

Ця заявка претендує на пріоритет за тимчасовою заявкою США №60/212,171, яку було подано 16 червня 2000 року, та тимчасовою заявкою США №60/240,349, яку було подано 13 жовтня 2000 року.

Глюкагоноподібний пептид 1 (GLP-1) є пептидом, до складу якого входять 37 амінокислот, і який секретується L-клітинами кишечника у відповідь на приймання їжі усередину. Було встановлено, що цей пептид стимулює секретування інсуліну (інсулінотропна дія), наслідком чого є поглинання глюкози клітинами та зменшення рівнів глюкози у сироватці (дивись, наприклад, Мойсов С (Mojsos S.), Int. J. Peptide Protein Research, 40: 333-343 (1992)). Однак GLP-1(1-37) має низьку активність, і увагу було зосереджено на укорочених аналогах, які називають сполуками GLP, і які є біологічно набагато ефективнішими, аніж GLP-1. Прикладами є GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH та Ser<sup>34</sup>-GLP-1(7-37)OH. Завдяки своїй здатності до стимулювання секреції інсуліну, сполуки GLP демонструють великий потенціал як засоби для лікування діабету, ожиріння та споріднених станів.

Сполуки GLP-1 можуть існувати як мінімум у двох різних формах. Перша форма є фізіологічно активною і легко розчиняється у водному розчині при фізіологічному pH (7,4). У протилежність до цього, друга форма має незначну або зовсім не має інсулінотропної активності і є по суті нерозчинною у воді при pH 7,4. На жаль, неактивна форма легко утворюється у тому разі, коли водні розчини GLP-1 збовтуються, опиняються на гідрофобних поверхнях або мають великі поверхні розділу повітря/вода. Схильність до перетворення на нерозчинну форму значно ускладнює одержання комерційних кількостей активних сполук GLP-1; операції змішування або безперервного руху через насос є розповсюдженими операціями у процесах масового виробництва, і ці операції викликають збовтування, утворення поверхонь розділу повітря/вода та/або контактування з гідрофобними поверхнями, наслідком чого є утворення нерозчинної форми. Перетворення на неактивну форму може також відбуватись під час збереження або після введення пацієнту, що додатково ускладнює застосування цих сполук як лікарських засобів. Таким чином, існує велика потреба у біологічно активних аналогах GLP-1, які, порівняно з доступними на цей час сполуками GLP-1, не так легко перетворюються на нерозчинну форму.

Було встановлено, що ряд аналогів GLP-1 з модифікаціями у одному або декількох із наведених далі положень: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 або 37, демонструє значно зменшену схильність до агрегації, порівняно з GLP-1(7-37)OH.

Багато з цих аналогів зберігають здатність до активації рецептора GLP-1, яка є порівнянною, а у деяких випадках і перевищує відповідну здатність відомих сполук GLP-1, таких як GLP-1(7-37)OH та Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH. Наприклад, час агрегації Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH більше ніж у двадцять разів перевищує час агрегації GLP-1(7-37)OH, а його здатність до активації рецептора GLP-1 є майже на 25% більшою, ніж відповідний показник GLP-1(7-37)OH. Виходячи з цих відкриттів, у цьому описі розкривають нові сполуки GLP-1 та способи лікування з застосуванням нових сполук GLP-1.

Одним із варіантів втілення цього винаходу є поліпептид, який має амінокислотну послідовність формули I (Послідовність №1):

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Xaa<sub>11</sub>-Xaa<sub>12</sub>-Thr-Ser-Asp-Xaa<sub>16</sub>-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Xaa<sub>24</sub>-Ala-Xaa<sub>26</sub>-Xaa<sub>27</sub>-Phe-Ile-Ala-Xaa<sub>31</sub>-Leu-Xaa<sub>33</sub>-Xaa<sub>34</sub>-Xaa<sub>35</sub>-Xaa<sub>36</sub>-R.

формула I (Послідовність №1),

де:

Xaa<sub>8</sub> - Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;

Xaa<sub>11</sub> - Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys або His;

Xaa<sub>12</sub> - His, Trp, Phe або Tyr;

Xaa<sub>16</sub> - Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu або Ala;

Xaa<sub>22</sub> - Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys або цистеїнова кислота;

Xaa<sub>23</sub> - His, Asp, Lys, Glu або Gln;

Xaa<sub>24</sub> - Glu, His, Ala або Lys;

Xaa<sub>26</sub> - Asp, Lys, Glu або His;

Xaa<sub>27</sub> - Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg або Lys;

Xaa<sub>30</sub> - Ala, Glu, Asp, Ser або His;

Xaa<sub>33</sub> - Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly або Glu;

Xaa<sub>34</sub> - Glu, Lys або Asp;

Xaa<sub>35</sub> - Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His або Glu;

Xaa<sub>36</sub> - Arg, Glu або His;

R - Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH<sub>2</sub>, Gly, Gly-Pro, або Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, або видаляється,

за умови, що згаданий поліпептид не має послідовності GLP-1(7-37)OH або GLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub>, та за умови, що згаданий поліпептид не є Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Leu<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Leu<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ile<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Ile<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Thr<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH або Thr<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ala<sup>11</sup>-Glp-1(7-37)OH, Ala<sup>11</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ala<sup>16</sup>-Glp-1(7-37)OH, Ala<sup>16</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ala<sup>27</sup>-Glp-1(7-37)OH, Ala<sup>27</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Glu<sup>27</sup>-Glp-1(7-37)OH, Glu<sup>27</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ala<sup>33</sup>-Glp-1(7-37)OH або Ala<sup>33</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>.

Іншим варіантом втілення цього винаходу є поліпептид, який має амінокислотну послідовність формули II (Послідовність №2):

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Xaa<sub>12</sub>-Thr-Ser-Asp-Xaa<sub>16</sub>-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Ala-Ala-Xaa<sub>26</sub>-Glu-Phe-Ile-Xaa<sub>30</sub>-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa<sub>35</sub>-Arg-R

формула II (Послідовність №2),

де: Xaa<sub>8</sub> - Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;

Xaa<sub>12</sub> - His, Tip, Phe або Tyr;

Xaa<sub>16</sub> - Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu або Ala;

Xaa<sub>22</sub> - Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys або цистеїнова кислота;  
Xaa<sub>23</sub> - His, Asp, Lys, Glu або Gln;  
Xaa<sub>26</sub> - Asp, Lys, Glu або His;  
Xaa<sub>30</sub> - Ala, Glu, Asp, Ser або His;  
Xaa<sub>35</sub> - Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His або Glu;  
R - Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH<sub>2</sub>, Gly, Gly-Pro, або  
Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, або видаляється,

за умови, що згаданий поліпептид не має послідовності GLP-1(7-37)OH або GLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub>, та за умови, що згаданий поліпептид не є Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Leu<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Leu<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ile<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Ile<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Thr<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Thr<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ala<sup>16</sup>-GLP(7-37)OH або Ala<sup>16</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>.

Іншим варіантом втілення цього винаходу є поліпептид, який має амінокислотну послідовність формули III (Послідовність №3):

His-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-  
Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Xaa<sub>23</sub>-Ala-Ala-Lys-Xaa<sub>27</sub>-Phe-Ile-  
Xaa<sub>30</sub>-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

формула III (Послідовність №3),

де:

Xaa<sub>8</sub> - Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;  
Xaa<sub>22</sub> - Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys або цистеїнова кислота;  
Xaa<sub>23</sub> - His, Asp, Lys, Glu або Gln;  
Xaa<sub>27</sub> - Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg або Lys;  
Xaa<sub>30</sub> - Ala, Glu, Asp, Ser або His;

R - Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH<sub>2</sub>, Gly, Gly-Pro, або Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, або видаляється,

за умови, що згаданий поліпептид не має послідовності GLP-1(7-37)OH або GLP-1(7-36)-NH<sub>2</sub>, та за умови, що згаданий поліпептид не є Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Gly<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Val<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Leu<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Leu<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ile<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Ile<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Ser<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Thr<sup>8</sup>-GLP-1(7-37)OH, Thr<sup>8</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Ala<sup>16</sup>-Glp-1(7-37)OH, Ala<sup>16</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>, Glu<sup>27</sup>-Glp-1(7-37)OH або Glu<sup>27</sup>-Glp-1(7-36)NH<sub>2</sub>.

Іншим варіантом втілення цього винаходу є поліпептид, який має амінокислотну послідовність формули IV (Послідовність №4):

Xaa<sub>7</sub>-Xaa<sub>8</sub>-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-  
Ser-Tyr-Leu-Glu-Xaa<sub>22</sub>-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-  
Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R

(Послідовність №4),

де:

Xaa<sub>7</sub> - L-гістидин, D-гістидин, дезаміно-гістидин, 2-аміно-гістидин, β-гідрокси-гістидин, гомогістидин, α-фторметил-гістидин або α-метил-гістидин;

Xaa<sub>8</sub> - гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин або треонін. За варіантом, якому віддається перевага, Xaa<sub>8</sub> - гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, серин або треонін;

Xaa<sub>22</sub> - аспарагінова кислота, глутамінова кислота, глутамін, аспарагін, лізин, аргінін, цистеїн або цистеїнова кислота.

R - -NH<sub>2</sub> або Gly(OH).

