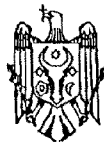




MD/EP 3310371 T2 2020.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3310371 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 38/00** (2006.01.01)
A61K 38/26 (2006.01.01)
C07K 14/605 (2006.01.01)
C07K 14/00 (2006.01.01)
A61P 3/00 (2006.01.01)
A61P 1/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0406 (22) Data de depozit: 2016.06.16 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16733268.3, 2016.06.16 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3310371, 2018.04.25 (31) Numărul cererii prioritare: 201562182847 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.22 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2020, 2020.12.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 40/2020, 2020.09.30 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2018, 2018.06.30
(71) Solicitant: ELI LILLY AND COMPANY, US (72) Inventatori: CHEN Yanyun, US; MEZO Adam Robert, US; QU Hongchang, US; VALENZUELA Francisco Alcides, US (73) Titular: ELI LILLY AND COMPANY, US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Glucagon și compuși co-agoniști GLP-1

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție furnizează glucagon și compuși co-agoniști GLP-1 care sunt utili în tratamentul diabetului de tip 2, obezității, bolii nealcoolice a ficatului gras (NAFLD) și/sau a

2
steatohepatitei nealcoolice (NASH). P-20637
Secvențe: 11
Revendicări: 24

MD/EP 3310371 T2 2020.12.31

(54) Glucagon and GLP-1 co-agonist compounds**(57) Abstract:**

¹
The present invention provides glucagon and GLP-1 co-agonist compounds that are useful in the treatment of type 2 diabetes, obesity, nonalcoholic fatty liver

²
disease (NAFLD) and/or nonalcoholic steatohepatitis (NASH). P-20637
Sequences: 11
Claims: 24

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Prezenta invenție este în domeniul medicinei. Mai special, prezenta invenție este în domeniul tratamentului diabetului și obezității și se referă la compuși care agonizează atât receptorul glucagon (Gcg) cât și receptorul peptidă-1 asemănător cu glucagonul (GLP-1). Sunt furnizați specifici analogi oxintomodulin/glucagon cu modificări de aminoacizi introduse pentru a modula activitatea atât a receptorului Gcg cât și a receptorului GLP-1.

În ultimele câteva decade, prevalența diabetului a continuat să crească. Diabetul zaharat de tip 2 (T2D) este cea mai comună formă de diabet numărând aproximativ 90% din toate cazurile de diabet. T2D este caracterizat prin niveluri ridicate de glucoză în sânge cauzate de rezistența la insulină. Standardul actual de îngrijire a T2D include dietă și exerciții împreună cu medicamente disponibile oral și injectabile pentru scăderea glucozei. Cu toate acestea, mulți pacienți cu T2D încă rămân controlați neadecvat. Diabetul necontrolat conduce la câteva afecțiuni care impactează morbiditatea și mortalitatea pacienților. Cauza principală de deces pentru pacienții diabetici sunt complicațiile cardiovasculare. Unul dintre factorii principali de risc pentru diabetul de tip 2 este obezitatea. Majoritatea pacienților cu T2D (□90%) sunt supraponderali sau obezi. Este documentat că o scădere în adipozitatea corporală va conduce la îmbunătățirea co-morbidităților asociate cu obezitatea incluzând hiperglicemia și evenimentele cardiovasculare. Prin urmare, terapiile eficiente în controlul glucozei și reducerea greutății sunt necesare pentru o mai bună gestionare a bolii.

Un număr de peptide derivate din pre-proglucagon, și analogi ai acestora, au fost propuși ca terapeutici pentru tratamentul T2D și obezității, în particular, Gcg, GLP-1 și oxintomodulină (OXM). Pre-proglucagonul este o polipeptidă precursoră a aminoacidului 158 care este procesată diferențial în țesuturi pentru a forma un număr de polipeptide derivate din proglucagon asociate structural, incluzând Gcg, GLP-1, peptidă-2 asemănătoare glucagonului (GLP-2), și oxintomodulină (OXM). Aceste molecule sunt implicate într-o largă varietate de funcții fiziologice, incluzând homeostazele glucozice, secreția de insulină, golirea gastrică și creșterea intestinală, precum și reglarea alimentelor ingerate.

Gcg este o peptidă a aminoacidului 29 care corespunde cu aminoacizii 53 până la 81 de preproglucagon. OXM este o peptidă a aminoacidului 37 și este compusă din secvența completă de aminoacid 29 a Gcg cu o extensie octapeptidă a terminalului carboxi (aminoacizii 82 până la 89 de pre-proglucagon și denumiți „peptidă 1 de intervenție“ sau IP-1). Fragmentul major activ biologic de GLP-1 (GLP-1₇₋₃₆) este produs ca aminoacid 30, peptidă amidată la C-terminal care corespunde cu aminoacizii 98 până la 127 de pre-proglucagon.

Gcg ajută la menținerea nivelului de glucoză în sânge prin legarea la receptorii Gcg pe hepatocite, determinând ficatul să elibereze glucoză - depozitată în formă de glicogen - prin glicogenoliză. Pe măsură ce aceste depozite se epuizează, Gcg stimulează ficatul să sintetizeze glucoză suplimentară prin gluconeogeneza. Această glucoză este eliberată în fluxul sanguin, prevenind dezvoltarea hipoglicemiei.

GLP-1 are diferite activități biologice în comparație cu Gcg. Acțiunile sale includ stimularea sintezei și secreției insulinei, inhibarea secreției de Gcg și inhibarea alimentelor ingerate. GLP-1 a arătat că reduce hiperglicemia la diabetici. Câțiva agoniști GLP-1 au fost aprobați pentru utilizare în tratamentul T2D la oameni, incluzând exenatide, liraglutide, lixisenatide, albiglutide și dulaglutide. Astfel de agoniști GLP-1 sunt eficienți în controlul glicemic cu efecte favorabile asupra greutății fără risc de hipoglicemie. Totuși, pierderea în greutate este modestă din cauza efectelor secundare gastrointestinale dependente de doză.

OXM este eliberată împreună cu GLP-1 din celulele L ale intestinului subțire proporțional cu nutrientul ingerat. OXM activează ambii receptori Gcg și GLP-1, cu o puțin mai ridicată potență pentru receptorul Gcg față de receptorul GLP-1. Este mai puțin potent decât Gcg și GLP-1 nativi pe respectivi lor receptori. Gcg uman este de asemenea capabil să activeze ambii receptori, cu toate că cu o puternică preferință pentru receptorul Gcg față de receptorul GLP-1. GLP-1 nu este capabil să activeze receptorii Gcg. OXM este implicată în reglarea ingerării alimentelor și a greutății corporale. S-a arătat că suprimă apetitul și inhibă ingerarea de alimente la oameni. În a 4-a săptămână de studiu cu subiecți supraponderali și obezi, administrarea subcutanată preprandială de trei ori pe zi de OXM a produs o pierdere în greutate de 2,3 kg comparativ cu 0,5 kg la grupul placebo. În acest studiu, greața, cel mai comun efect secundar asociat cu terapia pe bază de GLP-1 (cum ar fi exenatide și liraglutide), a fost mai puțină frecvent. Într-un alt studiu mai scurt, OXM a arătat că scade ingerarea de calorii și crește consumul de energie asociat activității la subiecți supraponderali și obezi.

Aceste date sugerează că OXM are potențialul de a fi un agent bine tolerat anti-diabet/obezitate. OXM, totuși, prezintă câteva provocări pentru dezvoltarea într-un agent terapeutic viabil comercial. OXM endogenă este repede degradată in vivo de dipeptidil peptidaza IV și alte peptidaze precum și este supusă unei eliminări renale rapide din cauza dimensiunii ei mici. Este prin urmare de dorit să se identifice peptide care activează receptorii Gcg și GLP-1 cu stabilitate metabolică îmbunătățită și rată redusă de eliminare.

Peptidele OXM cu substituții de aminoacizi pentru a îmbunătăți stabilitatea și cu modificări suplimentare pentru a încetini eliminarea, cum ar fi PEGilarea sau lipidarea sunt divulgate în domeniu. Alte peptide au fost declarate că se leagă la, și activează atât receptorul Gcg cât și receptorul GLP-1 și că suprimă câștigul în greutatea corporală (vezi de exemplu, WO 2011/075393 A2 și WO 2012/177444 A2).

În ciuda disponibilității diferitelor peptide care agonizează ambii receptori Gcg și GLP-1, rămâne o necesitate pentru compuși mai potenți, stabili, care acționează pe termen lung, și/sau bine-tolerați având un raport de activitate receptor Gcg(Gcg-R)/receptor GLP-1 (GLP-1-R) care a fost optimizat astfel încât potența și activitatea insulino-tropică a compușilor să furnizeze tratamente eficiente pentru diabet, preferabil T2D, și tulburările înrudite. În particular, rămâne o necesitate pentru compuși cu un raport echilibrat de activitate coagonistă Gcg-R/GLP-1-R care să reducă greutatea corporală. De asemenea, rămâne o necesitate pentru a furniza compuși cu un raport echilibrat de activitate co-agonistă Gcg-R/GLP-1-R care să suporte dozarea potențială zilnică, bi-săptămânală, o dată pe săptămână sau lunară la oameni. Corespunzător, prezenta invenție caută să furnizeze tratamente eficiente pentru diabet, obezitate, boala nonalcoolică a ficatului gras (NAFLD) și/sau steatohepatită nonalcoolică (NASH).

Intr-un aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

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

in care

Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu sau Ser;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_n, în care t este 1 sau 2; și

aminoacidul C-terminal este opțional amidat,

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

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 in care

Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_n, în care t este 1 sau 2; și

aminoacidul C-terminal este opțional amidat,

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

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 in care

Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_n, în care t este 1 sau 2; și

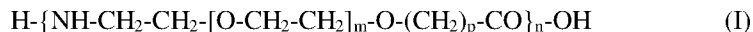
aminoacidul C-terminal este opțional amidat,

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24.

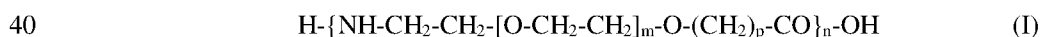
Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este selectat din grupul constând din:

(a) un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I:



- în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12, și p este 1 sau 2;
- (b) un aminoacid selectat din grupul constând din arginină (Arg), asparagină (Asn), acid aspartic (Asp), glutamină (Gln), acid glutamic (Glu), histidină (His), lizină (Lys), serină (Ser), treonină (Thr), citrulină (Cit), ornitină (Orn), sarcozină (Sar), glicină (Gly), acid γ -aminobutiric (γ -Abu) și acid γ -glutamic (γ -Glu);
- (c) o dipeptidă selectată din grupul constând din 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-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid-7-aminoheptanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid;
- (d) o tripeptidă selectată din grupul constând din 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 și γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;
- (e) o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminoheptanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s, unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15; și
- (f) un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I cum s-a definit la (a) este conjugat cu:
- (i) un aminoacid selectat din grupul constând din Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu și γ -Glu;
- (ii) o dipeptidă selectată din grupul constând din 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-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid-7-aminoheptanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid;
- (iii) o tripeptidă selectată din grupul constând din 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 și γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; sau
- (iv) o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminoheptanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s, unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I:



în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12, și p este 1 sau 2.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, n este 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 și m este 1 și p este 1 pentru amino polietilen glicol carboxilat cu formula I.

- Pentru anumiți compuși divulgați aici, n este 2, m este 1 și p este 1 pentru amino polietilen glicol carboxilat cu formula I.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este un aminoacid selectat din grupul constând din Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu și γ -Glu.

- Pentru anumiți compuși divulgați aici, aminoacidul este γ -Glu.

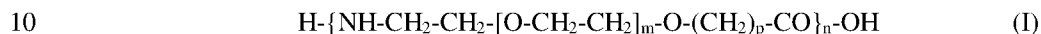
Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este o dipeptidă selectată din grupul constând din Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid-7-aminoheptanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid.

- Pentru anumiți compuși divulgați aici, dipeptida este γ -Glu- γ -Glu.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este o tripeptidă selectată din grupul constând din 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 și γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminoheptanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s, unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora, agentul de legătură este un agent de legătură conjugat, în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I:



în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12, și p este 1 sau 2, este conjugat cu:

(i) un aminoacid selectat din grupul constând din Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu și γ -Glu;

(ii) o dipeptidă selectată din grupul constând din 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-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid-7-aminoheptanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid;

(iii) o tripeptidă selectată din grupul constând din 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 și γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; sau

(iv) o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminoheptanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s, unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, n este 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 și m este 1 și p este 1 pentru amino polietilen glicol carboxilatul cu formula I.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, n este 2, m este 1 și p este 1 pentru amino polietilen glicol carboxilatul cu formula I.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, aminoacidul este γ -Glu.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, dipeptida este γ -Glu- γ -Glu.

În un aspect preferat al compuşilor din prezenta invenție, agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ -Glu)_t, în care t este 1 sau 2.

Preferabil, t este 1.

Mai preferabil, t este 2.

Intr-un încă un alt aspect preferat al compuşilor din prezenta invenție, sau sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora, acidul gras C14-C24 este un monoacid saturat sau un diacid saturat.

Preferabil, acidul gras este un monoacid saturat sau diacid saturat selectat din grupul constând din acid miristic (acid tetradecanoic) (monoacid C14), acid tetradecanedioic (diacid C14), acid palmitic (acid hexadecanoic) (monoacid C16), acid hexadecanedioic (diacid C16), acid margarinic (acid heptadecanoic) (monoacid C17), acid heptadecanedioic (diacid C17), acid stearic (acid octadecanoic) (monoacid C18), acid octadecanedioic (diacid C18), acid nonadecilic (acid nonadecanoic) (monoacid C19), acid nonadecanedioic (diacid C19), acid aracidic (acid eicosanoic) (monoacid C20), acid eicosanedioic (diacid C20), acid heneicosilic (acid heneicosanoic) (monoacid C21), acid heneicosanedioic (diacid C21), acid behenic (acid docosanoic) (C22), acid docosanedioic (diacid C22), acid lignoceric (acid tetracosanoic) (monoacid C24) și acid tetracosanedioic (diacid C24).

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid miristic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid tetradecanedioic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid palmitic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid hexadecanedioic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24s este acid stearic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid octadecanedioic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid nonadecanedioic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid aracidic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid eicosanedioic.

Încă mai preferabil, acidul gras C14-C24 este acid docosanedioic.

Intr-un încă un alt aspect preferat al compuşilor din prezenta invenție, sau al sărurilor acceptabile farmaceutic ale acestora, aminoacidul C-terminal este amidat.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-
 5 Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
 in care Xaa 2 este Aib;
 Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale
 Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; și
 aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 5), sau o sare acceptabilă farmaceutic a
 10 acestuia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

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
 in care Xaa 2 este Aib;
 15 Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale
 Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; și
 aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 6);
 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-
 20 Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
 in care Xaa 2 este Aib;
 Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale
 Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; și
 25 aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 7);
 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus cu formula următoare:

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
 in care Xaa 2 este Aib;
 30 Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale
 Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; și
 aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 8);
 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

35 Intr-un alt aspect, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând un
 compus din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, și un purtător
 acceptabil farmaceutic, diluant, sau excipient.

Aici este divulgată o compoziție farmaceutică cuprinzând un compus din prezenta
 invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, împreună cu un purtător acceptabil
 40 farmaceutic, diluant, sau excipient și alte ingrediente terapeutice.

