

**(19) C2 (11) 65549 (13) UA**

(98) а/с 925, м. Харків-82, 61082

(85) 1999-06-07

(74) Шляховецький Олександр Михайлович, (UA)

(45) [2004-04-15]

(43) [2000-08-15]

(24) 2004-04-15

(22) 1997-11-04

(12) null

(21) 99063107

(46) 2004-04-15

(86) 1997-11-04 PCT/US97/20114

(30) 60/030,213 1996-11-05 US 08/961,405 1997-10-30 US

(54) СПОСІБ РЕГУЛЮВАННЯ ОЖИРІННЯ ШЛЯХОМ ПЕРИФЕРІЙНОГО ВВЕДЕННЯ АНАЛОГІВ ТА ПОХІДНИХ GLP-1 (ВАРІАНТИ) ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛОГОВ И ПРОИЗВОДНЫХ GLP-1 ДЛЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ДЛЯ БОРЬБЫ С ОЖИРЕНИЕМ USE OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDES SUCH AS GLP-1, GLP-1 ANALOG, OR GLP-1 DERIVATIVE IN METHODS AND COMPOSITIONS FOR REDUCING BODY WEIGHT

(56) TURTON M.D. et al.: "A role for GLP-1 in the central regulation of feeding", NATURE, 1996, vol. 379, pp. 69-72 3

(71)

(72) US Дімарчі Річард Денніс US Димарчи Ричард Деннис US Dimarchi Richard Dennis SE Ефендік Сьюад SE Ефендік Сьюад SE Ефендік Сьюад

(73) US ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ US ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ US ELI LILLI AND COMPANY

Изобретение относится к применению глюкагоноподобных пептидов, например, GLP-1, аналога GLP-1 или производного GLP-1 как препаратов, используемых с целью снижения массы тела.

Винахід стосується застосування глюкагоноподібних пептидів, наприклад, GLP-1, аналога GLP-1 або похідної GLP-1 для зменшення маси тіла шляхом периферійного введення.

This invention relates to the use of glucagon-like peptides such as GLP-1, a GLP-1 analog, or a GLP-1 derivative in methods and compositions for reducing body weight.

1. Застосування композиції, що містить глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) або його аналог, або похідну, для периферійного введення для зменшення маси тіла.
2. Застосування композиції, що містить глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) або його аналог, або похідну, для виготовлення лікарського засобу для периферійного введення для лікування ожиріння.
3. Спосіб зменшення маси тіла, який включає периферійне введення відповідному суб'єкту композиції, що містить сполуку, вибрану з групи, до складу якої входять GLP-1, аналоги GLP-1, похідні GLP-1, агоністи рецептора GLP-1, агоністи шляху передачі сигналу GLP-1, сполуки, які стимулюють синтез ендogenous GLP-1, сполуки, які стимулюють виділення ендogenous GLP-1 та фармацевтично прийнятні солі всіх згаданих сполук, у дозі, достатній для спричинення зменшення маси тіла.
4. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згадану сполуку вибрано з групи, до складу якої входять GLP-1, аналоги GLP-1, похідні GLP-1 та фармацевтично прийнятні солі всіх згаданих сполук.
5. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згадану композицію вводять парентерально.
6. Спосіб за п. 5, який відрізняється тим, що згадану композицію вводять інтравенозно.
7. Спосіб за п. 6, який відрізняється тим, що згадану композицію вводять підшкірно.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 3, 5-7, який відрізняється тим, що згадане введення є безперервним.
9. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що згадану композицію вводять зі швидкістю від 0,25 пмоль/кг/хвилину до 6 пмоль/кг/хвилину.
10. Спосіб за п. 8, який відрізняється тим, що згадану композицію вводять зі швидкістю від 0,6 пмоль/кг/хвилину до 2,4 пмоль/кг/хвилину.
11. Спосіб за п. 6, який відрізняється тим, що згадане інтравенозне введення здійснюють періодично.
12. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданою сполукою є амід GLP-1 (7 - 36) або його фармацевтично прийнятна сіль.
13. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що згаданою сполукою є Val<sup>8</sup>-GLP-1 (7 - 37)ОН або його фармацевтично прийнятна сіль.
14. Спосіб зменшення маси тіла, який включає периферійне введення відповідному суб'єкту композиції, що містить сполуку, вибрану з групи, до складу якої входять агоністи рецептора GLP-1, агоністи шляху передачі сигналу GLP-1, сполуки, які стимулюють синтез ендogenous GLP-1, сполуки, які стимулюють виділення ендogenous GLP-1, та фармацевтично прийнятні солі всіх згаданих сполук у дозі, достатній для спричинення зменшення маси тіла.

15. Композиція для периферійного введення, призначена для зменшення маси тіла, яка містить глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) або його аналог, похідну або активний фрагмент.

Цей винахід має відношення до застосування глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), аналогів та похідних GLP-1 у способах та композиціях, у певних фармацевтичних лікарських формах, які сприяють втраті маси.

Ожиріння, і, зокрема, ожиріння верхньої частини тіла, є найбільш поширеним наслідком порушення харчування у тій частині населення земної кулі, яка вживає надмірну кількість їжі. Результати численних досліджень свідчать про те, що зниження маси тіла суттєво зменшує ризик хронічних захворювань, наприклад, діабету, артеріальної гіпертензії, гіперліпідемії, ішемічної хвороби серця та кістково-м'язових хвороб. Наприклад, різні критерії визначення ожиріння, у тому числі проста маса тіла, співвідношення обсягу талії до обсягу стегон та мезентеріальне жирове депо, у дуже значній мірі корелюють з ризиком виникнення інсулінонезалежного діабету (NIDDM), відомого також як діабет типу II. За даними Американської Діабетичної Асоціації (1995), майже 80% пацієнтів з NIDDM мають надмірну вагу. Зменшення ваги є специфічною метою медичного лікування багатьох хронічних захворювань, у тому числі й NIDDM.

Сучасні способи стимулювання втрати ваги є не зовсім задовільними. Деякі огрядні пацієнти можуть втрачати вагу шляхом цілеспрямованого модифікування поведінки, наприклад, зміною раціону та підвищенням фізичної активності. Неможливість забезпечення втрати ваги за допомогою згаданих способів може бути обумовленою генетичними факторами, які викликають підвищений апетит, наданням переваги продуктам харчування з високим вмістом жиру або тенденцією до ліпогенного метаболізму. На жаль, щорічні витрати на заходи, спрямовані на втрату ваги, які більшою мірою виявляються марними, становлять, за приблизними оцінками, 33 мільйони доларів. Таким чином, відчувається термінова необхідність у нових способах та композиціях, наприклад, фармацевтичних засобах, які стимулюють втрату ваги, для доповнення старих підходів.

Глюкагоноподібний пептид 1 (GLP-1), як відомо, відіграє критичну роль у регулюванні фізіологічної реакції на споживання продуктів харчування. GLP-1 утворюється з проглюкагону і виділяється до кровотоку з L-клітин ендокринних залоз, які знаходяться, головним чином, у дистальній частині тонкого кишечника та прямої кишки, у відповідь на споживання їжі [Нільсон (Nilsson) та інші, 1991; Кроймен (Kroymann) та інші, 1987; Мойсов (Mojsov) та інші, 1986]. GLP-1 діє через пов'язаний з G білком поверхневоклітинний рецептор (GLP-IR) та підсилює індукований живильними речовинами синтез [Фемен (Fehmann) та інші, 1992] та виділення [Фемен (Fehmann) та інші] інсуліну. GLP-1 стимулює секрецію інсуліну (інсулінотропна дія) та утворення цАМФ [Мойсов (Mojsov) та інші, 1992]. Амід GLP-1 (7-36) стимулює виділення інсуліну, зменшує рівень секреції глюкагону та пригнічує шлункову секрецію та випорожнення [Наук (Nauck), 1993; Гутняк (Gutniak) та інші, 1992]. Згадані шлунково-кишкові ефекти GLP-1 не спостерігаються у ваготомізованих суб'єктів, що вказує на опосередкованість згаданого ефекту центральною нервовою системою [Орсков (Orskov) та інші, 1995]. GLP-1 з високим рівнем спорідненості зв'язується з виділеними адипоцитами пацюків, наслідком чого є активація продукування цАМФ [Вальверде (Valverde) та інші, 1993] та стимулювання ліпогенезу [Обен (Oben) та інші, 1991] або ліполізу (Руйс-Гранде (Ruiz-Gran de) та інші, 1992). GLP-1 стимулює синтез глікогену, окисдування глюкози та утворення лактату у скелетних м'язах пацюків [Вілланова (Villanova) та інші, 1994].