Іншим варіантом втілення цього винаходу є сполука глюкагоноподібного пептиду-1(GLP-1), що у положенні 8 має іншу амінокислоту, ніж аланін, та у положенні 22 іншу амінокислоту, ніж гліцин.

Іншим варіантом втілення цього винаходу є спосіб стимулювання рецептора GLP-1 у суб'єкта, який потребує стимулювання рецептора GLP-1. Цей спосіб включає етап введення згаданому суб'єкту ефективної кількості сполук GLP-1, опис яких наведено, або поліпептиду, що має амінокислотну Послідовність №1, Послідовність №2, Послідовність №3, Послідовність №4.

Ще іншим варіантом втілення цього винаходу є сполуки GLP-1, опис яких наведено, або поліпептиду, що має амінокислотну Послідовність №1, Послідовність №2, Послідовність №3 або Послідовність №4 для застосування з метою стимулювання рецептора GLP-1 у суб'єкта, що потребує стимулювання рецептора GLP-1.

Сполуки GLP-1 за цим винаходом зберігають здатність до активації рецептора GLP-1 і, на додаток до цього, мають зменшену схильність до агрегації, порівняно з іншими сполуками GLP-1. Як результат, розчини цих сполук можуть перемішуватись із мінімальним перетворенням на нерозчинну, неактивну форму. Ця перевага значно спрощує процес виготовлення. На додаток до цього, сподіваються, що після введення пацієнтам буде спостерігатись незначна або зовсім не буде відбуватись агрегація in vivo, що буде сприяти підвищенню активності та зведенню потенціалу несприятливих реакцій до мінімального рівня. На додаток до цього, ці сполуки GLP-1 є стійкими до розщеплення діамінопептидазою IV та зв'язують цинк, завдяки чому, як гадають, вони забезпечують пролонговану дію in vivo.

На Фіг.1 представлена амінокислотна послідовність Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №5), Val<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №6), Val<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №7) та Val<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №8).

На Фіг.2 представлена амінокислотна послідовність Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №9), Gly<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №10), Gly<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №11) та Gly<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №12).

На Фіг.3 представлена амінокислотна послідовність Val<sup>8</sup>-Glu<sup>30</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №13), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>30</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №14), Val<sup>8</sup>-His<sup>37</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №15), та Gly<sup>8</sup>-His<sup>37</sup>-GLP-

1(7-37)ОН (Послідовність №16).

На Фіг.4 представлена амінокислотна послідовність Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Ala<sup>27</sup>-GLP-1(7-37)ОН (Послідовність №17) та Val<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-Glu<sup>23</sup>-GLP-1(7-37)ОН (Послідовність №18).

Сполука GLP-1 є поліпептидом, що має від приблизно двадцяти п'яти до приблизно тридцяти дев'яти амінокислот, які зустрічаються або не зустрічаються за природних умов, та має достатню гомологію з GLP-1(7-37)ОН, завдяки чому вона демонструє інсулінотропну активність. Прикладами амінокислот, які не зустрічаються за природних умов, є α-метиламінокислоти (наприклад, α-метилаланін), D-амінокислоти, гістидиноподібні амінокислоти (наприклад, 2-аміно-гістидин, β-гідрокси-гістидин, гомогістидин, α-фторметил-гістидин та α-метил-гістидин), амінокислоти, що мають зайвий метилен у боковому ланцюзі ("гомо" амінокислоти), та амінокислоти, у яких карбоксильна функціональна група у боковому ланцюзі замінюється на сульфокислотну групу (наприклад, цистеїнова кислота). За варіантом, якому віддається перевага, однак, до складу сполук GLP-1 за цим винаходом входять лише амінокислоти, які зустрічаються за природних умов, за виключенням конкретно обумовлених випадків, які наводяться у цьому описі.

До складу сполуки GLP-1, як правило, входить поліпептид, що має амінокислотну послідовність GLP-1(7-37)ОН, аналогу GLP-1(7-37)ОН, фрагмента GLP-1(7-37)ОН або фрагмента аналогу GLP-1(7-37)ОН. GLP-1(7-37)ОН має амінокислотну послідовність №19:

<sup>7</sup>His-Ala-Glu-<sup>10</sup>Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-<sup>15</sup>Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-<sup>20</sup>Leu-Glu-Gly-  
Gln-Ala-<sup>25</sup>Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-<sup>30</sup>Ala-Trp-Leu-Val-Lys-<sup>35</sup>Gly-Arg-<sup>37</sup>Gly  
(Послідовність №19)

Як прийнято у цій галузі, амінокінцевий залишок GLP-1(7-37)ОН має цифрове позначення 7, карбоксильний кінець має цифрове позначення 37. Інші амінокислоти поліпептиду нумеруються послідовно, як показано на Послідовності №19. Наприклад, положення 12 - фенілаланін, положення 22 - гліцин. У разі відсутності конкретних визначень, С-кінець має традиційну карбоксильну форму.

"Фрагмент GLP-1" є поліпептидом, який одержують після зрізання однієї або декількох амінокислот із N-кінця та/або С-кінця GLP-1(7-37)ОН або аналогу GLP-1(7-37)ОН. Номенклатура, яку було використано для опису GLP-1(7-37)ОН, розповсюджується і на фрагменти GLP-1. Наприклад, GLP-1(9-36)ОН означає фрагмент GLP-1, який одержали зрізанням двох амінокислот із N-кінця та однієї амінокислоти з С-кінця. Амінокислоти фрагмента позначаються тими ж самими числами, що і відповідна амінокислота у GLP-1(7-37)ОН. Наприклад, N-кінцева глутамінова кислота GLP-1(9-36)ОН знаходиться у положенні 9; положення 12 займається фенілаланіном; і положення 22 займається гліцином, як і у GLP-1(7-37)ОН.

"Сполука GLP-1" включає також поліпептиди, у яких до N-кінця та/або С-кінця GLP-1(7-37)ОН або його фрагментів було додано одну або декілька амінокислот. Сполуки GLP-1 цього типу мають до приблизно тридцяти дев'яти амінокислот. Амінокислоти "подовженої" сполуки GLP-1 позначаються таким же самим числом, що і відповідна амінокислота GLP-1(7-37)ОН. Наприклад, N-кінцева амінокислота сполуки GLP-1, яку одержали шляхом додання двох амінокислот до N-кінця GLP-1(7-37)ОН, знаходиться у положенні 5; і С-кінцева амінокислота сполуки GLP-1, яку одержали шляхом додання однієї амінокислоти до С-кінця GLP-1(7-37)ОН, знаходиться у положенні 38. Таким чином, у обох цих "подовжених" сполук GLP-1, як і у GLP-1(7-37)ОН, положення 12 зайняте фенілаланіном і положення 22 зайняте гліцином. Амінокислоти 1-6 подовженої сполуки GLP-1, за варіантом, якому віддається перевага, є тими ж самими або консервативною заміною амінокислоти у відповідному положенні GLP-1(7-37)ОН. Амінокислоти 38-45 подовженої сполуки GLP-1, за варіантом, якому віддається перевага, є тими ж самими або консервативною заміною амінокислоти у відповідному положенні глюкагону або ексендину-4.

"Аналог GLP-1" має достатню гомологію із GLP-1(7-37)ОН або фрагментом GLP-1(7-37)ОН, завдяки чому згаданий аналог має інсулінотропну активність. За варіантом, якому віддається перевага, аналог GLP-1 має амінокислотну послідовність GLP-1(7-37)ОН або його фрагмента, модифіковану таким чином, що за однією, двома, трьома, чотирма або п'ятьма амінокислотами відрізняється від амінокислоти у відповідному положенні GLP-1(7-37)ОН або фрагмента GLP-1(7-37)ОН. За номенклатурою, яку використано у цьому описі для позначення сполук GLP-1, заміна амінокислоти та її положення вказується перед батьківською структурою. Наприклад, Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)ОН означає сполуку GLP-1, у якій гліцин, що за нормальних обставин знаходиться у положенні 22 GLP-1(7-37)ОН, було замінено на глутамінову кислоту; Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)ОН означає сполуку GLP-1, у якій аланін, що за нормальних обставин знаходиться у положенні 8, та гліцин, що за нормальних обставин знаходиться у положенні 22 GLP-1(7-37)ОН, було замінено на валін та глутамінову кислоту, відповідно.

N-кінець сполуки GLP-1 є, взагалі, незаміщеним, однак може також алкілюватись або ацилюватись (за варіантом, якому віддається перевага, C1-C20). С-кінець може бути незаміщеним, як у разі із GLP-1(7-37)ОН, амідуватись -NH<sub>2</sub>, -NHR або NRR', або естерифікуватись -OR". R та R' - незалежно алкільна або ацильна групи (за варіантом, якому віддається перевага, C1-C20). R" - алкіл (C1-C20). GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> є прикладом "амідованої сполуки GLP". За варіантом, якому віддається перевага, сполуки GLP-1 за цим винаходом мають С-кінець, який є незаміщеним або заміщується -NH<sub>2</sub>.