În plus aici este divulgată o metodă de tratare a diabetului de tip 2 la un subiect care are
 nevoie de aceasta, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente dintr-un compus
 din prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia.

45 Încă în plus este divulgată aici o metodă de tratare a obezității la un subiect care are
 nevoie de aceasta, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente dintr-un compus
 din prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia.

Încă în plus este divulgată aici o metodă de tratare bolii nonalcoolice a ficatului gras
 (NAFLD) la un subiect care are nevoie de aceasta, cuprinzând administrarea către subiect a unei
 cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic
 50 a acestuia.

Încă în plus este divulgată aici o metodă de tratare a steatohepatitei nonalcoolice (NASH)
 la un subiect care are nevoie de aceasta, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități
 eficiente dintr-un compus din prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a
 acestuia.

55 Încă în plus este divulgată aici o metodă de inducere a pierderii în greutate non-
 terapeutică la un subiect cuprinzând administrarea unei cantități eficiente dintr-un compus din
 prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia.

În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru
 utilizare în terapie.

60 În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru
 utilizare în tratamentul diabetului de tip 2.

În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul obezității.

În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul bolii nonalcoolice a ficatului gras (NAFLD).

5 În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul steatohepatitei nonalcoolice (NASH).

Este divulgată aici utilizarea unui compus din prezenta invenție pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului de tip 2.

10 Este suplimentar divulgată aici utilizarea unui compus din prezenta invenție pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul obezității.

Încă în plus este divulgată aici utilizarea unui compus din prezenta invenție pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul bolii nonalcoolice a ficatului gras (NAFLD).

Încă în plus este divulgată aici utilizarea unui compus din prezenta invenție pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul steatohepatitei nonalcoolice (NASH).

15 În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un compus intermediar cu formula următoare:

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
in care Xaa 2 este Aib;

20 Xaa28 este Glu sau Ser (SEQ ID NO: 9); și
aminoacidul C-terminal este opțional amidat,
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Preferabil, prezenta invenție furnizează un compus intermediar cu formula următoare:

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-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
în care Xaa 2 este Aib; și

aminoacidul C-terminal este opțional amidat (SEQ ID NO: 10);
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

30 Mai preferabil, prezenta invenție furnizează un compus intermediar cu formula următoare:

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
în care Xaa 2 este Aib; și

35 aminoacidul C-terminal este opțional amidat (SEQ ID NO: 11),
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

În încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează un procedeu pentru fabricarea unui compus cu formula următoare:

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

40 în care Xaa 2 este Aib; și
Xaa28 este Glu sau Ser;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_n, în care t este 1 sau 2; și

45 aminoacidul C-terminal este opțional amidat, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, procedeul menționat cuprinzând etapele de:

(i) modificare a unui compus intermediar cu formula următoare:

50 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
in care Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu sau Ser; și

55 aminoacidul C-terminal este opțional amidat (SEQ ID NO: 9), prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys la poziția 20 a compusului intermediar cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_n, în care t este 1 sau 2.

Lys la poziția 20 a compusului intermediar este modificat prin conjugare cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24.

Este divulgat aici un compus produs prin procedeul descris mai sus.

60 Compușii prezentei invenții sunt capabili de legare la, și de activarea atât a receptorului GLP-1 cât și a receptorului Gcg. Compușii prezentei invenții sunt capabili să determine o reducere

în ingerarea alimentelor la subiecții supraponderali și obezi. Compușii invenției au potențial de a furniza un efect de pierdere superioară în greutate *versus* OXM umană de tip sălbatic.

Compușii invenției pot îmbunătăți toleranța la glucoză și profilul lipidic al subiecților cu T2D și/sau dereglările metabolice asociate și pot face acest lucru mai eficient decât OXM umană

Un avantaj particular al compușilor din prezenta invenție este că frecvența efectelor secundare, cum ar fi greața, care este în mod obișnuit asociată cu terapia cu GLP-1, cum ar fi exenatide și liraglutide, poate fi redusă sau eliminată. Compușii prezentei invenții pot astfel avea efecte secundare reduse în comparație cu terapia cu GLP-1.

Compușii prezentei invenții cuprind o polipeptidă conjugată la un acid gras. Acizi grași, prin motivele lor de legare a albuminei, pot îmbunătăți farmacocineticele unei peptide extinzând perioada de înjumătățire a plasmiei și reducând rata de eliminare. În timp ce este de așteptat ca compușii prezentei invenții să prezinte un profil farmacocinetic îmbunătățit față de OXM umană de tip sălbatic, mărimea îmbunătățirii nu este predictibilă. Inventatorii au descoperit că lungimea, compoziția și poziția acidului gras, și opțional, a agentului de legătură, în compușii prezentei invenții conduc la compuși cu un profil farmacocinetic dorit care susțin dozarea zilnică, bi-săptămânală, o dată pe săptămână sau lunară.

În plus față de profilul farmacocinetic îmbunătățit, prezenții inventatori au descoperit de asemenea că lungimea, compoziția și poziția acidului gras, și opțional, a agentului de legătură, sunt critice pentru optimizarea raportului activității agoniste a Gcg-R/GLP-1-R.

OXM umană de tip sălbatic are eficacitate și potență depline la GLP-1-R uman și la Gcg-R uman. Secvența de aminoacizi de OXM umană de tip sălbatic este furnizată mai jos: 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 (SEQ ID NO: 1).

Anumiți compuși ai prezentei invenții au un raport echilibrat de activitate co-agonistă Gcg-R/GLP-1-R. Activitatea echilibrată Gcg și GLP-1 așa cum s-a utilizat în acest document se referă la un compus care are afinitate pentru receptorii Gcg și GLP-1 într-un test de legare *in vitro* care este aproape de 1:1, cum ar fi 1:1 GLP-1/Gcg, 2:1 GLP-1/Gcg, 3:2 GLP-1/Gcg, 1:2 GLP-1/Gcg, sau 2:3 GLP-1/Gcg. Cercetarea efectuată de inventatori a dezvăluit că lungimea, compoziția și poziția acidului gras sunt critice pentru obținerea raportului de echilibru al activității co-agoniste Gcg-R/GLP-1-R care este o caracteristică a compușilor din prezenta invenție, precum și a impactului asupra perioadei de înjumătățire a plasmiei, a stabilității fizice, a solubilității și a stabilității *in vivo* a compușilor din prezenta invenție.

În timp ce conjugarea unei peptide cu un acid gras are avantaje în privința unui profil farmacocinetic îmbunătățit și/sau unui raport echilibrat al activității co-agoniste Gcg-R/GLP-1-R, ar fi de asemenea de așteptat ca compusul să poată piardă activitate deoarece există potențial pentru interferență cu interfața de legare fie a receptorului Gcg, fie a receptorului GLP-1. S-a descoperit totuși că, conjugarea reziduiului de lizină la poziția 20 cu un acid gras reține activitatea *in vitro* și *in vivo* la ambii receptori într-o mai mare măsură decât este cazul când aminoacizii la alte poziții sunt conjugați cu un acid gras.

Mai mult, cateva substituții de aminoacizi față de OXM umană de tip sălbatic la compușii revendicați sunt capabile să sporească potența la Gcg-R și/sau GLP-1-R, compensând prin urmare pierderea de potență din cauza conjugării cu acidul gras în timp ce se menține un raport adecvat al activității co-agoniste a Gcg-R/GLP-1-R. Este important de observat că o substituție la un rest de aminoacid într-o anumită proteină poate afecta caracteristicile proteinelor ca întreg, și că efectul global poate fi benefic sau detrimental potenței farmacologice și/sau stabilității farmaceutice. Anumite substituții de aminoacizi pot crește potența dar au un efect detrimental asupra stabilității moleculei și *vice versa*. Substituțiile de aminoacizi în compușii prezentei invenții față de OXM umană de tip sălbatic (SEQ ID NO: 1) includ S2Aib, S16E, R17K, R18K, Q20K, D21E, Q24E, M27L, N28E or N28S și T29G. În plus, secvența C-terminală a OXM, KRNRNNIA, a fost înlocuită cu o secvență C-terminală GPSSG.

Substituția S2Aib protejează peptida de degradare prin peptidază, în particular, dipeptidil peptidază IV. Substituțiile S16E, R17K, R18K și Q20K sunt capabile să îmbunătățească potența compușilor invenției în testele *in vitro* și în modelele pe animale *in vivo*. Substituțiile D21E și Q24E sunt capabile să îmbunătățească stabilitatea compușilor invenției și modularea activității *in vitro*. Substituția M27L este capabilă să protejeze peptida de oxidarea reziduiului de metionină. Substituția N28E este capabilă să îmbunătățească solubilitatea compușilor care cuprind acea substituție. Substituția N28S este de asemenea capabilă să îmbunătățească solubilitatea compușilor care cuprind acea substituție dar în aceeași măsură ca substituția N28E. Totuși, solubilitatea compușilor cuprinzând o substituție N28S poate fi îmbunătățită prin selecția unui agent de legătură

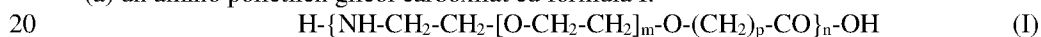
adecvat. Substituția restului de asparagină la poziția 28 evită posibilitatea apariției deamidării la această poziție.

Îndepărtarea resturilor secvenței C-terminale de OXM, KRNRNNIA, poate îmbunătăți solubilitatea, care este atribuibilă îndepărtării resturilor de arginină. Inventatorii au evaluat compuși având (i) nici o secvență C-terminală, (ii) compuși cu o secvență C-terminală GPSSG și (iii) compuși cu o secvență C-terminală GPSSGAPPPS. S-a descoperit în mod surprinzător că anumiți compuși cu o secvență C-terminală GPSSG au prezentat potență îmbunătățită *in vivo* în modelele pe animale față de OXM umană de tip sălbatic, compuși fără secvență C-terminală și compuși cu o secvență C-terminală GPSSGAPPPS. Secvența C-terminală GPSSG a îmbunătățit de asemenea stabilitatea și solubilitatea compușilor în conformitate cu invenția față de OXM umană de tip sălbatic și compuși fără secvență C-terminală.

Compușii prezentei invenții conțin astfel substituții de aminoacizi care, separat sau împreună, nu numai că sunt capabile să îmbunătățească potența, dar sunt de asemenea capabile să furnizeze stabilitate fizică și caracteristici de solubilitate îmbunătățite și o stabilitate crescută *in vivo*.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, acidul gras C14-C24 este conjugat la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a lizinei *printr-un* agent de legătură, în care agentul de legătură este selectat din grupul constând din:

(a) un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I:



în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12, și p este 1 sau 2;

(b) un aminoacid selectat din grupul constând din Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu și γ -Glu;

(c) o dipeptidă selectată din grupul constând din 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-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminohexanoic acid-7-aminohexanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid;

(d) o tripeptidă selectată din grupul constând din 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 și γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;

(e) o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminohexanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s, unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15; și

(f) un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I cum s-a definit la (a) este conjugat cu:

(i) un aminoacid selectat din grupul constând din Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu și γ -Glu;

(ii) o dipeptidă selectată din grupul constând din 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-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminohexanoic acid-7-aminohexanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid;

(iii) o tripeptidă selectată din grupul constând din 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 și γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; sau

(iv) o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminohexanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s, unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15.

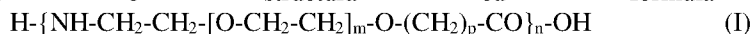
Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I, sau un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I este conjugat cu un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă, cum s-a definit mai sus, în care n este 1, 2, 3, 4, 5 sau 6, m este 1 și p este 1.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I, sau un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I este conjugat cu un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă, cum s-a definit mai sus, în care n este 2, m este 1 și p este 1.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură amino polietilen glicol carboxilat cu formula I, sau agentul de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol

carboxilat cu formula I este conjugat cu un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă, cum s-a definit mai sus, cuprinde un mic radical polietilen glicol (PEG) cuprinzând o structură [-O-CH₂-CH₂]_m, în care m este un număr întreg între 1 și 12, (de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Astfel de PEG-uri mici sunt referite aici ca „mini-PEG”. Într-un aspect preferat, mini-

5 PEG are o structură cu formula I:



în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12 și p este 1 sau 2. Preferabil, mini-PEG are o structură cu formula I, în care n este 1, 2, 3, 4, 5 sau 6, m este 1 și p este 1. Mai preferabil, miniPEG are o structură cu formula I în care n este 1, m este 1 și p este 1. Reactivii adecvați pentru utilizare în acilarea unui aminoacid cu mini-PEG sunt disponibili comercial de la venditori, cum ar fi Peptide International (Louisville, KY) și ChemPep, Inc. (Wellington, FL). De asemenea, sunt descrise aici tehnici adecvate pentru acilarea unui aminoacid cu mini-PEG (vezi Exemplele 1-4).

15 Mini-PEG cu formula I este un mini-PEG funcționalizat cuprinzând o grupare funcțională amină și o grupare funcțională carboxil. Gruparea funcțională carboxil reacționează cu gruparea epsilon-amino a catenei laterale a lizinei pentru a forma o legătură amidă. Gruparea funcțională amină reacționează cu o grupare carboxil a acidului gras. Lizina la poziția 20 a peptidei din SEQ ID NO: 2 este astfel conjugată la un acid gras C14-C24 *printr-un* mini-PEG cu formula I.

20 Alternativ, pentru anumiți compuși divulgați aici, când mini-PEG cu formula I este parte a unui agent de legătură conjugat (adică un mini-PEG cu formula I conjugat la un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă cum s-a definit mai sus), gruparea funcțională amină a mini-PEG cu formula I reacționează cu o grupare funcțională de aminoacid, dipeptidă, tripeptidă sau polipeptidă. O grupare funcțională suplimentară de aminoacid, dipeptidă, tripeptidă sau polipeptidă reacționează cu o grupare carboxil a acidului gras. Lizina la poziția 20 a peptidei din SEQ ID NO: 2 este astfel conjugată la acidul gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură conjugat cum s-a definit mai sus.

25 Natura hidrofilă a mini-PEG cu formula I servește pentru a crește solubilitatea compușilor invenției cuprinzând un agent de legătură care cuprinde un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I sau un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I este conjugat la un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă, cum s-a definit.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, agenții de legătură preferați cuprinzând o mini-PEG cu formula I includ, dar nu se limitează la, ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂ și acid 8-amino-3,6-dioxaoctanoic.

35 Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură poate fi de asemenea un singur aminoacid poziționat între gruparea epsilon-amino a catenei laterale a lizinei și acidul gras C14-C24. În unele aspecte preferate, aminoacidul este un aminoacid hidrofil. Aminoacizi adecvați includ Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu și γ-Glu.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, aminoacidul este γ-Glu.

40 Alternativ, pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este o dipeptidă selectată din grupul constând din 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-aminohexanoic acid-6-aminohexanoic acid, 5-aminovaleric acid-5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid-7-aminoheptanoic acid și 8-aminooctanoic acid-8-aminooctanoic acid.

45 În plus, alternativ, pentru anumiți compuși divulgați aici, fiecare aminoacid al dipeptidei poate fi același ca, sau diferit de cealalt aminoacid al dipeptidei, și poate fi selectat în mod independent din grupul constând din Ala, β-Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ-Glu, γ-Abu, acid 6-aminohexanoic, acid 5-aminovaleric, acid 7-aminoheptanoic și acid 8-aminooctanoic.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este γ-Glu-γ-Glu.

