

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 1651

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.11.1997**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.11.1996 30.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/030213 1997/961405**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/20114**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/19698**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/26

C 07 K 14/605

A 61 P 3/04

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY,
Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Dimarchi Richard D., Carmel, IN, US;
Efendic Suad, Lidingo, SE;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Léčivo k redukci tělesné hmotnosti nebo
obezity**

(57) Anotace:

Předmětem tohoto řešení je použití prostředku obsahujícího glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti nebo k léčbě obezity. Prostředek obzvláště obsahuje sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující GLP-1, deriváty GLP-1, agonisty receptoru pro GLP-1, agonisty signální přenosové kaskády pro GLP-1, sloučeniny, které stimulují syntezu endogenního GLP-1, sloučeniny, které stimulují uvolňování endogenního GLP-1, nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

Léčivo k redukci tělesné hmotnosti nebo obezity

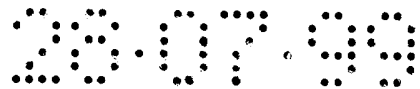
Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká použití prostředku obsahujícího glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti nebo k léčbě obezity.

Dosavadní stav techniky

Obezita, a zejména obezita horní části těla, je nejběžnějším nutričním onemocněním v nadměrně vyživované světové populaci. Mnoho studií ukázalo, že snížení tělesné hmotnosti významně snižuje riziko chronických onemocnění, jako je diabetes mellitus, hypertenze, hyperlipidemie, onemocnění koronárních cév a muskuloskeletální nemoci. Například, některá měření obezity, včetně prosté tělesné hmotnosti, poměrů obvod pasu/obvod boků a měření zásob mesenterického tuku, silně korelují s rizikovými faktory pro diabetes mellitus nezávislý na inzulinu (NIDDM), který je též znám jako diabetes II typu. Podle American Diabetes Association (1995) má přibližně 80 % pacientů s NIDDM nadměrnou hmotnost. Redukce tělesné hmotnosti je konkrétním cílem léčby mnoha chronických onemocnění, včetně NIDDM.

Současné metody pro snížení tělesné hmotnosti nejsou zcela uspokojivé. Někteří obézní pacienti mohou snížit svou hmotnost změnou chování, jako je změna diety a zvýšení tělesné aktivity. Selhání ve snížení tělesné hmotnosti při použití těchto metod může být způsobeno genetickými faktory, které způsobují zvýšenou chuť k jídlu, upřednostňováním potravin s vysokým obsahem tuků



nebo tendencí k lipogennímu metabolismu. Naneštěstí je vypočítaných 33 miliard dolarů ročně utracených na snížení tělesné hmotnosti vynaloženo marně. Proto existuje naléhavá potřeba nových způsobů a přípravků jako jsou farmaceutické prostředky, navozující snížení tělesné hmotnosti, pro doplnění stávajících přístupů.

Je známo, že glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1) má zásadní úlohu při regulaci fyziologické odpovědi na potravu. GLP-1 je vyráběn z proglukagonu a je uvolňován do krve z endokrinních L-buněk, které jsou lokalizované zejména v distálním tenkém střevu a tlustém střevu, v odpovědi na příjem potravy (Nilsson et al., 1991; Krcymann et al., 1987; Mojsov et al., 1986). GLP-1 působí přes povrchový buněčný receptor spojený s G proteinem (GLP-1R) a zvyšuje živinami indukovanou syntezu inzulínu (Fehmann et al., 1992) a jeho uvolňování (Fehmann et al., 1995). GLP-1 stimuluje sekreci inzulínu (inzulinotropní účinek) a tvorbu cAMP (Mojsov et al., 1992). GLP-1(7-36)amid stimuluje uvolňování inzulínu, snižuje sekreci glukagonu a inhibuje žludeční sekreci a vyprazdňování (nauck, 1993; Gutniak et al., 1992). Tyto gastrointestinální účinky GLP-1 nejsou pozorovány u vagotomizovaných subjektů, což ukazuje na centrálně zprostředkované účinky (Orskov et al., 1995). GLP-1 se váže s vysokou afinitou na izolované krysí adipocyty a aktivuje produkci cAMP (Valverde et al., 1993) a stimuluje lipogenesu (Oben et al., 1991) nebo lipolýzu (Ruiz-Grande et al., 1992). GLP-1 stimuluje syntezu glykogenu, oxidaci glukosy a tvorbu laktátu v kosterním svalu krys (Villanueva et al., 1994).

mRNA kodující pankreatický typ GLP-1 receptoru je nacházena v relativně vysokých množstvích v ostrůvkách krysí slinivky břišní, plicích, hypothalamu a žaludku (Billock et al., 1996). Zajímavé je, že i přes znalost toho, že jak GLP-1, tak receptory pro

GLP-1, jsou nalézány v hypothalamu (Krcymann et al., 1989; Kanse et al., 1988), nebyla určena žádná centrální funkce pro GLP-1, dokud poslední odborná publikace nepopsala, že GLP-1 podaný intracerebroventrikulárním způsobem (ICV) významně inhibuje příjem potravy krmených krys (Turton et al., 1996). Stejná publikace naznačuje, že po ICV podání GLP-1 se objeví c-fos, marker neuronální aktivace, výlučně v paraventriculárním jádře hypothalamu a v centrálním jádře amygdaly, což jsou dva regiony mozku mající hlavní funkci v regulaci příjmu potravy (Morley, 1987). ICV podání GLP-1 také významně redukuje příjem potravy po injekci účinného stimulačního činidla, neuropeptidu Y, u zvířat krmených ad libitum (Turton et al., 1996). Další publikace popisuje, že GLP-1 podaný centrálně nebo periferně se účastní na kontrole tělesné teploty, ale neovlivňuje příjem potravy po akutním intraperitoneálním podání u krys (O'Shea et al., 1996). Nedávná publikace popisuje, že injekce GLP-1 do laterální komory mozkové u plně krmených krys indukuje značnou stimulaci Fos-ir v paraventriculárním jádru a parvocelulárním centrálním jádru amygdaly, což potvrzuje pozorování, která učinil Turton et al. (Rowland et al., 1996). Kromě toho tito výzkumníci popisují silnou aktivaci jiných center účastnících se regulace příjmu potravy, včetně bezprostředního časného genového proteinového produktu v jádru tractus solitarius, laterálním parabrachiálním jádru pontu, bazálním jádru stria terminalis a v area postrema. Receptory pro GLP-1 přístupné perifernímu GLP-1 jsou nacházeny v kryším subfornikálním orgánu a v area postrema (Orskov et al., 1996).

Turton et al. (1996) konkrétně uvádí, že účinky GLP-1 na tělesnou hmotnost a příjem potravy jsou způsobeny pouze podáním GLP-1 přímo do cerebroventrikulárního systému, že intraperitoneální podání GLP-1, i v relativně vysokých dávkách, nezpůsobuje časnou fázi příjmu potravy za tmy a fragmenty GLP-1

jsou inaktivní, pokud jsou podány periferně, jak je uvedeno v citaci (Suzuki et al., 1989). Tak se snižuje možnost použití GLP-1 jako přípravku (farmaceutického činidla) pro redukci tělesné hmotnosti, protože centrální způsoby podání, jako je ICV způsob, nejsou vhodné pro léčbu obezity u lidí. Fyziologické účinky GLP-1 uvedené výše vedly k návrhu jeho výhodného použití pro léčbu diabetes mellitus a obezity například za použití transplantace rekombinantních buněčných linií kodujících GLP-1 nebo GLP nebo receptory pro GLP-1 (WO 96/25487).

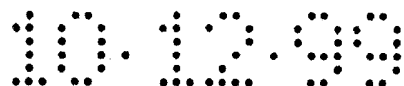
Jinou publikací, která odrazuje od použití GLP-1, je publikace, která ukazuje, že "periferní podání GLP-1 nemá žádný vliv na příjem potravy" (WO 97/31943, strana 3). Tato publikace také popisuje vliv GLP-2 na příjem potravy po periferním podání.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je použití prostředku obsahujícího glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

Předmětem tohoto vynálezu je také použití prostředku obsahujícího glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát pro přípravu léčiva k léčbě obezity.

Prostředky, zejména léčiva (farmaceutické prostředky), využívající analogy glukagonu podobného peptidu-1, jeho deriváty a aktivní peptidy, jsou tedy účinné při redukci tělesné hmotnosti a při léčbě obezity. Definice obezity se různí podle geografické lokality, klinického zaměření a sociálních preferencí. Prostředky používané podle předkládaného vynálezu jsou nicméně vhodné pro jakýkoliv subjekt, u kterého je žádoucí redukce tělesné hmotnosti.