За варіантом, якому віддається перевага, сполуки GLP-1 за цим винаходом включають аналоги GLP-1 або фрагменти аналогів GLP-1, де до складу остову таких аналогів або фрагментів у положенні 8 входить інша амінокислота, аніж аланін (аналоги за позицією 8). Остов може включати також L-гістидин, D-гістидин або модифіковані форми гістидину, такі як дезаміно-гістидин, 2-аміно-гістидин, β-гідрокси-гістидин, гомогістидин, α-фторметил-гістидин або α-метил-гістидин у положенні 7. Перевага віддається тому, щоб ці аналоги за позицією 8 включали одну або декілька додаткових змін у положеннях 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 та 37, порівняно з відповідною амінокислотою нативного GLP-1(7-37)ОН. Ще більша перевага віддається тому, щоб ці аналоги за позицією 8 включали одну або декілька додаткових змін у положеннях 12, 16, 22, 23, 26, 30, 35 та 37, порівняно з відповідною амінокислотою нативного GLP-1(7-37)ОН. Навіть ще більша перевага віддається тому, щоб ці аналоги за позицією 8 включали одну або декілька додаткових змін у положеннях 22, 23, 27, 30 та 37, порівняно з відповідною амінокислотою нативного GLP-1(7-37)ОН.

Перевага віддається також тому, щоб ці аналоги мали 6 або менше змін, порівняно з відповідними амінокислотами нативного GLP-1(7-37)ОН. Аналоги, яким віддається більша перевага, мають 5 або менше змін, порівняно з відповідними амінокислотами нативного GLP-1(7-37)ОН або мають 4 чи менше змін, порівняно з відповідними амінокислотами нативного GLP-1(7-37)ОН. Ще більша перевага віддається тому, щоб ці аналоги мали 3 або менше змін, порівняно з відповідними амінокислотами нативного GLP-1(7-37)ОН. Найбільша перевага віддається тому, щоб ці аналоги мали 2 або менше змін, порівняно з відповідними амінокислотами нативного GLP-1(7-37)ОН.

Було встановлено, що ці заміни зменшують схильність сполук GLP-1 до агрегації та утворення нерозчинної форми. Агрегація сполук GLP-1 за цим винаходом, взагалі, відбувається як мінімум у приблизно 5 разів повільніше, аніж GLP-1(7-37)ОН, у разі визначення, наприклад, за допомогою аналізу агрегації, опис якого наведено у Прикладі 3, за варіантом, якому віддається перевага, як мінімум у 20 разів повільніше, за варіантом, якому віддається більша перевага, як мінімум у 40 разів повільніше, за варіантом, якому віддається більша перевага, як мінімум у приблизно 50 разів повільніше, за варіантом, якому віддається ще більша перевага, у приблизно 60 разів повільніше, і за варіантом, якому віддається ще більша перевага, як мінімум у приблизно 65 разів повільніше. За варіантом, якому віддається перевага, сполуки GLP-1, опис яких наведено, є аналогами GLP-1(7-37)NH<sub>2</sub> або GLP-1(7-37)ОН.

За варіантом втілення, якому віддається перевага, амінокислота у положенні 22 сполуки GLP-1 за цим винаходом має бічний ланцюг, до складу якого входять як мінімум два атоми вуглецю та полярна або заряджена функціональна група. Включається аспарагінова кислота, яка має метилен та карбоксильний вуглець. За варіантом, якому віддається більша перевага, бічний ланцюг амінокислоти у положенні 22 є алкільною групою з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, до складу якої входять від двох до шести атомів вуглецю та заряджена функціональна група, наприклад, карбоксилотна група, аміногрупа, гуанідинова група або сульфокислотна група. Таким чином, прикладами амінокислот, яким віддається перевага, у положенні 22 є глутамінова кислота, аспарагінова кислота, аргінін та лізин. У разі, коли положення 22 є аспарагіновою кислотою, глутаміновою кислотою, аргініном або лізином, положення 8, за варіантом, якому віддається перевага, є гліцином, валіном, лейцином, ізолейцином, серином, треоніном або метіоніном, та за варіантом, якому віддається більша перевага, валіном або гліцином. Прикладом амінокислоти з сульфокислотною групою у бічному ланцюзі є цистеїнова кислота (-NH-CH(CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)-CO-, яка скорочено позначається як "Cys"). У разі, коли положення 22 є сульфоновною кислотою, такою як цистеїнова кислота, положення 8, за варіантом, якому віддається перевага, є гліцином, валіном, лейцином, ізолейцином, серином, треоніном або метіоніном, та за варіантом, якому віддається більша перевага, валіном або гліцином.

За іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, амінокислотою у положенні 8 за варіантом, якому віддається перевага, є гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін або метіонін, та за варіантом, якому віддається більша перевага, валін або гліцин, і положенням 30 є глутамінова кислота, аспарагінова кислота, серин або гістидин, та за варіантом, якому віддається більша перевага, глутамінова кислота.

За іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, амінокислотою у положенні 8 за варіантом, якому віддається перевага, є гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін або метіонін, та за варіантом, якому віддається більша перевага, валін або гліцин, і положенням 37 є гістидин, лізин, аргінін, треонін, серин, глутамінова кислота, аспарагінова кислота, триптофан, тирозин, фенілаланін, та за варіантом, якому віддається більша перевага, гістидин.

За іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, амінокислотою у положенні 8 є, за варіантом, якому віддається перевага, гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін або метіонін, та за варіантом, якому віддається більша перевага, валін або гліцин, і положенням 22 є глутамінова кислота, лізин, аспарагінова кислота або аргінін, та за варіантом, якому віддається більша перевага, глутамінова кислота або лізин, і положенням 23 є лізин, аргінін, глутамінова кислота, аспарагінова кислота та гістидин, та за варіантом, якому віддається більша перевага, лізин або глутамінова кислота.

За іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, амінокислотою у положенні 8 за варіантом, якому віддається перевага, є гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін або метіонін та за варіантом, якому віддається більша перевага, валін або гліцин, і положенням 22 є глутамінова кислота, лізин, аспарагінова кислота або аргінін, та за варіантом, якому віддається більша перевага, глутамінова кислота або лізин, і положенням 27 є аланін, лізин, аргінін, триптофан, тирозин, фенілаланін або гістидин, та за варіантом, якому віддається більша перевага, аланін.

За іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, сполуки GLP-1 за цим винаходом, мають амінокислоту у положенні 8 та одну, дві або три амінокислоти, які вибирають із групи, до складу якої входять положення 11, положення 12, положення 16, положення 22, положення 23, положення 24, положення 26, положення 27, положення 30, положення 33, положення 34, положення 35, положення 36 та положення 37, які відрізняються від амінокислоти у відповідному положенні нативного GLP-1(7-37)ОН.

За іншим варіантом втілення, якому віддається перевага, сполуки GLP-1 за цим винаходом мають одну або дві амінокислоти, на додаток до амінокислоти у положенні 8, які вибирають із групи, до складу якої входять положення 11, положення 12, положення 16, положення 22, положення 23, положення 24, положення 26, положення 27, положення 30, положення 33, положення 34, положення 35, положення 36 та положення 37, які відрізняються від амінокислоти у відповідному положенні нативного GLP-1(7-37)ОН.

Як описувалось перед тим, сполуки GLP-1 за цим винаходом можуть мати амінокислоти на додаток до амінокислот у положенні 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 та 37, які відрізняються від амінокислоти у відповідному положенні GLP-1(7-37) або фрагмента GLP-1(7-37). Амінокислотами, іншими, аніж амінокислоти у положеннях 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 та 37 сполуки GLP, які відрізняються від амінокислоти у відповідному положенні GLP-1(7-37)ОН, за варіантом, якому віддається перевага, є консервативні заміни та за варіантом, якому віддається більша перевага, висококонсервативні заміни.

За варіантом, якому віддається перевага, сполуки GLP-1 за цим винаходом мають нуль, одну, дві або три

амінокислоти на додаток до амінокислот у положеннях 8 та 22, які відрізняються від амінокислоти у відповідному положенні GLP-1(7-37)ОН або фрагмента GLP-1(7-37)ОН. У одному із прикладів, одна або декілька амінокислот у положеннях 7, 21 та 27 сполуки GLP-1 відрізняються від відповідної амінокислоти у GLP-1(7-37)ОН або фрагмента GLP-1(7-37)ОН, на додаток до амінокислот у положеннях 8 та 22.

За варіантом, якому віддається перевага, лише положення 7, 8 та 22 відрізняються від амінокислоти у відповідному положенні GLP-1(7-37)ОН (або його фрагмента). Очікують, що інші поліпшені сполуки GLP-1 зі зменшеними властивостями агрегування можуть бути одержані з відомих, біологічно активних сполук GLP-1 шляхом заміни гліцину у положенні 22 та за варіантом, якому віддається перевага, аланіну у положенні 8 цих сполук придатною амінокислотою, як описується тут. Відомі біологічно активні сполуки GLP-1 розкриваються у патенті США №5,977,071, який було видано на ім'я Гоффмана (Hoffmann) та інших, патенті США №5,545,618, який було видано на ім'я Баклі (Buckley) та інших, у роботі Адельхорста (Adelhorst) та інших у J. Biol. Chem., 269: 6275 (1994), які у повному обсязі включено до цього опису як посилання.

