



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122692** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2017 12096</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.06.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 29.12.2020</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/182,847</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 22.06.2015</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2018, Бюл.№ 7</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 28.12.2020, Бюл.№ 24</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2016/037818, 16.06.2016</p>	<p>(72) Винахідник(и): Чень Яньюнь (US), Мезо Адам Роберт (US), Цюй Хончан (US), Валенсуела Франсіско Алсідес (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011094337 A1, 04.08.2011 CA 2852177 A1, 23.12.2009 WO 2013074910 A1, 23.05.2013 WO 2013004983 A1, 10.01.2013 WO 2014152460 A2, 25.09.2014</p>
---	--

(54) СПОЛУКА-КОАГОНІСТ РЕЦЕПТОРІВ ГЛЮКАГОНУ ТА GLP-1

(57) Реферат:

Винахід стосується сполуки коаноністу рецепторів глюкагону та GLP-1. Також винахід стосується фармацевтичної композиції, способу лікування діабету 2-го типу, способу ожиріння, неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD), способу неалкогольного стеатогепатиту (NASH), способу спричинення нетераневтичної втрати маси, проміжної сполуки, способу виготовлення сполуки.

UA 122692 C2

Цей винахід стосується медицини. Більш конкретно, цей винахід стосується лікування діабету та ожиріння і має відношення до сполук, які є агоністами як рецепторів глюкагону (Gcg), так і рецепторів глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1). Зокрема, запропоновані аналоги оксинтомодуліну/глюкагону з модифікаціями амінокислотних залишків, введеними для модуляції активності як рецепторів Gcg, так і рецепторів GLP-1.

За останні кілька десятиріч поширеність діабету продовжує зростати. Цукровий діабет 2 типу (T2D) є найбільш поширеною формою діабету, яка становить близько 90 % всіх випадків діабету. T2D характеризується високим вмістом глюкози в крові, спричиненим резистентністю до інсуліну. Чинний стандарт лікування T2D включає дієту та фізичні вправи, а також доступні пероральні та ін'єкційні лікарські препарати, які знижують рівень глюкози. Проте багато пацієнтів з T2D все ще залишаються недостатньо контрольованими. Неконтрольований діабет призводить до декількох станів, які впливають на захворюваність та смертність пацієнтів. Основною причиною смерті хворих на цукровий діабет є серцево-судинні ускладнення. Одним з головних факторів ризику діабету 2 типу є ожиріння. Більшість пацієнтів з T2D (приблизно 90 %) мають надлишкову масу тіла або ожиріння. Документально підтверджено, що зниження ожиріння тіла призведе до позитивної динаміки супутніх захворювань, пов'язаних з ожирінням, включаючи гіперглікемію та серцево-судинні розлади. У зв'язку із цим для кращого лікування захворювання необхідними є лікарські засоби, ефективні для регулювання рівня глюкози та зниження маси тіла.

Як лікарські засоби для лікування T2D та ожиріння були запропоновані численні пептиди, одержані із препроглюкагону, та їх аналоги, зокрема, Gcg, GLP-1 та оксинтомодулін (ОХМ). Препроглюкагон являє собою поліпептид-попередник, що складається зі 158 амінокислот, який диференційовано перетворюється в тканинах для утворення ряду структурно пов'язаних пептидів-похідних проглюкагону, включаючи Gcg, GLP-1, глюкагоноподібний пептид-2 (GLP-2), і оксинтомодулін (ОХМ). Ці молекули залучені до широкого спектра фізіологічних функцій, включаючи гомеостаз глюкози, секрецію інсуліну, випорожнення шлунка та кишечний ріст, а також регулювання споживання їжі.

Gcg являє собою пептид, що складається з 29 амінокислот, які відповідають амінокислотам 53-81 препроглюкагону. ОХМ являє собою пептид, що складається з 37 амінокислот, який утворений повною 29-амінокислотою послідовністю пептиду Gcg з октапептидним карбоксикінцевим подовжувальним сегментом (амінокислоти 82-89 препроглюкагону, який називають "проміжним пептидом 1" або IP-1). Основний біологічно активний фрагмент GLP-1 (GLP-1₇₋₃₆) продукується як С-кінцевий амідований пептид із 30 амінокислот, які відповідають амінокислотам препроглюкагону від 98 до 127.

Gcg допомагає підтримувати рівень глюкози в крові шляхом зв'язування з рецепторами Gcg на гепатоцитах, що примушує печінку до вивільнення глюкози – яка зберігається у формі глікогену – через глікогеноліз. При вичерпанні цих запасів Gcg стимулює печінку до синтезу додаткової глюкози шляхом глюконеогенезу. Ця глюкоза вивільнюється в систему кровообігу, запобігаючи розвитку гіпоглікемії.

GLP-1, на відміну від Gcg, має інші види біологічної активності. Його дії охоплюють стимулювання синтезу та секреції інсуліну, пригнічення секреції Gcg та зменшення споживання їжі. Було показано, що GLP-1 зменшує рівень гіперглікемії у діабетиків. Було схвалено декілька агоністів GLP-1 для застосування у лікуванні T2D у людей, включаючи ексенатид (exenatide), ліраглутид (liraglutide), ліксисенатид (lixisenatide), альбіглутид (albiglutide) та дулаглутид (dulaglutide). Такі агоністи GLP-1 є ефективними при глікемічному контролі зі сприятливим впливом на масу тіла без ризику гіпоглікемії. Однак втрата маси тіла є незначною унаслідок дозозалежних шлунково-кишкових побічних ефектів.

ОХМ виділяється разом із GLP-1 з L-клітин тонкого кишечника пропорційно прийняттю поживних речовин. ОХМ активує як рецептори Gcg, так і рецептори GLP-1, з дещо вищою потенцією щодо рецепторів Gcg у порівнянні з рецепторами GLP-1. Він є менш дієвим щодо відповідних рецепторів у порівнянні з нативними Gcg і GLP-1. Людський Gcg також здатний активувати обидва рецептори, хоча і з сильною перевагою щодо рецепторів Gcg у порівнянні з рецепторами GLP-1. GLP-1 не здатний активувати рецептори Gcg. ОХМ є залученим до регулювання споживання їжі та маси тіла. Було показано, що він пригнічує у людей як апетит, так і споживання їжі. Під час 4-тижневого дослідження на суб'єктах з надлишковою масою тіла та ожирінням, препрандіальне підшкірне введення ОХМ тричі на день призвело до зниження маси тіла на 2,3 кг у порівнянні з 0,5 кг у групі, яка одержувала плацебо. Під час проведення цього дослідження рідше спостерігалась нудота, найпоширеніший побічний ефект, пов'язаний із застосуванням лікарських препаратів на основі GLP-1 (таких як ексенатид і ліраглутид). При проведенні іншого більш короткого дослідження було показано, що у суб'єктів із надлишковою

масою тіла та ожирінням ОХМ знижує споживання калорій та збільшує витрати енергії, пов'язані з активністю.

Ці дані означають, що ОХМ має потенціал бути добре переносним засобом для лікування діабету/ожиріння. Однак ОХМ створює декілька проблем при розробці на його основі прийнятної для постачання у продаж лікарського засобу. Ендогенний ОХМ швидко розкладається *in vivo* дипептидилпептидазою IV та іншими пептидазами, а також зазнає швидкого ниркового кліренсу, внаслідок його невеликого розміру. Тому бажано виявити пептиди, які активують рецептори Gcg та GLP-1 з поліпшеною метаболічною стабільністю та зниженою швидкістю кліренсу.

В даній галузі є відомими пептиди ОХМ з амінокислотними замінами для поліпшення стабільності і з додатковими модифікаціями для уповільнення кліренсу, такими як пегілювання або ліпидування. Були запропоновані інші пептиди, що зв'язуються як з рецепторами Gcg, так і з рецепторами GLP-1, і активують їх, та пригнічують збільшення маси тіла (дивись, наприклад, WO 2011/075393 A2 і WO 2012/177444 A2).

Незважаючи на наявність різних пептидів, які є агоністами як рецепторів Gcg, так і рецепторів GLP-1, залишається потреба в більш сильнодіючих, стабільних, тривалодіючих і/або добре переносних сполуках, які мають відношення активності щодо рецепторів Gcg (Gcg-R)/рецепторів GLP-1 (GLP-1-R), оптимізоване таким чином, що активність та інсулінотропна ефективність цих сполук забезпечують ефективне лікування діабету, переважно T2D, та пов'язаних з діабетом розладів. Зокрема, залишається потреба у сполуках зі збалансованим співвідношенням коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R, які знижують масу тіла. Крім того, залишається необхідність надання сполук зі збалансованим співвідношенням коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R, які забезпечують потенційне дозування у людей один раз на день, два рази на тиждень, один раз на тиждень або один раз на місяць. Відповідно, цей винахід спрямований на надання ефективних лікарських засобів для лікування діабету, ожиріння, неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD) та/або неалкогольного стеатогепатиту (NASH).

За одним з аспектів цього винаходу запропонована сполука такої формули:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де

Xaa2 являє собою Aib;

Xaa28 являє собою Glu або Ser;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; і

C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 2),

або її фармацевтично прийнятна сіль.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована сполука, яка має таку формулу:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де

Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; і

C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 3),

або її фармацевтично прийнятна сіль.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука такої формули:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де

Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; і

C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 4),

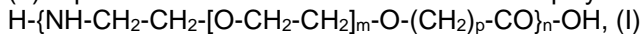
або її фармацевтично прийнятна сіль.

За аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим

шляхом кон'югації з C14-C24 жирною кислотою через лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою.

Далі, за варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, лінкер вибраний із групи, яку складають:

5 (a) карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I:



де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, і p дорівнює 1 або 2;

10 (b) амінокислота, вибрана з групи, яку складають аргінін (Arg), аспарагін (Asn), аспарагінова кислота (Asp), глутамін (Gln), глутамінова кислота (Glu), гістидин (His), лізин (Lys), серин (Ser), треонін (Thr), цитрулін (Cit), орнітин (Orn), саркозин (Sar), гліцин (Gly), γ-аміномасляна кислота (γ-Abu) і γ-глутамінова кислота (γ-Glu);

15 (c) дипептид, вибраний з групи, яку складають Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота і 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота;

20 (d) трипептид, вибраний із групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu та γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu;

25 (e) поліпептид, вибраний із групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q, (Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3, і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15; і

(f) кон'югатний лінкер, де карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I, як визначено в (a), кон'югований з:

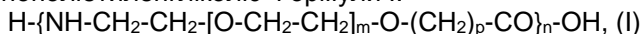
(i) амінокислотою, вибраною з групи, яку складають Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu і γ-Glu;

30 (ii) дипептидом, вибраним з групи, яку складають Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота і 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота;

35 (iii) трипептидом, вибраним з групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu та γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu; або

40 (iv) поліпептидом, вибраним із групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q, (Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3, і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15.

За аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий лінкер являє собою карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I:



де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12 і p дорівнює 1 або 2.

50 За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, для карбоксилату амінополіетиленгліколю Формули I n дорівнює 1, 2, 3, 4, 5 або 6, m дорівнює 1, і p дорівнює 1.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому також віддають перевагу, для карбоксилату амінополіетиленгліколю Формули I n дорівнює 2, m дорівнює 1, і p дорівнює 1.

55 За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий лінкер являє собою амінокислоту, вибрану з групи, яку складають Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu і γ-Glu.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, амінокислота являє собою γ-Glu.

60 За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий лінкер являє собою дипептид,

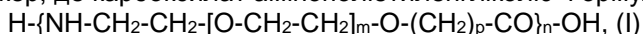
вибраний з групи, яку складають Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота і 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота.

5 За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, дипептид являє собою γ -Glu- γ -Glu.

За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий лінкер являє собою трипептид, вибраний з групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu та γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu.

За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий лінкер являє собою поліпептид, вибраний з групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q, (Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3, і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15.

За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згаданий лінкер являє собою кон'югатний лінкер, де карбоксилат амінополіетилєнглїколю Формули I:



де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, а p дорівнює 1 або 2, є кон'югованим з:

25 (i) амінокислотою, вибраною з групи, яку складають Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu і γ -Glu;

(ii) дипептидом, вибраним з групи, яку складають Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота і 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота;

35 (iii) трипептидом, вибраним з групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu та γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; або

(iv) поліпептидом, вибраним із групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q, (Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3, і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15.

40 За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, для карбоксилату амінополіетилєнглїколю Формули I n дорівнює 1, 2, 3, 4, 5 або 6, m дорівнює 1, p дорівнює 1.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, для карбоксилату амінополіетилєнглїколю Формули I n дорівнює 2, m дорівнює 1, p дорівнює 1.

45 За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, амінокислота являє собою γ -Glu.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, дипептид являє собою γ -Glu- γ -Glu.

За аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках лінкер являє собою ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γ -Glu)_t, де t дорівнює 1 або 2.

50 За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, t дорівнює 1.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, t дорівнює 2.

За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згадана C14-C24 жирна кислота являє собою насичену одноосновну або насичену двоосновну кислоту.

55 За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, жирна кислота являє собою насичену одноосновну або насичену двоосновну кислоту, вибрану із групи, яку складають міристинова кислота (тетрадеканова кислота) (C14 одноосновна кислота), тетрадекандіоева кислота (C14 двоосновна кислота), пальмітинова кислота (гексадеканова кислота) (C16 одноосновна кислота), гексадекандіоева кислота (C16 двоосновна кислота), маргарінова кислота (гептадеканова кислота) (C17 одноосновна кислота), гептадекандіоева

кислота (C17 двохоосновна кислота), стеаринова кислота (октадеканова кислота) (C18 одноосновна кислота), октадекандіоева кислота (C18 двохоосновна кислота), нонадецилова кислота (нонадеканова кислота) (C19 одноосновна кислота), нонадекандіоева кислота (C19 двохоосновна кислота), арахінова кислота (ейкозанова кислота) (C20 одноосновна кислота),
 5 ейкозандіоева кислота (C20 двохоосновна кислота), генейкозилова кислота (генейкозанова кислота) (C21 одноосновна кислота), генейкозандіоева кислота (C21 двохоосновна кислота), бегенова кислота (докозанова кислота) (C22 одноосновна кислота), докозандіоева кислота (C22 двохоосновна кислота), лігноцеринова кислота (тетракозанова кислота) (C24 одноосновна кислота) і тетракозандіоева кислота (C24 двохоосновна кислота).

10 За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою міристинову кислоту.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою тетрадекандіоеву кислоту.

15 За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою пальмітинову кислоту.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою гексадекандіоеву кислоту.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою стеаринову кислоту.

20 За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою октадекандіоеву кислоту.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою нонадекандіоеву кислоту.

25 За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою арахідонову кислоту.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою еікозандіоеву кислоту.

За ще одним варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою докозандіоеву кислоту.

30 За ще одним аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, у запропонованих сполуках або їх фармацевтично прийнятних солях згадана С-кінцева амінокислота є амідованою.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована сполука такої формули:

35 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,
 де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з $([2-(2\text{-аміноетоксі})етоксі]ацетил)_2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO}_2\text{H}$;

40 С-кінцева амінокислота є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 5), або її фармацевтично прийнятна сіль.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована сполука такої формули:

45 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,
 де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з $([2-(2\text{-аміноетоксі})етоксі]ацетил)_2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}$;

50 С-кінцева амінокислота є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 6);
 або її фармацевтично прийнятна сіль.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована сполука такої формули:

55 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,
 де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з $([2-(2\text{-аміноетоксі})етоксі]ацетил)_2-(\gamma\text{-Glu})_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO}_2\text{H}$;

60 С-кінцева амінокислота є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 7);
 або її фармацевтично прийнятна сіль.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована сполука такої формули:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,
де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з $[(2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетил)}_2\text{-(}\gamma\text{-Glu)}_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}$;

і
С-кінцева амінокислота є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 8);
або її фармацевтично прийнятна сіль.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована фармацевтична композиція, яка містить сполуку за цим винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль та фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

За іншим аспектом цього винаходу запропонована фармацевтична композиція, яка містить сполуку за цим винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль, разом з фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або наповнювачем та іншими терапевтичними інгредієнтами.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонований спосіб лікування діабету 2-го типу у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонований спосіб лікування ожиріння у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонований спосіб лікування неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD) у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонований спосіб лікування неалкогольного стеатогепатиту (NASH) у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонований спосіб спричинення нетерапевтичної втрати маси у суб'єкта, який включає введення ефективної кількості сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука за цим винаходом для застосування в терапії.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука за цим винаходом для застосування при лікуванні діабету 2 типу.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука за цим винаходом для застосування при лікуванні ожиріння.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука за цим винаходом для застосування у лікуванні неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD).