Vynález není omezen na použití například u diabetických pacientů. Periferní podání GLP-1(7-36)amidu obézním pacientům je dosti neočekávané a v protikladu k předpokladům Turtona et al., (1996), a způsobuje významnou redukci tělesné hmotnosti. Způsob pro redukci tělesné hmotnosti spočívá v použití prostředku obsahujícího sloučeninu odvozenou od glukagonu podobného peptidu-1 a jeho podání subjektu. Vhodné sloučeniny odvozené od glukagonu podobného peptidu 1 zahrnují GLP-1, analogy GLP-1, deriváty GLP-1, agonisty receptoru pro GLP-1, agonisty signálního přenosu GLP-1, sloučeniny, které stimulují syntezu endogenního GLP-1, sloučeniny, které stimulují uvolnění endogenního GLP-1, a jejich farmaceuticky přijatelné soli. Je podána farmaceuticky účinná dávka, to znamená dávka, které je dostatečná pro redukci tělesné hmotnosti.

Přípravky, zejména léčiva (farmaceutické prostředky), využívající analogy glukagonu podobného peptidu-1, jeho analogy nebo deriváty, jsou účinné při redukci tělesné hmotnosti a při léčbě obezity. Analogy nebo deriváty GLP-1, které jsou použitelné jsou ty, které mají vyšší poločas životnosti ve srovnání s GLP-1 a které mají schopnost způsobit redukci tělesné hmotnosti při podávání subjektu po určité době.

Sloučeniny

Analogy, deriváty, varianty, prekursory a homology GLP-1 jsou všechny vhodné pro použití v předkládaném vynálezu, pokud obsahují aktivní fragment, který způsobuje redukci tělesné hmotnosti.

- 5a -

"GLP-1" znamená GLP-1 (7-37). Podle zvyklostí v oboru je amino-konec GLP-1 (7-37) označen číslem 7 a karboxy-konec je označen číslem 37. Aminokyselinová sekvence GLP-1 (7-37) je v oboru dobře známá, ale pro orientaci čtenáře je uvedena dále:

NH₂-His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-
Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-Gly³⁷-COOH

(SEQ ID NO: 1)

"GLP-1" analog je definován jako molekula mající jednu nebo více aminokyselinových substitucí, delecí, inversí nebo adicí vzhledem k GLP-1. Analogy GLP-1 známé v oboru zahrnují například GLP-1 (7-34) a GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), Gln⁹-GLP-1 (7-37), D-Gln⁹-GLP-1 (7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37) a Lys¹⁸-GLP-1 (7-37). Výhodné analogy GLP-1 jsou GLP-1 (7-34) a GLP-1 (7-35), které jsou popsány v U.S. patentu č. 5118666, který je zde uveden jako odkaz a také GLP-1 (7-36). Tyto sloučeniny jsou biologicky zpracované formy GLP-1 mající insulinotropní vlastnosti. Další analogy GLP-1 jsou popsány v U.S. patentu č. 5545618.

"Derivát GLP-1" je definován jako molekula, která má aminokyselinovou sekvenci GLP-1 nebo analogu GLP-1, ale která má dále chemické modifikace jedné nebo více z postranních skupin aminokyselin, α -uhlíkových atomů, terminální aminoskupiny, nebo terminální karboxylové kyseliny. Chemické modifikace zahrnují přidání chemických skupin, tvorbu nových vazeb a odstranění chemických skupin. Modifikace vedlejších aminokyselinových skupin zahrnují, ale nejsou omezeny na, acylaci ϵ -aminoskupin lysinu, N-alkylaci argininu, histidinu, nebo lysinu, alkylaci glutamových nebo asparagových skupin karboxylových kyselin a deamidaci glutaminu nebo asparaginu. Modifikace terminální aminoskupiny zahrnují des-amino, N-nižší alkylové, N-di-nižší alkylové a N-acylové modifikace. Modifikace terminální karboxylové skupiny zahrnují amidové, nižší alkylamidové, dialkylamidové a nižší alkylesterové modifikace. Nižší alkyl je C₁-C₄ alkyl. Dále, jedna nebo více vedlejších skupin, nebo koncových skupin, může být chráněna chránícími skupinami známými v oboru proteinové chemie. α -uhlík aminokyseliny může být mono- nebo dimethylován.

V předkládaném vynálezu je výhodná skupina analogů a derivátů GLP-1 pro použití v předkládaném vynálezu složena z různých molekul GLP-1 chráněných v U.S. patentu č. 5545618 ('618). Účinné

analogy aktivních GLP-1 peptidů, 7-34, 7-35, 7-36 a 7-37, mají aminokyselinové substituce například v pozici 7-10 a/nebo jsou zkráceny na C-konci a/nebo obsahují různé jiné aminokyselinové substituce v základním peptidu. Analogy mající D-aminokyselinové substituce v 7. a 8. pozici a/nebo N-alkylované nebo N-acylované aminokyseliny v 7. pozici jsou zejména resistantní na degradaci in vivo.

Analogy podle vynálezu '618, které vykazují zvýšení stimulační charakteristiky pro inzulin sekvenci přirozeného GLP-1, 7-34, 7-35, 7-36 nebo 7-37, nebo jejich C-terminálního amidu, s alespoň jednou modifikací vybranou ze skupiny skládající se z:

(a) substituce neutrální aminokyseliny, argininu, nebo D-formy lysinu, za lysin v pozici 26 a/nebo 34 a/nebo neutrální aminokyseliny, lysinu nebo D-formy argininu za arginin v pozici 36;

(b) substituce aminokyseliny resistantní na oxidaci za tryptofan v pozici 31;

(c) substitucí vybranou z následujících substitucí:

Y za V v pozici 16;

K za S v pozici 18;

D za E v pozici 21;

S za G v pozici 22;

R za Q v pozici 23;

R za A v pozici 24; a

Q za K v pozici 26;

(Za použití jednopísmenného kodu pro aminokyseliny).

(d) substitucí zahrnující alespoň jednu z:

alternativní malá neutrální aminokyselina za A v pozici 8;

alternativní kyselá aminokyselina nebo neutrální

aminokyselina za E v pozici 9;

alternativní neutrální aminokyselina za G v pozici 10; a

alternativní kyselá aminokyselina za D v pozici 15; a

(e) substituce alternativní neutrální aminokyseliny nebo D nebo N-acylované nebo alkylované formy histidinu za histidin v pozici 7.

Z hlediska modifikací (a), (b), (d) a (e) mohou být substituované aminokyseliny v D formě. Aminokyseliny substituované v pozici 7 mohou být také v N-acylované nebo N-alkylované formě.

V jiném aspektu je vynález '618 zaměřen na peptidy, která vykazují zvýšenou resistenci na degradaci v plasmě ve srovnání s GLP-1 (7-37) (u kterého je tato zvýšená resistance na degradaci). V těchto analogách je jakákoliv výše uvedená zkrácená forma GLP-1(7-34) až GLP-1(7-37) nebo jejich forma amidovaná na C-konci modifikována:

(a) substitucí D-neutrální nebo D-kyselé aminokyseliny za H v pozici 7, nebo

(b) substitucí D-aminokyseliny za A v pozici 8, nebo

(c) oběma způsoby, nebo

(d) substitucí N-acylované nebo N-alkylované formy jakékoliv přirozené aminokyseliny za H v pozici 7.

Proto analogy resistantní na degradaci zahrnují (N-acyl(1-6C AA)⁷GLP-1(7-37) a (N-alkyl(1-6C AA)⁷GLP-1(7-37), kde když AA je lisylový zbytek, tak mohou být jeden nebo oba dusíky alkylovány nebo acylovány, a AA představuje jakoukoliv aminokyselinu slučitelnou se zachováním stimulační aktivity pro insulin.

Pro substituce D-aminokyselin v pozicích 7 a 8 může být použit D zbytek jakékoliv kyselé nebo neutrální aminokyseliny v pozici 7 a zbytek jakékoliv aminokyseliny v pozici 8, opět pokud je to slučitelné se zachováním stimulační aktivity pro insulin. Jedna nebo obě pozice 7 a 8 mohou být substituovány D-aminokyselinou;

D-aminokyselina v pozici 7 může být také acylována nebo alkylována. Tyto modifikace lze použít nejen na GLP-1(1-37), ale také na kratší zkrácené analogy.

