



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128210** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 9/00

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2020 06178</p> <p>(22) Дата подання заявки: 05.04.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 09.05.2024</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 201821013109, 201821040468, 201821040474</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 05.04.2018, 26.10.2018, 26.10.2018</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: IN, IN, IN</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 13.01.2021, Бюл.№ 2</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 08.05.2024, Бюл.№ 19</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/IB2019/052835, 05.04.2019</p>	<p>(72) Винахідник(и): Тхеннаті Раджаманнар (IN), Чатурведі Нішітх (IN), Бураде Вінод Сампатрао (IN), Шахі Прадіп Дінеш (IN), Натараджан Мутхукумаран (IN), Нагараджа Равішанкара Мадаваті (IN), Залавадія Рішіт Мансухлал (IN), Пандья Кунал (IN), Пател Бріджешкумар (IN), Джоші Дхірен Рамешчандра (IN), Соні Крунал Харішбхай (IN), Тіварі Абхішек (IN), Пател Віпулкумар Шанкарбхай (IN)</p> <p>(73) Володілець (володільці): САН ФАРМАСЬЮТИКАЛ ІНДАСТРІЗ ЛІМІТЕД, Sun House, Plot No. 201 B/1, Western Express Highway, Goregaon (E), Mumbai, Maharashtra 400 063, India (IN)</p> <p>(74) Представник: Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2006/097537 A2, 21.09.2006 WO 2006/097538 A1, 21.09.2006 BIKASH MANANDHAR et. al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs: recent advances, new possibilities, and therapeutic implications. Journal of medicinal chemistry. US, 12.02.2015. Vol. 58. No. 3. PP. 1020 - 1037. URL:http://doi.org/10.1021/jm500810s</p>
---	---

(54) АНАЛОГ GLP-1

(57) Реферат:

Винахід стосується нових аналогів глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1) (7-37), що мають амінокислотну послідовність із Leu або Ile на С-кінці. Нові аналоги є високоактивними агоністами GLP-1 зі зниженою кількістю небажаних ефектів і збільшеною тривалістю дії. Даний винахід також стосується ацильованих похідних нових аналогів, які характеризуються додатково збільшеною активністю і тривалістю дії і придатні для перорального введення.

UA 128210 C2

UA 128210 C2

Аналоги за даним винаходом можуть знайти застосування у лікуванні діабету та ожиріння.

СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет на основі трьох попередніх заявок на патент Індії під номерами заявок IN 201821013109 (подана 05 квітня 2018 року); IN 201821040468 (подана 26 жовтня 2018 року) і IN 201821040474 (подана 26 жовтня 2018 року), які включені у даний документ за допомогою посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується нових аналогів глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1) (7-38), що мають амінокислотну послідовність із Leu або Ile на С-кінці. Нові аналоги є високоактивними агоністами GLP-1 зі зниженою кількістю небажаних ефектів і збільшеною тривалістю дії. Даний винахід також стосується ацильованих похідних нових аналогів, які характеризуються додатково збільшеною активністю і тривалістю дії і придатні для перорального введення. Аналоги, розкриті у даному документі, ацильовані за допомогою пролонгувальних фрагментів, які збільшують тривалість активності сполук. Аналоги, розкриті у даному документі, можуть знайти застосування у лікуванні діабету й ожиріння.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) являє собою гормон, який виробляється здебільшого ентероендокринними L-клітинами кишечника і секретується у кровоток, коли їжа, що містить жир, гідролізат білка і/або глюкозу, потрапляє у дванадцятипалу кишку. GLP-1 утворюється у результаті клітинспецифічного посттрансляційного процесингу гена препроглюкагону. Спочатку як результат даного процесингу ідентифікували пептид GLP-1(1—37), але були наявні два усічених на N-кінці продукти, GLP-1(7—37) (SEQ ID NO: 1) і GLP-1(7—36)амід, які, як було виявлено, розпізнаються рецептором підшлункової залози і які, як було встановлено, є активними формами *in vivo*. Було виявлено, що GLP-1 стимулює секрецію інсуліну, спричиняючи таким чином захоплення глюкози клітинами і знижуючи рівні глюкози у сироватці крові. Агоністи GLP-1 можна застосовувати для лікування цукрового діабету 2 типу (T2DM) як переважні лікарські засоби, оскільки вони не призводять до гіпоглікемії і здійснюють позитивний вплив із погляду зниження ваги. Ендогенні речовини, GLP-1(7—37) і GLP-1(7—36)амід, розщеплюються пептидазами і, таким чином, характеризуються дуже коротким періодом напіввиведення. Були здійснені спроби поліпшити їхні характеристики шляхом розробки аналогів GLP-1 зі збільшеним періодом напіввиведення. Першим лікарським засобом, схваленим у 2005 році, був ексенатид, що передбачає введення дози на рівні 10 мкг двічі на день, який, як було виявлено, демонстрував значне поліпшення показника HbA1c, маркера контролю глюкози. Крім того, Novo Nordisk розробила ліраглутид (патент США № 6268343) (SEQ ID NO: 2), що передбачає введення дози 1,8 мг один раз на день, *s.c./день*, і був схвалений у 2010 році. Завдяки подальшим дослідженням і розробкам було створено продукти для введення раз на тиждень, такі як албіглутид, розроблений GSK, і дулаглутид, розроблений Eli Lilly. Останнім часом USFDA схвалила аналог GLP-1, семаглутид (публікація міжнародної заявки № WO 2006/097537 A2). Семаглутид (SEQ ID NO: 3) реалізується під торговою маркою Ozempic®. Його вводять у вигляді підшкірної ін'єкції один раз на тиждень.

У літературі повідомляється про багато спроб створення аналогів GLP-1, які характеризуються збільшеною активністю і тривалістю дії. У патенті США № 7291594 B2 (патент US "594) розкриті похідні GLP-1 (7-35), до С-кінця яких додані декілька залишків аргініну та/або лізину для забезпечення високої біодоступності через слизові оболонки. У патенті US "594 додатково розкрито, що цим похідним можна надати стійкості до дипептидилпептидази IV (DPP-IV) шляхом заміни амінокислоти 8 у їхній амінокислотній послідовності GLP-1 на Ser або стійкості до трипсину шляхом заміни амінокислот 26 і 34 на Gln і Asn відповідно.

У патенті США № 7893017 B2 (патент US "017) розкритий ацильований аналог GLP-1, де аналог GLP-1 стабілізований щодо дії DPP-IV шляхом модифікації щонайменше одного амінокислотного залишку в положеннях 7 і 8 порівняно з послідовністю GLP-1 (7—37), і де вказане ацилювання являє собою двохосновну кислоту, приєднану безпосередньо до С-кінцевого амінокислотного залишку вказаного аналога GLP-1.

У патенті США № 8951959 B2 (патент US "959) розкритий стійкий до DPP-IV аналог GLP-1 (7—37), який має непротеїногенний амінокислотний залишок, що містить трифторметильну групу, у положенні 8 порівняно з послідовністю GLP-1, і він є ацильованим за допомогою фрагмента, що містить дві кислотні групи, за залишком лізину в положенні 26.

У патенті США № 7084243 B2 (патент US "243) розкриті аналоги GLP-1 (7—37), які мають Val або Gly в положенні 8 порівняно з послідовністю GLP-1(7—37), як стійкі до DPP-IV пептиди.

У публікації міжнародної заявки № WO 2017/149070 A1 (WO "070) розкриті аналоги GLP-1, які мають триптофан у положенні, що відповідає положенню 8 у GLP-1 (7—37), і було показано, що дані сполуки з Trp8 дуже стабільні щодо розщеплення під дією DPP-IV.

У публікації міжнародної заявки № WO 2004/103390A2 (WO "390) розкрито, що модифікація за положенням P₁ (відповідає положенню 9 у випадку GLP-1 (7—37)) може давати аналоги GLP-1 зі значно зниженою чутливістю до опосередкованого ферментами (наприклад, DPP-IV) розщеплення порівняно з нативним субстратом, при цьому вони зберігають біологічну активність нативного субстрату. У WO "390 додатково розкриті аналоги GLP-1 (7—37), які мають амінокислоту з чотиризаміщеним атомом вуглецю C β (наприклад, трет-лейцин) у положенні 9, що забезпечує аналоги GLP, стійкі до руйнування під дією DPP-IV.

У публікації міжнародної заявки № WO 2015/086686 A2 (публікація WO "686) розкрито, що включення альфа-метил-функціоналізованих амінокислот безпосередньо в основний ланцюг аналогів GLP-1, як було встановлено, дає пептиди, стійкі до протеаз (у тому числі стійкі до DPP-IV).

Різні інші агоністи GLP-1, стійкі до DPP-IV, розкриті в патентних публікаціях, таких як публікації міжнародних заявок №№ WO 2007/030519 A2, WO 2004/078777 A2, WO 2007/039140 A1, WO 2014/209886 A1, WO 2012/016419 A1, WO 2017/211922 A2, WO 2016/198544 A1 і WO 2013/051938 A2.

У різних заявках на патент розкриті подовжені на C-кінці аналоги GLP-1, які характеризуються підвищеною стабільністю і більшою тривалістю дії. Наприклад, патенти США №№ 7482321 B2, 9498534 B2 і 7897566 B2.

У різних заявках на патент розкриті ацильовані аналоги GLP-1, де аналоги GLP-1 приєднані до ліпофільного замісника, необов'язково через лінкер, для забезпечення більшої тривалості дії.

У патенті США № 8603972 B2 (US "972) розкриті моноацильовані похідні аналогів GLP-1, де залишок Lys у положенні 37 або 38 аналога GLP-1 є ацильованим.

У патентах США №№ 8648041 B2, 9758560 B2, 9006178 B2, 9266940 B2, 9708383 B2 і публікаціях заявок на патент США №№ US 2015/0152157 A1, US 2015/0133374 A1 розкриті діацильовані похідні аналогів GLP-1.

У публікації заявки на патент США № US 2016/0200791 A1 розкриті триацильовані похідні аналогів GLP-1.

У публікаціях міжнародних заявок №№ WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 і WO 2014/202727 A1 розкриті ацильовані аналоги GLP-1, де залишок Lys в аналогах GLP-1 приєднаний до двох пролонгувальних фрагментів за допомогою розгалужувального лінкера.

У публікаціях міжнародних заявок №№ WO 2009/030771 A1 і WO 2018/083335 A1 розкриті різні ацилювальні засоби (бічний ланцюг), які можна приєднувати до залишку Lys в аналогах GLP-1 для забезпечення більшої тривалості дії.

У публікації міжнародної заявки № WO 2013/186240 A2 розкриті аналоги пептиду ексендину-4, які мають Gly, Ser або функціоналізований Ser, наприклад, Ser(OCH₃), D-Ser або функціоналізований D-Ser, наприклад, D-Ser(OCH₃), Aib, Ala або D-Ala у положенні 2 амінокислотної послідовності ексендину-4.

Різні інші аналоги GLP-1 розкриті у патентних заявках, таких як публікації міжнародних заявок №№ WO 2005/027978 A2, WO 1998/008871 A1, WO 1999/043705 A1, WO 1999/043706 A1, WO 1999/043707 A1, WO 1999/043708 A1, WO 2000/034331 A2, WO 2009/030771 A1, WO 2011/080103 A1, WO 2012/140117 A1, WO 2012/062803 A1, WO 2012/062804 A1, WO 2013/037690 A1, WO 2014/202727 A1, WO 2015/000942 A1, WO 2015/022400 A1, WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 і WO 2017/149070 A1.

Однак існує потреба у розробці аналогів GLP-1, які характеризуються оптимальними потрібними властивостями з погляду стабільності і тривалості дії.

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

В одному аспекті даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X₂-X₃-X₄-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X₁₆-G-Q-A-A-X₂₁-E-F-X₂₄-A-W-L-V-R-G-R-G-X₃₃-X₃₄,

де X₂ являє собою Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala або Aib;

X₃ відсутня або являє собою Gln;

X₄ являє собою Glu;

X₁₆ являє собою Glu;

X₂₄ являє собою Ile;

X₃₃ являє собою Leu, D-Leu, D-Ile або Ile;

X₃₄ відсутня, і

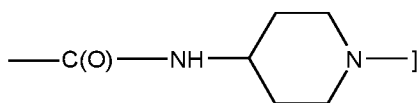
X₂₁ являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

U відсутня або являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$, де } являє собою місце приєднання групи W;

W відсутня або вибрана з групи, яка складається з $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-$ і



, де] являє собою місце приєднання групи Y;

Y являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ або $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число від 14 до 20.

10 Поліпептиди за даним винаходом є активними агоністами GLP-1 із меншою кількістю небажаних ефектів. Окрім того, поліпептиди за даним винаходом є стабільними і характеризуються великою тривалістю дії, а також придатні для перорального введення.

ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

15 На фігурі 1A показано одержання фрагмента A-OSu (проміжна сполука 3). На фігурі 1B показано одержання фрагмента A-OSu (проміжна сполука 3).

На фігурі 2 показано одержання фрагмента C-OSu.

На фігурі 3 показано одержання фрагмента D-OSu.

На фігурі 4 показано одержання фрагмента E-OSu.

На фігурі 5 показано одержання фрагмента F-OSu.

20 На фігурах 6A і 6B показані результати перорального тесту на толерантність до глюкози (OGTT) для сполуки 1 на щурах; однократна ін'єкція; 1 мг/кг; AUC 0—120 хв. глюкози (фігура 6A = через 22 години, фігура 6B = через 46 годин).

На фігурі 7 показано зниження рівнів глюкози у крові у мишей db/db із діабетом 2 типу після тривалої обробки сполукою 1.

25 На фігурі 8 показано зниження споживання їжі у мишей db/db після обробки сполукою 1.

На фігурі 9 показана ефективність сполуки 1 у мишей db/db у зниженні маси тіла.

На фігурі 10 показано зниження вмісту Hb1Ac у мишей db/db після обробки сполукою 1.

СКРОЧЕННЯ

Aib: 2-аміноізомасляна кислота

30 ADO: 8-аміно-3,6-діоксооктанова кислота

OGTT: пероральний тест на толерантність до глюкози

DIPEA: N, N'-діізопропілетиламін

HOBT: 1-гідроксibenзотриазол

DIPC: N, N'-діізопропілкарбодіїмід

35 HOSu: N-гідроксисукцинімід

IBCF: ізобутилхлорформіат

NMM: N-метилморфолін

THF: тетрагідрофуран

DCM: дихлорметан

40 DMAP: 4-диметиламінопіридин

DCC: дициклогексилкарбодіїмід

DMAc: диметилацетамід

ОПИС ВИНАХОДУ

45 У даному винаході передбачений стабільний аналог GLP-1 тривалої дії, який не потребує частого підшкірного введення дози, а також придатний для перорального введення. Неочікувано було виявлено, що додавання додаткового Leu на C-кінці послідовності давало пептиди зі значно збільшеною активністю і тривалістю дії порівняно з вихідним пептидом. Пептиди з додатковим Ile також показували аналогічний ефект збільшення активності і тривалості дії порівняно з вихідним пептидом. Додатково в даному винаході у даному документі показані фрагменти, які можна приєднувати до пептидів, що є аналогами GLP-1(7—37), за допомогою реакції ацилювання для одержання сполук зі значно збільшеною активністю і більшою тривалістю дії. Пролонгувальні фрагменти розкритих сполук мають більш стабільні зв'язки, які менше піддаються розщепленню під дією біологічних ферментів. Таким чином, розкриті у даному документі сполуки є більш стабільними і потребують менш частого введення, що сприяє дотриманню пацієнтом режиму лікування. Відповідно, у деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

(SEQ ID NO: 4),

де X2 являє собою Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala або Aib;

X3 відсутня або являє собою Gln;

X4 являє собою Glu;

5 X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu, D-Leu, D-Ile або Ile;

X34 відсутня, і

X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована.