У панкреатичних острівцях, легенях, гіпоталамусі та шлунку пацюків знаходять відносно великі кількості мРНК, яка кодує рецептор GLP-1 панкреатичного типу [Біллок (Billock) та інші, 1996]. Цікаво те, що, незважаючи на дані про присутність як GLP-1, так і GLP-1 рецептору у гіпоталамусі [Кроймен (Kroymann), та інші, 1989; Канзе (Kanse) та інші, 1988], центральної ролі GLP-1 не було встановлено до недавнього повідомлення про те, що GLP-1, який було введено інтрацеребровентрикулярним шляхом (ICV), явно пригнічував процес споживання їжі у голодних пацюків [Тартон (Turton) та інші, 1996]. У тому ж самому повідомленні вказувалось на те, що після ICV введення GLP-1, c-fos, маркер активації нейронів, з'являвся виключно у паравентрикулярному ядрі гіпоталамусу та у центральному ядрі мигдалеподібного тіла, тобто у двох ділянках головного мозку, які відіграють головну роль у регулюванні процесу споживання їжі [Морлі (Morley), 1987]. ICV GLP-1 також значно зменшує споживання їжі після прискування активного стимулятора годування, нейропептиду Y, у тварин; яких годували ad libitum [Тартон (Turton) та інші, 1996]. Подальшим повідомленням було продемонстровано, що GLP-1, який було введено центральним або периферійним шляхом, залучається до контролювання регулювання температури тіла, однак не впливає на споживання їжі після швидкого інтраперитонеального введення пацюкам [О'Ші (O'Shea) та інші, 1996]. Недавня стаття повідомляє про те, що вприскування GLP-1 до бокових шлуночків ситих пацюків індукує екстенсивне стимулювання Fos-ir у паравентрикулярному ядрі та парвоцелюлярному центральному ядрі мигдалеподібного тіла, що підтверджує дані Тартона (Turton) та інших [Роуленд (Rowland) та інші, 1996]. На додаток до цього згадані дослідники описують сильну активацію інших центрів, які залучено до регулювання процесу споживання їжі, у тому числі безпосереднього білкового продукту раннього гену у ядрі одинокого шляху, латерального парабрахіального ядра варолієвого мосту, базального ядра пограничної борозни та самого заднього поля. У органі нижче стовпа своду та самому задньому полі пацюків знайдено GLP-1 рецептори, які є доступними для периферійного GLP-1 [Орсков (Orskov) та інші, 1996].

Тартон (Turton) та інші (1996) конкретно вказує на те, що вплив GLP-1 на масу тіла та процес споживання їжі викликається лише у разі безпосереднього введення GLP-1 до шлуночків головного мозку, що інтраперитонеальне введення GLP-1, навіть у відносно високих дозах, не впливає на процес споживання їжі впродовж раннього присмеркового періоду, і що фрагменти GLP-1, у разі периферійного введення, позбавлені активності [з посиланням на Сузукі (Suzuki) та інших, 1989]. Такі твердження не заохочують до застосування GLP-1 як композиції (фармацевтичного засобу) для зменшення маси тіла,

оскільки центральні шляхи введення, наприклад ICV шлях, є недоступними для лікування ожиріння у людей. Наслідком фізіологічних ефектів GLP-1, які було задокументовано перед тим, було висунення припущення про його благотворне застосування для лікування діабету та ожиріння шляхом трансплантування ліній рекомбінантних клітин, які кодують GLP-1, GLP або рецептори GLP-1 [наприклад, WO 96/25487].

Інша публікація не заохочувала до застосування GLP-1 шляхом тлумачення одержаних даних у плані того, що "периферійне введення GLP-1 не впливає на харчову поведінку" [WO 97/31943, стор. 3]. У цій публікації повідомлялось також про вплив GLP-2 на процес споживання їжі у разі периферійного введення.

Коротке викладення суті винаходу

Способи та композиції, зокрема, фармацевтичні лікарські форми, лікарські засоби, застосування аналогів, похідних та активних пептидів глюкагоноподібного пептиду-1, є ефективними щодо зменшення маси тіла та лікування ожиріння. Визначення ожиріння відрізняється у залежності від географічного місцезнаходження, клінічної точки зору та соціальних переваг. Способи та композиції за цим винаходом, однак, є придатними для будь-якого суб'єкту, для якого є необхідним зменшення маси. Застосування цього винаходу не обмежується, наприклад, лише пацієнтами-діабетиками. Периферійне введення амідів GLP-1(7-36) небезпечним пацієнтам, вкрай неочікувано та, у протилежність твердженням Тартона(Turton) та інших (1996), викликає суттєве зменшення маси тіла. Таким чином, одним з аспектів цього винаходу є спосіб зменшення маси тіла, який включає одержання композиції, до складу якої входить згадана сполука глюкагоноподібного пептиду-1, та введення її суб'єкту. До придатних згаданих сполук глюкагоноподібного пептиду-1 належать GLP-1, аналоги GLP-1, похідні GLP-1, агоністи рецептору GLP-1, агоністи шляху передачі сигналу GLP-1, сполуки, які стимулюють синтез ендogenous GLP-1, сполуки, які стимулюють виділення ендogenous GLP-1 та їх фармацевтично прийнятні солі. Вводиться фармацевтично ефективна доза, тобто доза, яка є достатньою для спричинення зменшення маси тіла.

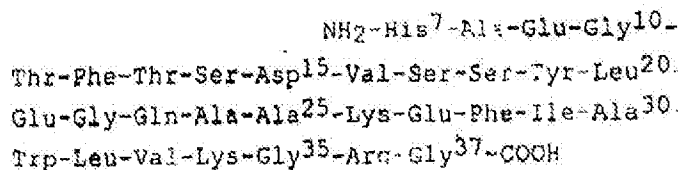
Докладний опис винаходу

Способи та композиції, зокрема, лікарські засоби(фармацевтичні композиції або лікарські форми) з застосуванням глюкагоноподібного пептиду-1, його аналогів або похідних, є ефективними щодо зменшення маси тіла та лікування ожиріння. До аналогів та похідних GLP-1, які є придатними для практичного здійснення цього винаходу, належать аналоги та похідні, які мають підвищений період напіввиведення, порівняно до GLP-1, та здатність до спричинення втрати маси у разі введення суб'єкту впродовж певного періоду часу.

Сполуки.

Усі аналоги, похідні, варіанти, попередники та гомологи GLP-1 є придатними для практичного втілення цього винаходу доти, доки до їх складу входить активний фрагмент, який забезпечує втрату маси.

Термін "GLP-1" означає GLP-1(7-37). За традицією, яка прийнята у цій галузі, аміно-кінцева ділянка GLP-1(7-37) позначається цифрою 7, у той час, як карбокси-кінцева ділянка позначається цифрою 37. Амінокислотна послідовність GLP-1(7-37) є добре відомою у цій галузі, однак її наведено далі для зручності читача:



(Послідовність № 1)

Термін "аналог GLP-1" визначається як молекула, яка має модифікацію, до складу якої входять один або декілька замісників, делецій, інверсій або додатків амінокислот, порівняно до GLP-1. До аналогів GLP-1, відомих у цій галузі, належать, наприклад, GLP-1(7-34) та GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37), Gln<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), D-Gln<sup>9</sup>-GLP-1(7-37), Thr<sup>16</sup>-Lys<sup>18</sup>-GLP-1(7-37) та Lys<sup>18</sup>-GLP-1(7-37). Переважними аналогами GLP-1 є GLP-1(7-34) та GLP-1(7-35), які розкриваються у патенті США №5,118,666, а також GLP-1(7-36). Ці сполуки, які мають інсулінотропні властивості, є формами GLP-1, які було піддано біологічній обробці. Інші аналоги GLP-1 розкриваються у патенті США №5,545,618.

Термін "похідна GLP-1" визначається як молекула, яка має амінокислотну послідовність GLP-1 або аналогу GLP-1, однак, на додаток до цього, має як мінімум одну хімічну модифікацію однієї або декількох своїх амінокислотних бокових груп, атомів α-вуглецю, кінцевої аміногрупи або кінцевої карбоксикислотної групи. Хімічна модифікація включає додання хімічних складових, утворення нових зв'язків та видалення хімічних складових. Модифікації амінокислотних бокових груп включають ацилювання лізинових ε-аміногруп, N-алкілювання аргініну, гістидину або лізину, алкілювання глутамінової або аспарагінової карбоксикислотних груп та деамідування глутаміну або аспарагіну. Модифікації кінцевої аміногрупи включаючи, модифікації, які залучають дезаміно, N-нижчий алкіл, N-ди-нижчий алкіл та N-ацил. Модифікації кінцевої карбоксильної групи включають модифікації, які залучають амід, нижчий алкіламід, діалкіламід та нижчий алкіловий ефір. Нижчим алкілом є C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл. Крім того, одна або декілька бокових груп або кінцевих груп можуть захищатись за допомогою захисних груп, відомих пересічному фахівцю у галузі білкової хімії, α-вуглець амінокислоти може бути моно- або диметиллованим.