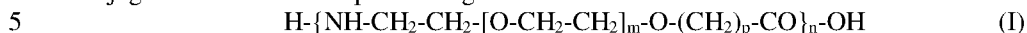
50 Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este o tripeptidă în care aminoacizii tripeptidei sunt selectați în mod independent din grupul constând din: Ala, β-Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, acid γ-aminobutiric (γ-Abu), acid γ-glutamic (γ-Glu), acid 6-aminohexanoic, acid 5-aminovaleric, acid 7-aminoheptanoic, și acid 8-aminooctanoic.

55 Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este o tripeptidă selectată din grupul constând din 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-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 și γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu.

60 Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este o polipeptidă selectată din grupul constând din (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r și (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_r, (acid 6-aminohexanoic)_s, (acid 5-aminovaleric)_s, (acid 7-aminoheptanoic)_s, și (acid 8-aminooctanoic)_s,

unde q este orice întreg de la 2 până la 5, r este orice întreg de la 1 până la 3, și s este orice întreg de la 4 până la 15.

Pentru anumiți compuși divulgați aici, agentul de legătură este un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I:



în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12, și p este 1 sau 2, este conjugat cu un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă, cum s-a definit mai sus.

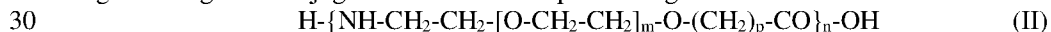
Intr-un aspect preferat, amino polietilen glicol carboxilatul agentului de legătură conjugat este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂.

10 Intr-un aspect mai preferat, agentul de legătură cuprinde ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_t (la care se face referire de asemenea ca (AEEA)₂-(γ-Glu)_t), în care t este 1 sau 2. Acidul gras și acidul gama-glutamic din agentul de legătură acționează ca lianți de albumină, și furnizează potențialul pentru a genera compuși care acționează pe termen lung *in vivo*. În cel mai preferat aspect, compușii prezentei invenții cuprind o lizină la poziția 20 care este modificată chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale a lizinei cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_t-CO-(CH₂)_d-CO₂H, în care t este 1 sau 2 și d este 16 sau 18.

Așa cum se arată în structurile chimice din exemplele 1-4, prima unitate a [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilului este legată la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a lizinei. A doua unitate a [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilului este apoi atașată la gruparea amino a primei unități a [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilului. Apoi, prima unitate de γ-Glu este atașată la gruparea amino a celei de a doua unități a [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil prin grupări γ-carboxil ale catenei laterale. Când t = 2, a doua unitate de γ-Glu este atașată la gruparea α-amino a primei unități a γ-Glu prin grupările γ-carboxil ale catenei laterale. În final, acidul gras este atașat la gruparea α-amino a primei (când t = 1) sau celei de a doua (când t = 2) unități de γ-Glu.

25 Pentru anumiți compuși divulgați aici, când agentul de legătură este un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă, sau o polipeptidă, cum s-a definit mai sus, este preferat ca aminoacidul, sau cel puțin un aminoacid al dipeptidei, tripeptidei sau polipeptidei, să fie un aminoacid hidrofil.

În mod similar, pentru anumiți compuși divulgați aici, când agentul de legătură este un agent de legătură conjugat în care un amino polietilen glicol carboxilat cu formula I:



în care m este orice întreg de la 1 până la 12, n este orice întreg de la 1 până la 12, și p este 1 sau 2; este conjugat cu un aminoacid, o dipeptidă, o tripeptidă sau o polipeptidă, cum s-a definit mai sus, este preferat ca aminoacidul/cel puțin un aminoacid al aminoacidului/dipeptidei/tripeptidei/polipeptidei să fie un aminoacid hidrofil.

35 Aminoacizii adecvați includ, dar nu se limitează la, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu și γ-Glu.

Prezenții inventatori au descoperit că prezența unuia sau mai multor aminoacizi hidrofilii în agentul de legătură compensează pierderea de solubilitate care poate fi în mod normal așteptată să apară ca consecință a unei substituții de aminoacizi în peptida din SEQ ID NO: 1. De exemplu, 40 în realizarea în care agentul de legătură cuprinde ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_t, în care t este 1 sau 2, Xaa28 a peptidei din SEQ ID NO: 1 poate fi serină sau acid glutamic. Selecția de acid glutamic la poziția 28 a peptidei din SEQ ID NO: 2 îmbunătățește solubilitatea unor astfel de compuși. Selecția de serină la poziția 28 a peptidei din SEQ ID NO: 2 ar putea fi de așteptat să reducă solubilitatea unor astfel de compuși față de acei compuși care diferă numai având un reziduu de acid glutamic la poziția 28. Totuși, un al doilea aminoacid γ-Glu în agentul de legătură descris mai sus (adică t este 2) compensează această așteptată reducere a solubilității.

Compușii prezentei invenții utilizează un acid gras C14-C24 conjugat chimic la gruparea epsilon-amino a unei catene laterale a lizinei fie printr-o legătură directă, fie printr-un agent de legătură. Termenul „acid gras C14-C24” așa cum s-a utilizat în acest document înseamnă un acid 50 carboxilic cu între 14 și 24 atomi de carbon. Acidul gras C14-C24 adecvat pentru utilizare aici poate fi un monoacid saturat sau un diacid saturat. Prin „saturat” se înțelege că acidul gras nu conține nici o legătură dublă carbon-carbon sau legături triple.

Exemple de acizi grași C14-C24 saturați specifici care sunt adecvați pentru compușii și utilizările acestora divulgate aici includ, dar nu se limitează la, acid miristic (acid tetradecanoic) (monoacid C14), acid tetradecanedioic (diacid C14), acid palmitic (acid hexadecanoic) (monoacid C16), acid hexadecanedioic (diacid C16), acid margarinic (acid heptadecanoic) (monoacid C17), acid heptadecanedioic (diacid C17), acid stearic (acid octadecanoic) (monoacid C18), acid octadecanedioic (diacid C18), acid nonadecilic (acid nonadecanoic) (monoacid C19), acid nonadecanedioic (diacid C19), acid aracidic (acid eicosanoic) (monoacid C20), acid eicosanedioic (diacid C20), acid heneicosilic (acid heneicosanoic) (monoacid C21), acid heneicosanedioic (diacid C21), acid behenic (acid docosanoic) (C22), acid docosanedioic (diacid C22), acid

lignoceric (acid tetracosanoic) (monoacid C24), acid tetracosanedioic (diacid C24), incluzand derivați ramificați și substituiți ai acestora.

În aspectele preferate ale compușilor divulgați aici, acidul gras C14-C24 este selectat din grupul constând dintr-un monoacid C14 saturat, un diacid C14 saturat, un monoacid C16 saturat, un diacid C16 saturat, un monoacid C18 saturat, un diacid C18 saturat, un diacid C19 saturat, un monoacid C20 saturat, un diacid C20 saturat, un diacid C22 saturat, și derivați ramificați și substituiți ai acestora.

În mai multe aspecte preferate ale compușilor din prezenta invenție, acidul gras C14-C24 este selectat din grupul constând din acid miristic, acid tetradecanedioic, acid palmitic, acid hexadecanedioic, acid stearic, acid octadecanedioic, acid nonadecanedioic, acid aradic, acid eicosanedioic și acid docosanedioic.

Preferabil, acidul gras C14-C24 este acid octadecanedioic sau acid eicosanedioic.

Prezenții inventatori au descoperit că poziția acidului gras este critică în obținerea unui compus cu raportul dorit de activitate co-agonistă a Gcg-R/GLP-1-R. Lungimea și compoziția acidului gras impactează perioada de înjumătățire a plasmii compusului, potența compusului pe modelele pe animale *in vivo* și de asemenea impactează solubilitatea și stabilitatea compusului. Conjugarea peptidei definite în SEQ ID NO: 2 la un monoacid sau diacid gras saturat C14-C24 conduce la compuși care prezintă perioadă de înjumătățire dorită a plasmii, potență dorită în modelele pe animale *in vivo* și posedă de asemenea caracteristici dorite de solubilitate și stabilitate. Acidul miristic, acidul tetradecanedioic, acidul palmitic, acidul hexadecanedioic, acidul stearic, acidul octadecanedioic, acidul nonadecanedioic, acidul aradic, acidul eicosanedioic și acidul docosanedioic sunt acizii grași în special preferați.

În particular, conjugarea peptidei definite în SEQ ID NO: 2 la reziduul lizinei la poziția 20 cu acid octadecanedioic sau acid eicosanedioic conduce la compuși care: (i) sunt capabili de obținerea rapoartelor dorite de activitate co-agonistă a Gcg-R/GLP-1-R, (ii) sunt capabili de potență îmbunătățită în modelele pe animale *in vivo* și/sau (iii) sunt capabili de îmbunătățirea stabilității fizice și a caracteristicilor de solubilitate.

Compușii invenției sunt preferabil formulați ca compoziții farmaceutice administrate pe căi parenterale (*de exemplu*, subcutanată, intravenoasă, intraperitoneală, intramusculară, sau transdermală).

Compușii prezentei invenții de obicei vor fi administrați parenteral. Administrarea parenterală include, de exemplu, administrarea sistemică, cum ar fi intramusculară, intravenoasă, subcutanată, intradermală, sau injecție intraperitoneală. Calea preferată de administrare este injecția subcutanată. Un compus din prezenta invenție este administrat către subiect în conjuncție cu un purtător acceptabil farmaceutic, diluant, sau excipient ca parte a unei compoziții farmaceutice pentru tratarea diabetului de tip 2, obezității, NAFLD și/sau NASH. Compoziția farmaceutică poate fi o soluție sau o suspensie cum ar fi una în care un compus din prezenta invenție este complexat cu un cation metalic divalent cum ar fi zincul. Un compus din prezenta invenție poate fi de asemenea formulat într-o formulare solidă cum ar fi prin liofilizare sau pulverizare uscată, care este apoi reconstituită într-o soluție de diluant adecvată înainte de administrare. Purtătorii farmaceutici adecvați pot conține ingrediente inerte care nu interacționează cu peptida sau derivatul peptidic. Purtătorii farmaceutici adecvați pentru administrare parenterală includ, de exemplu, apă sterilă, soluție salină fiziologică, soluție salină bacteriostatică (soluție salină conținând aproximativ 0,9% mg/ml alcool benzilic), soluție salină tamponată cu fosfat, soluție Hank, lactat Ringer și altele asemenea. Unele exemple de excipienți adecvați includ lactoză, dextroză, zaharoză, trehaloză, sorbitol, și manitol și conservanți cum ar fi fenol și m-cresol.

Pot fi utilizate tehnici standard de formulare farmaceutică, cum ar fi cele descrise în Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, ediția 21-a, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Compușii prezentei invenții pot fi formulați alternativ pentru administrare pe cale bucală, orală, transdermală, nazală, sau pulmonară.

Compușii prezentei invenții pot reacționa cu oricare dintr-un număr de acizi anorganici și organici pentru a forma săruri de adiție cu acid acceptabile farmaceutic. Sărurile acceptabile farmaceutic și metodologia comună pentru prepararea lor sunt bine cunoscute în domeniu. Vezi, *de exemplu*, P. Stahl, și colab. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, ediția a 2-a revizuită (Wiley-VCH, 2011). Sărurile acceptabile farmaceutic din prezenta invenție includ săruri de trifluoroacetat, clorhidrat, și acetat.

Compușii prezentei invenții pot fi utilizați pentru a trata diabetul, în special diabetul de tip 2. Subiecții splimentari care pot beneficia de tratamentul cu compușii prezentei invenții, îi includ pe cei cu toleranță afectată la glucoză sau la glucoza afectată de repaus alimentar, subiecți a căror greutate corporală este de aproximativ 25% sau mai mult peste greutatea corporală normală pentru

înălțimea subiectului și constituția fizică, subiecți având unul sau mai mulți părinți cu diabet de tip 2, subiecți care au avut diabet gestațional, și subiecți cu tulburări metabolice cum ar fi cele care rezultă dintr-o secreție endogenă scăzută de insulină. Compușii prezentei invenții pot fi utilizați pentru a preveni subiecții cu toleranță afectată la glucoză să continue să dezvolte diabet de tip 2, să prevină deteriorarea celulei β pancreatice, să inducă proliferarea celulei β , să îmbunătățească funcționarea celulei β , să activeze celulele β inactive, să promoveze diferențierea celulelor în celule β , să stimuleze replicarea celulelor β , și să inhibe apoptoza celulelor β . Alte boli și afecțiuni care pot fi tratate sau prevenite utilizând compușii invenției în metodele invenției includ: diabetul cu debut la maturitate al tinerilor (MODY) (Herman, și colab., Diabetes 43:40, 1994); Latent Autoimmune Diabetes Adult (LADA) (Zimmet, și colab., Diabetes Med. 11:299, 1994); toleranță afectată la glucoză (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999); glucoza afectată de repausul alimentar (IFG) (Charles, și colab., Diabetes 40:796, 1991); diabetul gestațional (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); sindromul metabolic X, dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, și rezistență la insulină.

Compușii invenției pot fi de asemenea utilizați în metodele invenției pentru a trata cauzele secundare ale diabetului (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999). Astfel de cauze secundare includ excesul de glucocorticoizi, creșterea excesului de hormoni, feocromocitomul, și diabetul indus de medicamente. Medicamentele care pot induce diabetul includ, dar nu se limitează la, piriminil, acid nicotinic, glucocorticoizi, fenitoin, hormoni de tiroidă, agenți β -adrenergici, α -interferon și medicamente utilizate pentru a trata infecția HIV.

Compușii prezentei invenții pot fi eficienți în supresia alimentelor ingerate și tratamentul obezității.

O „cantitate eficientă” dintr-un compus din prezenta invenție este cantitatea care rezultă într-un efect terapeutic și/sau profilactic dorit fără să cauzeze efecte secundare inacceptabile când se administrează unui subiect. Un „efect terapeutic dorit” include unul sau mai multe dintre următoarele: 1) o ameliorare a simptomului asociat cu boala sau afecțiunea; 2) o întârziere în debutul simptoamelor asociate cu boala sau afecțiunea; 3) longevitate crescută comparativ cu absența tratamentului; și 4) o mai mare calitate a vieții comparativ cu absența tratamentului. De exemplu, o „cantitate eficientă” dintr-un compus din prezenta invenție pentru tratamentul T2D este cantitatea care ar conduce la un control mai mare al concentrației de glucoză în sânge decât în absența tratamentului, conducând prin urmare la o întârziere în debutul complicațiilor diabetice cum ar fi retinopatia, neuropatia, sau boala renală. O „cantitate eficientă” dintr-un compus din prezenta invenție pentru prevenirea diabetului de tip 2, de exemplu la subiecții cu toleranță afectată la glucoză sau cu glucoză afectată de repausul alimentar, este cantitatea care ar întârzia, comparativ cu absența tratamentului, debutul nivelurilor ridicate de glucoză în sânge care necesită tratament cu medicamente anti-hiperglicemice cum ar fi sulfonilureele, tiazolidinedionele, insulină, și/sau bisguanidină.

