



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **330686**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/605 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20025949	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.06.01 PCT/US2001/16474
(22)	Inng.dag	2002.12.11	(85)	Videreføringsdag	2002.12.11
(24)	Løpedag	2001.06.01	(30)	Prioritet	2000.06.16, US, 212171 2000.10.13, US, 240349
(41)	Alm.tilgj	2002.12.11			
(45)	Meddelt	2011.06.06			
(73)	Innehaver	Eli Lilly and Co, Lilly Corporate Center, US-IN46285 INDIANAPOLIS, USA Wolfgang Glaesner, 7512 Fieldstone Court, US-IN46254 INDIANAPOLIS, USA Rohn Lee Millican, 5319 Deer Creek Avenue, Indianapolis, IN 46254, USA Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Glukagonliknende peptid-1 forbindelser og anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 00/07617 A1, WO 99/30731 A1			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet glukagonliknende peptid-1 (GLP-1) forbindelser med modifikasjoner i en eller flere av de følgende posisjonene: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36 eller 37. Fremgangsmåter for behandling av disse GLP-1-forbindelsene er også beskrevet.

GLUKAGONLIKNENDE PEPTID-1 ANALOGER

Glukagonliknende peptid-1 (GLP-1) er et 37 aminosyrers peptid som skilles ut av L-cellene i tarmen som respons på matinntak. Det er funnet å stimulere insulinsekresjon (insulinotropisk virkning) og medfører derved glukoseopptak i celler og senket serum glukosenivåer (se f. eks. Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research, 40:333-343 (1992)). GLP-1 (1-37) er imidlertid lite aktivt og oppmerksomheten har derfor blitt rettet mot trunkerte analoger, referert til som GLP-forbindelser, som er biologisk mye sterkere enn GLP-1. Eksempler omfatter GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) NH₂, Gly⁸-GLP-1 (7-37) OH og Ser³⁴-GLP-1 (7-37)OH. På grunn av sin evne til å stimulere insulinsekresjon, er GLP-forbindelser svært lovende som midler til behandling av diabetes, fedme og beslektede tilstander.

WO 00/07617 A1 beskriver ulike GLP-1 analoger og anvendelse av disse i behandling av diabetes. I disse analogene er det angitt at aminosyren i posisjon 8 kan være Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Met, eller Lys og aminosyren i posisjon 22 kan være Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp eller Lys.

I WO 99/30731 A1 angis også ulike GLP-1 analoger, en fremgangsmåte for å fremstille GLP-1 krystaller samt farmasøytiske sammensetninger inneholdende GLP-1 krystallene og anvendelsen av disse i behandlingen av diabetes. Blant GLP-1 analogene som beskrives er Gly⁸-GLP-1(7-36)OH, Val⁸-GLP-1(7-36)OH og Met⁸-GLP-1(7-36)OH.

GLP-1 forbindelser kan forekomme i minst to forskjellige former. Den første formen er fysiologisk aktiv og løses lett i vanndig løsning ved fysiologisk pH (7.4). I motsetning har den andre formen liten eller ingen insulinotropisk aktivitet og er så å si uløselig i vann ved pH 7.4. Dessverre produseres den inaktive formen raskt når vanndig GLP-1 løsninger røres, eksponeres på hydrofobe overflater eller har store luft/vann grenseflater. Tendensen til å omdannes til den uløselige formen, kompliserer fremstillingen av kommersielle mengder aktivt GLP-1 forbindelser betydelig; blandingsoperasjoner eller kontinuerlig bevegelse gjennom en pumpe er vanlige operasjoner i store produksjonsprosesser og disse operasjonene forårsaker bevegelse, luft/vann grenseflater og/eller kontakt med hydrofobe overflater som resulterer i den uløselige formen. Omdannelse til den inaktive formen kan også forekomme ved lagring eller etter administrering til en pasient, hvilket ytterligere kompliserer anvendelsen av disse forbindelsene som legemidler. Derfor er det et stort behov for biologisk aktive GLP-1 analoger som vanskeligere omdannes til den uløselige formen enn GLP-1 forbindelsene som er tilgjengelige for tiden.

Det er nå funnet at antallet GLP-1 analoger med modifiseringer i en eller flere av de følgende posisjonene: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 eller 37 viser merkbar nedsatt tilbøyelighet til å aggregere sammenlignet med GLP-1 (7-37) OH.

5

Mange av disse analogene beholder GLP-1 reseptoraktivering som er sammenlignbar og i noen tilfeller større enn kjente GLP-1 forbindelser slik som GLP-1 (7-37) OH og Val⁸-GLP-1 (7-37)OH. For eksempel er aggregeringstiden til Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH mer enn 20 ganger høyere og dets GLP-1 reseptoraktivering er omkring 25 % høyere enn GLP-1 (7-37)OH. Basert på disse oppdagelsene er nye GLP-1 forbindelser og be-

10

GLP-1 forbindelsene kan være et polypeptid som har aminosyresekvensen med formel I (SEQ ID NO: 1):

15

His-Xaa₈-Glu-Gly-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Ser-Tyr- Leu -Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Ala-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-R

20

formel I (SEQ ID NO: 1)

hvor:

Xaa₈ er: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser eller Thr,

Xaa₁₁ er: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys eller His,

25

Xaa₁₂ er: His, Trp, Phe eller Tyr,

Xaa₁₆ er: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu eller Ala,

Xaa₂₂ er: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys eller Cysteinsyre,

Xaa₂₃ er: His, Asp, Lys, Glu eller Gln

Xaa₂₄ er: Glu, His, Ala eller Lys,

30

Xaa₂₆ er: Asp, Lys, Glu eller His,

Xaa₂₇ er: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg eller Lys,

Xaa₃₀ er: Ala, Glu, Asp, Ser eller His,

Xaa₃₃ er: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly eller Glu,

Xaa₃₄ er: Glu, Lys eller Asp,

35

Xaa₃₅ er: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His eller Glu,

Xaa₃₆ er: Arg, Glu eller His,

R er: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro eller Gly-Pro-NH₂ eller er deletert.

forutsatt at polypeptidet ikke har sekvensen til GLP-1 (7-37) OH eller GLP-1 (7-36)-NH₂ og forutsatt at polypeptidet ikke er Gly⁸-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1 (7-37)OH, Leu⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ile⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ser⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1 (7-37)OH, Thr⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ala¹¹-Glp-1 (7-37)OH, Ala¹¹-Glp-1 (7-36)NH₂, Ala¹⁶-Glp-1 (7-37)OH, Ala¹⁶-Glp-1 (7-36)NH₂, Ala²⁷-Glp-1 (7-37)OH, Ala²⁷-Glp-1 (7-36)NH₂, Glu²⁷-Glp-1 (7-37)OH, Glu²⁷-Glp-1 (7-36)NH₂, Ala³³-Glp-1 (7-37)OH eller Ala³³-Glp-1 (7-36)NH₂.

10

En annen form av GLP-1 forbindelsene kan være et polypeptid som har aminosyresekvensen med formel II (SEQ ID NO: 2):

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

formel II (SEQ ID NO: 2)

20 hvori:

Xaa₈ er: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser eller Thr,

Xaa₁₂ er: His, Trp, Phe eller Tyr,

Xaa₁₆ er: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu eller Ala,

Xaa₂₂ er: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys eller Cysteinsyre,

25 Xaa₂₃ er: His, Asp, Lys, Glu eller Gln

Xaa₂₆ er: Asp, Lys, Glu eller His,

Xaa₃₀ er: Ala, Glu, Asp, Ser eller His,

Xaa₃₅ er: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His eller Glu,

R er: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro eller Gly-

30 Pro-NH₂ eller er deletert.

forutsatt at polypeptidet ikke har sekvensen til GLP-1 (7-37) OH eller GLP-1 (7-36)-NH₂ og forutsatt at polypeptidet ikke er Gly⁸-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1 (7-37)OH, Leu⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ile⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ser⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1 (7-37)OH, Thr⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ala¹⁶-Glp-1 (7-37)OH, Ala¹⁶-Glp-1 (7-36)NH₂.

