



## Sloučenina a farmaceutický prostředek

### Oblast techniky

Předložený vynález je zaměřen na peptidové analogy peptidu-1, který je podobný glukagonu, jejich farmakologicky přijatelné soli, způsoby použití takových analogů pro léčení savců a na vhodné farmaceutické prostředky, které tyto analogy obsahují.

### Dosavadní stav techniky

Amid peptidu-1 (7-36), který je podobný glukagonu (GLP-1) (SEQ ID NO: 1) (sekvenční číslo 1), je syntetizován ve střevních L-buňkách pomocí tkáňově specifického posttranslačního zpracování glukagonového prekurzoru preproglukagonu (Varndell, J. M., a kol., J. Histochem Cytochem, 1985:33:1080-6) a je uvolňován do oběhu v rámci odpovědi na potravu. Koncentrace GLP-1 vzrůstá z úrovně v období hladovění, která je přibližně 15 pmol/l, na vrcholnou hladinu po jídle, která je 40 pmol/l. Bylo ukázáno, že pro daný vzrůst plazmatické koncentrace glukózy je zvýšení plazmatického inzulínu přibližně třikrát vyšší, když je glukóza podána orálně, ve srovnání s jejím podáním intravenózním (Kreyman, B. a kol. Lancet 1987:2, 1300-4). Toto zvýšení hladiny uvolňování inzulínu vlivem potravy, známé jako efekt na vnitřní sekreci, je primárně hormonální a GLP-1 je nyní považován za nejsilnější substanci, fyziologicky ovlivňující vnitřní sekreci u člověka. Vedle účinku na inzulín GLP-1 potlačuje vylučování glukagonu, zpožďuje vyprazdňování žaludku (Wettergren A., Dig Dis Sci 1993:38:665-73) a může zvýšit množství periferní glukózy, která je k dispozici (D'Alessio, D. A. a kol., J. Clin Invest 1994:93:2293-6).

V roce 1994 bylo navrženo schéma léčebného účinku GLP-1 po pozorování, že jedna podkožní (s/c) dávka GLP-1 je schopna kompletně normalizovat hladiny glukózy po jídle u pacientů s diabetes mellitus, který není závislý na inzulínu (NIDDM) (Gutniak, M. K., a kol., Diabetes Care 1994:17:1039-44). Mělo se za to, že tento účinek je zprostředkován jak zvýšeným uvolňováním inzulínu, tak snížením vylučování glukagonu. Dále bylo ukázáno, že intravenózní infuze GLP-1 zpožďuje vyprazdňování žaludku u pacientů s NIDDM (Williams, B., a kol., J. Clin Endo Metab 1996:81:327-32).

Na rozdíl od sulfonylureáz, inzulinotropní působení GLP-1 je závislé na koncentraci glukózy v plazmě (Holz, G. G. 4. a kol., Nature 1993:361:362-5). Tedy nepřítomnost uvolňování inzulínu, zprostředkované GLP-1 při nízké koncentraci glukózy v plazmě, chrání proti prudkému nástupu hypoglykémie. Tato kombinace účinků dává GLP-1 jedinečný potenciál léčebných výhod oproti jiným činidlům, nyní běžně používaných pro léčení NIDDM.

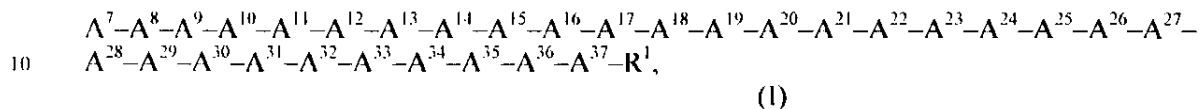
Početné studie ukázaly, že při podání zdravým pacientům GLP-1 silně ovlivňuje úroveň glykémie a rovněž koncentrace inzulínu a glukagonu (Orskov, C, Diabetologia 35:701-711, 1992; Holst, J. J. a kol., Možnosti uplatnění GLP-1 v zvládnutí diabetu v Glukagon III, Příručka experimentální farmakologie, Lefevbre PJ, vyd. Berlín, Springer Verlag, 1996, str. 311 až 326), jejichž účinky jsou závislé na glukóze (Keymann, B., a kol., Lancet ii: 1300-1304, Weir, G. C., a kol., Diabetes 38:338-342, 1989). Dále je také účinný u pacientů s diabetem (Gutniak, M., N. Engl J Med 226:1316-1322, 1992; Nathan, D. M., a kol., Diabetes Care 15:270-276, 1992) tím, že normalizuje hladiny glukózy v krvi u pacientů s diabetem typu 2 (Nauck, M. A. a kol., Diabetologia 36:741-744, 1993) a zlepšuje kontrolu glykémie u pacientů s diabetem typu 1 (Creutzfeld, W. O., a kol., Diabetes care 19:580-586, 1996), což zvyšuje možnost jeho použití jako terapeutického činidla.

Avšak GLP-1 je metabolicky nestabilní, jeho poločas v plazmě ( $t_{1/2}$ ) je *in vivo* pouze 1 až 2 minuty. Aplikovaný GLP-1 je také rychle degradován (Deacon, C. D., a kol., Diabetes 44:1126-1131, 1995). Tato metabolická nestabilita omezuje terapeutický potenciál přirozeného GLP-1.

Existuje tedy potřeba analogů GLP-1, které jsou aktivnější a jsou metabolicky stabilnější než přirozený GLP-1.

## 5 Podstata vynálezu

Vynález se týká sloučeniny obecného vzorce I,



kde

- $\Lambda^7$  je Hppa, což je 3-(p-hydroxyfenyl)propionová kyselina;  
 15  $\Lambda^8$  je Ala, D-Ala, Aib, Acc, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Arg nebo N-Me-Gly;  
 $\Lambda^9$  je Glu, N-Me-Glu, N-Me-Asp nebo Asp;  
 $\Lambda^{10}$  je Gly, Acc, Ala, D-Ala, Phe nebo Aib;  
 $\Lambda^{11}$  je Thr nebo Ser;  
 $\Lambda^{12}$  je Phe, Acc, Aic, Aib, 3-Pal, 4-Pal,  $\beta$ -Nal, Cha, Trp nebo  $X^1$ -Phe;  
 20  $\Lambda^{13}$  je Thr nebo Ser;  
 $\Lambda^{14}$  je Ser, Thr, Ala nebo Aib;  
 $\Lambda^{15}$  je Asp, Ala, D-Asp nebo Glu;  
 $\Lambda^{16}$  je Val, D-Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Abu, Ala, D-Ala, Tba nebo Cha;  
 $\Lambda^{17}$  je Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc nebo Thr;  
 25  $\Lambda^{18}$  je Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc nebo Thr;  
 $\Lambda^{19}$  je Tyr, D-Tyr, Cha, Phe, 3-Pal, 4-Pal, Acc,  $\beta$ -Nal, Amp nebo  $X^1$ -Phe;  
 $\Lambda^{20}$  je Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Val, Phe nebo  $X^1$ -Phe;  
 $\Lambda^{21}$  je Glu, Ala nebo Asp;  
 $\Lambda^{22}$  je Gly, Acc, Ala, D-Ala,  $\beta$ -Ala nebo Aib;  
 30  $\Lambda^{23}$  je Gln, Asp, Ala, D-Ala, Aib, Acc, Asn nebo Glu;  
 $\Lambda^{24}$  je Alab, Aib, Val, Abu, Tle nebo Acc;  
 $\Lambda^{25}$  je Ala, Aib, Val, Abu, Tle, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn, HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-C(O) nebo HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-X<sup>3</sup>)-C(O);  
 35  $\Lambda^{26}$  je Lys, Ala, 3-Pal, 4-Pal, Arg, hArg, Orn, Amp, HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-C(O) nebo HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-X<sup>3</sup>)-C(O);  
 $\Lambda^{27}$  je Glu, Ala, D-Ala nebo Asp;  
 $\Lambda^{28}$  je Phe, Ala, Pal,  $\beta$ -Nal,  $X^1$ -Phe, Aic, Acc, Aib, Cha nebo Trp;  
 $\Lambda^{29}$  je Ile, Acc, Aib, Leu, Nle, Cha, Tle, Val, Abu, Ala, Tba nebo Phe;  
 $\Lambda^{30}$  je Ala, Aib, Acc nebo chybí;  
 40  $\Lambda^{31}$  je Trp,  $\beta$ -Nal, 3-Pal, 4-Pal, Phe, Acc, Aib, Cha, Amp nebo chybí;  
 $\Lambda^{32}$  je Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Phe,  $X^1$ -Phe, Ala nebo chybí;  
 $\Lambda^{33}$  je Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Cha, Ala, Phe, Abu,  $X^1$ -Phe, Tba, Gaba nebo chybí;  
 $\Lambda^{34}$  je Lys, Arg, hArg, Orn, Amp, Gaba, HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-C(O), HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-X<sup>3</sup>)-C(O) nebo chybí;  
 45  $\Lambda^{35}$  je Gly nebo chybí;

