



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96003 (13) C2

(51) МПК

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>

1

(21) a200907977

(22) 31.12.2007

(24) 26.09.2011

(86) PCT/US2007/026490, 31.12.2007

(31) 61/196,711

(32) 29.12.2006

(33) US

(31) 61/066,151

(32) 12.09.2007

(33) US

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) ДОНГ ЧЖЕН КСІН, US, ШЕРІФ-ШЕЙКХ РО-  
ЛАН, ES, КОРДЕРО РІГОЛЬ ХОСЕ-АНТОНІО, ES,  
АЛЛОСА МІРАВЕТЕ РЕСУРРЕКСІОН, ES, ЛА-  
КОМБ ФРЕДЕРІК, ES, ТОБАЛІНА МАЕСТРЕ МА-  
РІЯ ДОЛОРЕС, ES

(73) ІПСЕН ФАРМА С.А.С., FR

(56) US 2005/0159356 A1, 21.07.2005

US 2006/0003918 A1, 05.01.2006

(57) 1. Фармацевтична композиція, що містить аналог GLP-1 [Aib<sup>8,35</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, одержана разом з фармацевтично прийнятною сіллю вказаного аналога або сумішшю солі вказаного аналога і аналога, що таким чином забезпечує молярне співвідношення солі аналога і аналога пептиду у вказаній фармацевтичній композиції, причому молярне співвідношення може регулюватися для регулювання розчинності, значення рН і ефекту вивільнення на параметри вивільнення пептиду in vivo у вказаній фармацевтичній композиції, вказана композиція додатково містить двовалентний метал і/або сіль двовалентного металу, причому молярне співвідношення вказаного аналога GLP-1 і вказаного двовалентного металу і/або солі двовалентного металу у вказаній фармацевтичній композиції становить приблизно від 5,4:1 до приблизно 1,5:1.

2. Фармацевтична композиція за п. 1, де вказаний вибраний двовалентний метал являє собою цинк або мідь.

2

3. Фармацевтична композиція за п. 1, де вказана композиція містить солі двовалентних металів, вибрані з групи, що складається з CuAc<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, ZnAc<sub>2</sub> і/або ZnCl<sub>2</sub>.

4. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 1 або 3, де вказана сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> є фармацевтично прийнятною сіллю органічної кислоти.

5. Фармацевтична композиція за п. 4, де вказана органічна кислота вибрана з групи, що складається з оцтової, трифтороцтової, молочної, яблучної, аскорбінової, янтарної, бензойної, лимонної, метансульфонової і толуолсульфонової кислот.

6. Фармацевтична композиція за п. 4, де вказана кислота являє собою оцтову кислоту.

7. Фармацевтична композиція за п. 1 або 3, де вказана сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> є фармацевтично прийнятною сіллю неорганічної кислоти.

8. Фармацевтична композиція за п. 7, де вказана неорганічна кислота вибрана з групи, що складається з хлористоводневої, бромистоводневої, йодистоводневої, сірчаної і фосфорної кислот.

9. Фармацевтична композиція за п. 7, де вказана кислота являє собою хлористоводневу кислоту.

10. Фармацевтична композиція за п. 1, де діапазон значень молярного співвідношення вказаної солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> і аналога пептиду GLP-1 складає від приблизно 0,5:1 до приблизно 10:1.

11. Фармацевтична композиція за п. 1, де вказана фармацевтично прийнятна сіль являє собою (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>·HCl Zn.

12. Фармацевтична композиція за п. 1, де вказана фармацевтично прийнятна сіль являє собою (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>·ацетат·Zn.

13. Фармацевтична композиція за п. 1, де вказана фармацевтично прийнятна сіль являє собою (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>·HCl мідь.

(13) C2

(11) 96003

(19) UA

Даний винахід стосується удосконалення композицій, що містять пептидні аналоги глюкагоноподібного пептиду-1 і/або їх фармацевтично прийнятні солі, способів одержання таких композицій, фармацевтичних композицій і способів одержання таких композицій для лікування ссавців.

Глюкагоноподібний пептид-1(7-36)амід (GLP-1) синтезується в L-клітинах кишечника при тканинспецифічному пост-трансляційному процесінгу попередника глюкагона передпроглюкагону (Varndell, J.M. et al., *J. Histochem Cytochem*, 1985:33:1080-6) і вивільняється в кров у відповідь на їжу. Концентрація GLP-1 в плазмі підвищується від рівня приблизно 15 пмоль/л натщесерце до максимального рівня 40 пмоль/л після їжі. Було показано, що, при такому підвищенні концентрації глюкози в плазмі, відбувається приблизно трикратне збільшення інсуліну в плазмі, якщо глюкоза надходить перорально в порівнянні з внутрішньовенним введенням (Kreymann B. et al., *Lancet* 1987:2, 1300-4). Таке аліментарне збільшення секреції інсуліну, відоме як "інкретиновий ефект", є передусім гуморальним, і вважають, що GLP-1 є найбільш сильним фізіологічним інкретином людини. Крім інсулінотропного ефекту, GLP-1 придушує секрецію глюкагону, затримує випорожнення шлунка (Wettersgren A. et al., *Dig Dis Sci* 1993:38:665-73) і може підвищувати периферичну утилізацію глюкози (D'Alessio D.A. et al., *J. Clin Invest* 1994:93:2293-6).

У 1994 році внаслідок спостереження було зроблене припущення, що GLP-1 володіє терапевтичною ефективністю, що одинична підшкірна (п/ш) доза GLP-1 може повністю нормалізувати рівні глюкози після їжі у пацієнтів з інсулінонезалежним цукровим діабетом (NIDDM) (Gutniak M.K. et al., *Diabetes Care* 1994:17:1039-44). Цей ефект, як вважають, опосередковується як посиленням секреції інсуліну, так і ослабленням секреції глюкагону. Крім того, було показано, що внутрішньовенне введення GLP-1 затримує випорожнення шлунка після їжі у пацієнтів з NIDDM (Williams B. et al., *J. Clin Endo Metab* 1996:81:327-32). На відміну від похідних сульфонілсечовини, інсулінотропний ефект GLP-1 залежить від концентрації глюкози в плазмі (Holz G.G. 4th, et al., *Nature* 1993:361:362-5). Таким чином, ослаблення секреції інсуліну, опосередковане GLP-1 при низькій концентрації глюкози в плазмі, захищає від важкої гіпоглікемії. Таке поєднання ефектів дає GLP-1 виняткові переваги над іншими засобами, що використовуються в цей час для лікування NIDDM.

Численні дослідження показали, що прийом здоровими індивідами GLP-1 значно впливає на глікемічні рівні, а також концентрацію інсуліну і глюкагону (Orskov C., *Diabetologia* 35:701-711, 1992; Hoist J.J. et al. Potential of GLP-1 in diabetes management in Glucagon III, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Lefebvre P.J., Ed. Berlin, Springer Verlag, 1996, p. 311-326), а ці ефекти залежать від глюкози (Kreymann B. et al., *Lancet* ii: 1300-1304, 1987; Weir G.C. et al., *Diabetes* 38:338-342, 1989). Більше того, GLP-1 також ефективний у пацієнтів з діабетом (Gutniak M., *N. Engl J*

*Med* 226:1316-1322, 1992; Nathan D.M. et al. *Diabetes Care* 15:270-276, 1992), оскільки нормалізує рівні глюкози крові у хворих діабетом типу 2 (Nauck M.A. et al., *Diabetologia* 36:741-744, 1993) і поліпшує глікемічний контроль у хворих діабетом типу 1 (Creutzfeldt W.O. et al. *Diabetes Care* 19:580-586, 1996), що вказує на його здатність, в числі іншого, підвищувати чутливість до інсуліну/знижувати резистентність до інсуліну. GLP-1 і його агоністи були запропоновані для використання у індивідів з ризиком розвитку інсуліннезалежного діабету (дивитесь WO 00/07617), а також для лікування гестаційного діабету (патент США № 20040266670).

Крім вказаного вище, GLP-1 і його агоністи були запропоновані для використання в ряді терапевтичних схем у ссавців, наприклад, людей, включаючи, але ними не обмежуючись: підвищення здатності до навчання, посилення нейропротективної дії і/або зменшення симптому захворювання або розладу центральної нервової системи, наприклад, за рахунок регулювання нейрогенезу, і, наприклад, при хворобі Паркінсона, хворобі Альцгеймера, хворобі Хантінгтона, бічному аміотрофічному склерозі (ALS), інсульті, синдромі дефіциту уваги (ADD) і психоневрологічних синдромах (патентні публікації США №№ 20050009742 і 20020115605); диференціюванні стовбурових клітин/клітин-попередників печінки в функціональні клітини підшлункової залози (WO03/033697); профілактика руйнування бета-клітин (патентні публікації США №№ 20040053819 і 20030220251) і стимуляції проліферації бета-клітин (патентна публікація США № 20030224983); лікування ожиріння (патентна публікація США № 20040018975; WO98/19698); придушення апетиту і стимуляцію почуття насичення (патентна публікація США № 20030232754); лікування синдромом подразненого кишечника (WO 99/64060); зниження захворюваності і/або смертності при інфаркті міокарда (патентна публікація США № 20040162241, WO98/08531) і інсульті (див. WO 00/16797); лікування гострого коронарного синдрому, що виявляється інфарктом міокарда з відсутністю зубця Q на ЕКГ (патентна публікація США № 20040002454); ослаблення післяопераційних катаболічних змін (патент США № 6006753); лікування гібернації міокарда або діабетичної кардіоміопатії (патентна публікація США № 20050096276); зниження рівнів норепінефрину в плазмі (патентна публікація США № 20050096276); посилення виведення натрію з сечею, зниження концентрації калію в сечі (патентна публікація США № 20050037958); лікування станів або розладів, пов'язаних з токсичною гіперволемією, наприклад, при нирковій недостатності, застійній серцевій недостатності, нефротичному синдромі, цирозі, набряку легенів і гіпертензії (патентна публікація США № 20050037958); індукцію інотропного ефекту і посилення скорочуваності серцевого м'яза (патентна публікація США № 20050037958); лікування синдрому полікістозу яєчників (патентні публікації США №№ 20040266678 і 20040029784); лікування дихальної недостатності (патентна публікація США № 20040235726); поліпшення харчування при неаліментарному шляху введення, а

саме, при внутрішньовенній, підшкірній, внутрішньом'язовій, перитонеальній або іншій ін'єкції або інфузії (патентна публікація США № 20040209814); лікування нефропатії (патентна публікація США № 20040209803); лікування систолічної дисфункції лівого шлуночка, наприклад, при патологічній фракції викиду лівого шлуночка (патентна публікація США № 20040097411); інгібування антродуоденальної моторики, наприклад, при лікуванні або профілактиці шлунково-кишкових розладів, таких як діарея, післяопераційний демпінг-синдром і синдром подразненого кишечника, і як медикаментозна підготовка при ендоскопічних процедурах (патентна публікація США № 20030216292); лікування поліневропатії критичного стану (CIPN) і синдрому системної запальної реакції (SIRS) (патентна публікація США № 20030199445); регулювання рівнів тригліцеридів і лікування дисліпидемії (публікації патентів США №№ 20030036504 і 20030143183); лікування ураження тканини органу, викликаного реперфузією кровотоку після ішемії (патентна публікація США № 20020147131); зменшення фактора ризику розвитку коронарної хвороби серця (CHDRF) (патентна публікація США № 20020045636) і інші.

Однак GLP-1 є метаболічно нестабільним, його період напіввиведення з плазми крові ( $t_{1/2}$ ) становить лише 1-2 хвилини *in vivo*. Екзогенно введений GLP-1 також швидко деградує (Deacon C.F. et al., *Diabetes* 44:1126-1131, 1995). Така метаболічна нестабільність обмежує терапевтичні можливості природного GLP-1. Були зроблені спроби поліпшити терапевтичні можливості GLP-1 і його аналогів шляхом поліпшення його лікарських форм. Наприклад, в міжнародній патентній публікації № WO01/57084 описаний процес одержання кристалів аналогів GLP-1, які, як вказується, використовуються при одержанні фармацевтичних композицій, таких як лікарські засоби, що вводяться ін'єкцією, що містять кристали і фармацевтично прийнятний носій. Неоднорідні мікрокристалічні кластери GLP-1(7-37)ОН вирощували з сольових розчинів і аналізували після просочення цинком і/або м-крезолом (Kim and Haren, *Pharma. Res. Vol. 12 No. 11* (1995)). З фосфатних розчинів, що містять цинк або протамін, були одержані сирі суспензії кристалів GLP(7-36)NH<sub>2</sub>, що містять голчасті кристали і аморфний осад (Pridal et. al., *International Journal of Pharmaceutics Vol. 136, pp. 53-59* (1996)). В європейській патентній публікації № EP0619322A2 описане одержання мікрокристалічних форм GLP-1(7-37)ОН шляхом змішування білкових розчинів в буфері pH 7-8,5 з певними комбінаціями солей і низькомолекулярних поліетиленгліколів (ПЕГ). У патенті США № 6566490 описано введення затравки мікрокристалів, і в числі іншого, GLP-1, яке, як вказано, сприяє одержанню очищених пептидних продуктів. У патенті США 6555521 (США ' 521) описані кристали GLP-1, що мають форму тетрагонального плоского стрижня або пластинчасту форму, які, як вказується, володіють підвищеною чистотою і демонструють пролонговану активність *in vivo*. У США ' 521 повідомляється, що такі кристали є відносно однорідними і зберігаються в суспензії протягом більш

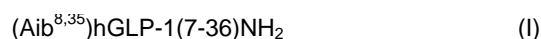
тривалого періоду часу, ніж попередні кристалічні кластери і аморфні кристалічні суспензії, які, як вказано, швидко осідають, агрегують або злипаються, забивають голки для шприців і, як правило, ускладнюють непередбачуване дозування.

Біодеградований триблокспівполімер полі[(dl-лактид-спів-гліколід)-β-етиленгліколь-β-(лактид-спів-гліколід)] був запропонований для використання в лікарських формах з контрольованим вивільненням GLP-1. Однак, як і у випадку інших полімерних систем, одержання триблокспівполімера передбачає складні методики і формування невідповідних частинок.

Аналогічно, також були запропоновані біодеградовані полімери, наприклад, полі(співполімер молочної і гліколевої кислоти) (PLGA), для використання в лікарських формах пептидів з уповільненням вивільнення. Однак використання таких біодеградованих полімерів, не прийнятих в галузі техніки, оскільки ці полімери в основному погано розчинні у воді, і при їх одержанні потрібні органічні розчинники, що не змішуються з водою, наприклад, метиленхлорид, і/або жорсткі умови одержання. Такі органічні розчинники і/або жорсткі умови одержання, як вважають, підвищують ризик індукції конформаційного перетворення цікавлячого пептиду або білка, що приводить до зниження структурної цілісності і порушення біологічної активності (Choi et al., *Pharm. Research, Vol. 21, No. 5, (2004)*). Полоксамери мають аналогічні проблеми.

Композиції GLP-1, описані у вказаних вище посиланнях, не є оптимальними для одержання фармацевтичних композицій GLP, оскільки затримують домішки, і/або існує інша складність, щоб здійснювати відновно виробництво і введення. Також відомо, що аналоги GLP викликають нудоту при підвищених концентраціях, таким чином, існує необхідність забезпечити пролонгований ефект лікарського засобу при знижених початкових концентраціях в плазмі (Ritzel et al., *Diabetologia, 38:720-725* (1995); Gutniak et al. *Diabetes Care, 17(9):1039-1044* (1994); Deacon et al., *Diabetes, 44:1126-1131* (1995)). Отже, існує необхідність в лікарських формах GLP-1 з надійним і простим виробництвом, які можна легко і відновно вводити пацієнту і які забезпечують знижені початкові концентрації в плазмі для того, щоб знизити або виключити небажані побічні ефекти.