Tak jsou výhodnými analogy vynálezu '618 ty, ve kterých byly (7-34), (7-35) nebo (7-37) formy GLP-1 modifikovány pouze substitucí neutrální aminokyseliny, argininu nebo D-formy lysinu za lysin v pozici 26 a/nebo 34 a/nebo substitucí neutrální aminokyseliny, lysinu nebo D-formy argininu za arginin v pozici 36 (část (a)). Zejména výhodnými analogy jsou ty, kde je aminokyselinou substituovanou za lysin v pozici 26 a 34 aminokyselina vybraná ze skupiny skládající se z K⁺, G, S, A, L, I, Q, R, R⁺ a M, a kde je aminokyselinou substituovanou za arginin v pozici 36 je aminokyselina vybraná ze skupiny skládající se z K, K⁺, G, S, A, L, I, Q, M a R⁺ (kde + označuje D-formu).

Též výhodnými jsou analogy, kde jedinou modifikací je substituce aminokyseliny resistentní na oxidaci za tryptofan v pozici 31 (část (b)). Zejména výhodné substituce jsou vybrané ze skupiny skládající se z F, V, L, I, A a Y.

Též výhodnými jsou analogy, kde jedinou modifikací je alespoň jedna ze specifických substitucí uvedených v části (c). Zejména výhodné jsou ty analogy, kde byly provedeny kombinované substituce S za G v pozici 22, R za Q v pozici 23 a R za A v pozici 24 a Q za K v pozici 26, nebo kde byly provedeny substituce Y za V v pozici 16 a K za S v pozici 18, nebo kde byly provedeny tyto substituce plus D za E v pozici 21.

Též výhodnými jsou analogy, kde jedinou modifikací je alespoň jedna z modifikací uvedených v části (d). Zejména výhodné jsou ty analogy, kde malá neutrální aminokyselina substituovaná

za alanin v pozici 8 je vybrána ze skupiny skládající se z S, S⁺, GC, C⁺, Sar, A⁺, β-Ala a Aib; a/nebo kde kyselá nebo neutrální aminokyselina substituovaná za kyselinu glutamovou v pozici 9 je vybrána ze skupiny skládající se z E⁺, D, D⁺, Cya T, T⁺, N, N⁺, Q, Q⁺, Cit, MSO a acetyl-K; a/nebo kde je alternativní neutrální aminokyselina substituovaná za glycin v pozici 10 vybraná ze skupiny skládající se z S, S⁺, Y, Y⁺, T, T⁺, N, N⁺, Q, Q⁺, Cit, MSO, acetyl-K, F a F⁺; a/nebo kde D je substituovaná za E v pozici 15.

Též výhodné jsou analogy, kde byla pozměněna pouze pozice 7 (část (e)). Výhodnými substitucemi jsou ty, kde aminokyselina substituovaná za histidin v pozici 7 je vybrána ze skupiny skládající se z H⁺, Y, Y⁺, F, F⁺, R, R⁺, Orn, Orn⁺, M, M⁺, N-formyl-H⁺, N-acetyl-H, N-acetyl-H⁺, N-isopropyl-H, N-isopropyl-H⁺, N-acetyl-K, N-acetyl-K⁺, P a P⁺.

Též výhodná jsou provedení s kombinací pouze dvou z výše uvedených tříd modifikovaných forem, spolu s následujícími specifickými provedeními.

Výhodné jsou následující specifické analogy:

- (H⁺)⁷-GLP-1(7-37);
- (Y)⁷-GLP-1(7-37);
- (N-acetyl-H)⁷-GLP-1(7-37);
- (N-isopropyl-H)⁷-GLP-1(7-37);
- (A⁺)⁸-GLP-1(7-37);
- (E⁺)⁹-GLP-1(7-37);
- (D)⁹-GLP-1(7-37);
- (D⁺)⁹-GLP-1(7-37);
- (F⁺)¹⁰-GLP-1(7-37);
- (S)²²(R)²³(R)²⁴(Q)²⁶-GLP-1(7-37);
- (S)⁸(Q)⁹(Y)¹⁶(K)¹⁸(D)²¹-GLP-1(7-37);

Výhodné formy analogů se zvýšenou stabilitou také mají pouze jednu, nebo nejvíce dvě, aminokyselinové modifikace.

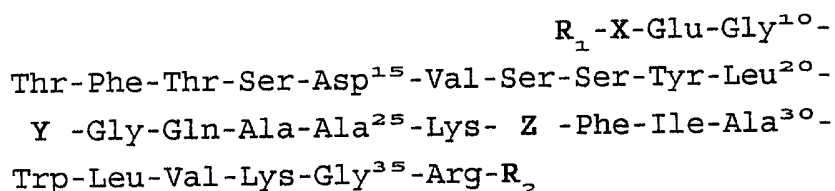
Výhodné substituce za histidin v pozici 7 zahrnují D-formy kyselých nebo neutrálních aminokyselin nebo D-formy histidinu. Výhodné jsou P⁺, D⁺, E⁺, N⁺, Q⁺, L⁺, V⁺, I⁺ a H⁺.

Histidin v pozici 7, nebo jeho náhrada (D nebo L), může být také N-alkylován (1-6C) nebo N-acylován (1-6C). Alkylové skupiny mají přímý nebo rozvětvený řetězec (včetně cyklického) uhlovodíkových zbytků s uvedeným počtem C. Acylové skupiny mají vzorec RC-, kde R je alkyl. Výhodné alkylové skupiny jsou t-ropyl, α-propyl a ethyl; výhodné acylové skupiny jsou acetyl a propionyl. Výhodné zbytky, které mohou být alkylovány nebo acylovány, zahrnují P, D, E, N, Q, V, L, I, K a H, jak v D, tak v L formě.

Výhodné substituce za alanin v pozici 8 jsou D-formy P, V, L, I a A; též výhodné jsou D-formy D, E, N, Q, K, T, S a H.

Některé specifické analogy vykazují jak zvýšenou stimulační aktivitu pro insulin, tak zvýšenou stabilitu.

Výhodná skupina analog a derivátů GLP-1 pro použití v předkládaném vynálezu je složena z molekul vzorce:



(SEQ ID NO: 2)

a jejich farmaceuticky přijatelných solí, kde: R₁ je vybrán ze

skupiny zahrnující L-histidin, D-histidin, desamino-histidin, 2-amino-histidin, β -hydroxy-histidin, homohistidin, α -fluormethyl-histidin a α -methyl-histidin; X je vybrán ze skupiny zahrnující Ala, Gly, Val, Thr, Ile a α -methyl-Ala; Y je vybrán ze skupiny zahrnující Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly; Z je vybrán ze skupiny zahrnující Gly, Gln, Ala, Thr, Ser, a Gly; a R_2 je vybrán ze skupiny zahrnující NH_2 a Gly-OH; s podmínkou, že sloučenina má izoelektrický bod v rozmezí od asi 6,0 až 9,0 a s další podmínkou, že pokud je R_1 His, X je Ala, Y je Glu a Z je Glu, pak musí R_2 být NH_2 .

Bylo popsáno mnoho analogů a derivátů GLP-1, které mají izoelektrický bod v rozmezí od přibližně 6,0 do přibližně 9,0 a patří mezi ně například:

GLP-1 (7-36) NH_2
 Gly⁸-GLP-1 (7-36) NH_2
 Gln⁹-GLP-1 (7-37)
 D-Gln⁹-GLP-1 (7-37)
 acetyl-Lys⁹-GLP-1 (7-37)
 Thr⁹-GLP-1 (7-37)
 D-Thr⁹-GLP-1 (7-37)
 Asn⁹-GLP-1 (7-37)
 D-Asn⁹-GLP-1 (7-37)
 Ser²²-Arg²³-Arg²⁴-Gln²⁶-GLP-1 (7-37)
 Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)
 Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)
 Arg²³-GLP-1 (7-37)
 Arg²⁴-GLP-1 (7-37).