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука за цим винаходом для застосування у лікуванні неалкогольного стеатогепатиту (NASH).

За ще одним аспектом цього винаходу запропоноване застосування сполуки за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування діабету 2-го типу.

За ще одним аспектом цього винаходу запропоноване застосування сполуки за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування ожиріння.

За ще одним аспектом цього винаходу запропоноване застосування сполуки за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD).

За ще одним аспектом цього винаходу запропоноване застосування сполуки за цим винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування неалкогольного стеатогепатиту (NASH).

За ще одним аспектом цього винаходу запропонована проміжна сполука такої формули:
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де Xaa2 являє собою Aib;

Xaa28 являє собою Glu або Ser (послідовність SEQ ID NO: 9); і

С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою,
або її фармацевтично прийнятна сіль.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, запропонована проміжна сполука такої формули:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,
де Xaa2 являє собою Aib; і

5 С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 10);
або її фармацевтично прийнятна сіль.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, запропонована проміжна сполука такої формули:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

10 де Xaa2 являє собою Aib; і
С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 11);
або її фармацевтично прийнятна сіль.

За ще одним аспектом цього винаходу запропонований спосіб виготовлення сполуки такої формули:

15 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де Xaa2 являє собою Aib; і
Xaa28 являє собою Glu або Ser;

20 Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; і

С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 2), або її фармацевтично прийнятної солі, при цьому згаданий спосіб включає етап:

(i) модифікування проміжної сполуки такої формули:

25 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де Xaa2 являє собою Aib;
Xaa28 являє собою Glu або Ser; і

30 С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 9), шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys у положенні 20 проміжної сполуки з C14-C24 жирною кислотою, факультативно через лінкер.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, Lys у положенні 20 проміжної сполуки модифікують шляхом кон'югації з C14-C24 жирною кислотою через лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою.

35 За ще одним аспектом цього винаходу запропонована сполука, одержана описаним вище способом.

Сполуки за цим винаходом здатні зв'язуватись з як рецептором GLP-1, так і рецептором Gcg та активувати їх. Сполуки за цим винаходом здатні спричинювати зменшення споживання їжі у людей з надлишковою масою тіла та ожирінням. Сполуки за цим винаходом потенційно можуть

40 забезпечити більш високу втрату маси тіла у порівнянні з людським ОХМ дикого типу.

Сполуки за цим винаходом можуть підвищувати толерантність до глюкози та покращувати ліпідний профіль у пацієнтів з T2D та/або пов'язаними із цим метаболічними порушеннями, і можуть зробити це більш ефективно за людський ОХМ дикого типу.

45 Особливою перевагою сполук за даним винаходом є те, що повторюваність побічних ефектів, таких як нудота, яку зазвичай пов'язують з лікарськими препаратами на основі GLP-1, такими як ексенатид та ліраглутид, може бути зменшена або ліквідована. Таким чином, сполуки за цим винаходом можуть мати зменшені побічні ефекти у порівнянні з лікарськими препаратами на основі GLP-1.

Сполуки за цим винаходом містять поліпептид, кон'югований з жирною кислотою. Жирні
50 кислоти, завдяки своїм альбумін-зв'язувальним фрагментам, можуть покращити фармакокінетику пептиду шляхом подовження періоду напіввиведення з плазми та зменшення швидкості кліренсу. Хоча очікується, що сполуки за цим винаходом можуть мати поліпшений фармакокінетичний профіль у порівнянні з людським ОХМ дикого типу, величина поліпшення є непрогнозованою. Винахідники виявили, що варіюючи довжину, склад та положення жирної
55 кислоти і, факультативно, лінкера у сполуках за цим винаходом, можна одержати сполуки з бажаним фармакокінетичним профілем, які підтримують дозування один раз на день, два рази на тиждень, один раз на тиждень або один раз на місяць.

60 На додаток до поліпшеного фармакокінетичного профілю, винахідники також виявили, що довжина, склад і положення жирної кислоти і, факультативно, лінкера є критичними для оптимізації співвідношення коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R.

Людський OXM дикого типу має повну ефективність і активність на людському GLP-1-R і людському Gcg-R. Амінокислотна послідовність людського OXM дикого типу надана нижче:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (послідовність SEQ ID NO: 1)

Деякі сполуки за цим винаходом мають збалансоване співвідношення коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R. Збалансована активність Gcg та GLP-1, у $\frac{1}{1}$, $\frac{2}{1}$, $\frac{3}{1}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, стосується сполуки, яка має спорідненість до рецепторів Gcg та GLP-1 в дослідженні зв'язування *in vitro*, яка є близькою до 1:1, наприклад, 1:1 GLP-1/Gcg, 2:1 GLP-1/Gcg, 3:2 GLP-1/Gcg, 1:2 GLP-1/Gcg або 2:3 GLP-1/Gcg. Дослідження, проведені винахідниками, показали, що довжина, склад та положення жирних кислот є критичними для досягнення збалансованого співвідношення коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R, що є характеристикою сполук за цим винаходом, а також впливають на період напіввиведення з плазми, фізичну стабільність, розчинність та стабільність *in vivo* сполук за цим винаходом.

Незважаючи на те, що кон'югація пептиду з жирною кислотою має переваги щодо поліпшеного фармакокінетичного профілю та/або збалансованого співвідношення коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R, можна очікувати також, що ця сполука може втратити активність, оскільки існує потенціал для втручання у поверхню контактування рецептора Gcg або рецептора GLP-1. Однак було виявлено, що кон'югація залишку лізину в положенні 20 з жирною кислотою зберігає активність *in vitro* та *in vivo* на обох рецепторах більшою мірою, ніж у випадку, коли з жирною кислотою кон'юговані амінокислоти в інших позиціях.

Більш того, декілька амінокислотних заміни у порівнянні з людським OXM дикого типу у заявлених сполуках здатні підвищити активність на Gcg-R та/або GLP-1-R, компенсуючи тим самим втрату активності унаслідок кон'югації з жирною кислотою з одночасним збереженням відповідного співвідношення коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R. Важливо зазначити, що заміна одного амінокислотного залишку у конкретного білка може впливати на характеристики білків в цілому, і що загальний ефект може бути корисним або шкідливим для фармакологічної активності та/або фармацевтичної стабільності. Деякі амінокислотні заміни можуть збільшувати активність, але мати шкідливий вплив на стабільність молекули, і *vice versa*. Амінокислотні заміни у сполуках за цим винаходом відносно людського OXM дикого типу (послідовність SEQ ID NO: 1) включають S2Aib, S16E, R17K, R18K, Q20K, D21E, Q24E, M27L, N28E або N28S і T29G. Крім того, С-кінцева послідовність OXM, KRNRRNNIA була замінена на С-кінцеву послідовність GPSSG.

Заміна S2Aib захищає пептид від розщеплення пептидазами, зокрема, дипептидилпептидазою IV. Заміни S16E, R17K, R18K та Q20K здатні підвищити активність сполук за цим винаходом в дослідженнях *in vitro* та на тваринних моделях *in vivo*. Заміни D21E та Q24E здатні підвищити стабільність сполук за цим винаходом та модулювати активність *in vitro*. Заміна M27L здатна захистити пептид від окиснення залишку метіоніну. Заміна N28E здатна поліпшити розчинність сполук, які включають цю заміну. Заміна N28S також здатна поліпшити розчинність сполук, які включають таку заміну, але не до такого самого ступеня, як заміна N28E. Проте розчинність сполук, що включають заміну N28S, може бути поліпшена шляхом вибору відповідного лінкера. Заміна залишку аспарагіну у положенні 28 виключає можливість деамідування, що відбувається в цьому положенні.

Видалення залишків С-кінцевої послідовності OXM, KRNRRNNIA може покращити розчинність, що пояснюється видаленням залишків аргініну. Винахідники оцінювали сполуки (i) 45 які не мають С-кінцевої послідовності, (ii) сполуки з С-кінцевою послідовністю GPSSG та (iii) сполуки з С-кінцевою послідовністю GPSSGAPPPS. Несподівано було встановлено, що деякі сполуки з С-кінцевою послідовністю GPSSG демонструють покращену активність *in vivo* на тваринних моделях порівняно з людським OXM дикого типу, сполуками без С-кінцевої послідовності та сполуками з С-кінцевою послідовністю GPSSGAPPPS. Кінцева послідовність 50 GPSSG також покращила стабільність і розчинність сполук за цим винаходом порівняно з людським OXM дикого типу та сполуками без С-кінцевої послідовності.

Отже, сполуки за цим винаходом містять амінокислотні заміни, які, окремо або разом, не тільки здатні поліпшувати активність, але також здатні забезпечити поліпшені характеристики фізичної стабільності і розчинності та підвищену стабільність *in vivo*.

55 За деякими аспектами цього винаходу у запропонованих сполуках C14-C24 жирна кислота є кон'югованою з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга лізину через лінкер, вибраний з групи, яку складають:

(а) карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули І:

$$\text{H}-\{\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}\}_n-\text{OH}, \quad (\text{I})$$

60 де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1

до 12, і р дорівнює 1 або 2;

(b) амінокислота, вибрана з групи, яку складають Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu і γ -Glu;

(c) дипептид, вибраний з групи, яку складають Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота і 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота;

(d) трипептид, вибраний з групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro та γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;

(e) поліпептид, вибраний з групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q(Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3, і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15; і

(f) кон'югатний лінкер, де карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I, як визначено в (a), є кон'югованим з:

(i) амінокислотою, вибраною з групи, яку складають Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu і γ -Glu;

(ii) дипептидом, вибраним з групи, яку складають Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота і 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота;

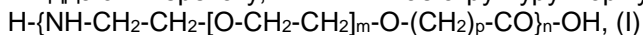
(iii) трипептидом, вибраним з групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro та γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; або

(iv) поліпептидом, вибраним з групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q, (Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3 і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15.

За аспектами цього винаходу, яким віддають перевагу, у запропонованих сполуках лінкер являє собою карбоксилат амінополіетиленгліколю, що має Формулу I, або кон'югатний лінкер, в якому карбоксилат амінополіетиленгліколю, що має Формулу I, є кон'югованим з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено вище, де n дорівнює 1, 2, 3, 4, 5 або 6, m дорівнює 1, і p дорівнює 1.

За аспектами цього винаходу, яким віддають більшу перевагу, у запропонованих сполуках лінкер являє собою карбоксилат амінополіетиленгліколю, що має Формулу I, або кон'югатний лінкер, в якому карбоксилат амінополіетиленгліколю, що має Формулу I, є кон'югованим з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено вище, де n дорівнює 2, m дорівнює 1, і p дорівнює 1.

Лінкер, карбоксилат амінополіетиленгліколю, що має Формулу I, або кон'югатний лінкер, в якому карбоксилат амінополіетиленгліколю, що має Формулу I, є кон'югованим з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено вище, і включає невелику поліетиленгліколеву (ПЕГ) складову, яка включає структуру [-O-CH₂-CH₂-]_m, де m являє собою ціле число від 1 до 12 (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Такі невеликі поліетиленгліколеві складові у цьому описі називають "міні-ПЕГ". За аспектами цього винаходу, яким віддають перевагу, міні-ПЕГ має структуру Формули I:



де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, і p дорівнює 1 або 2. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, міні-ПЕГ має структуру Формули I, де n дорівнює 1, 2, 3, 4, 5 або 6, m дорівнює 1, і p дорівнює 1. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, міні-ПЕГ має структуру Формули I, де n дорівнює 1, m дорівнює 1, і p дорівнює 1. Прийнятні реагенти для використання при ацилюванні амінокислоти міні-ПЕГ є наявні у продажу від постачальників, таких як Peptides International (Louisville, штат Кентуккі) та ChemPer, Inc. (Wellington, штат Флорида). У цьому описі також описані прийнятні методики ацилювання амінокислоти міні-ПЕГ (дивись Приклади 1-4).

Міні-ПЕГ Формули I являє собою функціоналізовану міні-ПЕГ, що містить функціональну аміногрупу та карбоксильну функціональну групу. Карбоксильна функціональна група реагує з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга лізину, утворюючи амідний зв'язок. Функціональна аміногрупа реагує з карбоксильною групою жирної кислоти. Відповідно, лізин у положенні 20 пептиду з послідовністю SEQ ID NO: 2 є кон'югованим з C14-C24 жирною кислотою через міні-ПЕГ Формули I.

Як альтернатива, коли міні-ПЕГ Формули I є частиною кон'югатного лінкера (тобто міні-ПЕГ Формули I, кон'югований з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено вище), функціональна аміногрупа міні-ПЕГ Формули I реагує з функціональною групою амінокислоти, дипептиду, трипептиду або поліпептиду. Інша функціональна група амінокислоти, дипептиду, трипептиду або поліпептиду реагує з карбоксильною групою жирної кислоти. Відповідно, лізин у положенні 20 пептиду з послідовністю SEQ ID NO: 2 є кон'югованим з C14-C24 жирною кислотою через кон'югатний лінкер, як визначено вище.

Гідрофільну властивість міні-ПЕГ Формули I використовують для підвищення розчинності сполук за цим винаходом, в тому числі лінкера, який містить карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I, або кон'югатного лінкера, в якому карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I є кон'югованим з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено.

Лінкери, яким віддають перевагу, що містять міні-ПЕГ Формули I охоплюють, але без обмеження ними, ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂ та 8-аміно-3,6-діоксооктанову кислоту.

Лінкер може бути також однією-єдиною амінокислотою, розташованою між епсилон-аміногрупою бокового ланцюга лізину та C14-C24 жирною кислотою. За деякими аспектами цього винаходу, яким віддають перевагу, згадана амінокислота являє собою гідрофільну амінокислоту. Прийнятні амінокислоти охоплюють Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu і γ-Glu.

За аспектами цього винаходу, яким віддають більшу перевагу, згадана амінокислота являє собою γ-Glu.

Як альтернатива, лінкер являє собою дипептид, вибраний із групи, яку складають Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, 6-аміногексанова кислота-6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота-5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота-7-аміногептанова кислота та 8-амінооктанова кислота-8-амінооктанова кислота.

За іншим альтернативним аспектом цього винаходу кожна амінокислота дипептиду може бути такою самою або відмінною від іншої амінокислоти дипептиду і може бути незалежно вибрана з групи, яку складають Ala, β-Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ-Glu, γ-Abu, 6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота та 8-амінооктанова кислота.

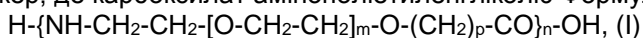
За аспектами цього винаходу, яким віддають більшу перевагу, вказаний лінкер являє собою γ-Glu-γ-Glu.

За деякими аспектами цього винаходу, лінкер являє собою трипептид, де амінокислоти трипептиду незалежно вибрані із групи, яку складають: Ala, β-Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ-аміномасляна кислота (γ-Abu), γ-глутамінова кислота (γ-Glu), 6-аміногексанова кислота, 5-аміновалеріанова кислота, 7-аміногептанова кислота та 8-амінооктанова кислота.

За аспектами, яким віддають перевагу, лінкер являє собою трипептид, вибраний із групи, яку складають Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro і γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu.

За деякими аспектами, лінкер являє собою поліпептид, вибраний із групи, яку складають (Gly-Gly-Ser)_q, (Gly-Gly-Gly-Ser)_r і (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (6-аміногексанова кислота)_s, (5-аміновалеріанова кислота)_s, (7-аміногептанова кислота)_s та (8-амінооктанова кислота)_s, де q являє собою будь-яке ціле число від 2 до 5, r являє собою будь-яке ціле число від 1 до 3, і s являє собою будь-яке ціле число від 4 до 15.

За аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, лінкер являє собою кон'югатний лінкер, де карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I:



де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, і p дорівнює 1 або 2, є кон'югованим з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено вище.

За аспектом цього винаходу, якому віддають перевагу, карбоксилат амінополіетиленгліколю

кон'югатного лінкера являє собою $[2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетил}_2$ або 8-аміно-3,6-діоксооктанову кислоту.

За аспектом цього винаходу, якому віддають більшу перевагу, лінкер включає $([2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетил}_2-(\gamma\text{-Glu})_t)$ (яку також називають $(\text{AEEA})_2-(\gamma\text{-Glu})_t$), де t дорівнює 1 або 2. Жирна кислота та гамма-глутамінова кислота в лінкері відіграють роль альбумінових зв'язків і забезпечують потенціал для одержання сполук тривалої дії *in vivo*. За аспектами цього винаходу, яким віддають найбільшу перевагу, сполуки за цим винаходом включають лізин у положенні 20, який є хімічно модифікований шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга лізину з $([2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетил}_2-(\gamma\text{-Glu})_t\text{-CO-(CH}_2)_d\text{-CO}_2\text{H})$, де t дорівнює 1 або 2, і d дорівнює 16 або 18.

Як показано в хімічних структурах Прикладу 1-4, перша одиниця $[2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетилу}$ приєднана до епсилон-аміногрупи бічного ланцюга лізину. Друга одиниця $[2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетилу}$ далі приєднана до аміногрупи першої одиниці $[2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетилу}$. Потім перша одиниця $\gamma\text{-Glu}$ приєднана до аміногрупи другої одиниці $[2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетилу}$ через γ -карбоксільну групу бічного ланцюга. Якщо $t=2$, друга одиниця $\gamma\text{-Glu}$ приєднана до α -аміногрупи першої одиниці $\gamma\text{-Glu}$ через γ -карбоксільну групу бічного ланцюга. Нарешті, жирна кислота приєднана до α -аміногрупи першої (якщо $t=1$) або другої (якщо $t=2$) одиниці $\gamma\text{-Glu}$.

Якщо лінкером є амінокислота, дипептид, трипептид або поліпептид, як визначено вище, перевагу віддають варіанту здійснення цього винаходу, за яким амінокислота, або щонайменше одна амінокислота дипептиду, трипептиду або поліпептиду, являє собою гідрофільну амінокислоту.

Аналогічно, якщо лінкером є кон'югатний лінкер, де карбоксилат амінополіетиленгліколю Формули I:



де m являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, n являє собою будь-яке ціле число від 1 до 12, і p дорівнює 1 або 2, є кон'югованим з амінокислотою, дипептидом, трипептидом або поліпептидом, як визначено вище, перевагу віддають варіанту здійснення цього винаходу, за яким амінокислота/щонайменше одна амінокислота з амінокислоти/дипептиду/трипептиду/поліпептиду являє собою гідрофільну амінокислоту.

Прийнятні амінокислоти охоплюють, але без обмеження ними, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, $\gamma\text{-Abu}$ і $\gamma\text{-Glu}$.

Автори цього винаходу виявили, що присутність однієї або декількох гідрофільних амінокислот у лінкерах компенсує втрату розчинності, яку, як правило, можна очікувати як наслідок амінокислотної заміни в пептиді з послідовністю SEQ ID NO: 1. Наприклад, за прикладом здійснення, де лінкер включає $([2-(2\text{-аміноетоксі)етоксі]ацетил}_2-(\gamma\text{-Glu})_t)$, де t дорівнює 1 або 2, Хаа28 пептиду з послідовністю SEQ ID NO: 1 може бути серином або глутаміновою кислотою. Вибір глутамінової кислоти у положенні 28 пептиду з послідовністю SEQ ID NO: 2 покращує розчинність таких сполук. Можна очікувати, що вибір серину в положенні 28 пептиду з послідовністю SEQ ID NO: 2 може зменшити розчинність таких сполук порівняно з тими сполуками, які відрізняються лише наявністю залишку глутамінової кислоти у положенні 28. Однак друга $\gamma\text{-Glu}$ амінокислота у описаному вище лінкері (тобто t дорівнює 2) компенсує це очікуване зменшення розчинності.

У сполуках за цим винаходом використана C14-C24 жирна кислота, хімічно кон'югована з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга лізину шляхом прямого зв'язку або за допомогою лінкера. Термін "C14-C24 жирна кислота" ó õýîõ ïëñ³ означає карбонову кислоту з 14-24 атомами вуглецю. C14-C24 жирна кислота, прийнятна для використання за цим описом, може являти собою насичену одноосновну кислоту або насичену двоосновну кислоту. Термін "насичена" означає, що жирна кислота не містить подвійних або потрійних вуглець-вуглецевих зв'язків.

До прикладів конкретних насичених C14-C24 жирних кислот, які є прийнятними для згаданих сполук, і застосування яких розкрито у цьому описі, належать, але без обмеження ними, міристинова кислота (тетрадеканова кислота)(C14 одноосновна кислота), тетрадекандіоева кислота (C14 двоосновна кислота), пальмітинова кислота (гексадеканова кислота)(C16 одноосновна кислота), гексадекандіоева кислота (C16 двоосновна кислота), маргарінова кислота (гептадеканова кислота)(C17 одноосновна кислота), гептадекандіоева кислота (C17 двоосновна кислота), стеаринова кислота (октадеканова кислота)(C18 одноосновна кислота), октадекандіоева кислота (C18 двоосновна кислота), нонадецилова кислота (нонадеканова кислота)(C19 одноосновна кислота), нонадекандіоева кислота (C19 двоосновна кислота), арахінова кислота (ейкозанова кислота)(C20 одноосновна кислота), ейкозандіоева кислота (C20 двоосновна кислота), генейкозилова кислота (генейкозанова кислота)(C21 одноосновна

кислота), генейкозандіоева кислота (C21 двохоосновна кислота), бегенова кислота (докозанова кислота) (C22), докозандіоева кислота (C22 двохоосновна кислота), лігноцерінова кислота (тетракозанова кислота) (C24 одноосновна кислота) і тетракозандіоева кислота (C24 двохоосновна кислота), включаючи їх розгалужені та заміщені похідні.

За аспектами цього винаходу, яким віддають перевагу, у запропонованих сполуках C14-C24 жирна кислота вибрана з групи, яку складають насичена C14 одноосновна кислота, насичена C14 двохоосновна кислота, насичена C16 одноосновна кислота, насичена C16 двохоосновна кислота, насичена C18 одноосновна кислота, насичена C18 двохоосновна кислота, насичена C19 двохоосновна кислота, насичена C20 одноосновна кислота, насичена C20 двохоосновна кислота, насичена C22 двохоосновна кислота та їх розгалужені і заміщені похідні.

За аспектами цього винаходу, яким віддають більшу перевагу, у запропонованих сполуках C14-C24 жирна кислота вибрана з групи, яку складають міристинова кислота, тетрадекандіоева кислота, пальмітинова кислота, гексадекандіоева кислота, стеаринова кислота, октадекандіоева кислота, нонадекандіоева кислота, арахідонова кислота, ейкозандіоева кислота та докозандіоева кислота.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, C14-C24 жирна кислота являє собою октадекандіоеву кислоту або ейкозандіоеву кислоту.

Автори цього винаходу виявили, що положення жирної кислоти є критичним для одержання сполуки з бажаним співвідношенням коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R. Довжина і склад жирної кислоти впливають на період напіввиведення вказаної сполуки з плазми, активність сполуки в тваринних моделях *in vivo*, а також впливають на розчинність та стабільність сполуки. Результатом кон'югації пептиду, визначеного послідовністю SEQ ID NO: 2, з насиченою C14-C24 одноосновною або двохоосновною жирною кислотою є одержання сполук, які демонструють бажаний період напіввиведення з плазми, бажану активність в тваринних моделях *in vivo*, а також мають бажані характеристики розчинності та стабільності. Жирними кислотами, яким віддають особливу перевагу, є міристинова кислота, тетрадекандіоева кислота, пальмітинова кислота, гексадекандіоева кислота, стеаринова кислота, октадекандіоева кислота, нонадекандіоева кислота, арахідонова кислота, ейкозандіоева кислота та докозандіоева кислота.

Зокрема, результатом кон'югації пептиду, визначеного послідовністю SEQ ID NO: 2, із залишком лізину в положенні 20 з октадекандіоевою кислотою або ейкозандіоевою кислотою, є одержання сполук, які: (i) здатні досягти бажаного співвідношення коагоністичної активності Gcg-R/GLP-1-R, (ii) здатні підвищувати активність в тваринних моделях *in vivo* та/або (iii) здатні поліпшувати характеристики фізичної стабільності та розчинності.

Сполуки за цим винаходом переважно входять до складу фармацевтичних композицій, які вводять парентеральними шляхами (наприклад, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньоочеревинно, внутрішньом'язово або трансдермально).

Сполуки за цим винаходом, як правило, призначені для парентерального введення. Парентеральним введенням є, наприклад, системне введення, таке як введення шляхом внутрішньом'язової, внутрішньовенної, підшкірної, внутрішньошкірної або внутрішньоочеревинної ін'єкції. Способом введення, якому віддають перевагу, є підшкірна ін'єкція. Сполуку за цим винаходом вводять суб'єкту спільно з прийнятим фармацевтичним носієм, розріджувачем або наповнювачем як частину фармацевтичної композиції для лікування діабету 2 типу, ожиріння, NAFLD та/або NASH. Фармацевтична композиція може являти собою розчин або суспензію, наприклад, такий(-у), у якому(-ій) сполука за цим винаходом знаходиться у комплексі з катіоном двовалентного металу, такого як цинк. Сполука за цим винаходом також може бути введена до складу твердої композиції, наприклад, шляхом ліофілізації або розпилювального сушіння, яку потім відновлюють у відповідному розріджувальному розчині перед введенням. Прийнятні фармацевтичні носії можуть містити інертні інгредієнти, які не взаємодіють із пептидом або пептидним похідним. Прийнятні фармацевтичні носії для парентерального введення охоплюють, наприклад, стерильну воду, фізіологічний розчин, бактеріостатичний фізіологічний розчин (фізіологічний розчин, який містить приблизно 0,9 % бензилового спирту), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Хенкса, лактат Рінгера тощо. Деякі приклади прийнятих наповнювачів охоплюють лактозу, декстрозу, сахарозу, трегалозу, сорбіт, маніт і консерванти, такі як фенол та м-крезол.

Можуть бути використані стандартні методики одержання фармацевтичної композиції, такі як методики, описані в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Сполуки за цим винаходом можуть бути альтернативно включені до складу фармацевтичних композицій для введення трансбукальним, пероральним, трансдермальним, назальним або легенеvim шляхом.

Сполуки за цим винаходом можуть взаємодіяти з будь-якою з численних неорганічних та органічних кислот з утворенням фармацевтично прийнятних солей приєднання кислоти. Фармацевтично прийнятні солі та загальна методика їх одержання добре відомі в цій галузі. Дивись, наприклад, P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011). Фармацевтично прийнятні солі за цим винаходом охоплюють трифторацетатні, гідрохлоридні та ацетатні солі.

Сполуки за цим винаходом можуть бути застосовані для лікування цукрового діабету, зокрема, діабету 2 типу. Користь від лікування сполуками за цим винаходом можуть також одержувати пацієнти, які мають порушення толерантності до глюкози або порушення рівня глюкози у крові натщесерце, суб'єкти, маса тіла яких на приблизно 25 % і більше перевищує нормальну масу тіла для зросту і будови тіла цих суб'єктів, суб'єкти з одним або декількома предками із діабетом 2 типу, суб'єкти, які мали гестаційний діабет, та суб'єкти з порушеннями обміну речовин, такими як порушення, які є результатом зниження секреції ендогенного інсуліну. Сполуки за цим винаходом можуть бути застосовані для запобігання переходу суб'єктів з порушенням толерантності до глюкози до розвитку діабету 2 типу, запобігання деградації β -клітин підшлункової залози, спричинення проліферації β -клітин, поліпшення функції β -клітин, активації "сплячих" β -клітин, сприяння диференціації клітин у β -клітини, стимуляції реплікації β -клітин та інгібування апоптозу β -клітин. Інші захворювання та стани, які можна лікувати або яким можна запобігати шляхом застосування сполук за цим винаходом в способах за цим винаходом, охоплюють: цукровий діабет дорослого типу у молодих (MODY) (Herman et al., Diabetes 43:40, 1994); латентний автоімунний діабет у дорослих (LADA) (Zimmet et al., Diabetes Med., 11: 299, 1994); порушення толерантності до глюкози (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999); порушення рівня глюкози у крові натщесерце (IFG) (Charles et al., Diabetes 40: 796, 1991); гестаційний діабет (Metzger, Diabetes, 40: 197, 1991); метаболічний синдром X, дисліпідемію, гіперглікемію, гіперінсулінемію, гіпертригліцеридемію та резистентність до інсуліну.

Сполуки за цим винаходом також можуть бути застосовані в способах за цим винаходом для лікування другорядних причин діабету (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999). Такі другорядні причини охоплюють надлишок глюкокортикоїдів, надлишок гормону росту, феохромоцитому та діабет, спричинений лікарськими препаратами. Лікарські препарати, які можуть спричинити діабет, охоплюють, але без обмеження ними, піримініл (pyriminil), нікотинову кислоту, глюкокортикоїди, фенітоїн, гормони щитовидної залози, β -адренергічні засоби, α -інтерферон та лікарські препарати, які застосовують для лікування ВІЛ-інфекції.

Сполуки за цим винаходом можуть бути ефективними щодо пригнічення споживання їжі та лікування ожиріння.

"Ефективною кількістю" сполуки за цим винаходом є кількість, яка забезпечує досягнення бажаного терапевтичного та/або профілактичного ефекту без спричинення неприйнятних побічних ефектів при введенні суб'єкту. "Бажаний терапевтичний ефект" включає один або декілька з таких: 1) зменшення інтенсивності симптому(-ів), пов'язаного(-их) із захворюванням або станом; 2) затримка появи симптомів, пов'язаних із захворюванням або станом; 3) збільшення тривалості життя у порівнянні з відсутністю лікування; і 4) кращу якість життя у порівнянні з відсутністю лікування. Наприклад, "ефективною кількістю" сполуки за цим винаходом для лікування T2D є кількість, яка призведе до більш тривалого регулювання концентрації глюкози в крові, ніж при відсутності лікування, тим самим призводячи до затримки початку діабетичних ускладнень, таких як ретинопатія, невротія чи хвороба нирок. "Ефективною кількістю" сполуки за цим винаходом для запобігання цукровому діабету 2 типу, наприклад, у суб'єктів з порушенням толерантності до глюкози або порушенням рівня глюкози у крові натщесерце, є кількість, яка затримує, у порівнянні з відсутністю лікування, початок підвищення рівня глюкози в крові, що вимагає лікування антигіперглікемічними препаратами, такими як сульфонілсечовини, тіазолідиндіони, інсулін та/або бісугуанідини.

"Ефективна кількість" сполуки за цим винаходом, яку вводять суб'єкту, також буде залежати від типу та тяжкості захворювання і від характеристик суб'єкта, таких як загальний стан здоров'я, вік, стать, маса тіла та толерантність до лікарських препаратів. Доза сполуки за цим винаходом, ефективна для нормалізації рівня глюкози в крові суб'єкта, буде залежати від численних факторів, до яких, без обмежень, належать стать суб'єкта, маса і вік, тяжкість нездатності регулювати рівень глюкози в крові, шлях введення і біодоступність, фармакокінетичний профіль пептиду, активність та лікарська форма.

Деякі сполуки за цим винаходом є загалом ефективними в широкому діапазоні доз. Наприклад, дози для введення один раз на тиждень можуть становити від приблизно 0,05 мг до

приблизно 30 мг на людину на тиждень. Деякі сполуки за цим винаходом можна вводити щодня. Крім того, деякі сполуки за цим винаходом можна вводити два рази на тиждень, один раз на тиждень або один раз на місяць.

"Суб'єктом" є ссавець, переважно людина, але це також може бути тварина, у тому числі домашні тварини (наприклад, собаки, кішки тощо), сільськогосподарські тварини (наприклад, корови, вівці, свині, коні тощо) і лабораторні тварини (наприклад, пацюки, миші, морські свинки тощо).