10 У деяких варіантах здійснення X21 можна ацилювати за допомогою пролонгувальних фрагментів, про які повідомляється у патентах США №№ 6268343, 8951959 B2, 8603972 B2, 8648041 B2, 9758560 B2, 9006178 B2, 9266940 B2, 9708383 B2 і публікаціях заявок на патент США №№ US 2015/0152157 A1 і US 2015/0133374 A1; публікаціях міжнародних заявок №№ WO 2009/030771 A1, WO 2006/097537 A2 і WO 2018/083335 A1.

15 У деяких варіантах здійснення X21, що являє собою Lys, ацильована за аміногрупою (ϵ -аміногрупою) її бічного ланцюга за допомогою фрагмента, що містить групу жирної кислоти. Група жирної кислоти може бути приєднана до X21, що являє собою Lys, за допомогою лінкера. Відповідно, у деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

20 H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

де X2 являє собою Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala або Aib;

X3 відсутня або являє собою Gln;

X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

25 X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu, D-Leu, D-Ile або Ile;

X34 відсутня, і

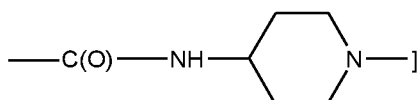
X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

30 {-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

У відсутня або являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, де } являє собою місце приєднання групи W;

35 W відсутня або вибрана з групи, яка складається з $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$, $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$ і



, де] являє собою місце приєднання групи Y;

Y являє собою $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

40 Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$ або $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, де n являє собою ціле число від 14 до 20.

У деяких варіантах здійснення амінокислота у положенні X2 вибрана з Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala або Aib.

У деяких варіантах здійснення X2 являє собою Aib.

У деяких варіантах здійснення X3 відсутня.

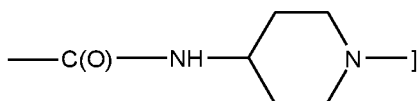
45 У деяких варіантах здійснення X33 являє собою Leu.

У деяких варіантах здійснення X33 являє собою Ile.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

50 де W вибрана з групи, яка складається з $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$, $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$ і



У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де обидві U і W відсутні, а Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, де n являє собою ціле число 14.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

5 де W являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$].

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$].

10 У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH-$].

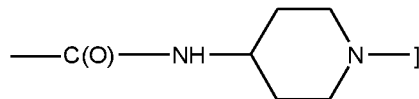
15 У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_3-NH-$].

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

20 {-Q-T-U-W-Y-Z,



де W являє собою

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

25 де Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, де n являє собою ціле число 14.

30 У деяких варіантах здійснення X2 являє собою Ala або Aib;

X3 відсутня;

X33 являє собою Leu;

U відсутня;

W відсутня;

35 Y являє собою $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, де n являє собою ціле число 14.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

40 де X2 являє собою Aib;

X3 відсутня;

X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

45 X33 являє собою Leu;

X34 відсутня, і

X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

50 де Q і T відсутні;

U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$ }, де } являє собою місце приєднання групи W;

W являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$], де] являє собою місце приєднання групи Y;

55 Y являє собою $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить

амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,
де X2 являє собою Aib;

X3 відсутня;

5 X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu;

X34 відсутня, і

10 X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

15 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, де } являє собою місце приєднання групи W;

W являє собою $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$, де] являє собою місце приєднання групи Y;

Y являє собою $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

20 У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,
де X2 являє собою Aib;

X3 відсутня;

25 X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu;

X34 відсутня, і

30 X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

35 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, де } являє собою місце приєднання групи W;

W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$, де] являє собою місце приєднання групи Y;

Y являє собою $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

40 У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH-$.

45 У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_3-NH-$.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,
де X2 являє собою Aib;

50 X3 відсутня;

X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu;

55 X34 відсутня, і

X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

60 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, де } являє собою місце приєднання

групи W;

W являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-$, де] являє собою місце приєднання групи Y;

Y являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z;

Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ або $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число від 14 до 20.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, де n являє собою ціле число 16.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число 14.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

де X2 являє собою Aib;

X3 відсутня;

X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu;

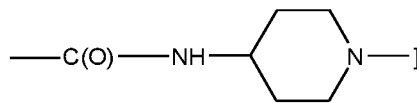
X34 відсутня, і

X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

U являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$, де } являє собою місце приєднання групи W;



W являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-$, де] являє собою місце приєднання групи

Y;

Y являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z; і

Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, де n являє собою ціле число 16.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачений поліпептид, що містить амінокислотну послідовність:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

де X2 являє собою Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe);

X3 відсутня;

X4 являє собою Glu;

X16 являє собою Glu;

X24 являє собою Ile;

X33 являє собою Leu;

X34 відсутня, і

X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де Q і T відсутні;

U являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$, де } являє собою місце приєднання групи W;

W являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-$, де] являє собою місце приєднання групи Y;

Y являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, де -- являє собою місце приєднання групи Z; і

Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ або $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число від 14 до 20.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_{3,4}-NH-$.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

5 де W являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$.

У деяких варіантах здійснення X21 являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

де W являє собою $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$.

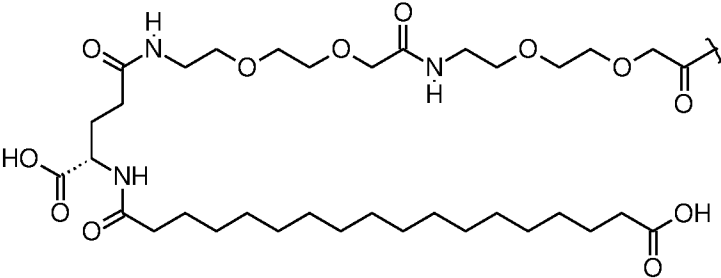
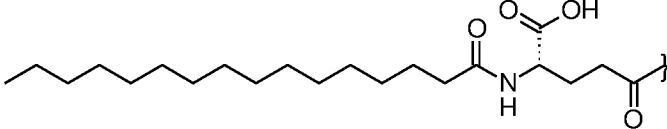
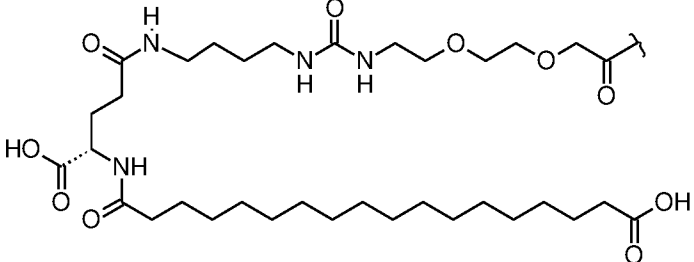
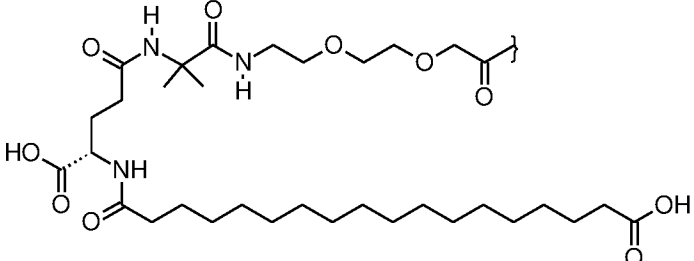
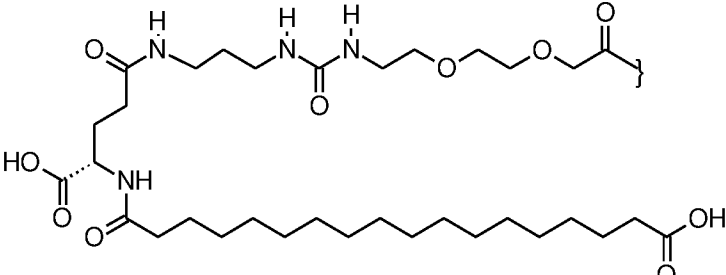
10 У деяких варіантах здійснення X21 являє собою модифікований ліпідом Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента,

{-Q-T-U-W-Y-Z,

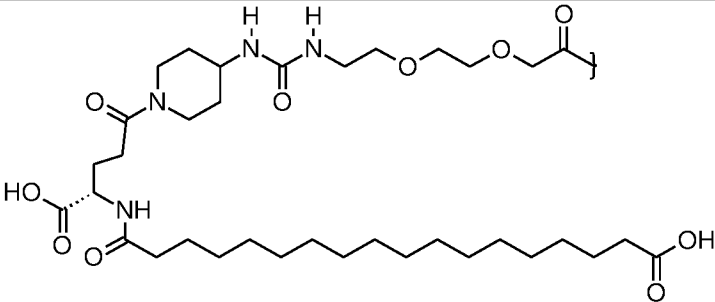
який представлений фрагментами, представленими у таблиці 1.

Таблиця 1

Типові фрагменти для групи {-Q-T-U-W-Y-Z

Позначення	Фрагмент
Фрагмент А	
Фрагмент В	
Фрагмент С	
Фрагмент D	
Фрагмент Е	

Таблиця 1 (продовження)

Позначення	Фрагмент
Фрагмент F	

В іншому варіанті здійснення даного винаходу передбачений поліпептид за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, який вибраний із пептидів, представлених у таблиці 2.

5

Таблиця 2

Типові поліпептидні сполуки за даним винаходом

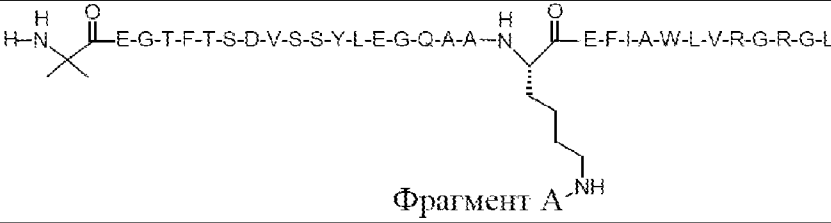
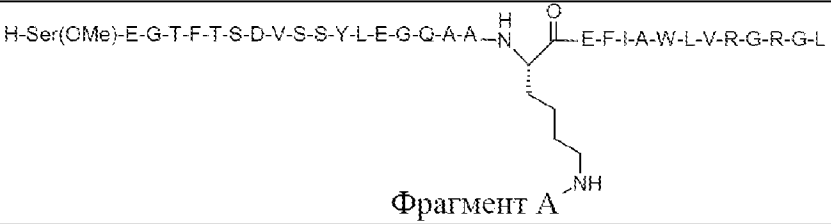
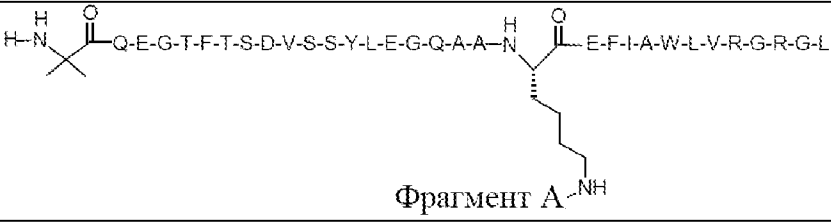
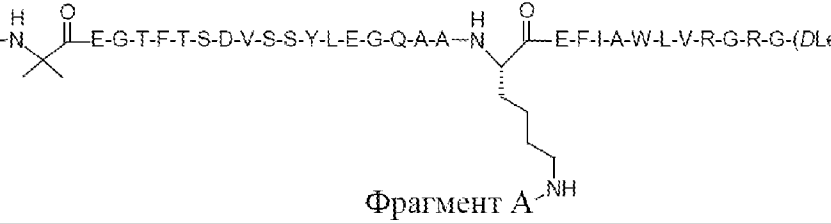
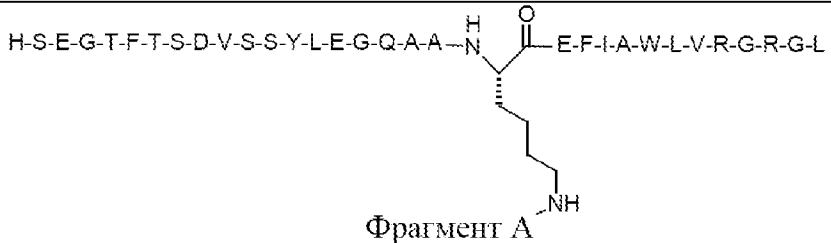
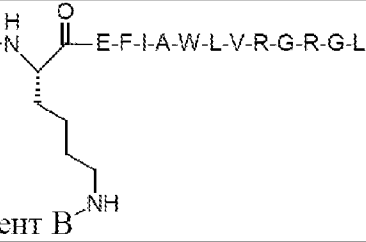
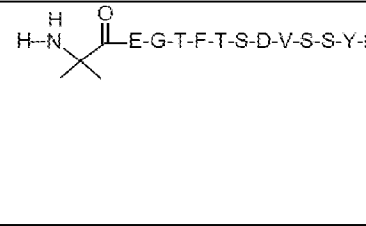
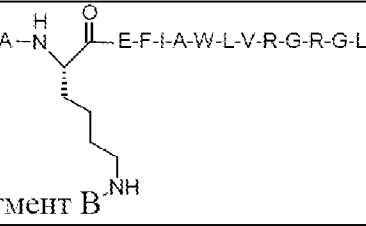
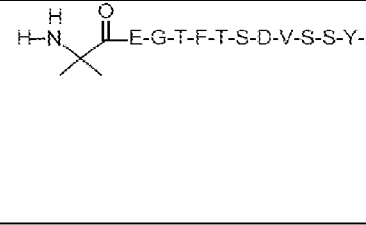
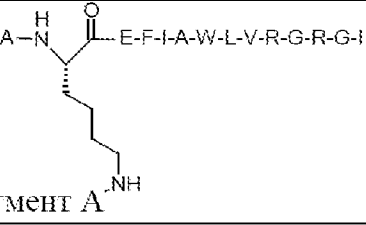
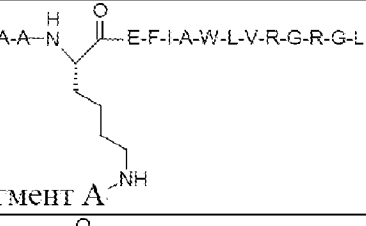
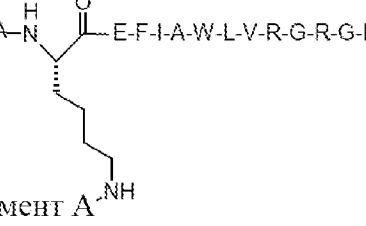
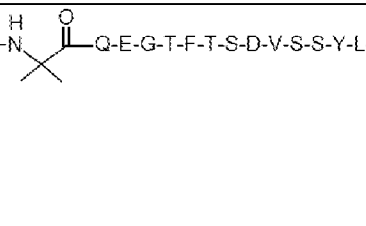
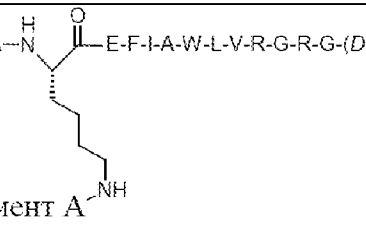
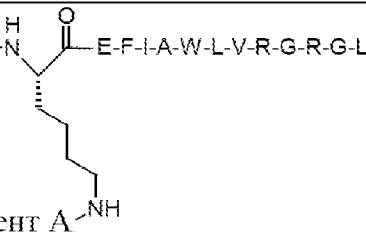
Спол. №	Структура*	Seq ID
1	 <p>Фрагмент A</p>	SEQ ID NO: 05
2	<p>H-Ser(CMe)-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N</p>  <p>Фрагмент A</p>	SEQ ID NO: 06
3	 <p>Фрагмент A</p>	SEQ ID NO: 07
4	 <p>Фрагмент A</p>	SEQ ID NO: 08
5	 <p>Фрагмент A</p>	SEQ ID NO: 09

Таблица 2 (продовження)

Спол. №	Структура*	Seq ID
6	<p>H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p> <p>Фрагмент В</p>	SEQ ID NO: 10
7	<p> E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p> <p>Фрагмент В</p>	SEQ ID NO: 05
8	<p> E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-I</p> <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 11
9	<p>H-(D<i>Ser</i>(OMe))-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p> <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 12
10	<p>H-(D<i>Ser</i>)-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p> <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 13
11	<p> Q-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-(D<i>Leu</i>)</p> <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 14
12	<p>H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N^H  E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p> <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 10

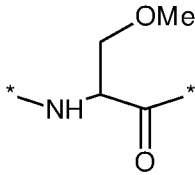
Таблиця 2 (продовження)

Спол. №	Структура*	Seq ID
13	<p>Фрагмент C</p>	SEQ ID NO: 05
14	<p>Фрагмент C</p>	SEQ ID NO: 09
15	<p>Фрагмент C</p>	SEQ ID NO: 11
16	<p>Фрагмент D</p>	SEQ ID NO: 05
17	<p>Фрагмент E</p>	SEQ ID NO: 05
18	<p>Фрагмент F</p>	SEQ ID NO: 05

*Якщо не вказано інше, всі амінокислоти у структурах мають L-конфігурацію в α -положенні. D у разі використання як префікса амінокислоти у послідовності означає D-конфігурацію амінокислоти. Наприклад, (DSer) означає, що амінокислота серин у послідовності має D-конфігурацію.