35

En annen form av GLP-1 forbindelsene kan være et polypeptid som har aminosyresekvensen med formel III (SEQ ID NO: 3):

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-
 5 Tyr-Leu-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Ala-Lys-Xaa₂₇-Phe-Ile-
 Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

formel III (SEQ ID NO: 3)

10 hvori:

Xaa₈ er: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser eller Thr,

Xaa₂₂ er: Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys eller Cysteinsyre,

Xaa₂₃ er: His, Asp, Lys, Glu eller Gln

Xaa₂₇ er: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg eller Lys,

15 Xaa₃₀ er: Ala, Glu, Asp, Ser eller His,

R er: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro eller Gly-Pro-NH₂ eller er deletert.

forutsatt at polypeptidet ikke har sekvensen til GLP-1 (7-37) OH eller GLP-1 (7-36)-
 20 NH₂ og forutsatt at polypeptidet ikke er Gly⁸-GLP-1 (7-37)OH, Gly⁸-GLP-1 (7-
 36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, Val⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Leu⁸-GLP-1 (7-37)OH, Leu⁸-
 GLP-1 (7-36)NH₂, Ile⁸-GLP-1 (7-37)OH, Ile⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ser⁸-GLP-1 (7-
 37)OH, Ser⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Thr⁸-GLP-1 (7-37)OH, Thr⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Ala¹⁶-
 Gln-1 (7-37)OH, Ala¹⁶-Gln-1 (7-36)NH₂, Glu²⁷-Gln-1 (7-37)OH eller Glu²⁷-Gln-1 (7-
 25 36)NH₂.

En annen form av GLP-1 forbindelsene kan være et polypeptid som har aminosyresekvensen med formel IV (SEQ ID NO: 4):

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

(SEQ ID NO: 4)

35

hvor:

Xaa₇ er L-histidin, D-histidin, desamino-histidin, 2-amino-histidin, β-hydroksihistidin, homohistidin, α-fluorometyl-histidin eller α-metylhistidin,

Xaa₈ er glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin eller threonin. Fortrinnsvis er Xaa₈ glycin, valin, leucin, isoleucin, serin eller threonin,

Xaa₂₂ er asparaginsyre, glutaminsyre, glutamin, asparagin, lysin, arginin, cystein eller cysteinsyre.

5 R er –NH₂ eller Gly(OH).

Også et glukagonliknende peptid (GLP-1) forbindelse som har en aminosyre som ikke er alanin i posisjon 8 og en aminosyre som ikke er glycin i posisjon 22 kan være en aktuell form.

10

GLP-1 forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse beholder GLP-1 reseptoraktive-ringsevne og har i tillegg nedsatt tilbøyelighet til å aggregere sammenlignet med andre GLP-1 forbindelser. Som et resultat, kan løsninger av disse forbindelsene agiteres med minimal omdannelse til den uløselige, inaktive formen. Denne fordelten forenkler produksjonsprosessen svært. I tillegg er det forventet at lite eller ingen *in vivo* aggregering vil forekomme etter administrering til pasienter, og derved øke aktiviteten og minimere muligheten for uheldige reaksjoner. I tillegg er disse GLP-1 forbindelsene resistente for diaminopeptidase IV-degradering og binder sink og er derfor antatt å gi forlenget tidsvirkning *in vivo*.

20

Figur 1 viser aminosyresekvensen til Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 5), Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 7) og Val⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 8).

Figur 2 viser aminosyresekvensen til Gly⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 9), Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 10), Gly⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 11) og Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 12).

Figur 3 viser aminosyresekvensen til Val⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 13), Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 14), Val⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 15) og Gly⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 16).

30 **Figur 4** viser aminosyresekvensen til Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 17) og Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 18).

En GLP-1 forbindelse er et polypeptid som har fra omkring 25 til omkring 39 naturlig forekommende eller ikke-naturlig forekommende aminosyrer og har tilstrekkelig homologi med GLP-1 (7-37) OH slik at den viser insulinotropisk aktivitet. Eksempler på ikke-naturlig forekommende aminosyrer omfatter α-metyl aminosyrer (f. eks. α-metyllalanin), D-aminosyrer, histidinliknende aminosyrer (f. eks. 2-aminohistidin, β-

35

hydroksihistidin, homohistidin, α -fluorometyl-histidin og α -metylhistidin), aminosyrer som har en ekstra metylen i sidekjeden ("homo" aminosyrer) og aminosyrer hvori en funksjonell karboksylsyregruppe i sidekjeden er erstattet med en sulfonsyregruppe (f. eks. cysteinsyre). Fortrinnsvis omfatter imidlertid GLP-1 forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kun naturlig forekommende aminosyrer unntatt slik som på annen måte spesifikt er fremsatt heri.

En GLP-1 forbindelse omfatter typisk et polypeptid med aminosyresekvensen til GLP-1(7-37) OH, en analog til GLP-1(7-37) OH, et fragment av GLP-1(7-37) OH eller et fragment av en GLP-1(7-37) OH-analog. GLP-1(7-37) OH har aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 19:

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

Den aminoterminalen enden til GLP-1(7-37) OH er gitt residie nummer 7 og den karboksiterminale enden nummer 37 slik som er vanlig innen fagområdet. De andre aminosyrene i polypeptidet nummereres fortløpende slik som vist i SEQ ID NO: 19. For eksempel er posisjon 12 fenylalanin og posisjon 22 glycin. Når annet ikke er spesifisert, er den C-terminalen enden i den tradisjonelle karboksylformen.

Et "GLP-1 fragment" er et polypeptid som er oppnådd etter trunkering av en eller flere aminosyrer fra den N-terminalen enden og/eller den C-terminalen enden i GLP-1(7-37) OH eller en GLP-1(7-37) OH analog. Nomenklaturen som anvendes for å beskrive GLP-1(7-37) OH bærer over to GLP-1 fragmenter. For eksempel betegner GLP-1(9-36) OH et GLP-1 fragment som er oppnådd ved trunkering av to aminosyrer fra den N-terminalen enden og en aminosyre fra den C-terminalen enden. Aminosyrene i fragmentet er betegnet med det samme tallet som den korresponderende aminosyren i GLP-1(7-37) OH. For eksempel er den N-terminalen glutaminsyren i GLP-1(9-36) OH i posisjon 9, posisjon 12 er opptatt av fenylalanin og posisjon 22 er opptatt av glycin slik som i GLP-1(7-37) OH.

"GLP-1 forbindelse" omfatter også polypeptider hvori en eller flere aminosyrer er lagt til den N-terminalen enden og/eller den C-terminalen enden i GLP-1(7-37) OH eller fragmenter derav. GLP-1 forbindelser av denne typen har opp til omkring 39 aminosyrer. Aminosyrene i den "forlengede" GLP-1 forbindelsen er betegnet med det samme tallet

som den korresponderende aminosyren i GLP-1(7-37) OH. For eksempel er den N-terminale aminosyren til en GLP-1 forbindelse som er oppnådd ved å legge til to aminosyrer i den N-terminale enden i GLP-1(7-37) OH i posisjon 5 og den C-terminale aminosyren til en GLP-1 forbindelse som er oppnådd ved å legge en aminosyre til den C-terminale ende i GLP-1(7-37) OH i posisjon 38. På denne måten er posisjon 12 opptatt av fenyylalanin og posisjon 22 er opptatt av glycin i begge disse "forlengede" GLP-1 forbindelsene slik som i GLP-1(7-37) OH. Aminosyrer 1-6 i en forlenget GLP-1 forbindelse er fortrinnsvis de samme som eller en konservativ substitusjon av aminosyren i den korresponderende posisjonen i GLP-1(7-37) OH. Aminosyrer 38-45 i en forlenget GLP-1 forbindelse er fortrinnsvis de samme eller en konservativ substitusjon av aminosyren i den korresponderende posisjonen i glukagon eller exendin-4.

En "GLP-1 analog" har tilstrekkelig homologi med GLP-1(7-37) OH eller et fragment av GLP-1(7-37) OH slik at analogen har insulinotropisk aktivitet. Fortrinnsvis har en GLP-1 analog aminosyresekvensen til GLP-1(7-37) OH eller et fragment derav, modifisert slik at en, to, tre, fire eller fem aminosyrer skiller seg fra aminosyren i korresponderende posisjon i GLP-1(7-37) OH eller fragmentet til GLP-1(7-37) OH. I nomenklaturen som anvendes heri for å betegne GLP-1 forbindelser, er den substituerende aminosyren og dets posisjon indikert foran opphavsstrukturen. For eksempel betegner Glu²²-GLP-1(7-37) OH en GLP-1 forbindelse hvori glycinet som normalt finnes i posisjon 22 i GLP-1(7-37) OH er erstattet med glutaminsyre, Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37) OH betegner en GLP-1 forbindelse hvori alanin som normalt finnes i posisjon 8 og glycin som normalt finnes i posisjon 22 i GLP-1(7-37) OH er erstattet med henholdsvis valin og glutaminsyre.

Den N-terminale enden i en GLP-1 forbindelse er stort sett ikke substituert, men kan også være alkylert eller acylert (fortrinnsvis C1-C20). Den C-terminale enden kan være usubstituert slik som i tilfellet med GLP-1 (7-37) OH, amidert med -NH₂, -NHR eller NRR' eller estrifisert med-OR". R og R' er uavhengige alkyl eller acylgrupper (fortrinnsvis C1-C20). R" er en alkyl (C1-C20). GLP-1 (7-36) NH₂ er et eksempel på en "amidert GLP-forbindelse". Fortrinnsvis har GLP-1 forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse en C-terminale ende som er usubstituert eller substituert med -NH₂.