У цьому терміні термін "лікування" або "лікувати" означає стримування, уповільнення, зупинення або обернення напрямку розвитку або тяжкості наявного симптому або розладу.

Термін "період напіввиведення з плазми" означає час, необхідний для того, щоб половина відповідних сполук була видалена з плазми. Альтернативно вживається термін "час напіввиведення". Термін "продовжений" або "довший", який вживається в контексті періоду напіввиведення з плазми або часу напіввиведення, вказує на значне збільшення періоду напіввиведення сполуки за цим винаходом у порівнянні з періодом напіввиведення еталонної молекули (наприклад, пептиду, кон'югованого з нежирною кислотою, людського ОХМ дикого типу або семаглутиду), визначеного за аналогічних умов.

Кліренс є мірою здатності організму до видалення лікарського препарату з кровообігу. Оскільки кліренс знижується унаслідок, наприклад, модифікацій лікарського препарату, очікується, що період напіввиведення збільшиться. Проте ці взаємні співвідношення є точними лише у разі відсутності змін у об'ємі розподілу. Корисне приблизне співвідношення між кінцевим лінійним періодом напіввиведення у логарифмічному перерахуванні ($T_{1/2}$), кліренсом (C) та об'ємом розподілу (V) надається рівнянням: $T_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. Кліренс вказує не те, скільки лікарського препарату видаляється, але, скоріше, об'єм біологічної рідини, наприклад, крові чи плазми, який має бути повністю звільнений від лікарського препарату для забезпечення видалення. Кліренс виражається як об'єм на одиницю часу.

У цьому терміні термін "гідрофільний" означає здатність легко вбирати воду та мати сильно полярні групи, які легко взаємодіють з водою.

У цьому терміні термін "семаглутид" означає хімічно синтезований аналог GLP-1, який має пептидний каркас та загальну структуру сполуки, зареєстрованої під номером CAS 910463-68-2.

Амінокислотні послідовності за цим винаходом містять стандартні однолітерні або трілітерні коди для двадцяти природних амінокислот. Крім того, "Aib" означає альфа-аміноізомасляну кислоту, "Abu" означає аміномасляну кислоту, "Orn" означає орнітин, "Cit" означає цитрулін і "Sar" означає саркозин.

У цьому терміні термін "С-кінцева амінокислота" означає останню амінокислоту в послідовності пептиду, яка містить вільну карбоксильну групу. С-кінцевою амінокислотою сполук за цим винаходом є Gly у положенні 34.

Цей винахід також охоплює нові проміжні сполуки та способи, придатні для синтезу сполук за цим винаходом або їх фармацевтично прийнятних солей. Проміжні сполуки та сполуки за цим винаходом можуть бути одержані за різними методами, відомими в цій галузі. Зокрема, спосіб з використанням хімічного синтезу описаний в наведених нижче Прикладах. Конкретні етапи синтезу для кожного з описаних шляхів можна комбінувати різним чином для одержання сполук за цим винаходом або їх солей. Реагенти та початкові матеріали легко доступні фахівцю в цій галузі. Слід мати на увазі, що ці Приклади не призначені для будь-якого обмеження обсягу цього винаходу.

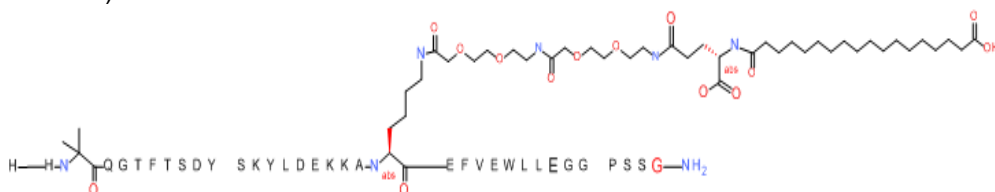
ПРИКЛАД 1

HXaa2QGTFTSDY SKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG,

де Xaa2 означає Aib;

K (Lys) у положенні 20 є хімічно модифікованим кон'югацією епсилон-аміногрупи бічного ланцюга K з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; і

С-кінцева амінокислота є амідованою як С-кінцевий первинний амід (послідовність SEQ ID NO: 5).



На наведеній вище схемі зображена структура сполуки послідовності SEQ ID NO: 5 (нижче "Сполука 1"), на якій використаний стандартний однолітерний амінокислотний код, за винятком залишків Aib2 і K20, де структури цих амінокислот були розширені.

Пептидний компонент Сполуки 1 синтезований шляхом автоматизованого твердофазного синтезу з використанням фторенілметилоксикарбонілу (Fmoc)/трет-бутилу (t-Bu) на 12-канальному мультиплексному пептидному синтезаторі Symphony (Protein Technologies, Inc., Tucson, штат Аризона).

Синтезована смола складається з 1 % зшитого дивінілбензольного (DVB) полістиролу (Fmoc-Rink-MBHA Low Loading resin, 100-200 меш, EMD Millipore, Temecula, штат Каліфорнія) при заміщенні 0,3-0,4 мекв/г. Стандартні захисні групи бічних ланцюгів: трет-бутилоксикарбоніл (Boc) для Trp та Lys; трет-бутиловий складний ефір (OtBu) для Asp та Glu; tBu для Ser, Thr і Tyr; і трифенілметил (Trt) для Gln; N- α -Fmoc-N- ϵ -4-метилтритил-L-лізин (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) був використаний для лізину в положенні 20 послідовності SEQ ID NO: 3 і N α ,N $_{(im)}$ -ди-Boc-L-гістидин (Boc-His(Boc)-OH) був використаний для гістидину у положенні 1. Fmoc групи видаляли перед кожним етапом зв'язування (2 \times 7 хв), використовуючи 20 % розчин піперидину у диметилформаміді (DMF). Всі стандартні амінокислотні зв'язування здійснювали протягом 1 год., використовуючи рівне молярне співвідношення Fmoc амінокислоти (EMD Millipore, Temecula, штат Каліфорнія), діізопропілкарбодііміду (DIC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, штат Міссурі) та Охума (Охума Pure, Iris Biotech, Marktredwitz, Німеччина), при 9-кратному молярному перевищенні над теоретичним завантаженням пептиду та кінцевою концентрацією 0,18 М в DMF.

Двома винятками є залишок глутаміну в положенні 3 послідовності SEQ ID NO: 5, який зазнає подвійного зв'язування (2 \times 1 год.), і залишок гістидину в положенні 1 послідовності SEQ ID NO: 5, який є зв'язаним з 6-кратним молярним надлишком, використовуючи 1-гідрокси-7-азабензотриазол (HOAt) замість Охума протягом 18 год. Після завершення синтезу лінійного пептиду смола для пептидного синтезу переносили в одноразовий 25 мл поліпропіленовий шприц з фритою (Torvig, Niles, штат Міссурі), споряджений політетрафторетиленовим (PTFE) запірним краном (компанія Biotage, Charlotte, штат Північна Кароліна), і 4-метилтритилову (Mtt) захисну групу на лізині у положенні 20 послідовності SEQ ID NO: 5 селективно видаляли зі смоли для пептидного синтезу трьома обробками 20 % розчином гексафторізопропанолу (Oakwood Chemicals, West Columbia, штат Південна Кароліна) в DCM (2 \times 10 хв та 1 \times 45 хв), щоб відкрити вільну епсилон-аміногрупу лізину у положенні 20 і зробити її доступною для подальшої реакції.

Подальше прикріплення складової, що включає жирну кислоту-лінкер, здійснювали шляхом виконання двох послідовних з'єднань [2-(2-(Fmoc-аміно)етокси)етокси]оцтової кислоти (Fmoc-AEEA-OH) (ChemPer, Inc., Wellington, штат Флорида; 3-кратний надлишок амінокислоти (AA):1-[біс(диметиламіно)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридиній-3-оксиду гексафторфосфату (HATU): N,N-діізопропілетиламіну (DIPEA) [1:1:5 моль/моль] з 3-годинною тривалістю зв'язування з подальшим зв'язуванням α -трет-бутилового складного ефіру Fmoc-глутамінової кислоти (Fmoc-Glu-OtBu) (Ark Pharm, Inc. Libertyville, штат Іллінойс, 3-кратний надлишок AA:HATU:DIPEA [1:1:5 моль/моль] з 3-годинною тривалістю зв'язування). У кожному випадку складову Fmoc видаляли, як описано вище. Нарешті, моно-OtBu-октадекандіоеву кислоту (WuXi AppTec, Shanghai, Китай) сполучали зі смолою протягом 18 год., використовуючи 3-кратний надлишок кислоти:HATU:DIPEA (1:1:5 моль/моль).

Після закінчення синтезу смола для пептидного синтезу промивали дихлорметаном (DCM), діетиловим простим ефіром і ретельно висушували повітрям, піддаючи шприц вакуумуванню протягом 5 хв. Суху смола обробляли коктейлем для розщеплення (трифтороцтова кислота (TFA):анізол:вода:триізопропілсилан, 88:5:5:2 (у об'ємному відношенні)) протягом 2 год. при кімнатній температурі для вивільнення пептиду з твердої основи та видалення всіх захисних груп бічних ланцюгів. Смола відфільтровували, двічі промивали чистою TFA, і об'єднані фільтрати обробляли холодним діетиловим простим ефіром для осадження неочищеного пептиду. Потім суспензію пептиду/ефіру центрифугували при 4000 об/хв до одержання твердого осаду, супернатант декантували, твердий осад двічі розтирали з ефіром і сушили in vacuo. Неочищений пептид розчиняли у 20 % розчині ацетонітрилу/води, і очищали рідинною хроматографією високої ефективності з оберненою фазою на препаративній колонці C8 (Luna 21 \times 250 мм, Phenomenex, Torrance, штат Каліфорнія) з лінійними градієнтами ацетонітрилу та води, використовуючи три різні буферні системи:

- 1) 0,1М розчин ацетату амонію у воді, pH 5,0;
- 2) 0,1 % розчин TFA у воді; і
- 3) 5 % розчин оцтової кислоти у воді.

Подальша ліофілізація кінцевого пулу основного продукту дає ліофілізовану ацетатну сіль пептиду.

У процесі синтезу, виконаному по суті так, як описано вище, чистоту Сполуки 1 оцінювали із

застосуванням аналітичної рідинної хроматографії високої ефективності з оберненою фазою, і визначили, що вона становить >97 %.

Молекулярну масу визначали із застосуванням мас-спектрометрії з електророзпилюванням. Молекулярна маса Сполуки 1 за розрахунком становила 4535,0 Да, тоді як деконволютована усереднена молекулярна маса, що спостерігалась, становила 4535,0 Да, і спостерігали такі іони: 1512,3 (M+3H), 1134,3 (M+4H), 908 (M+5H).

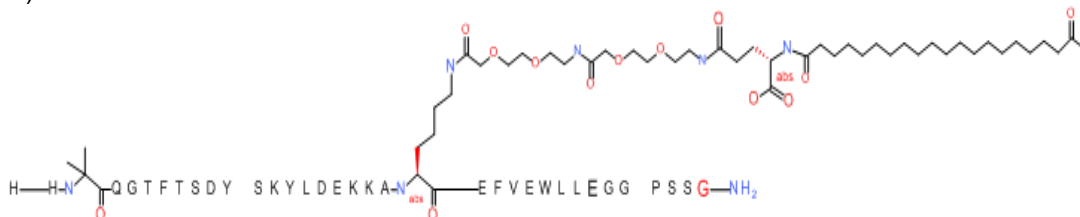
ПРИКЛАД 2

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG,

де Xaa2 означає Aib;

К у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга К з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; і

С-кінцева амінокислота є амідованою як С-кінцевий первинний амід (послідовність SEQ ID NO: 6).



На наведеній вище схемі зображена структура сполуки послідовності SEQ ID NO: 6 (нижче "Сполука 2"), на якій використаний стандартний однолітерний амінокислотний код, за винятком залишків Aib2 і K20, де структури цих амінокислот були розширені.

Сполуку 2 синтезували, як у Прикладі 1, за винятком того, що моно-OtBu-ейкозандіоеву кислоту (WuXi AppTec, Shanghai, Китай) зв'язували зі смолою протягом 18 год. з використанням 3-кратного надлишку AA:HATU:DIPEA (1:1:5 моль/моль), а не моно-OtBu-октадекандіоевої кислоти, як у Прикладі 1.

Молекулярна маса Сполуки 2 за розрахунком становила 4563,1 Да, тоді як деконволютована усереднена молекулярна маса, що спостерігалась, становила 4562,9 Да, і спостерігали такі іони: 1521,7 (M+3H), 1141,3 (M+4H), 913,5 (M+5H).

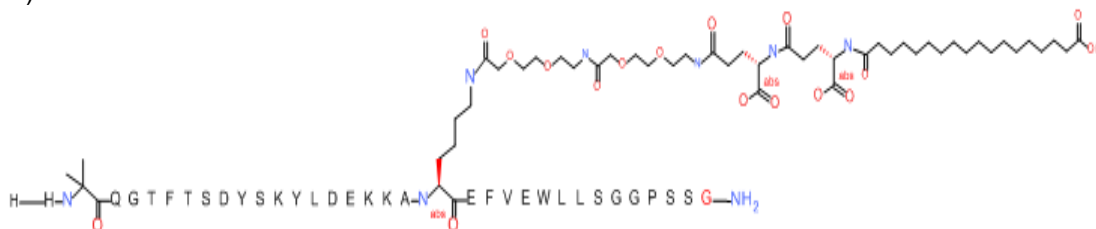
ПРИКЛАД 3

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG,

де Xaa2 означає Aib;

К у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга К з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; і

С-кінцева амінокислота є амідованою як С-кінцевий первинний амід (послідовність SEQ ID NO: 7).



На наведеній вище схемі зображена структура сполуки послідовності SEQ ID NO: 7 (нижче "Сполука 3"), на якій використаний стандартний однолітерний амінокислотний код, за винятком залишків Aib2 і K20, де структури цих амінокислот були розширені.

Сполуку 4 синтезували як у Прикладі 1, за винятком того, що у циклі синтезу лінкера була додана додаткова складова Fmoc-Glu-OtBu.

Молекулярна маса Сполуки 3 за розрахунком становила 4622,1 Да, тоді як деконволютована усереднена молекулярна маса, що спостерігалась, становила 4621,9 Да, і спостерігали такі іони: 1541,3 (M+3H), 1156,2 (M+4H), 925,2 (M+5H).

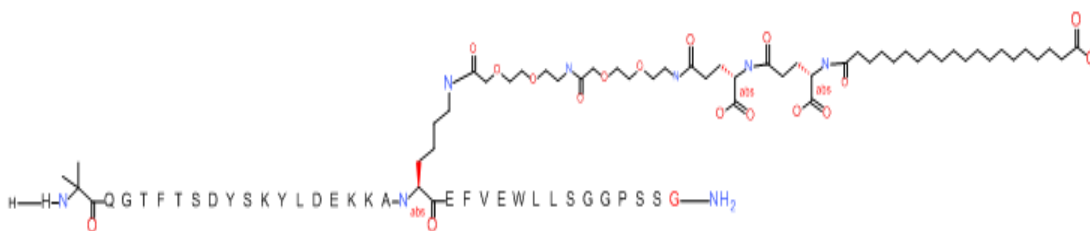
ПРИКЛАД 4

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG,

де Xaa2 означає Aib;

К у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга К з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; і

С-кінцева амінокислота є амідованою як С-кінцевий первинний амід (послідовність SEQ ID NO: 8).



На наведеній вище схемі зображена структура сполуки послідовності SEQ ID NO: 8 (нижче "Сполука 4"), на якій використаний стандартний однолітерний амінокислотний код, за винятком залишків Aib2 і K20, де структури цих амінокислот були розширені.

5 Сполуку 4 синтезували як у Прикладі 1, за винятком того, що моно-OtBu-ейкозандіоеву кислоту (WuXi AppTec, Shanghai, Китай) зв'язували зі смолою протягом 18 год. з використанням 3-кратного надлишку AA:HATU:DIPEA (1:1:5 моль/моль), а не моно-OtBu-октадекандіоевої кислоти, як у Прикладі 1. Окрім того, у циклі синтезу лінкера була додана додаткова складова амінокислота Fmoc-Glu-OtBu.