Суть винаходу наведена в абзацах нижче, а також в формулі винаходу. Таким чином, винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить аналог GLP-1. Особливо переважним є аналог GLP-1 наступної формули (I):



або його фармацевтично прийнятна сіль, де склад вказаної композиції дозволяє спростити одержання, введення, поліпшити фармакокінетичні і фармакодинамічні властивості, а також мінімізувати негативні побічні ефекти. Переважно, фармацевтична композиція за винаходом не має в своєму складі прозорого водного розчину ZnCl<sub>2</sub> з pH 4, в якому вказаний [Aib<sup>8,35</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> знахо-

диться в концентрації 4 мг/мл і вказаний  $\text{ZnCl}_2$  присутній в концентрації 0,5 мг/мл.

В одному з переважних варіантів здійснення винахід стосується фармацевтичної композиції з поліпшеними характеристиками вивільнення лікарського засобу, переважно, із зниженою початковою концентрацією.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції, що містить сполуку формули (I) з пролонгованою дією.

В іншому варіанті здійснення винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка випадає в осад *in vivo* при фізіологічному значенні pH з утворенням *in situ* депо для забезпечення уповільненого вивільнення лікарського засобу.

У ще одному варіанті здійснення винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить сполуку формули (I), або її фармацевтично прийнятну сіль, і фармацевтично прийнятний носій або розріджувач. Переважно, вказаний носій або розріджувач містить воду.

У переважних варіантах винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить сполуку або аналог пептиду GLP - 1, одержаний у вигляді солі пептиду або у вигляді суміші пептиду і його солі.

Переважно, сіль аналога пептиду GLP - 1 у вказаній фармацевтичній композиції вибрана з переліку фармацевтично прийнятних солей органічних кислот, таких як оцтова, молочна, яблучна, аскорбінова, янтарна, бензойна, лимонна, метансульфонова або толуолсульфонова кислоти, або фармацевтично прийнятних солей неорганічних кислот, таких як хлористоводнева, бромистоводнева, йодистоводнева, сірчана або фосфорна кислоти. Фармацевтично прийнятні солі сильних кислот, таких як хлористоводнева кислота, є особливо переважними. Під сильною кислотою розуміють кислоту з рК<sub>а</sub>, що дорівнює менше 4,5. Іншими переважними солями пептиду у вказаній фармацевтичній композиції є солі органічних кислот, таких як оцтова кислота або трифтороцтова кислота, молочна, яблучна, аскорбінова, янтарна, бензойна або лимонна кислота.

В одному з переважних варіантів здійснення розчинність, pH і характер вивільнення фармацевтичної композиції можуть регулюватися шляхом підбору молярного відношення аналога GLP - 1 в формі солі і аналога GLP - 1 не в формі солі для поліпшення характеристик вивільнення і зменшення початкового піка концентрації аналога GLP - 1.

У переважному варіанті здійснення фармацевтична композиція, крім того, містить двовалентний метал, для зниження розчинності композиції у воді, і, таким чином, поліпшенні характеристик вивільнення, нарівні із зменшенням початкового викиду або піка концентрацій в плазмі. Переважні двовалентні метали включають в себе цинк і мідь. Форми солей двовалентних металів є особливо переважними, включаючи, але ними не обмежуючись, хлоридні і ацетатні солі двовалентних металів. Найбільш переважними є  $\text{CuAc}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnAc}_2$  і/або  $\text{ZnCl}_2$ . Переважно, двовалентний метал і/або солі двовалентного металу знаходяться у вказаній фармацевтичній композиції в концентрації від

приблизно 0,0005 до приблизно 50 мг/мл. Навіть більш переважно, двовалентний метал і/або солі двовалентного металу знаходяться у вказаній фармацевтичній композиції в концентрації від приблизно 0,01 до приблизно 0,50 мг/мл. Більш переважно, вказана фармацевтична композиція містить розріджувач, де вказаний розріджувач містить фармацевтично прийнятний водний розчин. Розріджувач може містити стерильну воду.

В іншому варіанті здійснення вказана фармацевтична композиція додатково містить двовалентний метал і/або сіль двовалентного металу, де молярне співвідношення вказаного аналога GLP - 1 і вказаного двовалентного металу і/або солі двовалентного металу у вказаній фармацевтичній композиції складає від приблизно 6:1 до приблизно 1:1. Переважно, вказане співвідношення складає від приблизно 5,5:1 до приблизно 1:1. Більш переважно, вказане співвідношення складає від приблизно 5,4:1 до приблизно 1,5:1. Однак ще більш переважно, вказане співвідношення становить приблизно 5,4:1, 4,0:1 або 1,5:1. Найбільш переважно, вказане співвідношення становить приблизно 1,5:1. У даному аспекті винаходу "приблизно" означає співвідношення  $1,5:1 \pm 10\%$  кожної вказаної величини, таким чином, передбачуване співвідношення включає в себе співвідношення, що включають, наприклад, 1,35-1,65:0,85-1,15.

Переважно, вказана фармацевтична композиція містить водну суміш, суспензію або розчин, де вказаний аналог GLP - 1, сполука формули (I) або її сіль знаходяться в концентрації приблизно 0,5 - 30 % (мас/мас). Більш переважно, концентрація вказаного аналога GLP - 1 і/або його солі у вказаній водній суміші, суспензії або розчині становить приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 або 30 % (мас/мас). Більш переважно, концентрація вказаного аналога GLP - 1 і/або його солі у вказаному водному розчині становить приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29 або 30 % (мас/мас). Ще більш переважно, концентрація вказаного аналога GLP - 1 і/або його солі у вказаному водному розчині становить приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 22, 23, 24, 25 або 26 % (мас/мас). Ще більш переважно, концентрація вказаного аналога GLP - 1 і/або його солі у вказаному водному розчині становить приблизно 1, 2, 5, 10, 23 або 25 % (мас/мас). Під "приблизно" розуміють наступне: для концентрацій від приблизно 0,5 до приблизно 4 % необхідний діапазон становить  $\pm 0,5\%$  вказаної величини (наприклад, 0,5 - 1,5 % становить приблизно 1 %); для вказаних концентрацій приблизно 5 % і вище, бажаний діапазон становить 20 % вказаної величини (наприклад, 8 - 12 % відповідає приблизно 10 %).

Переважно, концентрація  $[\text{Aib}^{8,35}] \text{hGLP-1(7-36)}\text{NH}_2$ , аналога GLP - 1 або його солі в фармацевтичній композиції становить приблизно 1 % (маса/об'єм), а молярне співвідношення  $[\text{Aib}^{8,35}] \text{hGLP-1(7-36)}\text{NH}_2$  і вказаного двовалентного металу і/або

солі двовалентного металу становить приблизно 1,5:1. Більш переважно, концентрація  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солі у вказаній фармацевтичній композиції становить приблизно 2 % (маса/об'єм), а молярне співвідношення  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  і вказаного двовалентного металу і/або солі двовалентного металу становить приблизно 1,5:1. Ще більш переважно, концентрація  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солі у вказаній фармацевтичній композиції становить приблизно 10 % (маса/об'єм), а молярне співвідношення  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  і вказаного двовалентного металу і/або солі двовалентного металу становить приблизно 1,5:1. Найбільш переважно, концентрація  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солі у вказаній фармацевтичній композиції становить приблизно 23 або приблизно 25 % (маса/об'єм), а молярне співвідношення  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  і вказаного двовалентного металу і/або солі двовалентного металу становить приблизно 1,5:1.

У переважному варіанті здійснення концентрації аналога GLP - 1,  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солей в фармацевтичній композиції становить приблизно 5 % (маса/об'єм), а молярне співвідношення пептиду і двовалентного металу і/або солі двовалентного металу становить приблизно 5,4:1. Більш переважно, концентрація  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солі у вказаній композиції становить приблизно 5 % (маса/об'єм), а вказане співвідношення становить приблизно 4,0:1. Однак більш переважно, концентрація  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солі у вказаній композиції становить приблизно 10 % (маса/об'єм), а вказане співвідношення становить приблизно 5,4:1. Ще більш переважно, концентрація  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  або його солі у вказаній композиції становить приблизно 10 % (маса/об'єм), а вказане співвідношення становить приблизно 4,0:1.

Переважно, вказаний двовалентний метал і/або сіль двовалентного металу знаходяться у вигляді хлориду цинку або ацетату цинку. Більш переважно, вказаний ацетат цинку знаходиться у вигляді  $ZnAc_2 \cdot 2H_2O$ .

В іншому варіанті здійснення вказаний двовалентний метал і/або сіль двовалентного металу знаходяться у вигляді хлориду міді або ацетату міді.

В одному з варіантів здійснення значення pH вказаної фармацевтичної композиції збільшують за допомогою основи. Більш переважно, регулювання вказаного значення pH здійснюють з допомогою NaOH. Ще більш переважно, значення pH вказаної фармацевтичної композиції регулюють з допомогою NaOH, і якщо розбавляють до приблизно 1/2 від початкової концентрації, використовуючи 0,9 % NaCl, то набувають значення pH, рівне приблизно 5,0 - 5,5, використовуючи безпосередньо потенціометричне титрування.

У переважному варіанті здійснення винахід стосується фармацевтичної композиції, яка складена так, що пептидний аналог GLP - 1 або його сіль, наприклад, сполука формули (I) або її сіль, вивільняються в організмі індивіда, наприклад, ссавця, переважно, людини, протягом тривалого

періоду часу. Переважно, вказане вивільнення вказаної сполуки продовжується щонайменше годину, більш переважно, щонайменше 4, 6, 12 або 24 години. Ще більш переважно, вказана композиція складена так, що сполука формули (I) вивільняється в організмі індивіда протягом щонайменше 36, 48, 60, 72, 84 або 96 годин. Більш переважно, вказана композиція складена так, що сполука формули вивільняється в організмі індивіда протягом щонайменше приблизно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 днів. Ще більш переважно, вказана композиція складена так, що сполука формули (I) вивільняється в організмі індивіда протягом щонайменше приблизно 2, 3 або 4 тижнів. Ще більш переважно, вказана композиція складена так, що сполука формули (I) вивільняється в організмі індивіда протягом не менш приблизно 1, 1,5, 2 або 3 місяців або довше.

В одному з аспектів винаходу регулювання складу солей пептидного аналога GLP - 1 у вказаній фармацевтичній композиції поліпшує розчинність і стабільність пептидного аналога GLP - 1 в фармацевтичній композиції і, крім того, забезпечує поліпшення характеру вивільнення *in vivo* за рахунок зниження початкового викиду вивільнення.

Термін "регулювання" в даному аспекті винаходу означає зміну складу солі за рахунок регулювання молярного співвідношення аналога GLP - 1, що знаходиться в формі солі, і аналога GLP - 1 не у вигляді солі.

Ще більш переважно, сіль пептиду у вказаній фармацевтичній композиції являє собою сіль хлористоводневої або оцтової кислоти, або хлориду або ацетату вказаного пептиду формули (I). У вказаній фармацевтичній композиції ацетат або хлорид знаходиться в кінцевому молярному співвідношенні ацетату або хлориду і вказаної сполуки формули (I) в діапазоні від приблизно 0,5:1 до приблизно 10:1. Більш переважно, вказане співвідношення змінюється від приблизно 0,8:1 до приблизно 9:1. Навіть більш переважно, вказане співвідношення складає від приблизно 1:1 до приблизно 6:1. Найбільш переважно, вказане співвідношення становить приблизно 3,0:1, зокрема, 3,2:1.

У цьому аспекті винаходу молярне співвідношення ацетату або хлориду і пептиду означає молярну пропорцію ацетату ( $CH_3COO^-$ ) або хлориду ( $Cl^-$ ) в фармацевтичній композиції до молярної пропорції пептиду в фармацевтичній композиції. Наприклад, при молярному співвідношенні 3:1 в фармацевтичній композиції ацетату, молярний вміст в три рази більше молярного вмісту пептиду в пропорції. Це є стехіометричним співвідношенням сполуки в порівнянні з іншою сполукою.

У даному аспекті винаходу термін "приблизно" означає співвідношення  $1,5:1 \pm 10$  % кожної вказаної величини, таким чином, передбачуване співвідношення включає в себе співвідношення, що включають, наприклад, 1,35 - 1,65:0,85 - 1,15.

В інших переважних аспектах винаходу значення pH фармацевтичної композиції встановлюють шляхом регулювання вмісту ацетату в композиції. Переважно, діапазон значень pH вказаної фармацевтичної композиції складає pH від 3 до 6.

Більш переважно, вказаний діапазон значень pH вказаної фармацевтичної композиції складає pH від 3,5 до 5,5. Найбільш переважно, вказаний діапазон значень pH вказаної фармацевтичної композиції складає pH від 4,2 до 4,6.

Переважно, для підкислення фармацевтичної композиції вміст ацетату може збільшуватися при додаванні оцтової кислоти.

В одному з варіантів здійснення значення pH вказаної фармацевтичної композиції може бути збільшене, виходячи з пептидної солі аналога GLP - 1, що має низький вміст ацетату або, що не містить ацетат, шляхом регулювання вмісту ацетату.

У переважних варіантах здійснення встановлення значення pH в кінцевій фармацевтичній композиції шляхом регулювання вмісту ацетату і хлориду робить можливим регулювання таких параметрів, як концентрація пептиду, концентрація цинку, хімічна стабільність, фізична стабільність і характер вивільнення *in vivo* шляхом зниження початкового викиду вивільнення.

В одному з аспектів винаходу вміст Zn або Cu є фіксованим, а значення pH контролюється шляхом регулювання вмісту ацетату. Підвищений вміст ацетату приводить до поліпшення розчинності і фізичної стабільності, а знижений вміст ацетату приводить до збільшення впливу на значення pH і зниження впливу на  $S_{\text{макс}}$ .

У переважних варіантах здійснення вказана фармацевтична композиція містить водну суміш, суспензію або розчин.

Даний винахід також стосується способу індукції ефекту агоніста GLP - 1, де вказаний спосіб включає приведення рецептора ліганда GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в контакт з аналогом GLP - 1 або його сіллю, напряду або опосередковано.

У вказаному вище способі вказаний рецептор ліганда GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> знаходиться у тварини, переважно, примата, більш переважно, людини. Таким чином, в цьому варіанті здійснення даний винахід стосується способу індукції ефекту агоніста рецептора GLP - 1 у індивіда, який включає введення вказаному індивіду композиції згідно з даним винаходом, де вказана композиція містить ефективну кількість аналога GLP - 1 або його фармацевтично прийнятну сіль.

У переважному аспекті вказаного вище способу вказаний індивід є людиною, страждаючою або, що має ризик розвитку захворювання або стану, вибраного з групи, що складається з діабету типу I, діабету типу II, гестаційного діабету, ожиріння, булімії, відсутності почуття насичення і порушення обміну речовин. Переважно, вказане захворювання являє собою діабет типу I або діабет типу II.