Jiná výhodná skupina aktivních sloučenin pro použití v předkládaném vynálezu je popsána ve WO 91/11457 (související s U.S. 5545618) a skládá se z GLP-1 (7-34), GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), nebo GLP-1 (7-37), nebo jejich amidových forem, a jejich

farmaceuticky přijatelných solí, majících alespoň jednu modifikaci vybranou ze skupiny zahrnující:

(a) substituci glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, methioninu, fenylalaninu, argininu nebo D-lysinu za lysin v pozici 26 a/nebo v pozici 34; nebo substituci glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, methioninu, fenylalaninu, lysinu nebo D-argininu za arginin v pozici 36;

(b) substituci aminokyseliny resistantní na oxidaci za tryptofan v pozici 31;

(c) substituci alespoň jednoho z: tyrosinu za valin v pozici 16; lysinu za serin v pozici 18; kyseliny asparagové za kyselinu glutamovou v pozici 21; serinu za glycin v pozici 22; argininu za glutamin v pozici 23; argininu za alanin v pozici 24; a glutaminu za lysin v pozici 26; a

(d) substituci alespoň jednoho z: glycinu, serinu nebo cysteinu za alanin v pozici 8; kyseliny asparagové, glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, methioninu nebo fenylalaninu za kyselinu glutamovou v pozici 9; serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, methioninu nebo fenylalaninu za glycin v pozici 10; a kyseliny glutamové za kyselinu asparagovou v pozici 15; a

(e) substituci glycinu, serinu, cysteinu, threoninu, asparaginu, glutaminu, tyrosinu, alaninu, valinu, isoleucinu, leucinu, methioninu nebo fenylalaninu nebo D- nebo N-acylované

nebo alkylované formy histidinu za histidin v pozici 7; kde v substitucích (a), (b), (d) a (e) může být substituovaná aminokyselina volitelně v D-formě a aminokyselina substituovaná v pozici 7 může volitelně být v N-acylované nebo N-alkylované formě.

Jelikož za pozorovanou rychlou in vivo inaktivaci podaného GLP-1 může být odpovědný enzym dipeptyl-peptidasa IV (DPP IV) (viz Mentlein, R. et al., (1993)), je výhodné podání analogů nebo derivátů GLP-1, které jsou chráněny před aktivitou DPP IV, a nejvýhodnější je podání Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, α-methyl-Ala⁸-GLP-1 (7-36)NH₂ a Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37)OH nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Výhodné je v předkládaném vynálezu také použití molekul chráněných v U.S. patentu č. 5188666 ('666). Taková molekula je vybrána ze skupiny zahrnující peptid mající jednu z následujících aminokyselinových sekvencí:

NH₂-His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-
Trp-Leu-Val-X

(SEQ ID NO: 3)

kde X je vybrán ze skupiny zahrnující Lys a Lys-Gly; nebo derivátů uvedeného peptidu, a kde uvedený peptid může být farmaceuticky přijatelná adiční sůl uvedeného peptidu s kyselinou; farmaceuticky přijatelná karboxylatová sůl uvedeného peptidu; farmaceuticky přijatelný nižší alkylester uvedeného peptidu; nebo farmaceuticky přijatelný amid uvedeného peptidu vybraný ze skupiny zahrnující amid, nižší alkylamid, a nižší dialkylamid.

Vynález '666 se týká peptidového fragmentu, který je insulinotropní a který je možno odvodit od přirozené aminokyselinové sekvence.

Vynález obsahuje sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující:

(A) peptid obsahující sekvenci:

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

kde X je vybrán ze skupiny zahrnující:

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

(B) derivát peptidu; kde sloučenina je v podstatě prostá přirozených kontaminujících složek a má insulinotropní aktivitu, která je vyšší než insulinotropní aktivita GLP-1(1-36) nebo GLP-1(1-37).

Vynález také obsahuje sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující:

(A) peptid obsahující sekvenci:

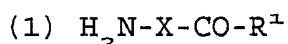
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-X

kde X je vybrán ze skupiny zahrnující:

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

(B) derivát peptidu; kde sloučenina je v podstatě prostá přirozených kontaminujících složek a má insulinotropní aktivitu v koncentraci nejméně 10^{-10} M.

Zejména výhodné jsou peptidy následujícího vzorce:



kde R^1 je OH, OM nebo $-NR^2R^3$;

M je farmaceuticky přijatelný kationt nebo nižší alkylová skupina s rozvětveným nebo přímým řetězcem;

R^2 a R^3 jsou stejné nebo odlišné a jsou vybrány ze skupiny zahrnující vodík a nižší alkylová skupina s rozvětveným nebo přímým řetězcem;

X je peptid obsahující sekvenci

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

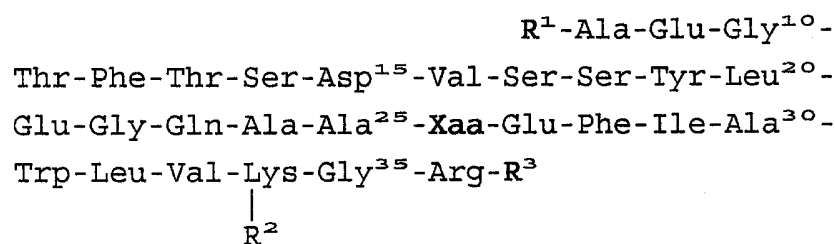
NH_2 je amino-skupina amino-konce X; a CO je karbonylová skupina karboxy-konce X;

(2) jeho adiční soli s kyselinami; a

(3) jeho chráněné nebo částečně chráněné deriváty;

kde uvedená sloučenina má insulinotropní aktivitu, která je vyšší než insulinotropní aktivita GLP-1(1-36) nebo GLP-1(1-37).

Jiná výhodná skupina molekul pro použití v předkládaném vynálezu se skládá ze sloučenin chráněných U.S. patentem č. 5512549, které mají obecný vzorec:



(SEQ ID NO: 4)

a jejich farmaceuticky přijatelných solí, kde R^1 je vybrán ze skupiny skládající se z 4-imidazopropionyl, 4-imidazoacetyl, nebo 4-imidazo- α,α -dimethyl-acetyl; R^2 je vybrán ze skupiny zahrnující C_6 - C_{10} nerozvětvený acyl, nebo není přítomen; R^3 je vybrán ze skupiny zahrnující Gly-OH nebo NH_2 ; a Xaa je Lys nebo Arg.

Výhodnější sloučeniny SEQ ID NO:4 pro použití v předkládaném vynálezu jsou ty sloučeniny, kde Xaa je Arg a R² je C₆-C₁₀ nerozvětvený acyl.

Ještě výhodnější sloučeniny SEQ ID NO:4 pro použití v předkládaném vynálezu jsou ty sloučeniny, kde Xaa je Arg a R² je C₆-C₁₀ nerozvětvený acyl a R³ je Gly-OH.

Ještě výhodnější sloučeniny SEQ ID NO:4 pro použití v předkládaném vynálezu jsou ty sloučeniny, kde Xaa je Arg a R² je C₆-C₁₀ nerozvětvený acyl, R³ je Gly-OH a R¹ je 4-imidazopropionyl.

Nejvýhodnější sloučenina SEQ ID NO:4 pro použití v předkládaném vynálezu jsou ta sloučenina, kde Xaa je Arg, R² je C₆ nerozvětvený acyl, R³ je Gly-OH a R¹ je 4-imidazopropionyl.

Výhodné je v předkládaném vynálezu použití molekuly chráněné v U.S. patentu č. 5120712. Taková molekula je vybrána ze skupiny zahrnující peptid mající aminokyselinovou sekvenci:

NH₂-His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-
 Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-
 Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-
 Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-Gly³⁷-OH

(SEQ ID NO: 1)

a deriváty uvedeného peptidu, kde uvedený peptid je vybrán ze skupiny zahrnující: farmaceuticky přijatelnou adiční sůl uvedeného peptidu s kyselinou; farmaceuticky přijatelnou karboxylatovou sůl uvedeného peptidu; farmaceuticky přijatelný nižší alkylester uvedeného peptidu; a farmaceuticky přijatelný amid uvedeného peptidu vybraný ze skupiny zahrnující amid, nižší alkylamid, a

nižší dialkylamid.

Výhodné je v předkládaném vynálezu použití GLP-1 (7-36) amidu, nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli. Aminokyselinová sekvence GLP-1 (7-36) amidu je:

NH₂-His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-
Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-NH₂

(SEQ ID NO: 5)

Nejvýhodnější je v předkládaném vynálezu použití Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli. Aminokyselinová sekvence Val⁸-GLP-1(7-37)OH je:

NH₂-His⁷-Ala-Glu-Gly¹⁰-
Thr-Phe-Thr-Ser-Asp¹⁵-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu²⁰-
Glu-Gly-Gln-Ala-Ala²⁵-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala³⁰-
Trp-Leu-Val-Lys-Gly³⁵-Arg-Gly³⁷-OH

(SEQ ID NO: 6)

Příprava sloučenin

Způsoby pro přípravu aktivních sloučenin použitých v předkládaném vynálezu, jmenovitě GLP-1, analogů GLP-1 nebo derivátů GLP-1, nebo jakýchkoliv příbuzných sloučenin včetně aktivních fragmentů schopných redukce tělesné hmotnosti při periferním podání, jsou dobře známé a jsou popsány v U.S. patentech č. 5118666, 5120712 a 5523549.