O „cantitate eficientă” dintr-un compus din prezenta invenție administrată unui subiect va depinde de asemenea de tipul și severitatea bolii și de caracteristicile subiectului, cum ar fi sănătatea generală, vârsta, sexul, greutatea corporală și toleranța la medicamente. Doza dintr-un compus din prezenta invenție eficientă pentru a normaliza glucoza din sângele subiectului va depinde de un număr de factori, printre care sunt incluși, fără limitare, sexul subiectului, greutatea și vârsta, severitatea incapacității de a regla glucoza în sânge, calea de administrare și biodisponibilitatea, profilul farmacocinetic al peptidei, potența, și formularea.

Anumiți compuși ai prezentei invenții sunt în general eficienți pe un interval de dozare larg. De exemplu, dozajele pentru o dozare o dată săptămânal se pot încadra în intervalul de la aproximativ 0,05 până la aproximativ 30 mg pe persoană pe săptămână. Anumiți compuși ai prezentei invenții pot fi dozați zilnic. Suplimentar, anumiți compuși ai prezentei invenții pot fi dozați bi-săptămânal, o dată pe săptămână sau lunar.

Un „subiect” este un mamifer, preferabil un om, dar poate fi de asemenea un animal, incluzând animale de companie (de exemplu, câini, pisici, și altele asemenea), animale de fermă (de exemplu, vaci, oi, porci, cai, și altele asemenea) și animale de laborator (de exemplu, șobolani, șoareci, cobai, și altele asemenea).

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „tratând” sau „a trata” include restrângerea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului sau severității unui simptom sau tulburare existente.

Termenul „perioadă de înjumătățire a plasmiei” se referă la timpul necesar pentru ca jumătate din compușii relevanți să fie eliminați din plasmă. Un termen utilizat alternativ este „perioada de înjumătățire de eliminare”. Termenul „extins” sau „mai lung” utilizat în contextul perioadei de înjumătățire a plasmiei sau perioadei de înjumătățire de eliminare, indică faptul că

există o creștere semnificativă în perioada de înjumătățire a unui compus din prezenta invenție față de cea a moleculei de referință (de exemplu forma conjugată de acid non-gras a peptidei, OXM umană de tip sălbatic sau semaglutidă) după cum s-a determinat în condiții comparabile.

- 5 Eliminarea este o măsură a abilității corpului de a elimina un medicament din circulație. Deoarece eliminarea scade datorită, de exemplu, modificărilor la un medicament, perioada de înjumătățire ar fi de așteptat să crească. Totuși, această relație reciprocă este exactă numai când nu există nici o modificare în volumul de distribuție. O relație aproximativ utilă între perioada de înjumătățire log-liniară terminală ($T_{1/2}$), eliminarea (C) și volumul de distribuție (V) este dată de ecuația: $T_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. Eliminarea nu a indicat cât medicament a fost îndepărtat ci, mai
- 10 degrabă, volumul de fluid biologic cum ar fi sângele sau plasma care ar trebui să fie complet eliberate de medicament pentru a explica eliminarea. Eliminarea este exprimată ca volum pe unitate de timp.

- Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „hidrofil” se referă la proprietatea de a fi capabil să absoarbă cu ușurință umezeala și de a avea grupări polare puternice care interacționează cu ușurință cu apa.
- 15

Așa cum s-a utilizat în acest document, „semaglutidă” se referă la un analog GLP-1 sintetizat chimic care are structura principală a peptidei și structura globală a compusului găsit în numărul de registru CAS 910463-68-2.

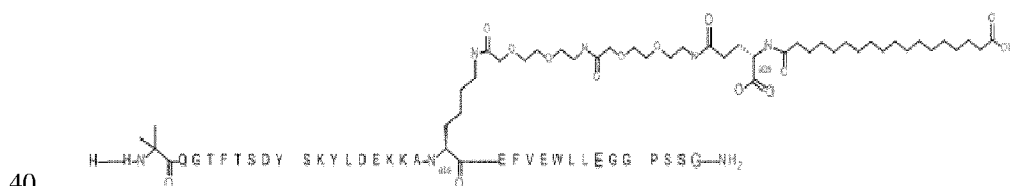
- Secvențele de aminoacizi din prezenta invenție conțin coduri standard dintr-o singură literă sau din trei litere pentru douăzeci de aminoacizi care apar natural. Suplimentar, „Aib” este acid alfa amino isobutiric, „Abu” este acid aminobutiric, „Orn” este ornitină, „Cit” este citrulină și „Sar” este sarcozină.
- 20

- Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „aminoacid C-terminal” se referă la ultimul aminoacid din secvența unei peptide care conține o grupare carboxil liberă. Aminoacidul C-terminal al compușilor din prezenta invenție este Gly la poziția 34.
- 25

- Prezenta invenție cuprinde de asemenea noi intermediari și procedee utile pentru sinteza compușilor din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora. Intermediarii și compușii prezentei invenții pot fi preparați printr-o varietate de proceduri cunoscute în domeniu. În particular, procedeul care utilizează sinteza chimică este ilustrat în exemplele mai jos. Etapele de sinteză specifice pentru fiecare din căile descrise pot fi combinate în diferite moduri pentru a prepara compușii prezentei invenții, sau săruri ale acestora. Reactivii și materiile prime sunt cu ușurință disponibile cuiva având calificare obișnuită în domeniu.
- 30

EXEMPLUL 1

- HXaa2QGTFSTDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG
- 35 în care Xaa2 este Aib;
- K la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino al catenei laterale K cu $[(2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi})\text{-acetil}]_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_1\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-CO}_2\text{H}$; și aminoacidul C-terminal este amidat ca amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 5).



- Diagrama de mai sus ilustrează structura compusului din SEQ ID NO: 5 (la care se face referire în continuare în acest document ca „Compusul 1”) utilizând codul standard de aminoacid cu o singură literă cu excepția resturilor Aib2 și K20 unde structurile acestor aminoacizi au fost expandate.
- 45

- Componenta peptidică a compusului 1 este sintetizată prin sinteza automată a fazei solide utilizând chimia Fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc)/terț-butil (t-Bu) pe un sintetizator peptidic multiplex Symphony cu 12 canale (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

- Sinteza rășinii constă din 1% polistiren reticulat DVB (Fmoc-Rink-MBHA Low Loading resin, 100-200 mesh, EMD Millipore, Temecula, CA) la o substituție de 0,3-0,4 meq/g. Grupările de protecție standard ale catenei laterale sunt după cum urmează: terț-butiloxycarbonil (Boc) pentru Trp și Lys; terț-butil ester (OtBu) pentru Asp și Glu; tBu pentru Ser, Thr și Tyr; și trifenilmetil (Trt) pentru Gln; N- α -Fmoc-N- ϵ -4-metiltritol-L-lizină (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) a fost utilizat pentru lizină la poziția 20 din SEQ ID NO: 3 și N- α ,N-(im)-di-Boc-L-histidină (Boc-His(Boc)-OH) a fost utilizat pentru histidină la poziția 1. Grupările Fmoc au fost îndepărtate înainte de fiecare etapă de cuplare (2 x 7 minute) utilizând 20% piperidină în dimetilformamidă (DMF). Toate cuplările standard de aminoacizi sunt efectuate timp de 1 oră, utilizând un raport molar egal de aminoacid
- 50
- 55

Fmoc (EMD Millipore, Temecula, CA), diizopropilcarbodiimidă (DIC)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) și Oximă (Oxima Pure, Iris Biotech, Marktredwitz, Germania), la un exces molar de 9 ori peste încărcarea teoretică a peptidei și la o concentrație finală de 0,18 M în DMF.

5 Două excepții sunt restul de glutamină la poziția 3 din SEQ ID NO: 5, care este dublu-cuplat (2 x 1 oră), și restul de histidină la poziția 1 din SEQ ID NO: 5, care a fost cuplat la un exces molar de 6 ori utilizând 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) în loc de Oximă timp de 18 ore. După terminarea sintezei peptidei liniare, rășina a fost transferată la o seringă de polipropilenă de 25 mL fritată de unică folosință (Torviq, Niles, MI) echipată cu un robinet de politetrafluoroetilen (PTFE) (Biotage, Charlotte, NC) și gruparea de protecție 4-Metilritil (Mtt) pe lizina la poziția 20 din SEQ ID NO: 5 a fost îndepărtată selectiv de rășina peptidică utilizând trei tratamente cu 20% hexafluoroizopropanol (Oakwood Chemicals, West Columbia, SC) în DCM (2 x 10 minute și 1 x 45 minute) pentru a expune amina epsilon liberă a lizinei la poziția 20 și a o face disponibilă pentru reacția următoare.

15 Atașarea ulterioară a radicalului de legătură al acidului gras este realizată prin efectuarea a două cuplări succesive de acid [2-(2-(Fmoc-amino)etoxi)etoxi]acetic (Fmoc-AEEA-OH) (ChemPep, Inc. Wellington, FL; 3 ori exces de aminoacid (AA):1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinium-3-oxid hexafluorofosfat (HATU): *N,N*-diizopropiletilamină (DIPEA) [1:1:5 mol/mol] pentru un timp de cuplare de 3 ore), urmată de cuplarea de Fmoc-acid glutamic α -t-butil ester (Fmoc-Glu-OtBu)(Ark Pharm, Inc. Libertyville IL, 3 ori exces de AA:HATU:DIPEA [1:1:5 mol/mol] pentru un timp de cuplare de 3 ore). În fiecare caz, radicalul Fmoc este îndepărtat cum s-a descris mai sus. În final, acidul mono-OtBu-octadecanedioic (WuXi AppTec, Shanghai, China) este cuplat la rășina peste 18 ore utilizând un de 3 ori exces de acid:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol).

25 După ce sinteza a fost completă, rășina peptidică este spălată cu diclorometan (DCM), dietil eter și bine uscată în aer prin aplicarea sucției în vid seringii timp de 5 minute. Rășina uscată este tratată cu un cocktail de clivare (acid trifluoroacetic (TFA): anisol:apă:triizopropilsilan, 88:5:5:2 v/v) timp de 2 ore la temperatura camerei pentru a elibera peptida de pe suportul solid și pentru a îndepărta toate grupările de protecție ale catenei laterale. Rășina este separată prin filtrare, spălată de două ori cu neat TFA, și filtratele combinate sunt tratate cu dietil eter rece pentru a precipita peptida brută. Suspensia de peptidă/eter este apoi centrifugată la 4000 rpm pentru a forma un pelet solid, supernatantul este decantat, și peletul solid este triturat cu eter de două ori în plus și uscat *in vid*. Peptida brută este solubilizată în 20% acetonitril/apă și purificată prin RP-HPLC pe o coloană preparativă C8 (Luna 21 x 250 mm, Fenomenex, Torrance, CA) cu gradient liniar de acetonitril și apă utilizând trei sisteme de tamponare diferite:

- 35 1) 0,1 M acetat de amoniu în apă, pH 5,0;
- 2) 0,1 % TFA în apă; și
- 3) 5% acid acetic în apă.

Liofilizarea ulterioară a grupului de produs principal final dă sarea acetat a peptidei liofilizate.

40 Intr-o sinteză efectuată în mod esențial cum s-a descris mai sus, puritatea compusului 1 este evaluată utilizând RP-HPLC analitică și a fost găsită ca fiind >97%.

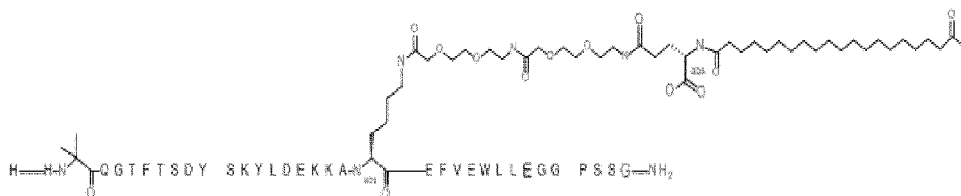
Masa moleculară este determinată prin MS analitică cu electropulverizare. Masa moleculară a compusului 1 este calculată a fi 4535,0 Daltoni în timp ce masa moleculară medie deconvolutată observată a fost determinată a fi 4535,0 Daltoni și s-au observat următorii ioni: 1512,3 (M+3H), 1134,3 (M+4H), 908 (M+5H).

EXEMPLUL 2

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

în care Xaa2 este Aib;

50 K la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea la gruparea epsilon-amino a catenei laterale K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetyl)₂-(γ Glu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 6).



55 Diagrama de mai sus ilustrează structura compusului din SEQ ID NO: 6 (la care se face referire în continuare în acest document ca „Compusul 2”) utilizând codul standard de aminoacid

cu o singură literă cu excepția resturilor Aib2 și K20 unde structurile acestor aminoacizi au fost expandate.

Compusul 2 este sintetizat ca în Exemplul 1, cu excepția faptului că acidul mono-OtBu-eicosanedioic (WuXi AppTec, Shanghai, China) este cuplat la rășină peste 18 ore utilizând un de 3 ori exces de AA:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol), mai degrabă decât acidul mono-OtBu-octadecanedioic ca în Exemplul 1.

Masa moleculară a compusului 2 este calculată a fi 4563,1 Daltoni în timp ce masa moleculară medie deconvolutată observată este determinată a fi 4562,9 Daltoni și s-au observat următorii ioni: 1521,7 (M+3H), 1141,3 (M+4H), 913,5 (M+5H).

10 EXEMPLUL 3

HXaa2QGTFSTDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

în care Xaa2 este Aib;

K la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; și

15 aminoacidul C-terminal este amidat ca amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 7).

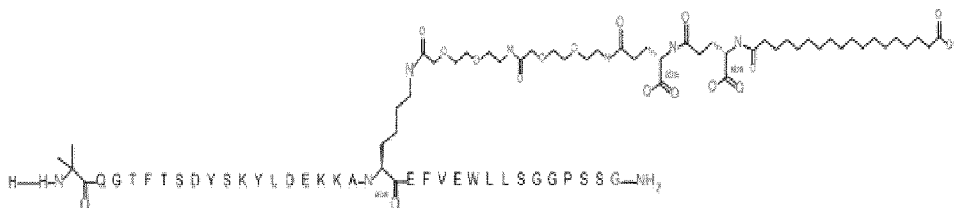


Diagrama de mai sus ilustrează structura compusului din SEQ ID NO: 7 (la care se face referire în continuare în acest document ca „Compusul 3”) utilizând codul standard de aminoacid cu o singură literă cu excepția resturilor Aib2 și K20 unde structurile acestor aminoacizi au fost expandate.

Compusul 3 este sintetizat ca în Exemplul 1, cu excepția că faptului că a fost adăugat un radical Fmoc-Glu-OtBu suplimentar în ciclul de sinteză al agentului de legătură.

Masa moleculară a compusului 3 este calculată a fi 4622,1 Daltoni în timp ce masa moleculară medie deconvolutată observată a fost determinată a fi 4621,9 Daltoni și s-au observat următorii ioni: 1541,3 (M+3H), 1156,2 (M+4H), 925,2 (M+5H).

EXEMPLUL 4

HXaa2QGTFSTDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

în care Xaa2 este Aib;

30 K la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; și

aminoacidul C-terminal este amidat ca amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 8).