Якщо не вказано інше, даний винахід охоплює як L-, так і D-ізомери амінокислот у послідовностях.

5 Ser(OMe), як описано у даному документі, у даному винаході являє собою амінокислоту серин із метильованою гідроксильною групою і має наступну структуру



У поліпептидних послідовностях, згаданих у даному винаході, амінокислоти представлені
однобуквеним кодом, схваленим IUPAC.

5 Q, T, U, W, Y і Z, застосовувані у даному документі для позначення ацилювального
фрагмента у варіантах здійснення даного винаходу, відрізняються від однобуквеного коду
амінокислоти, застосовуваного під час визначення поліпептидної послідовності.

Поліпептиди за даним винаходом неочікувано показали значне зниження рівня глюкози у
крові під час проведення перорального тесту на толерантність до глюкози (OGTT) у щурів SD.
10 Відсоткове зниження рівня глюкози у крові у щурів SD під час перорального введення проби
глюкози виявилось значно більшим, ніж у відповідних поліпептидів, у яких відсутній додатковий
Leu або Ile у положенні X33.

Даний винахід докладно проілюстровано далі з посиланням на наступні приклади. Бажано,
щоб приклад у всіх розуміннях розглядався як ілюстративний, і вони не передбачають
15 обмеження обсягу заявленого винаходу.

ПРИКЛАДИ

Загальні способи одержання

Поліпептидну сполуку за даним винаходом можна одержувати за допомогою способів,
описаних у даному документі нижче. Процес включає два етапи, що включають одержання
20 вихідного лінійного пептиду і наступне приєднання жирнокислотного ланцюга до вихідного
пептиду.

Пептиди, описані у даному документі, можна одержувати за допомогою хімічного синтезу із
застосуванням твердофазних методик, таких як описані у G. Barany and R. B. Merrifield,
"The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology"; Volume 2 -«Special Methods in Peptide Synthesis, Part
A", pp. 3—284, E. Gross and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, New York, 1980; і в J. M. Stewart
and J. D. Young, "Solid-Phase Peptide Synthesis", 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984.
25 Потрібна стратегія основана на застосуванні Fmoc (9-флуоренілметилоксикарбонільної) групи
для тимчасового захисту α -аміногрупи у комбінації із захисними групами, такими як трет-
бутильна (-tBu), трет-бутилоксикарбонільна (-Boc), тритильна (-Trt) групи, для тимчасового
захисту бічних ланцюгів амінокислот (див., наприклад, E. Atherton and R. C. Sheppard,
"The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", у "The Peptides: Analysis, Synthesis,
Biology"; Volume 9-«Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1-38, S. Udenfriend and
J. Meienhofer, Eds., Academic Press, San Diego, 1987).

Пептиди можна синтезувати поетапно на нерозчинній полімерній підкладці (також називаній
35 "смолою"), починаючи з C-кінця пептиду. Синтез починається з приєднання C-кінцевої
амінокислоти пептиду до смоли за допомогою утворення амідного або естерного зв'язку. Це
забезпечує можливість кінцевого вивільнення одержаного пептиду з амідом або карбоною
кислотою на C-кінці відповідно.

Потрібно, щоб C-кінцева амінокислота і всі інші амінокислоти, застосовувані у синтезі, мали
40 різний захист своїх α -аміногруп і функціональних груп бічних ланцюгів (якщо вони наявні), щоб
захисну групу α -аміногрупи можна було селективно видалити під час синтезу. Зв'язування
амінокислоти здійснюють шляхом активації її карбоксильної групи у вигляді активного естеру і її
реакції з деблокованою α -аміногрупою N-кінцевої амінокислоти, приєднаної до смоли.
Послідовність зняття захисту і зв'язування α -аміногрупи повторюють доти, доки не збереться
45 вся пептидна послідовність. Потім пептид звільняють від смоли з одночасним зняттям захисту з
функціональних груп бічних ланцюгів, зазвичай у присутності відповідних акцепторів для
обмеження побічних реакцій. Одержаний пептид остаточно очищують за допомогою зворотно-
фазової HPLC.

Потім вихідний пептид можна зв'язати з жирнокислотним ланцюгом шляхом зв'язування
50 активованого жирнокислотного ланцюга з вихідним пептидом. Жирнокислотний ланцюг можна
одержувати за допомогою способів, добре відомих в органічній хімії. Наприклад,
жирнокислотний ланцюг можна одержувати із застосуванням способів твердофазного синтезу,
які дозволяють одержувати лінійні жирнокислотні ланцюги.

Синтезовані лінійні пептиди очищали за допомогою процедури препаративної HPLC, як
55 стисло описано нижче.

Препаративна HPLC: модуль із четверним градієнтом WATERS 2555 (максимальний загальний потік: 300 мл/хв., максимальний тиск: 3000 фунтів на квадратний дюйм) або Shimadzu LC-8A (максимальний загальний потік: 150 мл; максимальний тиск: 20 МПа);
Колонка: C18, 10 мкм;

5 Потік: 75 мл/хв.;

Рухома фаза: для першого очищення:

рухома фаза А: фосфатний буфер, рН 7,5;

рухома фаза В: ацетонітрил;

градієнт: від 10 до 40 % рухомої фази В за 300 хв.;

10 для другого очищення:

рухома фаза А: 1 % оцтової кислоти у воді;

рухома фаза В: 1 % оцтової кислоти в ацетонітрилі:н-пропанолі (50:50);

градієнт: від 15 до 45 % рухомої фази В за 300 хв.

15 Кінцеві сполуки за даним винаходом очищали за допомогою процедури препаративної HPLC, як стисло описано нижче.

Препаративна HPLC: модуль із четверним градієнтом WATERS 2555 (максимальний загальний потік: 300 мл/хв., максимальний тиск: 3000 фунтів на квадратний дюйм) або Shimadzu LC-8A (максимальний загальний потік: 150 мл, максимальний тиск: 20 МПа);
Колонка: C18, 10 мкм;

20 Потік: 75 мл/хв.;

Рухома фаза:

	Для першого очищення	Для другого очищення
Рухома фаза А	фосфатний буфер, рН 7,5	1 % оцтової кислоти у воді;
Рухома фаза В	ацетонітрил;	1 % оцтової кислоти в ацетонітрилі: н-пропанолі (50:50);
Градiєнт	від 10 до 40 % рухомої фази В за 300 хв.	від 15 до 45 % рухомої фази В за 300 хв.

25 Чистоту сполук за даним винаходом аналізували за допомогою методу RP-HPLC, як стисло описано нижче.

HPLC спосіб В1:

Колонка: YMC Pack-Ph (4,6 мм X 150 мм, 3 мкм);

Елюент: рухома фаза А: 0,1 % трифтороцтової кислоти у воді;

рухома фаза В: 0,1 % трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі;

30 Швидкість потоку: 1,5 мл/хв.;

Детектування: УФ-детектування за 210 нм;

Температура колонки: 50 °С;

Час виконання аналізу: 50 хв.;

35 Градієнт

Час	Рухома фаза А, %	Рухома фаза В, %
0,01	90	10
35,0	20	80
40,0	20	80
41,0	90	10
50,0	90	10

HPLC спосіб В2:

Колонка: YMC-Pack Pro C18 (4 мм x 250 мм, 3 мкм);

Елюент: рухома фаза А: буфер: ацетонітрил (900:100);

40 рухома фаза В: буфер: ацетонітрил (300:700);

буфер: дигідроортофосфат калію у воді, рН доведений до 3,0±0,1 ортофосфорною кислотою;

Швидкість потоку: 1,0 мл/хв.;

Детектування: УФ-детектування за 210 нм;

45 Температура колонки: 50 °С;

Температура лотка для зразків: 8 °С;

Час виконання аналізу: 38 хв.

Час	Рухома фаза А, %	Рухома фаза В, %
0	100	0
5	100	0
30	0	100
32	0	100
32.1	100	0
38	100	0

HPLC спосіб В3:

Колонка: Waters X-Select CSH-C18 (150 мм X 4,6 мм; 2,5 мкм);

5 Елюент: рухома фаза А: буфер: ацетонітрил (900:100);

рухома фаза В: буфер: ацетонітрил (300:700);

буфер: дигідроортофосфат калію у воді, рН доведений до 1,5±0,1 ортофосфорною кислотою;

Швидкість потоку: 0,9 мл/хв.;

10 Детектування: УФ-детектування за 210 нм;

Температура колонки: 40 °С;

Температура лотка для зразків: 5 °С;

Час виконання аналізу: 100 хв.

Час	Рухома фаза А	Рухома фаза В
0	50	50
40	43	57
55	43	57
90	0	100
91	50	50
100	50	50

15

Сполуки за даним винаходом аналізували за допомогою LCMS, як стисло описано нижче.

Мас-спектри реєстрували за допомогою LCMS із застосуванням Waters Acquity® QDa®, Waters Micromass Quattro Micro API або Thermo scientific LCQ Fleet™. Тестований розчин одержували шляхом розчинення відповідної кількості аналіту в розчиннику з одержанням кінцевої концентрації від 1 мкг/мл до 50 мкг/мл залежно від іонізації аналіту. Тестований розчин вводили зі швидкістю, що становить від приблизно 10 мкл до 50 мкл на хвилину, у LCMS протягом 1 хв. і мас-спектри реєстрували у позитивному або негативному режимі іонізації електророзпиленням (ESI) і у відповідному діапазоні мас.

20

Приклад 1. Одержання активованих жирнокислотних бічних ланцюгів

25

1. Одержання 18-[[[(1S)-1-карбокси-4-[2-[2-[2-[2-(2,5-діоксопіролідін-1-іл)окси-2-оксоетокси]етокси]етиламіно]-2-оксоетокси]етокси]етиламіно]-4-оксобутил]аміно]-18-оксооктадеканової кислоти (фрагмент А-OSu, проміжна сполука-3)

Активований жирнокислотний бічний ланцюг, фрагмент А-OSu, одержували шляхом твердофазного синтезу із застосуванням 2-хлортритилхлоридної смоли, як схематично

30

представлено на фігурі 1А. 2-[2-(2-Фмос-аміноетокси)етокси]оцтову кислоту (проміжна сполука-1) прикріплювали до 2-хлортритилхлоридної смоли у присутності N, N'-діізопропілетиламіну (DIPEA), що зумовило одержання 2-[2-(2-Фмос-аміноетокси)етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Проміжну сполуку-1 можна одержати шляхом зв'язування 2-[2-(2-

35

аміноетокси)етокси]оцтової кислоти з Фмос-N-гідроксисукцинімідним естером. Альтернативно проміжна сполука-1 є комерційно доступною, та, отже, її можна придбати. Захисну групу Фмос

видаляли шляхом селективного деблокування аміногрупи 2-[2-(2-Фмос-аміноетокси)етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли із застосуванням піперидину, а вільну

40

аміногрупу потім приєднували до 2-[2-(2-Фмос-аміноетокси)етокси]оцтової кислоти із застосуванням 1-гідроксibenзтриазолу (HOBt) і N, N'-діізопропілкарбодііміду (DIPC), що

зумовило одержання 2-[2-[2-[2-(2-Фмос-аміноетокси)етокси]ацетил]аміно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Групу Фмос

45

потім видаляли шляхом селективного деблокування аміногрупи 2-[2-[2-[2-(2-Фмос-аміноетокси)етокси]ацетил]аміно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу потім приєднували до Фмос-Glu-OtBu із застосуванням HOBt і

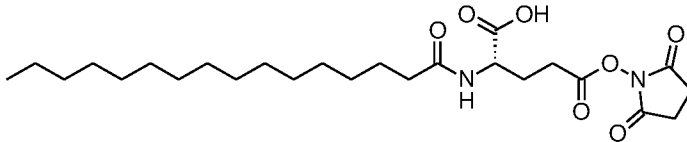
DIPC з одержанням 2-[2-[2-[2-[2-(4S)-4-Фмос-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]етокси]етокси]ацетил]аміно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли.

Одержану 2-[2-[2-[2-[2-(4S)-4-Фмос-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]етокси]етокси]ацетил]аміно]етокси]етокси]оцтова

кислота-2-Cl-Trt-смоли селективно деблокували із застосуванням піперидину, а потім з'єднували з моно-трет-

бутиловим етером октадекандіової кислоти з одержанням проміжної сполуки-2, а саме [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканол)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]етокси]етокси]ацетил]аміно]етокси]етокси]оцтова кислота]-2-Cl-Trt-смоли. Проміжну сполуку 2 потім відщеплювали від 2-Cl-Trt-смоли із застосуванням трифторетанолу:DCM (1:1). Потім одержану сполуку вводили в реакцію з N-гідроксисукцинімідом (HOSu) у присутності ізобутилхлорформіату (IBCF) і N-метилморфоліну (NMM) із наступним зняттям захисту за допомогою трифтороцтової кислоти з одержанням вказаної у заголовку сполуки (фрагмент A-OSu, проміжна сполука-3). Весь процес також може бути зображений, як схематично представлено на фігурі 1B.

2. Одержання N-пальмітоїл-L-γ-глутамілсукцинімідного естеру (фрагмент B-OSu)
Фрагмент B-OSu



Moiety B-OSu

Альфа-трет-бутиловий естер L-глутамінової кислоти (H-Glu-OtBu) вводили у реакцію з пальмітиновою кислотою у присутності IBCF і NMM з одержанням $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-\text{Glu}-\text{OtBu}$, який потім вводили у реакцію з HOSu у присутності IBCF і NMM з одержанням $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-\text{Glu}(\text{OSu})-\text{OtBu}$, з якого потім знімали захист за допомогою трифтороцтової кислоти з одержанням фрагмента B-OSu.