Fortrinnsvis omfatter GLP-1 forbindelsene GLP-1 analoger eller fragmenter av GLP-1 analoger, hvori skjelettet for slike analoger eller fragmenter inneholder en aminosyre annen enn alanin i posisjon 8 (posisjon 8-analoger). Skjelettet kan også omfatte L-histidin, D-histidin eller modifiserte former av histidin slik som desamino-histidin, 2-

aminohistidin, β -hydroksihistidin, homohistidin, α -fluorometylhistidin eller α -metylhistidin i posisjon 7. Det er foretrukket at disse posisjon 8-analogene inneholder en eller flere ekstra endringer i posisjonene 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 og 37 sammenlignet med den korresponderende aminosyren til det native GLP-1(7-37) OH. Det er mer foretrukket at disse posisjon 8-analogene inneholder en eller flere ekstra endringer i posisjonene 12, 16, 22, 23, 26, 30, 35 og 37 sammenlignet med den korresponderende aminosyren i nativt GLP-1(7-37) OH. Det er enda mer foretrukket at disse posisjon 8-analogene inneholder en eller flere ekstra endringer i posisjonene 22, 23, 27, 30 og 37 sammenlignet med den korresponderende aminosyren i nativt GLP-1(7-37) OH.

Det er også en fordel at disse analogene har 6 eller færre endringer sammenlignet med de korresponderende aminosyrene i nativt GLP-1(7-37) OH. Mer fordelaktig kan analogene ha 5 eller færre endringer sammenlignet med de korresponderende aminosyrene i nativt GLP-1(7-37) OH eller har 4 eller færre endringer sammenlignet med de korresponderende aminosyrene i nativt GLP-1(7-37) OH. Analogene kan også ha 3 eller færre endringer sammenlignet med de korresponderende aminosyrene i nativt GLP-1(7-37) OH. Det er en stor fordel hvis disse analogene har 2 eller færre endringer sammenlignet med de korresponderende aminosyrene i nativt GLP-1(7-37) OH.

Det er funnet at disse substitusjonene reduserer GLP-1 forbindelsenes tilbøyelighet til å aggregere og generere den uløselige formen. GLP-1 forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse aggregerer stort sett minst omkring 5 ganger tregere enn GLP-1(7-37) OH når de undersøkes, for eksempel ved aggregeringsmålingen som er beskrevet i eksempel 3, fortrinnsvis minst 20 ganger tregere, mer foretrukket minst 40 ganger tregere, mer foretrukket minst omkring 50 ganger tregere, enda mer foretrukket omkring 60 ganger tregere og enda mer foretrukket minst omkring 65 ganger tregere. Fortrinnsvis er GLP-1 forbindelsene som er beskrevet heri analoger av GLP-1(7-36) NH₂ eller GLP-1(7-37) OH.

GLP-1 forbindelsen kan i posisjon 22 ha en sidekjede som omfatter minst to karbonatomer og en polar eller ladet funksjonell gruppe. Asparaginsyre som har et metylen og karboksylkarbon, er inkludert. Sidekjeden til aminosyren i posisjon 22 kan være en rett eller forgrenet kjede alkylgruppe med fra 2 til 6 karbonatomer og en ladet funksjonell gruppe, f. eks. en karboksylsyre, et amin, guanidingruppe eller en sulfonsyregruppe. Derfor omfatter eksempler på foretrukne aminosyrer i posisjon 22 glutaminsyre, asparaginsyre, glutaminsyre, arginin eller lysin, posisjon 8 er fortrinnsvis glycine, valin, leucin,

isoleucin, serin, treonin eller metionin og mer foretrukket valin eller glycin. Et eksempel på en aminosyre med en sulfonylsyregruppe i sidekjeden er cysteinsyre ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{SO}_3)-\text{CO}-$, forkortet som "Cya"). Når posisjon 22 er en sulfonsyre slik som cysteinsyre, er posisjon 8 fortrinnsvis glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin eller metionin og mer foretrukket valin eller glycin.

I en annen form, kan aminosyren i posisjon 8 være fortrinnsvis glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin eller metionin og mer foretrukket valin eller glycin og posisjon 30 er glutaminsyre, asparaginsyre, serin eller histidin og mer fordelaktig glutamatsyre.

I en ytterligere form kan aminosyren i posisjon 8 fortrinnsvis være glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin eller metionin og mer foretrukket valin eller glycin og posisjon 37 er histidin, lysin, arginin, threonin, serin, glutaminsyre, asparaginsyre, tryptofan, tyrosin, fenylalanin og mer foretrukket histidin.

I en annen form kan aminosyren i posisjon 8 fortrinnsvis være glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin eller metionin og mer foretrukket valin eller glycin og posisjon 22 er glutaminsyre, lysin, asparaginsyre eller arginin og mer foretrukket glutaminsyre eller lysin og posisjon 23 er lysin, arginin, glutaminsyre, asparaginsyre og histidin og mer foretrukket lysin eller glutaminsyre.

I en annen form kan aminosyren i posisjon 8 fortrinnsvis være glycin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin eller metionin og mer foretrukket valin eller glycin og posisjon 22 er glutaminsyre, lysin, asparaginsyre eller arginin og mer foretrukket glutaminsyre eller lysin og posisjon 27 er alanin, lysin, arginin, tryptofan, tyrosin, fenylalanin eller histidin og mer foretrukket alanin.

I en annen form har GLP-1 forbindelsene en aminosyre i posisjon 8 og har en, to eller tre aminosyrer som er selektert fra gruppen som består av posisjon 11, posisjon 12, posisjon 16, posisjon 22, posisjon 23, posisjon 24, posisjon 26, posisjon 27, posisjon 30, posisjon 33, posisjon 34, posisjon 35, posisjon 36 og posisjon 37 som er forskjellig fra aminosyren i den korresponderende posisjonen i nativt GLP-1 (7-37)OH.

I en annen form kan GLP-1 forbindelsene ha en aminosyre i posisjon 8 og har en eller to aminosyrer i tillegg til aminosyren i posisjon 8, som er selektert fra gruppen som består av posisjon 11, posisjon 12, posisjon 16, posisjon 22, posisjon 23, posisjon 24, posisjon 26, posisjon 27, posisjon 30, posisjon 33, posisjon 34, posisjon 35, posisjon 36 og posi-

sjon 37 som er forskjellig fra aminosyren i den korresponderende posisjonen i nativt GLP-1 (7-37)OH.

Som beskrevet over kan GLP-1 forbindelsene ha aminosyrer i tillegg til de i posisjon 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 og 37 som er forskjellig fra aminosyren i den korresponderende posisjonen i nativt GLP-1 (7-37) eller et fragment av GLP-1 (7-37). Aminosyrene som ikke er i posisjon 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 og 37 i GLP-forbindelsen som er forskjellig fra aminosyren i den korresponderende posisjonen i nativt GLP-1 (7-37) OH, er fortrinnsvis konservative substitusjoner og mer foretrukket høyt konserverte substitusjoner.

Fortrinnsvis har GLP-1-forbindelsene null, en, to eller tre aminosyrer i tillegg til aminosyrene i posisjon 8 og 22 som er forskjellig fra aminosyren i den korresponderende posisjonen i GLP-1 (7-37)OH eller et GLP-1 (7-37)OH-fragment. I et eksempel er en eller flere av aminosyrene i posisjon 7, 21 og 27 i GLP-1-forbindelsen forskjellig fra den korresponderende aminosyren i GLP-1(7-37)OH eller et GLP-1 (7-37)OH-fragment, i tillegg til aminosyrene i posisjon 8 og 22.

Fortrinnsvis er kun posisjoner 7, 8 og 22 forskjellig fra aminosyren i den korresponderende posisjon i GLP-1 (7-37)OH (eller et fragment derav). Det er forventet at andre forbedrede GLP-1-forbindelser med reduserte aggregeringsegenskaper kan oppnås fra kjente, biologisk aktive GLP-1-forbindelser ved å erstatte glycin i posisjon 22 og fortrinnsvis alanin i posisjon 8 i disse kjente forbindelsene med en egnet aminosyre slik som beskrevet heri. Kjente biologisk aktive GLP-1-forbindelser er beskrevet i US patent 5 977 071 Hoffmann et al., US patent 5 545 618 Buckley et al., Adelhorst et al., J. Biol. Chem. 269: 6275 (1994).