Aminokyselinová část aktivní sloučeniny použité v předkládaném vynálezu, nebo jejího prekursoru, je vyrobena buď: 1) chemickou

syntesou na pevné fázi; 2) přečištěním GLP molekuly z přirozených zdrojů; 3) technologií rekombinantní DNA; nebo (4) kombinací výše uvedených technik.

Chemická syntesa polypeptidů na pevné fázi je v oboru dobře známá a je uvedena například v Dugas a Penney, (1981); Merrifield, (1962); Stewart a Young, (1969).

Například, aminokyselinová část může být syntetizována technikou syntesy na pevné fázi za použití 430A peptidového syntezátoru (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) a cyklů syntesy dodávaných PE-Applied Biosystems. BOC-aminokyseliny a jiná činidla jsou komerčně dostupná od PE-Applied Biosystems a jiných dodavatelských firem. Sekvenční Boc chemický postup využívající protokol dvojité vazby je použit na výchozí p-methyl-benzhydryl-aminové pryskyřici pro produkci C-koncových karboxamidů. Pro produkci C-koncových kyselin se použije odpovídající PAM pryskyřice. Asn, Gln a Arg jsou navázány pomocí předem vytvořených hydroxy-benzotriazolesterů. Mohou být použity následující chránící skupiny pro postranní řetězce:

- Arg, tosyl
- Asp, cyklohexyl
- Glu, cyklohexyl
- Ser, benzyl
- Thr, benzyl
- Tyr, 4-brom-karbobenzoxy

Boc odstranění chránících skupin může být provedeno pomocí kyseliny trifluoroctové v methylenchloridu. Po dokončení syntesy mohou být peptidy zbaveny chránících skupin a mohou být odštěpeny z pryskyřice pomocí bezvodého fluorovodíku (HF) obsahujícího 10% meta-kresol. Štěpení chránících skupin pro postranní řetězce

a štěpení peptidu z pryskyřice je provedeno při -5°C až 5°C , výhodně na ledu během 60 minut. Po odstranění HF je směs peptid/pryskyřice promyta etherem a peptid se extrahuje ledovou kyselinou octovou a lyofilizuje se.

Techniky dobře známé odborníkům v oboru rekombinantní DNA technologie mohou být použity pro přípravu aktivní sloučeniny použité v předkládaném vynálezu. V praxi mohou být rekombinantní DNA techniky mohou být preferovány, protože mají vyšší výtěžek. Základní kroky v rekombinantní produkci jsou:

- (a) izolace přirozené DNA sekvence kodující GLP-1 molekulu podle předkládaného vynálezu nebo konstrukce syntetické nebo semi-syntetické DNA kodující sekvence pro GLP-1 molekulu;
- (b) umístění kodující sekvence do expresního vektoru způsobem vhodným pro expresi proteinů buď samostatných, nebo ve formě fúzních proteinů;
- (c) transformace vhodných eukaryotických nebo prokaryotických hostitelských buněk expresním vektorem;
- (d) kultivace transformovaných hostitelských buněk za podmínek umožňujících expresi GLP-1 molekuly; a
- (e) získání a přečištění rekombinantně produkované GLP-1 molekuly.

Jak bylo uvedeno výše, kodující sekvence může být plně syntetická nebo může vzniknout modifikací větší, přirozené kodující DNA pro glukagon. DNA sekvence kodující preproglukagon je uvedena v Lund et al. (1982) a může být použita jako výchozí materiál pro semisyntetickou produkci sloučenin podle předkládaného vynálezu pomocí změny přirozené sekvence tak, aby bylo dosaženo požadovaného výsledku.

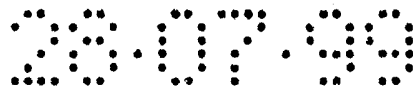
Syntetické geny, jejichž in vitro nebo in vivo transkripce a translace vede k výrobě GLP-1 molekuly, mohou být konstruovány

technikami dobře známými v oboru. Vzhledem k degeneraci genetického kodu bude odborníkům jasné, že může být konstruován velký počet DNA sekvencí, které budou všechny kodovat GLP-1 molekulu.

Technika konstrukce syntetických genů je v oboru dobře známá (Brown et al., (1979)). DNA sekvence je navržena pro požadovanou aminokyselinovou sekvenci pomocí genetického kodu, což snadno provede zkušený biolog. Po navržení může být sekvence samotná vytvořena pomocí běžného přístroje pro syntesu DNA, jako je například Model 380A nebo 380B DNA syntezátoru (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404).

Pro expresi aminokyselinové části sloučenin použitých v předkládaném vynálezu se zpracovaná syntetická DNA sekvence vloží do jednoho z mnoha vhodných rekombinantních DNA expresních vektorů pomocí vhodných restričních endonukleas (Maniatis et al., (1989)). Rozpoznávací místa pro restriční endonukleasy se zapracují do jednoho konce DNA kodující GLP-1 molekulu pro usnadnění její izolace, integrace a amplifikace v expresních vektorech dobře známých v oboru. Typ určité použité restriční endonukleasy bude určen charakterem štěpení původního použitého expresního vektoru. Restriční místa jsou vybrána tak, aby správně orientovala kodující sekvenci vzhledem ke kontrolní sekvenci, což umožní správné čtení v čtecím rámci a expresi požadovaného proteinu. Kodující sekvence musí být umístěna ve správném čtecím rámci s promotorem a vazebným místem pro ribosomy expresního vektoru, kde oba tyto elementy jsou funkční v hostitelské buňce, ve které má být protein exprimován.

Pro dosažení účinné transkripce syntetického genu musí být gen operativně navázán na region promotor-operátor. Proto je region



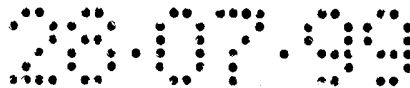
promotor-operátor syntetického genu umístěn ve stejné sekvenční orientaci vzhledem k ATG start kodonu syntetického genu.

V oboru je známo mnoho expresních vektorů použitelných pro transformaci prokaryotických a eukaryotických buněk. Viz Promega Catalogue (1992), Stratagene Catalogue (1992). Též U.S. patent č. 4710473 popisuje cirkulární DNA plasmidové transformační vektory použitelné pro expresi exogenních genů v *E. coli* s vysokým výtěžkem. Tyto plasmidy jsou použitelné jako transformační vektory v rekombinantních DNA technikách a

- (a) udílejí plasmidu schopnost autonomní replikace v hostitelských buňkách;
- (b) kontrolují autonomní replikaci plasmidu v závislosti na teplotě, při které jsou hostitelské buňky kultivovány;
- (c) stabilizují udržování plasmidu v populaci hostitelských buněk;
- (d) řídí syntesu proteinového produktu, který je znakem udržování plasmidu v populaci hostitelských buněk;
- (e) poskytují serii rozpoznávacích míst pro restriční endonukleasy, která jsou jedinečná pro plasmid;
- (f) ukončují transkripci mRNA.

Tyto cirkulární DNA plasmidy jsou užitečné jako vektory v rekombinantních DNA technikách pro zajištění vysokých hladin exprese exogenních genů.

Po konstrukci expresního vektoru pro aminokyselinovou část sloučenin použitých v předkládaném vynálezu je dalším krokem umístění vektoru do vhodných buněk a tak konstrukce rekombinantních hostitelských buněk použitelných pro expresi polypeptidu. Techniky pro transformování buněk rekombinantními DNA vektory jsou dobře známé v oboru a jsou uvedeny například v Maniatis et al., výše. Hostitelské buňky mohou být vytvořeny buď



z prokaryotických, nebo z eukaryotických buněk.

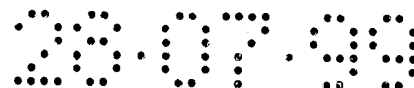
Prokaryotické hostitelské buňky obvykle produkují protein vyšší rychlostí a lépe se kultivují. Proteiny exprivované ve vysokých koncentracích v bakteriálních expresních systémech jsou charakteristicky agregovány v granulích nebo v inklusních tělískách, které obsahují vysoké hladiny nadměrně exprivovaného proteinu. Takové proteinové agregáty musí být typicky odebrány, solubilizovány, denaturovány a znovu složeny pomocí technik dobře známých v oboru. Viz Kreuger et al., (1990), U.S. patent č. 4923967.