10 Молекулярна маса пептиду за розрахунком становила 4650,1 Да, тоді як деконволютована усереднена молекулярна маса, що спостерігалась, становила 4650,1 Да, і спостерігались такі іони: 1550,7 (M+3H), 1163,3 (M+4H), 930,8 (M+5H).

ФІЗИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В'язкість

15 В'язкість сполук за цим винаходом вимірювали за допомогою віскозиметра Rheosense mVroc з такими характеристиками:

- (а) Розмір шприца: 500 мкл шприц
- (б) Швидкість потоку: швидкість потоку 100 мкл/хв
- (в) Середня температура: 25 °C
- (д) Коефіцієнт зсуву: 1934 с⁻¹

20 Сухий порошок (сполуку) зважували, розчиняли у воді з одержанням каламутного осаду, і титрували до приблизно рН 8,0 1н розчином NaOH. Розчин обробляли ультразвуком, і перемішували вручну доти, доки пептид не перейде в розчин. Зразки піддавали стерильній фільтрації (0,22 мкм PVDF (полівініліденфторид) фільтри). Після цього зразки досліджували із застосуванням спектрофотометра UV/VIS для оцінювання концентрації вихідних розчинів.

25 Розчини розбавляють розчином (3×) m-крезолу у 10 мМ трис-буфері рН 8,0 до кінцевої концентрації приблизно 10 мг/мл пептиду (у масовому відношенні) в 10 мМ трис-буфері + 3 мг/мл m-крезолу при рН 8,0. Зразки фільтрували через 0,22 мкм фільтри безпосередньо перед аналізом в'язкості. 25 мкл зразка відбирають для перевірки концентрації рідиною

30 хроматографією високої ефективності з оберненою фазою до і після дослідження.

Контрольні зразки води та буфера вимірювали до і після дослідження кожного зразка. Прилад промивали буфером (3×) між дослідженнями кожного зразка. Зразки відбирали в окремі шприци, і досліджували. Результати першого вимірювання в остаточний розрахунок не включали для забезпечення рівноваги із системою. Потім зразки досліджували з трьома

35 повторами (n=3).

В'язкість Сполук 1-4 визначали по суті так, як це описано в цьому дослідженні. Дані з в'язкості для Сполук 1-4 в узагальненому вигляді наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Дані з в'язкості для Сполук 1-4

Зразок	В'язкість (сП або мПа-с), 500 мкл шприц
Контрольний буфер	0,99
Сполука 1	1,06
Сполука 2	1,04
Сполука 3	1,03
Сполука 4	1,05

40 Розчинність

Розчинність сполук за даним винаходом визначали за допомогою систем для хроматографії Agilent 1100 HPLC, Agilent 1200 HPLC та Nanodrop 2000. Використовують такі колонки для рідинної хроматографії високої ефективності:

(a) рідинна хроматографія високої ефективності з оберненою фазою: Waters Symmetry Shield C18, 3,6 мкм, 4,6×100 мм;

(b) рідинна хроматографія високої ефективності за розміром молекул: Tosoh Biosciences, TSK2000_{SWXL} 7,8 см×30 мм.

5 Всі концентрації пептидів доводили до 10 мг/мл у таких розчинах:

(a) 10 мМ Трис, рН 8,0±3 мг/мл m-крезол;

(b) 10 мМ Трис, рН 8,0±3 мг/мл m-крезол + 150 мМ NaCl;

(c) 10 мМ Трис рН 8,0±3 мг/мл m-крезол + 0,02 % Твін-20;

(d) PBS рН 7,4.

10 5 мл пептиду (10 мг/мл), розчиненого в 10 мМ при рН 8,0, концентрували до приблизно 20 мг/мл за допомогою пристроїв Amicon-ultra 3kDa MWCO. Розчин фільтрували через 0,22 мкм фільтри Millivex (PVDF-мембрана), і кінцеву концентрацію визначали за допомогою спектрометра NanoDrop. Цей початковий розчин використовували для одержання зазначених вище кінцевих розчинів, використовуючи вихідні розчини 3× m-крезолу, 10× NaCl і 100× Твін-20.

15 Розчин у PBS (10 мг/мл) також готували, шляхом розчинення безпосередньо при концентрації 5 мг/мл та концентрування із застосуванням пристроїв Amicon-ultra 3kDa MWCO.

20 Кожен розчин вміщували у холодильник при температурі 4 °C на 1 тиждень, для визначення концентрації проводили дослідження із застосуванням рідинної хроматографії високої ефективності з оберненою фазою (RP-HPLC), та для оцінювання утворення високомолекулярних (HMW) сполук проводили дослідження із застосуванням рідинної хроматографії високої ефективності за розміром молекул (HPLC-SEC). Дослідження завершували на T-0 тижні та T-1 тижні.

Розчинність Сполук 1-4 визначали по суті так, як в описі цього дослідження. Дані з розчинності для Сполук 1-4 в узагальненому вигляді наведені в 2(a)-(d).

Таблиця 2(a)

Дані з розчинності Сполуки 1

Параметр	Узагальнені дані
Розчинність/Розчинення	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері рН 8±3 мг/мл m-крезолу (T8m);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері рН 8±3 мг/мл m-крезолу + 150 мМ NaCl (T8Nm);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері рН 8±3 мг/мл m-крезолу + 0,02 % твін-20 (T8Tm);
	Розчинність 10 мг/мл в PBS, рН 7,4;
	Після зберігання протягом 1 тижня при температурі 4 °C видимих ознак осадження або розділення фаз не спостерігалось;
	За даними SEC-HPLC утворення високомолекулярних сполук не спостерігалось;
	За даними RP-HPLC концентрація 10 мг/мл зберігається протягом дослідження тривалістю 1 тиждень.

Таблиця 2(b)

Дані з розчинності Сполуки 2

Параметр	Узагальнені дані
Розчинність/Розчинення	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу (T8m);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу + 150 mM NaCl (T8Nm);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу + 0,02 % твін-20 (T8Tm);
	Розчинність 10 мг/мл в PBS, pH 7,4;
	Після зберігання протягом 1 тижня при температурі 4 °C видимих ознак осадження або розділення фаз не спостерігалось;
	За даними SEC-HPLC утворення високомолекулярних сполук не спостерігалось;
	За даними RP-HPLC концентрація 10 мг/мл зберігається протягом дослідження тривалістю 1 тиждень.

Таблиця 2(c)

Дані з розчинності Сполуки 3

Параметр	Узагальнені дані
Розчинність/Розчинення	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу (T8m);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу + 150 mM NaCl (T8Nm);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу + 0,02 % твін-20 (T8Tm);
	Розчинність 10 мг/мл в PBS, pH 7,4;
	Після зберігання протягом 1 тижня при температурі 4 °C видимих ознак осадження або розділення фаз не спостерігалось;
	За даними SEC-HPLC утворення високомолекулярних сполук не спостерігалось;
	За даними RP-HPLC концентрація 10 мг/мл зберігається протягом дослідження тривалістю 1 тиждень.

Таблиця 2(d)

Дані з розчинності Сполуки 4

Параметр	Узагальнені дані
Розчинність/Розчинення	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу (T8m);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу + 150 mM NaCl (T8Nm);
	Розчинність 10 мг/мл в трис-буфері pH 8+3 мг/мл m-крелозу + 0,02 % твін-20 (T8Tm);
	Розчинність 10 мг/мл в PBS, pH 7,4;
	Після зберігання протягом 1 тижня при температурі 4 °C видимих ознак осадження або розділення фаз не спостерігалось;
	За даними SEC-HPLC утворення високомолекулярних сполук не спостерігалось;
	За даними RP-HPLC концентрація 10 мг/мл зберігається протягом дослідження тривалістю 1 тиждень.

5

ФУНКЦІЯ IN VITRO

Зв'язувальна спорідненість Сполук 1-4 до рекомбінантного людського рецептора Gcg (hGcg-R) і людського рецептора GLP-1 (hGLP-1-R)

Для визначення констант дисоціації у стані рівноваги (K_i) для Сполук 1-4 проводили

дослідження конкурентного зв'язування мічених радіоактивними ізотопами лігандів з використанням методів сцинтиляційного аналізу із застосуванням молекулярно імпринтованих полімерів (SPA) та мембран, одержаних зі стабільно трансфікованих клітин 293HEK, що надекспресують hGcg-R або hGLP-1-R. Протоколи та результати експериментів описані нижче.

5 Дослідження зв'язування hGLP-1R

В дослідженні зв'язування рецепторів GLP-1 використовували клонований hGLP-1-R (Graziano M.P., Hey P.J., Borkowski D., Chicchi G.G., Strader C.D., Biochem Biophys Res Commun. 196 (1): 141-6, 1993), виділений з клітин 293HEK, які надекспресують рекомбінантний hGLP-1R. кДНК hGLP-1R субклонували в експресійній плазміді pHd (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell B.W., Berg D.T., Walls J. and Yan S.B. Bio/Technology 5:1189-1192, 1987). ДНК цієї плазміді трансфікували клітини 293HEK з подальшим відбором за допомогою гіроміцину (200 мкг/мл).

Неочищені цитоплазматичні мембрани одержували з використанням клітин з прикріпленої культури. Клітини піддавали лізису на льоду в гіпотонічному буфері, що містить 50 мМ Трис HCl, pH 7,5 та інгібітори протеаз Roche Complete™ з EDTA (Roche Complete™). Суспензію клітин руйнували із застосуванням скляного гомогенізатора Potter-Elvehjem, спорядженого тефлоновим товчачиком (Teflon®) Teflon®, за 25 ходів. Гомогенат центрифугували при температурі 4 °C при 1100×g протягом 10 хв. Супернатант збирали, та зберігали на льоду, тоді як клітинний дебрис ресуспендували у гіпотонічному буфері, і повторно гомогенізували. Суміш центрифугували при 1100×g протягом 10 хв. Другий супернатант об'єднували з першим супернатантом, і центрифугували при 35000×g протягом 1 год. при температурі 4 °C. Мембранний осад ресуспендували у буфері для гомогенізації, що містив інгібітори протеаз, швидко заморожували у рідкому азоті, і зберігали у вигляді аліквот у холодильнику при температурі -80 °C до використання.

GLP-1 мітили радіоактивним йодом із застосуванням лактопероксидази з ізотопом ¹²⁵I, і очищали рідинною хроматографією з оберненою фазовою на Perkin-Elmer (NEX308). Питома активність становила 2200 Кі/ммоль. Визначення К_D здійснювали шляхом гомологічної конкуренції замість насичувального зв'язування через високий вміст пропанолу в матеріалі I-125 GLP-1. За оцінкою К_D становив 1,24 нМ, і це значення використовували для розрахунку значень К_i для всіх випробуваних сполук.

Дослідження зв'язування рецепторів здійснювали з використанням методу сцинтиляційного аналізу із застосуванням молекулярно імпринтованих полімерів (SPA) з гранулами аглютиніну з паростків пшениці (WGA) (Perkin Elmer). Зв'язувальний буфер містив 25 мМ 4-(2-гідроксietил)-1-піперазинетансульфонової кислоти (HEPES), pH 7,4, 2,5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,1 % (у відношенні маси до об'єму) бацитрацину (Affymetrix), 0,003 % (у відношенні маси до об'єму) монолаурату поліоксіетиленсорбітану (TWEEN®-20) та інгібітори протеаз Roche Complete™ без EDTA (Roche Complete™). GLP-1 розчиняли у DMSO з концентрацією 0,339 мг/мл (0,1 мМ), і зберігали замороженим при -20 °C у вигляді 100 мкл аліквот. Аліквоту GLP-1 розбавляли, і використовували при проведенні дослідження зв'язування протягом 1 год. Аналог пептиду розчиняли у диметилсульфоксиді (DMSO) з подальшим трикратним послідовним розбавленням у 100 % DMSO. Далі 5 мкл послідовно розбавленої сполуки або DMSO переносили на аналітичні планшети з прозорим дном Corning® 3632, які містили 45 мкл аналітичного зв'язувального буфера або немічений контрольний GLP-1 (неспецифічне зв'язування (NSB) з кінцевою концентрацією 0,25 мМ). Потім додавали 50 мкл мембран hGLP-1R (0,5 мкг/лунка), 50 мкл I-125 GLP-1 (кінцева концентрація 0,15 нМ) та 50 мкл гранул WGA (150 мкг/лунка), планшети щільно закривали, і змішували компоненти на планшетному шейкері (настроювання 6) протягом 1 хв. Планшети зчитували за допомогою сцинтиляційного лічильника PerkinElmer Trilux MicroBeta® після 12 год. відстоювання при кімнатній температурі.

Результати обчислювали як відсоток специфічного зв'язування I-125-GLP-1 у присутності сполуки. Абсолютну концентрацію IC₅₀ сполуки визначали методом із застосуванням нелінійної регресії відсоткового специфічного зв'язування I-125-GLP-1 у зіставленні з концентрацією доданої сполуки. Концентрацію IC₅₀ перетворювали на К_i за рівнянням Ченга-Пруссофа (Cheng Y., Prusoff W.H., Biochem Pharmacol., 22, 3099-3108, (1973)).

К_i Сполук 1-4, людського Gcg і людського GLP-1(7-36)NH₂ на hGLP-1-R показані в наведеній нижче Таблиці 3. Кількість повторювань (n) вказана в дужках. Кваліфікатор А Визначник (>) вказує на те, що відсоток інгібування не досягнув 50 %, і обчислену К_i одержували, використовуючи найбільшу випробувану концентрацію. n=1/n вказує на те, що середні значення не обчислюються, якщо всі значення мають знак >, а показане значення є найвищим обчисленим значенням.

K_i Сполук 1-4, людського Gcg і людського GLP-1(7-36)NH₂ на hGLP-1-R

Сполука	K _i , нМ ± SEM (середня квадратична помилка середнього), (n)
Сполука 1	23,0±5,5 (n=6)
Сполука 2	28,6±4,8 (n=4)
Сполука 3	8,68±1,60 (n=4)
Сполука 4	20,2±8,2 (n=4)
Людський Gcg	>4940 (n=1/2)
Людський GLP-1(7-36)NH ₂	0,75±0,056 (n=67)

Дослідження зв'язування hGcg-R

В дослідженні зв'язування рецепторів Gcg використовували клонований hGcg-R (Lok S. et al., Gene 140 (2), 203-209 (1994)), виділений з клітин 293HEK, що надекспресують рекомбінантний hGcg-R. кДНК hGcg-R субклонували в експресійній плазміді pHd (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell B.W., et al., Bio/Technology 5:1189-1192, 1987)). ДНК цієї плазміді трансфікували в клітини 293HEK та відбирали гіпоміцином (200 мкг/мл).

Неочищені цитоплазматичні мембрани одержували з використанням клітин з прикріпленої культури. Клітини піддавали лізису на льоду в гіпотонічному буфері, що містив 50 мМ Трис HCl, pH 7,5 та інгібітори протеаз Roche Complete™ з EDTA. Суспензію клітин руйнували із застосуванням скляного гомогенізатора Potter-Elvehjem, спорядженого тефлоновим (Teflon®), товкачиком, за 25 ходів. Гомогенат центрифугували при температурі 4 °C при 1100×g протягом 10 хв. Супернатант збирали, та зберігали на льоду, тоді як клітинний дебрис ресуспендували у гіпотонічному буфері, і повторно гомогенізували. Суміш центрифугували при 1100×g протягом 10 хв. Другий супернатант об'єднували з першим супернатантом, і центрифугували при 35000×g протягом 1 год. при температурі 4 °C. Мембранний осад ресуспендували у буфері для гомогенізації, що містив інгібітори протеаз, швидко заморожували у рідкому азоті, і зберігали у вигляді аліквот у холодильнику при температурі -80 °C до використання.

Gcg мітили радіоактивним йодом із застосуванням лактопероксидази з ізотопом ¹²⁵I, і очищали рідинною хроматографією з оберненою фазою на Perkin-Elmer (NEX207). Питома активність становила 2200 Кі/ммоль. Визначення K_d здійснювали шляхом гомологічної конкуренції замість насичувального зв'язування через високий вміст пропанолу в матеріалі I-125 GLP-1. За оцінкою K_d становив 3,92 нМ, і це значення використовували для розрахунку значень K_i для всіх випробуваних сполук.

