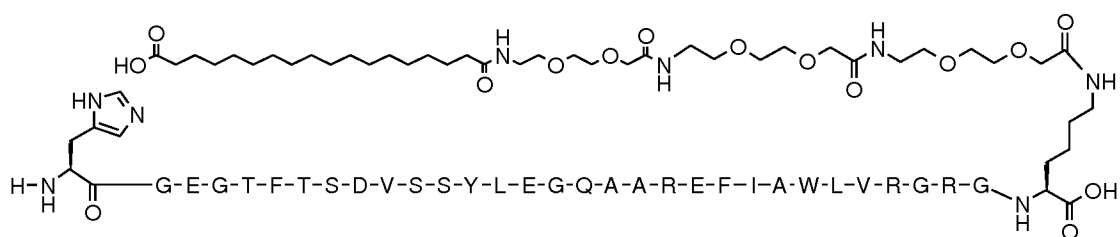


10

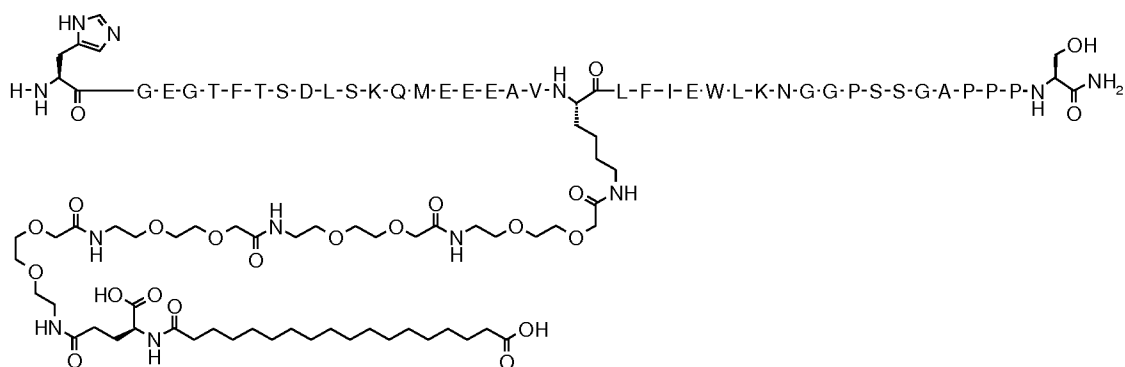
[Gly⁸,Arg^{26,34}]GLP-1(7-37)Lys(2-(2-(2-(4-(19-(karboksy)nonadecanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetyl)-OH,



117

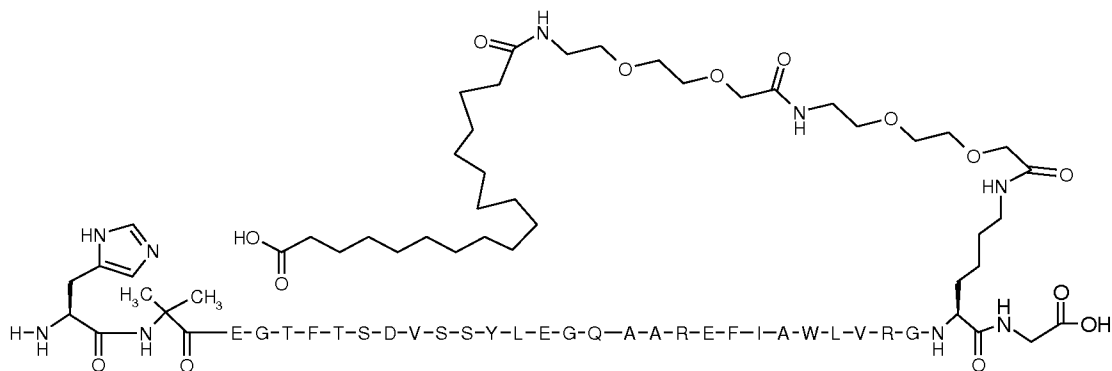


N⁶²⁰-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(4-(17-(karboksy)heptadecanoylamino)-4-karboksybutyrylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl [Lys²⁰]exendin-4 (1-39)-NH₂,



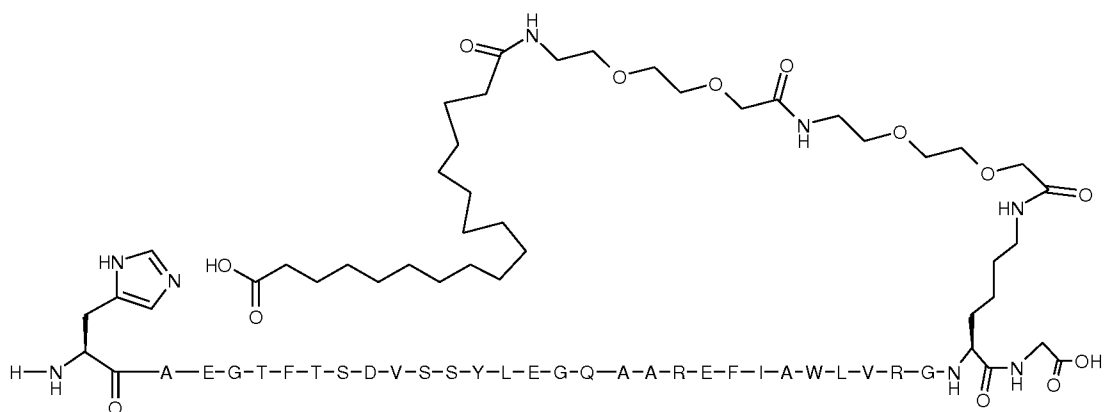
5

N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-carboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl) [Aib⁸, Arg^{26,34}, Lys³⁶] GLP-1 (7-37),

