

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043848**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.29
- (21) Номер заявки
201891946
- (22) Дата подачи заявки
2017.03.10
- (51) Int. Cl. **A61K 38/26** (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(54) **КОАГОНИСТЫ ГЛЮКАГОНА И GLP-1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖИРЕНИЯ**

- (31) **62/306,121**
- (32) **2016.03.10**
- (33) **US**
- (43) **2019.04.30**
- (86) **PCT/EP2017/055679**
- (87) **WO 2017/153575 2017.09.14**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)
- (72) Изобретатель:
**Беднарек Мария Александра, Ермутус
Луц Ульрих, Эмбери Филип, Петроун
Марселла (GB)**
- (74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В. (RU)**
- (56) **WO-A2-2014091316
WO-A1-2011094337
WO-A2-2012050923
WO-A1-2012138941
WO-A1-2011006497**

-
- (57) Предусмотрены способы предупреждения и лечения ожирения и диабета у пациентов, предусматривающие введение пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона.
-

B1

043848

043848

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/306121, поданной 10 марта 2016 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ссылка на перечень последовательностей, предоставленный в электронном виде

Содержание перечня последовательностей, предоставленного в электронном виде в текстовом файле ASCII (название: Sequencelisting_ST25.txt; размер: 14333 байта; и дата создания: 6 марта 2017 г.), который был подан вместе с настоящей заявкой, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Ожирение представляет собой значительную и растущую проблему здравоохранения во всем мире. Оно связано со многими опасными для жизни заболеваниями, такими как сердечно-сосудистое заболевание, заболевание почек, гипертензия, инсульт, бесплодие, нарушение функции дыхательной системы и диабет 2 типа.

Глюкагон и глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1) происходят из препроглюкагона, полипептида-предшественника из 158 аминокислот, который подвергается процессингу в различных тканях с образованием ряда различных пептидов, происходящих из проглюкагона, в том числе глюкагона, глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида 2 (GLP-2) и оксинтомодулина (ОХМ), которые вовлечены в широкий спектр физиологических функций, в том числе гомеостаз глюкозы, секрецию инсулина, опорожнение желудка и развитие кишечника, а также регуляцию потребления пищи. Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, который соответствует аминокислотам 33-61 проглюкагона (53-81 препроглюкагона), тогда как GLP-1 вырабатывается в виде пептида из 37 аминокислот, который соответствует аминокислотам 72-108 проглюкагона (92-128 препроглюкагона). Амид GLP-1(7-36) или кислота GLP-1(7-37) являются биологически активными формами GLP-1, которые характеризуются по сути эквивалентной активностью по отношению к рецептору GLP-1.

Глюкагон выделяется поджелудочной железой и взаимодействует с рецептором глюкагона ("glucR"). Глюкагон оказывает свое действие в печени с повышением уровня глюкозы в крови посредством глюконеогенеза и гликогенолиза. Когда уровень глюкозы начинает снижаться, глюкагон дает сигнал печени расщеплять гликоген и высвобождать глюкозу, что вызывает повышение уровней глюкозы в крови до нормального уровня.

GLP-1 характеризуется отличающимися биологическими активностями в сравнении с глюкагоном. Он секретируется из L-клеток кишечника и связывается с рецептором GLP-1. Его виды активности включают стимуляцию синтеза и секреции инсулина, ингибирование секреции глюкагона и подавление потребления пищи.

Было показано, что как глюкагон, так и GLP-1, действуя в качестве агонистов в отношении их соответствующих рецепторов, являются эффективными в потере веса. Определенные аналоги GLP-1 для лечения ожирения имеются в продаже или находятся на стадии разработки, в том числе, например, лираглутид (VICTOZA® от Novo Nordisk) и эксенатид (Byetta® от Eli Lilly/Amylin). Пептиды, являющиеся агонистами глюкагона/GLP-1, также были раскрыты в WO 2014/091316.

Несмотря на доступность некоторых терапевтических средств для контроля уровня глюкозы в крови ни одно из них в настоящее время не способствует значительной потере веса, что остается существенной неудовлетворенной потребностью для пациентов. Пятьдесят процентов пациентов переходят от монотерапии пероральными лекарственными препаратами для контроля уровня глюкозы (обычно метформином) к началу приема инсулина в течение 10 лет, часто принимая многочисленные пероральные комбинированные терапевтические средства до начала приема инсулина. Применение инсулина усиливает набор веса, что может составлять почти 6 кг в первый год после начала терапии инсулином. Такой набор веса может приводить к повышенной инсулинорезистентности, которая связана с гипертонией, дислипидемией и повышенным риском существенных нежелательных явлений со стороны сердечно-сосудистой системы. Что касается снижения инсулинорезистентности, значительная потеря веса (>5%) является оптимальным вмешательством для снижения инсулинорезистентности, хотя этого в настоящее время можно достичь посредством интенсивных вмешательств в режим питания и образ жизни и/или бариатрического хирургического вмешательства. Сохраняется потребность в способах введения пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, людям с применением схем дозирования, которые являются терапевтически эффективными при лечении диабета и ожирения, но не вызывают нежелательных эффектов.

Краткое описание

В данном документе предусмотрены способы предупреждения и лечения ожирения и диабета, а также связанных состояний у пациентов, предусматривающие введение пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона.

В одном случае способ снижения веса тела предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность

HX₂QGTFTSDX₁₀SX₁₂X₁₃LX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈AX₂₀X₂₁FX₂₃X₂₄WLX₂₇X₂₈GX₃₀;

где X_2 представляет собой G или S, X_{10} представляет собой Y или K, X_{12} представляет собой K, E, R или S, X_{13} представляет собой K или Y, X_{15} представляет собой D или E, X_{16} представляет собой S или G, X_{17} представляет собой E, R, Q или K, X_{18} представляет собой R, S или A, X_{20} представляет собой R, K или Q, X_{21} представляет собой D или E, X_{23} представляет собой V или I, X_{24} представляет собой A или Q, X_{27} представляет собой E или V, X_{28} представляет собой A или K и X_{30} представляет собой G или R (SEQ ID NO: 4).

В одном случае способ снижения содержания жира в организме предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ лечения ожирения предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, вызванного или характеризующегося избыточным весом тела, предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ контроля веса предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ усиления окисления липидов предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ сокращения потребления пищи предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ снижения уровня глюкозы в плазме крови предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ улучшения гликемического контроля предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ достижения гликемического контроля предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ снижения веса и контроля уровня глюкозы предусматривает введение субъекту-человеку, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае у субъекта имеется диабет. В одном случае диабет представляет собой сахарный диабет 2 типа.