En "konservert" substitusjon" er erstatningen av en aminosyre med en annen aminosyre som har samme netto elektriske ladning og tilnærmet samme størrelse og form. Aminosyrer med alifatiske eller substituerte alifatiske aminosyre-sidekjeder har tilnærmet samme størrelse når det totale antallet karbon og heteroatomer i deres sidekjeder er forskjellige med ikke mer enn omkring 4. De har tilnærmet samme form når antallet forgreininger i sidekjedene ikke skiller seg fra hverandre med mer enn 1. Aminosyrer med fenyl eller substituerte fenylgrupper i sidekjedene antas å ha omkring samme størrelse og form. Fem aminosyregrupper er listet nedenfor. Erstatning av en aminosyre i en GLP-1-forbindelse med en annen aminosyre fra samme gruppe, resulterer i en konservativ substitusjon:

Gruppe I: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, cystein og ikke-naturlig forekommende aminosyrer med C1 – C4 alifatiske eller C1 – C4 hydroksylsubstituerte alifatiske sidekjeder (rettkjedet eller monoforgrenet).

5

Gruppe II: glutaminsyre, asparaginsyre og ikke-naturlig forekommende aminosyrer med karboksylsyresubstituerte C1 – C4 alifatiske sidekjeder (uforgrenede eller et forgreningspunkt).

10

Gruppe III: lysin, ornitin, arginin og ikke-naturlig forekommende aminosyrer med amin eller guanidinosubstituerte C1 – C4 alifatiske sidekjeder (uforgrenede eller et forgreningspunkt).

15

Gruppe IV: glutamin, asparagin og ikke-naturlig forekommende aminosyrer med amidsubstituerte C1 – C4 alifatiske sidekjeder (uforgrenede eller et forgreningspunkt).

Gruppe V: fenylalanin, fenylglycin, tyrosin og tryptofan.

20 Bortsett fra dersom det på annen måte spesifikt er angitt heri, utføres konservative substitusjoner fortrinnsvis med naturlig forekommende aminosyrer.

En "svært konservert substitusjon" er erstatningen av en aminosyre med en annen aminosyre som har samme funksjonelle gruppe i sidekjeden og nesten samme størrelse og form. Aminosyrer med alifatiske eller substituerte alifatiske aminosyresidekjeder har 25 nesten samme størrelse når det totale antallet karbon og heteroatomer i sidekjedene deres ikke skiller seg fra hverandre med mer enn 2. De har nesten samme form når de har samme antall forgreininger i sidekjedene sine. Eksempler på svært konservative substitusjoner omfatter valin for leucin, threonin for serin, asparaginsyre for glutaminsyre og 30 fenylglycin for fenylalanin. Eksempler på substitusjoner som ikke er svært konservative omfatter alanin for valin, alanin for serin og asparaginsyre for serin.

Et eksempel på en GLP-1 forbindelse er et polypeptid med aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 1. I et foretrukket eksempel er GLP-1-forbindelsen GLP-1 (7-37) OH bortsett 35 fra at Xaa₈ er Gly eller Val, Xaa₂₂ er Glu eller Lys og Xaa₂₃ er Glu eller Lys. I et annet eksempel er GLP-1-forbindelsen GLP-1 (7-37) OH bortsett fra at Xaa₈ er Gly eller Val

og Xaa₃₀ er Glu. Et ytterligere eksempel er en GLP-1-forbindelse som er GLP-1 (7-37) OH bortsett fra at Xaa₈ er Gly eller Val og Xaa₃₇ er His.

Et annet eksempel på en GLP-1-forbindelse er et polypeptid med aminosyresekvensen til SEQ ID NO: 4. I et eksempel er Xaa₇ L-histidin, D-histidin, desaminohistidin, 2-amino-histidin, β -hydroksihistidin, homohistidin, α -fluorometyl-histidin og α -methylhistidin, Xaa₈ er glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin eller threonin, R er –NH₂ eller Gly(OH) og Xaa₂₂ er lysin, glutaminsyre, asparaginsyre eller arginin i SEQ ID NO: 4. I et annet eksempel er Xaa₇ L-histidin, Xaa₈ er glycin eller valin, Xaa₂₂ er lysin, glutaminsyre, asparaginsyre eller arginin og R er Gly(OH). Alternativt er Xaa₇, Xaa₈ og R i SEQ ID NO: 4 slik som beskrevet over og Xaa₂₂ er en aminosyre med en sidekjede som omfatter en sulfonsyregruppe, f. eks. cysteinsyre.

I et annet eksempel på GLP-1-forbindelser, er aminosyren i posisjon 8 ikke en D-aminosyre og har ikke sidekjeden til glycin, serin, threonin, cystein eller beta-alanin når aminosyren i posisjon 22 har en C1 – C2 alkylsidekjede, en C1 – C2 hydroksylert alkyl sidekjede eller en C1 – C2 tiolert alkylkjede (f. eks. cystein). I et eksempel på GLP-1-forbindelser er ikke aminosyren i posisjon 8 en D-aminosyre og har ikke sidekjeden til glycin, serin, threonin, cystein eller beta-alanin når aminosyren i posisjon 22 har en C1 – C4 alkylsidekjede, en C1 – C4 hydroksylert alkyl sidekjede eller en C1 – C2 tiolert alkylkjede.

I et annet eksempel på GLP-1-forbindelsene, er aminosyren i posisjon 8 glycin, valin, leucin, isoleucin, metionin, serin, threonin, cystein, asparaginsyre, glutaminsyre, lysin, arginin, asparagin, glutamin, fenylglycin, tyrosin, histidin eller tryptofan og aminosyren i posisjon 22 er asparaginsyre, glutaminsyre, lysin, arginin, asparagin, glutamin eller histidin.

Spesifikke eksempler på GLP-1-forbindelser omfatter Glu²²-GLP-1 (7-37) OH (SEQ ID NO: 20), Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 21), Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 22), Lys²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 23), Cya²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 24), Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 5), Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 7) og Val⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 8), Val⁸-Cya²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 25), Gly⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 9), Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 10), Gly⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 11), Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 12), Gly⁸-Cya²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 26), Gly²²-GLP-1 (7-36)NH₂

(SEQ ID NO: 27), Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 28), Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 29), Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 30), Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 31), Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 32), Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 33), Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 34), Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 35), Val⁸-Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 36), Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 37), Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 38), Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 39), Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 40), Gly⁸-Cya²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEQ ID NO: 41), Val⁸-Lys²³-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 42), Val⁸-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 43), Val⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 44), Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 45), Val⁸-His³⁵-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 46), Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 47), Val⁸-Glu²²-Lys²³-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 48), Val⁸-Glu²²-Glu²³-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 49), Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 50), Val⁸-Gly³⁴-Lys³⁵-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 51), Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 52), Gly⁸-His²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 53).

Foreliggende oppfinnelse omfatter GLP-1-forbindelse, kjennetegnet ved at den er valgt fra Val⁸ – Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEKV. ID. NR. 5) og Val⁸ – Glu²²-GLP-1(7-36)NH₂ (SEKV. ID. NR. 32). Videre omfatter forbindelsen anvendelse av en GLP-1 forbindelse i følge kravene 1-3 for fremstilling av et medikament for behandling av ikke-insulinavhengig diabetes.

Også anvendelse av en GLP-1 forbindelse i følge kravene 1-3, for fremstilling av et medikament for behandling av fedme, hjerteinfarkt, myokardialt infarkt, katabolske endringer etter kirurgisk inngrep eller irritabelt tarmsyndrom er omfattet av foreliggende oppfinnelse.

Betegnelsen "GLP-1-forbindelse" slik som den anvendes heri, omfatter også farmasøytisk akseptable salter av forbindelsene som er beskrevet heri. En GLP-1-forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse kan være i besittelse av en tilstrekkelig sur, en tilstrekkelig basisk eller begge funksjonelle grupper og reagere i samsvar med hvilket som helst av et antall uorganiske baser og uorganiske og organiske syrer for å danne et salt. Syrer som er vanlige å benytte for å lage syreaddisjonssalter er uorganiske syrer slik som saltsyre, hydrobromsyre, hydrojodsyre, svovelsyre, fosforsyre og liknende og organiske syrer slike som p-toluensulfonsyre, metansulfonsyre, oksalsyre, p-bromfenylsulfonsyre, karbonsyre, ravsyre, sitronsyre, benzosyre, eddiksyre og liknende. Eksemp-

ler på slike salter omfatter sulfat, pyrosulfat, bisulfat, sulfitt, fosfat, monohydrogenfosfat, dihydrogenfosfat, metafosfat, pyrofosfat, klorid, bromid, jodid, acetat, propionat, dekanooat, kaprylat, akrylat, format, isobutyrat, kaproat, heptanoat, propiolat, oksalat, malonat, sukksinat, suberat, sebakat, fumarat, maleat, butyn-1,4-dioat, heksyn-1,6-dioat, benzoat, klorbenzoat, metylbenzoat, dinitrobenzoat, hydroksibenzoat, metoksibenzoat, ftalat, sulfonat, xylensulfonat, fenylacetat, fenylpropionat, fenylbutyrat, citrat, laktat, gamma-hydroksibutytrat, glykolat, tartrat, metansulfonat, propansulfonat, naftalen-1-sulfonat, naftalen-2-sulfonat, mandelat og liknende.