"Консервативною заміною" є заміна амінокислоти іншою амінокислотою, яка має такий же самий сумарний заряд електронів та приблизно такий же самий розмір та форму. Амінокислоти з аліфатичними або заміщеними аліфатичними амінокислотними бічними ланцюгами мають приблизно такий же самий розмір, коли загальна кількість атомів вуглецю та гетероатомів у їхніх бічних ланцюгах різняться не більше, ніж приблизно на чотири. Вони мають приблизно таку ж саму форму, коли кількість відгалужень у їхніх бічних ланцюгах різняться не більше, ніж на одне. Амінокислоти з фенільними або заміщеними фенільними групами у їхніх бічних ланцюгах розглядаються як такі, що мають приблизно однаковий розмір та форму. Далі наведено п'ять груп амінокислот. Наслідком заміни амінокислоти у сполуці GLP-1 іншою амінокислотою з тієї ж самої групи є консервативна заміна:

Група I: гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін, цистеїн та амінокислоти, які не зустрічаються за природних умов, з C1-C4 аліфатичними або C1-C4 гідроксилзаміщеними аліфатичними бічними ланцюгами (нерозгалуженими або монорозгалуженими).

Група II: глутамінова кислота, аспарагінова кислота та амінокислоти, які не зустрічаються за природних умов, з карбоксилотозаміщеними C1-C4 аліфатичними бічними ланцюгами (нерозгалуженими або з однією точкою розгалуження).

Група III: лізин, орнітин, аргінін та амінокислоти, які не зустрічаються за природних умов, з аміно- або гуанідинозаміщеними C1-C4 аліфатичними бічними ланцюгами (нерозгалуженими або з однією точкою розгалуження).

Група IV: глутамін, аспарагін та амінокислоти, які не зустрічаються за природних умов, з амідозаміщеними C1-C4 аліфатичними бічними ланцюгами (нерозгалуженими або з однією точкою розгалуження).

Група V: фенілаланін, фенілгліцин, тирозин та триптофан.

За виключенням конкретно обумовлених випадків, які наведено у цьому описі, консервативні заміни за варіантом, якому віддається перевага, здійснюються за допомогою амінокислот, які зустрічаються за природних умов.

"Висококонсервативною заміною" є заміна амінокислоти іншою амінокислотою, яка має таку ж саму функціональну групу у бічному ланцюзі та майже такий же самий розмір та форму. Амінокислоти з аліфатичними або заміщеними аліфатичними амінокислотними бічними ланцюгами мають майже такий же самий розмір, коли загальна кількість атомів вуглецю та гетероатомів у їхніх бічних ланцюгах різняться не більше, ніж на два. Вони мають майже таку ж саму форму, коли мають однакову кількість відгалужень у бічних ланцюгах. Прикладом висококонсервативних заміни є заміна лейцину валіном, серину треоніном, глутамінової кислоти аспарагіновою кислотою та фенілаланіну фенілгліцином. Прикладами заміни, які не є висококонсервативними, є заміна валіну аланіном, серину аланіном та серину аспарагіновою кислотою.

Одним із прикладів сполуки GLP-1 за цим винаходом є поліпептид, який має амінокислотну послідовність №1. За прикладом, якому віддається перевага, сполука GLP-1 є GLP-1(7-37)ОН, за виключенням того, що Xaa<sub>8</sub> є Gly або Val, Xaa<sub>22</sub> є Glu або Lys, та Xaa<sub>23</sub> є Glu або Lys. За іншим прикладом, сполука GLP-1 є GLP-1(7-37)ОН, за виключенням того, що Xaa<sub>8</sub> є Gly або Val та Xaa<sub>30</sub> є Glu. Додатковим прикладом є сполука GLP-1, яка є GLP-1(7-37)ОН, за виключенням того, що Xaa<sub>8</sub> є Gly або Val та Xaa<sub>37</sub> є His.

Іншим прикладом сполуки GLP-1 за цим винаходом є поліпептид, який має амінокислотну послідовність №4. За прикладом, якому віддається перевага, Xaa<sub>7</sub> - L-гістидин, D-гістидин, дезаміно-гістидин, 2-аміно-гістидин, β-гідрокси-гістидин, гомогістидин, α-фторметил-гістидин та α-метил-гістидин, Xaa<sub>8</sub> - гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин або треонін, та за варіантом, якому віддається перевага, гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, серин або треонін, R - -NH<sub>2</sub> або Gly(OH), та Xaa<sub>22</sub> - лізин, глутамінова кислота, аспарагінова кислота або аргінін у Послідовності №4. За прикладом, якому віддається більша перевага, Xaa<sub>7</sub> - L-гістидин, Xaa<sub>8</sub> - гліцин або валін, Xaa<sub>22</sub> - лізин, глутамінова кислота, аспарагінова кислота або аргінін, та R - Gly(OH). За альтернативним варіантом Xaa<sub>7</sub>, Xaa<sub>8</sub> та R у Послідовності №4 відповідають опису, який було наведено перед тим, та Xaa<sub>22</sub> - амінокислота з бічним ланцюгом, який включає сульфокислотну групу, наприклад, цистеїнову кислоту.

У іншому прикладі сполук GLP-1 за цим винаходом, амінокислотою у положенні 8 не є D-амінокислота і вона не має як бічний ланцюг, гліцину, серину, треоніну, цистеїну або бета-аланіну, коли амінокислота у положенні 22 має C1-C2 алкільний бічний ланцюг, C1-C2 гідроксилований алкільний бічний ланцюг або C1-C2 тіолований алкільний ланцюг (наприклад, цистеїн). У прикладі, якому віддається перевага, сполук GLP-1 за цим винаходом, амінокислотою у положенні 8 не є D-амінокислота і вона не має як бічний ланцюг, гліцину, серину, треоніну, цистеїну або бета-аланіну, коли амінокислота у положенні 22 має C1-C4 алкільний бічний ланцюг, C1-C4 гідроксилований алкільний бічний ланцюг або C1-C4 тіолований алкільний ланцюг.

У іншому прикладі сполук GLP-1 за цим винаходом, амінокислотою у положенні 8 є гліцин, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, серин, треонін, цистеїн, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, аргінін, аспарагін, глутамін, фенілаланін, тірозин, гістидин або триптофан; і амінокислотою у положенні 22 є аспарагінова кислота, глутамінова кислота, лізин, аргінін, аспарагін, глутамін або гістидин.

Конкретними прикладами сполук GLP-1 за цим винаходом є Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №20), Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №21), Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №22), Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №23), Cys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №24), Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №5), Val<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №6), Val<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №7), Val<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №8), Val<sup>8</sup>-Cys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №25), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №9), Gly<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №10), Gly<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №11), Gly<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №12), Gly<sup>8</sup>-Cys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №26), Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №27), Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №28), Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №29), Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №30), Cys<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №31), Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №32), Val<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №33), Val<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №34), Val<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №35), Val<sup>8</sup>-Cys<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №36), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №37), Gly<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №38), Gly<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №39), Gly<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №40) та Gly<sup>8</sup>-Cys<sup>22</sup>-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Послідовність №41), Val<sup>8</sup>-Lys<sup>23</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №42), Val<sup>8</sup>-Ala<sup>27</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №43), Val<sup>8</sup>-Glu<sup>30</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №44), Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>30</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №45), Val<sup>8</sup>-His<sup>35</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №46), Val<sup>8</sup>-His<sup>37</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №47), Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Lys<sup>23</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №48), Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Glu<sup>23</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №49), Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-Ala<sup>27</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №50), Val<sup>8</sup>-Gly<sup>34</sup>-Lys<sup>35</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №51), Val<sup>8</sup>-His<sup>37</sup>-GLP-1(7-37)OH (Послідовність №52), Gly<sup>8</sup>-His<sup>37</sup>-GLP-1(7-36)OH (Послідовність №53).

Як використано у цьому описі, термін "сполука GLP-1" включає також фармацевтично прийнятні солі сполук, опис яких наведено. Сполука GLP-1 за цим винаходом може мати достатньо кислу, достатньо основну або обидві функціональні групи, і відповідно реагувати з будь-якою з цілого ряду неорганічних основ та неорганічних і органічних кислот з утворенням солі. Кислотами, які традиційно використовують для одержання солей, що одержують доданням кислот, є неорганічні кислоти, такі як хлористоводнева кислота, бромистоводнева кислота, йодистоводнева кислота, сірчана кислота, фосфорна кислота тощо, та органічні кислоти, такі як р-толуолсульфонова кислота, метансульфонова кислота, шавлева кислота, р-бромфенілсульфонова кислота, вугільна кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, бензойна кислота, оцтова кислота тощо. Прикладами таких солей є сульфат, піросульфат, бісульфат, сульфід, бісульфід, фосфат, моногідрофосфат, дигідрофосфат, метафосфат, пірофосфат, хлорид, бромід, йодид, ацетат, пропіонат, деканоат, каприлат, акрилат, форміат, ізобутират, капроат, гепаноат, пропіолат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себацат, фумарат, малеат, бутин-1,4-діоат, гексин-1,6-діоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динітробензоат, гідроксибензоат, метоксibenзоат, фталат, сульфонат, ксилосульфонат, фенілацетат, фенілпропіонат, фенілбутират, цитрат, лактат, гамма-гідроксибутират, гліколят, тартрат, метансульфонат, пропансульфонат, нафталін-1-сульфонат, нафталін-2-сульфонат, манделат тощо.

Солями, які одержують доданням основи, є солі, одержані за допомогою неорганічних основ, таких як гідроксиди, карбонати, бікарбонати амонію, лужних або лужноземельних металів тощо. До таких основ, придатних для одержання солей за цим винаходом, таким чином, належать гідроксид натрію, гідроксид калію, гідроксид амонію, карбонат калію тощо.