В одном случае способ лечения сахарного диабета 2 типа предусматривает введение человеку пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае способ улучшения гликемического контроля у субъекта-человека с сахарным диабетом 2 типа предусматривает введение субъекту 50-600 или 100-600 мкг пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4.

В одном случае посредством введения обеспечивается снижение веса тела. В одном случае посредством введения обеспечивается лечение ожирения. В одном случае посредством введения обеспечивается снижение содержания жира в организме.

В одном случае X_2 представляет собой G, X_{10} представляет собой K, X_{12} представляет собой E, R или S, X_{13} представляет собой K, X_{17} представляет собой E или K, X_{18} представляет собой S, X_{20} представляет собой R, X_{27} представляет собой E или X_{28} представляет собой A.

В одном случае X_2 представляет собой G, X_{10} представляет собой K, X_{12} представляет собой E, R или S, X_{13} представляет собой K, X_{17} представляет собой E или K, X_{18} представляет собой S, X_{20} представляет собой R, X_{27} представляет собой E и X_{28} представляет собой A.

В одном случае пептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19, состоит по сути из таковой или состоит из таковой.

В одном случае введение предусматривает введение начальной дозы в течение 3-10 дней и второй более высокой дозы после этого.

В одном случае начальную дозу вводят в течение 3-7 дней. В одном случае начальная доза представляет собой 100 мкг пептида. В одном случае вторую дозу вводят в течение по меньшей мере четырех

дней. В одном случае начальную дозу вводят в течение четырех последовательных дней и вторую дозу вводят в течение по меньшей мере четырех последовательных дней. В одном случае вторая доза составляет 150-200 мкг пептида. В одном случае вторая доза составляет 150 или 200 мкг пептида.

В одном случае введение дополнительно предусматривает введение третьей дозы после второй дозы, где третья доза является более высокой, чем вторая доза. В одном случае начальную дозу вводят в течение 3-10 дней и вторую дозу вводят в течение 3-10 дней. В одном случае начальную дозу вводят в течение 3-7 дней и вторую дозу вводят в течение 3-7 дней. В одном случае начальную дозу вводят в течение четырех последовательных дней, вторую дозу вводят в течение четырех последовательных дней и третью дозу вводят в течение по меньшей мере четырех последовательных дней. В одном случае начальную дозу вводят в течение четырех последовательных дней, вторую дозу вводят в течение семи последовательных дней и третью дозу вводят в течение по меньшей мере четырех последовательных дней. В одном случае третья доза составляет 200-400 мкг пептида. В одном случае третья доза составляет 200, 300 или 400 мкг пептида.

В одном случае начальную дозу, составляющую 100 мкг, вводят в течение четырех дней, вторую дозу, составляющую 150 мкг, вводят в течение четырех дней, и затем третью дозу, составляющую 200 мкг, вводят ежедневно. В одном случае начальную дозу, составляющую 100 мкг, вводят в течение пяти дней, вторую дозу, составляющую 150 мкг, вводят в течение пяти дней, и третью дозу, составляющую 200 мкг, вводят в течение пяти дней, и затем четвертую дозу, составляющую 300 мкг, вводят ежедневно. В одном случае начальную дозу, составляющую 100 мкг, вводят в течение пяти дней, вторую дозу, составляющую 200 мкг, вводят в течение пяти дней, и затем третью дозу, составляющую 300 мкг, вводят ежедневно.

В одном случае вводят 50 мкг пептида. В одном случае вводят 100 мкг пептида. В одном случае вводят 150 мкг пептида. В одном случае вводят 200 мкг пептида. В одном случае вводят 250 мкг пептида. В одном случае вводят 300 мкг пептида. В одном случае вводят 400 мкг пептида.

В одном случае пептид вводят ежедневно. В одном случае пептид вводят один раз в день.

В одном случае пептид вводят в течение по меньшей мере одной недели, в течение по меньшей мере двух недель, в течение по меньшей мере трех недель или в течение по меньшей мере четырех недель.

В одном случае пептид вводят с помощью инъекции. В одном случае введение является подкожным.

В одном случае введение приводит в результате к по меньшей мере 20% снижению площади под кривой зависимости концентрации глюкозы от времени после проведения теста толерантности к пище.

В одном случае уровень глюкозы снижается. В одном случае уровень глюкозы представляет собой уровень глюкозы в плазме крови натощак. В одном случае уровень глюкозы представляет собой постпрандиальный уровень глюкозы после проведения теста толерантности к пище.

В одном случае введение приводит в результате к потере веса на по меньшей мере 1,0 кг, по меньшей мере 1,3 кг или от приблизительно 1,3 кг до приблизительно 2,0 кг. В одном случае вес субъекта снижается на по меньшей мере 3,5 кг или по меньшей мере 5 кг. В одном случае вес субъекта снижается на по меньшей мере 2%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5% или по меньшей мере 10%. В одном случае вес субъекта снижается на от приблизительно 2% до приблизительно 20%, от приблизительно 2% до приблизительно 25% или от приблизительно 2% до приблизительно 30%.

В одном случае жир представляет собой жир в печени. В одном случае содержание жира в печени снижается на по меньшей мере 20%. В одном случае содержание жира в печени у субъекта снижается на от приблизительно 20% до приблизительно 40%. В одном случае введение приводит в результате к снижению содержания жира в печени на приблизительно одну треть. В одном случае у субъекта снижается объем печени.

В одном случае посредством введения обеспечивается снижение уровней гемоглобина A1c (HbA1c). В одном случае уровень HbA1c у субъекта снижается на по меньшей мере 0,6%. В одном случае уровень HbA1c у субъекта снижается на по меньшей мере 0,9%. В одном случае уровень HbA1c у субъекта снижается на от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 2% или от приблизительно 0,5% до приблизительно 3%. В одном случае уровень HbA1c у субъекта снижается до 6,3% или ниже.

В одном случае посредством введения обеспечивается снижение уровней фруктозамина.

В одном случае аппетит субъекта снижается.

В одном случае расход энергии у субъекта повышается.

В одном случае прогрессирование заболевания прекращается. В одном случае прогрессирование заболевания обращается.

В одном случае пептид получен синтетическим способом с помощью твердофазного синтеза.

В одном случае при твердофазном синтезе применяют химическое средство на основе флуоренил-метилоксикарбонилхлорида.

В одном случае карбоксильная группа X₃₀, представляющей собой G или R, в пептиде является немодифицированной. В одном случае карбонильная группа X₃₀ в пептиде является амидированной.