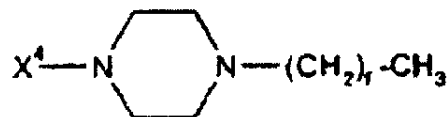
$A^{36}$  je L- nebo D-Arg, D- nebo L-Lys, D- nebo L-hArg, D- nebo L-Orn, Amp, HN-  
CH((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-C(O), HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-X<sup>3</sup>)-C(O) nebo chybí;

$A^{37}$  je Gly nebo chybí;

$X^1$  je pro každý případ nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkyl, OH a halo;

5  $R^1$  je OH, NH<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)alkoxy, nebo NH-X<sup>2</sup>-CH<sub>2</sub>-Z<sup>0</sup>, kde X<sup>2</sup> je (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)uhlovodíkový zbytek  
a Z<sup>0</sup> je H, OH, CO<sub>2</sub>H nebo CONH<sub>2</sub>;

$X^3$  je



10 nebo -C(O)-NHR<sup>12</sup>, kde  $X^4$  je pro každý případ nezávisle -C(O)-, -NH-C(O)- nebo -CH<sub>2</sub>-, a  
kde f je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 29 včetně;

e je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 4;

n je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 5; a

15 každý z R<sup>10</sup> a R<sup>11</sup> je pro každý případ nezávisle H, (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)alkyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)acyl, (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)alkyl-  
sulfonyl, -C((NH)(NH<sub>2</sub>)) nebo



20 za předpokladu, že když R<sup>10</sup> je (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)acyl,



(C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)alkylsulfonyl, -C((NH)(NH<sub>2</sub>)), tak

25 R<sup>11</sup> je H nebo (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)alkyl; a

R<sup>12</sup> je (C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>)alkyl,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

Dále jsou popsány sloučeniny obecného vzorce I,

30  $A^7 - A^8 - A^9 - A^{10} - A^{11} - A^{12} - A^{13} - A^{14} - A^{15} - A^{16} - A^{17} - A^{18} - A^{19} - A^{20} - A^{21} - A^{22} - A^{23} - A^{24} - A^{25} - A^{26} - A^{27} -$   
 $A^{28} - A^{29} - A^{30} - A^{31} - A^{32} - A^{33} - A^{34} - A^{35} - A^{36} - A^{37} - R^1,$

(I)

35 kde

$A^7$  je Ura, Paa, Pta nebo Hppa

$A^8$  je Ala, D-Ala, Aib, Acc, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Arg nebo N-Me-Gly;

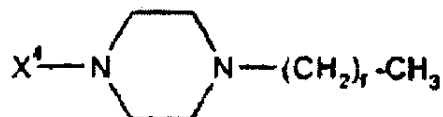
$A^9$  je Glu, N-Me-Glu, N-Me-Asp nebo Asp;

$A^{10}$  je Gly, Acc, Ala, D-Ala, Phe nebo Aib;

40  $A^{11}$  je Thr nebo Ser;

$A^{12}$  je Phe, Acc, Aic, Aib, 3-Pal, 4-Pal, β-Nal, Cha, Trp nebo X<sup>1</sup>-Phe;

- $A^{13}$  je Thr nebo Ser;  
 $A^{14}$  je Ser, Thr, Ala nebo Aib;  
 $A^{15}$  je Asp, Ala, D-Asp nebo Glu;  
 $A^{16}$  je Val, D-Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Abu, Ala, D-Ala, Tba nebo Cha;  
 5  $A^{17}$  je Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc nebo Thr;  
 $A^{18}$  je Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc nebo Thr;  
 $A^{19}$  je Tyr, D-Tyr, Cha, Phe, 3-Pal, 4-Pal, Acc,  $\beta$ -Nal, Amp nebo  $X^1$ -Phe;  
 $A^{20}$  je Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Val, Phe nebo  $X^1$ -Phe;  
 $A^{21}$  je Glu, Ala nebo Asp;  
 10  $A^{22}$  je Gly, Acc, Ala, D-Ala,  $\beta$ -Ala nebo Aib;  
 $A^{23}$  je Gln, Asp, Ala, D-Ala, Aib, Acc, Asn nebo Glu;  
 $A^{24}$  je Alab, Aib, Val, Abu, Tle nebo Acc;  
 $A^{25}$  je Ala, Aib, Val, Abu, Tle, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$   
 nebo  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$ ;  
 15  $A^{26}$  je Lys, Ala, 3-Pal, 4-Pal, Arg, hArg, Orn, Amp,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$  nebo  
 $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$ ;  
 $A^{27}$  je Glu, Ala, D-Ala nebo Asp;  
 $A^{28}$  je Phe, Ala, Pal,  $\beta$ -Nal,  $X^1$ -Phe, Aic, Acc, Aib, Cha nebo Trp;  
 $A^{29}$  je Ile, Acc, Aib, Leu, Nle, Cha, Tle, Val, Abu, Ala, Tba nebo Phe;  
 20  $A^{30}$  je Ala, Aib, Acc nebo chybí;  
 $A^{31}$  je Trp,  $\beta$ -Nal, 3-Pal, 4-Pal, Phe, Acc, Aib, Cha, Amp nebo chybí;  
 $A^{32}$  je Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Phe,  $X^1$ -Phe, Ala nebo chybí;  
 $A^{33}$  je Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Cha, Ala, Phe, Abu,  $X^1$ -Phe, Tba, Gaba nebo chybí;  
 $A^{34}$  je Lys, Arg, hArg, Orn, Amp, Gaba,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$ ,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$  nebo chybí;  
 25  $A^{35}$  je Gly nebo chybí;  
 $A^{36}$  je L- nebo D-Arg, D- nebo L-Lys, D- nebo L-hArg, D- nebo L-Orn, Amp,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$ ,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$  nebo chybí;  
 $A^{37}$  je Gly nebo chybí;  
 30  $X^1$  je pro každý případ nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující  $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alkyl, OH a halo;  
 $R^1$  je OH,  $\text{NH}_2$ ,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkoxy, nebo  $\text{NH-X}^2\text{-CH}_2\text{-Z}^0$ , kde  $X^2$  je  $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$ uhlovodíkový zbytek  
 a  $Z^0$  je H, OH,  $\text{CO}_2\text{H}$  nebo  $\text{CONH}_2$ ;  
 $X^3$  je



35

nebo  $\text{-C(O)-NHR}^{12}$ , kde  $X^4$  je pro každý případ nezávisle  $\text{-C(O)-}$ ,  $\text{-NH-C(O)-}$  nebo  $\text{-CH}_2\text{-}$ , a kde  $f$  je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 29 včetně;

$e$  je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 4;

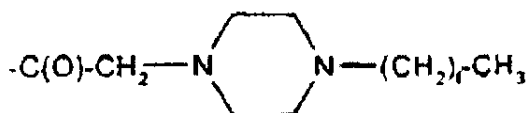
40  $n$  je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 5; a

každý z  $R^{10}$  a  $R^{11}$  je pro každý případ nezávisle H,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkyl,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ acyl,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkyl-sulfonyl,  $\text{-C}((\text{NH})(\text{NH}_2))$  nebo



za předpokladu, že když  $\text{R}^{10}$  je  $(\text{C}_1-\text{C}_{30})$ acyl,

5



$(\text{C}_1-\text{C}_{30})$ alkylsulfonyl,  $-\text{C}((\text{NH})(\text{NH}_2))$ , tak

$\text{R}^{11}$  je H nebo  $(\text{C}_1-\text{C}_{30})$ alkyl; a

10  $\text{R}^{12}$  je  $(\text{C}_1-\text{C}_{30})$ alkyl,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

Výhodná sloučenina, která splňuje podmínky právě uvedeného obecného vzorce I je taková, kde  $\text{A}^{11}$  je Thr;  $\text{A}^{13}$  je Thr;  $\text{A}^{14}$  je Ser, Aib nebo Ala;  $\text{A}^{17}$  je Ser, Ala, Aib nebo D-Ala;  $\text{A}^{18}$  je Ser, Ala, Aib nebo D-Ala;  $\text{A}^{21}$  je Glu nebo Ala;  $\text{A}^{23}$  je Gln, Glu nebo Ala; a  $\text{A}^{27}$  je Glu nebo Ala; nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