У цьому винаході група аналогів та похідних GLP-1, якій надається перевага та яка призначена для застосування за цим винаходом, складається з різних молекул GLP-1, заявлених у патенті США №5.545,618('618). Ефективні аналоги активних GLP-1 пептидів, 7-34, 7-35, 7-36 та 7-37, мають амінокислотні заміни у положеннях 7-10 та/або є усіченими на С-кінцевій ділянці та/або включають різні інші амінокислотні заміни у згаданому основному пептиді. Аналоги, які мають D-амінокислотні заміни у 7 та 8 положеннях та/або N-алкіловані або N-ациловані амінокислоти у 7 положенні, є особливо стійкими до деградації *in vivo*.

Аналоги цього винаходу у '618, які демонструють підвищені інсуліностимулювальні властивості, мають послідовність нативного GLP-1, 7-34, 7-35, 7-36 або 7-37, або його С-кінцевий амід, з як мінімум однією модифікацією, яку вибирають з групи, до складу якої входять:

(а) заміна лізину нейтральною амінокислотою, аргініном або D-формою лізину у положенні 26 та/або 34 та/або аргініну нейтральною амінокислотою, лізином або D-формою аргініну у положенні 36;

(b) заміна триптофану стійкою до оксидування амінокислотою у положенні 31;

(c) заміна відповідно до, як мінімум, одного з наведених далі пунктів:

V на Y у положенні 16;

S на K у положенні 18;

E на D у положенні 21;

G на S у положенні 22;

Q на R у положенні 23;

A на R у положенні 24; та

K на Q у положенні 26;

(З використанням однолітерних умовних позначень амінокислот)

(d) заміна, яка включає як мінімум одну з наведених далі:

A альтернативною невеликою нейтральною амінокислотою у положенні 8;

E альтернативною кислотною амінокислотою або нейтральною амінокислотою у положенні 9;

G альтернативною нейтральною амінокислотою у положенні 10;

D альтернативною кислотною амінокислотою у положенні 15; та

(e) заміна гістидину альтернативною нейтральною амінокислотою або D або N-ациловою або алкіловою формою гістидину у положенні 7.

Відносно модифікацій (a), (b), (d) та (c) згадані амінокислоти, які було замінено, можуть бути у D-формі. Згадані амінокислоти, які було замінено у положенні 7, також можуть бути у N-ацилованій або N-алкілованій формах.

За іншим аспектом винаходу згаданий '618 спрямовано на пептиди, які демонструють підвищену стійкість до деградації у плазмі, порівняно до GLP-1(7-37), де це підвищувало стійкість до деградації. У цих аналогів будь-які з вищезгаданих усічених форм GLP-1(7-34)-GLP-1(7-37) або їх С-кінцеві амідовані форми модифіковано

(a) заміною H D-нейтральною або D-кислотою амінокислотою у положенні 7, або

(b) заміною A D-амінокислотою у положенні 8, або

(c) обома вищезгаданими замінами, або

(d) заміною H N-ациловою або N-алкіловою формою будь-якої природної амінокислоти у положенні 7.

Таким чином, до аналогів, які є стійкими до деградації, належать (N-ацил (1-6C) AA)<sup>7</sup> GLP-1(7-37) та (N-алкіл (1-6C AA)<sup>7</sup> GLP-1(7-37), де, у разі, коли AA - лізильний залишок, один або обидва атоми азоту можуть бути алкілованими або ацилованими, AA означає будь-яку амінокислоту, яка зберігає інсуліностимулювальну активність.

Для заміни D-амінокислот у 7 та 8 положеннях, D-залишок будь-якої кислотної або нейтральної амінокислоти може бути використано у положенні 7 та будь-якої амінокислоти у положенні 8, що знову-таки відповідає інсуліностимулювальній активності. Будь-яке або обидва положення 7 та 8 можна замінити D-амінокислотою; згадана D-амінокислота у положенні 7 також може бути ациловою або алкіловою. Ці модифіковані форми є придатними не тільки для GLP-1(7-37), але також і для більш коротких усічених аналогів.

Таким чином, до переважних аналогів згаданого винаходу '618 належать ті з них, у яких згадану (7-34), (7-35) або (7-37) форму GLP-1 було модифіковано лише заміною лізину нейтральною амінокислотою, аргініном або D-формою лізину у положенні 26 та/або 34 та/або аргініну нейтральною амінокислотою, лізином або D-формою аргініну у положенні 36(розділ (a)). Особливо переважними аналогами є ті з них, де згадану амінокислоту, якою було замінено лізін у положенні 26 та 34, було вибрано з групи, до складу якої входять K<sup>+</sup>, G, S, A, L, I, Q, R, R<sup>+</sup> та M, та де згадану амінокислоту, якою було замінено аргінін у положенні 36, було вибрано з групи, до складу якої входять K, K<sup>+</sup>, G, S, A, L, I, Q, M та R<sup>+</sup> (де + означає D-форму).

Перевага також надається аналогам, де єдиною модифікацією є заміна триптофану стійкою до оксидування амінокислотою у положенні 31(розділ (b)). Особливо переважні заміни вибирають з групи, до складу якої входять F, V, L, I, A та Y.

Перевага також надається тим аналогам, де єдиною модифікацією є як мінімум одна з конкретних заміни, які було наведено у розділі (c). Особлива перевага надається аналогам, де було здійснено комбіновані заміни G на S у положенні 22, Q та A на R у положеннях 23 та 24, відповідно, та K на Q у положенні 26, або заміни V на Y у положенні 16 та S на K у положенні 18, або ці заміни плюс заміну E на D у положеннях 21.

Перевага також надається аналогам, де єдиними модифікаціями є модифікації, які було представлено

у розділі (d). Особлива перевага з-посеред них надається аналогам, у яких невелику нейтральну амінокислоту, якою було замінено аланін у положенні 8, було вибрано з групи, до складу якої входять S, S<sup>+</sup>, GC, C<sup>+</sup>, Sar, A<sup>+</sup>, бета-ala та Aib; та/або згадану кислотну або нейтральну амінокислоту, якою було замінено глутамінову кислоту у положенні 9, було вибрано з групи, до складу якої входять E<sup>+</sup>, D, D<sup>+</sup>, Суа T, T<sup>+</sup>, N, N<sup>+</sup>, Q, Q<sup>+</sup>, Cit, MSO та ацетил-K; та/або згадану альтернативну нейтральну амінокислоту, якою було замінено гліцин у положенні 10, було вибрано з групи, до складу якої входять S, S<sup>+</sup>, Y, Y<sup>+</sup>, T, T<sup>+</sup>, N, N<sup>+</sup>, Q, Q<sup>+</sup>, Cit, MSO, ацетил-K, F та F<sup>+</sup>; та/або де E було замінено D у положенні 15.

Перевага також надається аналогам, де було змінено лише положення 7(розділ (e)). Переважними замінами є ті з них, де згадану амінокислоту, якою було замінено гістидин у положенні 7, було вибрано з групи, до складу якої входять H<sup>+</sup>, Y, Y<sup>+</sup>, F, F<sup>+</sup>, R, R<sup>+</sup>, Orn, Orn<sup>+</sup>, M, M<sup>+</sup>, N-форміл-H, N-форміл-H<sup>+</sup>, N-ацетил-H, N-ацетил-H<sup>+</sup>, N-ізопропіл-H, N-ізопропіл-H<sup>+</sup>, N-ацетил-K; N-ацетил-K<sup>+</sup>, P та P<sup>+</sup>.

Перевага надається також варіантам втілення з комбінацією лише двох з вищезгаданих класів модифікованих форм, на додаток до наведених далі конкретних варіантів втілення.

Перевага надається наведеним далі конкретним аналогам:

(H<sup>+</sup>)<sup>7</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (Y)<sup>7</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (N-acetyl-H)<sup>7</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (N-isopropyl-H)<sup>7</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (A<sup>+</sup>)<sup>8</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (E<sup>+</sup>)<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (D)<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (D<sup>+</sup>)<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (F<sup>+</sup>)<sup>10</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (S)<sup>22</sup>(R)<sup>23</sup>(R)<sup>24</sup>(Q)<sup>26</sup>-GLP-1 (7-37);  
 (S)<sup>8</sup>(Q)<sup>9</sup>(Y)<sup>15</sup>(K)<sup>18</sup>(D)<sup>21</sup>-GLP-1 (7-37)

acetyl - ацетил

isopropyl — ізопропіл

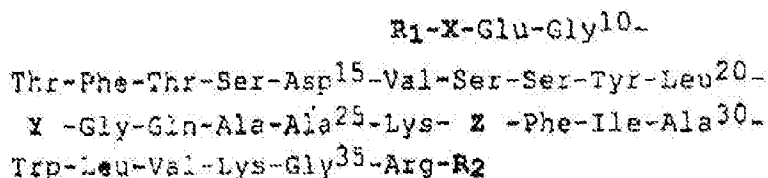
Переважні форми аналогів з підвищеною стійкістю також мають лише одну або, найбільше, дві амінокислотні модифікації.

До переважних замін для гістидину у положенні 7 належать D-форми кислотних або нейтральних амінокислот або D-форми гістидинів. Переважними є P<sup>+</sup>, D<sup>+</sup>, E<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, Q<sup>+</sup>, L<sup>+</sup>, V<sup>+</sup>, I<sup>+</sup> та H<sup>+</sup>.