Сполуки GLP-1 можуть застосовуватись для лікування суб'єктів із різноманітними хворобами та станами. Припускають, що сполуки GLP-1, у тому числі сполуки за цим винаходом, здійснюють свій біологічний вплив шляхом дії на рецептор, який називають "рецептором GLP-1" (дивись патент США №5,670,360, який було видано на ім'я Торренса (Thorrens)). Суб'єкти із хворобами та/або станами, які сприятливо реагують на стимуляцію рецептора GLP-1 або на введення сполук GLP-1, можуть, таким чином, лікуватись сполуками GLP-1 за цим винаходом. Про цих суб'єктів кажуть, що вони "потребують лікування сполуками GLP-1" або "потребують стимулювання рецептора GLP-1". До їх числа належать суб'єкти з інсуліннезалежним діабетом, інсуліннезалежним діабетом, інсультом (дивись WO 00/16797 на ім'я Ефендік (Efendic)), інфарктом міокарда (дивись WO 98/08531 на ім'я Ефендік (Efendic)), ожирінням (дивись WO 98/19698 на ім'я Ефендік (Efendic)), катаболічними змінами після оперативного втручання (дивись патент США №6,006,753 на ім'я Ефендік (Efendic)), функціональною диспепсією та синдромом подразненої товстої кишки (дивись WO 99/64060 на ім'я Ефендік (Efendic)). Сюди входять також суб'єкти, які потребують профілактичного лікування сполукою GLP-1, наприклад, суб'єкти з ризиком розвитку інсуліннезалежного діабету (дивись WO 00/07617). Суб'єкти зі зниженою толерантністю до глюкози або зі зниженим рівнем глюкози крові натщесерце, суб'єкти, маса тіла яких на приблизно 25% перевищує нормальну масу тіла для зросту та статури суб'єкта, суб'єкти з частковою резекцією підшлункової залози, суб'єкти, які мають одного або більше батьків з інсуліннезалежним діабетом, суб'єкти, які мають діабет вагітних та суб'єкти, які перенесли гострий або хронічний панкреатит, знаходяться у стані ризику розвитку інсуліннезалежного діабету.

"Ефективною кількістю" сполуки GLP-1 є кількість, що викликає бажаний терапевтичний та/або профілактичний ефект без спричинення неприємних побічних ефектів у разі введення суб'єкту, який потребує стимулювання рецептора GLP-1. "Бажаний терапевтичний ефект" включає один або декілька з наведених далі пунктів: 1) поліпшення симптому (симптомів), який пов'язується із хворобою або станом; 2) затримка появи симптомів, які пов'язуються із хворобою або станом; 3) підвищена тривалість життя, порівняно з відсутністю лікування; та 4) вища якість життя, порівняно з відсутністю лікування. Наприклад, "ефективною кількістю" сполуки GLP-1 для лікування діабету є кількість, яка забезпечить більший контроль за концентрацією глюкози у крові, аніж за відсутності лікування, наслідком чого буде затримка появи діабетичних ускладнень, таких як ретинопатія, нейропатія або хвороба нирок. "Ефективною кількістю" сполуки GLP-1 для запобігання діабету є кількість, яка забезпечить затримку, порівняно з відсутністю лікування, появи підвищених рівнів глюкози у крові, які потребують лікування антигіпоглікемічними лікарськими засобами, такими як сульфонілсечовина, тіазолідиніони, інсулін та/або бісгуанідини.

"Ефективна кількість" сполуки GLP-1 для введення суб'єкту буде залежати також від типу та тяжкості

хвороби та від характеристик суб'єкта, таких як загальний стан здоров'я, вік, стать, маса тіла та толерантність до лікарських засобів. Досвідчений фахівець зможе визначити відповідні дозування у залежності від цих та інших факторів. Як правило, терапевтично ефективна кількість сполуки GLP-1 може коливатись у межах від приблизно 0,01мг/день до приблизно 100мг/день для дорослої особи. За варіантом, якому віддається перевага, доза коливається у межах від приблизно 0,1мг/день до приблизно 100мг/день, за варіантом, якому віддається більша перевага, від приблизно 1,0мг/день до приблизно 10мг/день.

Сполуки GLP-1 за цим винаходом можуть, наприклад, вводиться перорально, інтраназально, інгаляційним шляхом або парентерально. Парентеральне введення може включати, наприклад, системне введення, таке як внутрішньом'язове, інтравенозне, підшкірне або внутрішньоочеревинне впорскування. Сполуки GLP-1 можуть вводиться суб'єкту разом із прийнятим фармацевтичним носієм, розріджувачем або наповнювачем як частина фармацевтичної композиції для лікування хвороб, які обговорювались перед тим. Фармацевтична композиція може бути розчином, або, у разі парентерального введення, суспензією сполуки GLP-1, або суспензією сполуки GLP-1 у комплексі із двовалентним катіоном металу, як описується далі. До складу придатних фармацевтичних носіїв можуть входити інертні інгредієнти, які не взаємодіють із пептидом або похідною пептиду. Можуть застосовуватись стандартні технології виготовлення лікарського засобу, наприклад, такі, опис яких наведено у Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, штат Пенсільванія. Придатними фармацевтичними носіями для парентерального введення є, наприклад, стерильна вода, фізіологічний сольовий розчин, бактеріостатичний сольовий розчин (сольовий розчин, до складу якого входить приблизно 0,9% бензилового спирту), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Хенкса, лактат Рінгера тощо. Деякими прикладами придатних наповнювачів є лактоза, декстроза, цукроза, трегалоза, сорбіт та маніт.

"Суб'єктом" є ссавець, за варіантом, якому віддається перевага, людина, однак ним може бути також тварина, наприклад, домашні тварини (наприклад, собаки, кішки тощо), сільськогосподарські тварини (наприклад, корови, вівці, свині, коні тощо) та лабораторні тварини (наприклад, пацюки, миші, морські свинки тощо).

Сполуки GLP-1 за цим винаходом можуть утворювати комплекси із придатним двовалентним катіоном металу. Комплекси двовалентного катіону металу зі сполуками GLP-1 є, взагалі, нерозчинними у водному розчині у межах фізіологічного рН. Таким чином, ці комплекси можуть вводиться підшкірно у вигляді суспензій та демонструвати зменшену швидкість виділення *in vivo*, завдяки чому продовжується тривалість дії сполуки. Прикладами придатних двовалентних катіонів металів є  $Zn^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Ni^{++}$  тощо. Перевага віддається  $Zn^{++}$ .

Для одержання комплексів між сполуками GLP-1 за цим винаходом та двовалентним катіоном металу, GLP-1 розчиняють у придатному буфері та у присутності солі металу. Суміш витримують з інкубуванням при температурі навколишнього середовища до випадення комплексу до осаду. Придатними буферними речовинами є ті, що підтримують діапазон рН суміші у межах від приблизно 3,0 до приблизно 9,0 і не перешкоджають проходженню реакції комплексоутворення. Прикладами є фосфатні буфери, ацетатні буфери, цитратні буфери та буфери Гуда, наприклад, ГЕПЕС-буфер, трис-буфер та трис-ацетатний буфер. Придатними солями металів є ті з них, у яких метал є доступним для комплексоутворення. Прикладами придатних солей цинку є хлорид цинку, ацетат цинку, оксид цинку та сульфат цинку. За варіантом, якому віддається перевага, двовалентна катіонна сіль металу, така як хлорид цинку, постачається з надлишком для забезпечення молярного співвідношення до приблизно 50 молекул двовалентного катіону металу на кожен молекулу, сполуки GLP-1.

"Інсулінотропна активність" означає стимулювання секреції інсуліну у відповідь на підвищені рівні глюкози, що забезпечує поглинання глюкози клітинами та зниження рівнів глюкози у сироватці. Інсулінотропна активність може визначатись за допомогою методів, відомих у цій галузі, у тому числі за допомогою експериментів *in vivo* та аналізів *in vitro*, за допомогою яких визначають зв'язувальну активність або активацію рецептора GLP-1, наприклад, за допомогою аналізів із використанням інсулоцитів підшлункової залози або клітин інсуліноми, як описано у EP 619,322 на ім'я Гелфанд (Gelfand) та інших, та патенті США №5,120,712, відповідно. Ці джерела у повному обсязі включено до цього опису як посилання.

Сполуки GLP-1 за цим винаходом можна одержувати за допомогою стандартних способів твердофазного синтезу пептидів. Синтезатори пептидів є комерційно доступними, наприклад, від компанії Applied Biosystems у Foster City, штат Каліфорнія. Реактиви для твердофазного синтезу є комерційно доступними, наприклад, від компанії Midwest Biotech (Fishers, штат Індіана). Твердофазні синтезатори пептидів можуть використовуватись за інструкціями виробника для блокування сторонніх груп, захисту амінокислоти, яка використовується у реакції, сполучення, порушення взаємодії та кепінгу амінокислот, які не вступили до реакції.