У ще одному більш переважному аспекті вказаного вище способу вказаний індивід є людиною, страждаючою або, що має ризик розвитку захворювання, вибраного з групи, що складається з діабету типу I, діабету типу II, ожиріння, глюкагономи, секреторних розладів дихальних шляхів, артриту, остеопорозу, розладів центральної нервової системи, рестенозу, нейродегенеративного захворювання, ниркової недостатності, застійної серцевої недостатності, нефротичного синдрому, цирозу, набряку легенів, гіпертензії і розладів, при яких

бажано знизити споживання їжі, захворювання або порушення центральної нервової системи (наприклад, за рахунок регулювання нейрогенезу і, наприклад, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера, хвороба Хантінгтона, ALS, інсульт, ADD і психоневрологічні синдроми), синдрому подразненого кишечника, інфаркту міокарда (наприклад, знижуючи пов'язані з ним захворюваність і/або смертність), інсульту, гострого коронарного синдрому (наприклад, відмінного відсутністю зубця Q) інфаркту міокарда; післяопераційних катаболічних змін, гібернації міокарда або діабетичної кардіоміопатії, недостатнього виведення натрію з сечею, надмірної концентрації калію в сечі, станів або розладів, пов'язаних з токсичною гіперволемією (наприклад, при нирковій недостатності, застійній серцевій недостатності, нефротичному синдромі, цирозі, набряку легенів і гіпертензії), синдром полікістозу яєчників, дихальної недостатності, нефропатії, систолічній дисфункції лівого шлуночка (наприклад, при патологічній фракції викиду лівого шлуночка), шлунково - кишкових розладів, таких як діарея, післяопераційний демпінг - синдром і синдром подразненої кишки (а саме, за рахунок інгібування антро - дуоденальної моторики), поліневропатії критичного стану (CIPN), синдрому системної запальної реакції (SIRS), дисліпідемії, ураження тканини органу, викликаного реперфузією кровотоку після ішемії, фактора ризику розвитку ішемічної хвороби серця (CHDRF).

У додатковому аспекті винаходу винахід стосується способу диференціювання стовбурових клітин/клітин - попередників печінки в функціональні клітини підшлункової залози, запобігання руйнуванню бета - клітин і стимуляції проліферації бета - клітин, зниженню рівнів норелінефіну в плазмі крові, індукції інотропного ефекту і посилення скорочуваності серцевого м'яза, поліпшення харчування при неаліментарному шляху (наприклад, за рахунок внутрішньовенної, підшкірної, внутрішньом'язової, перитонеальної або іншої ін'єкції або інфузії), медикаментозної підготовки індивіда до ендоскопічних процедур, і регулювання рівнів тригліцеридів у хворих, де вказаний спосіб включає введення вказаному індивіду композиції згідно з даним винаходом, що містить ефективну кількість сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі. Переважно, вказаний індивід є ссавцем, більш переважно, приматом, ще більш переважно, людиною.

На фіг. 1 представлені параметри плазми (медіана), одержані після однократного підшкірного (s.c.) введення собакам приблизно 1 мг [Aib<sup>8,35</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>. У кожному випадку пептид вводили у вигляді водної цинк - вмісної композиції, що містить приблизно 1 % (мас/об.) пептиду і має молярне співвідношення пептид:Zn, яке дорівнює приблизно 1,5. Зафарбовані квадрати і пусті квадрати відповідають композиціям, в яких значення pH регулюється за допомогою NaOH, як описано в описі; зафарбовані трикутники відповідають композиції, в якій pH не регулювали за допомогою NaOH; зафарбовані кола відповідають композиції, забуференій AcOH/AcO<sup>-</sup>.

На фіг. 2 представлені параметри плазми (медіана), одержані після однократного підшкірного (s.c.) введення собакам приблизно 15 мг  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ . У кожному випадку пептид вводили у вигляді водної цинк - вмісної композиції, що містить приблизно 10 % (мас/об.) пептиду і має молярне співвідношення пептид:Zn, яке дорівнює приблизно 1,5. Зафарбовані квадрати і пусті квадрати відповідають композиціям, в яких значення pH регулюється за допомогою NaOH, як описано в описі; зафарбовані трикутники відповідають композиції, в якій значення pH не регулювали за допомогою NaOH; зафарбовані кола відповідають композиції, забуференої  $AcOH/AcO^-$ .

На фіг. 3 представлені параметри плазми (медіана), одержані після однократного підшкірного (s.c.) введення собакам приблизно 1 мг  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ . У кожному випадку пептид вводили у вигляді напівтвердої водної цинк - вмісної композиції таким чином: чорні кола: приблизно 5 % (мас/об.) пептиду, молярне співвідношення пептид:Zn становить приблизно 5,4:1, без регулювання значення pH; білі кола: приблизно 10 % (мас/об.) пептиду, молярне співвідношення пептид:Zn становить приблизно 5,4:1, без регулювання значення pH; білі квадрати: приблизно 10 % (мас/об.) пептиду, молярне співвідношення пептид:Zn становить приблизно 5,4:1, pH регулювали за допомогою NaOH; чорні квадрати: приблизно 10 % (мас/об.) пептиду, молярне співвідношення пептид:Zn становить приблизно 4:1, pH регулювали за допомогою NaOH.

На фіг. 4 схематично представлені різні пристрої, які можна використати для одержання деяких композицій згідно з даним винаходом.

На фіг. 5 представлені параметри плазми (медіана), одержані після однократного підшкірного (s.c.) введення собакам приблизно 1 мг  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ . Пептид вводили у вигляді водної цинк - вмісної композиції з концентрацією пептиду, що дорівнює приблизно 2 %, і молярним співвідношенням пептид:Zn, яке дорівнює приблизно 1,5:1.

На фіг. 6 представлені параметри плазми (медіана), одержані після однократного підшкірного (s.c.) введення собакам приблизно 15 мг  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ . Пептид вводили у вигляді напівтвердої цинк - вмісної композиції з концентрацією пептиду, що дорівнює приблизно 25 %, і молярним співвідношенням пептид:Zn, яке дорівнює приблизно 4:1.

На фіг. 7 представлені параметри плазми (медіана), одержані після однократного підшкірного (s.c.) введення собакам приблизно 15 мг  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ . Пептид вводили у вигляді напівтвердої цинк - вмісної композиції з концентрацією пептиду, що дорівнює приблизно 23 %, і молярним співвідношенням пептид:Zn, яке дорівнює приблизно 1,5:1.

На фіг. 8 представлений повний цикл параметрів плазми (медіана), одержаних після однократного підшкірного (s.c.) введення щурам 0,3 мг (3 мкл 10 % розчину) аналізованих композицій HCl - солі аналога GLP - 1:

(1) HCl - сіль  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  з  $CuCl_2$ : молярне співвідношення  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2/CuCl_2$  становить 1,5:1. Концентрація пептиду становить 10 % (30 мМ) у воді (мас/мас.) з приблизно pH 5,5.

(2) HCl - сіль  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  з  $ZnCl_2$ : молярне співвідношення  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2/ZnCl_2$  становить 1,5:1. Концентрація пептиду становить 10 % (30 мМ) у воді (мас/мас.) з приблизно pH 5,5.

На фіг. 9 представлений повний цикл параметрів плазми (медіана), одержаних після однократного підшкірного (s.c.) введення щурам 0,3 мг (3 мкл 10 % розчину) аналізованих композицій ацетатної солі аналога GLP - 1:

Ацетатна сіль  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$  з  $ZnCl_2$ : молярне співвідношення  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2/ZnCl_2$  становить 1,5:1. Концентрація пептиду становить 10 % (30 мМ) у воді (мас/мас.) з pH приблизно 5,5.

На фіг. 10 представлена початкова частина параметрів плазми (медіана), одержаних після однократного підшкірного (s.c.) введення щурам 0,3 мг (3 мкл 10 % розчину) аналізованих композицій, поданих на фіг. 8.

На фіг. 11 представлена початкова частина параметрів плазми (медіана), одержаних після однократного підшкірного (s.c.) введення щурам 0,3 мг (3 мкл 10 % розчину) аналізованих композицій, поданих на фіг. 9.

На фіг. 12 представлений розрахований процент  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ , що залишився на місці ін'єкції у щурів після однократного підшкірного (s.c.) введення 0,3 мг (3 мкл 10 % розчину) трьох композицій, що аналізуються, поданих на фіг. 8.

Переважає пептид GLP - 1, який може бути використаний у вигляді солі пептиду за винаходом, позначений в описі таким чином, наприклад,  $[Aib^{8,35}]hGLP-1(7-36)NH_2$ , з амінокислотними замінами в природній послідовності, розташованими в перших дужках (наприклад,  $Aib^{8,35}$  означає, що  $Ala^8$  і  $Gly^{35}$  в hGLP - 1 замінені на Aib). Aib є аббревіатурою  $\alpha$  - аміноізомасляної кислоти.

Абревіатура GLP - 1 означає глюкагоноподібний пептид - 1; hGLP - 1 означає глюкагоноподібний пептид - 1 людини. Цифри між другими дужками означають число амінокислот в пептиді (наприклад, hGLP-1(7-36) означає амінокислоти 7 - 36 пептидної послідовності GLP - 1 людини). Послідовність hGLP-1(7-37) приведена в статті Mojsov S., Int. J. Peptide Protein Res., 40, 1992, pp. 333 - 342. Позначення "NH<sub>2</sub>" в hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> вказує на те, що C - кінець пептиду є амідованим. hGLP-1(7-36) означає, що C - кінець є вільною кислотою. У hGLP-1(7-38) залишки в положеннях 37 і 38 є Gly і Arg, відповідно, якщо не вказано інше.

Особливо переважні аналоги пептиду GLP - 1, що використовуються в даному винаході, знаходяться в формі фармацевтично прийнятних солей. Приклади таких солей включають, але ними не обмежуються, солі органічних кислот (наприклад, оцтової, молочної, малеїнової, лимонної, яблучної, аскорбінової, янтарної, бензойної, метансульфонові, толуолсульфонові або памові кислот),

неорганічних кислот (наприклад, хлористоводневої кислоти, сірчаної кислоти або фосфорної кислоти) і полімерних кислот (наприклад, дигалової кислоти, карбоксиметилцелюлози, полімолочної, полігліколевої або співполімерів полі(молочної - гліколевої) кислот). Звичайний спосіб одержання солі пептиду згідно з даним винаходом добре відомий в даній галузі і може проводитися стандартними способами обміну солей. Таким чином, сіль ТФО пептиду згідно з даним винаходом (сіль ТФО одержують після очищення пептиду шляхом використання препаративної ВЕРХ, елюючи ТФО - вмісними буферними розчинами) може бути перетворена в іншу сіль, таку як ацетатна сіль, шляхом розчинення пептиду в невеликій кількості 0,25 н. водного розчину оцтової кислоти. Одержаний розчин наносять на напівпрепаративну колонку ВЕРХ (Zorbax, 300 SB, C - 8). Колонку елюють (1) 0,1 н. водним розчином ацетату амонію протягом 0,5 години, (2) 0,25 н. водним розчином оцтової кислоти протягом 0,5 години і (3) в лінійному градієнті (20 - 100 % розчину В протягом 30 хвилин) з швидкістю потоку 4 мл/хв. (розчин А являє собою 0,25 н. водний розчин оцтової кислоти; розчин В являє собою 0,25 н. оцтову кислоту в ацетонітрилі/воді 80:20). Фракції, що містять пептид, збирають і ліофілізують досуха.

Фахівцям в даній галузі добре відомо, що відоме і можливе застосування GLP - 1 по - різному і численно (див. Todd J.F. et al., Clinical Science, 1998, 95, pp. 325-329; і Todd J.F. et al., European Journal of Clinical Investigation, 1997, 27, pp.533 - 536). Таким чином, введення сполук за винаходом для індукції ефекту агоніста може мати ті ж ефекти і застосування, що і власне GLP - 1. Ці різноманітні шляхи застосування GLP - 1 можуть бути підсумовувані в залежності від лікування таким чином: діабет типу I, діабет типу II, ожиріння, глюкагонома, секреторні розлади дихальних шляхів, порушення обміну речовин, артрит, остеопороз, розлади центральної нервової системи, рестеноз, нейродегенеративне захворювання, ниркова недостатність, застійна серцева недостатність, нефротичний синдром, цироз, набряк легенів, гіпертензія і розлади, при яких бажано знизити споживання їжі, а також різні інші стани або порушення, що обговорюються в описі. Таким чином, об'ємом даного винаходу передбачені описані в даному описі фармацевтичні композиції, що містять як активний компонент сполуку формули (I).

Доза активного компонента в композиціях згідно з даним винаходом може застосовуватися, однак необхідна, щоб кількості активного компонента було достатньо для одержання відповідної дози. Вибрана доза залежить від бажаного терапевтичного ефекту, способу введення і тривалості лікування і, як правило, визначається лікуючим лікарем. Звичайно ефективна доза для здійснення винаходу знаходиться в діапазоні від  $1 \times 10^{-7}$  до 200 мг/кг/день, переважно від  $1 \times 10^{-4}$  до 100 мг/кг/день і може бути введена у вигляді одиничної дози або розділена на множину доз.

Композиції за винаходом переважно вводять парентерально, наприклад, внутрішньом'язово,

внутрішньочеревинно, внутрішньовенно, підшкірно і тому подібне.

Препарати за винаходом для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії, гелі або емульсії, за умови досягнення бажаних параметрів вивільнення *in vivo*. Прикладами неводних розчинів або везикул є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як оливкова олія і кукурудзяна олія, желатин і ін'єктовані складні органічні ефіри, такі як етилолеат. Такі лікарські форми можуть також містити допоміжні речовини, такі як консерванти, зволожувачі, емульгатори і диспергуючі агенти. Ці форми можуть бути стерилізовані, наприклад, шляхом фільтрування через затримуючий бактерії фільтр, шляхом додавання стерилізуючих агентів в композиції, шляхом опромінення композицій або шляхом нагрівання композицій. Також вони можуть бути одержані у вигляді твердих стерильних композицій, які можуть бути розчинені в стерильній воді або деякому іншому стерильному ін'єктованому середовищі безпосередньо перед використанням.

Пептиди, які можуть бути використані в практиці даного винаходу, можуть бути одержані і були одержані за допомогою стандартного твердофазного синтезу пептидів. Дивіться, наприклад, Stewart J.M. et al., Solid Phase Synthesis (Pierce Chemical Co., 2d ed. 1984).

Наступні приклади описують способи синтезу, які можуть бути і були використані для одержання пептидів, з якими даний винахід може бути ефективно використаний на практиці, при цьому способи синтезу добре відомі фахівцям в даній галузі. Інші способи також добре відомі фахівцям в даній галузі. Приклади наведені з метою ілюстрації і не призначені для обмеження об'єму даного винаходу.

Вказані пептиди, такі як аналог GLP - 1, можуть бути одержані різними способами синтезу, добре відомими фахівцям в даній галузі, які можуть включати остаточне осадження пептиду, процес ліофілізації, сушіння у вакуумі або інші відомі в даній галузі способи сушіння. Іонообмінна хроматографія, осмотичний обмін буфера і дифільтрація можуть бути відповідними способами в даному винаході для очищення або виділення пептиду у вигляді різних солей.

Вос-βAla-OH, Вос-D-Arg(Tos)-OH і Вос-D-Asp(OcHex) були придбані у Nova Biochem, Сан-Дієго, Каліфорнія. Вос-Aun-OH був придбаний у Bachem, Кінг-оф-Прусія, Пенсильванія. Вос-Ava-OH і Вос-Ado-OH були придбані у Chem-Impex International, Вуд-Дейл, Ілінойс. Вос-2Nal-OH був придбаний у Synthetech, Inc., Олбані, Орегон.