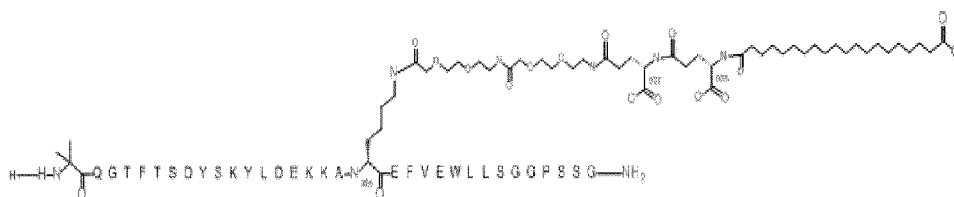


Diagrama de mai sus ilustrează structura compusului din SEQ ID NO: 8 (la care se face referire în continuare în acest document ca „Compusul 4”) utilizând codul standard de aminoacid cu o singură literă cu excepția resturilor Aib2 și K20 unde structurile acestor aminoacizi au fost expandate.

Compusul 4 este sintetizat ca în Exemplul 1, cu excepția faptului că acidul mono-OtBu-eicosanedioic (WuXi AppTec, Shanghai, China) este cuplat la rășină peste 18 ore utilizând un de 3 ori exces de AA:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol), mai degrabă decât acidul mono-OtBu-octadecanedioic utilizat în Exemplul 1. În plus, un radical suplimentar Fmoc-Glu-OtBu de aminoacid se adaugă în ciclul de sinteză al agentului de legătură.

Masa moleculară a peptidei este calculată a fi 4650,1 Daltoni în timp ce masa moleculară medie deconvolutată observată este determinată a fi 4650,1 Daltoni și s-au observat următorii ioni: 1550,7 (M+3H), 1163,3 (M+4H), 930,8 (M+5H).

CARACTERISTICI FIZICE

Vascozitate

Vâscozitatea compușilor din prezenta invenție este măsurată cu un vâscometru Rheosense mVroc cu următoarele setări:

(a)	Dimensiune seringă:	seringă de 500 μL
(b)	Debit:	debit de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$
(c)	Temperatură medie:	25°C
(d)	Viteză de forfecare:	1934 s^{-1}

- 5 până la aproximativ pH 8,0 cu 1N NaOH. Soluția este sonicată și agitată cu mâna până când peptida este în soluție. Mostrele sunt filtrate steril (filtre PVDF de 0,22 μm). Mostrele sunt apoi analizate prin UV-Vis pentru a evalua concentrațiile soluției stoc. Soluțiile sunt diluate la concentrația finală utilizând 3x m-cresol în 10 mM tampon Tris pH 8,0 la concentrații finale de aproximativ 10 mg/mL peptidă din masă în 10 mM Tris + 3 mg/mL m-cresol la pH 8,0. Mostrele
- 10 au fost filtrate printr-un filtru de 0,22 μm imediat înainte de analiza de vâscozitate. 25 μL de mostră sunt îndepărtați pentru a verifica concentrația de RP-HPLC înainte și după analiză.

- Mostrele de control de apă și tampon sunt măsurate înainte și după ce fiecare mostră este analizată. Instrumentul este spălat cu tampon (3x) între analizele fiecărei mostre. Mostrele sunt încărcate în seringi individuale și analizate. Prima măsurare nu este inclusă în calculul final pentru
- 15 a permite echilibrarea cu sistemul. Mostrele sunt apoi analizate în triplicat ($n=3$).

Vâscozitatea compușilor 1-4 a fost măsurată în mod esențial cum s-a descris în acest test. Datele despre vâscozitatea Compușilor 1-4 sunt rezumate în Tabelul 1.

Tabelul 1: Date despre vâscozitatea Compușilor 1-4

Mostră	Vâscozitate seringă de 500 μL (cP sau mPa-s)
Control cu tampon	0,99
Compusul 1	1,06
Compusul 2	1,04
Compusul 3	1,03
Compusul 4	1,05

20 Solubilitate

Solubilitatea compușilor din prezenta invenție este măsurată într-o HPLC Agilent 1100 HPLC, o Agilent 1200 HPLC și o Nanodrop 2000. Următoarele coloane HPLC sunt utilizate:

(a)	RP-HPLC:	Waters Symmetry Shield C18, 3,6 μm , 4,6 x 100 mm
(b)	HPLC-SEC:	Tosoh Biosciences, TSK2000 _{SWXL} , 7,8 cm x 30 mm

- 25 Toate concentrațiile peptidice sunt făcute la 10 mg/mL în următoarele:

- (a) 10 mM Tris pH 8,0 + 3 mg/mL m-cresol
- (b) 10 mM Tris pH 8,0 + 3 mg/mL m-cresol + 150 mM NaCl
- (c) 10 mM Tris pH 8,0 + 3 mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20
- (d) PBS pH 7,4

- 30 5mL de 10 mg/mL peptidă dizolvați în 10 mM Tris la pH 8,0 sunt concentrați până la aproximativ 20 mg/mL utilizând dispozitivul Amicon-ultra 3kDa MWCO. Soluția este filtrată utilizând filtrul Millivex 0,22 μm (membrană PVDF) și concentrația finală este măsurată prin spectrometrul NanoDrop. Această soluție stoc este utilizată pentru a formula condițiile finale declarate mai sus utilizând soluții stoc 3x m-cresol, 10x NaCl, și 100x Tween-20. O soluție PBS 10 mg/mL este de asemenea preparată prin dizolvarea directă la 5 mg/mL și concentrare utilizând
- 35 dispozitivul Amicon-ultra 3kDa MWCO.

Fiecare soluție este plasată într-un congelator la 4°C timp de 1 săptămână, cu analiză prin RP-HPLC pentru a evalua concentrația și HPLC-SEC pentru a evalua formarea speciilor HMW. Analiza a fost completată la săptămâna T-0 și la săptămâna T-1.

- 40 Solubilitatea compușilor 1-4 a fost măsurată în mod esențial cum s-a descris în acest test. Datele despre solubilitatea Compușilor 1-4 sunt rezumate în Tabele 2(a)-(d).

Tabelul 2(a): Date despre solubilitatea Compusului 1

PARAMETRU	REZUMAT
Solubilitate/Dizolvare	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); 10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mm NaCl (T8Nm);
	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm);
	10 mg/mL solubilitate în PBS, pH 7,4; Nici o precipitare vizibilă sau separare a fazelor observată după 1 săptămână de depozitare la 4°C;

PARAMETRU	REZUMAT
	Nici o formare de specii HMW observată prin SEC-HPLC; RP-HPLC verifică concentrația de 10 mg/mL menținută pe durata cursului de 1 săptămână de studiu.

Tabelul 2(b): Date despre solubilitatea Compusului 2

PARAMETRU	REZUMAT
Solubilitate Dizolvare	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); 10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mm NaCl (T8Nm);
	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm);
	10 mg/mL solubilitate în PBS, pH 7,4; Nici o precipitare vizibilă sau separare a fazelor observată după 1 săptămână de depozitare la 4°C;
	Nici o formare de specii HMW observată prin SEC-HPLC; RP-HPLC verifică concentrația de 10 mg/mL menținută pe durata cursului de 1 săptămână de studiu

Tabelul 2(c): Date despre solubilitatea Compusului 3

PARAMETRU	REZUMAT
Solubilitate Dizolvare	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); 10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mm NaCl (T8Nm);
	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm);
	10 mg/mL solubilitate în PBS, pH 7,4; Nici o precipitare vizibilă sau separare a fazelor observată după 1 săptămână de depozitare la 4°C;
	Nici o formare de specii HMW observată prin SEC-HPLC; RP-HPLC verifică concentrația de 10 mg/mL menținută pe durata cursului de 1 săptămână de studiu

Tabelul 2(d): Date despre solubilitatea Compusului 4

PARAMETRU	REZUMAT
Solubilitate Dizolvare	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol (T8m); 10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 150 mm NaCl (T8Nm);
	10 mg/mL solubilitate în Tris pH 8 + 3mg/mL m-cresol + 0,02% Tween-20(T8Tm);
	10 mg/mL solubilitate în PBS, pH 7,4; Nici o precipitare vizibilă sau separare a fazelor observată după 1 săptămână de depozitare la 4°C;
	Nici o formare de specii HMW observată prin SEC-HPLC; RP-HPLC verifică concentrația de 10 mg/mL menținută pe durata cursului de 1 săptămână de studiu

5 **FUNCTIONARE IN VITRO**

Afinitatea de legare a compuşilor 1-4 pentru receptorul Gcg uman recombinant (hGcg-R) și receptorul GLP-1 uman (hGLP-1-R)

- Testele de legare competițională a radioligandului utilizând metode de testare a proximității scintilației (SPA) și membrane preparate din celule transfectate stabil 293HEK care supraexprimă hGcg-R sau hGLP-1-R au fost rulate pentru a determina constantele de disociere de echilibru (K_i) pentru Compuşii 1-4. Protocoalele experimentale și rezultatele sunt descrise mai jos.

Test de legare hGLP-1R

- Testul de legare al receptorului GLP-1 utilizează hGLP-1-R clonată (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196(1): 141-6, 1993) izolată din celule 293HEK care supraexprimă hGLP-1R recombinant. ADNc hGLP-1R este subclonat în plasmidă de expresia pHd (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. și Yan, S.B. Bio/Technology 5:1189-1192, 1987). Această plasmidă ADN este transfectată în celule 293HEK și selectată cu 200 µg/mL higromicină.

- Membranele plasmatic brută sunt preparate utilizând celule de cultură aderentă. Celulele sunt lizate pe gheață în tampon hipotonic conținând 50 mM Tris HCl, pH 7,5 și inhibitori de protează Roche Complete™ cu EDTA. Suspensia de celule este sfărâmată utilizând un omogenizator de sticlă Potter-Elvehjem dotat cu un piston Teflon® pentru 25 de lovituri. Omogenatul este centrifugat la 4°C la 1100 x g timp de 10 minute. Supernatantul este colectat și depozitat pe gheață în timp ce peletul este resuspendat în tampon hipotonic și reomogenizat. Amestecul este centrifugat la 1100 x g timp de 10 minute. Al doilea supernatant este combinat cu primul supernatant și centrifugat la 35000 x g timp de 1 oră la 4°C. Peletul membranal este resuspendat în tampon de omogenizare conținând inhibitori de protează, congelat rapid în azot lichid și depozitat ca alicote într-un congelator la -80°C până la utilizare.

- GLP-1 este radioiodinat prin procedura lactoperoxidază I-125 și purificat prin HPLA cu fază inversă la Perkin-Elmer (NEX308). Activitatea specifică este 2200 Ci/mmol. Determinarea K_D este efectuată prin competiția omoloagă în loc de legarea de saturație din cauza conținutului

ridicat de propanol din materialul GLP-1 1-125. K_D este estimată a fi 1,24 nM și este utilizată pentru a calcula valorile K_i pentru toți compușii testați.

Testul de legare al receptorului este efectuat utilizând un test de proximitate de scintilație (SPA) format cu perle din aglutinină din germeni de grâu (WGA) (Perkin Elmer). Tamponul de legare conține 25 mM acid 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetsulfonic (HEPES), pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% (m/v) bacitracin (Affymetrix), 0,003% (m/v) monolaurat de polioxietilensorbitan (TWEEN®-20) și inhibitori de protează Roche Complete™ fără EDTA. GLP-1 este dizolvat în DMSO la 0,339 mg/mL (0,1 mM) și depozitat congelat la -20°C în 100 μL alicote. Alicota GLP-1 este diluată și utilizată în teste de legare într-o oră. Analogul peptidei este dizolvat în dimetil sulfoxid (DMSO) și diluat serial de 3 ori în 100% DMSO. Apoi, 5 μL de compus diluat serial sau DMSO este transferat în plăci de testare cu fund clar Corning® 3632 conținând 45 μL tampon de legare de testare sau control GLP-1 neetichetat (legare non-specifică (NSB) la 0,25 μM final). Apoi, se adaugă 50 μL de membrane hGLP-1R (0,5 $\mu\text{g/godeu}$), 50 μL GLP-1 1-125 (0,15 nM final), și 50 μL de perle WGA (150 $\mu\text{g/godeu}$), plăcile sunt etanșate și amestecate pe un agitator de placă (setat la 6) timp de 1 minut. Plăci sunt citite cu un numărător de scintilații PerkinElmer Trilux MicroBeta® după un timp de 12 ore de ședere la temperatura camerei.

Rezultatele sunt calculate ca procente de legare I-125-GLP-1 specifică în prezența compusului. Concentrația IC_{50} absolută de compus este derivată din regresia non-liniară a procentajului de legare specifică a I-125-GLP-1 vs. concentrația de compus adăugat. Concentrația de IC_{50} este convertită la K_i utilizând ecuația Cheng-Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

K_i a compușilor 1-4, Gcg uman și GLP-1(7-36) NH_2 uman la hGLP-1-R sunt prezentate în Tabelul 3 mai jos. Numărul de replicare este indicat în paranteză. Calificativul A (>) indică faptul că % de inhibare nu a atins 50% și K_i calculat este obținut utilizând cea mai mare concentrație testată. $n=1/n$ indică faptul că mediile nu sunt calculate când toate valorile au un semn > și valoarea prezentată este cea mai mare valoare calculată.

Tabelul 3: K_i a compușilor 1-4, Gcg uman și GLP-1(7-36) NH_2 uman la hGLP-1-R

Compus	K_i , nM $\pm$ SEM, (n)
Compusul 1	23,0 $\pm$ 5,5 (n=6)
Compusul 2	28,6 $\pm$ 4,8 (n=4)
Compusul 3	8,68 $\pm$ 1,60 (n=4)
Compusul 4	20,2 $\pm$ 8,2 (n=4)
Gcg uman	>4940 (n=1/2)
GLP-1 (7-36) NH_2 uman	0,75 $\pm$ 0,056 (n=67)

30 Test de legare hGcg-R

Testul de legare al receptorului Gcg utilizează hGcg-R clonată (Lok, S. și colab., Gene 140 (2), 203-209 (1994)) izolată din celule 293HEK care supraexprimă hGcg-R recombinant. ADNc hGcg-R este subclonat în plasmidă de expresie pHD (expresia trans-activată a proteinei C umane recombinante complete gama-carboxilate, un factor antitrombotic. Grinnell, B.W., și colab., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Acest ADN plasmidic este transfectat în celule 293HEK și selectat cu 200 $\mu\text{g/mL}$ higromicină.

Membranele plasmactice brute sunt preparate utilizând celule de cultură aderente. Celulele sunt lizate pe gheață în tampon hipotonic conținând 50 mM Tris HCl, pH 7,5 și inhibitori de protează Roche Complete™ cu EDTA. Suspensia de celule este sfărâmată utilizând un omogenizator de sticlă Potter-Elvehjem dotat cu un piston Teflon® pentru 25 de lovituri. Omogenatul este centrifugat la 4°C la 1100 x g timp de 10 minute. Supernatantul este colectat și depozitat pe gheață în timp ce peletul este resuspendat în tampon hipotonic și reomogenizat. Amestecul este centrifugat la 1100 x g timp de 10 minute. Al doilea supernatant este combinat cu primul supernatant și centrifugat la 35000 x g timp de 1 oră la 4°C. Peletul membranal este resuspendat în tampon de omogenizare conținând inhibitori de protează, congelat rapid în azot lichid și depozitat ca alicote într-un congelator la -80°C până la utilizare.

Gcg este radioiodinat prin procedura lactoperoxidază I-125 și purificat prin HPLC cu fază inversă la Perkin-Elmer (NEX207). Activitatea specifică este 2200 Ci/mmol. Determinarea K_D este efectuată prin competiție omoloagă în loc de legarea de saturație din cauza conținutului ridicat de propanol din materialul Gcg 1-125. K_D este estimată a fi 3,92 nM și este utilizată pentru a calcula valorile K_i pentru toți compușii testați.