Дослідження зв'язування рецепторів здійснювали з використанням методу сцинтиляційного аналізу із застосуванням молекулярно імпринтованих полімерів (SPA) з гранулами аглютиніну з паростків пшениці (WGA) (Perkin Elmer). Зв'язувальний буфер містив 25 мМ HEPES, pH 7,4, 2,5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,1 % (у відношенні маси до об'єму) бацитрацину (Affymetrix), 0,003 % (у відношенні маси до об'єму) монолаурату поліоксіетиленсорбітану (TWEEN®-20) та інгібітори протеаз Roche Complete™ без EDTA. Gcg розчиняли у DMSO з концентрацією 3,48 мг/мл (1 мМ), і зберігали замороженим при -20 °C у вигляді 100 мкл аліквот. Аліквоту Gcg розбавляли, і використовували при проведенні дослідження зв'язування протягом 1 год. Аналог пептиду розчиняли у DMSO з подальшим трикратним послідовним розбавленням у 100 % DMSO. Далі 5 мкл послідовно розбавленої сполуки або DMSO переносили на аналітичні планшети з прозорим дном Corning® 3632, які містили 45 мкл аналітичного зв'язувального буфера або немічений контрольний Gcg (NSB з кінцевою концентрацією 1 мкМ). Потім додавали 50 мкл мембран hGcg-R (0,5 мкг/лунка), 50 мкл I-125 Gcg (кінцева концентрація 0,15 нМ в реакційній суміші) та 50 мкл гранул WGA (150 мкг/лунка), планшети щільно закривали, і змішували компоненти на планшетному шейкері (настроювання 6) протягом 1 хв. Планшети зчитували за допомогою сцинтиляційного лічильника PerkinElmer Trilux MicroBeta® після 12 год. відстоювання при кімнатній температурі.

Результати обчислювали як відсоток специфічного зв'язування I-125-Gcg у присутності сполуки. Абсолютну концентрацію IC₅₀ сполуки визначали методом із застосуванням нелінійної регресії відсоткового специфічного зв'язування I-125-Gcg у зіставленні з концентрацією доданої сполуки. Концентрацію IC₅₀ перетворювали на K_i за рівнянням Ченга-Прусофа (Cheng Y., Prusoff W.H., Biochem Pharmacol., 22, 3099-3108, (1973)). K_i Сполук 1-4, людського Gcg і людського GLP-1(7-36)NH₂ на hGcg-R показані в наведеній нижче Таблиці 4. Кількість повторювань (n) вказана в дужках. Визначник (>) вказує на те, що відсоток інгібування не досягнув 50 %, і обчислену K_i

одержували, використовуючи найбільшу випробувану концентрацію. $n=1/2$ вказує на те, що середні значення не обчислюються, якщо всі значення мають знак $>$, а показане значення є найвищим обчисленим значенням.

Таблиця 4

K_i Сполук 1-4, людського Gcg і людського GLP-1(7-36)NH₂ на hGcg-R

Сполука	K_i , нМ \pm SEM, (n)
Сполука 1	14,6 \pm 4,4 (n=6)
Сполука 2	17,7 \pm 5,0 (n=4)
Сполука 3	37,3 \pm 4,2 (n=4)
Сполука 4	27,4 \pm 3,3 (n=4)
Людський Gcg	2,49 \pm 0,24 (n=73)
Людський GLP-1(7-36)NH ₂	>2420 (n=1/2)

5

Функціональні дослідження hGLP-1-R та hGcg-R

Функціональну активність визначали на клональних лініях клітин HEK-293, які експресують hGLP-1-R і hGcg-R. Протоколи експериментів та результати описані нижче.

10 Кожну клітинну лінію, що надекспресує ці рецептори, обробляли пептидом у живильному середовищі DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла, Gibco, номер за каталогом: 31053), доповненому 1X GlutaMAX™ (дипептид L-аланін-L-глутамін у 0,85 % розчині NaCl, Gibco, номер за каталогом: 35050), 0,25 % FBS (діалізована ембріональна бичача сироватка, Gibco, номер за каталогом: 26400), 0,05 % фракції V BSA (фракція V бичачого альбуміну, Gibco, номер за каталогом: 15260), 250 мкМ IBMX (3-ізобутил-1-метилксантин) та 20 мМ HEPES [N-2-гідроксietил]піперазин-N'-(2-етансульфонова кислота), HyClone, номер за каталогом: SH30237.01 у 40 мкл аналітичному об'ємі. Після 60-хвилинної інкубації при кімнатній температурі здійснюють кількісне визначення одержаного збільшення внутрішньоклітинного цАМФ (аденозин 3',5'-циклічний монофосфат), використовуючи аналітичний набір CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF Assay Kit (62AM4PEJ). Рівні цАМФ всередині клітини виявляли шляхом додання кон'югату цАМФ-d2 в буфері для лізису клітин (20 мкл), з подальшим доданням антитіла проти цАМФ-Eu³⁺-криптату, також у буфері для лізису клітин (20 мкл). Одержану реакційну суміш для конкурентного аналізу інкубували протягом щонайменше 60 хв при кімнатній температурі з подальшим детектуванням за допомогою приладу PerkinElmer Envision® зі збудженням при 320 нм і випромінюванням при 665 нм та 620 нм. Одиниці, визначені за допомогою цього приладу (випромінювання при 665 нм та 620 нм \times 10000), є обернено пропорційними кількості наявного цАМФ, і їх перетворювали на нМ цАМФ на лунку з використанням стандартної кривої цАМФ. Кількість цАМФ (нМ), утвореного в кожній лунці, перетворювали на відсоток максимальної відповіді, яка спостерігається з 10 нМ людського GLP-1(7-36)NH₂ або 10 нМ людського Gcg.

30 Відносне значення EC₅₀ та максимальний відсоток (E_{max}) визначали за допомогою нелінійного регресійного аналізу, використовуючи відсоток максимальної відповіді у зіставленні з концентрацією доданого пептиду з підгонкою за чотирипараметричним логістичним рівнянням (Genedata Screener®).

35 Функціональні дані для Сполук 1-4, людського GLP-1(7-36)NH₂, людського Gcg та людського ОХМ дикого типу показані в наведених нижче Таблиці 5. Середні значення EC₅₀ виражені у вигляді геометричних середніх \pm середня квадратична помилка середнього (SEM) з кількістю повторювань (n), зазначених у дужках. Середні значення E_{max} виражені у вигляді арифметичних середніх \pm середня квадратична помилка. ND означає, що агоністична активність не була виявлена. Усі наведені значення мають три (3) значущі цифри.

40

Таблиця 5

Функціональна активність (EC_{50}) та ефективність (E_{max})
Сполук 1-4 для людського GLP-1(7-36)NH₂, людського Gcg та людського OXM дикого типу

Сполука	Людський GLP-1-R		Людський Gcg-R	
	EC_{50} , нМ \pm SEM (n)	E_{max} , %	EC_{50} , нМ \pm SEM, (n)	E_{max} , %
Сполука 1	23,9 \pm 4,5 (13)	104 \pm 7	7,21 \pm 1,06 (13)	112 \pm 3
Сполука 2	83,1 \pm 16,8 (15)	107 \pm 7	26,5 \pm 2,2 (15)	114 \pm 5
Сполука 3	34,3 \pm 9,4 (13)	105 \pm 5	15,3 \pm 2,2 (13)	104 \pm 5
Сполука 4	106 \pm 18 (13)	85,2 \pm 6,0	68,8 \pm 7,2 (15)	116 \pm 4
Людський Gcg	ND	ND	0,023 \pm 0,014 (47)	113 \pm 1
Людський GLP-1(7-36)NH ₂	0,168 \pm 0,008 (51)	101 \pm 1	ND	ND
Людський OXM дикого типу	9,54 \pm 1,34 (8)	96,9 \pm 5,7	0,757 \pm 0,090 (8)	121 \pm 7

Функціональна активація паючого GLP-1-R в клітинній лінії інсуліноми INS1 832-3

Для визначення функціональної активності Сполук 1-4 щодо стимуляції продукування цАМФ на рецепторах ендogenous GLP-1 використовували лінію бета-клітин підшлункової залози пацюків, клітини INS1 832-3. Клітини підтримували в середовищі RPMI 1640 (HyClone, номер за каталогом: SH30027), доповненому 10 % ембріональної бичачої сироватки, 10 мМ HEPES, 1 мМ пірувату натрію, 2 мМ L-глутаміну, 50 мкМ 2-меркаптоетанолу та 100 Од/мл пеніциліну/100 мкг/мл стрептоміцину, в 5 % CO₂-інкубаторі при температурі 37 °C з пасажуванням двічі на тиждень.

Виконання цього дослідження вимагає відокремлення клітин від культуральних флаконів із застосуванням розчину для відокремлення клітин без ферментів (Enzyme Free Cell Stripper) і осадження центрифугуванням при 1000 об/хв протягом 5 хв при кімнатній температурі. Одержаний клітинний дебрис ресуспендували в збалансованому сольовому розчині Ерла (EBSS), доповненому 11,2 мМ глюкози та 0,1 % BSA. 40 мкл клітинної суспензії при густині 1 \times 10⁶/мл наносили на 96-лункові (чорні) планшети з половинним ребром (Costar 3875), та інкубували при температурі 37 °C у 5 % CO₂-інкубаторі протягом 2 год. для відновлення та голодування. Послідовні розведення досліджуваних сполук одержували при 100 \times кінцевій досліджуваній концентрації в 100 % DMSO з подальшим 20-кратним розбавленням в EBSS і доповненням 11,2 мМ глюкози, 0,1 % BSA і 1,25 мМ IBMX (Sigma I-7816). Після 2-годинного голодування клітини обробляли сполукою шляхом додавання 10 мкл 5 \times розведень сполук на планшети для культивування клітин (n=2), та інкубували при температурі 37 °C в 5 % CO₂-інкубаторі протягом 30 хв.

Концентрацію цАМФ визначали за допомогою аналітичного набору HTRF cAMP assay kit (Cisbio); до клітин на планшеті додають кон'югат цАМФ-d2 в буфері для лізису клітин (20 мкл), з подальшим доданням антитіла проти цАМФ-Eu³⁺-криплату, також у буфері для лізису клітин (20 мкл). Одержану реакційну суміш для конкурентного аналізу інкубували протягом щонайменше 60 хв при кімнатній температурі з подальшим детектуванням із застосуванням приладу PerkinElmer Envision® зі збудженням при 320 нм і випромінюванням при 665 нм та 620 нм. Одиниці, визначені за допомогою цього приладу (випромінювання при 665 нм/620 нм \times 10000), є обернено пропорційними кількості наявного цАМФ, і їх перетворювали на нМ цАМФ на лунку з використанням стандартної кривої цАМФ.

Концентрацію цАМФ в кожній лунці (нМ) розраховували з використанням стандартної кривої цАМФ, і перетворювали її на відсоток максимальної відповіді, яка спостерігалась з нативним пептидом GLP-1 при 300 нМ для підбору кривої.

Відносне значення EC_{50} та максимальний відсоток (% E_{max}) визначали із застосуванням нелінійного регресійного аналізу, використовуючи відсоток максимальної відповіді у зіставленні з концентрацією доданого пептиду з підгонкою за чотирипараметричним логістичним рівнянням (програме забезпечення GraphPad Prism (версія 6.05)). Дослідження проводили з дубльованими планшетами. Кількість повторювань (n) вказана в дужках.

EC_{50} і % E_{max} для людського OXM дикого типу, семаглутиду та Сполуки 1 і Сполуки 2 були обчислені по суті так, як описано вище. Дані EC_{50} та % E_{max} для цих сполук наведені у Таблиці 6. Крім того, Сполука 1 та Сполука 2 збільшували продукування цАМФ дозозалежним чином (дані не показані).

Таблиця 6

EC₅₀ людського ОХМ дикого типу, семаглутиду та Сполука 1 і Сполука 2 на паціючому GLP-1-R в клітинній лінії інсуліноми INS1 832-3

Сполука	EC ₅₀ (нМ)	E _{max} (%)
Людський ОХМ дикого типу	7,3 (n=1)	121,1
Семаглутид	5,8 (n=1)	107,2
Сполука 1	26,1 (n=1)	112,3
Сполука 2	62 (n=1)	104,5

Функціональна активація hGcg-R у первинних людських гепатоцитах

Для визначення функціональної активності сполук на стимуляцію продукування цАМФ на рецепторах ендогенного Gcg використовували первинні людські гепатоцити. Флакони з первинними людськими гепатоцитами заморожували у баці з рідким азотом. Після виймання флакони негайно відтаювали на водяній бані, яка мала температуру 37 °С. Потім клітинну суспензію переносили на 50 мл CHRM (Gibco/Life Technologies, номер за каталогом: CM7000, кріоконсервоване середовище для відновлення гепатоцитів).

Клітинну суспензію центрифугували при 1000×g протягом 10 хв. Клітинний дебрис ресуспендували у 5 мл середовища для культивування в бактеріологічних чашках після видалення CHRM шляхом аспірації. Згадане середовище для культивування в бактеріологічних чашках готували шляхом додання всього вмісту CM3000 Supplement Packs до 500 мл середовища Вільямса (Gibco/Life Technologies) з подальшим стерильним фільтруванням через 0,22 мкм мембрану.

Густину клітин підраховували на гемоцитометрі, додавши 100 мкл клітинної суспензії до 100 мкл трипанового синього (Trypan Blue 0,04 %, HyClone, номер за каталогом: SV30084.01). Клітинну суспензію додатково розбавляли в середовищі для культивування в бактеріологічних чашках до кінцевої густини $0,8 \times 10^6$ клітин/мл. У кожен лунку 96-лункового планшета з колагеновим покриттям (Corning BioCoat, номер за каталогом: 354649, партія № 22314033) додавали 65 мл середовища для культивування в бактеріологічних чашках. Потім у кожен лунку 96-лункового планшета з колагеновим покриттям додавали 65 мкл клітинної суспензії до кінцевої густини 50000 клітин/лунка. Планшет для клітинних культур інкубували в 5 % CO₂-інкубаторі при температурі 37 °С протягом 3-4 год.

Після 3-4-годинного інкубування середовище видаляли, і замінювали його на 100 мл середовища для культивування в бактеріологічних чашках. Зазначене середовище для культивування в бактеріологічних чашках готували шляхом додання всього вмісту CM4000 Supplement Packs до 500 мл середовища Вільямса (Gibco/Life Technologies) з подальшим стерильним фільтруванням через 0,22 мкм мембрану. Планшет для клітинних культур повертали до 5 % CO₂-інкубатора при температурі 37 °С на ніч під час підготовки до дослідження цАМФ.

Під час підготовки до дослідження Сполуку 1 і Сполуку 2 та людський ОХМ дикого типу піддавали 3-кратному послідовному розведенню в аналітичному буфері для сполук (HBSS, що містить 20 мМ HEPES та 1 % термоінактивованої FBS) для 10 концентрацій.

Планшет для клітинних культур виймали з інкубатора, і середовище видаляли шляхом обережного відсмоктування без порушення моношару клітин. Клітини обробляли додаванням на планшет для клітинних культур 40 мкл аналітичного буфера для клітин та 40 мкл досліджуваного розчину (тобто Сполука 1, Сполука 2 або людський ОХМ дикого типу, розбавлені в аналітичному буфері для сполук) з подальшим інкубуванням при кімнатній температурі протягом 1 год. з обережним перемішуванням.

Концентрацію цАМФ визначали із застосуванням аналітичного набору HTRF cAMP assay kit (Cisbio); до клітин на планшеті додавали кон'югат цАМФ-d2 в буфері для лізису клітин (40 мкл), з подальшим доданням антитіла проти цАМФ-Eu³⁺-криптану, також у буфері для лізису клітин (40 мкл). Одержану реакційну суміш для конкурентного аналізу інкубували протягом щонайменше 60 хв при кімнатній температурі з подальшим детектуванням із застосуванням приладу PerkinElmer Envision® зі збудженням при 320 нм і випромінюванням при 665 нм та 620 нм. Одиниці, визначені із застосуванням цього приладу (випромінювання при 665 нм/620 нм×10000), є обернено пропорційними кількості наявного цАМФ, і їх перетворюють на нМ цАМФ на лунку з використанням стандартної кривої цАМФ.