Далі приведені розшифровки інших аббревіатур, що використовуються в даному описі: Вос - тре-бутилоксикарбоніл, HF - фтороводень, Fm - форміл, Хап - ксантил, Bzl - бензил, Tos - тозил, DNP - 2,4-динітрофеніл, ДМФА (DMF) - диметилформамід, ДХМ (DCM) - дихлорметан, НВТУ - 2-(1Н-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію гексафторфосфат, DIEA - діізопропілетиламін, НОАс - оцтова кислота, ТФО - трифтороцтова кислота, 2ClZ - 2-хлорбензилоксикарбоніл, 2BrZ - 2-



бромбензилоксикарбоніл, OcHex - О-циклогексил, Fmoc - 9-флуоренілметоксикарбоніл, HOBt - N-гідроксисбензотриазол, РАМ-смола - 4-гідроксиметилфенілацетамідометильна смола, Tris (Tris) - трис(гідроксиметил)амінометан і Tris (Bis - Tris) - біс(2-гідроксіетил)аміно-трис(гідроксиметил)метан (а саме, 2-біс(2-гідроксіетил)аміно-2-(гідроксиметил)-1,3-пропандіол). Термін "галоген" включає фтор, хлор, бром і йод.

Якщо не указано інакше, всі технічні і наукові терміни, що використовуються мають ті ж значення, які відомі середньому фахівцеві в даній галузі, до якої належить даний винахід. Крім того, всі публікації, патентні заявки і патенти, а також інші вказані в даному описі посилання включені як посилання.

#### Приклад 1

[Aib<sup>8,35</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>

Докладний опис способу синтезу [Aib<sup>8,35</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> даний в міжнародній патентній публікації № WO00/34331 (РСТ/EP99/09660), вміст якої приведений в даному описі в повному об'ємі. Стикло, сполуку синтезували з використанням пептидного синтезатора Applied Biosystems (Фостер Ситі, Каліфорнія), модель 43 ОА, який був модифікований для прискорення твердофазного синтезу пептидів з використанням Boc - хімії. Див. Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res., 40:180 (1992). Використали 4-метилбензгідріламінову (МВНА) смолу (Peninsula, Бельмонт, Каліфорнія) із заміщенням 0,91 ммоль/г. Використали Boc-амінокислоти (Bachem, Каліфорнія, Torrance, Каліфорнія; Nova Biochem., Лайола, Каліфорнія) з наступним захистом бічних ланцюгів: Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, Boc-His(DNP)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Gln-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Lys(2ClZ)-OH, Boc-Thr(Bzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH і Boc-Trp(Fm)-OH. Boc-групи видаляли шляхом обробки 100 % ТФО протягом 2×1 хвилину. Boc - амінокислоти (2,5 ммоль) заздалегідь активували з допомогою HBTU (2,0 ммоль) і DIEA (1,0 мл) в 4 мл ДМФА і проводили реакцію приєднання без попередньої нейтралізації солі ТФО пептиду на смолі. Час реакції приєднання становив 5 хвилин, за винятком залишків Boc-Aib-OH і наступних залишків, Boc-Luys(2CLZ)-OH і Boc-His(DNP)-OH, для яких час реакції приєднання становив 2 години.

У кінці збирання пептидного ланцюга смолу обробляли розчином 20 % меркаптоетанол/10 % DIEA в ДМФА протягом 2×30 хвилин для видалення DNP - груп бічного ланцюга His. N-кінцеву Boc-групу потім видаляли обробкою 100 % ТФО протягом 2×2 хвилини. Після нейтралізації пептиду - смоли з допомогою 10 % DIEA в ДМФА (1×1 хвилину), формільну групу бічного ланцюга Trp видаляли за допомогою розчину 15 % етаноламін/15 % вода/70 % ДМФА протягом 2×30 хвилин. Пептид - смолу промивали ДМФА і ДХМ і сушили при зниженому тиску. Кінцеве розщеплення проводили при перемішуванні пептиду - смоли в 10 мл HF, що містить 1 мл анізолу і дітіотреїтолу (24 мг) при 0

°C протягом 75 хвилин. HF видаляли в потоку азоту. Залишок промивали простим ефіром (6×10 мл) і екстрагували 4 н. HOAc(6×10мл).

Пептидну суміш у водному екстракті очищали з допомогою препаративної вискоєфективної рідинної хроматографії із зворотною фазою (ВЕРХ), використовуючи колонку із зворотною фазою VYDAC® C18 (Nest Group, Southborough, Massachusetts). Колонку елюювали в лінійному градієнті (20 - 50 % розчину В протягом 105 хвилин) з швидкістю потоку 10 мл/хв. (розчин А = вода, що містить 0,1 % ТФО; розчин В = ацетонітрил, що містить 0,1 % ТФО). Фракції збирали і перевіряли за допомогою аналітичної ВЕРХ. Фракції, що містять чистий продукт, об'єднували і ліофілізували досуха. В одному з прикладів синтезу сполуки було одержано 135 мг білої твердої речовини. Чистота становила 98,6 % на основі аналізу з допомогою аналітичної ВЕРХ. Аналіз мас - спектрометрії з іонізацією електроспреем (MS(ES))S дав молекулярну масу 3339,7 (у повній відповідності до обчисленої молекулярної маси 3339,7).

#### Приклад 2

Методика одержання лікарської форми I

2.1. Матеріали, базові розчини, розрахунки

А) Матеріали: ZnCl<sub>2</sub>, гранули NaOH і хлористоводневу кислоту, 35 %, одержували від Panreac Quimica, Барселона, Іспанія. WFI (стерильну воду для ін'єкцій/промивання) одержували від B. Braun Medical, Барселона, Іспанія.

В) Базові розчини

(i) ZnCl<sub>2</sub>, pH=3:

1. При перемішуванні додавали 35 % HCl в WFI до досягнення pH=3.

2. У мірну колбу переносили зважену кількість ZnCl<sub>2</sub>. При перемішуванні додавали pH=3 HCl до досягнення кінцевої концентрації приблизно 1 - 4 мг ZnCl<sub>2</sub>.

(ii) ZnCl<sub>2</sub>, pH=2:

1. При перемішуванні додавали 35 % HCl в WFI до досягнення pH=2.

2. У мірну колбу переносили зважену кількість ZnCl<sub>2</sub>. При перемішуванні додавали pH=2 HCl до досягнення кінцевої концентрації приблизно 4 - 12 мг ZnCl<sub>2</sub>/мл.

(iii) NaOH, 0,1 - 10 мг/мл:

1. У мірну колбу переносили зважену кількість NaOH. При перемішуванні додавали WFI до досягнення кінцевої концентрації приблизно 0,1 - 10 мг NaOH/мл.

(iv) Ліофілізовані 20 - мг аліквоти (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/флакони:

1. Одержували 0,04 % (об./об.) розчин оцтової кислоти і WFI.

2. У мірну колбу переносили зважену кількість (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (ацетатна сіль). При перемішуванні додавали достатню кількість 0,04 % оцтової кислоти до досягнення кінцевої концентрації 20 мг (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/мл. Після стерилізації фільтруванням на фільтрах розміром 0,45 мікрон, аліквоти по 1 мл розчину переносили у флакони для ліофілізації, розчини ліофілізували, і висушений продукт зберігали при - 22 °C.

(v) Ліофілізовані 50 - мг аліквоти [Aib<sup>8,35</sup>]hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/флакони:

1. Одержували 0,1 % (об./об.) розчин оцтової кислоти і WFI.

2. У мірну колбу переносили зважену кількість (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (ацетатна сіль). При перемішуванні додавали достатню кількість 0,1 % оцтової кислоти до досягнення кінцевої концентрації 50 мг (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/мл. Після стерилізації фільтруванням, аліквоти по 1 мл розчину переносили у флакони для ліофілізації і ліофілізували.

С) Розрахунки

(i) Визначення загальної маси/об'єму наповнювача (E) для композиції:

$$E = (A \times 100 / T) - (A / P)$$

де:

E = наповнювач в мг;

A = вміст чистого пептиду (мг);

T = цільова концентрація композиції; наприклад, 2, якщо метою є 2 %; і

P = концентрація чистого пептиду (мг пептиду/100 мг складу).

Що стосується загального об'єму наповнювача, приймається допущення, що 1 мл = 1 г.

(ii) Визначення об'єму/маси (W) ZnCl<sub>2</sub> для додання в кожний мл або г розчину композиції:

а) W=100 % E для композиції, в якій регулювання pH не здійснюється;

б) W=80 % E для рідких композицій, в яких пептид становить приблизно 1 % або приблизно 2 %, або приблизно до 10 %, і pH регулюють за допомогою основи;

с) W=50 % E для напівтвердих або гелевих композицій, в яких пептид становить приблизно 1 % або приблизно 2 %, або приблизно до 10 %, і pH регулюють за допомогою основи;

д) W=66,66 % E для напівтвердих або гелевих композицій, в яких пептид становить приблизно 25 %, і pH регулюють за допомогою основи;

е) W=90 % E для складів, в яких пептид відновлюють з ліофілізованого препарату, і pH регулюють за допомогою основи.

(iii) Визначення об'єму/маси (W) NaOH для додання в кожний мл або г розчину композиції:

а) W=20 % E для композицій, в яких пептид становить приблизно 1 % або приблизно 2 %, або приблизно до 10 %, і pH регулюють за допомогою основи;

б) W=50 % E для напівтвердих або гелевих композицій, в яких пептид становить приблизно 1 % або приблизно 2 %, або приблизно до 10 %, і pH регулюють за допомогою основи;

с) W=33,33 % E для напівтвердих або гелевих композицій, в яких пептид становить приблизно 25 %, і pH регулюють за допомогою основи;

д) W=10 % E для композицій, в яких пептид відновлюють з ліофілізованого препарату, і pH регулюють за допомогою основи.

(iv) Визначення концентрації ZnCl<sub>2</sub> (мг/мл або мг/г), яку використовують в кожній композиції:

$$[ZnCl_2] = (136,29 \times A) / (W \times 3339,76 \times R)$$

де:

A = вміст чистого пептиду (мг);

R = молярне співвідношення пептид/Zn;

R=1,5 для композицій, в яких пептид становить приблизно 1 % або приблизно 2 %, або приблизно 10 %, або приблизно до 23 %;

R=4,0 для композицій, в яких пептид становить приблизно 25 %; і

W = маса (г) або об'єм (мл) розчину ZnCl<sub>2</sub>, які додають до кожного г або мл розчину композиції.

2.2. Одержання композицій з 1 - 10 % ліофілізованого пептиду і ZnCl<sub>2</sub>, без регулювання pH

Як використовується в описі, композиція з процентним вмістом пептиду відповідає композиції, що містить кількість пептиду по масі на загальну масу композиції, наприклад, 1 % пептиду описує склад, що містить 1 г пептиду на 100 г всієї композиції. Композиції, що містять приблизно 1 % або приблизно 2 %, приблизно до 10 % пептиду одержували таким чином. Ліофілізовані зразки (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, одержані як описано, ретельно змішували з базовим розчином ZnCl<sub>2</sub> pH 3 при 100 % загальному об'ємі наповнювача і [пептид:Zn]=1,5:1.

A) 1 % композиції одержували шляхом змішування 20 мг ліофілізованого (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (див. 2.1 B (iv) вище) з 2 мл розчину ZnCl<sub>2</sub> (0,272 мг/мл; див. 2.1 B (i) вище).

B) 2 % композиції одержували шляхом змішування 20 мг ліофілізованого (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (див. 2.1 B (iv) вище) з 1 мл розчину ZnCl<sub>2</sub> (0,544 мг/мл; див. 2.1 B (i) вище).

C) 10 % композиції одержували шляхом змішування 50 мг ліофілізованого (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (див. 2.1 B (v) вище) з 0,45 мл розчину ZnCl<sub>2</sub> (3,023 мг/мл; див. 2.1 B (i) вище).

Ліофілізовані пептиди і розчини залишали уривноважуватися при кімнатній температурі. Необхідний об'єм розчину ZnCl<sub>2</sub> вливали у флакон, що містить ліофілізований пептид, і дозволяли протікати гідратації протягом приблизно 2 хвилин для 1 % або 2 % композицій пептиду, приблизно до 60 хвилин для 10 % композиції пептиду або доти, поки весь ліофілізований пептид повністю гідратується і розчин не буде містити грудки пептиду. Після гідратації розчинений пептид струшували протягом приблизно 1 хвилини.

Відповідна кількість пептиду може бути відібрана для дозування, наприклад, 100 мкл 1 % розчин пептиду, одержаного згідно з A вище, відповідає дозі 1 мг, 50 мкл 2 % розчин пептиду, одержаного згідно з B вище, відповідає дозі 1 мг, 150 мкл 10 % розчин пептиду, одержаного згідно з C вище, відповідає дозі 15 мг, і т.д.

Використовуючи відомості заявки, що розглядається, фахівець в даній галузі може легко варіювати кількості пептиду і ZnCl<sub>2</sub> для одержання композицій, відрізняються від 1 %, 2 % і 10 % композицій, детально описаних нижче, а також бажаних доз.

2.3. Одержання композицій з 1 - 10 % ліофілізованого пептиду і ZnCl<sub>2</sub>, з регулюванням pH

Композиції, що містять приблизно 1 % або приблизно 2 %, приблизно до 10 % пептиду, були одержані таким чином. Ліофілізовані зразки (Aib<sup>8,33</sup>)hGLP - I(7 - 36)NH<sub>2</sub>, одержані як описано, ретельно змішували з базовим розчином ZnCl<sub>2</sub> pH 3 при 90 % загального об'єму наповнювача. Необ-

хідного значення pH досягали при додаванні розбавленого розчину NaOH.

А) 1 % композиції одержували шляхом змішування 20 мг ліофілізованого (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (див. 2.1 В (iv) вище) з 1,8 мл розчину ZnCl<sub>2</sub> (див. 2.1 В (i) вище).

В) 2 % композиції одержували шляхом змішування 20 мг ліофілізованого (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (див. 2.1 В (iv) вище) з 0,9 мл розчину ZnCl<sub>2</sub> (див. 2.1 В (i) вище).

С) 10 % композиції одержували шляхом змішування 50 мг ліофілізованого (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (див. 2.1 В (v) вище) з 0,40 мл розчину ZnCl<sub>2</sub> (див. 2.1 В (i) вище).

До одержаних вище розчинів додавали необхідний об'єм (10 % загального об'єму наповнювача) розбавленого розчину NaOH для досягнення цільової концентрації і pH. Наприклад, для кожної:

1 % композиції: додавали 0,2 мл розчину NaOH з відповідною концентрацією;

2 % композиції: додавали 0,1 мл розчину NaOH з відповідною концентрацією;

10 % композиції: додавали 0,05 мл розчину NaOH з відповідною концентрацією.

Використовуючи відомості заявки, що розглядається, фахівець в даній галузі може варіювати кількості пептиду і ZnCl<sub>2</sub> для одержання композицій, відмінних від 1 %, 2 % і 10 % композицій, детально описаних нижче.

2.4. Одержання рідких композицій з 1 - 10 % пептиду і ZnCl<sub>2</sub>, без регулювання pH

Рідкі композиції, що містять приблизно 1 % або приблизно 2 %, приблизно до 10 % пептиду, одержували таким чином. Зразки (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> зважували і змішували з базовим розчином ZnCl<sub>2</sub> pH 3 для досягнення цільової концентрації пептиду 1 %, 2 %, до 10 %. Після змішування композицію стерилізували фільтруванням і зберігали до використання.