Příprava analogů a derivátů GLP-1

Změny v aminokyselinové sekvenci prekursoru GLP-1 nebo GLP-1 vedoucí k zisku požadovaného GLP-1 analogu nebo GLP-1 derivátu, nebo jejich aktivního fragmentu, jsou vytvořeny pomocí dobře známých technik: chemickou modifikací, enzymatickou modifikací, nebo kombinací chemické a enzymatické modifikace. Techniky klasické metody v kapalně fázi a semisyntetické metody mohou být také použity pro přípravu GLP-1 molekul použitelných v předkládaném vynálezu. Metody pro přípravu GLP-1 molekul podle předkládaného vynálezu jsou odborníkům v oboru peptidové chemie dobře známy.

Adice acylové skupiny na epsilon amino skupinu Lys³⁴ může být provedena pomocí jakékoliv techniky, která je v oboru známá. Viz (Bioconjugate Chem. (1990); Hashimoto et al., (1989).

Například, N-hydroxy-sukcinimidester kyseliny oktanové může být navázán na epsilon-lysyl-amin za použití 50% acetonitrilu v boritanovém pufru. Peptid může být acylován buď před, nebo po adici imidozalové skupiny. Kromě toho, pokud je peptid připraven



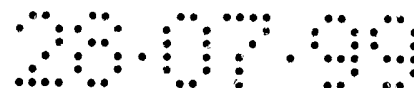
rekombinantně, je možná acylace před enzymatickým štěpením. Také lysin v GLP-1 derivátu může být acylován, jak je uvedeno v WO 96-29342.

Existence a příprava mnoha chráněných, nechráněných, a částečně chráněných, přirozených a syntetických, funkčních analogů a derivátů GLP-1(7-36)amidu a GLP-1(7-37) molekul byla v oboru popsána (U.S. patenty č. 5120712 a 5118666, Orskov et al., 1989; a WO 91/11457.

Volitelně, amino- a karboxy-koncové aminokyselinové zbytky GLP-1 derivátů mohou být chráněny, nebo je, volitelně, chráněn pouze jeden konec. Reakce pro tvorbu a odstranění takových chránících skupin jsou popsány ve pracích známých v oboru, jako je například "Protective Groups in Organic Chemistry", (1973); Green, (1981); Schroder and Lubke, (1965). Příklady chránících skupin pro amino skupinu zahrnují formyl, acetyl, isopropyl, butoxykarbonyl, fluorenylmethoxykarbonyl, karbobenzyloxy a podobně. Příklady chránících skupin pro karboxy skupinu zahrnují benzylester, methylester, ethylester, t-butylester, p-nitrofenylester a podobně.

GLP-1 deriváty s nižším alkylesterem na karboxy konci použité v předkládaném vynálezu jsou připraveny reakcí požadovaného (C_1-C_4)alkanolu s požadovaným polypeptidem za přítomnosti katalytické kyseliny jako je kyselina chlorovodíková. Vhodné podmínky pro takovou tvorbu alkylesteru zahrnují reakční teplotu okolo 50 °C a reakční dobu okolo 1 až 3 hodin. Podobně mohou být vytvořeny alkylesterové deriváty Asp a/nebo Glu zbytků.

Příprava karboxamidových derivátů sloučenin použitých v předkládaném vynálezu je provedena například způsobem popsaným v Stewart et al., 1984.



Farmaceuticky přijatelné soli GLP-1, analogů GLP-1 nebo derivátů GLP-1 mohou být použity v předkládaném vynálezu. Kyselinami běžně používanými při tvorbě adičních solí s kyselinami jsou anorganické kyseliny jako je kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina jodovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná a podobně a organické kyseliny jako je kyselina p-toluensulfonová, kyselina methansulfonová, kyselina šťavelová, kyselina p-bromfenylsulfonová, kyselina uhličitá, kyselina jantarová, kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina octová a podobně. Příklady takových solí zahrnují síran, pyrosíran, kyselý síran, siřičitan, kyselý siřičitan, fosforečnan, monohydrogenfosforečnan, dihydrogenfosforečnan, monohydrogenfosforečnan, metafosforečnan, pyrofosforečnan, chlorid, bromid, jodid, octan, propionat, dekanat, kaprylat, akrylat, formiat, isobutyrat, kaproat, heptanoat, propiolat, šťavelan, malonan, jantar, suberat, sebakat, fumarat, maleinan, butin-1,4-dioat, benzoat, chlorbenzoat, methylbenzoat, dinitrobenzoat, hydroxybenzoat, methoxybenzoat, ftalat, sulfonát, xylensulfonát, fenylacetát, fenylpropionát, fenylbutyrát, citrát, laktát, gamma-hydroxybutyrát, glykolat, vinan, methansulfonát, propansulfonát, naftalen-1-sulfonát, naftalen-2-sulfonát, mandlan, a podobně. Výhodné adiční soli s kyselinou jsou ty, které jsou tvořeny s anorganickými kyselinami jako je kyselina chlorovodíková a bromovodíková, zejména soli s kyselinou chlorovodíkovou.

Adiční soli s bazemi zahrnují ty soli, které jsou tvořeny s anorganickými bazemi jako jsou amoniak nebo hydroxidy alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, uhličitany, hydrogenuhlíčitany a podobně. Takové baze použitelné při přípravě solí podle předkládaného vynálezu zahrnují hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid amonný, uhličitán draselný a podobně. Zejména

výhodné jsou formy solí.

GLP-1, analog GLP-1 nebo derivát GLP-1 může být před použitím v předkládaném vynálezu připraven spolu s jednou nebo více přísadami. Například, aktivní sloučenina použitá v předkládaném vynálezu může být v komplexu s kationtem dvojjazného kovu, za použití dobře známých technik. Takové kationty kovů zahrnují, například, Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} a podobně.

Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu

Volitelně může být aktivní sloučenina použitá v předkládaném vynálezu v kombinaci s farmaceuticky přijatelným pufrům a pH může být upraveno tak, aby bylo dosaženo přijatelné stability a aby bylo pH přijatelné pro parenterální podání.

Volitelně může být přidáno jedno nebo více farmaceuticky přijatelných antimikrobiálních činidel. Meta-kresol a fenol jsou výhodnými farmaceuticky přijatelnými antimikrobiálními činidly. Může být přidána jedna nebo více farmaceuticky přijatelných solí pro úpravu iontové síly a tonicity. Může být přidána jedna nebo více dalších přísad pro další úpravu isotonicity prostředku. Glycerin je příkladem přísady upravující isotonicitu.

GLP-1 receptory a signální přenosová kaskáda zahájená vazbou ligandu na receptor pro GLP-1 jsou popsány ve WO 96/25487; Thorens, (1992); Thorens et al., (1993); Widmann et al., (1994). Receptor pro GLP-1 je membránový protein spřažený s heterotrimerickými G-proteiny, které spojují aktivaci receptoru vazbou ligandu s produkcí intracelulárních druhých posílů, zejména cyklickým adenosinmonofosfatem (cAMP). cAMP potom aktivuje specifickou protein-kinasu (protein-kinasu A, PKA). Tento enzym fosforyluje mnoho klíčových reaktivních elementů v promotorovém

regionu určitých genů. V pankreatických b-buňkách a jiných neuroendokrinních buňkách stimuluje fosforylace některých specifických proteinů regulační sekreční dráhy sekreci peptidů prostřednictvím stimulace exocytosy sekrečních granulí.

O různých sloučeninách je známo, že stimulují sekreci endogenního GLP-1. Například, expozice STC-1 buněk některým substancím vyvolávajícím sekreci, jako je například aktivátor adenylatcyklasy, forskolin, nebo činidlo stimulující protein-kinasu-C, 12-O-tetradekanoylfobol-13-acetat (TPA), způsobuje zvýšené uvolňování GLP-1 (Abelo et al., 1994). STC-buněčná linie pochází ze střevních nádorů transgenních myší, které nesou spouštěcí onkogeny pro inzulin a o STC-1 buňkách je známo, že obsahují m-RNA transkripty proglukagonu, ze kterého je tvořen GLP-1. O dalších sloučeninách, jako je somatostatin, žaludeční inhibiční polypeptid, glukosa-dependentní insulinotropní peptid, bombesin, peptid související s kalcitoninovým genem, peptid uvolňující gastrin, cholinergní agonisté, β -adrenergní agonisté, isoproterenol a muskarinový cholinergní agonista, bethanechol, je také známo, že způsobují uvolnění endogenního GLP-1 (Plaisancie et al., (1994); Orskov et al., (1986); Brubaker, (1991); Buchan et al., (1987)).