Концентрацію цАМФ в кожній лунці (нМ) обчислювали з використанням стандартної кривої цАМФ, і перетворювали її на відсоток максимальної відповіді, яка спостерігалась з аналогом

Gcg, кон'югованим з насиченою C18 жирною кислотою (двохосновна кислота) для підбору кривої.

Відносно значення EC₅₀ та максимальний відсоток (% E_{max}) визначали із застосуванням нелінійного регресійного аналізу, використовуючи відсоток максимальної відповіді у зіставленні з концентрацією доданого пептиду з підгонкою за чотирипараметричним логістичним рівнянням (програмне забезпечення GraphPad Prism (версія 6.05)).

EC₅₀ і % E_{max} для Сполуки 1 і Сполуки 2 та людського ОХМ дикого типу були обчислені по суті так, як описано вище. Дані EC₅₀ та % E_{max} для цих сполук наведені у Таблиці 7. Крім того, Сполука 1 та Сполука 2 збільшували продукування цАМФ дозозалежним чином (дані не показані). Кількість повторювань (n) вказана в дужках.

Таблиця 7

EC₅₀ Сполуки 1 і Сполуки 2 та людського ОХМ дикого типу
на hGcg-R у первинних людських гепатоцитах

Сполука	EC ₅₀ (нМ)	E _{max} (%)
Людський ОХМ дикого типу	29,8 (n=1)	90,0
Сполука 1	99,9 (n=1)	100,0
Сполука 2	159,4 (n=1)	101,2

ФАРМАКОКІНЕТИКА

Дослідження фармакокінетики на макаках-крабоїдах

Фармакокінетичні властивості in vivo сполук за цим винаходом демонструють, використовуючи макак-крабоїдів.

Сполуки вводили одною-єдиною внутрішньовенною або підшкірною дозою 50 нмоль/кг або 250 нмоль/кг. Проби крові від кожної тварини відбирали через 4 год., 8 год., 12 год., 24 год., 48 год., 72 год., 96 год., 120 год., 144 год., 168 год., 192 год., 240 год., 288 год., 208 год., 480 год., 576 год. та 672 год. після введення дози.

Концентрації сполук у плазмі визначали методом LC/MS (рідинна хроматографія/мас-спектрометрія). Стисло, сполуку за цим винаходом екстрагували з 100 % плазми мавп (25 мкл) з використанням ацетонітрилу. При центрифугуванні утворювалися два різні шари зі сполукою, розташованою в рідкому шарі. 80 мкл аліквоту супернатанту переносили на 96-лунковий планшет, розбавляли 150 мкл води та 25 мкл мурашиної кислоти. Розбавлений зразок (10 мкл) вводили в 3 мкм аналітичну колонку Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 см × 1 мм. Елюат спрямовували в мас-спектрометр Thermo Q-Exactive для виявлення та кількісного оцінювання.

У експериментах, виконаних по суті так, як описано для цього дослідження, макам-крабоїдам вводили одну-єдину підшкірну (50 нмоль/кг) дозу Сполуки 1 в 40 мМ розчині Трис HCl (pH 8,0) об'ємом 0,20 мл/кг. Проби крові від кожної тварини відбирали через 2 год. (тільки внутрішньовенно), 7 год., 12 год., 24 год., 48 год., 72 год., 96 год., 120 год., 168 год., 192 год., 240 год., 336 год., 480 год., 576 год. та 672 год. після введення дози.

Іншим макам-крабоїдам вводили одну-єдину внутрішньовенну (50 нмоль/кг) або підшкірну (50 нмоль/кг або 250 нмоль/кг) дозу Сполуки 2 в 40 мМ розчині Трис HCl (pH 8,0) об'ємом 0,20 мл/кг. Проби крові від кожної тварини відбирали через 2 год. (тільки внутрішньовенно), 7 год., 12 год., 24 год., 48 год., 72 год., 96 год., 120 год., 168 год., 192 год., 240 год., 336 год., 480 год., 576 год. та 672 год. після введення дози.

Дані для Сполуки 1 наведено в Таблиці 9, а дані для Сполуки 2 наведено в Таблиці 10.

Сполука 1 досягала середньої максимальної концентрації в плазмі через приблизно 12 год. після 50 нмоль/кг підшкірної дози. Середній період напіввиведення становив 57 год., і середній кліренс становив 2,16 мл/год./кг (Таблиця 8).

Сполука 2 досягала середньої максимальної концентрації в плазмі через приблизно 24 год. після 50 нмоль/кг підшкірної дози. Середній період напіввиведення становив 122 год., і середній кліренс становить 0,55 мл/год./кг (Таблиця 9).

Таблиця 8: Індивідуальні та середні фармакокінетичні параметри після введення одної-єдиної 50 нмоль/кг підшкірної дози Сполуки 1 макам-крабоїдам

Таблиця 8

Сполука	№ тварини	T _{1/2} (год.)	T _{max} (год.)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{0-inf} (год·нмоль/л)	CL/F (мл/год./кг)
Сполука 1: підшкірно, 50 нмоль/кг	I07762	47	12	253	21672	2,31
	I07763	67	12	236	24865	2,01
	Середнє	57	12	244	23268	2,16

Скорочення: AUC_{0-inf} – площа під кривою від 0 до нескінченності,
CL/F – кліренс/біодоступність, T_{max} – час до досягнення максимальної концентрації,
C_{max} – максимальна концентрація в плазмі, T_{1/2} – період напіввиведення.

Таблиця 9

Індивідуальні та середні фармакокінетичні параметри після введення одної-єдиної внутрішньовенної або підшкірної дози Сполуки 2 макакам-краб'ядам

Сполука/Шлях введення/Доза	№ тварини	T _{1/2} (год.)	T _{max} (год.)	C ₀ або C _{max} (нмоль/л)	AUC _{0-inf} (год·нмоль/л)	CL/F (мл/год./кг)
Сполука 2: внутрішньовенно, 50 нмоль/кг	I07772	88	Дані відсутні	1017	94828	0,53
	I07773	131	Дані відсутні	1105	93174	0,54
	Середнє	110	Дані відсутні	1061	94001	0,53
Сполука 2: підшкірно, 50 нмоль/кг	I07764	137	24	474	100967	0,50
	I07765	106	24	452	82792	0,60
	Середнє	122	24	463	91879	0,55
Сполука 2: підшкірно, 250 нмоль/кг	I07766	115	12	3640	429859	0,58
	I07767	104	12	3615	540175	0,46
	Середнє	110	12	3628	485017	0,52

Скорочення: AUC_{0-inf} – площа під кривою від 0 до нескінченності, CL – кліренс,
CL/F – кліренс/біодоступність, T_{max} – час до досягнення максимальної концентрації,
C₀ – екстраполяція концентрації в час 0 год., C_{max} – максимальна концентрація в плазмі,
T_{1/2} – період напіввиведення, NA = дані відсутні.

ДОСЛІДЖЕННЯ IN VIVO

5 Пероральний тест на глюкозотолерантність (OGTT) на мишах DIO

10 Мишача модель ожиріння, спричиненого дієтою (DIO), являє собою модель інсулінорезистентності. У цьому дослідженні використовують п'яти-шестимісячних мишей-самців DIO (C57BL/6) від компанії Taconic Biosciences. Тварин індивідуально розміщували в приміщенні з контрольованою температурою (24 °C) з 12-годинним циклом чергування світла і темряви (вмикання освітлення о 06:00) та вільним доступом до їжі та води. Тривалість періоду акліматизації у приміщенні становить два тижні. Напередодні дослідження тварин довільно розподіляли на групи відповідно до маси їхнього тіла. У другій половині того самого дня тварин розміщували в чистих клітках, позбавляючи доступу до їжі і шляхом підшкірної ін'єкції вводили носій (40 mM Трис-HCl, pH 8,0) або досліджувані сполуки. Наступного ранку, через 16 год. після введення пептиду, визначали масу тіла натщесерце для розрахунку доз глюкози. Для визначення вмісту глюкози у крові у час 0 відбирали проби крові. Після цього тваринам із застосуванням шлунокового зонда пероральним шляхом вводили глюкозу (2 г/кг). Два вимірювання рівня глюкози із застосуванням глюкометра здійснювали через 15 хв, 30 хв, 60 хв та 120 хв після перорального введення глюкози. В кожний момент часу реєстрували середнє значення двох показників рівня глюкози, і підраховували площу під кривою. Статистичні дані аналізували із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) з порівнянням за критерієм Даннета за допомогою JMP 6; значущість позначена при p≤0,05 у зіставленні з носієм.

25 У експериментах, виконаних по суті так, як в описаному дослідженні, Сполука 2 продемонструвала дозозалежне зниження рівня глюкози під час тесту на глюкозотолерантність, а AUC глюкози була зниженою при всіх трьох випробуваних дозах 1 нмоль/кг, 3 нмоль/кг і 10 нмоль/кг (Таблиця 10).

Таблиця 10

AUC глюкози мишей-самців DIO, оброблених Сполукою 2 та семаглутидом у відповідь на OGTT (2 г/кг)

Сполука	Доза (нмоль/кг)	AUC глюкози (% носія)
Сполука 2	1	76*
Сполука 2	3	50*
Сполука 2	10	39*
Семаглутид	1	59*
Семаглутид	3	51*
Семаглутид	10	38*

відсоток (%) носія, обчислений як $100 \times$ (Значення обчислене для групи сполук/значення обчислене для групи носія)

* $p \leq 0,05$

OGTT на мишах DIO, оброблених стрептозотоцином (STZ)

- 5 Модель на мишах, оброблених STZ, являє собою модель раннього діабету. У цьому дослідженні використовували п'яти-шестимісячних мишей-самців DIO (C57BL/6) від компанії Taconic Biosciences. Тварин індивідуально розміщували в приміщенні з контрольованою температурою (24°C) з 12-годинним циклом чергування світла і темряви (вмикання освітлення о 06:00) та вільним доступом до їжі та води. Після двотижневої акліматизації у приміщенні мишам у вівторок та п'ятницю внутрішньоочеревинно впорскували STZ у дозі 50 мг/кг. Через два тижні
- 10 після ін'єкції тварин з рівнями глюкози 180-300 мг/дл о 09:00 ранку відбирали для постановки OGTT. За день до проведення дослідження тварин довільно розподіляли на групи відповідно до маси їхнього тіла та рівнів глюкози у крові. Тваринам шляхом підшкірної ін'єкції вводили носій або досліджувані сполуки безпосередньо перед позбавленням доступу до їжі протягом ночі (16:00). Для визначення рівня глюкози у момент часу 0 наступного ранку о 08:00, через 16 год.
- 15 після введення сполук, відбирали проби крові. Тваринам перорально вводили глюкозу у дозі 2 г/кг. Рівні глюкози визначали через 15 хв, 30 хв, 60 хв та 120 хв після перорального цукрового навантаження. Статистичні дані аналізували із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) з порівнянням за критерієм Даннета за допомогою JMP 6. Значущість позначена при $p \leq 0,05$ у зіставленні з носієм.
- 20 У експериментах, виконаних по суті так, як в описаному дослідженні, Сполука 2 продемонструвала дозозалежне зниження екскурсії глюкози під час тесту на глюкозотолерантність AUC глюкози була зниженою при всіх трьох випробуваних дозах 1 нмоль/кг, 3 нмоль/кг і 10 нмоль/кг (Таблиця 11).

Таблиця 11

AUC глюкози мишей-самців, яким вводили STZ, оброблених сполукою 2 та семаглутидом у відповідь на OGTT (2 г/кг)

Сполука	Доза (нмоль/кг)	AUC глюкози (% носія)
Сполука 2	1	70*
Сполука 2	3	48*
Сполука 2	10	35*
Семаглутид	1	72*
Семаглутид	3	53*
Семаглутид	10	35*

Відсоток (%) носія, обчислений як $100 \times$ (Значення обчислене для групи сполук/значення обчислене для групи носія)

* $p \leq 0,05$

Глікемічний контроль у мишей DIO

У цьому дослідженні використовували п'яти-шестимісячних мишей-самців DIO (C57BL/6) від компанії Taconic Biosciences. Тварин індивідуально розміщували в приміщенні з контрольованою температурою (24°C) з 12-годинним циклом чергування світла і темряви (вмикання освітлення о 06:00) та вільним доступом до їжі та води. Після двотижневої акліматизації у приміщенні мишей довільно розподіляли на експериментальні групи (n=7/група) відповідно до маси їхнього тіла та рівня глюкози у крові. Мишам шляхом одноразової підшкірної ін'єкції вводили носій або сполуки (25 нмоль/кг). Рівень глюкози у крові визначали через 2 год. та 8 год. після ін'єкції і потім один раз на день о 08:00 протягом 4 днів. OGTT проводили через 44 год. та 78 год. після ін'єкції пептиду. Статистичні дані аналізували із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) з порівнянням за критерієм Даннета за допомогою JMP 6. Значущість позначена при $p \leq 0,05$ у зіставленні з носієм.

У експериментах, виконаних по суті так, як в описаному дослідженні, миші, оброблені Сполукою 2 і Сполукою 4, мали більш низький рівень глюкози ніж контрольні миші, оброблені носієм, до 96 год. після ін'єкції. Миші, оброблені Сполукою 2 і Сполукою 4, мали меншу екскурсію глюкози після перорального цукрового навантаження в обидва моменти часу при проведенні OGTT.

Сполука 1 і Сполука 3 знижували рівень глюкози в крові до 72 год. (Таблиця 12).

Миші, оброблені Сполукою 1 і Сполукою 3, мали меншу екскурсію глюкози після перорального цукрового навантаження через 44 год після ін'єкції пептиду (Таблиця 13).

Таблиця 12

Рівні глюкози в крові, визначені через 2 год., 8 год., 24 год., 48 год., 72 год.
та 96 год. після ін'єкції у мишей-самців DIO

Час	Рівень глюкози у крові (мг/дл) після ін'єкції носія		Рівень глюкози у крові (мг/дл) після ін'єкції Сполуки 1		Рівень глюкози у крові (мг/дл) після ін'єкції Сполуки 2		Рівень глюкози у крові (мг/дл) після ін'єкції Сполуки 3		Рівень глюкози у крові (мг/дл) після ін'єкції Сполуки 4	
	Середнє	SEM	Середнє	SEM	Середнє	SEM	Середнє	SEM	Середнє	SEM
2	155,7	5,0	168,5	21,4	112,7	8,5	173,4	19,0	110,2	2,3
8	164,5	6,7	79,4	3,4	87,4	1,2	81,4	3,8	91,5	4,4
24	189,1	5,1	90,6	4,0	101,1	3,1	96,6	2,8	87,4	1,6
48	142,6	2,5	101,9	4,1	101,3	3,1	95,8	5,3	102,9	4,7
72	154,2	4,2	113,4	5,6	97,6	3,8	104,7	5,6	115,7	2,8
96	159,4	4,3	150,0	10,4	115,0	5,5	141,1	7,2	104,6	2,6

Таблиця 13

Екскурсія глюкози при постановці OGTT через 44 год. і 78 год. після ін'єкції сполуки

Сполука	44 год.	78 год.
	AUC глюкози (% носія)	AUC глюкози (% носія)
Сполука 1	42*	90
Сполука 2	39*	66*
Сполука 3	35*	76*
Сполука 4	41*	60*

Відсоток (%) носія, обчислений як $100 \times (\text{Значення обчислене для групи сполук} / \text{значення обчислене для групи носія})$

* $p \leq 0,05$

Обробка мишей DIO протягом тривалого періоду часу

На мишах DIO оцінюють вплив на споживання їжі та масу тіла/жиру. У цьому дослідженні використовували п'яти-шестимісячних мишей DIO (C57BL/6) від компанії Taconic Biosciences. Тварин індивідуально розміщували в приміщенні з контрольованою температурою (24°C) з 12-годинним циклом чергування світла і темряви (вмикання освітлення о 06:00) та вільним

доступом до їжі та води. Тривалість періоду акліматизації у приміщенні становив два тижні. Напередодні початку дослідження жирову масу вимірювали за ядерним магнітним резонансом (ЯМР), використовуючи інструмент Echo Medical System (Houston, штат Техас). Мишей довільно розподіляли на оброблювані групи (N=7 мишей на групу), виходячи з маси тіла та жирової маси, таким чином, щоб кожна група мала аналогічну вихідну середню масу тіла та масу жиру. Носій (40 мМ Трис-НСІ, рН 8,0), досліджувані сполуки або позитивний контроль семаглутид вводили шляхом підшкірної (SC) ін'єкції мишам ad libitum між 08:00-10:00 кожні три дні протягом 15 днів. Підшкірні ін'єкції робили у День 1, День 4, День 7, День 10 та День 13. Маса тіла та споживання їжі визначали перед кожною ін'єкцією протягом всього дослідження. Відсоткові зміни маси тіла

обчислювали за формулою:

$$100 \times \frac{\text{кінцева маса тіла тварини} - \text{початкова маса тіла тварини}}{\text{початкова маса тіла тварини}}$$

Після закінчення дослідження загальну масу жиру знову визначали за ЯМР. Статистичні дані аналізували із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) з порівнянням за критерієм Даннета за допомогою JMP 6. Значущість позначена при $p \leq 0,05$ у зіставленні з носієм.