15

Výhodná sloučenina, která splňuje podmínky právě uvedeného obecného vzorce I je taková, kde  $\text{A}^9$  je Glu, N-Me-Glu nebo N-Me-Asp;  $\text{A}^{12}$  je Phe, Acc nebo Aic;  $\text{A}^{16}$  je Val, D-Val, Acc, Aib, Ala, Tle nebo D-Ala;  $\text{A}^{19}$  je Tyr, 3-Pal, 4-Pal nebo D-Tyr;  $\text{A}^{20}$  je Leu, Acc, Cha, Ala nebo Tle;  $\text{A}^{24}$  je Ala, Aib nebo Acc;  $\text{A}^{25}$  je Ala, Aib, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn,  $\text{HN}-\text{CH}((\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{R}^{10})-\text{C}(\text{O})$ ;  $\text{A}^{28}$  je Phe nebo Ala;  $\text{A}^{29}$  je Ile, Acc nebo Tle;  $\text{A}^{30}$  je Ala, Aib nebo chybí;  $\text{A}^{31}$  je Pr, Ala, 3-Pal, 4-Pal nebo chybí;  $\text{A}^{32}$  je Leu, Acc, Cha, Ala nebo chybí;  $\text{A}^{33}$  je Val, Acc, Ala, Gaba, Tle nebo chybí; nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

20

Výhodná sloučenina, která splňuje podmínky právě uvedeného obecného vzorce I je taková, kde  $\text{A}^8$  je Ala, D-Ala, Aib, A6c, A5c, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala nebo N-Me-Gly;  $\text{A}^{10}$  je Gly, Ala, D-Ala nebo Phe;  $\text{A}^{12}$  je Phe, A6c nebo A5c;  $\text{A}^{16}$  je Val, Ala, Tle, A6c, A5c nebo D-Val;  $\text{A}^{20}$  je Leu, A6c, A5c, Cha, Ala nebo Tle;  $\text{A}^{22}$  je Gly, Aib,  $\beta$ -Ala, L-Ala nebo D-Ala;  $\text{A}^{24}$  je Ala nebo Aib;  $\text{A}^{29}$  je Leu, A6c, A5c nebo Tle;  $\text{A}^{32}$  je Leu, A6c, A5c, Cha, Ala nebo chybí;  $\text{A}^{33}$  je Val, A6c, A5c, Ala, Gaba, Tle nebo chybí; nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

25

Výhodná sloučenina, která splňuje podmínky právě uvedeného obecného vzorce I je taková, kde  $\text{R}^1$  je OH nebo  $\text{NH}_2$ ; nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

30

Nejvýhodnější sloučeninou obecného vzorce I je  $[\text{Hppa}^7]\text{hGLP}-1(7-36)-\text{NH}_2$  (SEQ ID NO:87); nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

Jinou nejvýhodnější sloučeninou obecného vzorce I je  $[\text{Ura}^7]\text{hGLP}-1(7-36)-\text{NH}_2$  (SEQ ID NO: 125);  $[\text{Paa}^7]\text{hGLP}-1(7-36)-\text{NH}_2$  (SEQ ID NO: 126);  $[\text{Pta}^7]\text{hGLP}-1(7-36)-\text{NH}_2$  (SEQ ID NO: 127); nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

35

V jiném provedení je popsán farmaceutický prostředek, který obsahuje účinné množství sloučeniny obecného vzorce I, která je zde výše definována nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl a farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

40

45

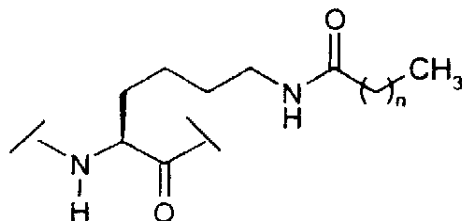
V ještě jiném provedení je popsáno použití sloučeniny vzorce I jak definována výše, nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva pro vyvolání agonistického účinku u receptoru GLP-1 u pacienta, který to vyžaduje.

- 5 V dalším provedení je popsáno použití sloučeniny vzorce I jak definována výše, nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva pro léčení nemoci vybrané ze skupiny obsahující diabetes typu I, diabetes typu II, obezitu, glukagonom, vylučovací potíže u dýchacích cest, metabolické poruchy, artritidu, osteoporózu, nemoc centrálního nervového systému, restenózu, neurodegenerativní nemoc, selhání ledvin, městnavé srdeční selhání, nefrotický syndrom, cirhózu, plicní otok a vysoký tlak u jedince který to vyžaduje, kdy léčba spočívá v tom, že jedinci je podáno účinné množství. Výhodné onemocnění, pro které je léčivo použito, je diabetes typu I nebo diabetes typu II.

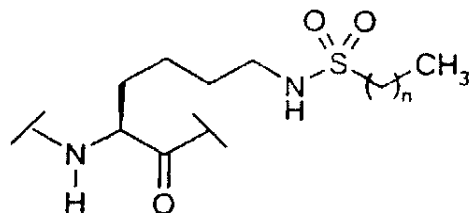
S výjimkou N-koncové aminokyseliny, všechny zkratky (např. Ala) aminokyselin v tomto popisu platí pro strukturu  $-NH-CH(R)-CO-$ , kde R je postranní řetězec aminokyseliny (např.  $CH_3$  nebo Ala). Pro N-koncovou aminokyselinu zkratka zastupuje strukturu  $(R^2R^3)-N-CH(R)-CO-$ , kde R je postranní řetězec aminokyseliny a  $R^2$  a  $R^3$  jsou takové, jak jsou definovány výše, s tou výjimkou, že když  $R^2$  je Ura, Paa, Pta nebo Hppa, tak v tomto případě  $R^2$  a  $R^3$  chybí, protože Ura, Paa, Pta nebo Hppa jsou zde zamýšleny jako des-aminokyseliny. Zkratky:  $\beta$ -Nal, Nle, Cha, Amp, 3-Pal, 4-Pal a Aib jsou zkratky následujících  $\alpha$ -aminokyselin:  $\beta$ -(2-naftyl)alanin, norleucin, cyklohexylalanin, 4-aminofenylalanin,  $\beta$ -(3-pyridinyl)alanin,  $\beta$ -(4-pyridinyl)alanin, respektive kyselina  $\alpha$ -aminoizomáselná. Definice jiných aminokyselin jsou: Ura je kyselina urokanová; Pta je kyselina (4-pyridylthio)octová; Paa je kyselina *trans*-3-(3-pyridyl)akrylová; Tma-His je N,N-tetramethylamidinohistidin; N-Me-Ala je N-methylalanin; N-Me-Gly je N-methylglycin; N-Me-Glu je kyselina N-methylglutamová; Tle je *terc*-butylglycin; Abu je kyselina  $\alpha$ -aminomáselná; Tba je *terc*-butylalanin; Orn je ornitin; Aib je kyselina  $\alpha$ -aminoizomáselná;  $\beta$ -Ala je  $\beta$ -alanin; Gaba je kyselina  $\gamma$ -aminomáselná; Ava je kyselina 5-aminovalerová a Aic je kyselina 2-aminoindan-2-karboxylová, Hppa je 3-(*p*-hydroxyfenyl)propionová kyselina.

30 Zkratka Acc představuje aminokyselinu vybranou ze skupiny zahrnující: 1-amino-1-cyklopropankarboxylovou (A3c); 1-amino-1-cyklobutankarboxylovou (A4c); kyselinu 1-amino-1-cyklopentankarboxylovou (A5c); kyselinu 1-amino-1-cyklohexankarboxylovou (A6c); kyselinu 1-amino-1-cykloheptankarboxylovou (A7c); kyselinu 1-amino-1-cyklooktankarboxylovou (A8c); a kyselinu 1-amino-1-cyklononankarboxylovou (A9c). Ve výše uvedeném vzorci, hydroxyalkyl, hydroxyfenylalkyl a hydroxynaftylalkyl mohou obsahovat 1 až 4 hydroxysubstituenty. COX<sup>5</sup> zastupuje  $-C=O \cdot X^5$ . Příklady  $-C=O \cdot X^5$  zahrnují mimo jiné acetyl a fenylpropionyl.

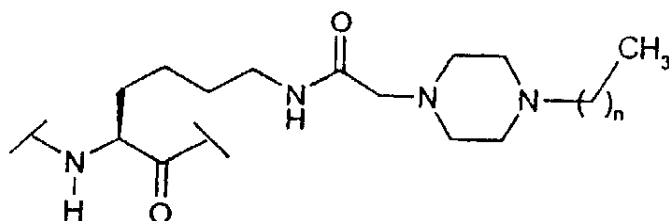
Zkratkou Lys(N<sub>ε</sub>-alkanoyl) je míněna následující obecná struktura:



40 Zkratkou Lys(N<sub>ε</sub>-alkylsulfonyl) je míněna následující obecná struktura:

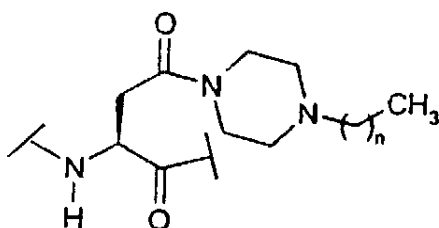


Zkratkou Lys(N<sub>ε</sub>-(2-(4-alkyl-1-piperazin)-acetyl)) je míněna následující obecná struktura:

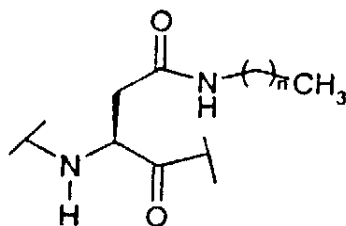


5

Zkratkou Asp(1-(4-alkylpiperazin)) je míněna následující obecná struktura:



10 Zkratkou Asp(1-alkylamino) je míněna následující obecná struktura:



Proměnná n v předchozích uvedených strukturách je v rozmezí 1 až 30.