Podání farmaceutických prostředků

Podání může být provedeno způsobem, o kterém je odborníkům nebo lékařům známo, že je účinný, s výjimkou parenterálního podání přímo do centrálního nervového systému, které není součástí předkládaného vynálezu. Výhodné je periferní, parenterální podání. Parenterálním podáním se obvykle v lékařské literatuře rozumí injekce dávkové formy do těla sterilní injekční stříkačkou nebo nějakým jiným mechanickým prostředkem jako je infusní pumpa. Pro účely předkládaného vynálezu zahrnují

periferní, parenterální způsoby podání intravenosní, intramuskulární, subkutánní a intraperitoneální podání. Nejvýhodnější jsou v předkládaném vynálezu intravenosní, intramuskulární a subkutánní způsob podání sloučenin použitých v předkládaném vynálezu. Ještě výhodnější jsou v předkládaném vynálezu intravenosní a subkutánní způsob podání sloučenin použitých v předkládaném vynálezu. Pro parenterální podání je sloučenina použitá v předkládaném vynálezu výhodně kombinována s destilovanou vodou při vhodném pH.

Některé sloučeniny použité v předkládaném vynálezu pro redukci tělesné hmotnosti mohou být vhodné pro orální, rektální, nasální podání, nebo pro podání do dolních dýchacích cest, kde tyto způsoby nejsou parenterální. Z uvedených neparenterálních způsobů podání je pro podání peptidů podle předkládaného vynálezu výhodná podání do dolních cest dýchacích. Různé prostředky peptidových sloučenin pro podání do dolního respiračního traktu jsou popsány v U.S. patentech č. 5287656 a 5364838. Přihláška WO 96/19197 popisuje aerosolové prostředky různých peptidů vhodné pro zvýšenou absorpci sloučenin podle předkládaného vynálezu v dolních dýchacích cestách. Výhodně je pro sloučeniny podle předkládaného vynálezu použito orálního způsobu podání.

Další farmaceutické techniky mohou být použity pro kontrolu trvání účinku. Přípravky s kontrolovaným uvolňováním mohou být vyrobeny pomocí polymerů pro tvorbu komplexů nebo pro absorpci aktivní sloučeniny použité v předkládaném vynálezu. Prodloužené trvání účinku může být dosaženo výběrem vhodných makromolekul, například polyesterů, polyaminokyselin, polyvinylpyrrolidonu, ethylenvinylacetátu, methylcelulosity, karboxymethylcelulosity nebo protaminsulfátu a volbou koncentrace makromolekul, stejně jako techniky inkorporace sloučenin. Jinou možnou metodou pro prodloužení trvání účinku prostředků s kontrolovaným uvolňováním

je inkorporace aktivní sloučeniny použité v předkládaném vynálezu do částic polymerického materiálu jako jsou polyestery, polyaminokyseliny, hydrogely, poly(mléčná kyselina) nebo kopolymery ethylenvinylacetátu. Alternativně, místo inkorporace sloučenin do těchto polymerických částic je možné vložit sloučeninu použitou v předkládaném vynálezu do mikrokapslí, připravených například koacervatovou technikou nebo mezifázovou polymerizací, například do hydroxymethylcelulosových nebo želatinových mikrokapslí, v příslušném pořadí, nebo do koloidních systému pro podání léčiv, jako jsou například liposomy, albuminové mikrosféry, mikroemulze, nanočástice a nanokapsle nebo do makroemulsí. Takové postupy jsou uvedeny v Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

Dávka GLP-1, GLP-1 analogu nebo GLP-1 derivátu, nebo jejich aktivních fragmentů, účinná pro redukci tělesné hmotnosti určitého subjektu bude záviset na mnoha faktorech, mimo jiné na pohlaví subjektu, hmotnosti a věku subjektu, na příčině obezity, na způsobu podání a biodostupnosti, na persistenci podané sloučeniny v těle, na typu prostředku a na síle prostředku. Pokud je podání intermitentní, pak by měla být jednotlivá dávka upravena podle intervalu mezi dávkami a biodostupnosti podané sloučeniny. Pokud je podání kontinuální, pak je vhodná rychlost podání mezi 0,25 a 6 pmol/kg tělesné hmotnosti a minutu, výhodně mezi 0,5 a 1,2 pmol/kg/min. Odborníci v oboru jsou schopni titrovat dávku a rychlost podání prostředku obsahujícího GLP-1, GLP-1 analog nebo GLP-1 derivát nebo jejich aktivní fragmenty, pro dosažení požadovaného klinického výsledku, to znamená redukce tělesné hmotnosti.

Termín "farmaceuticky přijatelný" znamená vhodný pro podání u lidí, to znamená neobsahující toxické složky, nežádoucí kontaminující složky a podobně, a neinterferující s aktivitou

aktivních sloučenin obsažených v prostředku.

Předkládaný vynález bude nyní dále popsán pomocí jednotlivých příkladů, které jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nijak neomezují předkládaný vynález.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Čtyřem pacientů s diabetes mellitus nezávislým na inzulinu (NIDDM) (3 muži, 1 žena, věk $60,2 \pm 1,8$ let; výchozí BMI $33,5 \pm 1,4$ kg/m²; výchozí tělesná hmotnost $97,5 \pm 6,5$ kg; výchozí obvod pasu/obvod boků $0,946 \pm 0,036$; výchozí HbA_{1c} $7,1 \pm 0,3\%$; glukosa v krvi na lačno $7,2 \pm 1,1$ mM) se podává kontinuální, subkutání infuse GLP1(7-36)amidu po dobu 4 týdnů. Roztoky GLP-1 se připraví kombinováním 100 nmol GLP-1(7-36)amidu a 0,025 ml roztoku lidského albuminu (20%), potom upravením pH na 4 za použití 5 molární kyseliny octové a nakonec úpravou objemu na 1 ml pomocí normálního fyziologického roztoku. Roztok se podá rychlostí 1,2 pmol GLP-1/kg/min. Volumetrická rychlost podání Minimed pumpy (Minimed Europe, Paris) použitá k podání roztoku GLP-1 je 0,05 - 0,07 ml/h. Místem subkutáního podání je břicho.

Tato léčba pomocí GLP-1 se srovnává s dvoutýdenní intenzivní inzulinovou terapií před a po infusi GLP-1. Během insulinové léčby se inzulin podá subkutáně před každým jídlem (viz tabulka 1). Během infuse GLP-1 se nepodává žádný inzulin. Jak během insulinové terapie, tak během GLP-1 terapie dodržují pacienti standardní diabetickou dietu skládající se z - podle kalorického obsahu - přibližně 55% uhlovodanů, 30% tuku a 15% proteinů. Není dodržován žádný cvičební režim. Pacienti nejsou hospitalisováni a po celou dobu pokusu jsou ambulantními pacienty.

Během léčby GLP-1 došlo u čtyř pacientů k průměrné redukci tělesné hmotnosti $3,5 \pm 1,2$ kg, zatímco v průběhu prvních dvou týdnů intenzivní léčby insulinem došlo k redukci pouze $1,3 \pm 0,6$ kg a dokonce v průběhu dalších dvou týdnů intenzivní insulinové terapie došlo vzestupu tělesné hmotnosti. Všechny hodnoty jsou jednotlivé hodnoty, nebo průměr \pm SEM (směrodatná odchylka). Nejsou dostupná žádná data pro pacienta MP pro druhou periodu inzulinové léčby.

Tabulka 1: Protokoly insulinové léčby. Čtyři hodnoty představují dávku insulinu podanou podkožně (IU) každému pacientovi před čtyřmi denními jídly. První podávání insulinu předcházelo a druhé podávání insulinu následovalo po 4-týdenní léčbě GLP-1.