Baseaddisjonssalter omfatter de som er avledet fra uorganiske baser slik som ammonium eller alkalie eller alkaliske jordmetallhydroksider, karbonater, bikarbonater og liknende. Slike baser som er nyttige til fremstillingen av saltene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter derfor natriumhydroksid, kaliumhydroksid, ammoniumhydroksid, kaliumkarbonat og liknende.

15

GLP-1-forbindelsene kan anvendes til å behandle individer med mange ulike sykdommer og tilstander. Det antas at GLP-1-forbindelser, inkludert de ifølge foreliggende oppfinnelse, utøver sine biologiske effekter ved å virke på en reseptor som refereres til som "GLP-1 reseptoren" (se US patent 5 670 360, Thorrens). Individer med sykdommer og/eller tilstander som responderer gunstig på GLP-1 reseptorstimulering eller på administreringen av GLP-1-forbindelser, kan derfor behandles med GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse. Disse individene sies å "ha behov for behandling med GLP-1-forbindelser" eller "ha behov for GLP-1 reseptorstimulering". Individer med ikke-insulinavhengig diabetes, insulinavhengig diabetes, slag (se WO 00/16797, Efendic), myokardinfarkt (se WO 98/08531, Efendic), fedme (se WO 98/19698, Efendic), katabolske endringer etter kirurgiske inngrep (se US patent 6 006 753, Efendic), funksjonell dyspepsi og irriterende tarmsyndrom (se WO 99/64060, Efendic), er omfattet. Individer som trenger profylaktisk behandling med GLP-1 forbindelser er også omfattet, f. eks. individer som har risiko for utvikling av ikke-insulinavhengig diabetes (se WO 00/07617). Individer med svekket glukosetoleranse eller svekket fasteglukose, individer hvis kroppsvekt er omkring 25 % over normal kroppsvekt i forhold til individets høyde og kroppsbygning, individer med en delvis pancreatektomi, individer som har en eller flere foreldre med ikke-insulinavhengig diabetes, individer som har hatt gestasjonell diabetes og individer som har hatt akutt eller kronisk pancreatitt, har risiko for å utvikle ikke-insulinavhengig diabetes.

En "effektiv mengde" av en GLP-1-forbindelse er kvantiteten som resulterer i en ønsket terapeutisk og/eller profylaktisk effekt uten å forårsake uakseptable bivirkninger når det administreres til et individ som har behov for GLP-1-reseptor stimulering. En "ønsket terapeutisk effekt" omfatter en eller flere av følgende: 1) en forbedring av sympto-
 5 met(ene) som er forbundet med sykdommen eller tilstanden, 2) en forsinkelse i inntreden av symptomer som er forbundet med sykdommen eller tilstanden, 3) økt levetid sammenlignet med uten behandlingen og 4) bedre livskvalitet sammenlignet med uten behandlingen. For eksempel er "en effektiv mengde" av en GLP-1-forbindelse til behandlingen av diabetes, kvantiteten som vil resultere i bedre kontroll av blodglukose
 10 konsentrasjoner enn ved fravær av behandling, derved resultere i en forsinkelse av inntreden av diabetiske komplikasjoner slik som retinopati, neuropati eller nyresykdom. En "effektiv mengde" av en GLP-1-forbindelse til forebyggingen av diabetes er kvantiteten som vil forsinke, sammenlignet med fravær av behandling, inntreden av forhøyede blodglukosenivåer som krever behandling med anti-hypoglykemiske legemidler slik
 15 som sulfonylureaer, tiazolidindioner, insulin og/eller bisguanidiner.

En "effektiv mengde" av GLP-1-forbindelsen som administreres til et individ vil også opplø-øavhenge av typen og alvorligheten av sykdommen og av individkarakteristikker, slik som generell helsetilstand, alder, kjønn, kroppsvekt og legemiddeltoleranse. En
 20 fagmann på området vil være istand til å bestemme hensiktsmessige doser avhengig av disse og andre faktorer. En typisk terapeutisk effektiv mengde av GLP-1-forbindelse kan strekke seg fra omkring 0.01 mg pr. dag til omkring 1000 mg pr. dag for en voksen. Fortrinnsvis strekker dosen seg fra omkring 0.1 mg pr. dag til omkring 100 mg pr. dag, mer foretrukket fra omkring 1.0 mg/dag til omkring 10 mg/dag.

25 GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan for eksempel administreres oralt, nasalt, ved inhalering eller parenteralt. Parenteral administrering kan for eksempel omfatte systemisk administrering slik som ved intramuskulær, intravenøs, subkutan eller intraperitoneal injeksjon. GLP-1-forbindelsene kan administreres til individet
 30 sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel eller eksipient som del av et farmasøytisk preparat til behandling av sykdommene som er diskutert over. Det farmasøytiske preparatet kan være en løsning eller dersom det administreres parenteralt, en suspensjon av GLP-1-forbindelsen eller en suspensjon av GLP-1-forbindelsen i kompleks med et divalent metallkation slik som beskrevet nedenfor. Egnede farmasøy-
 35 tiske bærere kan inneholde inerte bestanddeler som ikke interagerer med peptidet eller peptidderivater. Standard farmasøytiske formuleringsteknikker kan benyttes slik som de som er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company,

Easton, PA. Egnede farmasøytiske bærere til parenteral administrering omfatter for eksempel sterilt vann, fysiologisk salin, bakteriostatisk salin (salin som inneholder omkring 0.9 % mg/ml benzylalkohol), fosfatbufret salin, Hanks løsning, Ringers-laktat og liknende. Noen eksempler på egnede eksipienter omfatter laktose, dekstrose, sukrose, trehalose, sorbitol og mannitol.

Et "individ" er et pattedyr, fortrinnsvis et menneske, men kan også være et dyr, f. eks. kjæledyr (f. eks. hunder, katter og liknende), gårdsdyr (f. eks. kuer, sauer, griser, hester og liknende) og laboratoriedyr (f. eks. rotter, mus, marsvin og liknende).

GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være i kompleks med et egnet divalent metallkation. Divalente metallkomplekser av GLP-1-forbindelser er stort sett uløselige i vanndige løsninger ved fysiologisk pH. Derfor kan disse kompleksene administreres subkutan som suspensjoner og viser en nedsatt frigivningshastighet *in vivo*, og derved forlenge virkningstiden til forbindelsen. Eksempler på egnede divalente metallkationer omfatter Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} og liknende. Zn^{++} er foretrukket.

For å oppnå kompleksene mellom GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse og et divalent metallkation, løses en GLP-1 i en egnet buffer i nærvær av et metallsalt. Blandingen inkuberes ved romtemperatur slik at komplekset presipiterer. Egnede buffere er de som opprettholder blandingen i et pH-område fra omkring 3.0 til omkring 9.0 og som ikke interfererer med komplekseringsreaksjonen. Eksempler omfatter fosfatbuffer, acetatbuffer, citratbuffer og Goodes buffere, f. eks. HEPES, Tris og Tris acetat. Egnede metallsalter er de hvori metallet er tilgjengelig for kompleksdannelse. Eksempler på egnede sinksalter omfatter sinkklorid, sinkacetat, sinkoksid og sinksulfat. Fortrinnsvis tilveiebringes et divalent metallkationsalt slik som sinkklorid, i overskudd for å sørge for et molart forhold på opp til omkring 50 molekyler av et divalent metallkation for hvert molekyl GLP-1-forbindelse.

"Insulinotropisk aktivitet" refererer til stimulering av insulinsekresjon som respons på forhøyede glukosenivåer, og derved forårsake glukoseopptak i celler og senke serumglukosenivåer. Insulinotropisk aktivitet kan fastsettes ved fremgangsmåter som tilhører teknikkens stilling, inkludert anvendelse av *in vivo* forsøk og *in vitro* målinger som måler GLP-1-reseptor bindingsaktivitet eller reseptoraktivering, f. eks. målinger som benytter pancreasøyceller eller insulinomceller slik som beskrevet i henholdsvis EP 619 322, Gelfand et al. og US patent 5 120 712.

GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved anvendelse av standard fremgangsmåter for fastfasesyntese av peptider. Peptidsyntesemaskiner er kommersielt tilgjengelige fra for eksempel Applied Biosystems i Foster City CA. Reagenser til fastfasesyntese er kommersielt tilgjengelige fra for eksempel Midwest Biotech (Fishers, IN). Fastfase peptidsyntesemaskiner kan anvendes i henhold til forhandlers instruksjoner for blokkering av interfererende grupper, beskyttelse av aminosyrene som skal reagere, kobling, frikobling og "capping" av ureagerte aminosyrer.

- En α -N-karbamoyl beskyttet aminosyre og den N-terminale aminosyren på den voksende peptidkjeden på et resin kobles typisk ved romtemperatur i et inert løsningsmiddel slik som dimetylformamid, N-metylpyrrolidon eller metylenklorid i nærvær av koblingsmidler slik som disykloheksylkarbodiimid og 1-hydroksibenzotriazol og en base slik som diisopropyletylamin. Den α -N-karbamoyl beskyttende gruppen fjernes fra det resulterende peptidresinet ved anvendelse av en reagens slik som trifluoreddiksyre eller piperidin og koblingsreaksjonen gjentas med den neste ønskede N-beskyttede aminosyre som skal adderes til peptidkjeden. Egnede amin-beskyttelsesgrupper er velkjent innen fagområdet og er for eksempel beskrevet i Green og Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1991. Eksempler omfatter t-butyloksikarbonyl (tBoc) og fluorenylmetoksikarbonyl (Fmoc).

Peptidene syntetiseres også ved anvendelse av standard automatisk fastfase synteseprotokoller ved anvendelse av t-butoksikarbonyl eller fluorenylmetoksikarbonyl-alfa-aminosyrer med hensiktsmessig beskyttelse av sidekjedene. Etter fullføring av syntesen, spaltes peptidene fra fastfase underlaget med simultan fjerning av beskyttelsen i sidekjedene ved anvendelse av standard hydrogenfluorid fremgangsmåter. Råpeptider renses deretter videre ved anvendelse av revers fase kromatografi på Vydac C18 kolonner ved anvendelse av acetonitril-gradienter i 0.1 % trifluoreddiksyre (TFA). For å fjerne acetonitrill, lyofiliseres peptidene fra en løsning som inneholder 0.1 % TFA, acetonitrill og vann. Renheten kan verifiseres ved analytisk revers fase kromatografi. Peptidenes identitet kan verifiseres ved massespektrometri. Peptider kan løses i vandige buffere ved nøytral pH.

Oppfinnelsen illustreres ved de følgende eksemplene.

35

Eksempel 1 - Fremstilling av GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ved fastfase t-Boc kjemi

Tilnærmet 0.5-0.6 gram (0.38-0.45 mmol) Boc Gly-PAM resin ble plassert i en standard 60 ml reaksjonsbeholder og doble koblinger ble kjørt på en Applied Biosystems ABI430A peptidsyntesemaskin. De følgende sidekjede-beskyttede aminosyrene (2 mmol patroner av Boc aminosyrer) ble oppnådd fra Midwest Biotech (Fishers, IN) og
5 anvendt i syntesen:

Arg-Tosyl (TOS), Asp- δ -sykloheksylester (CHXL), Glu- δ -sykloheksylester (CHXL), His-benzyloksimetyl (BOM), Lys-2-klorobenzyloksikarbonyl (2Cl-Z), Met-sulfoksid (O), Ser-O-benzyleter (OBzl), Thr-O-benzyleter (Obzl), Trp-formyl (CHO) og Tyr-2-
10 bromobenzyloksikarbonyl (2Br-Z) og Boc Gly PAM resin. Trifluorediksyre (TFA), diisopropyletylamin (DIEA), 0.5 M hydroksibenzotriazol (HOBt) i DMF og 0.5 M di-sykloheksylkarbodiimid (DCC) i diklorometan ble kjøpt fra PE-Applied Biosystems (Foster City, CA). dimetylformamid (DMF-Burdick og Jackson) og diklormetan (DMC-Mallinkrodt) ble kjøpt fra Mays Chemical Co. (Indianapolis, IN).

15

Standard doble koblinger ble kjørt ved anvendelse av enten symmetrisk anhydrid eller HOBt estere, begge dannet ved anvendelse av DCC. Et andre sett av doble koblinger (uten TFA deproteksjon) ble kjørt på Trp 31, Thr13 og Thr11. Når syntesen var ferdig, ble den N-terminale Boc-gruppen fjernet og peptidylresiner behandlet med 20 % piperi-
20 din i DMF for å deformylere Trp-sidekjeden. Etter vasking med DCM, ble resinene overført til en TEFLON reaksjonsbeholder og tørket *in vacuo*.

For analoger som inneholder Met, ble en på-resinet reduksjon utført ved anvendelse av TFA/10 % dimetylsulfid (DMS)/2 % konsentrert HCl. Spaltinger ble utført ved å feste
25 reaksjonsbeholderne til et HF (fluorsyre) apparat (Penninsula Laboratories). 1 ml m-cresol pr. gram/resin ble tilsatt og 10 ml HF (innkjøpt fra AGA, Indianapolis, IN) ble kondensert opp i den forhåndskjølte beholderen. 1 ml DMS pr. gram resin ble tilsatt når metionin var tilstede. Reaksjonene ble rørt 1 time på isbad og HF ble fjernet *in vacuo*. Residiene ble suspendert i etyleter og de faste stoffene ble filtrert og vasket med eter.
30 Hvert peptid ble ekstrahert til vandig eddiksyre og enten frysetørket eller satt direkte på en reversfase kolonne.

Rensinger ble kjørt på en 2.2 x 25 cm VYDAC C18 kolonne i buffer A (0.1 % trifluorediksyre i vann, B: 0.1 % TFA i acetonitrill). En gradient på 20 % til 90 % B ble kjørt
35 på en HPLC (Waters) i 120 minutter ved 10 ml/minutt mens UV ved 280 nm (0.4 A) ble overvåket og 1 minutt-fraksjoner samlet. Hensiktsmessige fraksjoner ble kombinert,

fryst og frysetørket. Tørkede produkter ble analysert på HPLC (0.46 x 15 cm METASIL AQ C18) og MALDI massespektrometri.

Eksempel 2 - Fremstilling av GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ved fastfase F-Moc kjemi

Tilnærmet 114 mg (50 mmol) Fmoc Gly WANG resin (kjøpt fra NovaBiochem, LaJolla, CA) ble plassert i hver programmerte brønn på 96-brønners reaksjonsplaten og doble koblinger ble kjørt på en Advanced ChemTech 396 peptidsyntesemaskin. Analoger med et C-terminalt amid ble fremstilt ved anvendelse av 75 mg (50 μ mol) Rink Amide AM resin (NovaBiochem, LaJolla, CA).

Følgende Fmoc aminosyrer ble kjøpt fra Advanced ChemTech (Louisville, KY), NovaBiochem (LaJolla, CA) og Midwest BioTech (Fishers, IN): Arg-2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), Asn-trityl (Trt), Asp- β -t-butylester (tBu), Glu- δ -t-butylester (tBu), Gln-trityl (Trt), His-trityl (Trt), Lys-t-butyløksikarbonyl (Boc), Ser-t-butylester (OtBu), Thr-t-butylester (OtBu), Trp-t-butyløksikarbonyl (Boc), Tyr-t-butylester (OtBu).

Løsningsmidler dimetylformamid (DMF-Burdick og Jackson), N-metyl pyrrolidon (NMP- Burdick og Jackson), diklormetan (DCM-Mallinkrodt) ble kjøpt fra Mays Chemical Co. (Indianapolis, IN).

Hydroksibenzotrizol (HOBt), di-isopropylkarbodiimid (DIC), di-isopropyletylamin (DIEA) og piperidin (Pip) ble kjøpt fra Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI).

Alle aminosyrene ble løst opp i 0.45 M HOBt i NMP og 50 minutter DIC/HOBt aktiver-te koblinger ble kjørt etter 20 minutters deproteksjon ved anvendelse av 20 % Pip/DMF. Hvert resin ble vasket med DMF etter deproteksjoner og koblinger. Etter siste kobling og deproteksjon, ble peptidylresinene vasket med DCM og tørket *in vacuo* i reaksjons-blokken.

Med reaksjon/spaltingblokk samlingen på plass, ble 2 ml reagens K satt til hver brønn og spaltingsreaksjonen blandet i 2 timer [reagens K = 0.75 gm fenol, 0.5 ml tioanisol, 0.25 ml etanditiol, 0.5 ml vann pr. 10 ml trifluoreddiksyre (TFA), alt kjøpt fra Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI]. TFA-filtratene ble satt til 40 ml etyleter og presipitate-ne sentrifugert 2 minutter ved 2000 rpm. Supernatantene ble dekantert, pellettene re-

suspendert i 40 ml eter, resentrifugert, redekantert, tørket under nitrogen og deretter *in vacuo*.