Testul de legare al receptorului este efectuat utilizând un test de proximitate a scintilației (SPA) format cu perle din aglutinină din germeni de grâu (WGA) (Perkin Elmer). Tamponul de

legare conține 25 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,1% (m/v) bacitracin (Affymetrix), 0,003% (m/v) monolaurat de polioxietilensorbitan (TWEEN®-20) și inhibitori de protează Roche Complete™ fără EDTA. Gcg este dizolvat în DMSO la 3,48 mg/mL (1 mM) și depozitat congelat la -20°C în 100 μL alicote. Alicota Gcg este diluată și utilizată în teste de legare intr-o oră. Analogul peptidic este dizolvat în DMSO și diluat serial de 3 ori în 100% DMSO. Apoi, 5 μL de compus diluat serial sau DMSO sunt transferați în plăci de testare cu fund clar Corning® 3632 conținând 45 μL tampon de legare de testare sau control Gcg neetichetat (NSB la 1 μM final). Apoi, se adaugă 50 μL de membrane hGcg-R (0,5 $\mu\text{g/godeu}$), 50 μL 1-125 Gcg (0,15 nM final în reacție), și 50 μL de perle WGA (150 $\mu\text{g/godeu}$), plăcile sunt etanșate și amestecate pe un agitator de placă (setarea 6) timp de 1 minut. Plăcile sunt citite cu un numărător de scintilații PerkinElmer Trilux MicroBeta® după un timp de 12 ore de ședere la temperatura camerei.

Rezultatele sunt calculate ca procente de legare I-125-Gcg specifică în prezența compusului. Concentrația absolută de IC_{50} de compus este derivată din regresia non-liniară a procentajului de legare specifică a I-125-Gcg vs. concentrația de compus adăugat. Concentrația de IC_{50} este convertită la K_i utilizând ecuația Cheng-Prusoff) Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)). K_i a compușilor 1-4, Gcg uman și GLP-1(7-36) NH_2 uman la hGcg-R sunt prezentate în Tabelul 4 mai jos. Numărul de replicare este indicat în paranteză. Calificativul A (>) indică faptul că % de inhibare nu a atins 50% și K_i calculat este obținut utilizând cea mai mare concentrație testată. $n=1/2$ indică faptul că mediile nu sunt calculate când toate valorile au un semn > și valoarea rezultatului prezentată este cea mai mare valoare calculată.

Tabelul 4: K_i a compușilor 1-4, Gcg uman și GLP-1(7-36) NH_2 uman la hGcg-R

Compus	K_i , nM $\pm$ SEM, (n)
Compusul 1	$14,6 \pm 4,4$ (n=6)
Compusul 2	$17,7 \pm 5,0$ (n=4)
Compusul 3	$37,3 \pm 4,2$ (n=4)
Compusul 4	$27,4 \pm 3,3$ (n=4)
Gcg uman	$2,49 \pm 0,24$ (n=73)
GLP-1(7-36) NH_2 uman	>2420 (n=1/2)

Teste funcționale hGLP-1-R și hGcg-R

Activitatea funcțională este determinată în hGLP-1-R și hGcg-R care exprimă liniile celulare clonale HEK-293. Protocoalele experimentale și rezultatele sunt descrise mai jos.

Fiecare receptor care supraexprimă linia celulară este tratat cu peptidă în DMEM (mediu Eagle modificat Dulbecco, Gibco Cat# 31053) suplimentat cu 1X GlutaMAX™ (L-alanil-L-glutamină dipeptidă în 0,85% NaCl, Gibco Cat# 35050), 0,25% FBS (ser fetal bovin dializat, Gibco Cat# 26400), 0,05% fracțiune V BSA (fracțiune de albumină bovină V, Gibco Cat# 15260), 250 μM IBMX (3-Izobutil-1-metilxantină) și 20 mM HEPES [N-(2-Hidroxietyl)piperazin-N'-(acid 2-etansulfonic), HyClone Cat# SH30237,01] într-un volum de test de 40 μL . După o incubare de 60 minute la temperatura camerei, creșterea rezultată în AMPc intracelulară (adenozină 3',5'-ciclic monofosfat) este determinată cantitativ utilizând trusa de testare CisBio AMPc Dinamice 2 HTRF (62AM4PEJ). Nivelurile AMPc din celulă sunt detectate prin adăugarea conjugatului AMPc-d2 în tamponul de lizare celular (20 μL) urmată de anticorpul anti-AMPc-Eu³⁺-Cripstat, de asemenea în tamponul de lizare celular (20 μL). Testul competitiv rezultat este incubat timp de cel puțin 60 min la temperatura camerei, apoi detectat utilizând un instrument PerkinElmer Envision® cu excitație la 320 nm și emisie la 665 nm și 620 nm. Unitățile Envision (emisie la 665nm/620nm²10,000) sunt invers proporționale cu cantitatea de AMPc prezentă și sunt convertite la nM AMPc pe godeu utilizând o curbă standard AMPc. Cantitatea de AMPc generată (nM) în fiecare godeu este convertită la un procent din răspunsul maxim observat cu 10 nM GLP-1(7-36) NH_2 uman, sau cu 10 nM Gcg uman.

O valoare EC_{50} relativă și procentajul maxim (E_{max}) sunt derivate dintr-o analiză de regresie non-liniară utilizând procentajul de răspuns maxim vs. concentrația de peptidă adăugată, ajustat la o ecuație logistică cu patru parametri (Genedata Screener®).

Datele funcționale pentru Compușii 1-4, GLP-1(7-36) NH_2 uman, Gcg uman și OXM umană de tip sălbatic sunt prezentate în Tabelul 5 mai jos. Mediile pentru EC_{50} sunt exprimate ca medii geometrice $\pm$ eroare standard a mediei (SEM) cu numărul de replicare (n) indicat în paranteză. Mediile pentru E_{max} sunt exprimate ca medie aritmetică $\pm$ eroare standard. ND înseamnă că activitatea agonistă nu a fost detectată. Toate valorile prezentate sunt cu trei (3) digiți semnificativi.

Tabelul 5: Potența funcțională (EC₅₀) și eficacitatea (E_{max}) pentru Compușii 1-4 GLP-1(7-36)NH₂ uman, Gcg uman și de OXM umană de tip sălbatic

Compus	GLP-1-R uman		Gcg-R uman	
	EC ₅₀ , nM ± SEM (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)	E _{max} , %
Compusul 1	23,9 ± 4,5 (13)	104 ± 7	7,21 ± 1,06 (13)	112 ± 3
Compusul 2	83,1 ± 16,8 (15)	107 ± 7	26,5 ± 2,2 (15)	114 ± 5
Compusul 3	34,3 ± 9,4 (13)	105 ± 5	15,3 ± 2,2 (13)	104 ± 5
Compusul 4	106 ± 18 (13)	85,2 ± 6,0	68,8 ± 7,2 (15)	116 ± 4
Gcg uman	ND	ND	0,023 ± 0,014 (47)	113 ± 1
GLP-1(7-36)NH ₂ uman	0,168 ± 0,008 (51)	101 ± 1	ND	ND
OXM umană de tip sălbatic	9,54 ± 1,34 (8)	96,9 ± 5,7	0,757 ± 0,090 (8)	121 ± 7

Activarea funcțională a GLP-1-R de șobolan în linia celulară insulinomă INS1 832-3

5 O linie celulară beta pancreatică de șobolan, celula INS1 832-3, este utilizată pentru a determina activitatea funcțională a compușilor 1-4 asupra stimulării producției de AMPc la receptorii GLP-1 endogeni. Celulele sunt menținute în mediu RPMI 1640 (HyClone, Cat# SH30027) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 10 mM HEPES, 1 mM piruvat de sodiu, 2 mM L-Glutamină, 50 μM 2-Mercaptoetanol, și 100U/ml Penicilină/100μg/ml Streptomycină într-un incubator la 37°C, 5% CO₂ și trecute de două ori săptămânal.

10 Performanța testului necesită detașarea celulelor din flacoane de cultură utilizând deșertător de celule fără enzime și peletarea prin centrifugare la 1000 rpm timp de 5 minute la temperatura camerei. Peletul celular este resuspendat în soluție salină echilibrată Earle (EBSS) suplimentată cu 11,2 mM glucoză & 0,1% BSA. 40 μl de suspensie de celule la densitatea de 1x10⁶/ml sunt plasați în plăci negre cu jumătate de arie cu 96 de godeuri (Costar 3875) și incubate într-un incubator la 37°C, 5% CO₂ timp de 2 ore pentru recuperare & înfometare. Diluțiile seriale ale compușilor testați sunt preparate la 100X concentrație finală de testare în 100% DMSO, și în plus diluate de 20 de ori în EBSS suplimentată cu 11,2 mM glucoză, 0,1% BSA, și 1,25 mM IBMX (Sigma 1-7816). După 2 ore de înfometare, celulele sunt tratate cu compus prin adăugare de 10 μl de 5X diluții de compus în plăcile cu celule (n = 2) și incubate într-un incubator la 37°C, 5% CO₂ timp de 30 minute.

25 Concentrația de AMPc este măsurată utilizând o trusă de testare HTRF AMPc (Cisbio): conjugatul AMPc-d2 în tamponul de lizare celular (20 μl) urmat de anticorpul anti-AMPc-Eu³⁺-Criptat, de asemenea în tamponul de lizare celular (20 μl), se adaugă la celulele plăcii. Testul competitiv rezultat este incubat timp de cel puțin 60 minute la temperatura camerei și este ulterior detectat utilizând un instrument PerkinElmer Envision® cu excitație la 320 nm și emisie la 665 nm și 620 nm. Unitățile Envision (emisie la 665nm/620nm^{10,000}) sunt invers proporționale cu cantitatea de AMPc prezent și sunt convertite la nM AMPc pe godeu utilizând o curbă standard AMPc.

30 Concentrația de AMPc în fiecare godeu (nM) a fost calculată utilizând o curbă standard AMPc și convertită la un procentaj din răspunsul maxim observat cu peptida GLP-1 nativă la 300 nM pentru ajustarea pe o curbă.

35 O valoare EC₅₀ relativă și procentajul maxim (% E_{max}) sunt derivate dintr-o analiză de regresie non-liniară utilizând procentajul de răspuns maxim vs. concentrația de peptidă adăugată, ajustată la o ecuație logistică cu patru parametri (GraphPad Prism (Versiunea software 6.05). Testul este efectuat cu plăci duplicate. Numărul de replicare (n) este indicat în paranteză.

40 EC₅₀ și % E_{max} pentru OXM umană de tip sălbatic, semaglutidă și Compușii 1 și 2 au fost calculate în mod esențial cum s-a descris mai sus. Datele EC₅₀ și % E_{max} pentru acești compuși sunt furnizate în Tabelul 6. Mai mult, Compușii 1 și 2 au crescut producția AMPc într-o manieră dependentă de doză (datele nu sunt prezentate).

Tabelul 6: EC₅₀ ale OXM umană de tip sălbatic, semaglutidei și Compușilor 1 și 2 la GLP-1-R de șobolan în linia celulară insulinomă INS1 832-3

Compus	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
OXM umană de tip sălbatic	7,3 (n=1)	121,1
Semaglutidă	5,8 (n=1)	107,2
Compusul 1	26,1 (n=1)	112,3
Compusul 2	62 (n=1)	104,5

Activarea funcțională a hGcg-R în hapatocitele umane primare

Hepatocitele umane primare sunt utilizate pentru a determina activitatea funcțională a compușilor asupra stimulării producției de AMPc la receptorii Gcg endogeni.

5 Fiole de hepatocite primare umane sunt congelate într-un rezervor cu azot lichid. După îndepărtare, fiolele sunt dezghețate imediat într-o baie de apă având o temperatură de 37°C. Suspensia de celule este apoi transferată până la 50 ml CHRM (Gibco/Life Technologies cat#

10 CM7000 Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium). Suspensia de celule este centrifugată la 1.000 x g timp de 10min. Peleții celulari sunt resuspendați în 5ml de mediu de placare după îndepărtarea CHRM prin aspirare. Mediul de placare este preparat prin adăugarea întregului conținut de pachete de suplimente CM3000 până la 500ml mediu Williams (Gibco/Life Technologies), urmat de filtrarea sterilă printr-o membrană de 0,22μm.

15 Densitatea celulară este numărată pe hemocitometru, prin adăugarea a 100μl de suspensie de celule la 100μl tripan albastru (HyClone Trypan Blue 0,04%, număr de catalog SV30084,01). Suspensia de celule este diluată suplimentar în mediu de placare până la densitatea celulară finală de 0,8 X 10⁶ celule pe ml. 65 ml de mediu de placare se adaugă la fiecare godeu al plăcii cu 96 de godeuri acoperită cu Colagen (Corning BioCoat, număr de catalog 354649, Lot# 22314033). 65 ml de suspensie celulară sunt apoi adăugați în fiecare godeu al plăcii cu 96 de godeuri acoperite cu Colagen până la densitatea celulară finală de 50.000 celule pe godeu. Placa celulară este incubată într-un incubator la 37°C, 5% CO₂ timp de 3-4 ore.

20 După 3-4 ore de incubare, mediul este aspirat și înlocuit cu 100 ml mediu de întreținere. Mediul de întreținere este preparat prin adăugarea întregului conținut de pachete cu suplimente CM4000 până la 500ml mediu Williams (Gibco/Life Technologies), urmat de filtrarea sterilă printr-o membrană de 0,22μm. Placa celulară este întoarsă la incubator la 37°C, 5% CO₂ peste noapte în pregătire pentru testul AMPc.

25 În pregătirea pentru test, compușii 1 și 2 și OXM umană de tip sălbatic sunt supuse la de 3 ori diluție serială în compusul tampon de testare (HBSS conținând 20 mM HEPES și 1% FBS inactivat la căldură) pentru 10 concentrații.

30 Placa celulară este îndepărtată de incubator și mediul este îndepărtat prin aspirare ușoară fără a perturba monostratul celular. Celulele sunt tratate prin adăugarea a 40μl de tampon de testare celular și 40μl de soluție de test (adică Compusul 1, Compusul 2 sau OXM umană de tip sălbatic diluat în tampon de testare al compusului) în plăcile celulare și incubate la temperatura camerei timp de 1 oră cu agitare ușoară.

35 Concentrația AMPc este măsurată utilizând o trusă de testare HTRF AMPc (Cisbio): conjugatul AMPc-d2 în tampon de lizare celulară (40 μl) urmat de anticorpul anti-AMPc-Eu³⁺-Criptat, de asemenea în tampon de lizare celulară (40 μl), se adaugă la celulele plăcii. Testul competitiv rezultat este incubat timp de cel puțin 60 minute la temperatura camerei, apoi detectat utilizând un instrument PerkinElmer Envision® cu excitație la 320 nm și emisie la 665 nm și 620 nm. Unitățile Envision (emisie la 665nm/620nm² 10,000) sunt invers

40 proporționale cu cantitatea de AMPc prezentă și sunt convertite la nM AMPc pe godeu utilizând o curbă standard AMPc.

Concentrația de AMPc în fiecare godeu (nM) este calculată utilizând o curbă standard AMPc și convertită la un procentaj al răspunsului maxim observat cu un conjugat analog Gcg la un acid gras C18 saturat (diacid) pentru ajustarea pe o curbă.