15

Plné názvy jiných zkratk, které jsou zde použity, jsou následující: Boc pro t-butyloxykarbonyl, HF pro fluorovodík, Fm pro formyl, Xan pro xanthy, Bzl pro benzyl, Tos pro tosyl, DPN pro 2,4-dinitrofenyl, DMF pro dimethylformamid, DCM pro dichlormethan, HBTU pro hexafluorofosfát 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronia, DIEA pro diizopropylethylamin; HOAc pro kyselinu octovou, TFA pro kyselinu trifluoroctovou, 2ClZ pro 2-chlorbenzyloxykarbonyl a OcHex pro O-cyklohexyl.

20

25

Peptid tohoto vynálezu je zde také označován jiným formátem zápisu, např. (A5c<sup>8</sup>)hGLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 130), se substituovanými aminokyselinami z přirozené sekvence, umístěnými v první soustavě závorek (např. A5c<sup>8</sup> pro Ala<sup>8</sup> v hGLP-1). Zkratka GLP-1 znamená glukagonu podobný peptid-1, hGLP-1 znamená lidský glukagonu podobný peptid-1. Čísla umístěná v závorce označují počet aminokyselin přítomných v peptidu (např. hGLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 3) znamená aminokyseliny 7 až 36 ze sekvence peptidu lidského GLP-1). Sekvence hGLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 4) je uvedena v Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Res., 40, 1992, str. 333 až 341. Označení „NH<sub>2</sub>“ v hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1) znamená, že C-konec peptidu je ukončen amidovou skupinou. hGLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 2) znamená, že C-konec je volná aminokyselina.

30

Detailní popis

35

Peptidy tohoto vynálezu mohou být připraveny pomocí standardní syntézy peptidů na pevné fázi. Viz Steward, J. M., a kol., Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co., 2. vyd., 1984).



Pokud  $R^1$  je  $NH-X^2-CH_2-CONH_2$  (tj.  $Z^0 = CONH_2$ ), potom syntéza peptidu začíná pomocí Boc- $NH-X^2-CH_2-COOH$ , která je připojena k MBHA pryskyřici. Pokud  $R^1$  je  $NH-X_2-CH_2-COOH$  (tj.  $Z^0 = COOH$ ), potom syntéza peptidu začíná pomocí Boc- $HN-X_2-CH_2-COOH$ , která je připojena k PAM pryskyřici.

Dále je popsána syntetická metoda pro přípravu peptidu, který je předmětem tohoto vynálezu, která je dobře známa osobám se zkušeností v oboru. Osobám se zkušeností v oboru jsou také známy jiné metody.

Pryskyřice benzhydrylamin-polystyrén (Advanced ChemTech, Inc., Louisville, KY) (0,9 g, 0,3 mmol) ve formě s chloridovými ionty je umístěna do reakční nádoby syntetizátoru peptidů Advanced ChemTech Peptide Synthesizer Model 200, který je naprogramovaný tak, aby prováděl následující reakční cyklus: a) methylenchlorid; b) 33% kyselina trifluoroctová v methylenchloridu (2 kroky po 1 a 15 minutách každý); c) methylenchlorid; d) ethanol; e) methylenchlorid; f) 10% diizopropylethylamin v methylenchloridu.

Neutralizovaná pryskyřice byla míchána s Boc skupinou chráněnou aminokyselinou, která je C-koncovou aminokyselinou požadovaného syntetizovaného peptidu, a diizopropylkarbodiimidem v methylenchloridu (každý 3 mmol) po dobu 1 hodiny a výsledná pryskyřice s aminokyselinou je potom cyklována kroky a) až f) ve výše uvedeném promývacím programu. Jiné aminokyseliny (3 mmol) požadovaného peptidu jsou potom připojovány postupně stejným postupem. Po ukončení syntézy byl peptid odštěpen z pryskyřice tak, že byla smíchána s anisolem (5 ml), dithiothreitem (100 mg) a bezvodým fluorovodíkem (35 ml) při teplotě  $0^\circ C$  a míchání po dobu 45 minut. Přbytek fluorovodíku byl rychle odpařen proudem suchého dusíku a uvolněný peptid byl vysrážen a promyt éterem. Hrubý peptid byl potom rozpuštěn v minimálním objemu zředěné kyseliny octové, nalit na sloupec VYDAC® (2,5x2,5 cm) (kysličník křemičitý s oktaedecylsilanem 10mM) a vymýván lineárním gradientem 20 až 60% acetonitrilu v 0,1% kyselině trifluoroctové ve vodě po dobu asi 1 hodiny. Frakce byly testovány pomocí chromatografie na tenké vrstvě a pomocí analytické HPLC (40 až 70% B při 1%/minutu, roztok B je 80% acetonitril ve vodě, obsahující 0,1% TFA) a spojeny tak, aby bylo dosaženo spíše maximální čistoty než výtěžku. Voda z roztoku byla odstraněna opakovanou lyofilizací a výtěžek byl získán ve formě bílého, načechráného prášku.

Získaný peptid byl analyzován pomocí HPLC. Aminokyselinová analýza kyselého hydrolyzátu získaného peptidu může potvrdit složení peptidu. Pro určení molekulové hmotnosti peptidu je použita metoda laserové desorbce MS.

Chráněná aminokyselina, kyselina 1-(terc-butoxykarbonyl-amino)-1-cyklohexankarboxylová, byla syntetizována následujícím způsobem. 19,1 gramu (0,133 molu) kyseliny 1-amino-1-cyklohexankarboxylové (Acros Organics, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) bylo rozpuštěno ve 200 ml dioxanu a 100 ml vody. K tomu bylo přidáno 67 ml 2N NaOH. Roztok byl ochlazen v lázni vody s ledem. K tomuto roztoku bylo přidáno 32,0 g (0,147 molu) di-terc-butyldikarbonátu. Reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Poté byl za sníženého tlaku odstraněn dioxan. Ke zbývajcímu vodnému roztoku bylo přidáno 200 ml octanu ethylnatého. Směs byla ochlazená v lázni vody s ledem. pH vodné vrstvy bylo upraveno na asi 3 pomocí přidání 4N HCl. Organická vrstva byla oddělena. Vodná vrstva byla extrahována octanem ethylnatým (1x100 ml). Dvě organické vrstvy byly spojeny a promyty vodou (2x150 ml), sušeny nad bezvodým  $MgSO_4$ , filtrovány a za sníženého tlaku koncentrovány do suchého stavu. Výtěžek byl rekrystalován ze směsi octan ethylnatý/hexany. Bylo získáno 9,2 g čistého produktu. Výtěžek byl 29%.

Boc-A5c-OH byla syntetizována analogickým způsobem jako Boc-A6c-OH. Ostatní chráněné Acc aminokyseliny mohou být připraveny analogickým způsobem osobou s běžnou zkušeností v oboru podle popisů, uvedených v předloženém patentu.

Při syntéze peptidů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, a které obsahují A5c, A6c a/nebo Aib, jsou doby potřebné pro připojení těchto zbytků a zbytků, které je bezprostředně následují, 2 hodiny. Pro syntézu [Tma-His<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 117) byly pro reakci s N-koncovou volnou aminoskupinou na komplexu peptid-pryskyřice při poslední spojovací reakci použity HBTU (2 mmol) a DIEA (1,0 ml) v 4 ml DMF, doba připojení je asi 2 hodiny.

Plné názvy zkratk, které jsou zde použity, jsou následující: Boc pro t-butyloxykarbonyl, HF pro fluorovodík, Fm pro formyl, Xan pro xanthyl, Bzl pro benzyl, Tos pro tosyl, DPN pro 2,4-dinitrofenyl, DMF pro dimethylformamid, DCM pro dichlormethan, HBTU pro hexafluorofosfát 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronia, DIEA pro diizopropylethylamin, HOAc pro kyselinu octovou, TFA pro kyselinu trifluoroctovou, 2CIZ pro 2-chlorbenzyloxykarbonyl a OcHex pro O-cyklohexyl.

U sloučeniny, která je předmětem tohoto vynálezu, může být následujícím postupem testována její schopnost vázat se na GLP-1.