0.3-0.6 mg av hvert produkt ble løst opp i 1 ml 0.1 % TFA/acetonitrill (ACN) og 20 µl
 5 ble analysert på HPLC [0.46 x 15 cm METASIL AQ C18, 1 ml/min, 45°C, 214 nM (0.2 A), A = 0.1 % TFA, B = 0.1 % TFA/50 % ACN. Gradient = 50 % B til 90 % B i 30 minutter].

Rensinger ble kjørt på en 2.2 x 25 cm VYDAC C18 kolonne i buffer A (0.1 % trifluoreddiksyre i vann, B: 0.1 % TFA i acetonitrill). En gradient på 20 % til 90 % B ble kjørt
 10 på en HPLC (Waters) i 120 minutter ved 10 ml/minutt mens UV ved 280 nm (4.0 A) ble overvåket og 1 minutt-fraksjoner samlet. Hensiktsmessige fraksjoner ble kombinert, fryst og frysetørket. Tørkede produkter ble analysert på HPLC (0.46 x 15 cm METASIL AQ C18) og MALDI massespektrometri.

15

Eksempel 3 - GLP aggregeringsmåling:

GLP peptider ifølge foreliggende oppfinnelse ble analysert med hensyn til deres evne til å aggregere i løsning. Stort sett ble peptidene i løsning rørt ved forhøyet temperatur i en
 20 egnet buffer mens turbiditet ble tatt opp ved 350 nm som funksjon av tid. Tid til inntreden av aggregering ble målt for å kvantifisere potensialet til et gitt GLP-molekyl til å aggregere under disse stressede betingelsene.

Protokoll:

25 En GLP-1-forbindelse ble først løst opp under alkaliske betingelser (pH 10.5) i 30 minutter for å løse opp ethvert pre-aggregert materiale. Løsningen ble deretter justert til pH 7.4 og filtrert. Spesifikt ble 4 mg av en lyofilisert GLP-1-forbindelse løst i 3 ml av 10 ml fosfat/10 mM citrat. pH ble justert til 10.0 - 10.5 og holdt i 30 minutter. Løsningen ble justert med HCl til pH 7.4 og filtrert gjennom et egnet filter, for eksempel et Millex
 30 GV sprøytefilter (Millipore Corporation, Bedford, MA). Denne løsningen ble deretter fortynnet til en endelig prøve inneholdende 0.3 mg/ml protein i 10 mM citrat, 10 mM fosfat, 150 mM NaCl og justert til pH 7.4 - 7.5. Prøven ble inkubert ved 37°C i en kvartskyvette. Hvert femte minutt ble turbiditeten i løsningen målt ved 350 nm på et AVIV Model 14 DS UV-VIS spektrofotometer (Lakewood, NJ). I 30 sekunder før og
 35 under målingen ble løsningen rørt ved anvendelse av en magnetisk rørebarre fra Starna Cells, Inc. (Atascadero, CA). En økning i OD ved 350 nm indikerer aggregering av GLP-peptidene. Tiden til aggregering ble anslått ved skjæringen av lineære tilpasninger

til pre-vekst og vekst fasen i henhold til fremgangsmåten til Drake (Arvinte T, Cudd A og Drake AF. (1993) J. Bio. Chem. 268, 5415-6422).

5 Kyvetten ble vasket mellom forsøkene med en kaustisk såpeløsning (f. eks. Contrad-70).

Resultatene for en rekke GLP-1-forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse er oppgitt i tabell 1, som tiden i timer som kreves for at forbindelsen skal aggregere. Som det fremgår, viser forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse svært økte aggregeringstider
10 fremfor GLP-1-forbindelser som er kjent fra teknikkens stilling.

Eksempel 4 - GLP-1-reseptoraktivering med GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse

15 Evnen til GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse til å aktivere GLP-1-reseptoren ble fastsatt ved anvendelse av *in vitro* målinger slik som de som er beskrevet i henholdsvis EP 619 322, Gelfand et al. og US patent 5 120 712. Aktiviteten til disse forbindelsene relativt til aktiviteten til GLP-1 (7-37) OH er angitt i tabell 1. Som det fremgår av disse resultatene, er aktiviteten til GLP-1-forbindelsene ifølge foreliggende
20 oppfinnelse stort sett omkring like god eller bedre enn GLP-1 (7 – 37) OH.

Tabell 1

GLP-1-forbindelse	Aggregeringstid i timer	GLP-1 reseptoraktivering
GLP-1 (7 – 37) OH	1	1.0
Val ⁸ -GLP-1 (7-37)OH	0.9 ± 0.2 (n = 6)	0.47
Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH	9*	0.282
Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH	10	0.021
Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1 (7-37)OH	13	0.001
Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1 (7-37)OH	6	0.81
Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH	12	0.047
Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH	16	0.112
Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1 (7-37)OH	5	1.175
Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1 (7-37)OH	5	0.33
Gln ²² -GLP-1 (7-37)OH	7	0.42
Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1 (7-37)OH	19	0.56
Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1 (7-37)OH	22	0.50
Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1 (7-37)OH	>90	0.40

Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37)OH	72	1.29
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1 (7-37)OH	100, 54	0.58
Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1 (7-37)OH	>75	0.01
Val ⁸ -His ²² -GLP-1 (7-37)OH	>75	0.14
Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1 (7-36)NH ₂	24	0.53
Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-36)NH ₂	>65	1.0
Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1 (7-37)OH	19	1.07
Val ⁸ -Glu ²³ -GLP-1 (7-36)OH	65	0.28
Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1 (7-37)OH	>45	0.18
Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1 (7-37)OH	3	0.007
Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1 (7-37)OH	22	0.02
Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1 (7-37)OH	>24	0.8
Ala ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1 (7-37)OH	>24	0.7
Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1 (7-37)OH	10	0.37
Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37)OH	2	0.47
Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH	>40	0.29
Val ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH	30	0.29
Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH	>45	0.15
Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH	8	0.19
Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH	13	0.19
Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1 (7-37)OH	>70	0.039
Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1 (7-37)OH	20	0.1
Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1 (7-37)OH	9	0.01
Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1 (7-37)OH	>40*	0.17
Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH	14	0.094
Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH	>45, 30	0.41
Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH	63	0.15
Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1 (7-37)OH	>45	0.11
Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1 (7-37)OH	8	0.22
Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1 (7-37)OH	>40	0.33
Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1 (7-37)OH	>20	0.23
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1 (7-37)OH	4	0.37
Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1 (7-37)OH	>30	0.35
Val ⁸ -Glu ²² -Gln ²³ -GLP-1 (7-37)OH	>20	0.47
Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1 (7-37)OH	>45	1.02
Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1 (7-37)OH	>65	1.43
Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1 (7-37)OH	22	0.08

Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1 (7-37)OH	>48	0.09
Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1 (7-37)OH	27	0.34
Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1 (7-37)OH	2	0.53

*Aggregeringstid bestemt ved 30°C

Eksempel 5 - Sinkpresipitering av GLP-1-forbindelser

- 5 Individuelle GLP-1-forbindelser ble fremstilt slik som beskrevet i eksemplene 1 eller 2. 3 mg av et individuelt lyofilisert GLP-molekyl ble løst i 3 ml 0.1 M HEPES-buffer pH 10.5. pH i den resulterende løsningen ble deretter justert til mellom 10.0 og 10.5 med 0.2 N NaOH. Løsningen ble rørt ved romtemperatur i 30 minutter og løsningen ble deretter justert til en pH på 7.4 med 0.2 N HCl. Løsningen ble filtrert gjennom et passende
- 10 sprøytefilter, for eksempel et Millex GV sprøytefilter (Millipore Corporation, Bedford, MA) og konsentrasjonen av GLP-1-forbindelsen ble estimert ved måling av absorban- sen ved 280 nm i et spektrofotometer, for eksempel en Beckman DU640. Proteinkon- sentrasjonen ble deretter justert til 200 µM i HEPES pH 7.4.
- 15 De filtrerte GLP-1 løsningene (100 µl) ble fortynnet med 100 µl 0.1 M HEPES pH 7.4 inneholdende ulike nivåer av sinkklorid på en ELISA-plate (f. eks. Falcon Microtest TM 96) som resulterer i 200 µl løsning som inneholder ulike nivåer av sinkklorid og 100 µM GLP-1-forbindelser. Disse løsningene ble inkubert ved romtemperatur (22°C) i 18 timer og deretter sentrifugert, for eksempel i en Jouan CR412 sentrifuge med mikro-
- 20 plate adaptore. 150 µl av supernatantene etter sentrifugering ble deretter overført til en UV-lesbar ELISA mikrotiterplate (f. eks. Costar UV-plate) og OD ved 280 ble bestemt i en mikrotiterplateleser (f. eks. Molecular Devices SPECTRAMax PLUS, SOFTmax PRO). Resultatene til et forsøk er vist i tabell 2. A₂₈₀ verdier er resultatet av to uavhengige be- stemmelser.