Як правило,  $\alpha$ -N-карбамоїлзахищену амінокислоту та N-кінцеву амінокислоту на пептидному ланцюгу, який збільшується на смолі, сполучають при кімнатній температурі у інертному розчиннику, такому як диметилформамід, N-метилпіролідон або метиленхлорид, у присутності сполучних речовин, таких як дициклогексилкарбодіімід та 1-гідроксibenзотриазол, та основи, такої як діізопропіл етил амін.  $\alpha$ -N-карбамоїлзахищену групу видаляють з одержаної пептидної смоли за допомогою такого, наприклад, реактиву, як трифтороцтова кислота або піперидин, і реакцію сполучення повторюють із другою необхідною N-захищеною амінокислотою, яка призначена для додання до пептидного ланцюга. Придатні амінозахисні групи є добре відомими у цій галузі і їх опис наведено, наприклад, у довіднику Гріна (Green) та Вутса (Wuts) "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1991, який у повному обсязі включено до цього опису як посилання. Прикладами є t-бутилоксикарбоніл (tBoc) та флуоренілметоксикарбоніл (Fmoc).

Пептиди також синтезують за стандартними протоколами автоматизованого твердофазного синтезу з використанням t-бутоксикарбоніл- або флуоренілметоксикарбоніл-альфа-амінокислот із відповідним захистом бічних ланцюгів. Після завершення синтезу, пептиди відщеплюють від твердофазної основи з одночасним позбавленням захисту бічних ланцюгів за стандартними способами з використанням фтороводню. Після цього неочищені пептиди додатково очищають шляхом хроматографування з оберненою фазою на колонках Vydac

C18 із застосуванням градієнтів ацетонітрилу у 0,1% трифтороцтової кислоти (TFA). Для видалення ацетонітрилу пептиди ліофілізують із розчину, до складу якого входять 0,1% TFA, ацетонітрил та вода. Чистота може перевірятись засобами аналітичного хроматографування з оберненою фазою. Ідентичність пептидів може перевірятись мас-спектрометрією. Пептиди можуть розчинятись у водних буферах при нейтральному pH.

Винахід ілюструється наведеними далі прикладами, які у жодному разі не є обмежувальними.

Приклад 1 - Одержання сполук GLP-1 за цим винаходом шляхом твердофазного синтезу з застосуванням t-Вос

До стандартного 60мл реактора вносили приблизно 0,5-0,6г (0,38-0,45ммоль) Вос Gly-поліакриламідної смоли і на синтезаторі пептидів Applied Biosystems AB1430A здійснювали реакцію подвійного сполучення. У процесі синтезу були використані наведені далі амінокислоти з захищеними бічними ланцюгами (2ммоль капсули з Вос амінокислотами), які одержали від компанії Midwest Biotech (Fishers, штат Індіана):

Arg-тозил (TOS), Asp- $\delta$ -циклогексильовий складний ефір (CHXL), Glu- $\delta$ -циклогексильовий складний ефір (CHXL), His-бензилоксиметил (BOM), Lys-2-хлорбензилоксикарбоніл (2C1-Z), Met-сульфоксид (O), Ser-O-бензиловий простий ефір (OBzl), Thr-O-бензиловий простий ефір (OBzl), Trp-форміл (CHO), Tyr-2-бромбензилоксикарбоніл (2Br-Z) та Вос Gly поліакриламідна смола. Трифтороцтова кислота (TFA), діізопропілетиламін (DIEA), 0,5М гідроксibenзотриазол (HOBT) у DMF та 0,5М дициклогексилкарбодіімід (DCC) у дихлорметані були закуплені від компанії PE-Applied Biosystems (Foster City, штат Каліфорнія). Диметилформамід (DMF-Burdick and Jackson) та дихлорметан (DCM-Mallinkrodt) були закуплені від компанії Mays Chemical Co. (Indianapolis, штат Індіана).

Стандартні реакції подвійного сполучення здійснювали з використанням симетричного ангідриду або складних ефірів HOBT, які одержували за допомогою DCC. Другу серію реакцій подвійного сполучення (без відщеплення захисних груп за допомогою TFA) здійснювали на Trp31, Thr13 та Thr11. Після завершення синтезу N-кінцеву Вос групу видаляли і пептидильні смоли обробляли 20% піперидином у DMF для деформілування бічного ланцюга Trp. Після промивання за допомогою DCM, смоли переносили до реактора TEFLON і сушили *in vacuo*.

Для аналогів, до складу яких входив Met, відновлення на смолі здійснювали за допомогою суміші TFA/10% диметилсульфіду (DMS)/2% концентрованої HCl. Відщеплення здійснювали шляхом підключення реакторів до апарата для контактування з HF (фтористоводневою кислотою) (Penninsula Laboratories). Додавали 1мл m-крезолу на грам смоли і 10мл фтористоводневої кислоти (закупленої від компанії AGA, Indianapolis, штат Індіана) конденсували у попередньо охолоджену реакторі. У разі присутності метіоніну додавали 1мл DMS на грам смоли. Реакційні суміші перемішували впродовж 1год. на бані з льодом і фтористоводневу кислоту видаляли *in vacuo*. Залишки суспендували у етиловому ефірі, тверді речовини відфільтровували та промивали ефіром. Кожний пептид екстрагували до водного розчину оцтової кислоти та піддавали ліофілізації або безпосередньо вносили до хроматографічної колонки з оберненою фазою.

Очищення здійснювали на 2,2x25см колонці VYDAC C18 у буфері A (0,1% трифтороцтової кислоти у воді, B: 0,1% TFA у ацетонітрилі). Під час вискоєфективного рідинного хроматографування (Waters) впродовж 120хв. пропускали 20-90% градієнт B зі швидкістю 10 мл/хв з одночасним УФ-моніторингом при 280нм (4,0 А) та збиранням однохвилинних фракцій. Відповідні фракції змішували, заморожували та ліофілізували. Сухі продукти аналізували засобами вискоєфективного рідинного хроматографування (HPLC) (0,46x15см колонка METASIL AQ C18) та мас-спектрометрії з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині (MALDI).

Приклад 2 - Одержання сполук GLP-1 за цим винаходом шляхом твердофазного синтезу з застосуванням F-Мос

До кожної запрограмованої лунки 96-лункового реакційного блока вносили приблизно 114мг (50ммоль) FMOC GLY WANG смоли (закупленої від компанії NovaBiochem, La Jolla, штат Каліфорнія) і на синтезаторі пептидів Advanced ChemTech 396 здійснювали реакцію подвійного сполучення. Аналоги з C-кінцевим амідом одержали з використанням 75мг (50мкмоль) Rink Amide AM смоли (компанія NovaBiochem, La Jolla, штат Каліфорнія).

Наведені далі FMOC амінокислоти були закуплені від компанії Advanced ChemTech (Louisville, штат Кентуккі), компанії NovaBiochem (La Jolla, штат Каліфорнія) та компанії Midwest BioTech (Fishers, штат Індіана): Arg-2,2,4,6,7-пентаметилдигідробензофуран-5-сульфоніл (Pbf), Asn-тритил (Trt), Asp- $\beta$ -t-бутиловий складний ефір (tBu), C<sub>11</sub>и- $\delta$ -t-бутиловий складний ефір (tBu), Gln-тритил (Trt), His-тритил (Trt), Lys-t-бутилоксикарбоніл (Boc), Ser-t-бутиловий простий ефір (OtBu), Thr-t-бутиловий простий ефір (OtBu), Trp-t-бутилоксикарбоніл (Boc), Tyr-t-бутиловий простий ефір (OtBu).

Розчинники диметилформамід (DMF-Burdick and Jackson), N-метилпіпілідон (NMP-Burdick and Jackson), дихлорметан (DCM-Mallinkrodt) були закуплені від компанії Mays Chemical Co. (Indianapolis, штат Індіана).

Гідроксibenзотриазол (HOBT), діізопропілкарбодіімід (DIC), діізопропілетиламін (DIEA) та піперидин (Pip) були закуплені від компанії Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, штат Вісконсін).

Усі амінокислоти розчиняли у 0,45М HOBT у NMP і після відщеплення захисних груп (впродовж 20хв.) за допомогою 20% Pip/DMF, впродовж 50хв. здійснювали реакції сполучення, активовані DIC/HOBT. Після відщеплення захисних груп та реакції сполучення кожну смолу промивали DMF. Після завершення останньої реакції сполучення та відщеплення захисних груп, пептидильні смоли промивали DCM і сушили *in vacuo* у реакційному блоці.

Після установавання комплексу реакційного/гідролізного блока, до кожної лунки вносили 2мл реактиву K і гідролізу реакційну суміш перемішували впродовж 2год. [реактив K=0,75г фенолу, 0,5мл тіоанізолу, 0,25мл етандітіолу, 0,5мл води на 10мл трифтороцтової кислоти (TFA); усі складові були закуплені від компанії Aldrich Chemical Co., Milwaukee, штат Вісконсін]. TFA фільтрати додавали до 40мл етилового ефіру і осад центрифугували впродовж 2хв. при 2000об./хв. Супернатанти зливали, осад ресуспендували у 40мл ефіру, повторно центрифугували, повторно зливали, сушили спочатку у атмосфері азоту, потім *in vacuo*.



0,3-0,6мг кожного продукту розчиняли у 1мл 0,1% TFA/ацетонітрилу (ACN) і 20мкл аналізували засобами вискоєфективної рідинної хроматографії [0,46×15см колонка METASIL AQ C18, 1мл/хв., 45°C, 214нм (0,2A), A=0,1% TFA, B=0,1% TFA/50% ACN. Градієнт=від 50% B до 90% B впродовж 30хв.].