В одном случае пептид содержит пальмитоилловый фрагмент при N(эпсилон)-группе остатка лизи-

на. В одном случае пальмитоиловая группа связана с лизином посредством линкера. В одном случае линкер представляет собой гамма-глутамат. В одном случае пептид содержит стеариловый или стеаратный фрагмент при N(эпсилон)-группе остатка лизина. В одном случае лизиновый остаток представляет собой X₁₀.

В одном случае пептид связывается с рецептором глюкагона человека в анализе сAMP 1 при EC₅₀ менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ.

В одном случае пептид связывается с рецептором GLP-1 человека в анализе сAMP 1 при EC₅₀ менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ.

В одном случае пептид является агонистом в отношении активности GLP-1, агонистом в отношении активности глюкагона или агонистом в отношении активности как GLP-1, так и глюкагона.

В одном случае пептид связывается как с рецептором глюкагона, так и с рецептором GLP-1, при этом пептид характеризуется в по меньшей мере приблизительно 2, 5 или 10 раз большей активностью по сравнению с природным лигандом в отношении рецептора GLP-1, чем в отношении рецептора глюкагона.

В одном случае пептид дополнительно содержит гетерологичный фрагмент. В одном случае гетерологичный фрагмент представляет собой белок, пептид, домен белка, линкер, органический полимер, неорганический полимер, полиэтиленгликоль (PEG), биотин, альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA), участок, отвечающий за связывание HAS с FcRn, антитело, домен антитела, фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, доменное антитело, альбумин-связывающий домен, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасную структуру, отличную от каркасной структуры на основе FnIII, эпитопную метку, рекомбинантный полипептидный полимер, цитокин, липид или комбинацию двух или более из перечисленных фрагментов.

В одном случае субъект имеет индекс массы тела (BMI), составляющий от 27 до 40 кг/м². В одном случае субъект имеет BMI, составляющий 30-39,9 кг/м². В одном случае субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40 кг/м².

В одном случае у субъекта имеется избыточный вес. В одном случае субъект страдает ожирением. В одном случае у субъекта имеется

(i) избыточный вес; и

(ii) гипертензия, сахарный диабет 2 типа, дислипидемия, сердечно-сосудистое заболевание в анамнезе или их комбинация.

В одном случае у субъекта имеется

(i) избыточный вес; и

(ii) дисгликемия, гипертензия, дислипидемия, синдром обструктивного апноэ во сне или их комбинация.

В одном случае субъект получает терапию инсулином. В одном случае количество вводимого инсулина снижают. В одном случае терапию инсулином прекращают.

В одном случае субъект получает инсулин, метформин, сульфонилмочевину, ингибитор натрий-зависимого котранспортера глюкозы 2 (sglt-2), ингибитор дипептидилпептидазы 4 (DPP-IV), глутазон, ингибитор альфа-глюкозидазы или их комбинацию.

В одном случае период полувыведения пептида составляет от приблизительно 10 ч до приблизительно 12 ч.

В одном случае введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке.

В одном случае пептид содержит SEQ ID NO: 19 и пептид вводят в начальной дозе, составляющей 100 мкг, в течение четырех дней, во второй дозе, составляющей 150 мкг, в течение четырех дней, а затем в дозе, составляющей 200 мкг, ежедневно.

В одном случае пептид содержит SEQ ID NO: 19 и пептид вводят в начальной дозе, составляющей 100 мкг, в течение пяти дней, во второй дозе, составляющей 200 мкг, в течение пяти дней, а затем в дозе, составляющей 300 мкг, ежедневно.

В одном случае пептид содержит SEQ ID NO: 19 и пептид вводят в начальной дозе, составляющей 100 мкг, в течение пяти дней, во второй дозе, составляющей 150 мкг, в течение пяти дней, во второй дозе, составляющей 200 мкг, в течение пяти дней, а затем в дозе, составляющей 300 мкг, ежедневно.

В одном случае у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В одном случае субъект страдает ожирением. В одном случае у субъекта имеется

(i) избыточный вес; и

(ii) гипертензия, сахарный диабет 2 типа, дислипидемия, сердечно-сосудистое заболевание в анамнезе или их комбинация.

В одном случае у субъекта имеется

- (i) избыточный вес; и
- (ii) дисгликемия, гипертензия, дислипидемия, синдром обструктивного апноэ во сне или их комбинация.

Краткое описание графических материалов/фигур

На фиг. 1 показано среднее процентное изменение веса тела от нулевого дня у мышей DIO после введения пептида G730, являющегося коагонистом глюкагона/GLP-1, в трех различных дозах по сравнению с обработкой инертной средой и обработкой лираглутидом. Исходный вес тела в различных группах составлял соответственно: инертная среда: $47,4 \pm 3,7$ г; 10 нмоль/кг G730: $44,5 \pm 2,2$ г; 20 нмоль/кг G730: $45,9 \pm 3,6$ г; и 50 нмоль/кг G730: $46,1 \pm 2,4$ г.

На фиг. 2 показано среднее процентное изменение веса тела от нулевого дня у мышей DIO после введения пептида G797, являющегося коагонистом глюкагона/GLP-1, в трех различных дозах по сравнению с обработкой инертной средой и обработкой лираглутидом. Исходный вес тела в различных группах составлял соответственно: инертная среда: $47,4 \pm 3,7$ г; 5 нмоль/кг G797: $47,5 \pm 1,2$ г; 20 нмоль/кг G797: $47,4 \pm 2,2$ г; и 50 нмоль/кг G797: $47,2 \pm 1,8$ г.

На фиг. 3 показано среднее процентное изменение веса тела от нулевого дня у мышей DIO после введения пептида G812, являющегося коагонистом глюкагона/GLP-1, в дозе, составляющей 20 нмоль/кг, по сравнению с обработкой инертной средой и обработкой лираглутидом. Исходный вес тела в различных группах составлял соответственно: инертная среда: $47,4 \pm 3,7$ г; и 20 нмоль/кг G812: $49,2 \pm 3,4$ г.

Фиг. 4 представляет собой график, на котором сравниваются результаты в отношении изменения веса тела для трех пептидов, являющихся коагонистами глюкагона/GLP-1, которые представлены на фиг. 1, 2 и 3.

На фиг. 5 показано среднее процентное изменение веса тела от нулевого дня у мышей DIO после введения пептида G796, являющегося коагонистом глюкагона/GLP-1, в двух различных дозах по сравнению с обработкой инертной средой и обработкой лираглутидом.

На фиг. 6 показано среднее процентное изменение веса тела от нулевого дня у мышей DIO после введения пептида G865, являющегося коагонистом глюкагона/GLP-1, в двух различных дозах по сравнению с обработкой инертной средой и обработкой лираглутидом.