#### Buněčná kultura:

Buňky RIN 5F pocházející z krysího inzulinomu (ATCC#CRL-2058, Americká sbírka typových kultur, Manassas, VA), exprimující GLP-1 receptor, byly kultivovány v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca (DMEM), obsahujícím 10 % fetálního telecího séra a udržovány při 37 °C ve vlhké atmosféře o složení 5% CO<sub>2</sub>/95% vzduch.

#### Vazba radioaktivně značeného ligandu

Membrány pro studia vazby radioaktivně značeného ligandu byly připraveny homogenizací buněk RIN ve 20 ml ledového 50mM Tris-HCl pomocí zařízení Brinkman Polytron (Westbury, NY) (nastavení 6, 15 s). Homogenáty byly 2x promyty centrifugací (39 000 g/10 min) a konečné sedimenty byly resuspendovány v 50mM Tris-HCl, obsahujícím 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml bacitracinu (Sigma Chemical, St. Louis, MO) a 0,1% BSA. Pro testování byly alikvoty (0,4 ml) inkubovány s 0,05nM (<sup>125</sup>I)GLP-1(7-36) (~2200 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) buď s anebo bez 0,05 ml neznačených kompetujících testovaných peptidů. Po inkubaci 100 min (25 °C) byl vázaný (<sup>125</sup>I)GLP-1(7-36) oddělen od volného rychlou filtrací přes filtry GF/S (Brandel, Gaithersburg, MD), které byly předem nasáknuty v 0,5% polyethyleniminu. Filtry byly potom 3x promyty 5 ml alikvoty ledového 50mM Tris-HCl a vázaná radioaktivita, zachycená na filtrech, byla změřena spektrometrií gama (Wallac LKB, Gaithersburg, MD). Specifická vazba byla definována jako celkový vázaný (<sup>125</sup>I)GLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 151) mínus ten, který je vázaný v přítomnosti 1000nM GLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 3) (Bachem, Torrence, CA).

Peptidy které jsou předmětem tohoto vynálezu mohou být poskytnuty ve formě farmaceuticky přijatelných solí. Příklady takových solí zahrnují mimo jiné takové, které jsou vytvořeny s organickými kyselinami (např. kyselina octová, kyselina mléčná, kyselina maleinová, kyselina citrónová, kyselina jablečná, kyselina askorbová, kyselina jantarová, kyselina benzoová, kyselina methansulfonová, kyselina toluensulfonová nebo kyselina pamoová), s anorganickými kyselinami (např. kyselina chlorovodíková, kyselina sírová nebo kyselina fosforečná) a s polymerními kyselinami (např. tanin, karboxymethylcelulóza, kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová nebo kopolymery kyselin polymléčná-glykolová). Typický způsob pro přípravu soli peptidu, který je předmětem tohoto vynálezu, je v oboru dobře známý a může být proveden standardními metodami výměny solí. Tedy TFA sůl peptidu, který je předmětem tohoto vynálezu (TFA sůl je výsledkem purifikace peptidu pomocí preparativní HPLC, eluování pomocí pufrů obsahujících TFA) může být převedena na sůl jinou, jako je třeba octan tím, že je peptid rozpuštěn v malém množství vodného roztoku 0,25N kyseliny octové. Výsledný roztok je nanesen na semipreparativní HPLC sloupec (Zorbax, 300 SB, C-8). Sloupec je vymýván (1) roztokem 0,1N octanu amonného ve vodě po dobu 0,5 hodiny, (2) roztokem 0,25N octanu amonného ve vodě po dobu

0,5 hodiny a (3) lineárním gradientem (20% až 100% roztok B po dobu více než 30 minut) při rychlosti průtoku 4 ml/minutu (roztok A je 0,25N kyselina octová ve vodě; roztok B je 0,25N kyselina octová ve směsi acetonitril/voda, 80:20). Frakce obsahující peptid jsou odebrány a vysušeny do suchého stavu pomocí lyofilizace.

5

Jak je dobře známo osobám se zkušeností v oboru, známá a potenciální použití GLP-1 jsou různá a rozmanitá (viz Todd J. F. a kol., *Clinical Science*, 1998, 95, str. 325 až 329; a Todd J. F. a kol., *European Journal of Clinical Investigation*, 1997, 27, str. 533 až 536). Tedy podání sloučenin, které jsou předmětem tohoto vynálezu za účelem vyvolání, může mít tytéž účinky a použití jako samotný GLP-1. Tato různá použití GLP-1 mohou být shrnuta následovně jako léčení: diabetu typu I, diabetu typu II, obezity, glukagonomů, vylučovaných potíží u dýchacích cest, metabolických poruch, artritidy, osteoporózy, nemocí centrálního nervového systému, restenózy, neurodegenerativních nemocí, selhání ledvin, městnavého srdečního selhání, nefrotického syndromu, cirhózy, plicního otoku, vysokého tlaku a poruch s očekávaným snížením příjmu potravy. Analogy, které jsou předmětem tohoto vynálezu, které vyvolávají antagonistický efekt u jedince, mohou být použity pro léčení následujících poruch: hypoglykémie a syndromu špatného vstřebávání, spojeného s chirurgickým odnětím části žaludku a operacemi tenkého střeva.

Předložený vynález tedy ve svém rámci zahrnuje farmaceutické prostředky, které obsahují jako svoji aktivní složku, alespoň jednu ze sloučenin obecného vzorce I ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

Dávka aktivní složky v prostředcích, které jsou předmětem tohoto vynálezu, může být různá; je však nezbytné, aby množství aktivní složky bylo takové, aby bylo dosaženo vhodné dávky. Vybraná dávka závisí na požadovaném léčebném účinku, na způsobu podávání a na době trvání léčby. Obecně účinná dávka pro aktivity, které jsou předmětem tohoto vynálezu, je v rozsahu  $1 \times 10^{-7}$  až 200 mg/kg/den, výhodně  $1 \times 10^{-4}$  až 100 mg/kg/den, která může být podána jako jedna dávka nebo může být rozdělena do mnoha dávek.

Sloučeniny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být podávány orálně, parenterálně (např. intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní nebo podkožní injekcí, nebo pomocí implantátu), nazálně, vaginálně, rektálně, pod jazyk nebo místními způsoby podávání a mohou být připraveny s farmaceuticky přijatelnými nosiči tak, aby poskytly dávkové formy vhodné pro každý způsob podávání.

35

Pevné dávkové formy pro orální podávání zahrnují kapsle, tablety, pilulky, prášky a granule. V takových pevných dávkových formách je aktivní složka smíšena alespoň s jedním inertním farmaceuticky přijatelným nosičem jako je sacharóza, laktóza nebo škrob. Takové dávkové formy mohou také obsahovat, jako v běžné praxi, další sloučeniny, jiné než taková inertní ředidla, např. lubrikační činidla jako je stearan hořečnatý. V případě kapslí, tablet a pilulek mohou dávkové formy také obsahovat pufrční činidla. Tablety a pilulky mohou být dále připraveny s enterickým povlakem.

Tekuté dávkové formy pro orální podávání zahrnují farmaceuticky přijatelné emulze, roztoky, suspenze, sirupy, tinktury obsahující inertní ředidla, obecně v oboru používaná, jako je např. voda. Vedle takových inertních ředidel mohou také prostředky zahrnovat adjuvans, jako jsou zvlhčovací činidla, emulgační a suspenzní činidla a sladidla, činidla dodávající chuť a vůni.

Prostředky pro parenterální podávání, které jsou předmětem tohoto vynálezu, zahrnují sterilní vodné a nevodné roztoky, suspenze nebo emulze. Příklady nevodných rozpouštědel nebo nosičů jsou propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje, jako je olivový olej a kukuřičný olej, želatina a organické estery, které je možno podávat injekčně, jako je ethylester kyseliny olejové. Takové dávkové formy mohou také obsahovat adjuvans, jako jsou konzervační, zvlhčovací, emulgační a disperzní činidla. Mohou být sterilizovány například filtrací přes filtr zachycující bakterie, přidáním sterilizačního činidla do prostředků, ozářením prostředků nebo zahřátím pro-

55

středků. Mohou být také vyrobeny ve formě sterilního pevného prostředku, který může být bezprostředně před použitím rozpuštěn ve sterilní vodě nebo v nějakém jiném sterilním injekčním médiu.

- 5 Prostředky pro rektální nebo vaginální podávání jsou s výhodou čípky, které mohou vedle aktivní složky obsahovat excipienty, jako jsou máslo z koky nebo vosk na čípky.

Prostředky pro nazální podávání nebo pro podávání pod jazyk, jsou také připravovány se standardními excipienty, které jsou v oboru dobře známé.