Згаданий гістидин у положенні 7 або заміна (D або L) також можуть бути N-алкілованими(1-6C) або N-ацилованими(1-6C). Алкільні групи є гідрокарбіловими залишками з прямим або розгалуженим ланцюгом(у тому числі, циклічним) згаданого члену C. Ацильні групи мають формулу RCO, де R - алкіл. Переважними алкільними групами є t-пропіл, α-пропіл та етил; переважним ацилом є ацетил та пропіоніл. До переважних залишків, які можуть алкілюватись або ацилюватись, належать P, D, E, N, Q, V, L, I, K та H у D або L формі. Переважними замінами для аланіну у положенні 8 є D-форми P, V, L, I та A; переважними також є D-форми D, E, N, Q, K, T, S та H.

Деякі конкретні аналоги демонструють як підвищену активність стимулювання виділення інсуліну, так і підвищену стійкість.

Переважна група аналогів та похідних GLP-1 для застосування у цьому винаході складається з молекул наведеної формули:



(Послідовність № 2)

та їх фармацевтично прийнятних солей, де: R<sub>1</sub> вибирають з групи, до складу якої входять L-гістидин, D-гістидин, дезаміногістидин, 2-аміногістидин, b-гідрокси-гістидин, гомогістидин, альфа-фторметил-гістидин та альфа-метил-гістидин; X вибирають з групи, до складу якої входять Ala, Gly, Val, Thr, He та альфа-метил-Ala; Y вибирають з групи, до складу якої входять Glu, Gln, Ala, Thr, Ser та Gly; Z вибирають з групи, до складу якої входять Glu, Gln, Ala, Thr, Ser та Gly; та R<sub>2</sub> вибирають з групи, до складу якої входять NH<sub>2</sub> та Gly-OH; за умови, що згадана сполука має ізоелектричну точку в діапазоні від приблизно 6,0 до приблизно

9,0, та за додаткової умови, що у разі, коли R<sub>1</sub> - His, X - Ala, Y - Glu та Z - Glu, R<sub>2</sub> повинен бути NH<sub>2</sub>.

Було розкрито та включено численні аналоги та похідні GLP-1, які мають ізоелектричну точку у діапазоні від приблизно 6,0 до приблизно 9,0, наприклад:

GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>  
Gly<sup>8</sup>-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>  
Gln<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
D-Gln<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
acetyl-Lys<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
Thr<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
D-Thr<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
Asn<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
D-Asn<sup>9</sup>-GLP-1 (7-37)  
Ser<sup>22</sup>-Arg<sup>23</sup>-Arg<sup>24</sup>-Gln<sup>26</sup>-GLP-1 (7-37)  
Thr<sup>16</sup>-Lys<sup>18</sup>-GLP-1 (7-37)  
Lys<sup>18</sup>-GLP-1 (7-37)  
Arg<sup>23</sup>-GLP-1 (7-37)  
Arg<sup>24</sup>-GLP-1 (7-37)

Інша переважна група активних сполук для застосування у цьому винаході розкрита у WO 91/11457 (має відношення до патенту США №5,545,618) і включає GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), CLP-1(7-36) або GLP-1(7-37), або їх амідну форму та їх фармацевтично прийнятні солі, які мають як мінімум одну модифікацію, у тому числі модифікації, які наведено далі:

(a) заміна лізину гліцином, серином, цистеїном, треоніном, аспарагіном, глутаміном, тирозином, аланіном, валіном, ізолейцином, лейцином, метіоніном, фенілаланіном, аргініном або D-лізином у положенні 26 та/або положенні 34; або заміна аргініну гліцином, серином, цистеїном, треоніном, аспарагіном, глутаміном, тирозином, аланіном, валіном, ізолейцином, лейцином, метіоніном, фенілаланіном, лізином або D-аргініном у положенні 36;

(b) заміна триптофану стійкою до окисдування амінокислотою у положенні 31;

(c) заміна як мінімум одного з: валіну тирозином у положенні 16; серину лізином у положенні 18; глутамінової кислоти аспарагіновою кислотою у положенні 21; гліцину серином у положенні 22; глутаміну аргініном у положенні 23; аланіну аргініном у положенні 24; та лізину глутаміном у положенні 26; та

(d) заміна як мінімум одного з: аланіну гліцином, серином або цистеїном у положенні 8; глутамінової кислоти аспарагіновою кислотою, гліцином, серином, цистеїном, треоніном, аспарагіном, глутаміном, тирозином, аланіном, валіном, ізолейцином, лейцином, метіоніном або фенілаланіном у положенні 9; гліцину серином, цистеїном, треоніном, аспарагіном, глутаміном, тирозином, аланіном, валіном, ізолейцином, лейцином, метіоніном або фенілаланіном у положенні 10; та аспарагінової кислоти глутаміновою кислотою у положенні 15; та

(e) заміна гістидину гліцином, серином, цистеїном, треоніном, аспарагіном, глутаміном, тирозином, аланіном, валіном, ізолейцином, лейцином, метіоніном або фенілаланіном, або D- або N-ациловою або алкіловою формою гістидину у положенні 7; де у замінах (a), (b), (d) та (c) заміщені амінокислоти можуть, факультативно, бути у D-формі, та згадані амінокислоти, які було заміщено у положенні 7, можуть факультативно бути у N-ацилованій або N-алкілованій формі.

Оскільки відповідальним за швидку інактивацію введеного GLP-1 in vivo, яка спостерігається, може бути фермент, дипептидил-пептидаза IV (DPP IV) [Ментлайн (Mentlein) та інші, 1993], перевага надається введенню аналогів та похідних GLP-1, які захищено від активності DPP IV, та ще більше переважним є введення Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-36) NH<sub>2</sub>, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37) OH α-метил-Ala<sup>8</sup>-GLP-1(7-36) NH<sub>2</sub> та Gly<sup>8</sup>-Gln<sup>21</sup>-GLP-1(7-37) OH або їх фармацевтично прийнятних солей.

Перевага також надається застосуванню у цьому винаході молекули, яку заявлено у патенті США №5,188,666(666). Така молекула включає пептид, який має одну з наведених далі амінокислотних послідовностей:

NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Ala-Glu-Gly<sup>10</sup>-  
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-  
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-  
Trp-Leu-Val-X

(Послідовність № 3),

де X може бути Lys та Lys-Gly; або похідною згаданого пептиду та де згаданим пептидом може бути фармацевтично прийнятна сіль згаданого пептиду, одержана шляхом додання кислоти; фармацевтично прийнятна карбоксилатна сіль згаданого пептиду; фармацевтично прийнятний нижчий алкіловий ефір згаданого пептиду; або фармацевтично прийнятний амід згаданого пептиду, який вибирають з групи, до складу якої входять амід, нижчий алкіламід та нижчий диалкіламід.

Винахід у '666 має відношення до пептидного фрагменту, який є інсулінотропним і який одержують з природної амінокислотної послідовності.

Згаданий винахід включає сполуку, яку вибирають з групи, до складу якої належать:

(A) пептид, який включає послідовність:

His-Ala-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-X

де X вибирають з групи, до складу якої входять:

- (a) Lys,
- (b) Lys-Gly,
- (c) Lys-Gly-Arg;

та (B) похідна згаданого пептиду; де згадана сполука є по суті вільною від природних домішок та має інсулінотропну активність, яка перевищує інсулінотропну активність GLP-1(1-36) або GLP-1(1-37).

Цей винахід включає також сполуку, яку вибирають з групи, до складу якої входять:

(A) пептид, який включає послідовність:

His-Ala-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-X

де X вибирають з групи, до складу якої входять:

- (a) Lys,
- (b) Lys-Gly,
- (c) Lys-Gly-Arg;

та (B) похідна згаданого пептиду; де згадана сполука є по суті вільною від природних домішок та має інсулінотропну активність при концентрації, як мінімум,  $10^{-10}$ M.

Особливий інтерес представляють пептиди наведеної далі формули:

(1)  $H_2N-X-CO-R^1$ ,

де  $R^1$  - OH, OM або  $-NR^2R^3$ ;

M - фармацевтично прийнятний катіон або нижча розгалужена або нерозгалужена алкільна група;

$R^2$  та  $R^3$  є однаковими або різними і їх вибирають з групи, до складу якої входять водень та нижча розгалужена або нерозгалужена алкільна група;

X - пептид, який включає послідовність:

His-Ala-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

$NH_2$  - аміногрупа або аміно-кінцева ділянка X; та CO - карбонільна група карбоксильно-кінцевої ділянки X;

(2) їх солі, одержані доданням кислоти; та

(3) їх захищені або частково захищені похідні; де згадана сполука має інсулінотропну активність, яка перевищує інсулінотропну активність GLP-1(1-36) або GLP-1(1-37).