На фиг. 7 показано среднее процентное изменение веса тела от нулевого дня у мышей DIO после введения пептида G933, являющегося коагонистом глюкагона/GLP-1, в двух различных дозах по сравнению с обработкой инертной средой и обработкой лираглутидом.

Фиг. 8 представляет собой график, на котором сравниваются результаты в отношении изменения веса тела для трех пептидов, являющихся коагонистами глюкагона/GLP-1, которые представлены на фиг. 5, 6 и 7.

На фиг. 9 представлены блок-схемы запланированного и фактического исследования с однократной нарастающей дозой G933.

На фиг. 10 представлено распределение субъектов в исследовании с однократной нарастающей дозой G933.

На фиг. 11 показаны медианные уровни глюкозы у субъектов в исследовании с однократной нарастающей дозой G933.

На фиг. 12 показаны медианные уровни инсулина у субъектов в исследовании с однократной нарастающей дозой G933.

На фиг. 13 представлена блок-схема когорт 1-4 в исследовании с многократными нарастающими дозами G933. MEDI0382 относится к линейному пептиду из 30 аминокислот с последовательностью под SEQ ID NO: 19.

На фиг. 14 показаны средние уровни глюкозы в тесте толерантности к пище у субъектов, получавших лечение с помощью плацебо или 100 мкг G933 в день 7 (когорты 1), плацебо или 150 мкг G933 в день 11 (когорты 2) и плацебо или 200 мкг G933 в день 15 (когорты 3).

На фиг. 15 показано изменение исходных уровней глюкозы натощак у субъектов, получавших лечение с помощью плацебо или G933 в день 7 (когорты 1), плацебо или G933 в день 9 (когорты 3) и плацебо или G933 в день 15 (когорты 3).

На фиг. 16 показано изменение веса от исходного веса в течение исследования в обеих когортах 1 и 3 и в дни 7 и 15 в когортах 1 и 3 соответственно.

На фиг. 17 показана концентрация MEDI0382 в плазме крови после повторного введения доз.

На фиг. 18 показано улучшение контроля уровня глюкозы, как измерено по уровням глюкозы у пациентов, получавших лечение с помощью G933. Пунктирные линии представляют уровни глюкозы, наблюдаемые на исходном уровне (день 1), а сплошные линии представляют уровни глюкозы, наблюдаемые в день 41.

На фиг. 19 показано улучшение контроля уровня глюкозы, как измерено по уровням HbA1c у пациентов, получавших лечение с помощью G933.

На фиг. 20 показано снижение абсолютного значения веса у пациентов, получавших лечение с по-

мощью G933 (на данной фигуре G933 обозначен как "MEDI" или "0382"; "Plac" обозначает плацебо).

На фиг. 21 показано снижение процентного значения веса у пациентов, получавших лечение с помощью G933 (на данной фигуре "MEDI" обозначает "MEDI0382").

На фиг. 22 показана оценка снижения содержания жира в печени у пациентов, получавших лечение с помощью G933. Представлены репрезентативные изображения от отдельных субъектов.

На фиг. 23 показана частота тошноты и рвоты, наблюдаемая у пациентов, получавших лечение с помощью G933.

На фиг. 24 представлена блок-схема когорт 5 и 6 в исследовании с многократными нарастающими дозами G933.

На фиг. 25 показано улучшение контроля уровня глюкозы, как измерено по уровням глюкозы у пациентов когорты 5, получавших лечение с помощью G933, по сравнению с плацебо. Пунктирные линии представляют уровни глюкозы, наблюдаемые на исходном уровне (день 1), а сплошные линии представляют уровни глюкозы, наблюдаемые в день 17 (на данной фигуре G933 обозначен как "MEDI").

На фиг. 26 показано улучшение контроля уровня глюкозы, как измерено по уровням глюкозы у пациентов когорты 6, получавших лечение с помощью G933, по сравнению с плацебо. Пунктирные линии представляют уровни глюкозы, наблюдаемые на исходном уровне (день 1), а сплошные линии представляют уровни глюкозы, наблюдаемые в день 17 (на данной фигуре G933 обозначен как "MEDI").

На фиг. 27 показано процентное изменение AUC глюкозы от исходного уровня во всех когортах.

На фиг. 28 показано улучшение в отношении уровней глюкозы натощак в когортах 5 и 6 (на данной фигуре G933 обозначен как "MEDI").

На фиг. 29 показано изменение веса от исходного уровня в когортах 5 и 6 (на данной фигуре G933 обозначен как "MEDI").

На фиг. 30 показана потеря веса и изменение уровня глюкозы во всех когортах.

На фиг. 31 показана концентрация G933 в плазме крови в когорте 5 в дни 16 и 22 и в когорте 6 в дни 11 и 17.

Подробное описание

Определения.

Во всем настоящем раскрытии форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким таким объектам; например, подразумевается, что "полинуклеотид" представляет собой один или несколько полинуклеотидов. В связи с этим формы единственного числа, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

Кроме того, термин "и/или", в случаях когда он используется в данном документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без другого. Таким образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Следует понимать, что какие бы аспекты ни описывались в данном документе формулировкой "содержащий", другие аналогичные аспекты, описываемые терминами "состоящий из" и/или "состоящий по сути из", также предусмотрены. Пептид, "содержащий" конкретную аминокислотную последовательность, относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность, где пептид может содержать дополнительные аминокислоты или другие модификации аминокислотной последовательности или не содержать их. Пептид, "состоящий из" конкретной аминокислотной последовательности, относится к пептиду, содержащему только данную аминокислотную последовательность, а не дополнительные аминокислоты или другие модификации аминокислотной последовательности. Пептид, "содержащий" аминокислотную последовательность, "состоящую из" конкретной аминокислотной последовательности, относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность, а не дополнительные аминокислоты; однако пептид может содержать другие модификации аминокислотной последовательности (например, ацильный фрагмент или пальмитоильный фрагмент).

Если не определено иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в настоящем изобретении. Единицы измерения, приставки и символы указаны в их форме, принятой согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- к карбокси-концу. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты настоящего изобретения, которые могут обеспечиваться ссылкой на описание в целом. Соответственно термины, определяемые непосредственно ниже, более полно определены посредством ссылки на описание во

всей его полноте.