3. Одержання 18-[[[(1S)-1-карбокси-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-діоксопіролідин-1-іл)окси-2-оксоетокси]етокси]етилкарбамоїламіно]бутиламіно]-4-оксобутил]аміно]-18-оксооктадеканової кислоти (фрагмент C-OSu)

Активованій жирнокислотний бічний ланцюг, фрагмент C-OSu, одержували з використанням твердофазного синтезу із застосуванням 2-хлортритилхлоридної смоли, як схематично представлено на фігурі 2. 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси)етокси]оцтову кислоту прикріплювали до 2-хлортритилхлоридної смоли у присутності DIPEA з одержанням 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси)етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Захисну групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування аміногрупи із застосуванням піперидину, а потім активували вільну аміногрупу із застосуванням п-нітрофенілхлорформіату в THF і DIPEA з наступною реакцією з хлористоводневою сіллю Fmoc-амінобутиламіну в THF: DMAc і DIPEA, що зумовило одержання 2-[2-[2-(4-Fmoc-амінобутилкарбамоїламіно)етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу потім приєднували до Fmoc-Glu-OtBu із застосуванням HOBT і DIPIC, що зумовило одержання

2-[2-[2-[4-[[[(4S)-4-Fmoc-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]бутилкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Одержану

2-[2-[2-[4-[[[(4S)-4-Fmoc-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]бутилкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли селективно деблокували із застосуванням піперидину, а потім з'єднували з моно-трет-бутиловим естером октадекандіової кислоти з одержанням проміжної сполуки 2-[2-[2-[4-[[[(4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканол)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]бутилкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли... Потім

проміжну сполуку відщеплювали від 2-Cl-Trt-смоли із застосуванням трифторетанолу:DCM (1:1) з одержанням 2-[2-[2-[4-[[[(4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканол)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]бутилкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтової кислоти (LCMS= маса/заряд: 814,56 (M+H⁺)). Потім одержану сполуку вводили в реакцію з HOSu у присутності дициклогексилкарбодііміду (DCC) з одержанням захищеної сукцинімідом проміжної сполуки, з якої знімали захист за допомогою трифтороцтової кислоти з одержанням вказаної у заголовку сполуки (фрагмент C-OSu).

4. Одержання 18-[[[(1S)-1-карбокси-4-[[2-[2-[2-[2-(2,5-діоксопіролідин-1-іл)окси-2-оксоетокси]етокси]етиламіно]-1,1-диметил-2-оксоетил]аміно]-4-оксобутил]аміно]-18-оксооктадеканової кислоти (фрагмент D-OSu)

Жирнокислотний бічний ланцюг одержували з використанням твердофазного синтезу із застосуванням 2-хлортритилхлоридної смоли, як схематично представлено на фігурі 3. 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси)етокси]оцтову кислоту прикріплювали до 2-хлортритилхлоридної смоли у присутності DIPEA з одержанням 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси)етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-

смоли. Захисну групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування аміногрупи із застосуванням піперидину з наступним зв'язуванням із Fmoc-Aib-OH у THF: DMAc із застосуванням DIPIC і HOBT, що зумовило одержання 2-[2-[2-[(2-Fmoc-аміно-2-метилпропаноїл)аміно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу приєднували до Fmoc-Glu-OtBu із застосуванням HOBT і DIPIC з одержанням 2-[2-[2-[[2-[[4S)-4-Fmoc-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]-2-метилпропаноїл]аміно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли... Групу Fmoc одержаної сполуки селективно деблокували із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу потім з'єднували з моно-трет-бутиловим естером октадекандіової кислоти з одержанням 2-[2-[2-[[2-[[4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканоїл)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]-2-метилпропаноїл]аміно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Потім проміжну сполуку відщеплювали від 2-Cl-Trt-смоли із застосуванням трифторетанолу:DCM (1:1) з одержанням 2-[2-[2-[[2-[[4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканоїл)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]-2-метилпропаноїл]аміно]етокси]етокси]оцтової кислоти (LCMS= маса/заряд: 786,39 (M+H⁺)). Потім одержану сполуку вводили в реакцію з HOSu у присутності DCC з одержанням захищеної сукцинімідом проміжної сполуки, з якої знімали захист за допомогою трифтороцтової кислоти з одержанням вказаної у заголовку сполуки (фрагмент D-OSu).

5. Одержання 18-[[1S)-1-карбоксид-4-[3-[2-[2-(2,5-діоксопіролідид-1-іл)окси-2-оксоетокси]етокси]етилкарбамоїламіно]пропіламіно]-4-оксобутил]аміно]-18-оксооктадеканоїл]аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]етокси]етокси]оцтової кислоти (фрагмент E-OSu)

Жирнокислотний бічний ланцюг одержували з використанням твердофазного синтезу із застосуванням 2-хлортритилхлоридної смоли, як схематично представлено на фігурі 4. 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси]етокси]оцтову кислоту прикріплювали до 2-хлортритилхлоридної смоли у присутності DIPEA з одержанням 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Захисну групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування аміногрупи із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу потім активували із застосуванням п-нітрофенілхлорформіату в THF і DIPEA з наступною реакцією з 1,3-діамінопропаном у THF: DMAc у присутності DIPEA із застосуванням HOBT з утворенням NH₂-(CH₂)₃-NH-C(O)-{(2-(2-аміноетокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Вільну аміногрупу потім приєднували до Fmoc-Glu-OtBu із застосуванням HOBT і DIPIC, що зумовило одержання 2-[2-[2-[3-[[4S)-4-Fmoc-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]пропілкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Одержану 2-[2-[2-[3-[[4S)-4-Fmoc-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]аміно]пропілкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтову кислоту-2-Cl-Trt-смоли селективно деблокували із застосуванням піперидину, а потім з'єднували з моно-трет-бутиловим естером октадекандіової кислоти з одержанням 2-[2-[2-[3-[[4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканоїл)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]-пропілкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Потім проміжну сполуку відщеплювали від 2-Cl-Trt-смоли із застосуванням трифторетанолу:DCM (1:1) з одержанням 2-[2-[2-[3-[[4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканоїл)аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]пропілкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтової кислоти (LCMS= маса/заряд: 801,41 (M+H⁺)). Потім одержану сполуку вводили в реакцію з HOSu у присутності дициклогексилкарбодііміду (DCC) з одержанням захищеної сукцинімідом проміжної сполуки, з якої знімали захист за допомогою трифтороцтової кислоти з одержанням вказаної у заголовку сполуки (фрагмент E-OSu).

6. Одержання 18-[[1S)-1-карбоксид-4-[4-[2-[2-(2,5-діоксопіролідид-1-іл)окси-2-оксоетокси]етокси]етилкарбамоїламіно]-1-піперидил]-4-оксобутил]аміно]-18-оксооктадеканоїл]аміно]-5-оксопентаноїл]аміно]етокси]етокси]оцтової кислоти (фрагмент F-OSu)

Жирнокислотний бічний ланцюг одержували з використанням твердофазного синтезу із застосуванням 2-хлортритилхлоридної смоли, як схематично представлено на фігурі 5. 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси]етокси]оцтову кислоту прикріплювали до 2-хлортритилхлоридної смоли у присутності DIPEA з одержанням 2-[2-(2-Fmoc-аміноетокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Захисну групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування аміногрупи із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу потім активували із застосуванням п-нітрофенілхлорформіату в THF і DIPEA з наступною реакцією з 4-аміно-Вос-піперидином у THF: DMAc у присутності DIPEA із застосуванням HOBT, що зумовило одержання (2-[2-(4-Вос-піперидилкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Під час відщеплення одержаної сполуки із застосуванням трифтороцтової кислоти одержали 2-[2-[2-(4-піперидилкарбамоїламіно]етокси]етокси]оцтову кислоту, у результаті подальшої реакції якої з

Fmoc-OSu у присутності триетиламіну (TEA) одержали 2-[2-[2-(4-Fmoc-піперидилкарбамоїламіно)етокси]етокси]оцтову кислоту. Потім одержану сполуку додатково приєднували до 2-хлортритилхлоридної смоли у присутності DIPEA з одержанням 2-[2-[2-(4-Fmoc-піперидилкарбамоїламіно)етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Групу Fmoc видаляли шляхом селективного деблокування із застосуванням піперидину, а вільну аміногрупу потім приєднували до Fmoc-Glu-OtBu із застосуванням HOBt і DIPIC, що зумовило одержання 2-[2-[2-[1-[(4S)-4-аміно-5-трет-бутоксид-5-оксопентаноїл]-4-піперидил]карбамоїламіно]етокси]етокси]оцтова кислота-2-Cl-Trt-смоли. Одержану сполуку селективно деблокували із застосуванням піперидину і потім з'єднували з моно-трет-бутиловим естером октадекандіової кислоти з одержанням 2-[2-[2-[1-[(4S)-5-трет-бутоксид-4-[(18-трет-бутоксид-18-оксооктадеканоїл)аміно]-5-оксопентаноїл]-4-піперидил]карбамоїламіно]етокси]етокси]оцтової кислоти (LCMS= маса/заряд: 827,40 (M+H⁺)). Потім одержану сполуку вводили в реакцію з HOSu у присутності DCC з одержанням захищеної сукцинімідом проміжної сполуки, з якої знімали захист із застосуванням трифтороцтової кислоти з одержанням вказаної у заголовку сполуки, фрагмента F-OSu.

Приклад 2. Синтез сполуки 1

N-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксигептадеканоїламіно)-4(S)-карбоксибутириламіно]етокси]етокси]ацетиламіно)етокси]етокси]ацетил]](Aib⁸, Arg³⁴, Leu³⁸ GLP-1(7-38) пептид

Частина А. Синтез вихідного лінійного пептиду Aib⁸, Arg³⁴, Leu³⁸ GLP-1(7-38)

Вихідний пептид синтезували за допомогою твердофазного способу. Вихідна смола, застосовувана для синтезу, являла собою смолу Ванга. Fmoc-захищений лейцин застосовували для зв'язування зі смолою Ванга. Зв'язування проводили із застосуванням діізопропілкарбодіміду, N-гідроксибензотриазолу (DIC-HOBt) як зв'язувального реагенту в присутності 4-диметиламінопіридину (DMAP), що зумовило одержання Fmoc-Leu-смоли Ванга. Селективне деблокування аміногрупи на Fmoc-Leu-смолі Ванга із застосуванням піперидину з наступним зв'язуванням з Fmoc-Gly-OH із застосуванням HOBt і DIPIC зумовило одержання Fmoc-Gly-Leu-смоли Ванга. Так завершується один цикл. Оцтовий ангідрид і діізопропілетиламін/піридин застосовували для обмеження незв'язаних аміногруп під час кожного зв'язування амінокислоти.

2 вищезгадані стадії, тобто селективне деблокування Fmoc-захисту з амінокислоти, прикріпленої до смоли, і зв'язування з амінокислотним залишком із Fmoc-захищеною аміногрупою, розташованим наступним у послідовності, повторювали для інших 30 амінокислотних залишків. Селективне деблокування, тобто зняття захисту у вигляді групи Fmoc, виконували із застосуванням піперидину, а зв'язування з наступною Fmoc-захищеною амінокислотою проводили із застосуванням HOBt/DIPIC. Бічний ланцюг Fmoc-захищених амінокислот захищали ортогонально, наприклад, гідроксильну групу серину, тирозину або треоніну захищали за допомогою трет-бутильної (-tBu) групи, аміногрупу і гуанідогрупу лізину та аргініну захищали за допомогою трет-бутилоксикарбонілу (-Boc) і 2,2,4,6,7-пентаметилдигідробензофуран-5-сульфонільної (-Pbf) групи відповідно, імідазол у гістидині захищали за допомогою тритилу (-Trt), а карбоксикислотні групи аспарагінової кислоти або глутамінової кислоти захищали за допомогою групи -tBu. Виконували дві вищезгадані стадії, тобто селективне деблокування, а потім зв'язування з наступною Fmoc-захищеною амінокислотою з одержанням Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-смоли.

Деблокування Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-смоли із застосуванням піперидину з наступним відщепленням і зняттям захисту із застосуванням трифтороцтової кислоти з етан-1,2-дитіолом зумовило одержання неочищеного H-His-Aib-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH (Aib⁸, Arg³⁴, Leu³⁸ GLP-1 (7—38) пептиду), який очищали за допомогою HPLC.

Частина В:

Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента A-OSu, на очищений (лінійний пептид) H-His-Aib-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH, одержаний у частині А, в ацетонітрилі за

pH приблизно 10 зумовило одержання неочищеного вказаного у заголовку пептиду, який очищали за допомогою препаративної HPLC. Характеристики сполук представлені у таблиці 3.

Приклад 3. Одержання сполук 2, 3, 5, 9, 10 і 12

Лінійні пептиди сполук 2, 3, 5, 9, 10 і 12 одержували за допомогою твердофазного способу відповідно до аналогічного процесу, наведеного для прикладу 1, частина А. Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента А-OSu, із дотриманням процесу з прикладу 1, частина В, на відповідні лінійні пептиди забезпечило одержання сполуки 2, 3, 5, 9, 10 і 12.

Приклад 4. Одержання сполук 4 і 11

Лінійні пептиди сполук 4 і 11 одержували за допомогою твердофазного способу відповідно до аналогічного процесу, наведеного для прикладу 2, частина А, за винятком того, що у даному випадку зі смолою Ванга першим зв'язували Fmoc-захищений D-лейцин, а потім послідовно зв'язували інші амінокислоти. Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента А-OSu, на відповідний лінійний пептид відповідно до процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполук 4 і 11.

Приклад 5. Одержання сполуки 8

Лінійний пептид одержували за допомогою твердофазного способу відповідно до аналогічного процесу, наведеного для прикладу 2, частина А, за винятком того, що у даному випадку зі смолою Ванга першим зв'язували Fmoc-захищений ізолейцин, а потім послідовно зв'язували інші амінокислоти. Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента А-OSu, на лінійний пептид із дотриманням процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 8.

Приклад 6. Одержання сполуки 6

Лінійний пептид одержували за допомогою твердофазного способу відповідно до аналогічного процесу, наведеного для прикладу 2, частина А. Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента В-OSu, на лінійний пептид із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 6.

Приклад 7. Одержання сполуки 7

Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента В-OSu, на лінійний пептид із прикладу 2, частина А, із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 7.

Приклад 8. Одержання сполуки 13

Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента С-OSu, на лінійний пептид із прикладу 1, частина А, із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 1, частина В, забезпечило одержання сполуки 13.

Приклад 9. Одержання сполуки 14

Лінійний пептид одержували за допомогою твердофазного способу відповідно до аналогічного процесу, наведеного для прикладу 2, частина А. Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента С-OSu, на лінійний пептид із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 14.

Приклад 10. Одержання сполуки 15

Лінійний пептид одержували за допомогою твердофазного способу відповідно до аналогічного процесу, наведеного для прикладу 2, частина А, починаючи з Fmoc-захищеного ізолейцину, який першим зв'язували зі смолою Ванга, а потім послідовно зв'язували інші амінокислоти. Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента С-OSu, на лінійний пептид із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 15.

Приклад 11. Одержання сполуки 16

Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента D-OSu, на лінійний пептид із прикладу 2, частина А, із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 16.

Приклад 12. Одержання сполуки 17

Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента Е-OSu, на лінійний пептид із прикладу 2, частина А, із дотриманням аналогічному процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 17.

Приклад 13. Одержання сполуки 18

Прищеплення активованого жирнокислотного ланцюга, фрагмента F-OSu, на лінійний пептид із прикладу 2, частина А, із дотриманням аналогічного процесу з прикладу 2, частина В, забезпечило одержання сполуки 18.

Характеристики синтезованих сполук за даним винаходом представлені нижче у наступній таблиці 3.