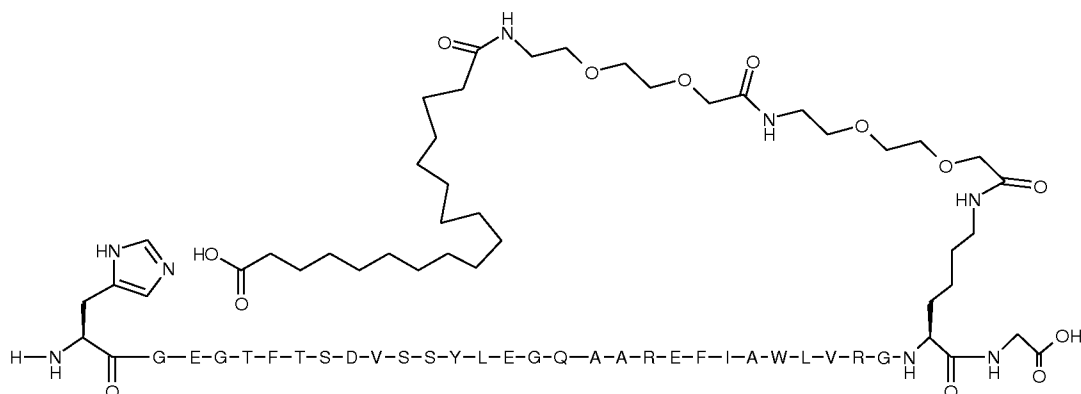


10

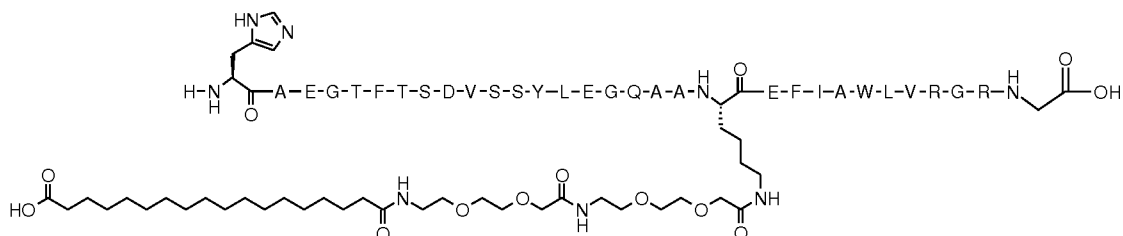
N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-carboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl) [Arg^{26,34}, Lys³⁶] GLP-1 (7-37),



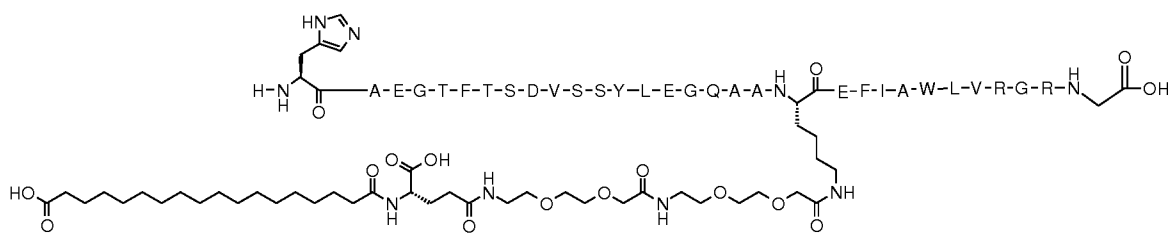
N^{ε36}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl) [Gly⁸,Arg^{26,34},Lys³⁶] GLP-1 (7-37),



5 N^{ε26}-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(17-karboksyheptadecanoylamino)etoksy]etoksy)acetylamino]etoksy)etoksy]acetyl)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH,