45 O valoare EC₅₀ relativă și procentajul maxim (% E_{max}) sunt derivate dintr-o analiză de regresie non-liniară utilizând procentajul răspunsului maxim vs. concentrația de peptidă adăugată, ajustat la o ecuație logistică cu patru parametri (GraphPad Prism (Versiunea software 6.05)).

50 EC₅₀ și % E_{max} pentru Compușii 1 și 2 și OXM umană de tip sălbatic au fost calculate în mod esențial cum s-a descris mai sus. Datele EC₅₀ și % E_{max} pentru acești compuși sunt prevăzute în Tabelul 7. Mai mult, Compușii 1 și 2 au crescut producția de AMPc într-o manieră dependentă de doză (datele nu sunt prezentate). Numărul de replicare (n) este indicat în paranteză.

Tabelul 7: EC₅₀ a compușilor 1 și 2 și OXM umană de tip sălbatic la hGcg-R în hepatocitele umane primare

Compus	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
OXM umană de tip sălbatic	29,8 (n=1)	90,0
Compusul 1	99,9 (n=1)	100,0
Compusul 2	159,4 (n=1)	101,2

FARMACOCINETICI

55 **Farmacocinetici la maimuța cynomolgus**

Proprietățile farmacocinetice *in vivo* pentru compușii prezentei invenții sunt demonstrate utilizând maimuțe cynomolguss.

Compușii sunt administrați printr-o singură doză intravenoasă sau subcutanată de 50 nmole/kg sau 250 nmole/kg. Sangele este colectat de la fiecare animal la 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 208, 480, 576 și 672 ore post-dozaj.

Concentrațiile de plasmă ale compușilor sunt determinate printr-o metodă LC/MS. Pe scurt, un compus din prezenta invenție este extras din 100% plasmă de maimuță (25 μ l) utilizând acetoniul. După centrifugare sunt formate două straturi distincte cu compusul situat în stratul lichid. O alicotă de 80 μ l de supernatant a fost transferată la o placă cu 96 de godeuri, diluată cu 150 μ l de apă și 25 μ l de acid formic. Mostra diluată (10 μ l) a fost injectată pe o coloană Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 cm X 1 mm, 3 μ m. Scurgerea coloanei este direcționată într-un spectrometru de masă Thermo Q-Exactive pentru detecție și cuantificare.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris pentru acest test, maimuței cynomolguss i-a fost administrată o singură doză subcutanată (50 nmole/kg) de compus 1 în 40 mM Tris HCl (pH 8,0) la un volum de 0,20 mL/kg. Sangele a fost colectat de la fiecare animal la 2 (numai IV), 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576, și 672 ore post doză.

Altor maimuțe cynomolguss le-a fost administrată o singură doză intravenoasă (50 nmole/kg) sau subcutanată (50 sau 250 nmole/kg) de compus 2 în 40 mM Tris HCl (pH 8,0) la un volum de 0,20 mL/kg. Sangele a fost colectat de la fiecare animal la 2 (numai IV), 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576, și 672 ore post doză.

Datele pentru Compusul 1 sunt furnizate în Tabelul 9 și datele pentru Compusul 2 sunt furnizate în Tabelul 10.

Compusul 1 a atins media concentrației maxime de plasmă la aproximativ 12 ore după 50 nmol/kg de doză subcutanată. Perioada medie de înjumătățire este de 57 ore și eliminarea medie este de 2,16 mL/oră/kg (Tabelul 8).

Compusul 2 a atins o medie a concentrației maxime de plasmă la aproximativ 24 ore după 50 nmol/kg de doză subcutanată. Perioada medie de înjumătățire este de 122 ore și eliminarea medie este de 0,55 mL/oră/kg (Tabelul 9).

Tabelul 8: Parametrii farmacocinetici individuali și medii după o singură doză subcutanată de 50 nmol/kg de compus 1 la maimuțele masculi cynomolguss

Compus	ID animal	T _{1/2} (oră)	T _{max} (oră)	C _{max} (nmol/L)	AUC _{0-inf} (ore*nmol/L)	CL/F (mL/ore/kg)
Compus 1: SC 50nmol/kg	I07762	47	12	253	21672	2,31
	I07763	67	12	236	24865	2,01
	Medie	57	12	244	23268	2,16

Abrevieri: AUC_{0-inf} = aria de sub curba de la 0 la infinit, CL/F = eliminare/biodisponibilitate, T_{max} = timp până la concentrația maximă, C_{max} = concentrația maximă a plasmelor, T_{1/2} = perioadă de înjumătățire.

Tabelul 9: Parametrii farmacocinetici individuali și medii ai compusului 2 după o singură doză intravenoasă sau subcutanată la maimuțele masculi cynomolguss

Compus/Cale/Doză	ID animal	T _{1/2} (oră)	T _{max} (oră)	C ₀ sau C _{max} (nmol/L)	AUC _{0-inf} (ore*nmol/L)	CL/F (mL/ore/kg)
Compus 2: IV 50nmol/kg	I07772	88	NA	1017	94828	0,53
	I07773	131	NA	1105	93174	0,54
	Medie	110	NA	1061	94001	0,53
Compus 2: SC 50nmol/kg	I07764	137	24	474	100967	0,50
	I07765	106	24	452	82792	0,60
	Medie	122	24	463	91879	0,55
Compus 2: SC 250nmol/kg	I07766	115	12	3640	429859	0,58
	I07767	104	12	3615	540175	0,46
	Medie	110	12	3628	485017	0,52

Abrevieri: AUC_{0-inf} = aria de sub curba de la 0 la infinit, CL = eliberare, CL/F = eliberare/biodisponibilitate, T_{max} = timp până la concentrația maximă, C₀ = concentrație extrapolată la timp de 0 ore, C_{max} = concentrația maximă a plasmelor, T_{1/2} = perioadă de înjumătățire, NA = neaplicabil.

35 **STUDII IN VIVO**

Test de toleranță la glucoza administrată oral (OGTT) la șoarecii DIO

Modelul pe șoarece de obezitate indusă de dietă (DIO) este un model de rezistență la insulină. Șoarecii DIO masculi cu vârsta între cinci și șase luni (C57BL/6) de la Taconic

- Biosciences sunt utilizați în acest studiu. Animalele sunt găzduite individual într-o incintă cu temperatură-controlată (24°C) cu un ciclu de 12 ore lumină/întuneric (lumină de la 06:00), și acces liber la alimente și apă. Perioada de aclimatizare în incintă este de două săptămâni. În ziua dinaintea studiului, animalele sunt randomizate în grupuri pe baza greutateii lor corporale. În aceeași după amiază, animalele sunt ținute fără mâncare în cuști curate și dozate cu vehicul (40 mM Tris-HCl, pH 8,0) sau articole de test prin injecție subcutanată. Următoarea dimineață, la 16 ore după injectarea peptidei, sunt obținute greutatea corporale de repaus alimentar pentru a calcula dozele de glucoză. Probele de sânge sunt luate pentru a măsura glucoza la momentul zero. Animalelor li se dă apoi un gavaj oral de glucoză (2 g/kg). Două citiri de glucoză prin glucometre au fost obținute la 15, 30, 60 și 120 minute după glucoza orală. Media celor două citiri de glucoză este raportată la fiecare moment de timp și se calculează o arie de sub curbă. Statisticile au fost analizate utilizând ANOVA cu comparație Dunnett prin JMP 6; semnificativ este denumit la $p \leq 0,05$ vs. vehicul.

- În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, Compusul 2 a prezentat o scădere a dependenței de doză în glucoză în timpul testului de toleranță, și AUC a glucozei a scăzut la toate cele trei doze testate 1, 3 și 10 nmol/kg (Tabelul 10).

Tabelul 10: AUC a glucozei șoarecilor DIO masculi tratați cu Compusul 2 și semaglutidă în răspuns la un OGTT (2g/kg)

Compus	Doză (nmol/kg)	AUC glucoză (% vehicul)
Compusul 2	1	76*
Compusul 2	3	50*
Compusul 2	10	39*
Semaglutidă	1	59*
Semaglutidă	3	51*
Semaglutidă	10	38*
% vehicul calculat ca $100 \times (\text{Valoarea calculată pentru grupul/valoarea compusului calculat pentru grupul cu vehicul})$ * $p \leq 0,05$		

20 OGTT la șoarecii DIO tratați cu streptozotocin (STZ)

- Modelul pe șoarece tratat cu STZ este un model de diabet timpuriu. Șoareci DIO masculi cu vârsta între cinci și șase luni (C57BL/6) de la Taconic Biosciences sunt utilizați în acest studiu. Animalele sunt găzduite individual într-o incintă cu temperatură-controlată (24°C) cu un ciclu de 12 ore lumină/întuneric ciclu (lumina de la 6:00), și cu acces liber la alimente și apă. După două săptămâni de aclimatizare cu incinta, șoarecii sunt injectați intraperitoneal cu 50mg/kg de STZ marți și vineri. Două săptămâni după injecție, animalele cu nivelurile de glucoză între 180-300mg/dL la 09:00 sunt selectate pentru studiul OGTT. În ziua dinaintea studiului, animalele sunt randomizate în grupuri pe baza masei corporale și nivelurilor lor de glucoză. Animalele sunt tratate cu vehicul sau articole de testare prin injecție subcutanată chiar înainte ca alimentele să fie îndepărtate peste noapte (16:00). Următoarea dimineață la 08:00, 16 ore după injectarea compusului, sunt luate probe de sânge pentru a măsura glucoza la momentul zero. Animalelor le este dată o doză orală de glucoză de 2 g/kg. Glucoza este măsurată la 15, 30, 60, și 120 minute după provocarea cu glucoză orală. Statisticile sunt analizate utilizând ANOVA cu comparație Dunnett prin JMP 6. Semnificativ este denumit la $p \leq 0,05$ vs. vehicul.

- În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, Compusul 2 a prezentat o scădere dependentă de doză în incursiunea glucozei în timpul testului de toleranță. AUC a glucozei a scăzut la toate cele trei doze testate 1, 3 și 10 nmol/kg (Tabelul 11).

Tabelul 11: AUC a glucozei șoarecilor STZ masculi tratați cu Compusul 2 și semaglutidă în răspuns la un OGTT (2g/kg)

Compus	Doză (nmol/kg)	AUC a glucozei (% vehicul)
Compusul 2	1	70*
Compusul 2	3	48*
Compusul 2	10	35*
Semaglutidă	1	72*
Semaglutidă	3	53*
Semaglutidă	10	35*
% vehicul calculat ca $100 \times (\text{Valoarea calculată pentru grupul/valoarea compusului calculat pentru grupul cu vehicul})$ * $p \leq 0,05$		

40 Controlul glicemic la șoarecii DIO

- 5 Șoarecii DIO masculi cu vârsta între cinci și șase luni (C57BL/6) de la Taconic Biosciences sunt utilizați în acest studiu. Animalele sunt găzduite individual într-o incintă cu temperatură-controlată (24°C) cu un ciclu de 12 oră lumină/întuneric (lumină de la 6:00), și acces liber la alimente și apă. După două săptămâni de aclimatizare la incintă, șoarecii sunt randomizați la grupurile de tratament (n=7/grup) pe baza greutateii lor corporale și a glucozei din sânge. Șoarecii sunt injectați subcutanat o dată cu vehiculul sau compușii (25 nmol/kg). Glucoza din sânge este monitorizată la 2 și 8 ore post-injecție și apoi o dată pe zi la 08:00 timp de 4 zile. OGTT sunt efectuate la 44 și 78 ore post injectarea peptidei. Statisticile sunt analizate utilizând ANOVA cu comparație Dunnett prin JMP 6. Semnificativ este denumit la $p \leq 0,05$ vs vehicul.
- 10 În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, șoarecii tratați cu Compusul 2 și Compusul 4 au avut o glucoză mai scăzută decât controalele cu vehiculul până la 96 ore post injecție. Șoarecii tratați cu Compusul 2 și Compusul 4 au avut incursiuni de glucoză mai scăzute post provocarea cu glucoza orală la ambele momente de timp când a fost efectuată OGTT.
- 15 Compusul 1 și Compusul 3 au scăzut glucoza în sânge până la 72 ore (Tabelul 12). Șoarecii tratați cu Compusul 1 și Compusul 3 au avut incursiuni de glucoză mai scăzute post provocarea cu glucoză orală la 44 de ore după injectarea peptidei (Tabelul 13).

Tabelul 12: Glucoza în sânge măsurată la 2, 8, 24, 48, 72 și 96 ore post injectare la șoarecii DIO masculi

Timp	Glucoza în sânge (mg/dL) post-injecție cu vehicul		Glucoza în sânge (mg/dL) post-injecție cu compus 1		Glucoza în sânge (mg/dL) post-injecție cu compus 2		Glucoza în sânge (mg/dL) post-injecție cu compus 3		Glucoza în sânge (mg/dL) post-injecție cu compus 4	
	Medie	SEM	Medie	SEM	Medie	SEM	Medie	SEM	Medie	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

20 **Tabelul 13: Incursiunile de glucoză în timpul OGTT la 44 ore și 78 ore după injectarea compusului**

Compus	44 ore	78 ore
	AUC glucoză (% Vehicul)	AUC glucoză (% Vehicul)
Compusul 1	42*	90
Compusul 2	39*	66*
Compusul 3	35*	76*
Compusul 4	41*	60*

% vehicul calculat ca $100 \times (\text{Valoare calculată pentru grupul/valoarea compusului calculat pentru grupul cu vehicul})$ * $p \leq 0,05$

Tratamentul cronic la șoarecii DIO

- 25 Efectele asupra ingerării alimentelor și greutateii/grăsimii corporale sunt evaluate la șoarecii DIO. Șoarecii DIO cu vârsta între cinci și șase luni (C57BL/6) de la Taconic Biosciences sunt utilizați în acest studiu. Animalele sunt găzduite individual într-o incintă cu temperatură-controlată (24°C) cu un ciclu de 12 ore lumină/întuneric (lumina de la 6:00), și acces liber la alimente și apă. Șoarecii sunt aclimatizați cu incinta timp de două săptămâni. În ziua de dinainte să înceapă studiul, masa de grăsime este măsurată prin rezonanță magnetică nucleară (RMN)
- 30 utilizând un instrument Echo Medical Sistem (Houston, TX). Șoarecii sunt randomizați la grupurile de tratament (N=7/grup) pe baza masei corporale și a masei de grăsime astfel că fiecare grup a avut o greutate corporală și o masă de grăsime medii de început similare. Vehiculul (40mM Tris-HCl, pH 8,0), compușii testați, sau un control pozitiv cu semaglutidă sunt administrați prin injecție subcutanată (SC) șoarecilor *ad libitum* între 8-10am la fiecare trei zile timp de 15 zile.
- 35 Injecțiile SC sunt făcute în zilele 1, 4, 7, 10, și 13. Greutatea corporală și ingerarea alimentelor sunt măsurate chiar înainte de fiecare injecție prin studiu. Procentajele de modificări în greutatea corporală sunt calculate după cum urmează:

$$100 \times \frac{\text{greutatea corporală finală a animalului} - \text{greutatea corporală inițială a animalului}}{\text{greutatea corporală inițială a animalului}}$$

La terminarea studiului, masa totală de grăsime este măsurată din nou prin RMN. Statisticile sunt analizate utilizând ANOVA cu comparație Dunnett prin JMP 6. Semnificativ este denumit la $p \leq 0,05$ vs. vehicul.