Інша переважна група молекул для застосування у цьому винаході, складається зі сполук, які було заявлено у патенті США №5,512,549, які мають загальну формулу:

R<sup>1</sup>-Ala-Glu-Gly<sup>10</sup>-  
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-  
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Xaa-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-  
Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-R<sup>3</sup>

I  
R<sup>2</sup>

(Послідовність № 4)

та їхніх фармацевтично прийнятних солей, де R<sup>1</sup> може бути 4-імідазопропіоном, 4-імідазоацетилом або 4-імідазо- $\alpha$ , диметил-ацетилом; R<sup>2</sup> може бути C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> нерозгалуженим ацил або відсутнім; R<sup>3</sup> може бути Gly-OH або NH<sub>2</sub>; та Xaa - Lys або Arg.

Більш переважними сполуками Послідовності №4 для застосування у цьому винаході є сполуки, у яких Xaa - Arg та R<sup>2</sup> - C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> нерозгалужений ацил.

Ще більше переважними сполуками Послідовності №4 для застосування у цьому винаході є сполуки, у яких Xaa - Arg, R<sup>2</sup> - C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> нерозгалужений ацил та R<sup>3</sup> - Gly-OH.

Ще найбільше переважними сполуками Послідовності №4 для застосування у цьому винаході є сполуки, у яких Xaa - Arg, R<sup>2</sup> - C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> нерозгалужений ацил, R<sup>3</sup> - Gly-OH та R<sup>1</sup> - 4-імідазопропіоніл.

Найпереважнішою сполукою Послідовності №4 для застосування у цьому винаході є сполука, у якій Xaa - Arg, R<sup>2</sup> - C<sub>8</sub> нерозгалужений ацил, R<sup>3</sup> - Gly-OH та R<sup>1</sup> - 4-імідазопропіоніл.

Більш переважним є застосування у цьому винаході молекули, яку заявлено у патенті США №5,120,712. Така молекула включає пептид, який має наведену далі амінокислотну послідовність:

NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Ala-Glu-Gly<sup>10</sup>-  
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-  
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-  
Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-Gly<sup>37</sup>-OH

(Послідовність № 1)

та похідну згаданого пептиду, де згаданим пептидом може бути фармацевтично прийнятна сіль згаданого пептиду, одержана шляхом додання кислоти; фармацевтично прийнятна карбоксилатна сіль згаданого пептиду; фармацевтично прийнятний нижчий алкіловий ефір згаданого пептиду; або фармацевтично прийнятний амід згаданого пептиду, де згаданим амідом може бути амід, нижчий алкіламід або нижчий диалкіламід.

Застосування аміду GLP-1(7-36) або його фармацевтично прийнятної солі у цьому винаході є найбільш переважним. Згадана амінокислотна послідовність аміду GLP-1(7-36) виглядає таким чином:

NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Ala-Glu-Gly<sup>10</sup>-  
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-  
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-  
Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-NH<sub>2</sub>

(Послідовність № 5)

Застосування Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37) OH або його фармацевтично прийнятної солі у цьому винаході є найбільш переважним. Згадана амінокислотна послідовність Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37) OH виглядає таким чином:

NH<sub>2</sub>-His<sup>7</sup>-Val-Glu-Gly<sup>10</sup>-  
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp<sup>15</sup>-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu<sup>20</sup>-  
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala<sup>25</sup>-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala<sup>30</sup>-  
Trp-Leu-Val-Lys-Gly<sup>35</sup>-Arg-Gly<sup>37</sup>-OH

(Послідовність № 6)

Одержання сполук

Способи одержання активних сполук, які застосовують у цьому винаході, зокрема, GLP-1, аналогу GLP-1 або похідної GLP-1, або будь-якої спорідненої сполуки, у тому числі активного фрагменту, який забезпечує втрату маси у разі периферійного введення, є добре відомі і їх опис наведено у патентах США №5,118,666, 5,120,712 та 5,523,549.

Згадану амінокислотну частину згаданої активної сполуки, яку застосовують у цьому винаході, або її попередника одержують 1) твердофазним хімічним синтезом; 2) очищенням молекул GLP з природних джерел; 3) способами рекомбінантної технології ДНК; або 4) комбінацією згаданих способів.

Твердофазний хімічний синтез поліпептидів є добре відомим у цій галузі і його опис можна знайти у загальних роботах з цієї галузі [наприклад, Дара(Dugas) та Пенні (Penney), 1981; Мерріфілд(Merrifield), 1962; Стюарт(Stewart) та Янг(Young), 1969].

Згадана амінокислотна частина може бути, наприклад, синтезована за твердофазною методикою з застосуванням пептидного синтезатору 430A [компанія PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, Каліфорнія 94404] та синтетичних циклів, які поставляються компанією PE-Applied Biosystems. Біохімічні амінокислоти та інші реактиви є комерційно доступними від компанії PE-Applied Biosystems та інших компаній, які поставляють хімічну продукцію. Вихідні p-метилбензгідриламінові смоли піддають обробці за послідовними біохімічними методами з застосуванням протоколів подвійного сполучення для одержання С-кінцевих карбоксамідів. Для одержання С-кінцевих кислот використовують відповідну поліакриламідну смолу. Asp, Gln та Arg сполучають за допомогою попередньо одержаних гідроксибензотриазолових ефірів. Можуть бути застосованими наведені далі захисні групи бокових ланцюгів:

Arg, Тозил  
Asp, циклогексил  
Glu, циклогексил  
Ser, бензил  
Thr, бензил  
Tyr, 4-бромкарбобензокси

Біохімічне позбавлення захисту може здійснюватись за допомогою трифтороцтової кислоти у метилхлориді. Після завершення згаданого синтезу пептиди можуть позбавлятися захисту та відщеплюватися від згаданої смоли за допомогою безводного фтороводню(HF), до складу якого входить 10% мета-крезолу. Відщеплення захисної групи(груп) бокового ланцюгу та пептиду від згаданої смоли здійснюється при температурі у межах від -5°C до 5°C, за переважним варіантом на льоду, впродовж 60 хвилин. Після видалення фтороводню згадану суміш пептиду/смоли промивають ефіром і одержаний пептид екстрагують за допомогою льодяної оцтової кислоти та ліофілізують.

Для одержання згаданої активної сполуки, яку застосовують у цьому винаході, можна використовувати способи, добре відомі пересічному фахівцю у методах рекомбінантних ДНК. Фактично, методам рекомбінантних ДНК може надаватись перевага завдяки підвищеному виходу. Основними етапами під час рекомбінантного продукування є:

- a) виділення природної послідовності ДНК, яка кодує молекулу GLP-1 за цим винаходом або конструювання синтетичної або напівсинтетичної кодувальної послідовності ДНК для молекули GLP-1;
- b) введення згаданої кодувальної послідовності до вектору експресії таким чином, який є придатним для експресування білків або самостійно, або у формі гібридних білків;
- c) трансформування відповідної еукаріотичної або прокаріотичної клітини-хазяїна за допомогою згаданого вектору експресії;
- d) культивування згаданої трансформованої клітини-хазяїна за умов, які нададуть можливість експресії молекули GLP-1, та
- e) виділення та очищення молекули GLP-1, одержаної рекомбінантними методами.

Як згадувалось перед тим, згадані кодувальні послідовності можуть бути цілком синтетичними або результатом модифікацій до більшої нативної ДНК, яка кодує глюкагон. Послідовність ДНК, яка кодує передпроглюкагон, наведено у роботі Ланда(Lund) та інших, 1982, і її можна використовувати, як вихідний матеріал під час напівсинтетичного продукування згаданих сполук за цим винаходом шляхом зміни нативної послідовності для досягнення необхідних результатів.

Синтетичні гени, наслідком транскрипції або трансляції яких in vitro або in vivo є продукування молекули GLP-1, можуть конструюватись за допомогою методів, добре відомих у цій галузі. Внаслідок природного виродження генетичного коду досвідченим фахівцем може бути сконструйована достатня кількість послідовностей ДНК, усі з яких кодують молекули GLP-1 за цим винаходом.

Методика конструювання синтетичних генів є добре відомою у цій галузі [Браун(Brown) та інші, 1979]. Згадану послідовність ДНК програмують на основі необхідної амінокислотної послідовності за допомогою генетичного коду, який легко підтверджується пересічним фахівцем у галузі біології. Після програмування можна одержувати саму згадану послідовність за допомогою традиційного апарату для синтезування ДНК, наприклад, синтезаторів моделі 380А або 380В [компанія PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, Каліфорнія 94404].

Для експресії згаданої амінокислотної частини сполуки, яку використовують у цьому винаході, послідовність ДНК, одержану методами генної інженерії, вводять до складу будь-якого з численних відповідних векторів експресії на основі рекомбінантної ДНК за допомогою відповідних рестриктаз [Maniatic(Maniatis) та інші, 1989]. Сайти відщеплення рестриктазами вводяться методами генної інженерії до будь-якого кінця ДНК, яка кодує молекулу GLP-1, для полегшення виділення з/інтегрування до векторів ампліфікації та експресії, добре відомих у цій галузі. Конкретні ендонуклеази до застосування будуть визначатись характером відщеплення рестриктаз застосованого батьківського вектору експресії. Сайти рестрикції вибирають для відповідного орієнтування згаданої кодувальної послідовності з контрольними послідовностями, завдяки чому забезпечують відповідне зчитування та експресію згаданого необхідного білку. Згадана кодувальна послідовність повинна бути розміщена таким чином, щоб виявитись у відповідній рамці зчитування зі згаданим промотором та сайтом зв'язування рибосоми згаданого вектору експресії, обидва з яких відіграють функціональну роль у клітині-хазяїні, у якій повинен експресуватись згаданий білок.