2.5. Одержання рідких композицій з 1 - 10 % пептиду і ZnCl<sub>2</sub>, з регулюванням pH

Рідкі композиції, що містять приблизно 1 % або приблизно 2 %, приблизно до 10 % пептиду одержували таким чином. Зразки (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> зважували і ретельно змішували з базовим розчином ZnCl<sub>2</sub> pH 3 при 80 % загального об'єму наповнювача. Розчин цинку може бути або ZnCl<sub>2</sub>, або ZnAc<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Необхідного значення pH розчину досягали шляхом додання розбавленого розчину NaOH. Препарати С5 - С13 були одержані із застосуванням даного способу.

Використовуючи відомості заявки, що розглядається, фахівець в даній галузі може варіювати кількості пептиду і ZnCl<sub>2</sub> для одержання композицій, відмінних від 1 %, 2 % і 10 % композицій, детально описаних нижче.

2.6. Одержання напівтвердих/гелевих композицій з 25 % пептиду і ZnCl<sub>2</sub>, без регулювання pH

Напівтверді або гелеві композиції, що містять приблизно 25 % пептиду, були одержані таким чином. Зразки (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> зважували і ретельно змішували з базовим розчином ZnCl<sub>2</sub> pH 2 при 66,66 % загального об'єму наповнювача. Розчин цинку може бути або ZnCl<sub>2</sub>, або

ZnAc<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Препарати С1 - С2 були одержані із застосуванням даного способу.

Зокрема, напівтверді або гелеві композиції були одержані із застосуванням методу змішування "до себе - від себе":

а) бажану кількість пептиду зважували в циліндрі одноразового шприца S1, заздалегідь обладнаному спеціальним ручним клапаном двосторонньої дії HV (В.Д.=0,5 мм), і трубку вмішували всередину отвору шприца Люера;

б) поршень шприца закріплювали штоком з нержавіючої сталі SR;

с) HV в S1 приєднували до джерела вакууму, і HV відкривали. Через 10 хвилин HV закривали;

д) розчин цинку акуратно зважували в циліндрі другого одноразового шприца S2;

е) потім S2 з'єднували з вільною частиною HV;

ф) HV відкривали, і розчинник витягували за допомогою вакууму в циліндр, що містить порошок пептиду S1;

г) HV закривали, і шприц з розчинником S2 видаляли, таким чином, гідратуючи порошок пептиду в S1;

h) SR видаляли, і поршень шприца повільно вивільняли;

і) поршень шприца рухали (до себе - від себе), без відкриття HV, так що порошкова маса повністю змочувалася розчинником;

ж) двосторонню з'єднувальну вставку з нержавіючої сталі SC (В.Д.=10 мм) вмішували в шприц S2 з трубкою, вміщеною всередину отвору шприца Люера, і його поршень штовхали до кінця;

к) HV в S1 відкривали, щоб випустити вакуум, і потім відділяли HV. Поршень шприца рухали так, щоб мінімізувати повітря в циліндрі; і

і) S1 і S2 з'єднували за допомогою SC, і композицію проштовхували з S1 в S2 через SC.

Використовуючи відомості заявки, що розглядається, фахівець в даній галузі може варіювати кількості пептиду і ZnCl<sub>2</sub> для одержання композицій, відмінних від 25 % композиції, описаної в опісі.

2.7. Одержання напівтвердих/гелевих композицій з 25 % пептиду і ZnCl<sub>2</sub>, з регулюванням pH

Напівтверді або гелеві композиції, що містять приблизно 25 % пептиду, одержували таким чином. Зразки (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> зважували і ретельно змішували з базовим розчином ZnCl<sub>2</sub> pH 2 при 66,66 % загального об'єму наповнювача. Розчин цинку може бути або ZnCl<sub>2</sub>, або ZnAc<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Необхідного значення pH розчину досягали шляхом додавання розбавленого розчину NaOH. У даному прикладі загальний об'єм рідкої фази, доданий до порошку, повинен бути розділений між розчинами цинку і NaOH. З цієї причини концентрацію розчину цинку встановлювали так, щоб загальний об'єм необхідного розчину цинку був доведений до 50 % загального об'єму рідкої фази, що додається до порошку пептиду (етап d). Інші 50 % загальної рідкої фази, що додаються до порошку пептиду, додавали у вигляді розчину NaOH як детально описано нижче. Препарати С3 і С4 були одержані із застосуванням даного способу.

pH - відрегульовані напівтверді або гелеві композиції були одержані із застосуванням методу змішування "до себе - від себе":

а) бажану кількість пептиду зважували в циліндрі одноразового шприца S1, заздалегідь обладнаному спеціальним ручним клапаном двосторонньої дії HV (В.Д.=0,5 мм), і трубку вмішували всередину отвору шприца Люера;

б) поршень шприца закріплювали штоком з нержавіючої сталі SR;

с) HV в S1 приєднували до джерела вакууму, і HV відкривали. Через 10 хвилин HV закривали;

д) розчин цинку акуратно зважували в циліндрі другого одноразового шприца S2;

е) потім S2 з'єднували з вільною частиною HV;

ф) HV відкривали, і розчинник витягували за допомогою вакууму в циліндр, що містить порошок пептиду S1;

г) HV закривали, і шприц з розчинником S2 відділяли, таким чином, гідратуючи порошок пептиду в S1;

h) SR відділяли, і поршень шприца повільно вивільняли;

і) поршень шприца рухали (до себе - від себе), без відкриття HV, так що порошкова маса повністю змочувалася розчинником;

ж) двосторонню з'єднувальну вставку з нержавіючої сталі SC (В.Д.=1,0 мм) вмішували в шприц S2 з трубкою, вміщеною всередину отвору шприца Люера, і його поршень штовхали до кінця;

к) HV в S1 відкривали, щоб випустити вакуум, і потім відділяли HV. Поршень шприца рухали так, щоб мінімізувати повітря в циліндрі; і

л) S1 і S2 з'єднували за допомогою SC, і композицію проштовхували з S1 в S2 через SC;

м) після гомогенізації відбирали аліквоту змішаного продукту для визначення концентрації пептиду;

н) проміжну масу продукту, що залишилася, акуратно зважували, і розраховували необхідну для досягнення бажаного значення pH кількість розчину NaOH;

о) розчин NaOH акуратно зважували в циліндрі третього одноразового шприца S3; і

р) поршні шприців повільно стискали для мінімізації повітря в камерах шприців. Обидва шприци з'єднували SC, і композицію проштовхували через SC.

Використовуючи відомості заявки, що розглядається, фахівець в даній галузі може варіювати кількості пептиду і  $ZnCl_2$  для одержання композицій, відмінних від 25 % композиції, описаної в описі.

Таблиця 1

Приклад	* Пептид			** Пептид
№	% пептиду	Розчин	Співвідношення Zn	Доза
C1	10	$ZnCl_2$ 0,846 мг/мл	5,4:1	1 мг
C2	5	0,40 мг $гпCl_2$ /мл	5,4:1	1 мг
C3	10	50 % $ZnCl_2$ 1,69 мг/мл, 50 % NaOH 1 мг/мл	5,4:1	1 мг
C4	10	50 % $ZnCl_2$ 2,28 мг/мл, 50 % NaOH 1 мг/мл	4:1	1 мг
C5	5	80 % $ZnCl_2$ 0,674 мг/мл, 20 % NaOH 3,81 мг/мл	4:1	1 мг
C6	2	80 % $ZnCl_2$ 0,26 мг/мл, 20 % NaOH 2,15 мг/мл	5,4:1	1 мг
C7	10	80 % $ZnCl_2$ 3,81 мг/мл, 20 % NaOH 4,47 мг/мл	1,5:1	1 мг
C8	10	80 % $ZnAc_2 \cdot 2H_2O$ 2,3 мг/мл, 20 % NaOH 6,1 мг/мл	4:1	1 мг
C9	2	80 % $ZnCl_2$ 0,695 мг/мл, 20 % NaOH 1,75 мг/мл	1,5:1	1 мг
C10	2	80 % $ZnAc_2 \cdot 2H_2O$ 1,12 мг/мл, 20 % NaOH 1,44 мг/мл	1,5:1	1 мг
C11	2	80 % $ZnCl_2$ 0,695 мг/мл, 20 % NaOH 1,75 мг/мл	1,5:1	1 мг
C12	1	80 % $ZnCl_2$ 0,384 мг/мл, 20 % NaOH 0,875 мг/мл	1,5:1	1 мг
C13	10	80 % $ZnCl_2$ 3,85 мг/мл, 20 % NaOH 4,47 мг/мл	1,5:1	15 мг

\*Показане цільове значення. Дані значення знаходилися в межах 5 % від цільового у всіх випадках

\*\*Показане цільове значення Дані значення знаходилися в межах 10 % від цільового у всіх випадках

### 3.0. Визначення афінності рецептора GLP - 1

Сполука для застосування на практиці даного винаходу може бути тестована на здатність зв'язуватися з рецептором GLP - 1 із застосуванням наступної методики.

#### Культура клітин

Клітини інсуліноми щура RIN 5F (номер ATCC CRL - 2058, Американська колекція типових культур, Манасас, Віргінія), експресуючі рецептор GLP - 1, культивували в модифікованому за Дульбеко середовищі Ігла (DMEM), що містить 10 % фетальної телячої сироватки, і витримували при приблизно 37 °C у вологій атмосфері з 5 %  $CO_2/95$  % повітря.

#### Радіолігандне зв'язування

Одержували мембрани для дослідження радіолігандного зв'язування шляхом гомогенізації клітин RIN в 20 мл крижаного 50 mM Трис - HCl з допомогою Політрона Брінкмана (Brinkman Polytron, Вестбері, Нью - Йорк) (установка 6, 15 секунд). Гомогенати промивали двічі з допомогою центрифугування (39000 g/10 хвилин), і кінцеві гранули ресуспендували в 50 mM Трис - HCl, що містить 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 мг/мл бацитрацину (Sigma Chemical, Сент - Луїс, Місурі) і 0,1 % BSA. Протягом аналізу аліквоти (0,4 мл) інкубували з 0,05 нМ ( $^{125}I$ )GLP-1(7-36) (~2200 Кі/ммоль, New England Nuclear, Бостон, Масачусетс), в присутно-

сті і за відсутності 0,05 мл немічених конкуруючих пептидів, що тестуються. Через 100 хвилин інкубації (25 °C) зв'язаний ( $^{125}\text{I}$ )GLP-1(7-36) відділяли від незв'язаного шляхом швидкого фільтрування через фільтри GF/C (Brandel, Гейтсбург, Меріленд), які заздалегідь замочували в 0,5 % поліетиленіміні. Фільтри промивали три рази 5 - мл аліквотами крижаного 50 мМ Трис - HCl, і затриману на фільтрах відповідну радіоактивність підраховували з допомогою гамма - спектрометрії (Wallac LKB, Гейтсбург, Меріленд). Специфічне зв'язування визначали як загальне зв'язування ( $^{125}\text{I}$ )GLP-1(7-36) мінус зв'язування в присутності 1000 нМ GLP-1(7-36) (Bachem, Торренс, Каліфорнія).

4. Визначення залежності розчинності від значення pH

4.1. Визначення залежності розчинності сполуки від значення pH в фосфатно - сольовому буферному розчині (PBS)

Сполука, яка може бути переважно застосована для практичного використання винаходу, може бути тестована для визначення її розчинності в PBS при різних значеннях pH і температурах, використовуючи наступну методику.

Базовий буферний розчин PBS одержували шляхом розчинення однієї упаковки заздалегідь змішаного порошку (SIGMA, Продукт № P - 3813) в одному літрі деіонізованої води з одержанням 10 мМ фосфатно - сольового буферного розчину з 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl і pH 7,4. Буфери PBS з різними значеннями pH одержували, регулюючи значення pH даного базового розчину за допомогою фосфорної кислоти і/або гідроксиду натрію.

Два мг зразків сполуки, яка тестується, наприклад, 2 мг сполуки прикладу 1, зважували в скляних посудинах. У кожну посудину додавали 50 - мкл аліквоти буфера PBS при визначеному значенні pH. Розчин перемішували на вортексі і, якщо необхідно, обробляли ультразвуком до одержання прозорого розчину. Записували для кожного pH, що тестується загальний об'єм буфера, необхідний для розчинення 2 мг сполуки, і розраховували розчинність.

Розчини пептидів, які були прозорими при кімнатній температурі (20 - 25 °C), вміщували в холодильник (4 °C) на ніч, і перевіряли розчинність пептиду при 4 °C.

4.2. Визначення залежності розчинності сполуки від значення pH в сольовому розчині

Сполука, яка може бути переважно застосована для практичного використання винаходу, може бути тестована для визначення її розчинності в сольовому розчині при різних значеннях pH і температурах, використовуючи наступну методику.

Базовий сольовий розчин одержували шляхом розчинення 9 грам NaCl в одному літрі деіонізованої води. Сольові розчини з різними значеннями pH одержували шляхом регулювання значень pH даного базового розчину з HCl і/або NaOH.

Два мг зразків сполуки, яка тестується, наприклад, 2 мг сполуки прикладу 1, зважували в скляних посудинах. У кожну посудину додавали 50 - мкл аліквоти сольового розчину при визначеному значенні pH. Розчин перемішували на вортексі і, якщо необхідно, обробляли ультразвуком до одержання прозорого розчину.

Записували для кожного pH, що тестується загальний об'єм сольового розчину, необхідний для розчинення 2 мг сполуки, і розраховували розчинність.

Розчини, які були прозорими при кімнатній температурі (20 - 25 °C), вміщували в холодильник (4 °C) на ніч, і перевіряли розчинність пептиду при 4 °C.

4.3. Визначення розчинності сполуки в сольовому розчині при pH 7,0

Сполуки, які можуть бути переважно застосовані для практичного використання винаходу, можуть бути тестовані для визначення їх розчинності при кімнатній температурі в сольовому розчині зі значенням pH=7, використовуючи наступну методику.

Сольовий розчин одержували шляхом розчинення 9 грам NaCl в одному літрі деіонізованої води. Зважували 2 мг зразки сполуки, що тестується, наприклад, 2 мг сполуки прикладу 1, в скляних посудинах і додавали 1 - мл аліквот сольового розчину, перемішували на вортексі і обробляли ультразвуком до одержання прозорого розчину. Записували загальний об'єм сольового розчину, необхідний для розчинення 2 мг пептиду, і розраховували розчинність при кімнатній температурі.

4.4. Визначення розчинності сполуки в сольовому розчині при різних значеннях pH

Сполука, яка може бути переважно застосована для практичного використання винаходу, може бути тестована для визначення її розчинності при кімнатній температурі в сольових розчинах з різними значеннями pH, використовуючи наступну методику.

Базовий сольовий розчин одержували шляхом розчинення 9 грам NaCl в одному літрі деіонізованої води. Сольові розчини з різними значеннями pH одержували шляхом обробки аліквот базового розчину HCl і NaOH.

Зважували 2 мг зразки сполуки, яка тестується, наприклад, сполуки прикладу 1, в скляних посудинах. Додавали 50 - мкл аліквоти сольового буферного розчину при визначеному значенні pH. Розчин перемішували на вортексі і обробляли ультразвуком до одержання прозорого розчину. Записували загальний об'єм буфера, використаного для розчинення 2 мг пептиду, і розраховували розчинність.