Подразумевается, что используемый в данном документе термин "полипептид" охватывает "полипептид" в единственном числе, а также "полипептиды" во множественном числе, и содержит любую цепь или цепи из двух или более аминокислот. Таким образом, используемые в данном документе термины "пептид", "пептидная субъединица", "белок", "аминокислотная цепь", "аминокислотная последовательность" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", несмотря на то что каждый из этих терминов может иметь более конкретное значение. Термин "полипептид" можно использовать вместо любых из этих терминов или взаимозаменяемо с таковыми. Термин дополнительно подразумевает полипептиды, которые подверглись посттрансляционным или постсинтетическим модификациям, например, гликозилированию, ацетилированию, фосфорилированию, амидированию, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическому расщеплению или модификации с помощью не встречающихся в природе аминокислот.

Более конкретно, термин "пептид", используемый в данном документе, охватывает полноразмерные пептиды и их фрагменты, варианты или производные, например, пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона (например, длиной в 29, 30 или 31 аминокислоту). "Пептид", раскрытый в данном документе, например, пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, может представлять собой часть слитого полипептида, содержащего дополнительные компоненты, такие как, например, Fc-домен или домен альбумина, в целях повышения периода полувыведения. Пептид, описанный в данном документе, также может быть дериватизирован с помощью ряда различных способов.

Термин "выделенный" относится к состоянию, в котором пептиды или нуклеиновые кислоты будут в целом соответствовать настоящему изобретению. Выделенные пептиды и выделенные нуклеиновые кислоты не будут содержать или фактически не будут содержать материал, с которым они связаны в природных условиях, как, например, другие пептиды или нуклеиновые кислоты, с которыми они встречаются в их природном окружении или среде, в которой их получают (например, клеточной культуре), если такое получение осуществляют с помощью технологии рекомбинантной ДНК, осуществляемой на практике *in vitro* или *in vivo*. Пептиды и нуклеиновую кислоту можно составлять с разбавителями или вспомогательными веществами и оставлять выделенными для практических целей - например, пептиды, как правило, будут смешивать с желатином или другими носителями, в случае применения для покрытия микротитрационных планшетов для применения в иммунологических анализах, или будут смешивать с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями при применении в диагностике или терапии.

"Рекомбинантный" пептид относится к пептиду, полученному посредством технологии рекомбинантной ДНК. Полученные рекомбинантным путем пептиды, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, поскольку представляют собой нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или в значительной степени очищены с помощью любой подходящей методики.

Термины "фрагмент", "аналог", "производное" или "вариант" в контексте пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, подразумевают любой пептид, у которого сохраняется по меньшей мере некоторая необходимая активность, например, связывание с рецепторами глюкагона и/или GLP-1. Предусмотренные в данном документе фрагменты пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, включают фрагменты, подвергнутые протеолитическому расщеплению, фрагменты, подвергнутые делеции, которые характеризуются необходимыми свойствами в ходе экспрессии, очистки и/или введения субъекту.

Термин "вариант", используемый в данном документе, относится к пептиду, который отличается от упомянутого пептида вследствие аминокислотных замен, делеций, вставок и/или модификаций. Варианты можно получать с применением известных из уровня техники методик мутагенеза. Варианты могут также или в качестве альтернативы содержать другие модификации - например, пептид можно конъюгировать или связывать, например, сливать с гетерологичной аминокислотной последовательностью или другим фрагментом, например, для повышения периода полувыведения, растворимости или стабильности. Примеры фрагментов, подлежащих конъюгации или связыванию с пептидом, предусмотренным в данном документе, включают без ограничения альбумин, Fc-область иммуноглобулина, полиэтиленгликоль (PEG) и т.п. Пептид может быть также конъюгирован или получен в виде связанного с линкером или другой последовательностью для облегчения синтеза, очистки или идентификации пептида (например, 6-His) или для усиления связывания полипептида с твердой подложкой.

Термин "идентичность последовательности", используемый в данном документе, относится к связи между двумя или более полинуклеотидными последовательностями или между двумя или более полипептидными последовательностями. Если положение в одной последовательности занято одним и тем же основанием нуклеиновой кислоты или аминокислотой, что и в соответствующем положении в сравниваемой последовательности, то последовательности в этом положении считаются "идентичными". Процентное значение "идентичности последовательностей" рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислота находится в обеих после-

довательностях, с получением числа "идентичных" положений. Число "идентичных" положений затем делят на общее число положений в окне сравнения и умножают на 100 с получением процентного значения "идентичности последовательностей". Процентное значение "идентичности последовательностей" определяют путем сравнения двух последовательностей, подвергнутых оптимальному выравниванию, в окне сравнения. Чтобы произвести оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения, часть последовательности полинуклеотида или полипептида в окне сравнения может содержать добавления или делеции, называемые гэпами, в то время как эталонная последовательность остается неизменной. Оптимальное выравнивание представляет собой такое выравнивание, в котором даже при наличии гэпов образуется наибольшее возможное число "идентичных" положений между эталонной и сравниваемой последовательностями. Процентное значение "идентичности последовательностей" между двумя последовательностями можно определить с помощью версии программы "BLAST 2 Sequences", которая была доступна из Национального центра биотехнологической информации по состоянию на 1 сентября 2004 г., при этом программа включает в себя программы BLASTN (для сравнения нуклеотидных последовательностей) и BLASTP (для сравнения полипептидных последовательностей), при этом в основе данных программ лежит алгоритм Карлина-Альтшуля (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90(12):5873-5877, 1993). При использовании "BLAST 2 Sequences" для длины слова (3), штрафа за открытие гэпа (11), штрафа за продолжение гэпа (1), величины максимального продления с использованием гэпов (50), ожидаемого значения (10) и каких-либо других необходимых параметров, включая, без ограничения, опцию "matrix", можно применять параметры, которые были параметрами по умолчанию по состоянию на 1 сентября 2004 года. Термины "композиция" или "фармацевтическая композиция" относятся к композициям, содержащим предусмотренный в данном документе пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, вместе, например, с фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или разбавителями, для введения субъекту, нуждающемуся в лечении, например, субъекту-человеку, подлежащему лечению от ожирения.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к композициям, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для контакта с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности или других осложнений в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

"Эффективное количество" представляет собой такое количество предусмотренного в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, введение которого субъекту, либо в однократной дозе, либо в виде части серии доз, является эффективным для лечения, например, лечения ожирения. Количество является эффективным, например, если его введение приводит в результате к одному или нескольким из потери веса или поддержания веса (например, предотвращения набора веса), снижения содержания жира в организме, предупреждения или модуляции гипогликемии, предупреждения или модуляции гипергликемии, стимуляции синтеза инсулина или сокращения потребления пищи. Данное количество может представлять собой фиксированную дозу для всех субъектов, подлежащих лечению, или может меняться в зависимости от веса, состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению, необходимой степени потери веса или поддержания веса, состава пептида, профессиональной оценки медицинского случая и других значимых факторов.