Характеристики типових сполук за даним винаходом

Спол. №	Дані LCMS	Чистота за HPLC
1	маса/заряд = 1057,52 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4226,05	98,32 % (спосіб B2), RT=24,85 хв.
2	маса/заряд = 1061,74 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4242,93	99,02 % (спосіб B1), RT=18,53 хв.
3	маса/заряд = 1087,65 (M-4H) ⁻⁴ , розрахована маса = 4354,63	98,12 % (спосіб B1), RT=18,48 хв.
4	маса/заряд = 1055,68 (M-4H) ⁻⁴ , розрахована маса = 4226,75	98,97 % (спосіб B1), RT=18,32 хв.
5	маса/заряд = 1057,88 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4227,49	96,75 % (спосіб B1), RT=17,09 хв.
6	маса/заряд = 967,26 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 3865,01	98,68 % (спосіб B3), RT=44,04 хв.
7	маса/заряд = 968,53 (M-4H) ⁻⁴ , розрахована маса = 3878,15	97,39 % (спосіб B3), RT=27,79 хв.
8	маса/заряд = 1057,72 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4226,85	95,70 % (спосіб B1), RT=16,62 хв.
9	маса/заряд = 1061,67 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4242,65	95,15 % (спосіб B1), RT=16,48 хв.
10	маса/заряд = 1058,18 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4228,69	93,66 % (спосіб B1), RT=16,13 хв.
11	маса/заряд = 1056,95 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4223,77	95,70 % (спосіб B2), RT=24,46 хв.
12	маса/заряд = 1405,12 (MH ₃ ³⁺), розрахована маса = 4212,34	97,51 % (спосіб B1), RT=19,06 хв.
13	маса/заряд = 1049,59 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4194,33	96,01 % (спосіб B2), RT=25,16 хв.
14	маса/заряд = 1050,13 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4196,49	92,06 % (спосіб B2), RT=24,55 хв.
15	маса/заряд = 1049,61 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4194,41	94,41 % (спосіб B2), RT=24,82 хв.
16	маса/заряд = 1042,34 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4165,32	94,56 % (спосіб B2), RT=25,26 хв.
17	маса/заряд = 1046,18 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4180,72	94,33 % (спосіб B2), RT=25,17 хв.
18	маса/заряд = 1052,77 (MH ₄ ⁴⁺), розрахована маса = 4207,08	93,12 % (спосіб B2), RT=24,92 хв.

Приклад 14. Пероральний тест на толерантність до глюкози (OGTT) у щурів; однократна ін'єкція; 1 мг/кг

- 5 Тварин розділили на три групи — нормальна контрольна група, група тестованої сполуки і третя група семаглутиду, по 4 тварини у кожній групі. Перед початком OGTT тварин не годували протягом 12 годин. Тваринам у групі тестованої сполуки підшкірно вводили сполуку 1 у дозі 1 мг/кг. Тваринам групи семаглутиду підшкірно вводили дозу 1 мг/кг. Через 22 години, 166 годин і 10 334 години після підшкірної ін'єкції тестованого лікарського засобу або семаглутиду рівень глюкози у крові вимірювали за допомогою глюкометра (вимірювання часу 0). Потім всім тваринам перорально вводили розчин глюкози з розрахунку 2 г/кг. Рівень глюкози у крові вимірювали через 20, 40, 60, 90 і 120 хвилин після введення глюкози. Реєстрували масу тіла і споживання їжі. Дані щодо рівня глюкози у крові аналізували із застосуванням двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні із 15 застосуванням PRISM (Graph Pad версії 5.03). Дані щодо AUC_{0–120} хв. глюкози у крові аналізували із застосуванням t-критерію.

- Для поліпептидів за даним винаходом продемонстрований ефект значного зниження рівня глюкози порівняно з контрольною групою під час дослідження за допомогою перорального тесту на толерантність до глюкози (OGTT) на щурах. Наприклад, на фігурі 6 показана залежність 20 зміни рівня глюкози у крові від часу за період 0—120 хвилин у групі тестованої сполуки, якій вводили сполуку 1, і групі обробки семаглутидом через 22 години і 46 годин після їх введення. Через 22 години після введення однократної дози сполуки 1 було показано статистично значуще зниження рівня глюкози у крові за $p < 0,001$ порівняно з нормальним контролем за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA з наступними апостеріорними критеріями 25 Бонферроні. Ефект зниження рівня глюкози у сполуки 1 перевищував ефект зниження рівня глюкози, спостережуваний із семаглутидом (див. фігуру 6A). Перевагу ефекту зниження рівня глюкози у сполуки 1 спостерігали навіть через 46 годин після підшкірного введення (фігура 6B). Окрім того, як для сполуки 1, так і для семаглутиду показано статистично значуще зниження 30 споживання їжі порівняно з контролем під час спостереження у день 2, а також у день 4 (див. таблиці 4 і 5). Зниження споживання їжі, продемонстроване для сполуки 1 у день 4, було більшим, ніж у семаглутиду (див. таблицю 5). За показником зниження маси тіла тільки тестована сполука продемонструвала значне зниження маси

Таблиця 4

Ефект обробки на вживання їжі та масу тіла у день 2

Споживання їжі (г) (від дня 0 — до дня 2)			Маса тіла (г) (день 2)		
	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	% зміни порівняно з вихідним рівнем
Нормальний контроль	33,0	4,7	480,6	15,6	8,89
Сполука 1	2,63***	2,5	365,6	21,0	-9,33
Семаглутид	5,03***	3,4	428,1	42,3	-7,65

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 порівняно з нормальним контролем; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Таблиця 5

Ефект обробки на вживання їжі та масу тіла у день 4

Споживання їжі (г) (від дня 0 — до дня 4)			Маса тіла (г) (день 4)		
	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	% зміни порівняно з вихідним рівнем
Нормальний контроль	90,5	5,6	491,3	16,9	2,1
Сполука 1	43,25***##	2,8	436,2*	21,1	-7,5
Семаглутид	55,73***	4,1	427,2	42,3	-5,3

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 порівняно з нормальним контролем; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

5 Неочікувано було виявлено, що для сполук, у яких X33 представлена Leu і Ile, показано значне зниження рівня глюкози у крові у даних дослідженнях, тоді як сполуки з амінокислотами, відмінними від Leu і Ile, мали значно менший ефект зниження рівня глюкози у крові. Для поліпептиду за даним винаходом показано значне зниження рівня глюкози у крові порівняно з контрольною групою. Також тестували сполуки з амінокислотами у положенні X33, відмінними від Leu або Ile. Наприклад, Leu у положенні 32 у сполуці 1 (SEQ ID NO: 05) заміняли на Lys і Ser з одержанням сполук Std-1 і Std-2 відповідно. Для Std-1 і Std-2 показано тільки приблизно 35 і 10 15 % зниження AUC_{0—120 хв.} глюкози у крові (таблиця 6).

Таблиця 6

Відсоткове зниження AUC_{0—120 хв.} глюкози у крові у тесті OGTT за дози 1 мг/кг через 24 години

Спол. №	% зниження рівня глюкози	Спол. std/семаглутид	Спол. №	% зниження рівня глюкози	Спол. std/ліраглутид
Std-1	35,1	0,71	6	75,8	1,83
Std-2	14,8	0,30	7	71,9	1,73
Семаглутид	49,3		Ліраглутид	41,5	

15 Аналогічним чином для сполуки 6, яка відрізняється від ліраглутиду наявністю додаткового Leu у положенні 32, і сполуки 7, яка відрізняється від ліраглутиду тим, що амінокислота Ala у положенні 2 замінена на Aib, і тим, що містить Leu як додаткову амінокислоту у положенні 32, продемонстрований ефект зниження рівня глюкози у крові через 24 години, який був значно вищий, ніж у ліраглутиду (таблиця 6).

20 Оскільки було визначено, що сполука 1 була значно ліпшою за показником зниження рівня глюкози, споживання їжі і зниження маси тіла, проводили експерименти з визначення тривалості дії сполуки за даним винаходом. Ефект типових сполук за даним винаходом (сполуки 1, 13 і 16) через 166 годин (7 днів) і 334 години (14 днів) вивчали і порівнювали з ефектом семаглутиду. Сполуки тестували згідно зі способом, наведеним нижче.

25 Тварин розділили на три групи — нормальна контрольна група, група тестованої сполуки і третя група семаглутиду, по 4 тварини у кожній групі. Перед початком OGTT тварин не годували протягом 12 годин. Тваринам у групі тестованої сполуки підшкірно вводили сполуку 1, сполуку 13 і сполуку 16 у дозі 1 мг/кг. Тваринам групи семаглутиду підшкірно вводили дозу 1 мг/кг. Через 22 години, 166 годин і 334 години після підшкірної ін'єкції тестованої сполуки або семаглутиду

рівень глюкози у крові вимірювали за допомогою глюкометра (вимірювання часу 0). Потім всім тваринам перорально вводили розчин глюкози з розрахунку 2 г/кг. Рівень глюкози у крові вимірювали через 20, 40, 60, 90 і 120 хвилин після введення глюкози. Реєстрували масу тіла і споживання їжі. Дані щодо рівня глюкози у крові аналізували із застосуванням двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні із застосуванням PRISM (Graph Pad версії 5.03). Дані щодо AUC_{0–120 хв.} глюкози у крові аналізували із застосуванням t-критерію.

У таблиці 7 представлено зниження AUC для глюкози у крові під дією типових сполук за даним винаходом (сполуки 1, 13 і 16) порівняно з контрольною групою через 1 день, 7 днів і 14 днів після введення.

Таблиця 7

Відсоткове зниження AUC_{0–120 хв.} глюкози у крові у тесті OGTT за дози 1 мг/кг

Сполука №	Час	AUC глюкози у крові (мг/дл*хв.)	
		Середнє значення	Зміна AUC (мг/дл*хв.)
Семаглутид Експеримент 1	22 години	5458,0	-63,4
	168 годин	12785,0	-25,5
	336 годин	16223,0	-2,4
Спол. 1 Експеримент 1	22 години	3173,0	-78,7
	168 годин	5941,0	-65,4
	336 годин	11920,0	-28,3
Спол. 13 Експеримент 1	22 години	2795,0	-81,2
	168 годин	6950,0	-59,5
	336 годин	11368,0	-31,6
Семаглутид Експеримент 2	22 години	4258	-50
	168 годин	7410	-26,6
	336 годин	8023,0	-5,5
Спол. 16 Експеримент 2	22 години	1646	-80,7
	168 годин	4283	-57,6
	336 годин	8295,0	-2,3

Сполуки 1 і 13 вивчали і порівнювали із семаглутидом в одному експерименті (експеримент 1), а сполуку 16 вивчали і порівнювали із семаглутидом в окремому експерименті (експеримент 2). Через 168 годин після ін'єкції для сполук 1, 13 і 16 за даним винаходом показано зниження AUC глюкози у крові на приблизно 60 % порівняно з рівнем глюкози у крові у нульовий момент часу. З іншого боку, для семаглутиду показано зниження рівня глюкози у крові на приблизно 25 % порівняно з рівнем глюкози у крові у нульовий момент часу.

Аналогічні спостереження провели щодо кількості споживаної їжі і зміни маси тіла. Як можна побачити з таблиці 8 нижче, тварини, яким вводили типові сполуки (сполуки 1, 13 і 16), споживали значно менше їжі порівняно з тваринами, яким вводили семаглутид. Для сполуки 16 показано суттєве зниження маси тіла, що демонструє його потенційну застосовність для лікування ожиріння.

Таблиця 8

Ефект щодо споживання їжі і маси тіла у тесті OGTT за дози 1 мг/кг

Сполука №	Час	Споживання їжі (г)	
		Середнє значення	Зміна маси тіла (%)
Семаглутид Експеримент 1	48 год.	17,5	-6,5
	154 год.	86,3	4,5
	324 год.	107,9	11,8
Спол. 1 Експеримент 1	48 год.	8,3	-9,8
	154 год.	69,6	5,2
	324 год.	99,4	9,3

Таблиця 8 (продовження)

Сполука №	Час	Споживання їжі (г)		Зміна маси тіла (%)	
		Середнє значення		Середнє значення	
Спол. 13 Експеримент 1	48 год.	8,4		-10,2	
	154 год.	62,3		4,5	
	324 год.	82,44		8,2	
Семаглутид Експеримент 2	48 год.	19,3		-8,7	
	154 год.	50,4		0,2	
	324 год.	96,8		3,8	
Спол. 16 Експеримент 2	48 год.	5,9		-10,7	
	154 год.	44,1		-7,0	
	324 год.	104,3		-4,3	

Приклад 15. Зниження HbA1c у мишей db/db із діабетом 2 типу після тривалої обробки

Даний дослід проводили на мишачій моделі діабету. Тварин розділили на три групи обробки — контрольну групу з діабетом, групу тестованої сполуки і групу обробки семаглутидом. Сполуку 1 за даним винаходом вводили підшкірно у дозі 0,3 мг/кг один раз на день протягом 3 днів (qd*3), а потім у дозі 0,1 мг/кг через день для 7 доз (q2d*7), а потім у дозі 0,1 мг/кг один раз на чотири дні протягом двох циклів введення дози (q4d*2). Таку саму схему введення доз застосовували у групі обробки семаглутидом. Щоденно проводили вимірювання рівнів глюкози у крові і маси тіла. % HbA1c вимірювали у день 0, день 7, день 14 і день 27 за допомогою колонкової хроматографії. Сукупне споживання їжі підраховували у день 27. Дані щодо % HbA1c аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні із застосуванням PRISM (Graph Pad версії 5.03).

Для тварин у групі тестованої сполуки, яким вводили сполуку 1, показано статистично значуще зниження рівнів глюкози у крові порівняно з контрольною групою з діабетом (див. фігуру 7), та ефект перевищував ефект у групі обробки семаглутидом на останній фазі дослідження. Для тварин у групі тестованої сполуки, яким вводили сполуку 1, показано значне зниження споживання їжі, що можна побачити з результатів, представлених на фігурі 8. На фігурі 8 представлено сукупне споживання їжі від дня 0 до дня 27 контрольними мишами і мишами db/db, обробленими тестованою сполукою. Як для тестованої сполуки, так і для семаглутиду показали статистично значуще зниження споживання їжі порівняно з контрольною групою з діабетом. Окрім того, для тестованої сполуки показано значно нижче споживання їжі порівняно із семаглутидом. У тому самому дослідженні для сполуки 1 також показано значне зниження маси тіла порівняно з контрольною групою з діабетом. На фігурі 9 представлений результат % зміни маси тіла для контрольної групи і групи тестованої сполуки від дня 0 до дня 27. Для тестованої сполуки 1 показано значне зниження, що становить -16 %, порівняно зі зниженням, що становить -8 %, спостережуваним у групі обробки семаглутидом (див. фігуру 09).

У разі цукрового діабету вищі кількості HbA1c, що вказують на слабший контроль рівнів глюкози у крові, були асоційовані із серцево-судинним захворюванням, нефропатією, нейропатією і ретинопатією. У 27-денному дослідженні для сполуки 1 показано статистично значуще зниження рівня HbA1c у мишей db/db із діабетом типу 2 після тривалої обробки. У таблиці 9 нижче і на фігурі 10 представлений рівень HbA1c у дні 0 і 27 у контрольній групі з діабетом і групі після тривалої обробки сполукою 1. Ефект був статистично значущим навіть порівняно із семаглутидом.