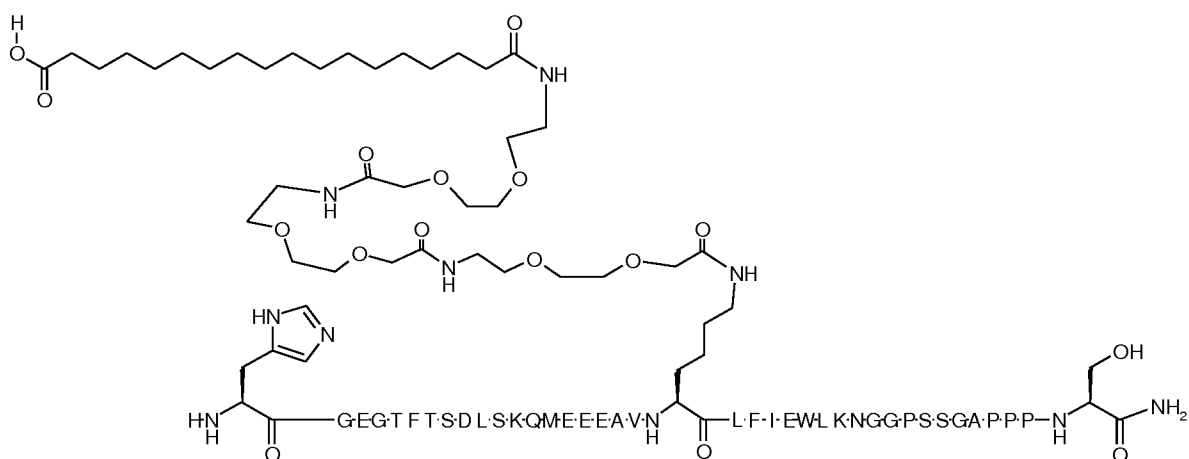
N^{ε26}-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-karboksyheptadecanoylamino)-4(S)-karboksybutyrylamino]etoksy)etoksy]acetylamino)etoksy)etoksy]acetyl)[Arg³⁴]GLP-1-(7-37)-OH,



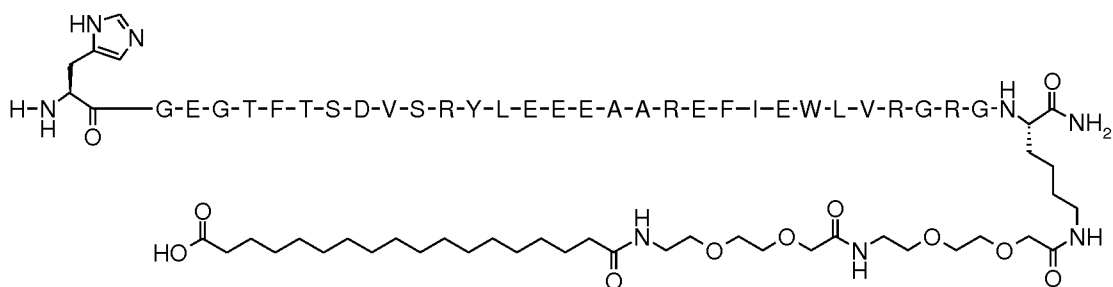
10

N^{ε20}-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy)etoksy)acetyl)amino)etoksy)etoksy)acetyl)[Lys²⁰] Exendin-4 (1-39) amid,

119

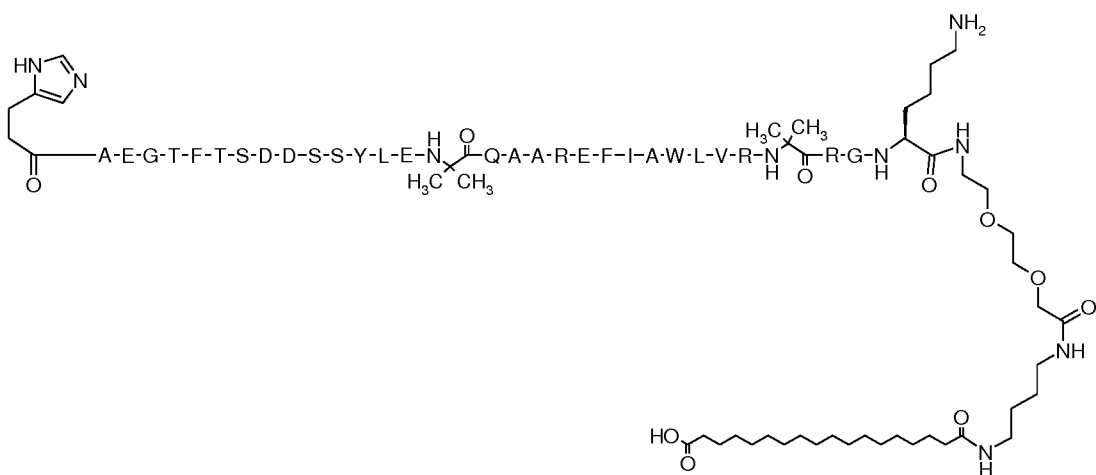


[Gly⁸, Glu^{22,23,30}, Arg^{18,26,34}]GLP1 (7-37) Lys(2-(2-(2-(2-(2-(2-(17-karboksyheptadecanoylamino)etoksy)etoksy)acetylamino)etoksy))etoksy)acetyl)-NH₂,



5

[Imidazolypropionic acid⁷, Asp¹⁶, Aib^{22,35}]GLP1(7-37)Lys NH((2-{[4-(17-karboksyheptadecanoylamino)butylkarbamoyl]metoksy}etoksy)etoksy)),



[Imidazolypropionic acid⁷, Aib^{22,35}]GLP1(7-37)Lys NH((2-{[4-(17-karboksyheptadecanoylamino)butylkarbamoyl]metoksy}etoksy)etoksy)),

10