- 10 Dále může být sloučenina, které je předmětem tohoto vynálezu, podávána pomocí prostředků pro trvalé uvolňování, jako jsou ty, které jsou popsány v následujících patentech a patentových přihláškách. Patent US 5 672 659 popisuje prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo a polyester. Patent US 5 595 760 popisuje prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo v gelové formě. Patentová přihláška US 08/929 363, podaná 9. září 1997, popisuje polymerní prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo a chitosan. Patentová přihláška US 08/740 778, podaná 1. listopadu 1996, popisuje prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo a cykloextrin. Patentová přihláška US 09/015 394, podaná 29. ledna 1998, popisuje absorbovatelné prostředky pro trvalé uvolňování, které obsahují biologicky aktivní činidlo. Patentová přihláška US 09/121 653, podaná 23. července 1998, popisuje způsob přípravy mikročástic, obsahujících terapeutické činidlo jako je peptid, procesem typu olej ve vodě. Patentová přihláška US 09/131 472, podaná 10. srpna 1998, popisuje komplexy obsahující terapeutické činidlo jako je peptid a fosforylovaný polymer. Patentová přihláška US 09/184 412, podaná 2. listopadu 1998, popisuje komplexy obsahující terapeutické činidlo jako je peptid a polymer obsahující nepolymerizovatelný lakton. Obsahy předchozích patentů a patentových přihlášek jsou zde zahrnuty jako odkazy.

- 30 Pokud není definováno jinak, všechny zde používané technické a vědecké termíny mají tentýž význam, jak je obvykle chápán osobami s běžnou zkušeností v oboru, do něhož tento vynález spadá. Také všechny publikace, patentové přihlášky, patenty a ostatní odkazy zde zmíněné, jsou zde zahrnuty jako odkaz.

- 35 Následující příklady popisují syntetické metody pro přípravu peptidů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, tyto metody jsou dobře známy osobám se zkušeností v oboru. Osobám se zkušeností v oboru jsou také známy jiné metody. Příklady jsou poskytnuty pro účely ilustrace a nejsou míněny tak, aby v jakémkoli směru omezovaly rozsah předloženého vynálezu.

#### 40 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: (D-Ala<sup>8</sup>, Ala<sup>17,22,23,27</sup>, 3-Pal<sup>19,31</sup>, Gaba<sup>34</sup>)hGLP-1(7-34)NH<sub>2</sub>

- 45 Prskyřice benzhydylamin-polystyrén (Advanced ChemTech, Inc., Louisville, KY) (0,9 g, 0,3 mmol) ve formě s chloridovými ionty je umístěna do reakční nádoby syntetizátoru peptidů Advanced ChemTech Peptide Synthetizer Model 200, který je naprogramován tak, aby prováděl následující reakční cyklus: a) methylenchlorid; b) 33% kyselina trifluoroctová v methylenchloridu (2 kroky po 1 a 15 minutách každý); c) methylenchlorid; d) ethanol; e) methylenchlorid; f) 10% diizopropylethylamin v methylenchloridu.

- 50 Neutralizovaná prskyřice byla míchána s Boc-Gaba a diizopropylkarbodiimidem v methylenchloridu (každý 3 mmol) po dobu 1 hodiny a výsledná prskyřice s aminokyselinou je potom cyklována kroky a) až f) ve výše uvedeném promývacím programu. Následující aminokyseliny (3 mmol) byly potom připojovány postupně stejným postupem: Boc-Val, Boc-Leu, Boc-3-Pal, 55 Boc-Ala, Boc-Ile, Boc-Phe, Boc-Ala, Boc-Lys(2-Cl-Z), Boc-Ala, Boc-Ala, Boc-Ala, Boc-

Ala, Boc-Glu(Bzl), Boc-Leu, Boc-3-Pal, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Asp(Bzl), Boc-Ser(Bzl), Boc-Thr(Bzl), Boc-Phe, Boc-Thr(Bzl), Boc-Gly, Boc-Glu(Bzl), Boc-D-Ala, Boc-His(Bom).

5 Po ukončení syntézy byl peptid odštěpen z pryskyřice tak, že byla smíchána s anisolem (5 ml), dithiothreitem (100 mg) a bezvodým fluorovodíkem (35 ml) při teplotě 0 °C a míchání po dobu 45 minut. Přebytek fluorovodíku byl rychle odpařen proudem suchého dusíku a uvolněný peptid byl vysrážen a promyt éterem. Hrubý peptid byl potom rozpuštěn v minimálním objemu zředěné kyseliny octové, nalit na sloupec VYDAC<sup>®</sup> (2,5x2,5 cm) (kysličník křemičitý s oktadecylsilanem 10mM) a vymýván lineárním gradientem 20 až 60% acetonitrilu v 0,1% kyselině trifluoroctové ve vodě po dobu asi 1 hodiny. Frakce byly testovány pomocí chromatografie na tenké vrstvě a pomocí analytické HPLC (40 až 70% B při 1%/minutu, vymývací doba 14,1 minuty) a spojeny tak, aby bylo dosaženo spíše maximální čistoty než výtěžku. Voda z roztoku byla odstraněna opakovanou lyofilizací a výtěžek (49,9 mg) byl získán ve formě bílého, načechného prášku.

15 Pomocí HPLC a tlc bylo zjištěno, že produkt je homogenní. Aminokyselinová analýza kyselého hydrolyzátu potvrdila složení peptidu. Laserová desorbce MS určila molekulovou hmotnost 2880 (vypočtená molekulová hmotnost 2873).

#### 20 Příklad 2: Syntéza nižších alkylamidových derivátů peptidů

Peptidy jsou sestavovány na O-benzyl-polystyrenové pryskyřici (často označované jako Merrifieldova pryskyřice) pomocí postupu pro aminokyseliny chráněné skupinou Boc, který je popsán v příkladu 1, s tou výjimkou, že karboxylové skupiny na postranních řetězcích aminokyselin Asp a Glu jsou chráněny skupinou Fm (fluorenylmethylester). Po ukončení syntézy je komplex peptid-pryskyřice suspendován v zředěných roztocích vhodného nižšího alkylamidu (jako jsou ethylamin, propylamin, fenylethylamin, 1,2-diaminoethan, atd.) v DMF a míchány při teplotě 60 °C (po dobu asi 18 hodin), načež po filtraci, odstranění rozpouštědel za sníženého tlaku a rozetření olejovité hmoty odštěpeného peptidu s éterem, byl získán chráněný alkylamidový derivát peptidu v pevné formě. Tento byl potom podroben štěpení HF, aby byly odstraněny další chránicí skupiny na postranních řetězcích a byla provedena purifikace pomocí HPLC, jak bylo popsáno v příkladu 1.

#### 35 Příklad 11

Peptid byl připraven v podstatě podle postupu popsaného v příkladu 1 za použití vhodných chráněných aminokyselin. MS byla získána pomocí laserové desorbce MS (NA znamená, že není dostupné).

40 Příklad 11: [Hppa<sup>7</sup>]hGLP-1(7-35)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 87); MS=NA.

#### 45 Příklad 12

Příklad 12: (Aib<sup>8</sup>,A6c<sup>32</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 114)

Jmenovaný peptid byl syntetizován na syntetizátoru peptidů Applied Biosystems (Foster City, CA) model 430A, který byl modifikován tak, aby prováděl urychlenou syntézu peptidů na pevné fázi za použití Boc-chemikálií. Viz Schnolzer a kol., Int. J. Peptide Protein Res., 40:180 (1992). Byla použita pryskyřice MBHA (4-methylbenzhydrolamin) (Peninsula, Belmont, CA) se substitucí 0,91 mmol/g. Byly použity Boc aminokyseliny (Bachem, CA, Torrance, CA; Nova Biochem., LaJolla, CA) s následující ochranou postranního řetězce: Boc-Ala-OH, Boc-Arg(TOS)-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, Boc-His(DNP)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Lys(2CiZ)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-A6c-OH, Ser(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH

a Boc-Trp(Fm)-OH. Syntéza byla provedena v množství 0,20 mmol. Skupiny Boc byly odstraněny působením 100% TFA po dobu 2x1 minutu. Boc aminokyseliny (2,5 mmol) byly předem aktivovány pomocí HBTU (2,0 mmol) a DIEA (1,0 ml) v 4 ml DMF a byly připojeny bez předchozí neutralizace ke komplexu peptid-pryskyřice ve formě TFA soli. Doby připojení byly asi 5 minut s výjimkou zbytků Boc-Aib-OH a Boc-A6c-OH a zbytků následujících, Boc-Trp(Fm)-OH a Boc-His(DNP)-OH, kde doby připojení byly asi 2 hodiny.

Po ukončení syntézy peptidového řetězce bylo na pryskyřici působeno roztokem 20% merkaptoethanol/10% DIEA v DMF po dobu 2x30 minut, aby došlo k odstranění DNP skupiny na postranním řetězci His. N-koncová Boc skupina byla potom odstraněna působením 100% TFA po dobu 2x2 minuty. Po neutralizaci komplexu peptid-pryskyřice pomocí 10% DIEA v DMF (1x1 minuta), byla formylová skupina na postranním řetězci. Trp odstraněna působením roztoku 15% ethanolamin/15% voda/70% DMF po dobu 2x30 minut. Komplex peptid-pryskyřice s částečně odstraněnými chránicími skupinami byl promyt DMF a DCM a sušen za sníženého tlaku. Konečné štěpení bylo provedeno mícháním komplexu peptid-pryskyřice v 10 ml HF obsahující anisol a dithiothreitol (24 mg) při teplotě 0 °C po dobu 75 minut. HF byl odstraněn proudem dusíku. Výtěžek byl promyt éterem (6x10 ml) a extrahován 4N HOAc (6x10 ml).