Таблиця 9

Ефект обробки на % рівні HbA1c у мишей db/db

Момент часу (дні)	% HbA1c										
	Контроль із діабетом (DC)			Сполука 1				Семаглутид			
	Середнє значення	SD	n	Середнє значення	SD	n	% зміни порівняно з DC	Середнє значення	SD	n	% зміни порівняно з DC
0	4,70	0,52	6	4,87	0,59	6	-	5,05	0,35	5	-
27	7,30	1,17	6	3,73***#	0,86	6	-3,57	5,03***	0,69	5	-2,26

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 порівняно з контролем із діабетом; двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

В окремому дослідженні вивчали тестовані сполуки 1, 13 і 16 і порівнювали із семаглутидом

щодо їхнього ефекту на рівень HbA1c та інсуліну і сукупне споживання їжі, зміну маси тіла та AUC глюкози у крові. Дослідження проводили аналогічно тому, як описано вище, на мишачій моделі діабету. Тварин розділили на три групи обробки — контрольну групу з діабетом, групу тестованої сполуки і групу обробки семаглутидом. Типові сполуки за даним винаходом, сполуку 1, сполуку 13 і сполуку 16, вводили підшкірно у дозі 3,04 або 6,078 нМ (через день аж до дня 28 (q2d*15)). Таку саму схему введення доз застосовували у групі обробки семаглутидом. Щоденно проводили вимірювання рівнів глюкози у крові і маси тіла. % HbA1c, вміст інсуліну вимірювали у день 0, день 14 і день 29. Сукупне споживання їжі і зміну маси тіла розраховували у день 14 і 29. Дані щодо % HbA1c, вмісту інсуліну аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні із застосуванням PRISM (Graph Pad версії 5.03). У той самий час дані щодо AUC глюкози у крові, зміни маси тіла і сукупного споживання їжі аналізували за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні із застосуванням PRISM (Graph Pad версії 5.03). Від дня 29 до дня 45 тварини перебували у відновлювальному періоді, протягом якого не проводили обробку лікарськими засобами. Протягом даного періоду вимірювали рівень глюкози у крові і масу тіла. У день 45 вимірювали зміни маси тіла, % HbA1c, вміст інсуліну.

Результати представлені у таблицях 10, 11 і 12 нижче.

Таблиця 10

HbA1C (%): сполука 1 (6,078 нМ), сполука 13 (3,04 і 6,078 нМ), сполука 16 (3,04 і 6,078 нМ); (q2d*15) (n=7)

Момент часу (дні)	% HbA1C													
	Контроль із діабетом (DC)		Сполука 1, 6,078 нМ, q2d*15		Сполука 13, 3,04 нМ, q2d*15		Сполука 13, 6,078 нМ, q2d*15		Сполука 16, 3,04 нМ, q2d*15		Сполука 16, 6,078 нМ, q2d*15		Семаглутид, 12,15 нМ, q2d*15	
	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD
0	7,7	1,2	7,8	0,8	7,7	1,5	7,83	0,76	7,74	1,27	7,83	0,99	7,66	1,13
14	8,0	1,0	6,4**	0,5	6,6*	0,9	6,00***	0,53	5,67***#	0,68	5,64***#	0,49	7,04	1,15
29	8,3	1,0	6,2***	0,5	6,4***	0,8	5,64***	0,51	5,33***#	0,39	5,16***#	0,24	6,47***	1,03

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 порівняно з контролем із діабетом, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Таблиця 11

Інсулін (нг/мл): сполука 1 (6,078 нМ), сполука 13 (3,04 і 6,078 нМ), сполука 16 (3,04 і 6,078 нМ); (q2d*15) (n=7)

Момент часу (дні)	Інсулін (нг/мл)													
	Контроль із діабетом		Сполука 1, 6,078 нМ, q2d*15		Сполука 13, 3,04 нМ, q2d*15		Сполука 13, 6,078 нМ, q2d*15		Сполука 16, 3,04 нМ, q2d*15		Сполука 16, 6,078 нМ, q2d*15		Семаглутид, 12,15 нМ, q2d*15	
	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD
0	17,6	5,5	18,0	5,8	21,7	12,1	26,2	14,0	13,9	6,6	21,8	9,6	18,7	10,3
14	23,0	10,7	58,1**	31,6	41,8	28,2	61,2***	23,7	50,8*	27,7	58,1**	12,5	37,5	26,5
29	16,9	6,6	54,7**	6,4	54,4**	27,0	59,4***	22,4	53,8**	23,5	68,2***	27,1	48,1**	25,3

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 порівняно з контролем із діабетом, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Таблиця 12

Сукупне споживання їжі, AUC глюкози у крові (мг/дл*день) і зміни маси тіла: сполука 1 (6,078 нМ), сполука 13 (3,04 і 6,078 нМ), сполука 16 (3,04 і 6,078 нМ); (q2d*15)

Групи (n=7)	Сукупне споживання їжі (г), день 0—29		AUC глюкози у крові (день 0—29) (мг/дл*дні)			Зміна маси тіла, день 29, % зміни порівняно з днем 0	
	Середнє значення	SD	Середнє значення	SD	% зміни порівняно з контролем	Середнє значення	SD
Контроль із діабетом	99,3	37,16	16948,1	281,48		9,4	6,4
Сполука 1, 6,078 нМ	79,8	25,09	9194,6***	450,84	-45,75	-0,3	2,2
Сполука 13, 3,04 нМ	75,2	18,45	9515,4***	805,21	-43,86	1,2	3,8
Сполука 13, 6,078 нМ	70,4	10,85	8451,7***##	612,94	-50,13	-1,1	2,4
Сполука 16, 3,04 нМ	77,4	23,82	9399,0***	680,38	-44,54	-1,4	5,4
Сполука 16, 6,078 нМ	66,7	29,48	8086,1***##	623,80	-52,29	-5,5	3,1
Семаглутид, 12,155 нМ	92,0	6,64	9867,9***	832,73	-41,78	0,7	3,9

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 порівняно з контролем із діабетом, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Для типових сполук за даним винаходом (сполуки 1, 13 і 16) у дозах приблизно 3 і 6 нМ показано значне зниження HbA1c, вмісту глюкози у крові, споживання їжі і маси тіла порівняно з контролем (таблиця 12). Зниження було порівнянним із показником для семаглутиду у дозі приблизно 12 нМ. До того ж ефект спостерігали навіть через 29 днів (таблиці 13 і 14), що демонструє потенціал сполук за даним винаходом для розробки лікарських засобів тривалої дії, які не потребують частого введення і, відповідно, поліпшують дотримання пацієнтами схеми лікування.

10

Таблиця 13

Дослідження відновлювального періоду — AUC глюкози у крові (мг/дл*дні)

Групи (n=3)	AUC глюкози у крові (день 30—37) (мг/дл*дні)		% зміни порівняно з контролем	AUC глюкози у крові (день 38—45) (мг/дл*дні)		% зміни порівняно з контролем
	Середнє значення	SD		Середнє значення	SD	
Контроль із діабетом	3591,7	47,04		3601,7	38,66	
Сполука 1, 6,078 нМ	2787,3*	17,67	-22,39	3335,7	66,11	-7,39
Сполука 13, 3,04 нМ	2588,7**	411,97	-27,93	3401,0	61,00	-5,57
Сполука 13, 6,078 нМ	2875,7	436,87	-19,94	3361,0	205,83	-6,68
Сполука 16, 3,04 нМ	2420,0**	89,71	-32,62	3284,0*	81,66	-8,82
Сполука 16, 6,078 нМ	2167,7***	210,19	-39,65	3134,7**	103,39	-12,97
Семаглутид, 12,155 нМ	3032,0	182,40	-15,58	3415,7	88,82	-5,16

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 порівняно з контролем із діабетом і #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Таблиця 14

Дослідження відновлювального періоду — % HbA1C і вміст інсуліну (нг/мл)

Групи (n=3)	% HbA1C		Дельта HbA1C порівняно з DC	Інсулін (нг/мл)		% зміни маси тіла порівняно з днем 45	
	Середнє значення	SD		Середнє значення	SD	Середнє значення	SD
Контроль із діабетом	8,5	0,4		20,6	12,0	7,8	1,08
Сполука 1, 6,078 нМ	7,6	0,5	-0,9	30,9	8,9	5,9	3,68
Сполука 13, 3,04 нМ	7,5	0,4	-1,0	31,2	32,7	6,6	0,86
Сполука 13, 6,078 нМ	7,3	0,4	-1,2	34,3	12,4	5,5	2,19
Сполука 16, 3,04 нМ	7,1*	0,2	-1,4	15,5	8,2	6,1	0,38
Сполука 16, 6,078 нМ	7,2*	0,5	-1,3	18,4	18,7	5,7	0,36
Семаглутид, 12,155 нМ	7,8	0,3	-0,7	19,7	4,2	9,5	4,68

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 порівняно з контролем із діабетом і #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 порівняно із семаглутидом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Дані результати демонструють, що сполука за даним винаходом потенційно може застосовуватись для лікування діабету та ожиріння.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Поліпептид, який містить амінокислотну послідовність:
 $H-X_2-X_3-X_4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X_{16}-G-Q-A-A-X_{21}-E-F-X_{24}-A-W-L-V-R-G-R-G-X_{33}-X_{34}$,
 де X_2 являє собою Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala або Aib;
 X_3 відсутня або являє собою Gln;

10

X_4 являє собою Glu;
 X_{16} являє собою Glu;
 X_{24} являє собою Ile;
 X_{33} являє собою Leu, -D-Leu, D-Ile або Ile;
 X_{34} відсутня, і

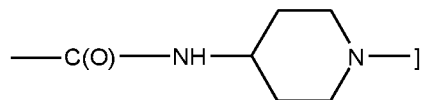
15

X_{21} являє собою Lys, де аміногрупа (ϵ -аміногрупа) бічного ланцюга Lys ацильована за допомогою фрагмента:

{-Q-T-U-W-Y-Z,
 де Q і T відсутні;

20

U відсутня або являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, де } являє собою місце приєднання групи W;
 W відсутня або вибрана з групи, яка складається з $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$], $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$], $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$] і



де] являє собою місце приєднання групи Y;

25

Y являє собою $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, і -- являє собою місце приєднання групи Z;
 Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$ або $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, де n являє собою ціле число від 14 до 20.

2. Поліпептид за п. 1, де X_2 являє собою Aib;

30

X_3 відсутня;
 X_{33} являє собою Leu;
 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$];
 W являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$], і
 Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

3. Поліпептид за п. 1, де X_2 являє собою Aib;

35

X_3 відсутня;
 X_{33} являє собою Leu;
 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$];
 W являє собою $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$], і
 Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

40

4. Поліпептид за п. 1, де X_2 являє собою Aib;

X_3 відсутня;
 X_{33} являє собою Leu;
 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$];
 W являє собою $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH-$], і

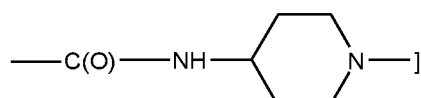
45

Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

5. Поліпептид за п. 1, де X_2 являє собою Aib;

50

X_3 відсутня;
 X_{33} являє собою Leu;
 U являє собою $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$];
 W являє собою



Z являє собою $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, де n являє собою ціле число 16.

6. Поліпептид за п. 1, де X_2 являє собою Aib;

X_3 відсутня;

X33 являє собою Leu;

U являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$;

W являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$, і

Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, де n являє собою ціле число 16.

5 7. Поліпептид за п. 1, де X2 являє собою Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe);

X3 відсутня;

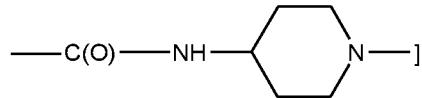
X33 являє собою Leu;

U являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$;

W являє собою $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-$, і

10 Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ або $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число від 14 до 20.

8. Поліпептид за п. 1, де W вибрана з групи, яка складається з $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-$ і



15 9. Поліпептид за п. 1, де X2 являє собою Ala;

X3 відсутня;

X33 являє собою Leu;

W відсутня;

Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число 14.

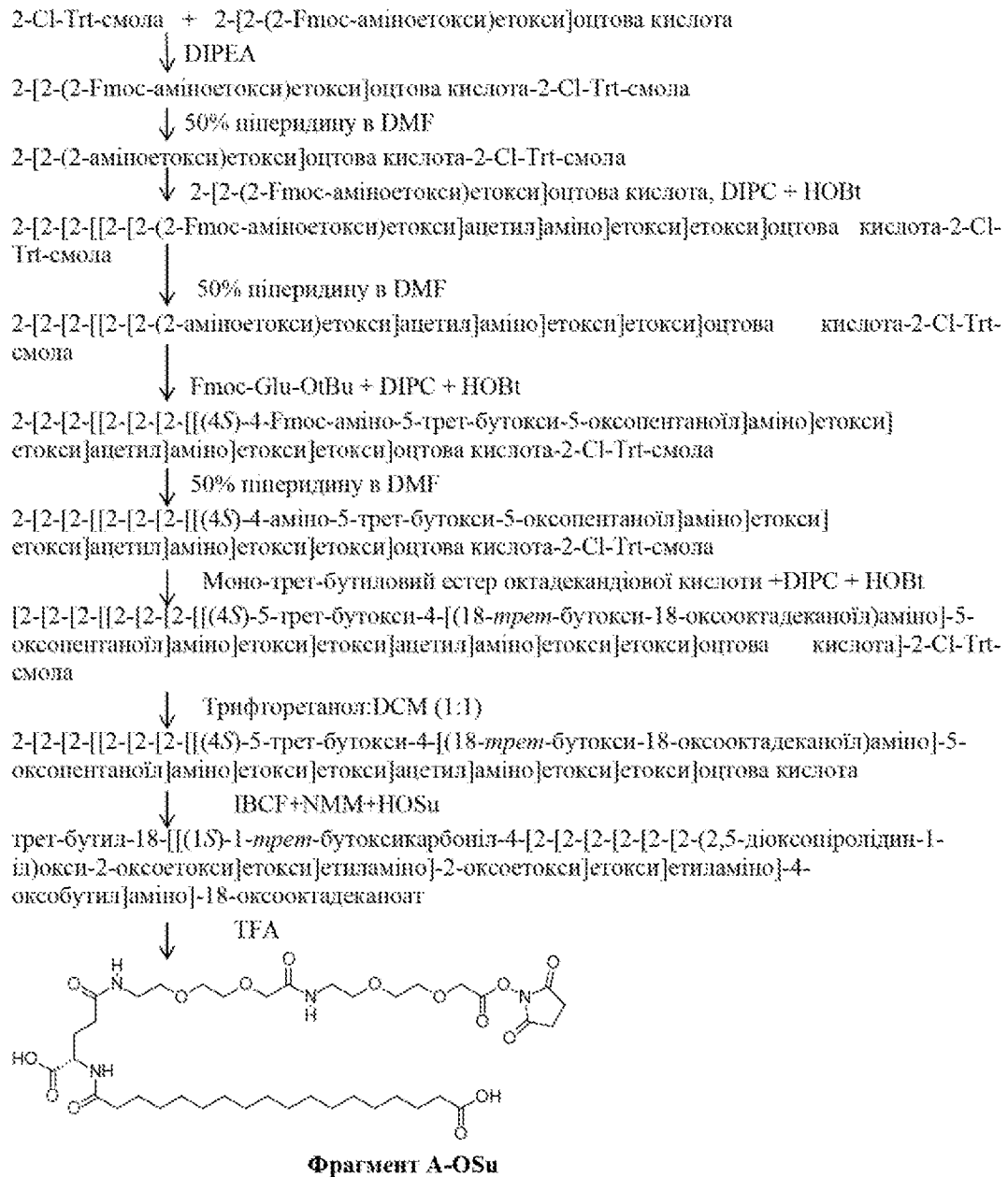
20 10. Поліпептид за п. 1, де X2 являє собою Aib;