Термин "субъект" означает любого субъекта, в частности субъекта-млекопитающего, нуждающегося в лечении с помощью предусмотренного в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона. Субъекты-млекопитающие включают без ограничения людей, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей, коров, человекообразных обезьян, обезьян, орангутанов и шимпанзе и т.д. В одном варианте осуществления субъектом является субъект-человек. Используемый в данном документе термин "субъект, нуждающийся в этом" относится к индивидууму, для которого целесообразным является лечение, например, к субъекту, страдающему ожирением, или субъекту, склонному к ожирению, для которого целесообразным является содействие потере веса или снижению содержания жира в организме, поддержание веса или содержания жира в организме или предупреждение или сведение к минимуму набора веса в течение определенного периода времени.

Такие термины, как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить", относятся к терапевтическим мерам, с помощью которых излечивают диагностированное патологическое состояние или нарушение и/или останавливают его прогрессирование. Такие термины, как "предупреждение", относятся к профилактическим или предупредительным мерам, с помощью которых предупреждают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже имеется заболевание или состояние. Нуждающиеся в предупреждении включают тех, кто склонен к развитию заболевания или состояния, и тех, у кого необходимо предупредить заболевание или состояние. Например, фраза "лечение пациента", у которого имеется заболевание или состояние, вызванное или характеризующееся избыточным весом тела, относится к снижению тяжести заболевания или состояния до такой степени, что субъект больше не страдает от дискомфорта и/или вызванной им измененной функции. Фраза "предупреждение" заболевания или состояния, вызванного или характеризующееся избыточным весом тела, относится к снижению вероятности возникновения заболевания или состояния и/или снижению частоты возникновения заболевания или состояния (например, относительному снижению частоты возникновения по сравнению с пациентами, не получившими

лечение).

Такие термины, как "снижение тяжести", относятся к терапевтическим мерам, с помощью которых замедляют или ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или нарушения. Например, фраза "снижение тяжести" заболевания или состояния, вызванного или характеризующегося избыточным весом тела, относится к снижению тяжести заболевания или состояния (например, снижению веса по сравнению с пациентами, не получавшими лечение, или повышению контроля уровня глюкозы).

Как используется в данном документе, "пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона" представляет собой химерный пептид, который характеризуется активностью в отношении рецептора глюкагона, составляющей по меньшей мере приблизительно 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более по сравнению с нативным глюкагоном, и также характеризуется активностью в отношении рецептора GLP-1, составляющей по меньшей мере приблизительно 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более по сравнению с нативным GLP-1, в условиях анализа 1.

Используемый в данном документе термин "нативный глюкагон" относится к встречающемуся в природе глюкагону, например глюкагону человека, содержащему последовательность под SEQ ID NO: 1. Термин "нативный GLP-1" относится к встречающемуся в природе GLP-1, например GLP-1 человека, и представляет собой общий термин, который охватывает, например, амид GLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 2), кислоту GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 3) или смесь этих двух соединений. Подразумевается, что используемая в данном документе общая ссылка на "глюкагон" или "GLP-1" в отсутствие любого дополнительного обозначения означает соответственно нативный глюкагон человека или нативный GLP-1 человека. Если не указано иное, "глюкагон" относится к глюкагону человека, и "GLP-1" относится к GLP-1 человека.

Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона.

В данном документе предусмотрены пептиды, которые связываются как с рецептором глюкагона, так и с рецептором GLP-1. Иллюстративные пептиды предусмотрены в WO 2014/091316, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления пептид представляет собой MEDI0382, т.е. линейный пептид из 30 аминокислот с последовательностью под SEQ ID NO: 19, которая содержит гамма-глутаматный линкер и дериватизацию пальмитоиловой группой по остатку 10. В определенных вариантах осуществления пептиды, предусмотренные в данном документе, являются коагонистами активности глюкагона и GLP-1. Такие пептиды обозначаются в данном документе как пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона. Предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются активностями GLP-1 и глюкагона в оптимальных соотношениях для содействия потере веса, предупреждению набора веса или поддержанию необходимого веса тела, а также характеризуются оптимальной растворимостью, способностью составления и стабильностью. В определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются активными в отношении рецепторов GLP1 человека и глюкагона человека, в определенных вариантах осуществления относительная активность по сравнению с природным лигандом в отношении рецептора GLP-1 составляет в 1, 2, 5, 8, 10, 15, 20 или 25 раз больше, чем в отношении рецептора глюкагона.

В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются необходимыми специфическими активностями в отношении рецепторов глюкагона и GLP-1 и характеризуются необходимыми относительными специфическими активностями для содействия потере веса. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении рецептора GLP-1 *in vitro*, показанными с помощью EC_{50} в анализе cAMP 1 (см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении рецептора GLP-1 *in vitro*, показанными с помощью EC_{50} в анализе cAMP с 4,4% сывороточного альбумина человека (анализ 2, см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении рецептора глюкагона *in vitro*, показанными с помощью EC_{50} в анализе cAMP 1 (см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении рецептора глюкагона *in vitro*, показанными с помощью EC_{50} в анализе cAMP с 4,4% сывороточного альбумина че-

ловека (анализ 2, см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются относительными соотношениями специфической активности в отношении GLP1-R/glucR по сравнению с нативными лигандами в диапазоне от приблизительно 0,01 до 0,50, например, от приблизительно 0,02 до 0,30, например, приблизительно 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28 или 0,30 при применении анализа 2.

В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении глюкозозависимого инсулинотропного пептида (желудочного ингибиторного пептида) (GIPR) *in vitro*, показанными с помощью EC_{50} в анализе сAMP 1 (см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении рецептора GIPR *in vitro*, показанными с помощью EC_{50} в анализе сAMP с 4,4% сывороточного альбумина человека (анализ 2, см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются одним или несколькими критериями из приемлемой растворимости, простоты составления, стабильности в плазме крови и улучшенных фармакокинетических свойств. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферах в пределах широкого диапазона значений pH. В определенных вариантах осуществления пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в обычных буферных растворах при концентрации не более 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мг/мл или более, в буферных системах и при диапазоне значений ионной силы, например, от 0,25 до 150 мМ, в том числе без ограничения фосфатном буфере, Tris-буфере, глутаматном буфере, ацетатном буфере, сукцинатном буфере или гистидиновом буфере. Иллюстративные буферы включают 100 мМ глутаматный буфер с pH 4,5, 100 мМ ацетатный буфер с pH 5, 100 мМ сукцинатный буфер с pH 5, 100 мМ фосфатный буфер с pH 6, 100 мМ гистидиновый буфер с pH 6, 100 мМ фосфатный буфер с pH 6,5, 100 мМ фосфатный буфер с pH 7,0, 100 мМ гистидиновый буфер с pH 7,0, 100 мМ фосфатный буфер с pH 7,5, 100 мМ Tris-буфер с pH 7,5 и 100 мМ Tris-буфер с pH 8,0. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферах при 0,8 мг/мл в пределах диапазона значений pH, например, от pH 4,0 до pH 8,0, например, при значениях pH, составляющих 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 или 8,5. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферах со значениями pH от 4,5 до 8,0, от 5,0 до 8,0, от 5,5 до 8,0, от 6,0 до 8,0, от 6,5 до 8,0, от 7,0 до 8,0, от 4,5 до 8,5, от 5,5 до 8,5, от 5,5 до 8,5, от 6,0 до 8,5, от 6,5 до 8,5 или от 7,0 до 8,5.