Для забезпечення ефективної транскрипції згаданого синтетичного гену, його необхідно функціонально зв'язати з ділянкою промотору-оператора. Таким чином, згадана ділянка промотора-оператора синтетичного гену опиняється з такою ж самою послідовною орієнтацією відносно стартового кодону ATG згаданого синтетичного гену.

Різноманітні вектори експресії, придатні для трансформування прокаріотичних та еукаріотичних клітин, є добре відомими у цій галузі [каталог компанії Promega, 1992; каталог компанії Stratagene, 1992]. Крім того, у патенті США №4,710,473 наведено опис трансформційного вектору на основі кільцевої молекули ДНК, придатного для експресії екзогенних генів у *E. coli* високими рівнями. Ці плазміди є придатними для застосування, як трансформційні вектори, у методах рекомбінантних ДНК та:

- (a) наділяють згадану плазмиду здатністю до автономної реплікації у клітині-хазяїні;
- (b) контролюють автономну реплікацію плазмиди у залежності від температури, при якій зберігаються культури клітини-хазяїна;
- (c) стабілізують зберігання згаданої плазмиди у популяції клітини-хазяїна;
- (d) спрямовують синтез білкового продукту, який свідчить про збереження плазмиди у популяції клітини-хазяїна;
- (e) забезпечують послідовні сайти розпізнавання рестриктаз, специфічних для згаданої плазмиди;
- (f) завершують транскрипцію мРНК.

Згадані кільцеві молекули ДНК є придатними як вектори у методах рекомбінантних ДНК для забезпечення високих рівнів експресії екзогенних генів.

Наступним етапом після завершення конструювання вектору експресії для згаданої амінокислотної частини сполуки, яка використовується у цьому винаході, є введення згаданого вектору до відповідної клітини, тобто конструювання рекомбінантної клітини-хазяїна, придатної для експресії поліпептиду. Способи трансформування клітин за допомогою векторів на основі рекомбінантних ДНК є добре відомими у цій галузі і їх можна знайти у таких загальних довідкових джерелах, як Maniatic(Maniatis) та інші, див. перед тим. Клітини-хазяї можуть конструюватись як з сукаріотичних, так і з прокаріотичних клітин.

Прокаріотичні клітини-хазяї як правило продукують згаданий білок з більшою швидкістю і їх легше культивувати. Білки, експресовані у бактеріальних системах експресії високого рівня, як правило агрегуються до гранул або тілець включення, які вміщують високі рівні надпродукованого білку. Такі білкові агрегати як правило повинні виділяти, розчинятись, денатуруватись та поновно впорядковуватись за допомогою способів, добре відомих у цій галузі [Крюгер(Kreuger) та інші, 1990; патент США №4,923,967]. Одержання аналогів та похідних GLP-1

Зміни до попереднього GLP-1 або амінокислотної послідовності GLP-1 з метою одержання необхідного аналогу GLP-1 або похідної GLP-1, або їх активного фрагменту, здійснюються за допомогою добре відомих способів: хімічної модифікації, ферментативної модифікації або комбінації хімічної та ферментативної модифікацій. Класичні методи розчинної фази та напівсинтетичні методи також можуть бути придатними для одержання молекул GLP-1, які використовують у цьому винаході. Способи одержання молекул GLP-1 за цим винаходом є добре відомими пересічному фахівцю у галузі білкової хімії.

Додання ацильної групи до епсилон-аміногрупи Lys<sup>34</sup> може здійснюватись за допомогою будь-якого з різноманітних методів, відомих у цій галузі [Bioconjugate Chem., 1990; Хашімото(Hashimoto) та інші, 1989].

Наприклад, N-гідрокси-сукцинімідний ефір октанової кислоти може додаватись до згаданого лізил-епсилон-аміну за допомогою суміші 50% ацетонітрилу у боратному буфері. Згаданий пептид може бути ацилованим перед або після додання згаданої імідазольної групи. Більше того у разі, якщо згаданий пептид одержано за допомогою рекомбінантних методів, можливим є здійснення ацилювання перед ферментативним відщепленням. Крім того, згаданий лізин у похідній GLP-1 може бути ацилованим за описом, який наведено у WO 96/29342. Було описано існування та одержання численних захищених, незахищених та частково захищених, природних та штучних, функціональних аналогів та похідних амідів GLP-1(7-36) та молекул GLP-1(7-37) [патенти США №5,120,712; 5,545,618 та 5,118,666; Орсков(Orskov) та інші, 1989; WO 91/11457].

За факультативним варіантом згадані аміно- та карбокси-кінцеві амінокислотні залишки похідних GLP-1 можуть бути захищеними або факультативно захищеною може бути лише одна з кінцевих ділянок. Опис реакцій одержання та видалення згаданих захисних груп наведено у роботах, відомих досвідченим фахівцем у згаданій галузі, у тому числі, [у Protective Groups in Organic Chemistry, 1973; Грін(Green), 1981; Шрьодер(Schroder) та Любке(Lubke), 1965]. До репрезентативних аміно-захисних груп належать, наприклад, форміл, ацетил, ізопропіл, бутоксикарбоніл, фторенілметоксикарбоніл, карбобензилокси і т. ін. До репрезентативних карбокси-захисних груп належать, наприклад, бензиловий ефір, метиловий ефір, етиловий ефір, t-бутиловий ефір, p-нітрофеніловий ефір і т. ін.

Карбокси-кінцеві похідні GLP-1 з нижчим алкіловим ефіром, які використовують у цьому винаході, одержують шляхом реагування необхідного (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) алканолу з необхідним поліпептидом у присутності каталітичної кислоти, наприклад, хлористоводневої кислоти. Відповідні умови для одержання такого алкілового ефіру включають температуру реагування приблизно 50°C та тривалість реакції, яка становить від приблизно 1 години до приблизно 3 годин. Подібним же чином можна одержати алкілефірні похідні Asp та/або Glu залишків.

Одержання карбоксамідної похідної сполуки, яка використовується у цьому винаході, здійснюється, наприклад, за описом, який наведено у Стюарта(Stewart) та інших, 1984.

У цьому винаході може використовуватись фармацевтично прийнятна сольова форма GLP-1, аналогу GLP-1 або похідної GLP-1. Кислотами, які традиційно використовують для одержання солей, які одержують доданням кислот, є неорганічні кислоти, наприклад, хлористоводнева кислота, бромистоводнева кислота, йодистоводнева кислота, сірчана кислота, фосфорна кислота і т. ін., та органічні кислоти, наприклад, p-толуолсульфонова кислота, метансульфонова кислота, щавлева кислота, p-бромфенілсульфонова кислота, вугільна кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, оцтова кислота і т. ін. До прикладів таких солей належать сульфат, піросульфат, бісульфат, сульфат, бісульфат, фосфат, моногідрогенфосфат, дигідрогенфосфат, метафосфат, пірофосфат, хлорид, бромід, йодид, ацетат, пропіонат, деканоат, каприлат, акрилат, форміат, ізобутират, капроат, гептаноат, пропіонат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себацат, фумарат, малеат, бутин-1,4-діоат, гексип-1,6-діоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динітробензоат, гідроксибензоат, метоксибензоат, фталат, сульфонат, ксилосульфонат, фенілацетат, фенілпропіонат, фенілбутират, цитрат, лактат, гамма-гідроксибутират, гліколят, тарtrat, метансульфонат, пропансульфонат, нафталін-1-сульфонат, нафталін-2-сульфонат, манделат і т. ін. До переважних солей, одержаних доданням кислоти, належать солі, які було одержано за допомогою мінеральних кислот, наприклад, хлористоводневої кислоти та бромистоводневої кислоти, і, зокрема, хлористоводневої кислоти.

До солей, які було одержано доданням основи, належать солі, які є похідними неорганічних основ, наприклад гідроксидів, карбонатів, бікарбонатів і т. ін. амонію або лужних або лужноземельних металів. До таких основ, придатних для одержання солей за цим винаходом, належать, таким чином, гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, карбонат калію і т. ін. Особлива перевага надається сольовим формам.

GLP-1, аналог GLP-1 або похідна GLP-1, які використовують у цьому винаході, можуть вводитись до складу лікарської форми з одним або декількома наповнювачами перед застосуванням у цьому винаході. Наприклад, згадана активна сполука, яку використовують у цьому винаході, може утворювати комплексну сполуку з двовалентним катіоном металу за допомогою добре відомих способів. До таких катіонів металів належать, наприклад, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> і т. ін.