X3 відсутня;

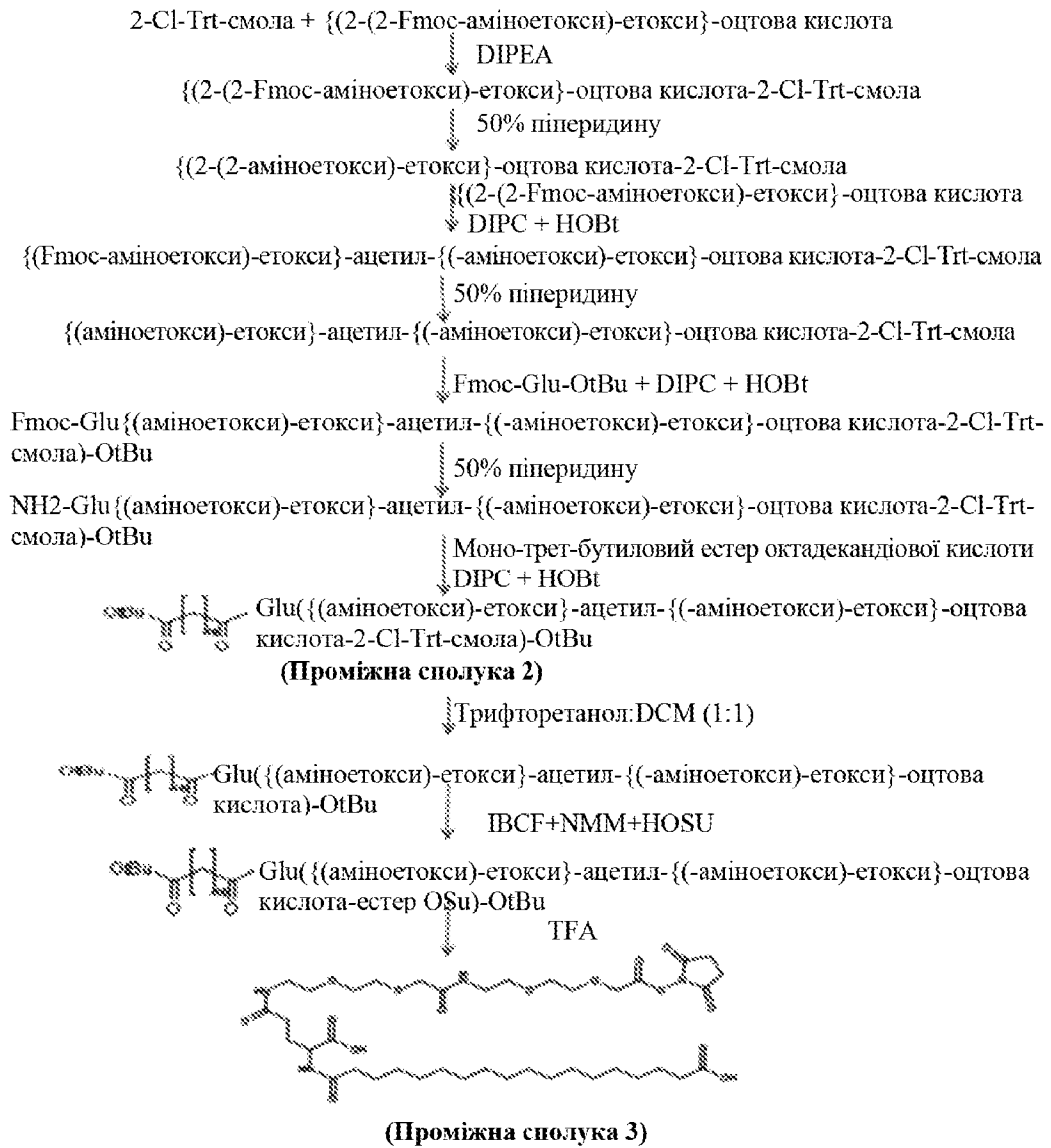
X33 являє собою Leu;

W відсутня;

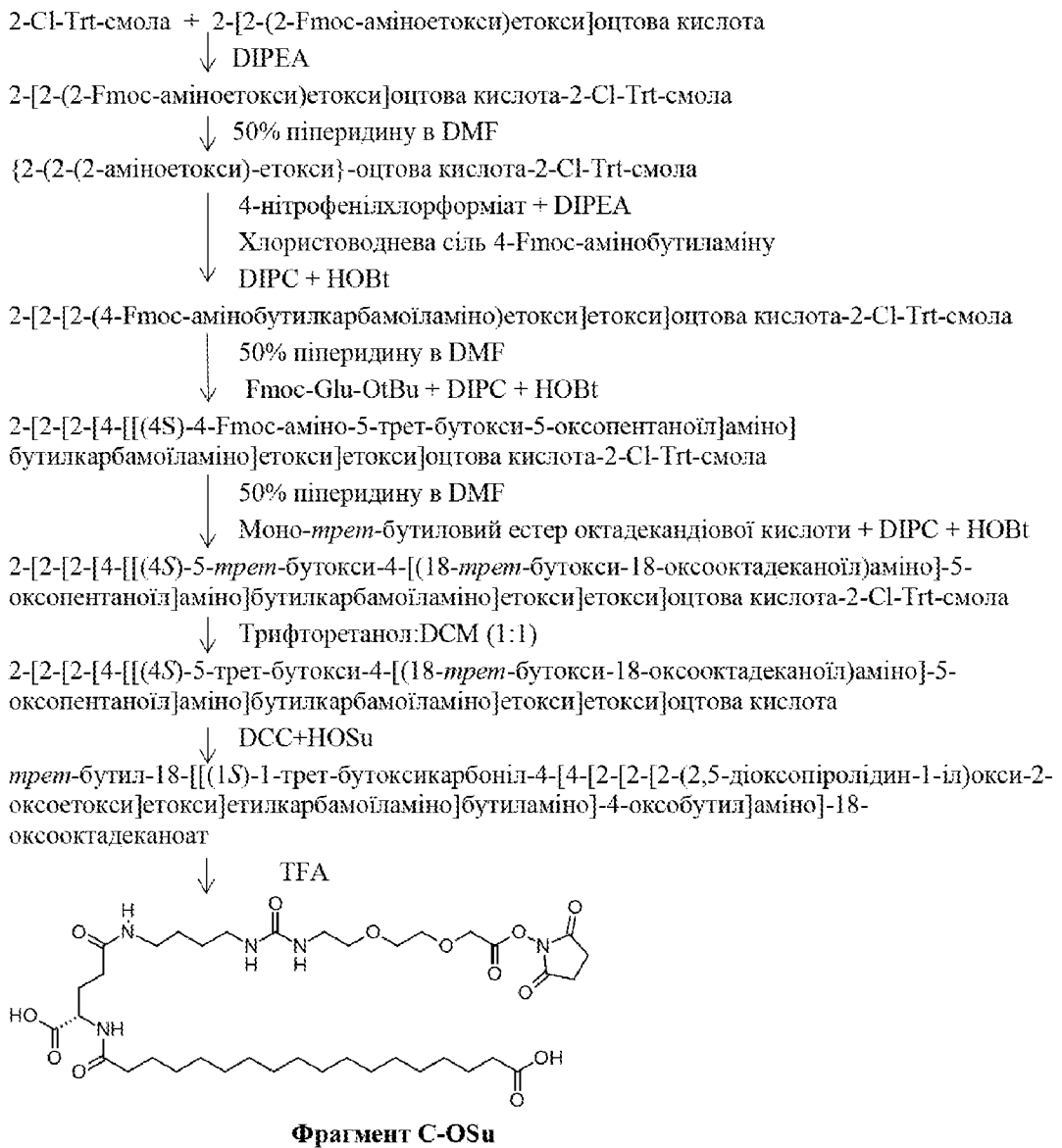
Z являє собою $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, де n являє собою ціле число 14.



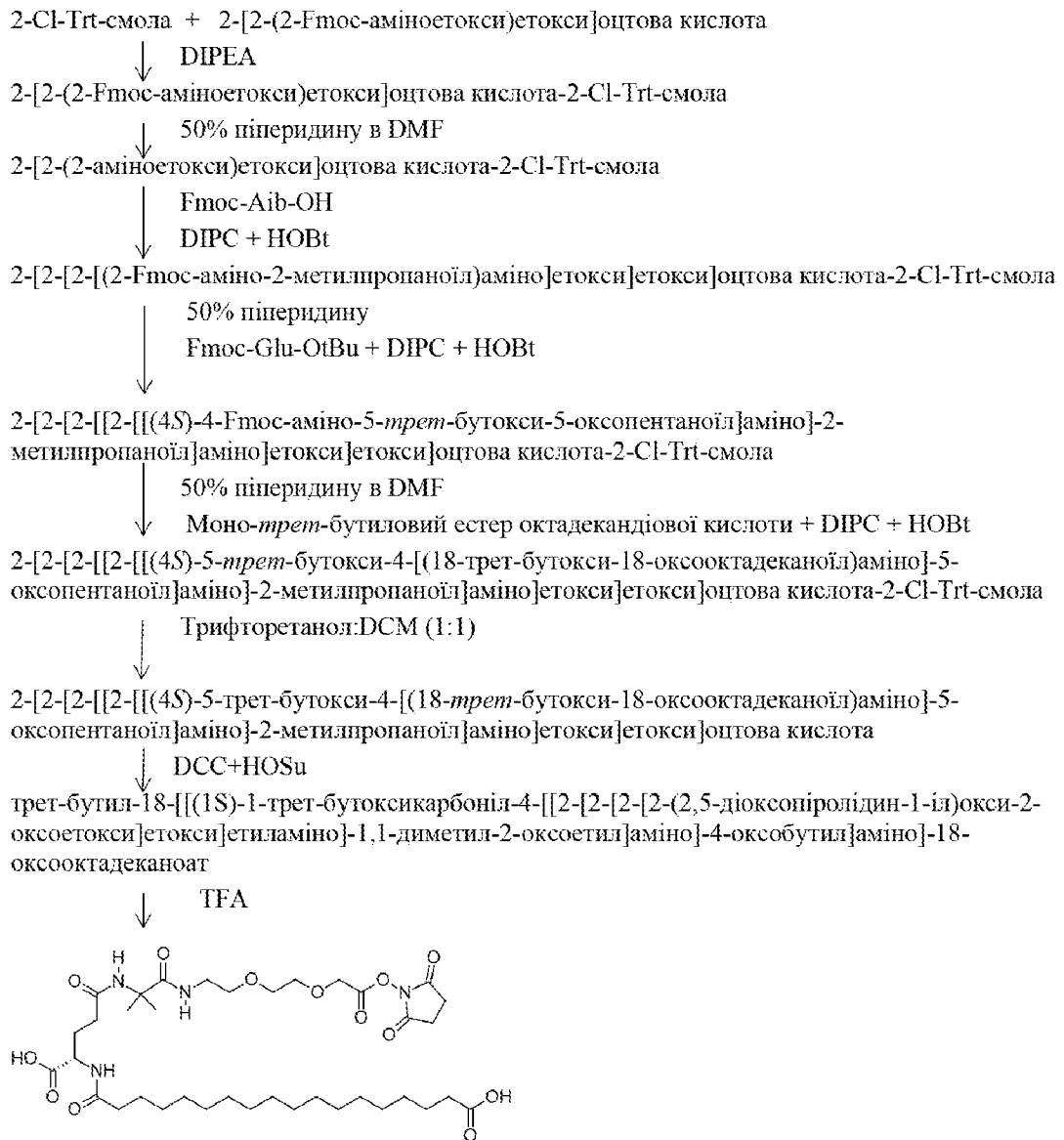
Фіг. 1А



Фіг. 1В

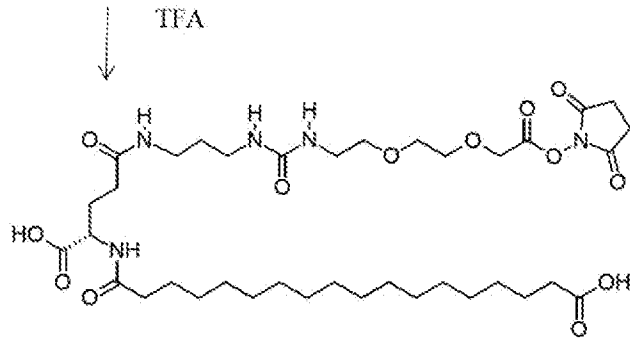
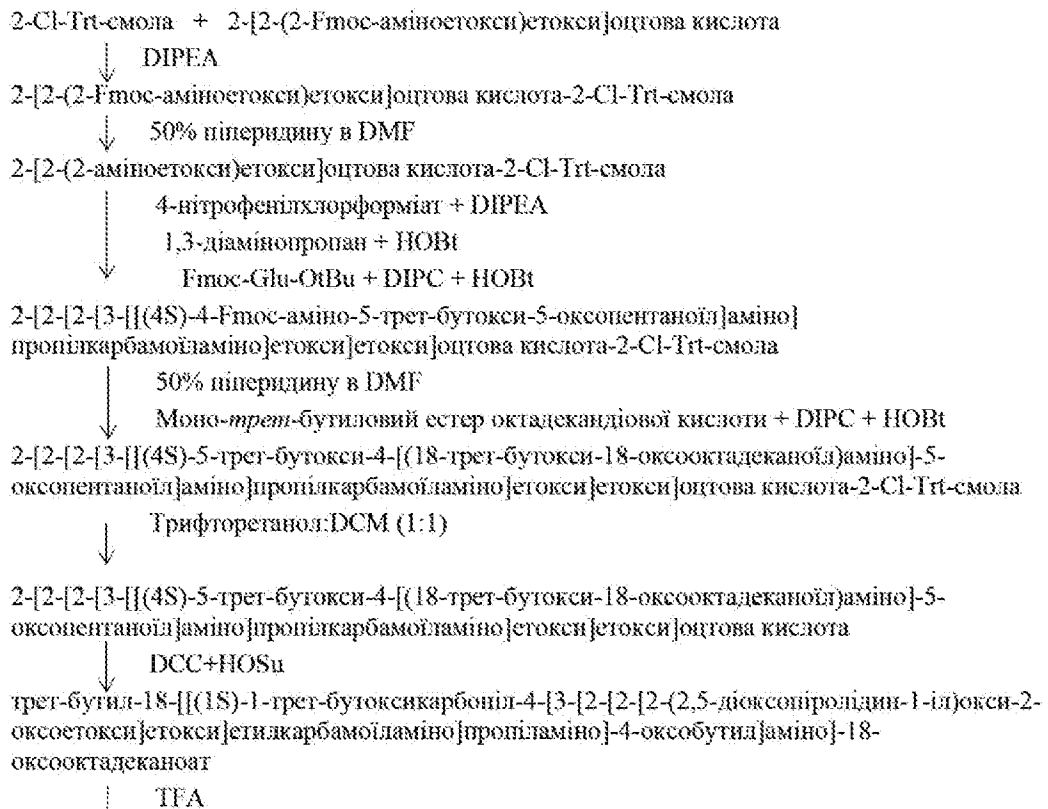