Směs peptidu ve vodném extraktu byl purifikován pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) v reverzní fázi za pomoci sloupce VYDAC® C<sub>18</sub> pro reverzní fázi (Nest Group, Southborough, MA). Sloupec byl vymýván lineárním gradientem (20 až 50% roztok B po dobu 105 minut) při rychlosti průtoku 10 ml/minutu (roztok A = voda obsahující 0,1% TFA; roztok B = acetonitril obsahující 0,1% TFA). Odebírané frakce byly testovány pomocí analytické HPLC. Ty frakce, které obsahovaly čistý produkt byly spojeny a lyofilizovány do suchého stavu. Na základě analytické HPLC byla čistota >99%. Analýzou pomocí hmotové spektrometrie byla určena molekulová hmotnost 3324,2 (vypočtená molekulová hmotnost je 3323,7).

Syntéza jiných sloučenin, které jsou předmětem tohoto vynálezu, může být provedena stejným způsobem, jaký je popsán pro syntézu (Aib<sup>8</sup>, A6c<sup>32</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 114) v příkladu 12, avšak za použití vhodných chráněných aminokyselin v závislosti na požadovaném peptidu.

[(N<sup>α</sup>-HEPES-His)<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 152) {HEPES je kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová)} může být syntetizován následujícím způsobem: po sestavení dlouhého řetězce peptidu na MBHA pryskyřici (0,20 mmol), je na komplex peptid-pryskyřice působeno 100% TFA (2x2 minuty) a promyt DMF a DCM. Pryskyřice je potom neutralizována 10% DIEA v DMF po dobu 2 minut. Po promytí DMF a DCM je na pryskyřici působeno 0,23 mmol 2-chlor-1-ethansulfonylchloridem a 0,7 mmol DIEA a DMF po dobu asi 1 hodiny. Pryskyřice je promyta DMF a DCM a je na ni působeno 1,2 mmol 2-hydroxyethylpiperazinem po dobu 2 hodin. Pryskyřice je promyta DMF a DCM a je na ni působeno různými reagenty ((1) 20% merkaptoethanol/ 10% DIEA v DMF a (2) 15% ethanolamin/15% voda 70% DMF), aby došlo k odstranění DNP skupin z postranního řetězce His a formylové skupiny z postranního řetězce Trp, jak bylo popsáno výše, to vše před konečným štěpením peptidu z pryskyřice pomocí HF.

[(N<sup>α</sup>-HEPA-His)<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 153) ([4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazacetyl-His<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>) může být připraven v podstatě podle postupu popsaného bezprostředně výše pro přípravu [(N<sup>α</sup>-HEPES-His)<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 152) s tou výjimkou, že na místo 2-chlor-1-ethansulfonylchloridu je použit anhydrid kyseliny 2-bromoctové.

## PPříklady 13 až 15

Byly připraveny v podstatě podle příkladu 12, pouze s použitím vhodných chráněných aminokyselin.

5

Příklad 13: [Ura<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 125); MS=3279,5; Vypočtená molekulová hmotnost = 3280,7.

10

Příklad 14: [Paa<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 126); MS=3290,9; Vypočtená molekulová hmotnost = 3291,8.

15

Příklad 15: [Pta<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 127); MS=3311,2; Vypočtená molekulová hmotnost = 3311,8.

20

Příklad 16: [Aib<sup>8</sup>,A5c<sup>32</sup>, Lys<sup>36</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl)]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 155)

25

Použité Boc aminokyseliny jsou tytéž jako aminokyseliny, které jsou použity při syntéze [Aib<sup>8</sup>,A6c<sup>32</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 114) (příklad 12) s tou výjimkou, že pro zbytek Lys<sup>36</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl) je zde použita Fmoc-Lys(Boc)-OH. První aminokyselinový zbytek je k pryskyřici připojen manuálně na třepače 2,5 mmol Fmoc-Lys(Boc)-OH je rozpuštěno ve 4 ml 0,5N HBTU v DMF. K roztoku je přidán 1 ml DIEA. Směs je třepána asi 2 minuty. Potom je k roztoku přidáno 0,2 mmol MBHA pryskyřice (substituční = 0,91 mmol/g). Směs je třepána po dobu 1 hodiny. Pryskyřice je promyta DMF a je na ni působeno 100% TFA po dobu 2x2 minuty, aby došlo k odstranění chránících skupin Boc. Pryskyřice je promyta DMF. Kyselina myristylová (2,5 mmol) je předem aktivována s HBTU (2,0 mmol) a DIEA (1,0 ml) ve 4 ml DMF po dobu 2 minut a je připojena ke komplexu Fmoc-Lys-pryskyřice. Doba použitá pro připojení je 1 hodina. Pryskyřice je promyta DMF a je na ni působeno 25% piperidinem v DMF po dobu 2x20 minut, aby došlo k odstranění chránící skupiny Fmoc. Pryskyřice je promyta DMF a přenesena do reakční nádoby syntetizátoru peptidů. Zbytek syntetického a purifikačního postupu u peptidu jsou tytéž jako při syntéze [Aib<sup>8</sup>,A6c<sup>32</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 114).

35

Syntézy jiných sloučenin obsahujících zbytek Lys(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl) jsou provedeny analogickým způsobem, jaký je popsán pro syntézu [Aib<sup>8</sup>,A6c<sup>32</sup>,Lys<sup>36</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl)]hGLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 155). V peptidu je pro zbytek Lys(N<sup>ε</sup>-alkanoyl) použita aminokyselina Fmoc-Lys(Boc)-OH, zatímco pro zbytek Lys je použita aminokyselina Lys(2ClZ)-OH. Pokud zbytek Lys(N<sup>ε</sup>-alkanoyl) není na C-konci, je fragment peptidu, nacházející se bezprostředně před zbytkem Lys(N<sup>ε</sup>-alkanoyl) sestaven napřed na pryskyřici syntetizátoru peptidů.

40

Příklad 17: [Aib<sup>8</sup>, Arg<sup>26,34</sup>,A6c<sup>32</sup>, Lys<sup>36</sup>((N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl))]hGLP-1(7-36)-OH (SEQ ID NO: 161)

45

Použité Boc aminokyseliny jsou tytéž jako aminokyseliny, které jsou použity při syntéze [Aib<sup>8</sup>, A6c<sup>32</sup>, Lys<sup>36</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl)]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 162) (příklad 16). Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,5 mmol) je předem aktivována s HBTU (2,0 mmol), HOBt (2,0 mmol) a DIEA (2,5 ml) v DMF (4 ml) po dobu 2 minut. Tato aminokyselina je ručně na třepače připojena k 235 mg PAM pryskyřice (Chem-Impex, Wood Dale, IL; substituční = 0,85 mmol/g). Doba použitá pro připojení je asi 8 hodin. Zbytek syntetického a purifikačního postupu při přípravě peptidu jsou tytéž jako jsou popsány v příkladu 12.

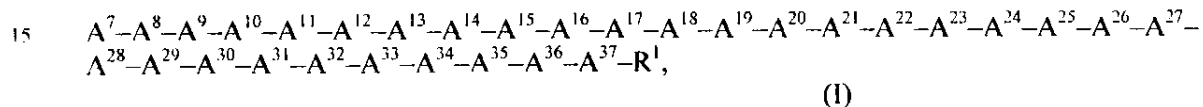
50

Syntézy jiných analogů hGLP-1(7-36)-OH (SEQ ID NO: 3) a hGLP-1(7-37)-OH (SEQ ID NO: 4), které obsahující zbytek Lys(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl) jsou provedeny analogickým způsobem, jaký je popsán pro syntézu [Aib<sup>8</sup>, Arg<sup>26,34</sup>, A6c<sup>32</sup>, Lys<sup>36</sup>(N<sup>ε</sup>-tetradekanoyl)]hGLP-1(7-36)-OH (SEQ ID NO: 161). V peptidu je pro zbytek Lys(N<sup>ε</sup>-alkanoyl) použita aminokyselina Fmoc-Lys(Boc)-OH, zatímco pro zbytek Lys je použita aminokyselina Lys(2CIz)-OH.