- În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, Compușii 1-4 reduc ingerarea alimentelor și greutatea/grăsimea corporală așa cum se arată în Tabelul 14 mai jos:
- Tabelul 14: % modificare greutate corporală și % modificare grăsime corporală la șoarecii DIO**

Compus	Doză (nmol/kg)	Greutate corporală (% modificare vs. vehicul din ziua 1)	Grăsime corporală (% modificare vs. vehicul din ziua 1)
Compusul 1	15	-19*	-49*
	30	-29*	-66*
Compusul 2	15	-19*	-43*
	30	-33*	-70*
Compusul 3	15	-17*	-32*
	30	-37*	-67*
Compusul 4	15	-15*	-26*
	30	-39*	-69*
Semaglutidă	30	-8	-20*
	60	-12*	-29*

* $p \leq 0,05$

Tratamentul acut la șoarecii DIO

- 10 Pentru a investiga căile metabolice implicate cu tratamentul compușilor din prezenta invenție independent de pierderea în greutate, compușii sunt testați pe șoarecii cu DIO acută (C57BL/6). Șoarecii utilizați sunt în vârstă de trei până la patru luni pe o dietă bogată în grăsime timp de cel puțin 4 săptămâni. Animalele sunt găzduite individual într-o incintă cu temperatură-controlată (24°C) cu un ciclu de 12 ore lumină/întuneric (lumină de la 6:00), și cu acces liber la
- 15 alimente și apă. Vehiculul sau compușii de testare au fost administrați șoarecilor prin injecție subcutanată la 16:00 în ziua de dinaintea studiului. Animalele au fost sacrificate 16 ore mai târziu pentru a colecta sange prin puncție cardiacă. Statisticile sunt analizate utilizând ANOVA cu comparație Dunnett prin JMP-6. Semnificativ este denumit la $p \leq 0,05$ vs vehicul.

- În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în test, Compușii 1-3 scad
- 20 colesterolul seros și nivelurile PCSK9 și cresc nivelurile FGF-21 așa cum se arată în Tabelul 15. În contrast, tratamentul cu semaglutidă nu scade colesterolul seros și nivelurile PCSK9 și crește nivelurile FGF-21. Ingerarea alimentelor a scăzut la un nivel similar în toate grupurile de tratament, ceea ce poate indica că modificările în colesterol, PCSK9 și FGF-21 sunt independente de ingerarea alimentelor.

25 Tabelul 15: Efecte acute asupra PCSK9, FGF-21 și nivelurilor de colesterol

Compus	Doză (nmol/kg)	PCSK9 (% vehicul)	FGF-21 (% vehicul)	Colesterol (% vehicul)
Compusul 1	30	14,6*	1770*	60,9*
Compusul 2	30	12,8*	465*	80,6*
Compusul 3	30	15,6*	1124*	55,6*
Semaglutidă	30	115,3	75	117,6

% vehicul calculat ca $100 \times$ (Valoare calculată pentru grupul/valoarea compusului calculat pentru grupul cu vehicul)* $p \leq 0,05$

Efecte asupra consumului energetic la șoarecii DIO

- Șoarecii DIO masculi cu vârsta între șapte și opt (C57BL/6) care cântăresc 45-50g sunt utilizați în acest studiu pentru a evalua efectul compușilor din prezenta invenție asupra metabolismului energetic. Animalele sunt găzduite individual într-o incintă cu temperatură-controlată (24°C) cu un ciclu de 12 ore lumină/întuneric (lumină la 22:00), și acces liber la
- 30 alimente (TD95217)(Teklad) și apă. După 2 săptămâni de aclimatizare cu incinta, șoarecii sunt randomizați la grupurile de tratament (N=6/grup) pe baza masei corporale astfel că fiecare grup are o greutate corporală medie de început similară. Animalele sunt plasate într-un calorimetru
- 35 FenoMaster/LabMaster (TSE Sisteme, Chesterfield, MO) timp de 8 zile pentru aclimatizare. Vehiculul (40 mM Tris HCl tampon la pH 8,0, 10 ml/kg), articolul de test (15 nmol/kg) sau semaglutidă (60 nmol/kg) sunt administrate subcutanat șoarecilor DIO alimentați *ad libitum* cu 30-90 minute înainte de debutul ciclului de întuneric la fiecare trei zile timp de 15 zile.

Coeficientul de căldură și respirator (RER) este măsurat prin calorimetrie indirectă cum s-a descris utilizând un sistem calorimetric cu circuit deschis. RER este raportul dintre volumul de CO₂ produs (VCO₂) și volumul de O₂ consumat (VO₂). Căldura este calculată cu ajutorul greutății corporale considerate. Consumul energetic este de kcal/kg/3 zi și exprimat ca medie $\pm$ SEM a 6 șoareci pe grup. Semnificația statistică este evaluată prin ANOVA bifactorială urmată de testul de comparație multiplă Tukey.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, șoarecii tratați cu Compușii 1 și 2 și-au crescut rata lor metabolică începând din săptămâna 2 și au susținut efectul pe perioada de tratament așa cum se arată în Tabelul 16. Totuși, semaglutida nu a avut efect asupra ratei metabolice. Această creștere a ratei metabolice poate contribui la pierderea suplimentară în greutate observată cu administrarea compușilor 1 și 2 în comparație cu administrarea de semaglutidă.

Tabelul 16: Efectul tratamentului cronic cu Compusul 1, Compusul 2 sau semaglutidă asupra ratei metabolice la șoarecii DIO

Perioadă de tratament	Căldură cumulată (Kcal/kg cu ajutorul a mese/3 zi)			
	Vehicul	Semaglutidă	Compusul 1	Compusul 2
Ziua 1 până în ziua 4	2184 $\pm$ 27	1973 $\pm$ 51	1749 $\pm$ 136**	1746 $\pm$ 96**
Ziua 4 până în ziua 7	2154 $\pm$ 36	2018 $\pm$ 54	1822 $\pm$ 173	1778 $\pm$ 132*
Ziua 7 până în ziua 10	2239 $\pm$ 28	2151 $\pm$ 48	2349 $\pm$ 129	2549 $\pm$ 129**
Ziua 10 până în ziua 13	2207 $\pm$ 16	2138 $\pm$ 46	2351 $\pm$ 144	2568 $\pm$ 147*

* $p \leq 0,05$ vs. vehicul

** $p \leq 0,05$ vs. semaglutidă

SECVENȚE DE AMINOACIZI

SEQ ID NO: 1 (OXM umană)

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 (Secvență artificială)

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)

in care Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu (E) sau Ser (S);

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 prin (i) o legătură directă sau (ii) un agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat.

SEQ ID NO: 3 (Secvență artificială)

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)

in care Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 prin (i) o legătură directă sau (ii) un agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat.

SEQ ID NO: 4 (Secvență artificială)

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)

in care Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 prin (i) o legătură directă sau (ii) un agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat.

SEQ ID NO: 5 (Secvență artificială)

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)

in care Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat.

SEQ ID NO: 6 (Secvență artificială)

- 5 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-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDDEKKAKEFVEWLLGGPSSG)
in care Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat.

SEQ ID NO: 7 (Secvență artificială)

- 10 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
15 (HXaa2QGTFTSDYSKYLDDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)
in care Xaa2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat.

- 20 **SEQ ID NO: 8 (Secvență artificială)**

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
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)
in care Xaa2 este Aib;

- 25 Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat.

SEQ ID NO: 9 (Secvență artificială)

- 30 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
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)
in care Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu (E) sau Ser (S); și aminoacidul C-terminal este opțional amidat.

- 35 **SEQ ID NO: 10 (Secvență artificială)**

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
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDDEKKAKEFVEWLLGGPSSG)
in care Xaa2 este Aib; și

- 40 aminoacidul C-terminal este opțional amidat.

SEQ ID NO: 11 (Secvență artificială)

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
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

- 45 în care Xaa2 este Aib; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat.

LISTĂ DE SECVENȚE

- 50 <110> Eli Lilly și Company
<120> Glucagon și compuși co-agoniști GLP-1
<130> X-20637
<150> 62/182847
<151> 2015-06-22
<160> 11
55 <170> Versiune patentln 3.5
<210> 1
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapien
60 <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
5 <213> Secvență artificială
<220>
<223> Construcție sintetică
<220>
<221> MISC_CHARACTERISTICĂ
10 <222> (2)..(2)
<223> Xaa la poziția 2 este aminoacidul care nu apare natural acid 2-Aminoisobutiric
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
15 <223> Aib
<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei
20 laterale Lys cu un acid gras C14-C24 prin (i) o legătură directă sau (ii) un agent de legătură între
Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24
<220>
<221> MISC_CHARACTERISTICĂ
<222> (28)..(28)
25 <223> Xaa la poziția 28 este Glu sau Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (34)..(34)
<223> Gly la poziția 34 este opțional amidat
30 <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
35 <213> Secvență artificială
<220>
<223> Construcție sintetică
<220>
<221> MISC_CHARACTERISTICĂ
40 <222> (2)..(2)
<223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-Aminoisobutiric
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
45 <223> Aib
<220>
<221> MOD_RES

- <222> (20)..(20)
 <223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 prin (i) o legătură directă sau (ii) un agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24
- 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly la poziția 34 este opțional amidat
 <400> 3
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
- 10 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
- 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
- 20 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-Aminoisobutiric
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
- 25 <223> Aib
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 prin (i) o legătură directă (ii) un agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
- 30 <223> Gly la poziția 34 este opțional amidat
 <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
- 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-Aminoisobutiric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei
 laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(y-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly la poziția 34 este amidat
 <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

 15 Ser Gly
 <210> 6
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 20 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (2)..(2)
 25 <223> Xaa la poziție 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-Aminoisobutiric
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei
 laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(y-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly la poziția 34 este amidat
 <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

 40 Ser Gly
 <210> 7
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ

- <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-Aminoisobutiric
 <220>
 <221> MOD_RES
- 5 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
- 10 <223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(y-Glu)2-CO-(CH₂)₁₆CO₂H
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
- 15 <223> Gly la poziția 34 este amidat
 <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
- 20 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 <220>
- 25 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-aminoisobutiric
 <220>
 <221> MOD_RES
- 30 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
- 35 <223> Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(y-Glu)2-CO-(CH₂)₁₈CO₂H
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
- 40 <223> Gly la poziția 34 este amidat
 <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
- 45 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică

<220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un acid care nu apare natural acid 2-aminoisobutiric
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220>
 10 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa la poziția 28 este Glu sau Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (34)..(34)
 <223> Gly la poziția 34 este opțional amidat
 <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
 20 <210> 10
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Construcție sintetică
 25 <220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-aminoisobutiric
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (34)..(34)
 <223> Gly la poziția 34 este opțional amidat
 <400> 10
 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
 40 <210> 11
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 45 <223> Construcție sintetică
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERISTICĂ
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa la poziția 2 este un aminoacid care nu apare natural acid 2-aminoisobutiric

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Gly la poziția 34 este opțional amidat
 <400> 11
 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

 10 Ser Gly

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2011/094337
- WO-A1-2013/004983
- WO-A1-2013/074910
- WO-A2-2014/152460
- CA-A1- 2 852 177

(57) Revendicări:

1. Un compus of formula următoare:
 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
 în care
 Xaa2 este Aib;
 Xaa28 este Glu sau Ser;
 Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_n, în care t este 1 sau 2;
 și
 aminoacidul C-terminal este opțional amidat;
 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.
2. Un compus în conformitate cu revendicarea 1, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care Xaa28 este Glu.
3. Un compus în conformitate cu revendicarea 1, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care Xaa28 este Ser.
4. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-3, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care t este 1.
5. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-3, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care t este 2.
6. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-5, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care acidul gras C14-C24 este un monoacid saturat sau un diacid saturat.

7. Un compus în conformitate cu revendicarea 6, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care acidul gras este un monoacid saturat sau un diacid saturat selectat din grupul constând din acid miristic (acid tetradecanoic) (monoacid C14), acid tetradecanedioic (diacid C14), acid palmitic (acid hexadecanoic) (monoacid C16), acid hexadecanedioic (diacid C16), acid margarinic (acid heptadecanoic) (monoacid C17), acid heptadecanedioic (diacid C17), acid stearic (acid octadecanoic) (monoacid C18), acid octadecanedioic (diacid C18), acid nonadecilic (acid nonadecanoic) (monoacid C19), acid nonadecanedioic (diacid C19), acid aradic (acid eicosanoic) (monoacid C20), acid eicosanedioic (diacid C20), acid heneicosilic (acid heneicosanoic) (monoacid C21), acid heneicosanedioic (diacid C21), acid behenic (acid docosanoic) (C22), acid docosanedioic (diacid C22), acid lignoceric (acid tetracosanoic) (monoacid C24) și acid tetracosanedioic (diacid C24).

8. Un compus în conformitate cu revendicarea 6 sau 7, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care acidul gras C14-C24 este acid octadecanedioic.

9. Un compus în conformitate cu revendicarea 6 sau 7, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care acidul gras C14-C24 este acid eicosanedioic.

10. Un compus în conformitate cu orice revendicare precedentă, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care aminoacidul C-terminal este amidat.

11. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-8 și 10, în care compusul este cu formula următoare:

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

în care Xaa 2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; și

aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 5),

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

12. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-8 și 10, în care compusul este cu formula următoare:

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

în care Xaa 2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; și

aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 7);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

13. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-7 și 9-10, în care compusul este cu formula următoare:

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

în care Xaa 2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; și

aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 6);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

14. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-7 și 9-10, în care compusul este cu formula următoare:

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

în care Xaa 2 este Aib;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈CO₂H; și

aminoacidul C-terminal este amidat (SEQ ID NO: 8);

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

15. O compoziție farmaceutică cuprinzând un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 14, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, și un purtător acceptabil farmaceutic, diluant, sau excipient.

16. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 14, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în terapie.

17. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 14, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în tratamentul diabetului de tip 2.

18. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 14, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în tratamentul obezității.

19. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 14, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în tratamentul bolii nonalcoolice a ficatului gras (NAFLD).

20. Un compus în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 până la 14, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în tratamentul steatohepatitei nonalcoolice (NASH).

21. Un compus intermediar cu formula următoare:

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

în care

Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu sau Ser; și

aminoacidul C-terminal este opțional amidat (SEQ ID NO: 9),

sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

22. Un compus intermediar în conformitate cu revendicarea 21, în care Xaa28 este Glu.

23. Un compus intermediar în conformitate cu revendicarea 21, în care Xaa28 este Ser.

24. Un procedeu pentru fabricarea unui compus cu formula următoare:

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 în care

Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu sau Ser;

Lys la poziția 20 este modificat chimic prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură între

Lys la poziția 20 și acidul gras C14-C24, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_t, în care t este 1 sau 2; și

aminoacidul C-terminal este opțional amidat, procedeul menționat cuprinzând etapa de:

(i) modificare a unui compus intermediar cu formula următoare:

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 în care

Xaa2 este Aib;

Xaa28 este Glu sau Ser; și

aminoacidul C-terminal este opțional amidat (SEQ ID NO: 9) prin conjugarea grupării epsilon-amino a catenei laterale Lys la poziția 20 a compusului intermediar cu un acid gras C14-C24 *printr-un* agent de legătură, în care agentul de legătură este ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ-Glu)_t, în care t este 1 sau 2.