Фіг. 2



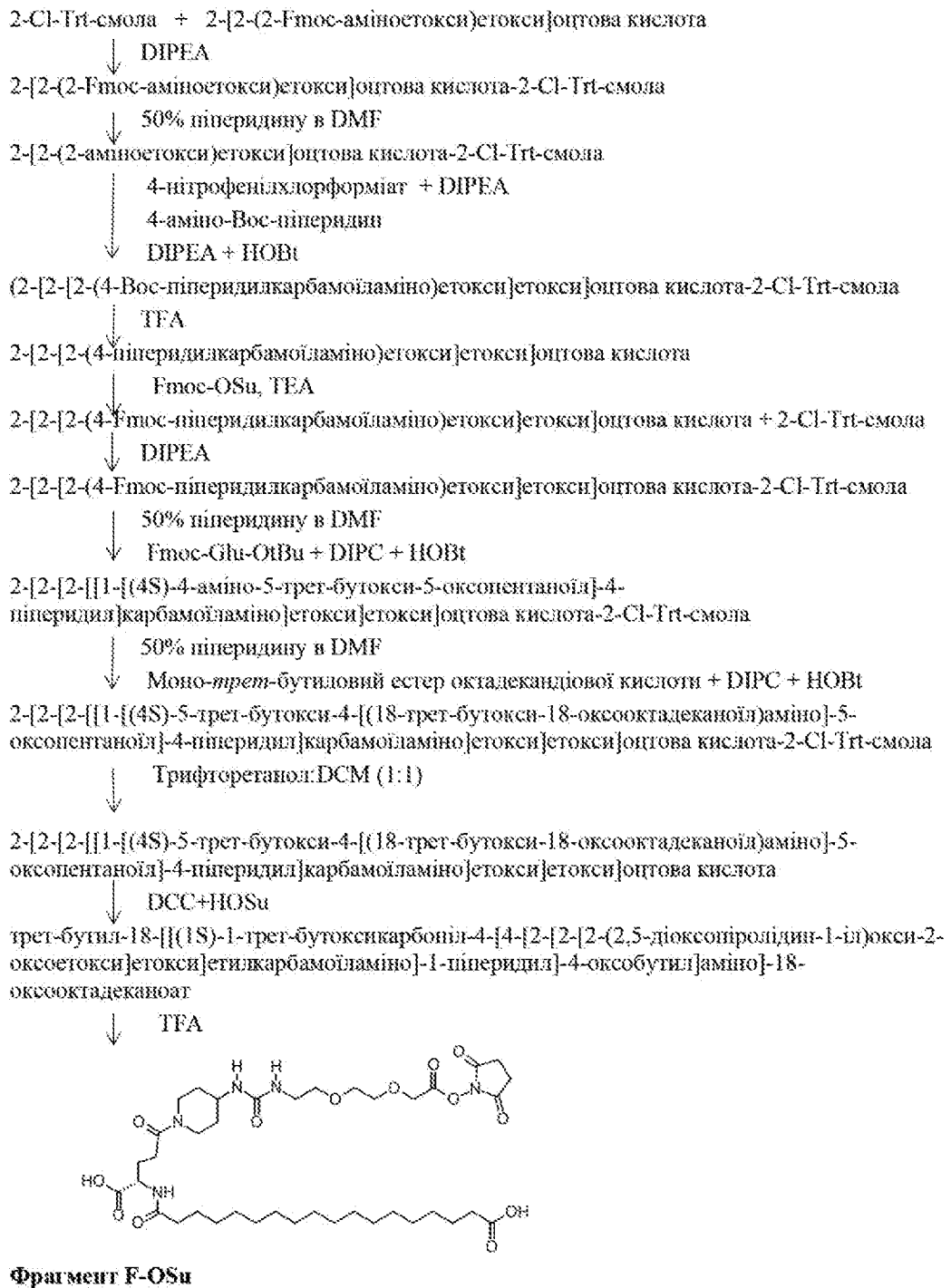
Фрагмент D-OSu

Фіг. 3

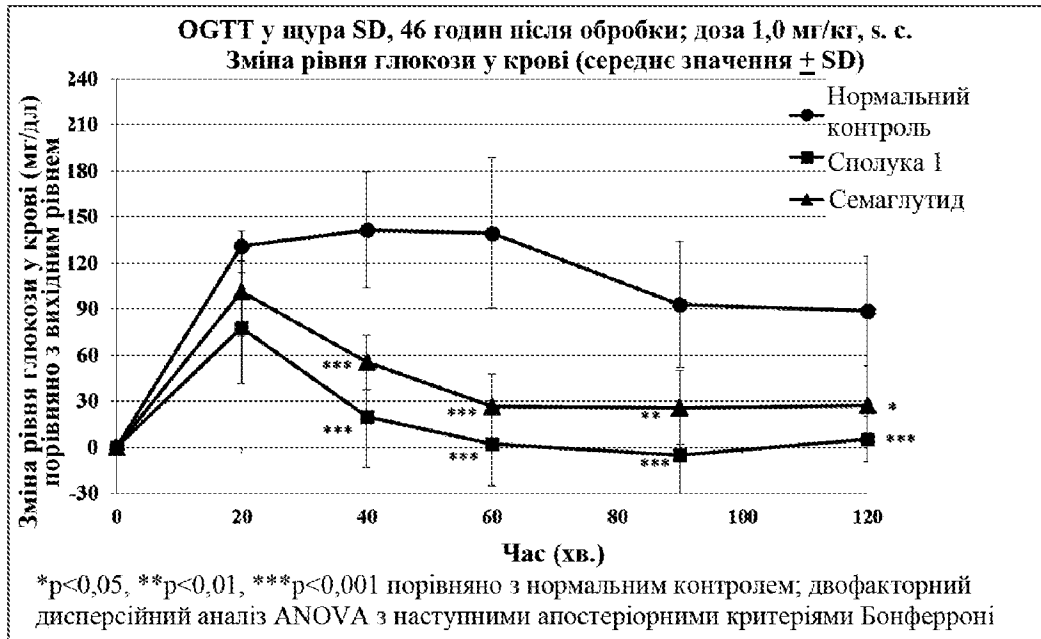


Фрагмент E-OSu

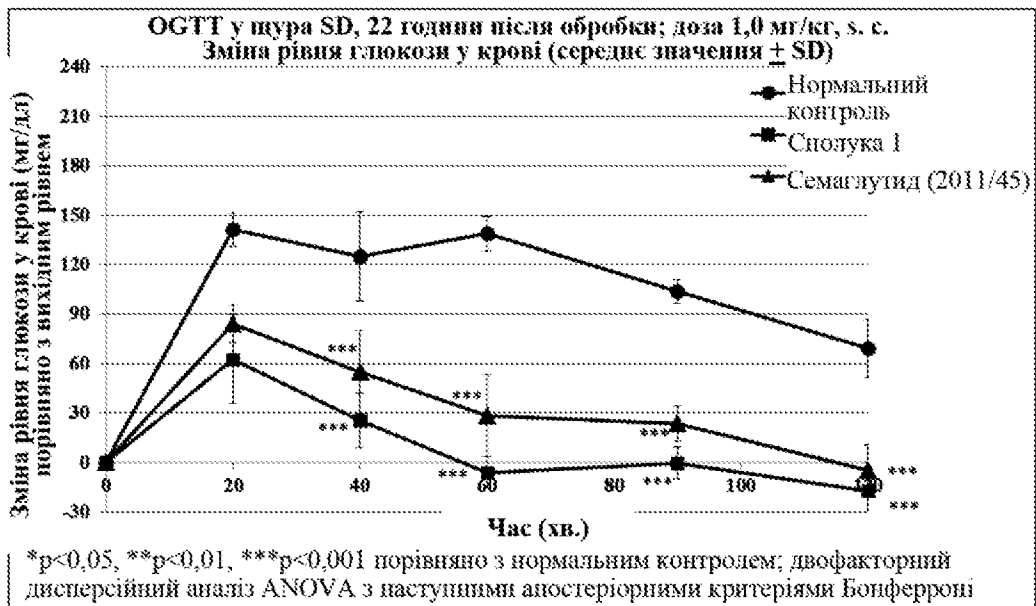
Fig. 4



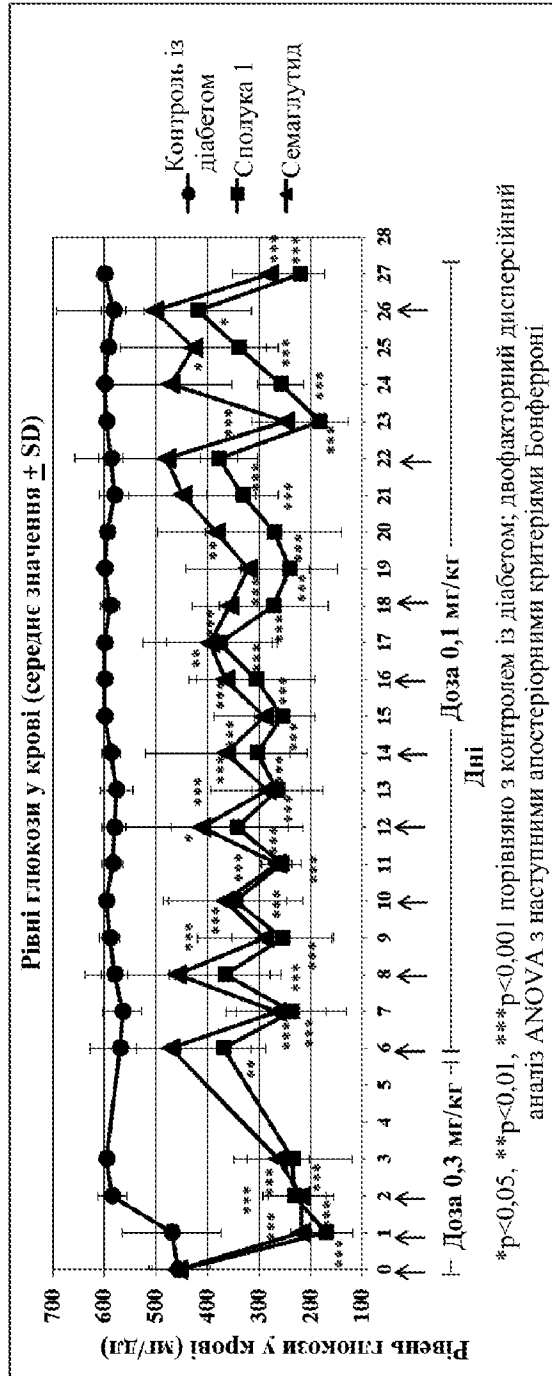
Фіг. 5



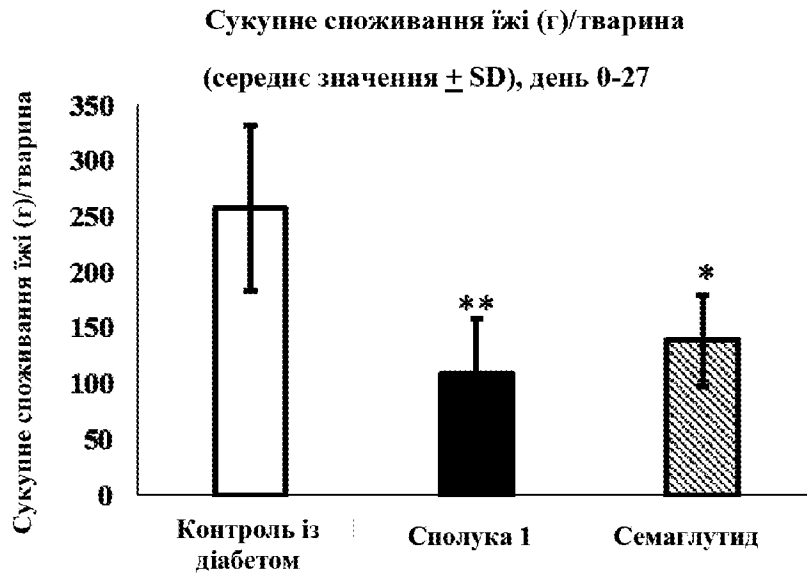
Фіг. 6А



Фіг. 6В

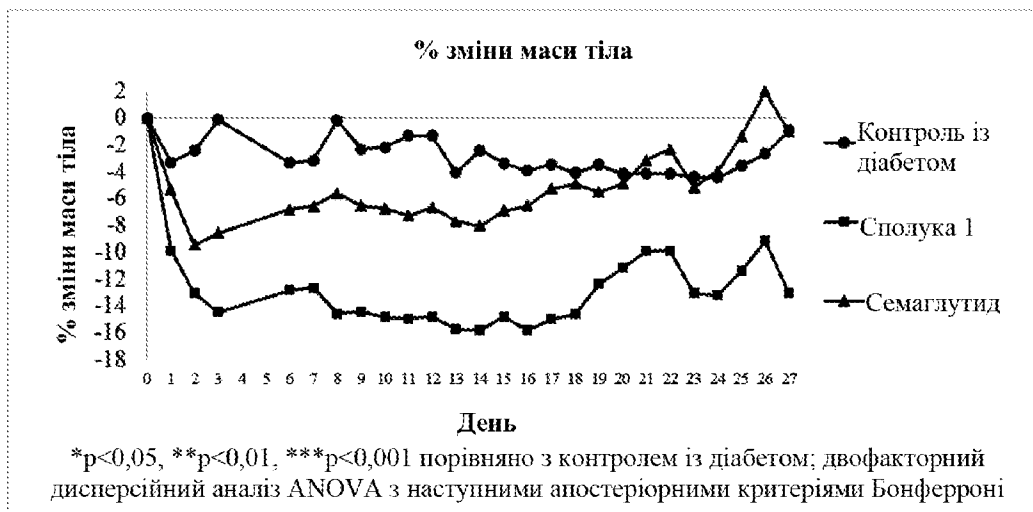


Фіг. 7

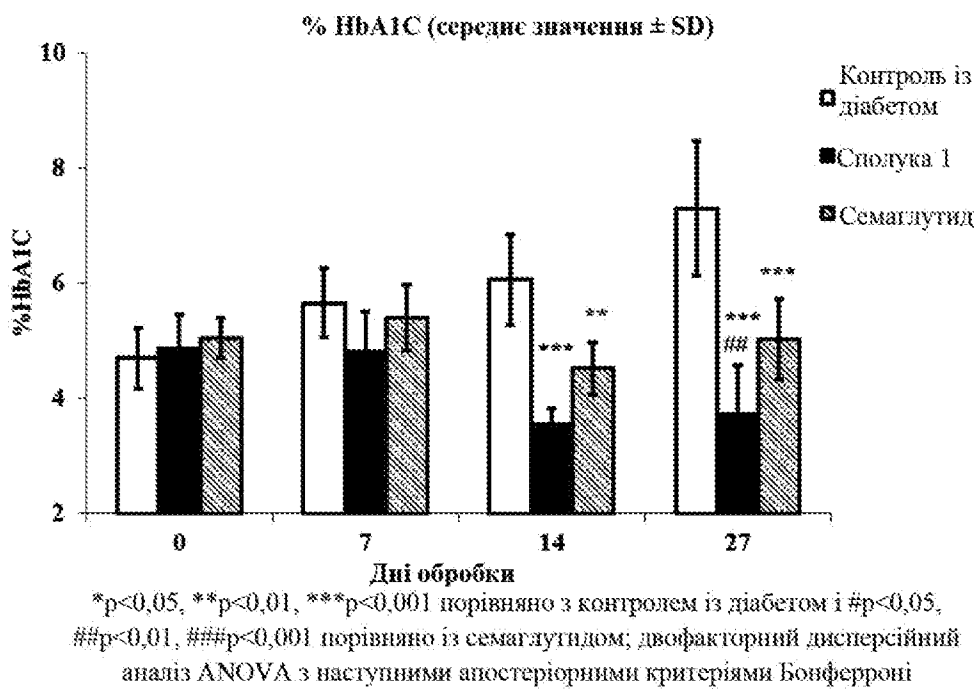


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ порівняно з контролем із діабетом; однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з наступними апостеріорними критеріями Бонферроні

Фіг. 8



Фіг. 9



Фіг. 10