В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, могут быть составлены в стандартные фармацевтические составы. Иллюстративные составы включают без ограничения: 0,1 М Tris с pH 7,5, 150 мМ маннита, конечное значение pH состава 7,2; 0,05 М Tris, 50 мМ аргинина/пролина, конечное значение pH состава 8,0; или натрий-фосфатный буфер (pH 8)/1,85% вес./об., пропиленгликоля, конечное значение pH состава 7,0. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в этих или других составах при концентрации не более 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мг/мл или более.

В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются приемлемо стабильными в сыворотке крови или плазме крови. Обычные продукты распада глюкагона или GLP-1 включают продукты с массой +1 (кислоту) и продукты расщепления под действием DPP IV. Продукты с массой +1 могут образовываться в результате деамидирования на амидных группах глутамата или на С-конце. Продукты расщепления образуются в результате действия протеазы DPP IV в плазме крови. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, остаются стабильными в плазме крови при уровнях вплоть до 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% через 24 ч в плазме крови при 37°C.

В данном документе предусмотрен пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, содержащий аминокислотную последовательность

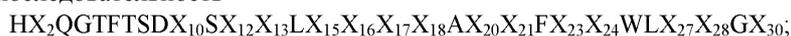


Таблица 1

Последовательности пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
G730	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-амид X13 = K(gE-palm)	16
G797	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-palm)	17
G849	HSQGT FTSDX SRYLD SRSAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-palm)	18
G933	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-кислота X10 = K(gE-palm)	19
G865	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-palm)	20
G796	HSQGT FTSDX SSYLD SRRAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-palm)	21
G812	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFLAW LEKGR-амид X10 = K(gE-palm)	22
G380	HGQGT FTSDY SKYLD SXRAQ DFVQW LVAGG-амид X17 = K(gE-palm)	23
G931	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-кислота X13 = K(gE-palm)	24
G934	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFLAW LEKGR-кислота X10 = K(gE-palm)	25
G973	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-кислота X10 = K(gE-palm)	26
GLP1	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFLAW LVKGR	SEQ ID NO:2 (амид 7-36)/SEQ ID NO:3 (кислота 7-37)
Глюкагон	HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LMNT	SEQ ID NO:1

K(gE-Palm)=лизин с пальмитоиловой группой, конъюгированной с азотом в положении эпсилон посредством линкера на основе гамма-глутаминовой кислоты.

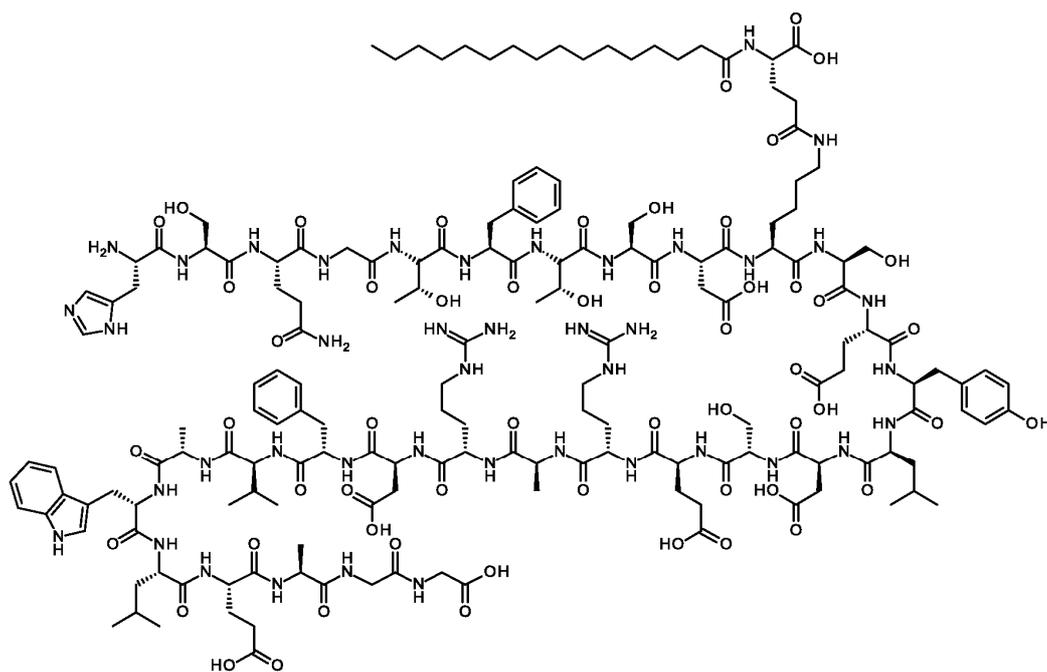
В определенных вариантах осуществления выделенный пептид представляет собой G933 (SEQ ID NO: 19).

Оба пептида G797 и G933 имеют остаток глутамата в положении 12 и сохраняют устойчивую активность в отношении рецепторов как глюкагона, так и GLP-1, как показано в примере 2. Соответствующий остаток в эксендине-4 и глюкагоне представляет собой лизин, а в GLP-1 -серин. Хотя считается, что данный остаток не контактирует с рецептором, изменение заряда с положительного на отрицательный может модифицировать смежное окружение. Кроме того, G797, G849 и G933 имеют остаток глутамата в положении 27. Остаток 27 представляет собой лизин в эксендине-4, и представляет собой незаряженный гидрофобный остаток в GLP1 (валин) и глюкагоне (метионин). Лизин в эксенатиде способствует электростатическим взаимодействиям с рецептором GLP1 в положениях, соответствующих остаткам Glu127 и Glu24 (C.R. Underwood et al., J. Biol. Chem., 285, 723-730 (2010); S. Runge et al., J. Biol. Chem., 283, 11340-11347 (2008)). Несмотря на то что можно ожидать потерю активности GLP1R в случае, когда заряд в положении 27 изменяется на отрицательный, данное изменение является совместимым с активностью G797, G849 и G933 в отношении GLP1R.