5. Визначення розчинності сполуки у воді в залежності від концентрації цинку

Сполука, яка може бути переважно застосована для практичного використання винаходу, може бути тестована для визначення її розчинності у воді з pH 7 при різних концентраціях цинку, використовуючи наступну методику.

Базовий розчин цинку одержували шляхом розчинення  $\text{ZnCl}_2$  в деіонізованій воді при концентрації 100 мг/мл і доводили pH до 2,7, використовуючи HCl. Розчини з різними концентраціями  $\text{ZnCl}_2$  ("тестові розчини Zn") одержували шляхом відповідних розведень базового розчину.

Один мг сполуки, яка тестується, наприклад, 1 мг сполук прикладу 1, розчиняли в 250 мкл кожного тестового розчину Zn з одержанням розчину, що має 4 мг/мл сполуки. Потім значення pH даного

розчину регулювали за допомогою 0,2 н. NaOH доти, поки не спостерігали утворення білого осаду. Розчин з осадом, що випав, центрифугували, і маточний розчин аналізували за допомогою ВЕРХ. Вимірювали площу УФ - поглинання піка сполуки, що тестується, і визначали концентрацію сполуки, що тестується, в маточному розчині за допомогою порівняння з калібрувальною кривою.

Як ілюстративний приклад сполуки, яка може бути застосована для практичного використання винаходу, тестували сполуку прикладу 1 безпосередньо у вищезазначеному аналізі, і були одержані наступні результати (водний, рН 7,0, кімнатна температура):

Таблиця 2

Концентрація ZnCl <sub>2</sub> (мг/мл)	Розчинність (мг/мл)
0	5,788
80	0,0770
500	0,0579
1000	0,0487
1500	0,0668
2500	0,1131

6. Визначення ізоелектричної точки (рі) за допомогою ІЕФ - гелів Для вимірювання рі пептидів GLP - 1, наприклад, сполуки прикладу 1, використали гелі Invitrogen's Novex ІЕФ рН 3 - 10. Пептидні сполуки, що тестуються, розчиняли у воді при концентрації 0,5 мг/мл. У випадку кожного такого розчину, 5 мкл одержаного розчину змішували з 5 мкл 2× буфера для зразка Novex® (що містить 20 мМ вільної основи аргініну, 20 мМ вільної основи лізину і 15 % гліцерину), і одержані 10 мкл розчину зразка вносили в гель разом із зразком білкових стандартів.

Рухомі буфери також одержували від Invitrogen, і гель проганяли відповідно до інструкцій виробників, звичайно таким чином: постійне значення 100 В протягом 1 години, з подальшим постійним значенням 200 В протягом 1 години, з подальшим постійним значенням 500 В протягом 30 хвилин.

Потім гель фіксували в 12 % ТХО (ТСА, трихлороцтова кислота), що містить 3,5 % сульфосаліцилової кислоти, протягом 30 хвилин і потім залишали на 2 години з колоїдним Кумасі синім, відповідно до інструкцій набору Novex® Colloidal Blue, потім видаляли барвник у воді протягом ночі.

Гель сканували і аналізували за допомогою програми Fragment Analysis 1.2. Значення рі невідомих пептидів розраховували відносно рі стандартних сполук, що володіють значеннями рі: 10,7, 9,5, 8,3, 8,0, 7,8, 7,4, 6,9, 6,0, 5,3, 5,2, 4,5, 4,2 і 3,5.

Виміряне значення рі сполуки прикладу 1 становило 7,60.

#### 7. Дослідження in vivo на щурах

Композиції згідно з даним винаходом можуть тестуватися для визначення їх здатності викликати і посилювати ефект in vivo, використовуючи наступні випробування.

#### 7.1. Експериментальна методика

За день до експеримента дорослим самцям щурів Sprague - Dawley (Taconic, Германтаун, Нью - Йорк), які важили приблизно 300 - 350 г, імплантували праву передсердну яремну канюлю під анестезією хлоргідратом. Потім щурів не годували протягом 18 годин до ін'єкції відповідної сполуки, що тестується, або наповнювача як контролю в момент часу 0. Щурів не годували протягом всього експеримента.

Одержували розчин 0,5 мг/мл ZnCl<sub>2</sub> шляхом розбавлення розчину 100 мг/мл ZnCl<sub>2</sub> в розчині HCl, що має рН 2,7 води. Розчиняли 1 мг сполуки формули (I) ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>) в 250 мкл даного розчину з одержанням прозорого розчину, що має 4 мг/мл сполуки і 0,5 мг/мл Zn при рН 4.

У нульовий момент часу щурам підшкірно (s.c.) ін'єктували або (а) згаданий в описі вище розчин (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, або носій - контроль. В обох випадках ін'єктований розчин був дуже малий (4 - 6 мкл), а доза введеної особною сполуки GLP - 1 становила 75 мкг/кг. У відповідний час після s.c. ін'єкцій забирали 500 мкл зразки крові за допомогою внутрішньовенної (i.v.) канюлі, і щурів піддавали i.v. глюкозному навантаженню, щоб тестувати на наявність посилення секреції інсуліну. Час глюкозного навантаження становив 0,25, 1, 6, 12 і 24 години після ін'єкції сполуки. Після відбирання першого зразка крові ін'єктували i.v. глюкозу (1 г/кг) і промивали 500 мкл гепаринізованого сольового розчину (10 Од./мл). Після цього на 2,5, 5, 10 і 20 хвилини після ін'єкції глюкози, забирали зразки крові по 500 мкл. За кожним негайно йшла i.v. ін'єкція 500 мкл гепаринізованого сольового розчину (10 Од./мл) через канюлю. Зразки крові центрифугували, з кожного зразка збирали плазму, і зразки зберігали при - 20 °C до їх використання в аналізі на вміст інсуліну. Кількість інсуліну в кожному зразку визначали, використовуючи набір для твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) інсуліну щура (American Laboratory Products Co., Віндхам, Нью - Гемпшир).

##### 7.1.1. Результати

Спостерігали стабільну інсулін - стимулюючу активність, яку індукувала ін'єкція глюкози, протягом всіх 24 годин експеримента.

#### 8. Дослідження in vivo на собаках

Існує ряд досліджень in vivo, відомих в галузі техніки, які дають можливість фахівцям в даній галузі визначати здатність композиції підтримувати пролонговане вивільнення активного компонента in vivo.

##### 8.1. 1 % композиція пептиду

Як приклад були одержані водні тестові склади, що містять 1 % (мас/мас.) сполуки формули (I) в буферному розчині ZnCl<sub>2</sub> (співвідношення пептид:Zn=1,5:1,0).

Всього 6 самців собак породи Бігль (Beagle) віком 42 - 78 місяців і масою тіла 14 - 21 кг містили з вільним доступом до води і харчуванням один раз в день (приблизно 400 г сухого стандартного харчування (SAFE 125)). Собак не годували протягом 18 годин до введення композиції, що тестується.

Композицію, що тестується, вводили підшкірно в міжлопаткову область. Об'єм введення (прибли-

зно 20 мікролітрів на тварину) формували за допомогою шприців Teguto 0,3 мл з 0,33 - 12 мм (BS=30M2913). Таким чином досягали теоретичної дози приблизно 0,2 мг пептиду.

Через певні проміжки часу забирали зразки крові, приблизний час = 0, 8, 15, 30, 45 хвилин і 1, 2, 4, 8 і 12 годин і 1, 2, 3, 4, 5 і 6 днів після введення. Кров швидко охолоджували після відбору зразка, перш ніж центрифугувати, і плазму декантували і швидко заморожували в очікуванні аналізу. Визначення концентрації пептиду в плазмі здійснювали після довільної твердофазної екстракції, з подальшою оперативною фазовою екстракцією, пов'язаною з РХ - МС/МС, і одержані дані обробляли за допомогою програмного забезпечення Analyst v1.2.

Композиції демонстрували пролонговане вивільнення активного пептиду протягом 2 днів.

#### 8.2. 1 % розчин (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>:

Використовуючи по суті ту ж саму методику аналізу *in vivo*, яка описана в розділі 8.1 вище, досліджували наступні композиції на їх здатність вивільняти випробуваний пептид протягом тривалого періоду часу. Для кожної з наступних чотирьох композицій концентрація пептиду становила приблизно 1 % (мас/мас), співвідношення пептиду і цинку становило приблизно 1,5:1, і доза пептиду, що вводиться, була приблизно 1 мг.

Розчин 8.2.A: (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в розчині, що містить (i) 90 % ZnCl<sub>2</sub> (0,298 мг/мл) і (ii) 10 % NaOH (0,975 мг/мл).

Розчин 8.2.B: ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в розчині ZnCl<sub>2</sub> (0,286 мг/мл).

Розчин 8.2.C: по суті аналогічний розчину 8.2.B і буферизований із застосуванням AcOH/AcO<sup>-</sup>.

Розчин 8.2.D: по суті аналогічний розчину 8.2.A.

Композиції забезпечували пролонговане вивільнення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, як подано на фіг. 1.

#### 8.3. 1 % розчин (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>

Використовуючи по суті ту ж саму методику аналізу *in vivo*, яка описана в розділі 8.1 вище, досліджували наступну композицію на здатність вивільняти випробуваний пептид протягом тривалого періоду часу. Для наступної композиції концентрація пептиду становила приблизно 2 % (мас/мас), співвідношення пептиду і цинку становило приблизно 1,5:1, і доза пептиду, що вводиться, була приблизно 1 мг.

Розчин 8.3: (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в розчині, що містить (i) 80 % ZnCl<sub>2</sub> (0,695 мг/мл) і (ii) 20 % NaOH (1,75 мг/мл).

Композиція забезпечувала пролонговане вивільнення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, як подано на фіг. 5.

#### 8.4. 10 % розчини пептиду

Використовуючи по суті ту ж саму методику аналізу *in vivo*, яка описана в розділі 8.1 вище, досліджували наступні композиції на їх здатність вивільняти випробуваний пептид протягом тривалого періоду часу. Для кожної з наступних чотирьох композицій концентрація пептиду становила приблизно 10 % (мас/мас), співвідношення пепти-

ду і цинку становило приблизно 1,5:1, і доза пептиду, що вводиться, була приблизно 15 мг.

Розчин 8.4.A: ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в розчині, що містить (i) 90 % ZnCl<sub>2</sub> (3,367 мг/мл) і (ii) 10 % NaOH (5,01 мг/мл).

Розчин 8.4.B: (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в розчині ZnCl<sub>2</sub> (2,993 мг/мл).

Розчин 8.4.C: по суті аналогічний розчину 8.4.B і буферизований із застосуванням AcOH/AcO<sup>-</sup>.

Розчин 8.4.D: по суті аналогічний розчину 8.4.A.

Композиції забезпечували пролонговане вивільнення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, як подано на фіг. 2.

#### 8.5. Напівтверді композиції

Використовуючи по суті ту ж саму методику аналізу *in vivo*, яка описана в розділі 8.1 вище, досліджували наступні напівтверді композиції на їх здатність вивільняти випробуваний пептид протягом тривалого періоду часу. Для композиції 8.5.A концентрація пептиду була приблизно 5 %, в той час як для композицій 8.5.B, 8.4.C і 8.5.D концентрація пептиду була приблизно 10 % (мас/мас). Співвідношення пептиду і цинку для композицій 8.5.A, 8.5.B і 8.5.C було приблизно 5,4:1, в той час як для композиції 8.5.D співвідношення становило приблизно 4,0:1. Для всіх чотирьох композицій доза пептиду, що вводиться, була приблизно 1 мг.

Композиція 8.5.A: (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в напівтвердій композиції, що містить ZnCl<sub>2</sub> (0,40 мг/мл) в WFI.

Композиція 8.5.B: по суті аналогічна композиції 8.5.A, де концентрацію ZnCl<sub>2</sub> встановлювали вище, щоб втримувати співвідношення пептид:Zn приблизно 5,4:1.

Композиція 8.5.C: (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в напівтвердій композиції, що містить (i) 50 % ZnCl<sub>2</sub> (1,69 мг/мл) і (ii) 50 % NaOH (1 мг/мл).

Композиція 8.5.D: (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в напівтвердій композиції, що містить (i) 50 % ZnCl<sub>2</sub> (2,28 мг/мл) і (ii) 50 % NaOH (1 мг/мл).

Композиції забезпечували пролонговане вивільнення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, як подано на фіг. 3.

#### 8.6. Напівтверді композиції

Використовуючи по суті ту ж саму методику аналізу *in vivo*, яка описана в розділі 8.1 вище, досліджували наступну напівтверду композицію на здатність вивільняти випробуваний пептид протягом тривалого періоду часу. Дану композицію одержували із застосуванням 5,22 мг/мл розчину ZnCl<sub>2</sub>, при pH=2,0. Забезпечували достатню кількість пептиду, щоб в результаті одержати 25 % напівтверду композицію пептиду, що має співвідношення пептиду і цинку приблизно 4:1. Значення pH композиції регулювали відповідно до передбаченої в описі процедури, використовуючи 10 мг/мл NaOH. Доза введення пептиду становила приблизно 15 мг.

Композиція 8.6 забезпечувала пролонговане вивільнення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, як подано на фіг. 6.

### 8.7. Напівтверді композиції

Використовуючи по суті ту ж саму методику аналізу *in vivo*, яка описана в розділі 8.1 вище, досліджували наступну напівтверду композицію на здатність вивільняти випробуваний пептид протягом тривалого періоду часу. Дану композицію одержували із застосуванням 8,5 мг/мл розчину  $ZnCl_2$ , при  $pH=2,0$ . Забезпечували достатню кількість пептиду, щоб в результаті одержати 23 % напівтверду композицію пептиду, що має співвідношення пептиду і цинку приблизно 1,5:1. Композицію одержували відповідно до методики, детально описаної в розділі 2.6 вище. Доза введеного пептиду становила приблизно 15 мг (відповідає приблизно 65 мікролітрам композиції).

Композиція 8.7 забезпечувала пролонговане вивільнення  $(Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH_2$ , як подано на фіг. 7.

Додаткові дослідження з різними змінами в розкритому виготовленні складу піддавали таким же чином аналізу *in vivo* і підтверджували, що композиції згідно з даним винаходом забезпечують корисну платформу для доставки лікарського засобу сполуки формули (I). Використовуючи відомості заявки, що розглядається, фахівцеві в даній галузі техніки може варіювати кількості пептиду і  $ZnCl_2$  і значень  $pH$  для одержання композицій згідно з даним винаходом як описано в описі.

#### Приклад 9

1. Регулювання ФК - профілю шляхом зміни вмісту ацетату в 10 % пептидних розчинах

У даному прикладі представлене фармакокінетичне дослідження  $(Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH_2$  у самців собак породи бігль після однократного підшкірного введення двох імпровізованих композицій, що містять 10 %  $(Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH_2$  і хлорид цинку  $[(Aib^{8,35})hGLP-1(7-36)NH_2:Zn=1,5:1]$ , з рівнем дози 15 мг/собака.

Метод проведення аналізу *in vivo* аналогічний описаному в розділі 8.1.

Даний приклад ілюструє регулювання ФК - профілю за допомогою вмісту ацетату в фармаце-

втичній композиції і, таким чином, вплив співвідношення [ацетат/пептид] в фармацевтичній композиції на значення  $pH$ .

Регулювання значення  $pH$  контролювали шляхом регулювання вмісту ацетату, зниження вмісту ацетату виявляло збільшення впливу на значення  $pH$ .

Варіювання ацетату також демонструвало вплив на  $C_{\max}$ . Звичайно зниження вмісту ацетату зменшувало величину  $C_{\max}$ .