У експериментах, виконаних по суті так, як в описаному дослідженні, Сполуки 1-4 зменшували споживання їжі та масу тіла/жиру, як показано в наведеній нижче Таблиці 14.

Таблиця 14

% зміна маси тіла та % зміна маси жиру у мишей DIO

Сполука	Доза (нмоль/кг)	Маса тіла (% зміна у зіставленні з носієм з Дня 1)	Маса жиру (% зміна у зіставленні з носієм з Дня 1)
Сполука 1	15	-19*	-49*
	30	-29*	-66*
Сполука 2	15	-19*	-43*
	30	-33*	-70*
Сполука 3	15	-17*	-32*
	30	-37*	-67*
Сполука 4	15	-15*	-26*
	30	-39*	-69*
Семаглутид	30	-8	-20*
	60	-12*	-29*

* $p \leq 0,05$

Обробка мишей DIO протягом короткого періоду часу

З метою вивчення шляхів обміну речовин, пов'язаних із лікуванням сполуками за цим винаходом незалежно від втрати ваги, на мишах DIO (C57BL/6) здійснювали випробування згаданих сполук протягом короткого періоду часу. Використовували мишей віком від трьох до чотирьох місяців на дієті з високим вмістом жиру протягом щонайменше 4 тижнів. Тварин індивідуально розміщували в приміщенні з контрольованою температурою (24 °C) з 12-годинним циклом чергування світла і темряви (вмикання освітлення о 06:00) та вільним доступом до їжі та води. Носій або досліджувані сполуки вводили мишам шляхом підшкірної ін'єкції о 16:00 напередодні дня проведення дослідження. Тварин умертвляли через 16 год. для відбору проб крові пункцією серця. Статистичні дані аналізували із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA) з порівнянням за критерієм Даннета за допомогою JMP 6. Значущість позначена при $p \leq 0,05$ у зіставленні з носієм.

У експериментах, виконаних по суті так, як в описаному дослідженні, Сполуки 1-3 знижували рівні холестерину і PCSK9 (пропротеїнова конвертаза субтилізин-кексинового типу 9) в сироватці крові та збільшували рівні FGF-21 (фактор росту фібробластів 21), як показано у Таблиці 15. На відміну від цього, обробка семаглутидом не знижувала рівні холестерину та PCSK9 в сироватці крові і збільшувала рівні FGF-21. В усіх досліджуваних групах однаково зменшилось споживання їжі, що може означати те, що зміни рівнів холестерину, PCSK9 та FGF-21 не залежать від споживання їжі.

Таблиця 15

Вплив на рівні PCSK9, FGF-21 та холестерину протягом короткого періоду часу

Сполука	Доза (нмоль/кг)	PCSK9 (% носія)	FGF-21 (% носія)	Холестерин (% носія)
Сполука 1	30	14,6*	1770*	60,9*
Сполука 2	30	12,8*	465*	80,6*
Сполука 3	30	15,6*	1124*	55,6*
Семаглутид	30	115,3	75	117,6

Відсоток (%) носія, обчислений як $100 \times (\text{Значення обчислене для групи сполук} / \text{значення обчислене для групи носія})$

* $p \leq 0,05$

Вплив на витрати енергії у мишей DIO

У цьому дослідженні для оцінювання впливу сполук за цим винаходом на енергетичний обмін використовували семи-восьмимісячних мишей-самців DIO (C57BL/6) масою 45-50 г. Тварин окремо розміщували в приміщенні з контрольованою температурою (24 °C) з 12-годинним циклом чергування світла і темряви (вмикання освітлення о 22:00) та вільним доступом до їжі (TD95217) (компанія Teklad) та води. Після 2-тижневої акліматизації у приміщенні мишей довільним чином розподіляли на оброблювані групи (N=6 мишей на групу), виходячи з маси тіла таким чином, щоб кожна група мала аналогічну вихідну середню масу тіла. Тварин на 8 днів розміщували в калориметрі PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Chesterfield, штат Міссурі) для акліматизації. Носій (40 mM Трис HCl-буфер при pH 8,0, 10 мл/кг), досліджувану сполуку (15 нмоль/кг) або семаглутид (60 нмоль/кг) вводили підшкірно мишам DIO, яких годували ad libitum, за 30-90 хв до початку циклу темряви кожні три дні протягом 15 днів.

Кількість тепла та дихальний коефіцієнт (RER) визначали непрямою калориметрією, як описано, з використанням калориметричної системи з відкритим контуром. RER являє собою співвідношення об'єму продукованого CO₂ (VCO₂) до об'єму спожитого O₂ (VO₂). Кількість тепла обчислювали з урахуванням маси безжирової компоненти тіла. Витрати енергії у ккал/кг/3 дні виражали як середнє \pm SEM для 6 мишей на групу. Статистичну значущість оцінювали із застосуванням двофакторного ANOVA з подальшим множинним порівнянням за допомогою критерію Тьюкі.

У експериментах, виконаних по суті так, як в описаному дослідженні, у мишей, оброблених Сполукі 1 і Сполукі 2, підвищувалась інтенсивність обміну речовин, починаючи з 2-го тижня, і цей ефект зберігався протягом всього періоду обробки, як показано у Таблиці 16. Однак семаглутид не впливав на інтенсивність обміну речовин. Це підвищення інтенсивності обміну речовин може сприяти додатковій втраті маси, що спостерігалось при введенні Сполукі 1 і Сполукі 2 у порівнянні з введенням семаглутиду.

Таблиця 16

Вплив обробки Сполукі 1, Сполукі 2 або семаглутидом протягом тривалого періоду часу на інтенсивність обміну речовин у мишей DIO

	Сумарна кількість тепла (ккал/кг безжирової компоненти маси тіла/3 дні)			
Період обробки	Носій	Семаглутид	Сполука 1	Сполука 2
День 1 – День 4	2184 \pm 27	1973 \pm 51	1749 \pm 136**	1746 \pm 96**
День 4 – День 7	2154 \pm 36	2018 \pm 54	1822 \pm 173	1778 \pm 132*
День 7 – День 10	2239 \pm 28	2151 \pm 48	2349 \pm 129	2549 \pm 129**
День 10 – День 13	2207 \pm 16	2138 \pm 46	2351 \pm 144	2568 \pm 147*

* $p \leq 0,05$ у зіставленні з носієм

** $p \leq 0,05$ у зіставленні з семаглутидом

АМІНОКИСЛОТНІ ПОСЛІДОВНОСТІ

SEQ ID NO: 1 (людський OXM)

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala
(HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA)

SEQ ID NO: 2 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG),

де Xaa2 являє собою Aib;

Xaa28 являє собою Glu (E) або Ser (S);

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; i

C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою.

SEQ ID NO: 3 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG),

де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; i

C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою.

SEQ ID NO: 4 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),

де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою; i

C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою.

SEQ ID NO: 5 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG),

де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; i

C-кінцева амінокислота є амідованою.

SEQ ID NO: 6 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG),

де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; i

C-кінцева амінокислота є амідованою.

SEQ ID NO: 7 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),

де Xaa2 являє собою Aib;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; i

C-кінцева амінокислота є амідованою.

SEQ ID NO: 8 (штучна послідовність)

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

- (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),
де Хаа2 являє собою Aib;
Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; і
- 5 С-кінцева амінокислота є амідованою.
SEQ ID NO: 9 (штучна послідовність)
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG),
- 10 де Хаа2 являє собою Aib;
Хаа28 являє собою Glu (E) або Ser (S); і
С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою.
SEQ ID NO: 10 (штучна послідовність)
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
- 15 (HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG),
де Хаа2 являє собою Aib; і
С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою.
SEQ ID NO: 11 (штучна послідовність)
- 20 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),
де Хаа2 являє собою Aib; і
С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою.
- 25

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Елі Ліллі енд Компані

<120> СПОЛУКИ-КОАГОНІСТИ РЕЦЕПТОРІВ ГЛЮКАГОНУ ТА GLP-1

<130> X-20637

<150> 62/182847

<151> 2015-06-22

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-аміномасляну кислоту

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> Хаа у положенні 28 являє собою Glu або Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34, за факультативним варіантом, є
амідованим

<400> 2

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Xaa Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 3
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом
кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24
жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys
у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34, за факультативним варіантом, є
амідованим

<400> 3

```

```

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

```

Ser Gly

```

<210> 4
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом
кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24
жирною кислотою через (i) прямий зв'язок або (ii) лінкер між Lys
у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34, за факультативним варіантом, є
амідованим

```

<400> 4

```

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

```

Ser Gly

```

<210> 5
<211> 34
<212> PRT

```

```

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом
кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-
аміноетокси)-етокси]-ацетил)2-(γ-Glu)-CO-(CH2)16CO2H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34 є амідованим

<400> 5

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 6
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом
кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-
аміноетокси)-етокси]-ацетил)2-(γ-Glu)-CO-(CH2)18CO2H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34 є амідованим

<400> 6

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 7
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом
кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-
аміноетокси)-етокси]-ацетил)2-(γ-Glu)2-CO-(CH2)16CO2H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34 є амідованим

<400> 7

```

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Ser Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 8
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсілон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з ([2-(2-аміноетокси)-етокси]-ацетил)2-(γ-Glu)2-CO-(CH₂)₁₈CO₂H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34 є амідованим

<400> 8

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Ser Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 9
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>


```

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> Хаа у положенні 28 являє собою Glu або Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly у положенні 34, за факультативним варіантом, є
амідованим

<400> 9

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

Lys Lys Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Xaa Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly

<210> 10
<211> 34
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту, 2-
аміномасляну кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Сполука такої формули:
His-Xaa²-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-
Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa²⁸-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,
де
Хаа² являє собою Aib;
- 10 Хаа²⁸ являє собою Glu або Ser;
Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного
ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24
жирною кислотою, де лінкер являє собою ([2-(2-аміноетоксі)етоксі]ацетил)₂-(γ-Glu)_t, де t
дорівнює 1 або 2; i
- 15 С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 2),
або її фармацевтично прийнятна сіль.
2. Сполука за п. 1 або її фармацевтично прийнятна сіль, де Хаа²⁸ являє собою Glu.
3. Сполука за п. 1 або її фармацевтично прийнятна сіль, де Хаа²⁸ являє собою Ser.

4. Сполука за будь-яким із пп. 1-3 або її фармацевтично прийнятна сіль, де t дорівнює 1.
5. Сполука за будь-яким із пп. 1-3 або її фармацевтично прийнятна сіль, де t дорівнює 2.
6. Сполука за будь-яким із пп. 1-5 або її фармацевтично прийнятна сіль, де C14-C24 жирна кислота являє собою насичену одноосновну кислоту або насичену двоосновну кислоту.
- 5 7. Сполука за п. 7 або її фармацевтично прийнятна сіль, де жирна кислота являє собою насичену одноосновну кислоту або насичену двоосновну кислоту, вибрану із групи, яку складають: міристинова кислота (тетрадеканова кислота) (C14 одноосновна кислота), тетрадекандіоева кислота (C14 двоосновна кислота), пальмітинова кислота (гексадеканова кислота) (C16 одноосновна кислота), гексадекандіоева кислота (C16 двоосновна кислота),
- 10 маргарінова кислота (гептадеканова кислота) (C17 одноосновна кислота), гептадекандіоева кислота (C17 двоосновна кислота), стеаринова кислота (октадеканова кислота) (C18 одноосновна кислота), октадекандіоева кислота (C18 двоосновна кислота), нонадецилова кислота (нонадеканова кислота) (C19 одноосновна кислота), нонадекандіоева кислота (C19 двоосновна кислота), арахінова кислота (ейкозанова кислота) (C20 одноосновна кислота),
- 15 ейкозандіоева кислота (C20 двоосновна кислота), генейкозилова кислота (генейкозанова кислота) (C21 одноосновна кислота), генейкозандіоева кислота (C21 двоосновна кислота), бегенова кислота (докозанова кислота) (C22), докозандіоева кислота (C22 двоосновна кислота), лігноцеринова кислота (тетракозанова кислота) (C24 одноосновна кислота) і тетракозандіоева кислота (C24 двоосновна кислота).
- 20 8. Сполука за п. 6 або п. 7 або її фармацевтично прийнятна сіль, де C14-C24 жирна кислота являє собою октадекандіоеву кислоту.
9. Сполука за п. 6 або п. 7 або її фармацевтично прийнятна сіль, де C14-C24 жирна кислота являє собою ейкозандіоеву кислоту.
10. Сполука за будь-яким із попередніх пунктів або її фармацевтично прийнятна сіль, де C-кінцева амінокислота є амідованою.
- 25 11. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятну сіль та фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.
12. Спосіб лікування діабету 2-го типу у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятної солі.
- 30 13. Спосіб лікування ожиріння у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятної солі.
- 35 14. Спосіб лікування неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD) у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятної солі.
15. Спосіб лікування неалкогольного стеатогепатиту (NASH) у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення цьому суб'єкту ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-10 або її
- 40 фармацевтично прийнятної солі.
16. Спосіб спричинення нетерапевтичної втрати маси у суб'єкта, який включає введення ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятної солі.
17. Сполука за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в терапії.
- 45 18. Сполука за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в лікуванні діабету 2 типу.
19. Сполука за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування при лікуванні ожиріння.
20. Сполука за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в
- 50 лікуванні неалкогольної жирової інфільтрації печінки (NAFLD).
21. Сполука за будь-яким із пп. 1-10 або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в лікуванні неалкогольного стеатогепатиту (NASH).
22. Проміжна сполука, яка має таку формулу: His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly, де Xaa2 являє собою Aib;
- 55 Xaa28 являє собою Glu або Ser; і
- C-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 9); або її фармацевтично прийнятна сіль.
23. Проміжна сполука за п. 22, де Xaa28 являє собою Glu.
- 60 24. Проміжна сполука за п. 22, де Xaa28 являє собою Ser.

25. Спосіб виготовлення сполуки, яка має таку формулу: His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де

5 Xaa2 являє собою Aib;

Xaa28 являє собою Glu або Ser;

Lys у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys з C14-C24 жирною кислотою через лінкер між Lys у положенні 20 та C14-C24 жирною кислотою, де лінкер являє собою $([2-(2\text{-аміноетоксі})етоксі]ацетил)_2-(\gamma\text{-Glu})_t$, де t

10 дорівнює 1 або 2; і

С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 2), де вказаний спосіб включає етап:

(і) модифікування проміжної сполуки такої формули:

15 His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

де

Xaa2 являє собою Aib;

Xaa28 являє собою Glu або Ser; і

20 С-кінцева амінокислота факультативно є амідованою (послідовність SEQ ID NO: 9) шляхом кон'югації епсилон-аміногрупи бічного ланцюга Lys у положенні 20 проміжної сполуки з C14-C24 жирною кислотою через лінкер, де лінкер являє собою $([2-(2\text{-аміноетоксі})етоксі]ацетил)_2-(\gamma\text{-Glu})_t$, де t дорівнює 1 або 2.