Tabell 2

Zn/GLP-1 molart forhold	GLP-1 (7- 37)OH A280	Gly ⁸ GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ GLP-1 (7- 37)OH A280	Gln ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ -Glu ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ -Ala ²² GLP-1 (7- 37)OH A280
0	0.337	0.32	0.3	0.290	0.295	0.289
0.3	0.318	0.166	0.27	0.390	0.291	0.202
0.5	0.329	0.151	0.26	0.123	0.292	0.107
0.7	0.253	0.156	0.124	0.076	0.293	0.104
1	0.148	0.119	0.06	0.074	0.26	0.110
2	0.092	0.089	0.025	0.095	0.078	0.110
3	0.081	0.085	0.021	0.095	0.052	0.104
5	0.074	0.078	0.019	0.097	0.035	0.119

Tabell 2 (fortsetter)

Zn/GLP-1 molart forhold	Val ⁸ -Ser ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ -Phe ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ -Pro ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ -Lys ²² GLP-1 (7- 37)OH A280	Val ⁸ -Asp ²² GLP-1 (7- 37)OH A280
0	0.2855	0.31	0.2595	0.299	0.288
0.3	0.2805	0.1485	0.2455	0.0825	0.2785
0.5	0.2665	0.1165	0.2325	0.0905	0.2845
0.7	0.1825	0.1015	0.219	0.1195	0.287
1	0.149	0.1265	0.1905	0.1225	0.291
2	0.0935	0.092	0.1695	0.1675	0.184
3	0.101	0.061	0.1615	0.1475	0.1485
5	0.0615	0.00795	0.171	0.142	0.1675

- 5 Disse resultatene viser at det kun kreves små mengder sink for å danne et kompleks med og presipitere en signifikant del av ulike GLP-1-forbindelser fra disse fortynnede løsningene.

P a t e n t k r a v

1.

GLP-1-forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
 5 er valgt fra Val⁸ – Glu²²- GLP -1 (7-37)OH (SEKV. ID. NR. 5) og Val⁸ – Glu²²- GLP -1
 (7-36)NH₂ (SEKV. ID. NR. 32).

2.

GLP-1-forbindelse i følge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 10 nevnte GLP-1-forbindelse er sammensatt med divalent metall kation.

3.

GLP-1-forbindelse i følge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 nevnte GLP-1-forbindelse er sammensatt med divalent zink kation.

15

4.

GLP-1-forbindelse i følge et hvilket som helst av kravene 1-3 k a r a k -
 t e r i s e r t v e d at nevnte forbindelse anvendes som et medikament.

20 5.

GLP-1-forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d at den anvendes for behandling av insulinavhengig diabetes.

6.

25 GLP-1-forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d at den anvendes i profylaksebehandling av ikke-insulinavhengig
 diabetes.

7.

30 GLP-1-forbindelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d at den anvendes i behandlingen av fedme, hjerteinfarkt, myokar-
 dialt infarkt, katabolske endringer etter kirurgisk inngrep eller irritabelt tarmsyndrom.

8.

35 Anvendelse av en GLP-1 forbindelse i følge kravene 1-3 for fremstilling av et medika-
 ment for behandling av ikke-insulinavhengig diabetes.

9.

Anvendelse av en GLP-1 forbindelse i følge kravene 1-3, for fremstilling av et medika-
ment for behandling av fedme, hjerteinfarkt, myokardialt infarkt, katabolske endringer
5 etter kirurgisk inngrep eller irritabelt tarmsyndrom.

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company
 <120> GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 ANALOGS
 <130> X-13989
 <160> 53
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> synthetic construct
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa at position 5 is Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, or His;
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa at position 6 is His, Trp, Phe, or Tyr;
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa at position 10 is Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,
 Glu, or Ala;
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, or
 Cys;
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa at position 17 is His, Asp, Lys, Glu, or Gln;
 <220>

<221> VARIANT
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa at position 18 is Glu, His, Ala, or Lys;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa at position 20 is Asp, Lys, Glu, or His;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa at position 21 is Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, or Lys;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa at position 25 is Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa at position 27 is Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, or Glu;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa at position 28 is Glu, Lys, or Asp;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa at position 29 is Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, or Glu;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa at position 30 is Arg, Glu, or His;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa at position 31 is Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH₂, or is deleted.

<400> 1

His Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Ile Ala Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at postion 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa at postion 6 is His, Trp, Phe, or Tyr;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa at postion 10 is Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val,
 Glu, or Ala;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at postion 16 is Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, or
 Cys;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa at postion 17 is His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa at postion 20 is Asp, Lys, Glu, or His;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa at postion 24 is Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa at postion 29 is Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp,

Gly, Pro, His, or Glu;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa at position 31 is Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH₂, or is deleted.

<400> 2

His	Xaa	Glu	Gly	Thr	Xaa	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Xaa
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Ala	Xaa	Glu	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Val	Lys	Xaa	Arg	Xaa
			20					25					30	

<210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, or Cys;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa at position 17 is His, Asp, Lys, Glu, or Gln;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa at position 21 is Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, or Lys;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa at position 24 is Ala, Glu, Asp, Ser, or His;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa at position 31 is Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, or Gly-Pro-NH₂, or is deleted.

<400> 3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Xaa Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
 20 25 30

<210> 4
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa at position 1 is L-histidine, D-histidine, desamino-histidine, 2-amino-histidine, Beta-hydroxy-histidine, homohistidine, alpha-fluoromethyl-histidine or alpha-methyl-histidine;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, or Thr;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is Asp, Glu, Gln, Asp, Lys, Arg, or Cys;

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa at position 31 is -NH₂ or Gly.

<400> 4

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
 20 25 30

<210> 5
 <211> 31

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 5

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 6
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 6

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 7
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 7

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 8
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 8

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

	20	25	30
<210>	9		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	synthetic construct		
<400>	9		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu			
1	5	10	15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly			
	20	25	30
<210>	10		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	synthetic construct		
<400>	10		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp			
1	5	10	15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly			
	20	25	30
<210>	11		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	synthetic construct		
<400>	11		
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg			
1	5	10	15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly			
	20	25	30
<210>	12		
<211>	31		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220>			
<223>	synthetic construct		
<400>	12		

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic construct

<400> 13

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 14
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic construct

<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 15
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic construct

<400> 15

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 16
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 16

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 17

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 18

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 20

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 21

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 22
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 22

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Arg
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 23
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 23

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Lys
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 24

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is cysteic acid.

<400> 24

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 25
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is cysteic acid.

<400> 25

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 26
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is cysteic acid.

<400> 26

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

 <210> 27
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> synthetic construct

 <400> 27

 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> synthetic construct

 <400> 28

 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
 1 5 10 15

 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

 <210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> synthetic construct

 <400> 29

 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
 1 5 10 15

 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

 <210> 30
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> synthetic construct

<400> 30

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial .

<220>

<223> synthetic construct

<220>

<221> VARIANT

<222> (16)..(16)

<223> Xaa at position 16 is cysteic acid.

<400> 31

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 32

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 33

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 34

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 35

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is cysteic acid.

<400> 36

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 37
 <211> 30
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 37

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 38

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 39

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 41
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> synthetic construct

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa at position 16 is cysteic acid.

<400> 41

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

<210> 42
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 42

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 43
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 43

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 44
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 44

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 45

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 46

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys His Arg Gly
 20 25 30

<210> 47

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic construct

<400> 47

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
 20 25 30

<210> 48

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 48

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 49
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 49

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 50
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 50

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 51
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct

<400> 51

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Gly Lys Arg Gly
 20 25 30

<210> 52
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct
 <400> 52

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
 20 25 30

<210> 53
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic construct
 <400> 53

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
 20 25 30

1/4

Fig. 1

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

Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH

10

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

Val⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH

15

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

20

Val⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH

25

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

Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH

2/4

Fig. 2

- 5 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH
- 10 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Asp-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 Gly⁸-Asp²²-GLP-1(7-37)OH
- 15 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Arg-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH
- 20 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH
- 25 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
 Gly⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH

3/4

Fig. 3

- 5 His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
Val⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37) OH
- 10 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-Gly
Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37) OH
- 15 His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His
Val⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37) OH
- 20 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His
Gly⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37) OH
- 25

4/4

Fig. 4

5

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

Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1 (7-37) OH

10

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

Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1 (7-37) OH

15