Збільшення вмісту ацетату демонструвало поліпшення розчинності і фізичної стабільності.

Згідно з вибраним складом, поліпшення шляхом регулювання співвідношення ацетат/пептид розчинності або стабільності компенсується шляхом регулювання співвідношення пептид/ $Zn$ , наприклад,  $C_{\max}$ . Можна бачити як в системі з трьома можливими змінними регулюється стабільність, розчинність, значення  $pH$  або  $C_{\max}$ .

У даному прикладі аббревіатура SD означає стандартне відхилення. AUC означає площу під кривою залежності концентрації в плазмі від часу Артемізиніну.

Значенням аббревіатури MRT є середній час утримання (MRT) - параметр для оцінки швидкості біодоступності в порівнянні з MRT з  $t_{\max}$ , яке являє собою час досягнення максимальної концентрації лікарського засобу.  $MRT_t$  розраховували, використовуючи дані від нульового моменту часу до часу останнього забору зразка крові.

У таблиці 3 зібрані результати по партіях 10 % композиції пептиду з різними співвідношеннями [ацетат/пептид] і підшкірним введенням собакам породи Бігль. Значення максимуму концентрації лікарського засобу в плазмі ( $C_{\max}$ ) становило 8,10 нг/мл ( $SD=1,80$  нг/мл) у випадку молярного співвідношення [ацетат/пептид], що дорівнювало [3,7:1], де партія, що має менше співвідношення [3,2:1], забезпечувала значення  $C_{\max}$  5,65 нг/мл ( $SD=2,61$  нг/мл).

Таблиця 3

Склад		10 % 15 мг		10 % 15 мг	
Співвідношення пептид/ $Zn$		1,5:1		1,5:1	
Параметр	Одиниці вимірювання	Середнє (n=5)	S.D.	Середнє (n=4)	S.D.
Доза	мкг·кг <sup>-1</sup>	857,7	131,0	694,8	46,5
$t_{\max}$	д	0,208	0,167	0,111	0,068
$C_{\max}$	нг·мл <sup>-1</sup>	8,10	1,80	5,65	2,61
$L_{1/2\text{прибл}}$	д	3,32	0,66	6,77	2,04
AUC <sub>t</sub>	нг·мл <sup>-1</sup> ·д	53,5	14,3	38,2	9,2
AUC	нг·мл <sup>-1</sup> ·д	55,4	15,7	41,6	8,9
AUC <sub>екстрап.</sub>	%	2,99	1,83	8,44	5,00
MRT <sub>t</sub>	д	9,31	2,25	7,48	1,39
MRT	д	9,96	2,60	9,85	2,54
[ацетат/пептид]		3,7:1		3,2:1	



10. Склади сіль пептиду GLP - 1/двовалентний метал

#### 10.1. Способи

Одержували розчини 1 мг/мл ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> у воді і PBS, і доводили значення pH до 7,0. Одержували базові розчини 10 мг/мл CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> і ZnCl<sub>2</sub> у воді. Доводили значення pH розчинів CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> і ZnCl<sub>2</sub> до 7,0. pH розчину CuCl<sub>2</sub> не може бути змінено у бік підвищення осадності, оскільки випадає осад Cu. Тому використали розчин CuCl<sub>2</sub> з pH 4,4.

Додавали 4 мкл розчинів іонів металів у воді або PBS до 200 мкл 1 мг/мл розчину (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з одержанням кінцевої концентрації іона металу 200 мкг/мл. Кінцевий розчин перемішували і перевіряли на утворення осаду. Якщо осад формувався, суспензію центрифугували. Визначали концентрацію (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в надосадовій рідині методом ВЕРХ.

#### 10.2. Результати

Таблиця 4

Розчинність (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в присутності іонів двовалентних металів

	Водний розчин, мг/мл	Розчин в PBS, мг/мл
CaCl <sub>2</sub>	>1 (pH 7,1)	>1 (pH 6,8)
CuCl <sub>2</sub>	0,058 (pH 7,1)	0,039 (pH 6,8)
MgCl <sub>2</sub>	>1 (pH 7,2)	>1 (pH 6,9)
ZnCl <sub>2</sub>	0,108 (pH 6,9)	0,056 (pH 6,8)

10.3. Фармакокінетичні дослідження прозорих складів ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/двовалентний метал з pH 5,5

Одержували три різних складів (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> використовуючи наступні методики:

(1) HCl - сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з CuCl<sub>2</sub>

(2) HCl - сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з ZnCl<sub>2</sub>

(3) Ацетатна сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з ZnCl<sub>2</sub>

Сіль ТФО аналога GLP - 1 (ТФО - сіль виходить внаслідок очищення пептиду із застосуванням препаративної ВЕРХ при елюванні буферними розчинами, що містять ТФО) може бути перетворена в іншу сіль, таку як ацетатна сіль, шляхом розчинення пептиду в невеликій кількості 0,25 н. водного розчину оцтової кислоти. Одержаний розчин використовують на напівпрепаративній колонці ВЕРХ (Zorbaх, 300 SB, C - 8). Колонку елюють (1) 0,1 н. водним розчином ацетату амонію протягом 0,5 години, (2) 0,25 н. водним розчином оцтової кислоти протягом 0,5 години і (3) в лінійному градієнті (20 - 100 % розчини В протягом 30 хвилин) з швидкістю потоку 4 мл/хв. (розчин А являє собою 0,25 н. водний розчин оцтової кислоти; розчин В являє собою 0,25 н. оцтову кислоту в ацетонітрилі/воді 80:20). Фракції, що містять пептид, збирають і ліофілізують досуха.

HCl - сіль ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> одержували за допомогою методу ліофілізації. Розчиняли 20 мг ацетату (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в 4 мл 20 мМ водного розчину HCl і витримували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Зразок заморозували і ліофілізували протягом ночі. Ліофілізацію здійснювали ще два рази і визначали вміст хлориду в кінцевому продукті. Вимірний вміст хлориду становив 5,38 %.

(1) HCl - сіль ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з CuCl<sub>2</sub>

Розчиняли 5,3 мг HCl - солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (вміст пептиду становить 95 %) в 50 мкл 20 мМ водного розчину CuCl<sub>2</sub>. pH регулювали за допомогою приблизно 2 мкл 1 н. NaOH приблизно до 5,5. Молярне співвідношення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/CuCl<sub>2</sub> становило 1,5:1. Концентрація пеп-

тиду у воді (мас/мас.) була 10 % (30 мМ) з pH приблизно 5,5.

(2) HCl - сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з ZnCl<sub>2</sub>

Розчиняли 5,3 мг HCl - солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (вміст пептиду становить 95 %) в 50 мкл 20 мМ водних розчину ZnCl<sub>2</sub>. pH регулювали з допомогою приблизно 2 мкл 1 н. NaOH приблизно до 5,5. Молярне співвідношення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/ZnCl<sub>2</sub> становило 1,5:1. Концентрація пептиду у воді (мас/мас.) була 10 % (30 мМ) з pH приблизно 5,5.

(3) Ацетатна сіль (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> з ZnCl<sub>2</sub>

Розчиняли 5,5 мг ацетатної солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (вміст пептиду становить 92 %) в 50 мкл 20 мМ водного розчину ZnCl<sub>2</sub>. Одержаний розчин ліофілізували протягом ночі і повторно розчиняли в 50 мкл води. pH регулювали за допомогою приблизно 1 мкл 1 н. NaOH приблизно до 5,5. Молярне співвідношення (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>/ZnCl<sub>2</sub> становило 1,5:1. Концентрація пептиду у воді (мас/мас.) була 10 % (30 мМ) з pH приблизно 5,5.

#### 10.4. Дозування і збір зразків крові

Щурам вводили підшкірно дані три складів (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в дозі 0,3 мг/щура (3 мкл 10 % розчини). Зразки крові забирали на 5, 10, 15, 30 хвилин, 1, 2, 4, 8 годин і 1, 2, 3, 4, 7, 10 днів. Плазму крові збирали після центрифугування і зберігали при - 80 °C. Ткань на місці ін'єкції також збирали, гомогенізували в 5х метанолі і зберігали при - 80 °C.

Двох щурів використали для експериментальних точок 5, 10, 15, 30 хвилин і 1, 2, 4, 8 годин. Одного щура використали для експериментальних точок 1, 2, 3, 4, 7, 10 днів.

#### 10.5. Підготовка зразка для PX - MC/MC

Плазму (200 мкл) підкисляли 10 мкл мурашиної кислоти і висаджували за допомогою 600 мкл ацетонітрилу. Супернатант збирали шляхом центрифугування і концентрували досуха у вакуумі. Залишок розчиняли в 150 мкл 30 % ацетоніт-

рилу у воді і центрифугували. 50 мкл супернатанту вводили для РХ - МС/МС аналізу.

Екстракт тканини в метанолі (10 мкл) розводили до 1 мл 30 % ацетонітрилом у воді і 50 мкл вводили для РХ - МС/МС аналізу.

#### 10.6. РХ - МС/МС аналіз

РХ - МС/МС аналіз здійснювали за допомогою системи мас - спектрометра API4000, обладнаною іонним джерелом Turbo Ionspray. Використали метод детектування молекулярних іонів MRM (моніторинг множинних іонів) з парою іонів 668,9 і 136,1.

Розділення ВЕРХ здійснювали за допомогою колонки Luna C8(2) 2×30 мм 3 мкм проганяючи від

10 до 90 % В за 10 хвилин при швидкості течії 0,30 мл/хв. Буфер А являє собою 1 % мурашину кислоти у воді, а буфер В являє собою 1 % мурашину кислоти в ацетонітрилі.

LOQ (чутливість методу) становила 0,5 нг/мл.

#### 10.7. Результати і висновки

Концентрації пептиду в плазмі обчислювали за допомогою його стандартної калібрувальної кривої. Для розрахунку, скільки процентів залишилося в місці введення, за 100 % приймали 0,06 мг/мл (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (0,3 мг/щур в 5 мл метанольного екстракту).

Таблиця 5

Концентрації в плазмі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>

Час, год.	Концентрація в плазмі (нг/мл) дози ((Aib <sup>8,35</sup> )hGLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> ·HCl і CuCl <sub>2</sub> )	Концентрація в плазмі (нг/мл) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> ·HCl і ZnCl <sub>2</sub> )	Концентрація в плазмі (нг/мл) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> ·ацетат і ZnCl <sub>2</sub> )
0,083	4,76	5,06±3,85	25,9±14,57
0,17	3,18	13,04±12,81	16,35±5,02
0,25	3,44	13,65±8,14	32,2
0,5	7,95±5,3	13,86±11,8	19,5±3,68
1	11,8	12,4±10,61	11,5
2	11,4±1,27	12,9±0,35	8,64
4	5,9±5,2	6,39±4,62	5,48
8	0,9±0,37	0,72	6,41
24	1,35	1,08	0,94
48	0,68	1,21	
72	0,66	0,47	0,77
96	0,15	1,35	0,33
168	0,17	0,74	0,82
240	0,35	0,6	1,09

На фіг. 8 представлена крива повного циклу фармакокінетичного профілю складів HCl - солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>. Крива більш ранньої частини циклу фармакокінетичного профілю складів HCl - солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> подана на фіг. 9. На фіг. 10 представлена крива повного циклу

фармакокінетичного профілю складів ацетатної солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>. Крива більш ранньої частини циклу фармакокінетичного профілю складів ацетатної солі (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> подана на фіг. 11.

Таблиця 6

Оцінені проценти ((Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, що залишився на місці ін'єкції

Час, дні	Оцінені проценти (%) дози ((Aib <sup>8,35</sup> )hGLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> і CuCl <sub>2</sub> , що залишилася на місці ін'єкції	Оцінені проценти (%) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> ·HCl і ZnCl <sub>2</sub> , що залишилася на місці ін'єкції	Оцінені проценти (%) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP-1(7-36)NH <sub>2</sub> , ацетат і ZnCl <sub>2</sub> , що залишилася на місці ін'єкції
1	1,58	10,59	6,96
2	24,88	26,94	9,97
3	12	21,87	11,6
4	0,14	0,04	0,23
7	0,47	0,06	0,03
10	0,01	0,02	0,01

Профіль акумуляції в тканині (Aib<sup>8,35</sup>)hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> на місці ін'єкції додатково поданий на фіг. 12.

Таблиця 7

ФК параметри

	Концентрація в плазмі (нг/мл) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP- 1(7-36)NH <sub>2</sub> ·HCl і CuCl <sub>2</sub>	Концентрація в плазмі (нг/мл) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP- 1(7-36)NH <sub>2</sub> ·HCl і ZnCl <sub>2</sub>	Концентрація в плазмі (нг/мл) дози (Aib <sup>8,35</sup> )hGLP- 1(7-36)NH <sub>2</sub> ·ацетат і ZnCl <sub>2</sub>
T <sub>макс</sub> , год	1	0,5	0,25
C <sub>макс</sub> , нг/мл	11,8	13,8	32,2
AUC, нг·год./мл	204	514	394

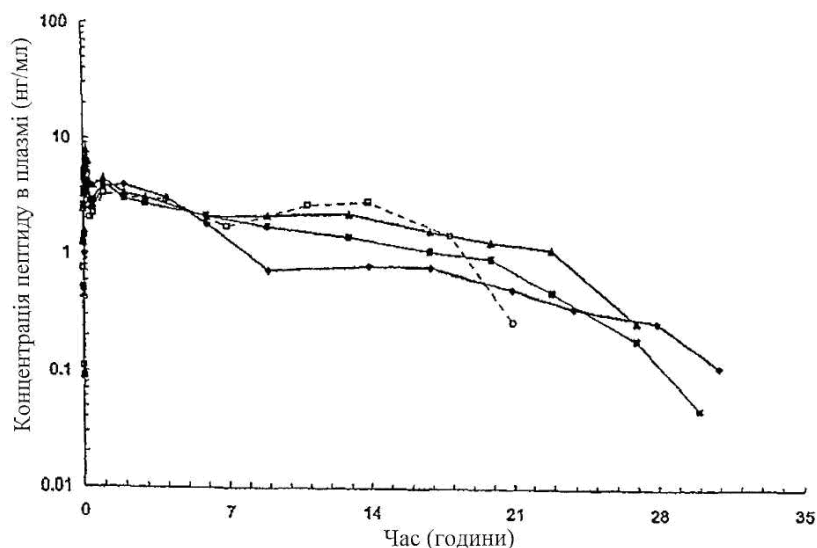
Результати вказують, що сольові форми аналогів GLP - 1, зокрема, в комбінації з солями дво-валентних металів, забезпечують прийнятні склади з уповільненим вивільненням із зниженими початковими концентраціями в плазмі, які знижують або виключають небажані побічні ефекти.