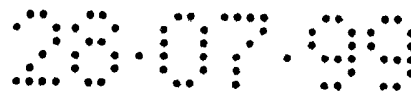
Pacient	První insulinová terapie (2 týdny)	Druhá insulinová terapie (2 týdny)
VN	47; 39; 35; 53	21; 20; 28; 26
NW	12; 13; 11; 12	11; 10; 12; 12
HF	11; 10; 12; 56	11; 10; 12; 12
MP	20; 14; 34; 30	

Tabulka 2: Hmotnost pacientů a změna hmotnosti.
GLP-1(7-36)amid byl podáván kontinuální subkutánní infusí po dobu 4 týdnů a bezprostředně před tím a potom proběhla dvoutýdenní intenzivní inzulínová terapie.

Pacient	Hmotnost pacienta (kg)			
	Počáteční	První 2-týdny insulinu	GLP-1 4 týdny	Druhé 2-týdny insulinu
VN	101,5	99,0	92,0	95,0
NW	113,5	111,0	108,0	108,0
HF	94,0	93,5	91,5	91,5
MP	82,0	81,9	80,0	-
	97,5±6,5	96,4±6,0	92,9±5,8	98,2±5,0

Tabulka 2 - pokračování

Pacient	Změna hmotnosti (kg)		
	První 2-týdny insulinu	GLP-1 4 týdny	Druhé 2-týdny insulinu
VN	-2,5	-7,0	3,0
NW	-2,0	-3,0	0,0
HF	-0,5	-2,0	0,0
MP	-0,1	-1,9	---
	-1,3±0,6	-3,5±1,2	+1,0±1,0



Odkazy:

- Abello, J., et al., *Endocrinol.* 134:2011-2017 (1994)
- American Diabetes Association, Detection and Management of Lipid Disorders in Diabetes, Consensus Statement, *Diabetes Care* 18:86-93 (1995)
- American Diabetes Association, Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus, Consensus Statement, *Diabetes Care* 18:8-15 (1995)
- Billock, B.P., et al., *Endocrinology* 137:2968-2978 (1996)
- Bioconjugate Chem.* "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990)
- Brown, et al. *Methods in Enzymology*, Academic Press, N.Y., 68:109-151 (1979)
- Brubaker, P.L. *Endocrinol.* 128:3175-3182 (1991)
- Buchan, A.M.J., et al., *Gastroenterol.* 93:791-800 (1987)
- Dugas, H. and Penney, C., *Biorganic Chemistry*, Springer-Verlag, New York, pp. 54-92 (1981)
- Fehmann, H.-C., et al., *Endocrinology* 130:159-166 (1992)
- Fehmann, H.-C., et al., *Endocr. Rev.* 16:390-410 (1995)
- Green, T.H., "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley, New York (1981)
- Gutniak M., et al., *New England J Med.* 326:1316-1322 (1992)
- Hashimoto et al., *Pharmaceutical Res.* 6(2):171-176 (1989)
- Kanse, S.M., et al., *FEBS Lett.* 241 209-212 (1988)
- Krcymann B., et al., *Lancet* 2:1300-1303 (1987)
- Krcymann, B., et al., *Brain Research* 502:325-331 (1989)



- Kreuger, et al. in *Protein Folding*, Gierasch and Anfinsen, eds., pgs 136-142, American Association for the Advancement of Science Publication No. 89-185, Washington, D.C. (1990)
- Lund, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:345-349 (1982)
- Maniatis et al. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3 (1989)
- Mentlein, R., et al., *Eur. J. Biochem.*, 214:829-835 (1993)
- Merrifield, J.M., *Chem. Soc.*, 85:2149 (1962)
- Mojsov, S., et al., *J. Biol. Chem.* 261:11880-11889 (1986)
- Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research*, 40:333-343 (1992)
- Morley, J.E., *Endocr. Rev.* 8:256-287 (1987)
- Nauck, M. A. et al., *J. Clin. Invest.* 91:301-307 (1993)
- Nilsson, O., et al., *Endocrinol.* 129:139-148 (1991)
- Oben, J. et al., *J Endocrinol.* 130:267-272 (1991)
- Orskov, C., et al., *Endocrinol.* 119:1467-1475 (1986)
- Orskov, C., et al., *J. Biol. Chem.* 264(22):12826-12829 (1989)
- Orskov, C., et al., *Diabetologia* 38 (Suppl. 1, Abstract):A39 (1995)
- Orskov, C., et al. *Diabetes* 45:832-835 (1996)
- O'Shea, et al., *NeuroReport* 7:830-832 (1996)
- Plaisancie, P., et al., *Endocrinol.* 135:2398-2403 (1994)
- The Promega Biological Research Products Catalogue*
Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399 (1992)
- Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London and New York (1973)
- Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980)

200799

- Rowland, N.E., et al., *Nutrition* 12:626-639 (1996)
- Ruiz-Grande, C., et al., *Peptides* 13:13-16 (1992)
- Schröder and Lübke, "The Peptides", Vol. I, Academic Press London and New York (1965)
- Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco pp. 24-66 (1969)
- Stewart, J. M., et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company Press, (1984)
- The Stratagene Cloning Systems Catalogue* Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037 (1992)
- Suzuki, S., et al. *Endocrinol.* 125:3109-3114 (1989)
- Thorens, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8641-8645 (1992)
- Thorens, B., et al., *Diabetes* 42:1678-1682 (1993)
- Turton, M.D., et al., *Nature* 379:69-72 (1996)
- U.S. Patent No. 4,710,473
- U.S. Patent No. 4,923,967
- U.S. Patent No. 5,118,666
- U.S. Patent No. 5,120,712
- U.S. Patent No. 5,284,656
- U.S. Patent No. 5,364,838
- U.S. Patent No. 5,512,549
- U.S. Patent No. 5,523,549
- U.S. Patent No. 5,545,618
- Valverde, I., et al. *Endocrinology* 132:75-79 (1993)
- Villanueva, M.L., et al., *Diabetologia* 37:1163-1166 (1994)
- Widmann, C., et al., *Mol. Pharmacol.* 45:1029-1035 (1994)
- WO 91/11457 (Buckley, D.I., et al., published August 8, 1991)

28.07.99

WO 96/19197

WO 96/25487 (Thorens, B. *et al.*, published August 22,
1996)

WO 96/29342

WO 97/31943 (Thim, L. *et al.*, published September 4,
1997)

Patentové nároky

1. Použití prostředku obsahujícího glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

2. Použití prostředku obsahujícího glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát pro přípravu léčiva k léčbě obezity.

3. Použití prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující GLP-1, analogy GLP-1, deriváty GLP-1, agonisty receptoru pro GLP-1, agonisty signální přenosové kaskády pro GLP-1, sloučeniny, které stimulují syntezu endogenního GLP-1, sloučeniny, které stimulují uvolňování endogenního GLP-1, nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

4. Použití podle nároku 3 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující GLP-1, analogy GLP-1, deriváty GLP-1 a jejich farmaceuticky přijatelné soli pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

5. Použití podle nároku 3 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro periferně parenterální podání k redukci tělesné hmotnosti.

6. Použití podle nároku 5 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro intravenosní podání k redukci tělesné hmotnosti.

7. Použití podle nároku 6 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro subkutánní podání k redukci tělesné hmotnosti.

8. Použití podle nároku 3, 5, 6 nebo 7 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro kontinuální podání k redukci tělesné hmotnosti.

9. Použití podle nároku 8 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro kontinuální podání rychlostí mezi 0,25 a 6 pmol/kg/min k redukci tělesné hmotnosti.

10. Použití podle nároku 8 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro kontinuální podání rychlostí mezi 0,6 a 2,4 pmol/kg/min k redukci tělesné hmotnosti.

11. Použití podle nároku 6 prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující látky podle nároku 3 pro přípravu léčiva pro intravenózní přerušované podání k redukci tělesné hmotnosti.

12. Použití podle nároku 3 prostředku obsahujícího sloučeninu, kterou je GLP-1(7-36)amid nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl, pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

13. Použití podle nároku 3 prostředku obsahujícího sloučeninu, kterou je Val⁸-GLP-1(7-37)OH nebo jeho

farmaceuticky přijatelná sůl, pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

14. Použití prostředku obsahujícího sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující agonisty receptoru pro GLP-1, agonisty signální přenosové kaskády pro GLP-1, sloučeniny, které stimulují syntezu endogenního GLP-1, sloučeniny, které stimulují uvolňování endogenního GLP-1, a jejich farmaceuticky přijatelné soli, pro přípravu léčiva k redukci tělesné hmotnosti.

15. Farmaceutický prostředek použitelný pro redukci tělesné hmotnosti, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje glukagonu podobný peptid-1 nebo jeho analog nebo derivát nebo aktivní fragment.