Композиції за цим винаходом

За факультативним варіантом згадана активна сполука, яку використовують у цьому винаході, може комбінуватись з фармацевтично прийнятним буфером з регулюванням рН для забезпечення прийнятної стабільності та рівня рН, прийнятного для парентерального введення.

За факультативним варіантом може додаватись один або декілька фармацевтично прийнятних протимікробних засобів. Переважними фармацевтично прийнятними протимікробними засобами є метакрезол та фенол. Для регулювання іонної сили та ізотонічності може додаватись одна або декілька фармацевтично прийнятних солей. Для додаткового регулювання ізотонічності згаданої лікарської форми може додаватись один або декілька наповнювачів. Гліцерин є прикладом наповнювача для регулювання ізотонічності.

Опис рецепторів GLP-1 та шляху передачі сигналу, який ініціюється зв'язуванням ліганду зі згаданим рецептором GLP-1, наведено [у WO 96/25487; Торенса(Thorens), 1992; Торенса та інших, 1993; Відмана(Widmann) та інших, 1994]. Згаданий рецептор GLP-1 є мембранним білком з сімома трансмембранними доменами, які сполучаються з гетеротримерними G-білками, які зв'язують активацію згаданого рецептору внаслідок зв'язування ліганду, з продукуванням внутрішньоклітинних вторинних посередників, зокрема, циклічного аденозинмонофосфату(цАМФ), який, у свою чергу, активізує специфічну протеїнкіназу, цАМФ-залежну протеїнкіназу(протеїнкіназу А, PKA). Цей фермент фосфорилує цілий ряд ключових реакційних елементів, присутніх на промоторній ділянці певних генів. У панкреатичних b-клітин та інших нейроендокринних клітин фосфорилування деяких специфічних білків регульованого секреторного шляху стимулює секрецію пептиду шляхом стимулювання екзоцитозу секреторних гранул.

Відомі різні сполуки, які стимулюють секрецію ендогенного GLP-1. Наприклад, піддання клітин STC-1 впливу певних стимуляторів секреції, наприклад, активатору аденілатциклази, форсколіну, або засобу стимулювання протеїнкінази-C, 12-O-тетрадеканойлфорбол-13-ацетату(ТРА), викликало значне підвищення виділення CLP-1 [Абелло(Abello) та інші, 1994]. Як відомо, до складу згаданої лінії клітин STC-1, яка походить від кишкової пухлини трансгенних мишей, які несуть інсулінстимульовальні онкогени, та клітин STC-1, входять мРНК транскрипти проглюкагона, з якого утворюється GLP-1. Відомо також, що інші



сполуки, наприклад, соматостатин, шлунковий пригнічувальний поліпептид, глюкозозалежний інсулінотропний пептид, бомбезин, пептид, пов'язаний з геном кальцитоніну, гастрин-секретувальний пептид, холінергічні агоністи, b-адренергічний агоніст, ізопротерепол та мускариновий холінергічний агоніст, бетанкол, викликають виділення ендогенного GLP-1 [Плезансі(Plaisancie) та інші, 1994; Орсков(Orskov) та інші, 19886; Брабейкер(Brubaker), 1991; Бахен(Buchan) та інші, 1987].

#### Введення композиції

Введення може здійснюватись будь-яким шляхом, ефективність якого відома пересічному лікарю, за виключенням того, що парентеральне введення безпосередньо до центральної нервової системи не є шляхом, який вказується або заявляється цим винаходом. Перевага надається периферійному парентеральному введенню. Парентеральне введення традиційно розуміється у медичній літературі, як впорскування дозованої форми до організму за допомогою стерильного шприцу або іншого механічного пристрою, наприклад, інфузійного насосу. Для цілей цього винаходу периферійні парентеральні шляхи включають інтравенозні, внутрішньом'язові, підшкірні та інтраперитонеальні шляхи введення. Інтравенозним, внутрішньом'язовим та підшкірним шляхам введення згаданих сполук, які використовуються у цьому винаході, надається більша перевага. Інтравенозним та підшкірним шляхам введення згаданих сполук, які використовуються у цьому винаході, надається ще більша перевага. Для парентерального введення активна сполука, яку використовують у цьому винаході, за переважним варіантом змішується з дистильованою водою з відповідним рН.

Певні сполуки, які використовують у цьому винаході для забезпечення втрати маси, можуть також бути придатними до введення пероральним, ректальним, назальним шляхами або через нижні дихальні шляхи, які є непарентеральними шляхами. Зі згаданих непарентеральних шляхів для введення пептидів, які використовуються у цьому винаході, перевага надається нижнім дихальним шляхам. У патентах США №5,284,656 та 5,364,838 розкривають різноманітні лікарські форми пептидних сполук для введення нижнім дихальним трактом. У публікації WO 96/19197 розкрито аерозольні лікарські форми різних пептидів, придатних для стимулювання абсорбування згаданих сполук, які використовують у цьому винаході, нижнім дихальним трактом. Для введення сполук, які використовують у цьому винаході, перевага надається оральному шляху.

Для контролювання тривалості дії можуть бути застосовані додаткові фармацевтичні методи. Препарати контрольованого виділення можна одержувати шляхом застосування полімерів для абсорбування або утворення комплексних сполук з активною сполукою, яка використовується у цьому винаході. Пролонговане виділення може забезпечуватись шляхом підбору відповідних макромолекул, наприклад, складних полієфірів, поліамінокислот, полівінілпіролідону, етиленвінілацетату, метилцелюлози, карбоксиметилцелюлози або протамінсульфату, та підбором концентрації макромолекул, а також способів включення з метою забезпечення пролонгованого виділення. Іншим можливим способом подовження тривалості дії за допомогою препаратів контрольованого виділення є включення активної сполуки, яка використовується у цьому винаході, до складу частинок полімерного матеріалу, наприклад, складних полієфірів, поліамінокислот, гідрогелей, полі(молочної кислоти) або співполімерів етилену-вінілацетату. За альтернативним варіантом замість включення сполуки до складу згаданих полімерних частинок згадану сполуку, яку використовують у цьому винаході, можна вводити до мікрокапсул, які одержують, наприклад, способами коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, до гідроксиметилцелюлозних або желатинових мікрокапсул, відповідно, або до колоїдних систем доставки лікарського засобу, наприклад, ліпосом, альбумінових мікросфер, мікроемульсій, наночастинок та нанокапсул або ж до макроемульсій. Подібні способи є відомі досвідченим фахівцям у цій галузі і розкриваються, наприклад, у Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980.

#### Доза

Доза GLP-1, аналогу GLP-1 або похідних GLP-1, або активних фрагментів, які забезпечують втрату маси конкретним суб'єктом, буде залежати від ряду факторів, до яких належать стать суб'єкту, маса та вік, першопринци ожиріння, шлях введення та біодоступність, переметування введеної сполуки у тілі, лікарська форма та вміст діючої речовини. У разі періодичного введення необхідно приймати до уваги інтервал між введеннями доз, а також біодоступність введеної сполуки. У разі безперервного введення прийнятна величина дози становить від приблизно 0,25пмоль/кг маси тіла/хвилину до 6пмоль/кг маси тіла/хвилину, за переважним варіантом від приблизно 0,5пмоль/кг/хвилину до приблизно 1,2пмоль/кг/хвилину. Титування дози та швидкості введення сполук, до складу яких входять GLP-1, аналогу GLP-1 або похідні GLP-1, або їх активні фрагменти для досягнення необхідного клінічного результату, тобто, втрати маси, знаходиться у межах можливостей пересічного лікаря.

"Фармацевтично прийнятний" означає придатний для введення людині, тобто такий, що не містить токсичних елементів, небажаних домішок або т. ін. і не перешкоджає дії активних сполук, які входять до його складу.

Зрозуміння цього винаходу буде полегшено посиланням па конкретний приклад, який наведено для ілюстрування, а не для обмеження цього винаходу.

#### Приклад 1

Чотирьом пацієнтам, які страждали на інсулінонезалежний цукровий діабет(NIDDM) (3 чоловіки, 1 жінка; вік: 60,2 ± 1,8 року; вихідний індекс маси тіла: 33,5 + 1,4кг/м<sup>2</sup>; вихідна маса тіла: 97,5 ± 6,5кг; вихідне співвідношення обсягу талії до обсягу стегон: 0,946 + 0,036; вихідний рівень гемоглобіну HbA<sub>1c</sub>: 7,1 ± 0,3%; рівень глюкози у крові під час голодування: 7,2 + 1,1мМ) безперервно підшкірно впродовж чотирьох тижнів вливали амід GLP-1(7-36). Розчини GLP-1 одержували шляхом змішування 100нмоль амиду GLP-1(7-36) та 0,025мл розчину альбуміну людини(20%) з подальшим доведенням рН до рівня 4 за допомогою 5 молярної

оцтової кислоти та з кінцевим доведенням об'єму до 1мл за допомогою нормального фізрозчину. Одержаний розчин вводили зі швидкістю введення GLP-1 у дозі 1,2пмоль/кг/хвилину. Об'ємна швидкість подачі насосу Minimed(компанія Minimed Europe, Париж), який було використано для введення згаданого розчину GLP-1, дорівнювала 0,05 - 0,07мл/годину. Ділянкою підшкірного введення була черевна порожнина.