Дані вказують, що солі з сильними кислотами, наприклад, HCl - солі аналога

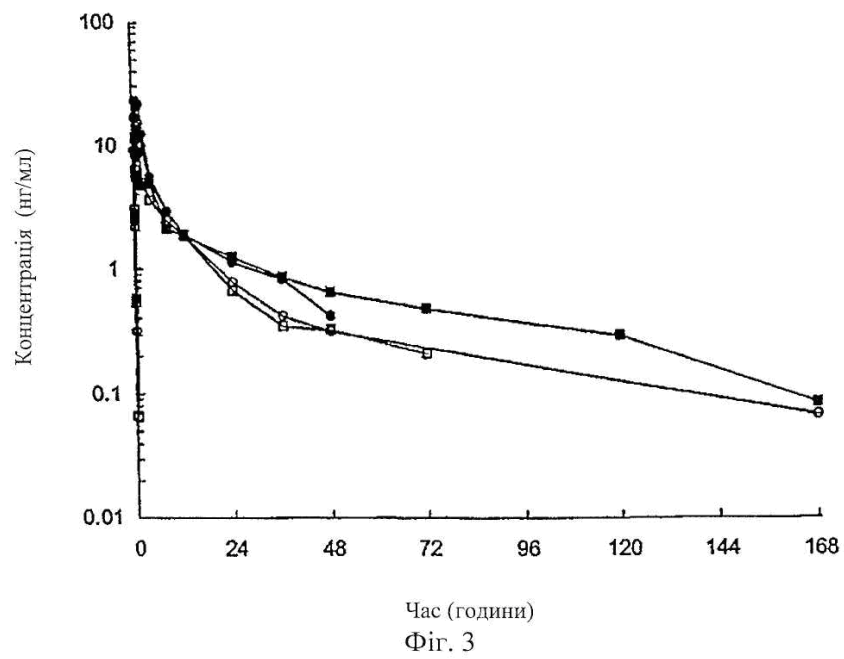
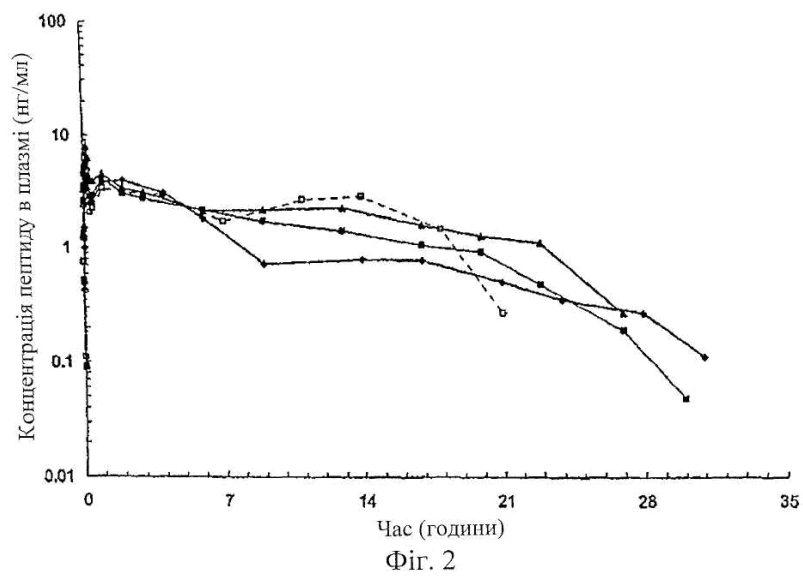
GLP - 1, показують додаткове зниження початкових концентрацій в плазмі. Без зв'язку з даною теорією вважають, що виняткове зниження початкових концентрацій в плазмі HCl - солей аналогів GLP - 1 пов'язане з процесом нейтралізації *in vivo*. У композиціях (1) і (2) вище при pH 5,5, 100 % кис-

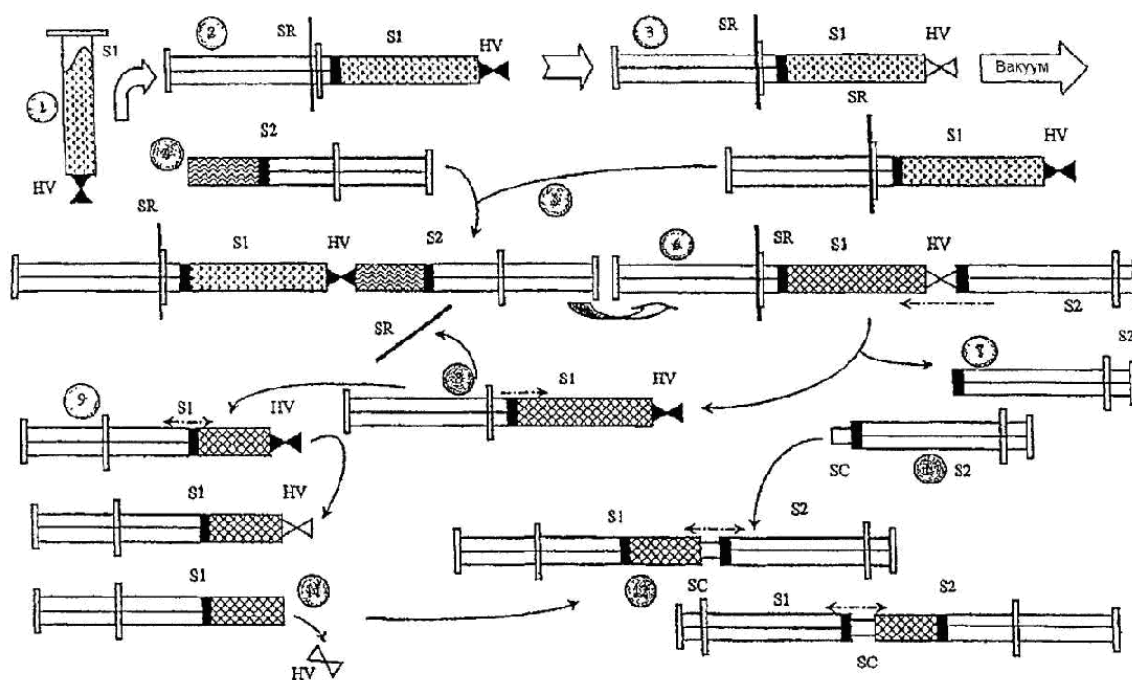
лоти знаходиться у вигляді хлоридної солі, і вільна кислота відсутня. Відповідно, після підшкірного введення рідке середовище організму здатне нейтралізувати розчин більш швидко, таким чином, приводячи до більш швидкого осадження розчину. Дане зниження часу нейтралізації приводить до меншої, менше за заявлену, початкову концентрацію в плазмі або піку.

Публікації, що цитуються вище, включені в даний опис за допомогою посилання. Додаткові приклади здійснення даного винаходу будуть очевидні з попереднього розкриття і входять в об'єм винаходу, який повністю описаний в описі і визначений в наступній формулі винаходу.

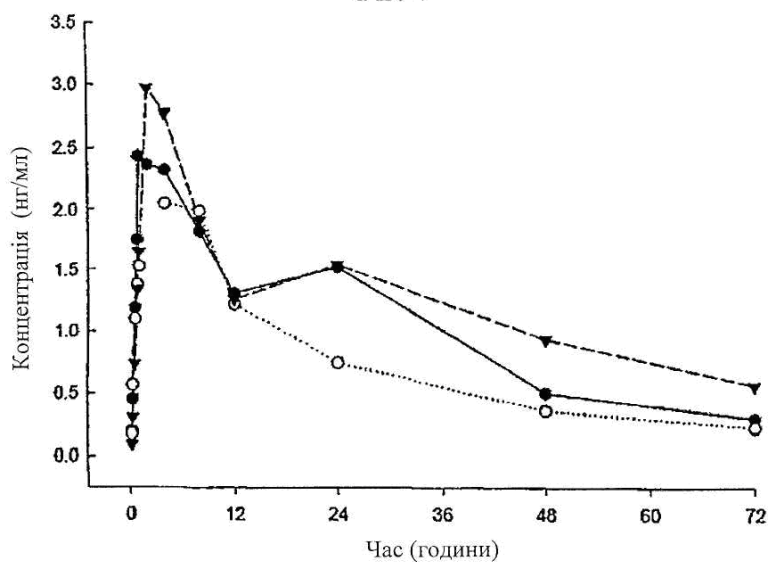


Фіг. 1

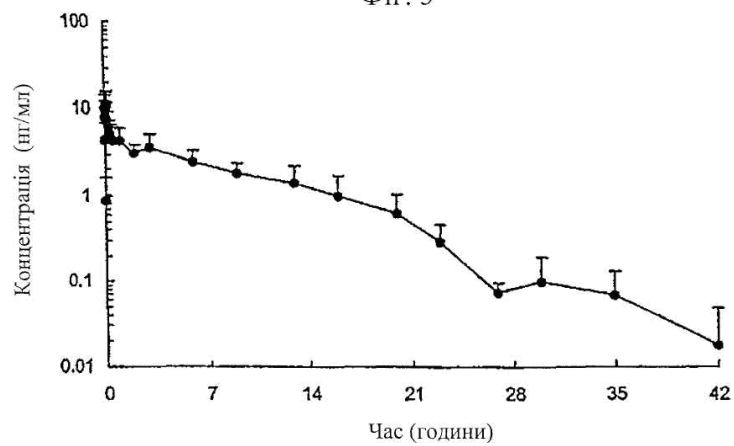




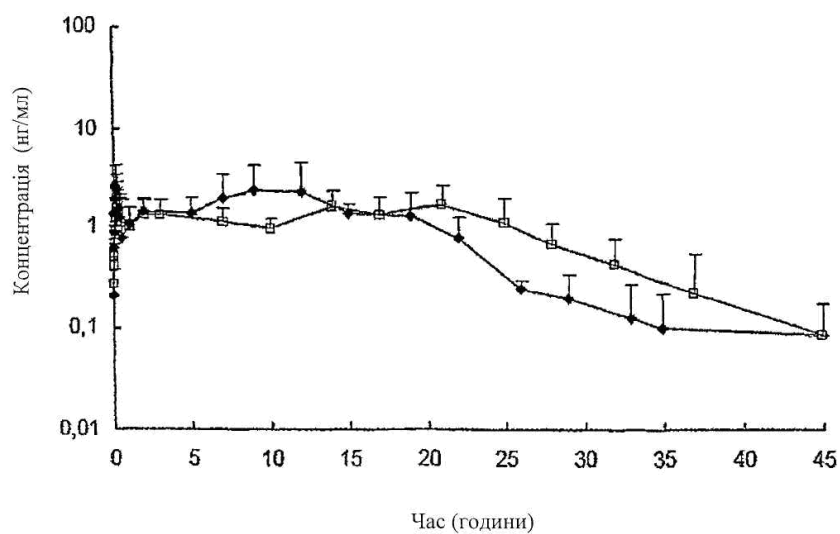
Фиг. 4



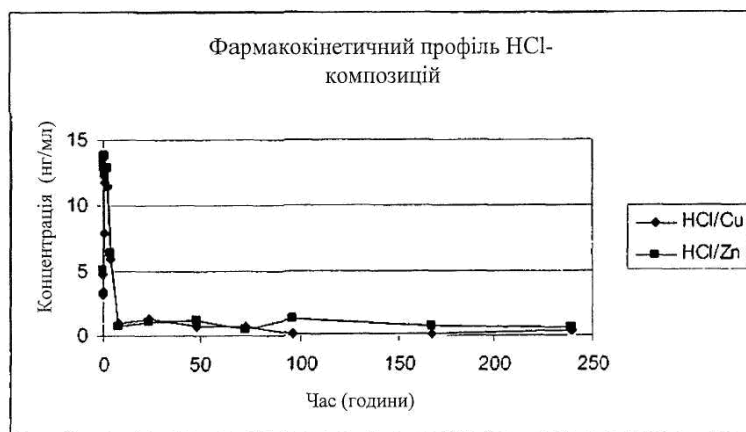
Фиг. 5



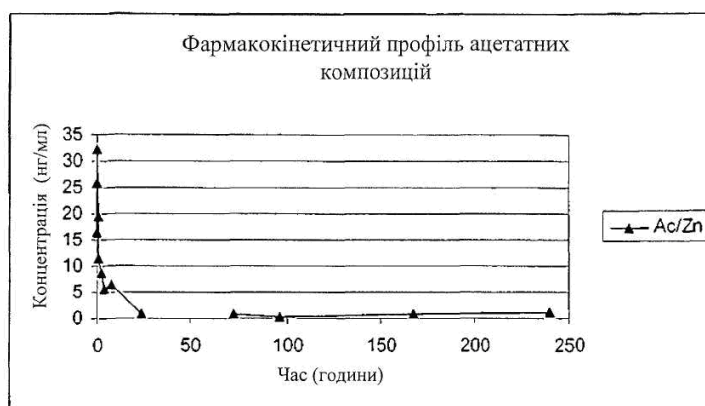
Фиг. 6



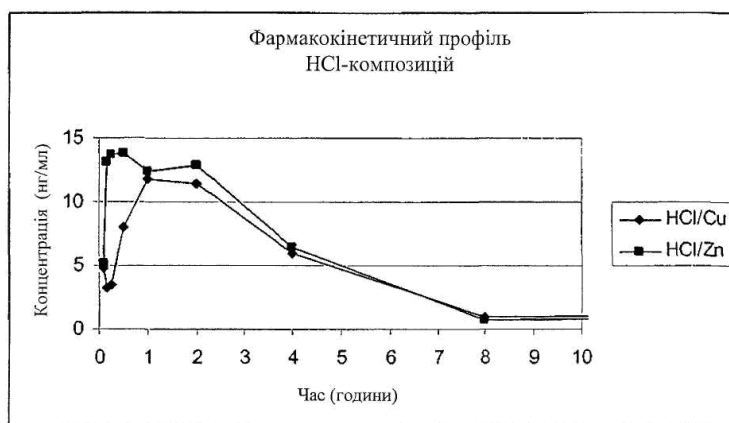
Фіг. 7



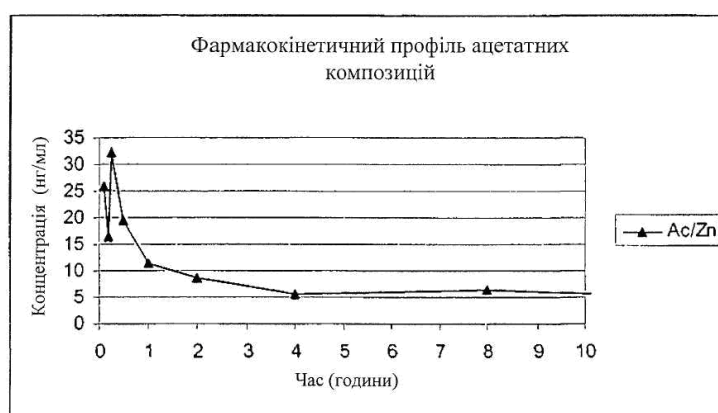
Фіг. 8



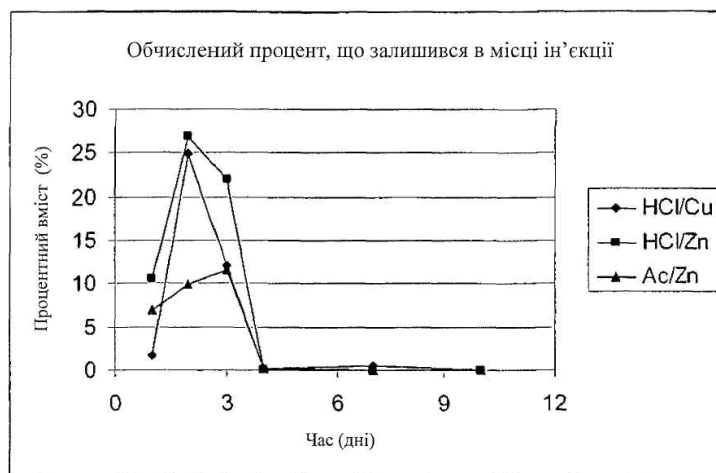
Фіг. 9



Фіг. 10



Фіг. 11



Фіг. 12