Очищення здійснювали на 2,2×25см колонці VYDAC C18 у буфері А (0,1% трифтороцтової кислоти у воді, В: 0,1% TFA у ацетонітрилі). Під час вискоєфективного рідинного хроматографування (Waters) впродовж 120хв. пропускали 20-90% градієнт В зі швидкістю 10 мл/хв з одночасним УФ-моніторингом при 280нм (4,0А) та збиранням одноквилинних фракцій. Відповідні фракції змішували, заморожували та ліофілізували. Сухі продукти аналізували засобами вискоєфективного рідинного хроматографування (HPLC) (0,46×15см колонка METASIL AQ C18) та мас-спектрометрії з іонізацією методом лазерної десорбції у матричному розчині (MALDI).

#### Приклад 3 - Аналіз агрегації GLP

Глюкагоноподібні пептиди за цим винаходом аналізували відносно їхнього потенціалу до агрегації у розчині. Взагалі, пептиди у розчині перемішували при підвищеній температурі у придатному буфері з реєстрацією каламутності при 350нм як функції часу. Час до початку агрегації вимірювали з метою кількісного визначення потенціалу даної молекули GLP до агрегування за цих напружених умов.

#### Протокол:

Сполуку GLP-1 спочатку розчиняли за лужних умов (pH10,5) впродовж 30хв. для розчинення будь-якого попередньо агрегованого матеріалу. Після цього pH розчину доводили до 7,4 і розчин фільтрували. Зокрема, 4мг ліофілізованої сполуки GLP-1 розчиняли у 3мл 10мМ фосфату/10мМ цитрату. pH доводили до рівня 10,0-10,5 і витримували протягом 30хв. pH розчину за допомогою HCl доводили до рівня 7,4 і розчин фільтрували через придатний фільтр, наприклад, шприц-фільтр Millex GV (компанія Millipore Corporation, Bedford, штат Массачусетс). Після цього розчин розбавляли з одержанням кінцевого зразка, до складу якого входило 0,3мг/мл білка у 10мМ цитрату, 10мМ фосфату, 150мМ NaCl, і pH доводили до рівня 7,4-7,5. Зразок інкубували при температурі 37°C у кварцовій кюветі. Кожні 5хв. каламутність розчину визначали при 350нм за допомогою UV-VIS спектрофотометра AMPV Модель 14DS (Lakewood, штат Нью-Джерсі). За 30с перед та під час вимірювання розчин перемішували за допомогою магнітної мішалки від компанії Starna Cells, Inc. (Atascadero, штат Каліфорнія). Підвищення оптичної густини при 350нм вказувало на агрегацію глюкагоноподібного пептиду. Час до агрегації апроксимували пересіченням підібраних кривих для передростової та ростової фаз за методом Дрейка (Drake) (АрвінтТ. (Arvinte T.), Кадд А. (CuddA.), Дрейк А.Ф. (Drake A.F.) (1993) J. Bio. Chem., 268, 6415-6422).

Кювету між експериментами очищали за допомогою розчину каустичної соди (наприклад, Contrad-70).

Результати для ряду сполук GLP-1 за цим винаходом наведено у Таблиці 1 як час у годинах, необхідний для агрегації сполуки. Як видно з таблиці, сполуки за цим винаходом показують значно збільшений час агрегації порівняно із відомими сполуками GLP-1.

#### Приклад 4 - Активація рецептора GLP-1 сполуками GLP-1 за цим винаходом

Здатність сполук GLP-1 за цим винаходом до активації рецептора GLP-1 оцінювали за допомогою аналізів in vitro, опис яких було наведено, наприклад, у EP 619,322, який було видано на ім'я Гелфанд (Gelfand) та інші, та патенті США №5,120,712, відповідно. Згадані джерела у повному обсязі включено до цього опису як посилання. Активність цих сполук відносно активності GLP-1(7-37)ОН наведена у Таблиці 1. Як можна бачити з цих результатів, активність сполук GLP-1 за цим винаходом, взагалі, є приблизно такою ж або кращою, ніж активність GLP-1(7-37)ОН.

Таблиця 1

Сполука GLP-1	Час агрегації у годинах	Активація рецептора GLP-1
GLP-1(7-37)ОН	1	1,0
Val <sup>8</sup> -GLP-1(7-37)ОН	0,9±0,2 (n=6)	0,47
Gly <sup>8</sup> -His <sup>11</sup> -GLP-1(7-37)ОН	9*	0,282
Val <sup>8</sup> -Ala <sup>11</sup> -GLP-1(7-37)ОН	10	0,021
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>11</sup> -GLP-1(7-37)ОН	13	0,001
Val <sup>8</sup> -Tyr <sup>12</sup> -GLP-1(7-37)ОН	6	0,81
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>16</sup> -GLP-1(7-37)ОН	12	0,047
Val <sup>8</sup> -Ala <sup>16</sup> -GLP-1(7-37)ОН	16	0,112
Val <sup>8</sup> -Tyr <sup>16</sup> -GLP-1(7-37)ОН	5	1,175
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>20</sup> -GLP-1(7-37)ОН	5	0,33
Gln <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	7	0,42
Val <sup>8</sup> -Ala <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	19	0,56
Val <sup>8</sup> -Ser <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	22	0,50
Val <sup>8</sup> -Asp <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	>90	0,40
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	72	1,29
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	100, 54	0,58
Val <sup>8</sup> -Pro <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	>75	0,01
Val <sup>8</sup> -His <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	>75	0,14
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>22</sup> -GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub>	24	0,53
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-36)NH <sub>2</sub>	>65	1,0
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	19	1,07
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)ОН	65	0,28
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>23</sup> -GLP-1(7-37)ОН	>45	0,18

Val <sup>8</sup> -His <sup>24</sup> -GLP-1(7-37)OH	3	0,007
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>24</sup> -GLP-1(7-37)OH	22	0,02
Ala <sup>8</sup> -His <sup>26</sup> -GLP-1(7-37)OH	>24	0,8
Ala <sup>8</sup> -Glu <sup>26</sup> -GLP-1(7-37)OH	>24	0,7
Val <sup>8</sup> -His <sup>27</sup> -GLP-1(7-37)OH	10	0,37
Val <sup>8</sup> -Ala <sup>27</sup> -GLP-1(7-37)OH	2	0,47
Gly <sup>8</sup> -Glu <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	>40	0,29
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	30	0,29
Val <sup>8</sup> -Asp <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	>45	0,15
Val <sup>8</sup> -Ser <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	8	0,19
Val <sup>8</sup> -His <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	13	0,19
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>33</sup> -GLP-1(7-37)OH	>70	0,039
Val <sup>8</sup> -Ala <sup>33</sup> -GLP-1(7-37)OH	20	0,1
Val <sup>8</sup> -Gly <sup>33</sup> -GLP-1(7-37)OH	9	0,01
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>34</sup> -GLP-1(7-37)OH	>40*	0,17
Val <sup>8</sup> -Pro <sup>35</sup> -GLP-1(7-37)OH	14	0,094
Val <sup>8</sup> -His <sup>35</sup> -GLP-1(7-37)OH	>45, 30	0,41
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>35</sup> -GLP-1(7-37)OH	63	0,15
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>36</sup> -GLP-1(7-37)OH	>45	0,11
Val <sup>8</sup> -His <sup>36</sup> -GLP-1(7-37)OH	8	0,22
Val <sup>8</sup> -His <sup>37</sup> -GLP-1(7-37)OH	>40	0,33
Val <sup>8</sup> -Leu <sup>16</sup> -Glu <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	>20	0,23
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>22</sup> -Glu <sup>30</sup> -GLP-1(7-37)OH	4	0,37
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>22</sup> -Glu <sup>23</sup> -GLP-1(7-37)OH	>30	0,35
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Gln <sup>23</sup> -GLP-1(7-37)OH	>20	0,47
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Ala <sup>27</sup> -GLP-1(7-37)OH	>45	1,02
Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> -Lys <sup>23</sup> -GLP-1(7-37)OH	>65	1,43
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>33</sup> -Val <sup>34</sup> -GLP-1(7-37)OH	22	0,08
Val <sup>8</sup> -Lys <sup>33</sup> -Asn <sup>34</sup> -GLP-1(7-37)OH	>48	0,09
Val <sup>8</sup> -Gly <sup>34</sup> -Lys <sup>35</sup> -GLP-1(7-37)OH	27	0,34
Val <sup>8</sup> -Gly <sup>36</sup> -Pro <sup>37</sup> -GLP-1(7-37)NH <sub>2</sub>	2	0,53

\*Час агрегації визначали при температурі 30°C

#### Приклад 5 - Осадження сполук GLP-1 за допомогою цинку

Окремі сполуки GLP-1 одержали за описом, який було наведено у Прикладах 1 або 2. Змг окремих ліофілізованих молекул GLP розчиняли у 3мл 0,1М ГЕПЕС-буферу (pH10,5). Після цього pH одержаного розчину за допомогою 0,2N NaOH доводили до рівня 10,0-10,5. Розчин перемішували при температурі навколишнього середовища впродовж 30хв., після чого pH розчину за допомогою 0,2N HCl доводили до рівня 7,4. Розчин фільтрували через придатний шприц-фільтр, наприклад, шприц-фільтр Millex GV (компанія Millipore Corporation, Bedford, штат Массачусетс), і концентрацію сполуки GLP-1 визначали шляхом вимірювання оптичної густини при 280нм за допомогою спектрофотометра, наприклад, Beckman DU640. Після цього концентрацію білка у ГЕПЕС-буфері (pH7,4) доводили до 200мкМ.