Наслідки згаданого лікування за допомогою GLP-1 порівнювали з наслідками, які було одержано після двотижневої інтенсивної інсулінотерапії перед та після згаданого вливання GLP-1. Впродовж періодів інсуліпотерапії, інсулін вводили підшкірно перед кожним прийняттям їжі(див. Таблицю 1). Під час згаданого вливання GLP-1 інсулін не вводили. Під час періодів інсулінотерапії, а також у періоди лікування за допомогою GLP-1, згадані пацієнти притримувались стандартного діабетичного раціону, який включав, на калорійній основі, приблизно, 55% вуглеводів, 30% жиру та 15% білку. Фізичні навантаження були відсутні. Згаданих пацієнтів не було госпіталізовано і впродовж усього періоду лікування вони залишались амбулаторними пацієнтами.

Впродовж лікування за допомогою GLP-1 чотири пацієнти втратили у середньому  $3,5 \pm 1,2$ кг маси тіла, у той час як впродовж перших двох тижню інтенсивної інсулінотерапії вони втратили лише  $1,3 \pm 0,6$ кг і фактично набули ваги у середньому впродовж другого двотижневого періоду інтенсивної інсулінотерапії. Усі наведені значення є індивідуальними або середніми  $\pm$  SEM(середня квадратична помилка середнього). Дані для пацієнта MP для другого періоду інсулінотерапії відсутні.

Таблиця 1. Режими інсулінотерапії. Чотири наведені значення представляють кількість інсуліну, яку було введено підшкірно(міжнародні одиниці) кожному пацієнту безпосередньо перед чотирма прийомами їжі впродовж дня. Перший згаданий період інсулінотерапії передував, а другий період інсулінотерапії було здійснено через 4 тижні після лікування за допомогою GLP-1.

Таблиця 1

Пацієнт	Перший період інсулінотерапії(2 тижні)	Другий період інсулінотерапії(2 тижні)
VN	47; 39; 35; 53	21; 20; 28; 26
NW	12; 13; 11; 12	11; 10; 12; 12
HF	11; 10; 12; 56	11- 10; 12; 12
MP	20; 14; 34; 30	

Таблиця 2. Маса та зміна маси пацієнтів. Амід GLP-1(7-36) вводили шляхом безперервного підшкірного вливання впродовж чотирьох тижнів, яким безпосередньо передувала та слідом за якими здійснювалась двотижнева інтенсивна інсулінотерапія.

Таблиця 2

Пацієнт	Початкова	маса пацієнта(кг)			зміна маси(кг)		
		Перший 2-тижневий період інсулінотерапії	Лікування за допомогою GLP-1 впродовж 4 тижнів	Другий 2-тижневий період інсулінотерапії	Перший 2-тижневий період інсулінотерапії	Лікування за допомогою GLP-1 впродовж 4 тижнів	Другий 2-тижневий період інсулінотерапії
VN	101,5	99,0	92,0	95,0	-2,5	-7,0	3,0
NW	113,0	111,0	108,0	108,0	-2,0	-3,0	0,0
HF	94,0	93,5	91,5	91,5	-0,5	-2,0	0,0
MP	82,0	81,9	80,0		-0,1	-1,9	-
	$97,5 \pm 6,5$	$96,4 \pm 6,0$	$92,9 \pm 5,8$	$98,2 \pm 5,0$	$-1,3 \pm 0,6$	$-3,5 \pm 1,2$	$+1,0 \pm 1,0$

Документи, які було наведено як посилання

Документи, які наведено далі, надають інформацію, придатну для практичного втілення цього винаходу; патенти США включено як посилання на документи США.

1. Abello, J., et al., Endocrinol. 134: 2011 - 2017 (1994)
2. American Diabetes Association, Detection and Management of Lipid Disorders in Diabetes, Consensus Statement, Diabetes Care 18: 86 - 93 (1995)
3. American Diabetes Association, Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus, Consensus Statement, Diabetes Care 18: 8 - 15 (1995)
4. Billock, B. P., et al., Endocrinology 137: 2968 - 2978 (1996)
5. Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2 - 12 (1990)
6. Brown, et al. Methods in Enzymology, Academic Press, N. Y., 68: 109 - 151 (1979)
7. Brubaker, P. L. Endocrinol. 128: 3175 - 3182 (1991)
8. Buchan, A. M. J., et al., Gastroenterol. 93: 791 - 800 (1987)
9. Dugas, H. and Penney, C, Bioorganic Chemistry, Springer-Verlag, New York, p. 54 - 92 (1981)
10. Fehmann, H. -C, et al., Endocrinology 130: 159 - 166 (1992)
11. Fehmann, H. -C, et al., Endocr. Rev. 16: 390 - 410 (1995)
12. Green, T. H., "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New York (1981)

13. Gutniak M., et al., *New England J. Med.* 326: 1316 - 1322, (1992)
14. Hashimoto et al., *Pharmaceutical Res.* 6(2): 171 - 176 (1989)
15. Kanse, S. M., et al., *FEBS Lett.* 241 209 - 212 (1988)
16. Krcymann B., et al., *Lancet* 2: 1300 - 1303 (1987)
17. Krcymann, B., et al., *Brain Research* 502: 325 - 331 (1989)
18. Kreuger, et al. in *Protein Folding*, Gierasch and King, eds., pgs 136 - 142, American Association for the Advancement of Science Publication №89-18S, Washington, D. C. (1990)
19. Lund, et al., *Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A.* 79: 345-349 (1982)
20. Maniatis et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N. Y., Vol. 1 - 3 (1989)
21. Mentlein, R., et al., *Eur. J. Biochem.*, 214: 829-835 (1993)
22. Merrifield, J. M., *Chem. Soc.* 85: 2149 (1962)
23. Mojsov, S., et al., *J. Biol. Chem.* 261: 11880 - 11889 (1986)
24. Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research*, 40: 333 - 343 (1992)
25. Morley, J. E., *Endocr. Rev.* 8: 256 - 287 (1987)
26. Nauck, M. A. et al., *J. Clin. Invest.* 91: 301 - 307 (1993)
27. Nilsson, O., et al., *Endocrinol.* 129: 139 - 148 (1991)
28. Oben, J. et al., *J Endocrinol.* 130: 267 - 272 (1991)
29. Orskov, C, et al., *Endocrinol.* 119: 1467 - 1475 (1986)
30. Orskov, C, et al., *J. Biol. Chem.* 264 (22): 12826 - 12829 (1989)
31. Orskov, C, et al., *Diabetologia* 38 (Suppl. 1, Abstract): A39 (1995)
32. Orskov, C, et al. *Diabetes* 45: 832 - 835 (1996)
33. O'Shea, et al., *NeuroReport* 7: 830 - 832 (1996)
34. Plaisancie, P., et al., *Endocrinol.* 135: 2398 - 2403 (1994)
35. The Promega Biological Research Products Catalogue Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711 - 5399 (1992)
36. *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London and New York (1973)
37. *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980)
38. Rowland, N. E., et al., *Nutrition* 12: 626 - 639 (1996)
39. Ruiz-Grande, C, et al., *Peptides* 13: 13 - 16 (1992)
40. Schröder and Lübke, "The Peptides", Vol. I, Academic Press London and New York (1965)
41. Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco p. 24 - 66 (1969)
42. Stewart, J. M., et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company Press, (1984)
43. *The Stratagene Cloning Systems Catalogue* Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037 (1992)
44. Suzuki, S., et al. *Endocrinol.* 125: 3109 - 3114 (1989)
45. Thorens, B., *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 89: 8641 - 8645 (1992)
46. Thorens, B., et al., *Diabetes* 42: 1678 - 1682 (1993)
47. Turton, M. D., et al., *Nature* 379: 69 - 72 (1996)
48. U.S. Patent №4,710,473
49. U.S. Patent №4,923,967
50. U.S. Patent №5,118,666
51. U.S. Patent №5,120,712
52. U.S. Patent №5,284,656
53. U.S. Patent №5,364,838
54. U.S. Patent №5,512,549
55. U.S. Patent №5,523,549
56. U.S. Patent №5,545,618
57. Valverde, I., et al. *Endocrinology* 132: 75 - 79 (1993)
58. Villanueva, M. L., et al., *Diabetologia* 37: 1163 - 1166 (1994)
59. Widmann, C, et al., *Mol. Pharmacol.* 45: 1029 - 1035 (1994)
60. WO 91/11457 (Buckley, D. I., et al., published August 8, 1991)
61. WO 96/19197
62. WO 96/25487 (Thorens, B. et al., published August 22, (1996)
63. WO 96/29342
64. WO 97/31943 (Thim, L. et al., published Septembe 4, (1997)