10

## PATENTOVÉ NÁROKY

## 1. Sloučenina obecného vzorce I,



kde

20 A<sup>7</sup> je Hppa,A<sup>8</sup> je Ala, D-Ala, Aib, Acc, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala, Arg nebo N-Me-Gly;A<sup>9</sup> je Glu, N-Me-Glu, N-Me-Asp nebo Asp;A<sup>10</sup> je Gly, Acc, Ala, D-Ala, Phe nebo Aib;A<sup>11</sup> je Thr nebo Ser;25 A<sup>12</sup> je Phe, Acc, Aic, Aib, 3-Pal, 4-Pal, β-Nal, Cha, Trp nebo X<sup>1</sup>-Phe;A<sup>13</sup> je Thr nebo Ser;A<sup>14</sup> je Ser, Thr, Ala nebo Aib;A<sup>15</sup> je Asp, Ala, D-Asp nebo Glu;A<sup>16</sup> je Val, D-Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Abu, Ala, D-Ala, Tba nebo Cha;30 A<sup>17</sup> je Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc nebo Thr;A<sup>18</sup> je Ser, Ala, D-Ala, Aib, Acc nebo Thr;A<sup>19</sup> je Tyr, D-Tyr, Cha, Phe, 3-Pal, 4-Pal, Acc, β-Nal, Amp nebo X<sup>1</sup>-Phe;A<sup>20</sup> je Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Val, Phe nebo X<sup>1</sup>-Phe;A<sup>21</sup> je Glu, Ala nebo Asp;35 A<sup>22</sup> je Gly, Acc, Ala, D-Ala, β-Ala nebo Aib;A<sup>23</sup> je Gln, Asp, Ala, D-Ala, Aib, Acc, Asn nebo Glu;A<sup>24</sup> je Ala, Aib, Val, Abu, Tle nebo Acc;A<sup>25</sup> je Ala, Aib, Val, Abu, Tle, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn, HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-C(O) nebo HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-X<sup>3</sup>)-C(O);40 A<sup>26</sup> je Lys, Ala, 3-Pal, 4-Pal, Arg, hArg, Orn, Amp, HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-C(O) nebo HN-CH((CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-X<sup>3</sup>)-C(O);A<sup>27</sup> je Glu, Ala, D-Ala nebo Asp;A<sup>28</sup> je Phe, Ala, Pal, β-Nal, X<sup>1</sup>-Phe, Aic, Acc, Aib, Cha nebo Trp;A<sup>29</sup> je Ile, Acc, Aib, Leu, Nle, Cha, Tle, Val, Abu, Ala, Tba nebo Phe;45 A<sup>30</sup> je Ala, Aib, Acc nebo chybí;A<sup>31</sup> je Trp, β-Nal, 3-Pal, 4-Pal, Phe, Acc, Aib, Cha, Amp nebo chybí;



$A^{32}$  je Leu, Ala, Acc, Aib, Nle, Ile, Cha, Tle, Phe,  $X^1$ -Phe, Ala nebo chybí;

$A^{33}$  je Val, Acc, Aib, Leu, Ile, Tle, Nle, Cha, Ala, Phe, Abu,  $X^1$ -Phe, Tba, Gaba nebo chybí;

$A^{34}$  je Lys, Arg, hArg, Orn, Amp, Gaba,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$ ,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$  nebo chybí;

5  $A^{35}$  je Gly nebo chybí;

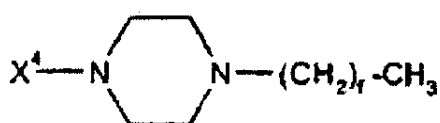
$A^{36}$  je L- nebo D-Arg, D- nebo L-Lys, D- nebo L-hArg, D- nebo L-Orn, Amp,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NR}^{10}\text{R}^{11})\text{-C(O)}$ ,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_e\text{-X}^3)\text{-C(O)}$  nebo chybí;

$A^{37}$  je Gly nebo chybí;

$X^1$  je pro každý případ nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující  $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alkyl, OH a halo;

10  $R^1$  je OH,  $\text{NH}_2$ ,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkoxy, nebo  $\text{NH-X}^2\text{-CH}_2\text{-Z}^0$ , kde  $X^2$  je  $(\text{C}_1\text{-C}_{12})$  uhlíkový zbytek a  $Z^0$  je H, OH,  $\text{CO}_2\text{H}$  nebo  $\text{CONH}_2$ ;

$X^3$  je



15

nebo  $\text{-C(O)-NHR}^{12}$ , kde  $X^4$  je pro každý případ nezávisle  $\text{-C(O)-}$ ,  $\text{-NH-C(O)-}$  nebo  $\text{-CH}_2\text{-}$ , a kde  $f$  je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 29 včetně;

$e$  je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 4;

$n$  je pro každý případ nezávisle celé číslo v rozmezí 1 až 5; a

20 každý z  $R^{10}$  a  $R^{11}$  je pro každý případ nezávisle H,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkyl,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ acyl,  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkylsulfonyl,  $\text{-C}((\text{NH})(\text{NH}_2))$  nebo



25 za předpokladu, že když  $R^{10}$  je  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ acyl,



$(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkylsulfonyl,  $\text{-C}((\text{NH})(\text{NH}_2))$ , tak

30  $R^{11}$  je H nebo  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkyl; a

$R^{12}$  je  $(\text{C}_1\text{-C}_{30})$ alkyl,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

35 **2.** Sloučenina podle nároku 1, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde  $A^{11}$  je Thr;  $A^{13}$  je Thr;  $A^{14}$  je Ser, Aib nebo Ala;  $A^{17}$  je Ser, Ala, Aib nebo D-Ala;  $A^{18}$  je Ser, Ala, Aib nebo D-Ala;  $A^{21}$  je Glu nebo Ala;  $A^{23}$  je Gln, Glu nebo Ala; a  $A^{27}$  je Glu nebo Ala.

40 **3.** Sloučenina podle nároku 2, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde  $A^9$  je Glu, N-Me-Glu nebo N-Me-Asp;  $A^{12}$  je Phe, Acc nebo Aic;  $A^{16}$  je Val, D-Val, Acc, Aib, Ala, Tle nebo D-Ala;  $A^{19}$  je Tyr, 3-Pal, 4-Pal nebo D-Tyr;  $A^{20}$  je Leu, Acc, Cha, Ala nebo Tle;  $A^{24}$  je Ala, Aib nebo Acc;  $A^{25}$  je Ala, Aib, Acc, Lys, Arg, hArg, Orn,  $\text{HN-CH}((\text{CH}_2)_n\text{-NH-R}^{10})\text{-C(O)}$ ;  $A^{28}$  je Phe

nebo Ala; A<sup>29</sup> je Ile, Acc nebo Tle; A<sup>30</sup> je Ala, Aib nebo chybí; A<sup>31</sup> je Trp, Ala, 3-Pal, 4-Pal nebo chybí; A<sup>32</sup> je Leu, Acc, Cha, Ala nebo chybí; A<sup>33</sup> je Val, Acc, Ala, Gaba, Tle nebo chybí.

- 5 4. Sloučenina podle nároku 3, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde A<sup>8</sup> je Ala, D-Ala, Aib, A6c, A5c, N-Me-Ala, N-Me-D-Ala nebo N-Me-Gly; A<sup>10</sup> je Gly, Ala, D-Ala nebo Phe; A<sup>12</sup> je Phe, A6c nebo A5c; A<sup>16</sup> je Val, Ala, Tle, A6c, A5c nebo D-Val; A<sup>20</sup> je Leu, A6c, A5c, Cha, Ala nebo Tle; A<sup>22</sup> je Gly, Aib, β-Ala, L-Ala nebo D-Ala; A<sup>24</sup> je Ala nebo Aib; A<sup>29</sup> je Ile, A6c, A5c nebo Tle; A<sup>32</sup> je Leu, A6c, A5c, Cha, Ala nebo chybí; A<sup>33</sup> je Val, A6c, A5c, Ala, Gaba, Tle nebo chybí.
- 10 5. Sloučenina podle nároku 4, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde R<sup>1</sup> je OH nebo NH<sub>2</sub>.
- 15 6. Sloučenina podle nároku 1, kterou je [Hppa<sup>7</sup>]hGLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 87); nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.
- 20 7. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje účinné množství sloučeniny podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelné soli a farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředící látku.
- 25 8. Použití sloučeniny podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva pro vyvolání agonistického účinku receptoru GLP-1 u jedince, který to vyžaduje.
- 30 9. Použití sloučeniny podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva pro léčení nemoci vybrané ze skupiny zahrnující diabetes typu I, diabetes typu II, obezitu, glukagonom, vylučovací potíže u dýchacích cest, metabolické potíže, artritidu, osteoporózu, nemoci centrálního nervového systému, restenózu, neurodegenerativní nemoci, selhání ledvin, městnavé srdeční selhání, nefrotický syndrom, cirhózu, plicní otok a vysoký tlak u jedince, který to vyžaduje.
- 35 10. Použití podle nároku 9, kdy nemocí je diabetes typu I nebo diabetes typu II.

---

Konec dokumentu

---