Відфільтровані розчини GLP-1(100мкл) розбавляли 100мкл 0,1М ГЕПЕС-буферу (pH7,4) з різним вмістом хлориду цинку на планшеті для проведення ELISA (твердофазного імуноферментного аналізу) (наприклад, Falcon Microtest™ 96) з одержанням 200мкл розчину з різним вмістом хлориду цинку та 100мкМ сполук GLP-1. Ці розчини інкубували при температурі навколишнього середовища (22°C) впродовж 18год. із подальшим центрифугуванням, наприклад, у центрифугі Jouan CR412 із тримачами титраційних мікропланшетів. Після цього 150 мкл супернатантів після центрифугування переносили на титраційний мікропланшет ELISA з УФ-зчитуванням (наприклад, Costar UV plate) і за допомогою спектрофотометра для зчитування планшетів (наприклад, Molecular Devices SPECTRAMax PLUS, SOFTmax PRO) визначали оптичну густину при 280 нм. Результати експерименту представлено у Таблиці 2. Значення A<sub>280</sub> є результатом двох незалежних визначень.

Таблиця 2

Молярне співвідношення Zn/GLP-1	GLP-1(7-37)OH A280	Gly <sup>8</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Gln <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -Glu <sup>22</sup> GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -Ala <sup>22</sup> GLP-1(7-37)OH A280
0	0,337	0,32	0,3	0,290	0,295	0,289
0,3	0,318	0,166	0,27	0,390	0,291	0,202
0,5	0,329	0,151	0,26	0,123	0,292	0,107
0,7	0,253	0,156	0,124	0,076	0,293	0,104
1	0,148	0,119	0,06	0,074	0,26	0,110
2	0,092	0,089	0,025	0,095	0,078	0,110
3	0,081	0,085	0,021	0,095	0,052	0,104
5	0,074	0,078	0,019	0,097	0,035	0,119

Таблиця 2 (продовження)

Молярне співвідношення Zn/GLP-1	Val <sup>8</sup> -Ser <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -Phe <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -Pro <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -Lys <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)OH A280	Val <sup>8</sup> -Asp <sup>22</sup> -GLP-1(7-37)OH A280
0	0,2855	0,31	0,2595	0,299	0,288
0,3	0,2805	0,1485	0,2455	0,0825	0,2785
0,5	0,2665	0,1165	0,2325	0,0905	0,2845
0,7	0,1825	0,1015	0,219	0,1195	0,287
1	0,149	0,1265	0,1905	0,1225	0,291
2	0,0935	0,092	0,1695	0,1675	0,184
3	0,101	0,061	0,1615	0,1475	0,1485
5	0,0615	0,00795	0,171	0,142	0,1675

Ці результати показують, що лише дуже малі кількості цинку є необхідними для комплексоутворення та осадження значної частини різних сполук GLP-1 із цих розбавлених розчинів.

#### ЕКВІВАЛЕНТИ

Незважаючи на те, що цей винахід було конкретно описано і показано з посиланням на варіанти його втілення, яким віддається перевага, фахівцям у цій галузі буде зрозумілою можливість внесення різних змін у форму та деталі без відхилення від сутності та обсягу винаходу, які визначаються пунктами формули винаходу, яка додається. Фахівці у цій галузі зможуть визначити або за допомогою простих експериментів встановити багато еквівалентів конкретних варіантів втілення цього винаходу, опис яких наведено. Такі еквіваленти входять до обсягу пунктів формули винаходу.

## ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТІ

<110> Eli Lilly and Company

<120> АНАЛОГИ ГЛЮКАГОНОПОДІБНОГО ПЕПТИДУ-1

<130> X-13989

<160> 53

<170> PatentIn, версія 3.0

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 є Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (5)..(5)

<223> Хаа у положенні 5 є Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys або His;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (6)..(6)

<223> Хаа у положенні 6 є His, Trp, Phe або Tyr;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (10)..(10)

<223> Хаа у положенні 10 є Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu або

Ala;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Хаа у положенні 16 є Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg або Cys;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (17)..(17)

<223> Хаа у положенні 17 є His, Asp, Lys, Glu або Gln;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (18)..(18)

<223> Хаа у положенні 18 є Glu, His, Ala або Lys;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (20)..(20)

<223> Хаа у положенні 20 є Asp, Lys, Glu або His;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (21)..(21)

<223> Хаа у положенні 21 є Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg або Lys;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (25)..(25)

<223> Хаа у положенні 25 є Ala, Glu, Asp, Ser або His;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (27)..(27)

<223> Хаа у положенні 27 є Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly або Glu;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (28)..(28)

<223> Хаа у положенні 28 є Glu, Lys або Asp;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (29)..(29)

<223> Хаа у положенні 29 є Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro,

His або Glu;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (30)..(30)

<223> Хаа у положенні 30 є Arg, Glu або His;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (31)..(31)

<223> Хаа у положенні 31 є Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,

-NH<sub>2</sub>, Gly, Gly-Pro, або Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, або видаляється.

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 є Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (6)..(6)

<223> Хаа у положенні 6 є His, Trp, Phe або Tyr;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (10)..(10)

<223> Хаа у положенні 10 є Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu або

Ala;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Хаа у положенні 16 є Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg або Cys;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (17)..(17)

<223> Хаа у положенні 17 є His, Asp, Lys, Glu або Gln;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (20)..(20)

<223> Хаа у положенні 20 є Asp, Lys, Glu або His;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (24)..(24)

<223> Хаа у положенні 24 є Ala, Glu, Asp, Ser або His;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (29)..(29)

<223> Хаа у положенні 29 є Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro,

His або Glu;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (31)..(31)

<223> Хаа у положенні 31 є Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,

-NH<sub>2</sub>, Gly, Gly-Pro, або Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, або видалається.

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (2)..(2)

<223> Xaa у положенні 2 є Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Xaa у положенні 16 є Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg або Cys;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (17)..(17)

<223> Xaa у положенні 17 є His, Asp, Lys, Glu або Gln;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (21)..(21)

<223> Xaa у положенні 21 є Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg або Lys;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (24)..(24)

<223> Xaa у положенні 24 є Ala, Glu, Asp, Ser або His;

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (31)..(31)

<223> Xaa у положенні 31 є Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His,

-NH<sub>2</sub>, Gly, Gly-Pro, або Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, або видаляється.

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (1)..(1)

<223> Хаа у положенні 1 – L-гістидин, D-гістидин, дезаміногістидин, 2-аміно-гістидин, бета-гідрокси-гістидин, гомогістидин, альфа-фторметил-гістидин або альфа-метил-гістидин;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 є Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser або Thr;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Хаа у положенні 16 є Asp, Glu, Gln, Asp, Lys, Arg або Cys;

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (31)..(31)

<223> Хаа у положенні 31 є -NH<sub>2</sub> або Gly.

<400> 4

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

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

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 5

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

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

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 6



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

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

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 7

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

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

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 11

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

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

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 15

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

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

<210> 16

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 18

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

<210> 19  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<400> 19

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

<210> 20  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 20

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

<210> 21  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 21

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

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

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 22

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

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

<210> 23

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Хаа у положенні 16 – цистеїнова кислота.

<400> 24

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

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

<210> 25

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Хаа у положенні 16 – цистеїнова кислота.

<400> 25

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

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

<210> 26

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> (16)..(16)

<223> Хаа у положенні 16 — цистеїнова кислота.

<400> 26

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

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

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 28

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

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

<210> 29

<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 29

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

<210> 30  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 30

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

<210> 31  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (16)..(16)  
<223> Хаа у положенні 16 – цистеїнова кислота.  
<400> 31

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

<210> 32  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 32

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

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

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 33

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

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

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 35

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

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

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція



<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (16)..(16)  
<223> Хаа у положенні 16 – цистеїнова кислота.  
<400> 36

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

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

<210> 37  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 37

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

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

<210> 38  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 38

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

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

<210> 39  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 40

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

<210> 41  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> (16)..(16)  
<223> Хаа у положенні 16 – цистеїнова кислота.  
<400> 41

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

<210> 42  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 42

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

<210> 43  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Штучна  
<220>  
<223> синтетична генно-інженерна конструкція  
<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 45

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

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

<210> 46

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 46

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

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

<210> 47

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 47

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

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

<210> 48

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 48

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

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

<210> 49

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 49

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

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

<210> 50

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 50

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

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

<210> 51

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 51

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

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 52

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

<210> 53

<211> 31

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 53

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

## ΦΙΓ. 1

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

Val<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

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

Val<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

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

Val<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

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

Val<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

## ΦΙΓ. 2

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

Gly<sup>8</sup>-Glu<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

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

Gly<sup>8</sup>-Asp<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

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

Gly<sup>8</sup>-Arg<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH

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

Gly<sup>8</sup>-Lys<sup>22</sup>-GLP-1(7-37)OH