MEDI0382 представляет собой синтетический пептид, являющийся двойным агонистом рецепторов глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1) и глюкагона. MEDI0382 представляет собой G933 (SEQ ID NO: 19), который содержит гамма-глутаматный линкер и дериватизацию пальмитоиловой группой по остатку 10.

MEDI0382 является химически синтезированным. Удлинение пептидной цепи на смоле выполняют с помощью твердофазного пептидного синтезатора с применением протоколов, предоставляемых производителем, в целях соединения Fmoc-аминокислот. Остатки глутамин 20 и 24 замещают аминокислотами, которые не подвергаются деамидированию и остаток аргинина 17 заменяют на глутамат в целях снижения подверженности к протеолизу. Последовательность MEDI0382 показана ниже.

L-гистидил-L-серил-L-глутаминилглицил-L-треонил-L-фенилаланил-L-треонил-L-серил-L-альфа-аспартил-(N6-[N-(1-оксогексадецил)-L-гамма-глутамил])-L-лизил-L-серил-L-альфа-глутамил-L-тирозил-L-лейцил-L-альфа-аспартил-L-серил-L-альфа-глутамил-L-аргинил-L-аланил-L-аргинил-L-альфа-L-аспартил-L-фенилаланил-L-валил-L-аланил-L-триптофил-L-лейцил-L-альфа-глутамил-L-аланилглицилглицин.



Способы получения пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона.

В настоящем изобретении предусмотрен способ получения пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона. Предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, можно получить с помощью любого подходящего способа. Например, в определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, химически синтезируют с помощью способов, известных средним специалистам в данной области техники, например, с помощью твердофазного синтеза, как описано Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.*, 55:2149-2154). Твердофазный синтез пептидов можно выполнять, например, с помощью автоматических синтезаторов с применением стандартных реагентов, например, как объясняется в примере 1. В качестве альтернативы предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, можно получить рекомбинантным путем с применением подходящей комбинации вектор/клетка-хозяин, как хорошо известно среднему специалисту в данной области техники. Доступен ряд способов рекомбинантного получения пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона. В целом полинуклеотидную последовательность, кодирующую пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, вставляют в соответствующее средство экспрессии, например, вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности. Нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, вставляют в вектор в соответствующей рамке считывания. Затем вектором экспрессии трансфицируют подходящую клетку-хозяина, которая будет экспрессировать пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения клетки бактерий, дрожжей или млекопитающих. Ряд коммерчески доступных векторных систем для экспрессии в хозяине можно использовать для экспрессии описанных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона.

Модификации, конъюгаты, продукты слияния и производные.

В определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, стабилизируют посредством аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления карбоксильная группа С-концевой аминокислоты является амидированной. В определенный вариант осуществления С-концевая аминокислота представляет собой амидированный глицин, например, G730, G797, G849, G865, G796, G812 и G380. В определенных вариантах осуществления, например в G933, С-концевой глицин представляет собой немодифицированную кислоту. В определенных вариантах осуществления предусмотрены пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются ацилированными. Например, в определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, содержат один или несколько остатков лизина, в которых пальмитоильный фрагмент присоединен к N(эпсилон)-группе. В определенных вариантах осуществления линкер вставлен между лизином и пальмитоильной группой. Данный линкер может представлять собой группу гамма-глутаминовой кислоты или альтернативный линкер, такой как без ограничения бета-аланин и аминоксаяновая кислота. Можно применять различные способы ацилирования, такие как добавление холестеринных или миристоильных групп. В определенных вариантах осуществления пальмитоильный фрагмент добавлен в положении 13 (например, G730). В определенных вариантах осуществле-

ния пальмитоиловый фрагмент добавлен в положении 10 (например, G797, G849, G933, G865, G796 и G812). В определенных вариантах осуществления пальмитоиловый фрагмент добавлен в положении 17 (например, G380).

Предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, например, G730, G797, G849 и G933, могут быть пальмитоилированными для продления их периода полувыведения за счет связывания с сывороточным альбумином, благодаря чему снижается их предрасположенность к почечному клиренсу, как описано в примере 1. В качестве альтернативы или в дополнение раскрытый в данном документе пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, может быть связан с гетерологичным фрагментом, например, для продления периода полувыведения. Гетерологичный фрагмент может представлять собой белок, пептид, домен белка, линкер, органический полимер, неорганический полимер, полиэтиленгликоль (PEG), биотин, альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA), участок, отвечающий за связывание HSA с FcRn, антитело, домен антитела, фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, доменное антитело, альбумин-связывающий домен, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасную структуру, отличную от каркасной структуры на основе FnIII, эпитопную метку, рекомбинантный полипептидный полимер, цитокин или комбинацию двух или более таких фрагментов.

Например, пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, могут быть слиты с гетерологичным полипептидом. Пептиды могут быть слиты с белками посредством слияния и экспрессии рекомбинантного гена либо посредством химической конъюгации. Белки, которые подходят в качестве партнеров для слияния, включают без ограничения сывороточный альбумин человека, антитела и фрагменты антител, в том числе слияние с Fc-участком антител. GLP-1 сливали с данными белками с сохранением специфической активности (L. Baggio et al., *Diabetes*, 53, 2492-2500 (2004); P. Barrington et al., *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13, 426-433 (2011); P. Paulik et al., *American Diabetes Association*, 2012, Poster, 1946). Удлиненные последовательности рекомбинантных пептидов также были описаны для получения высокой молекулярной массы пептида (V. Schellenberger et al., *Nature Biotechnol.*, 27, 1186-1190 (2009); PASylation (EP2173890)). В определенных вариантах осуществления пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, включены в качестве N-концевой части слитого белка с партнером по слиянию, например, альбумином или Fc-участком, на C-терминальном конце. Описанные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, также могут быть слиты с пептидами или белковыми доменами, такими как 'Albudab', которые характеризуются аффинностью к сывороточному альбумину человека (M.S. Dennis et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 35035-35043 (2002); A. Walker et al., *Protein Eng Design Selection*, 23, 271-278 (2010)). Способы слияния раскрытых в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, с гетерологичным полипептидом, например, альбумином или Fc-областью, хорошо известны средним специалистам в данной области техники.

Другие гетерологичные фрагменты могут быть конъюгированы с пептидами, являющимися агонистами GLP-1/глюкагона, для дополнительной стабилизации или увеличения периода полувыведения. В случае химического слияния определенные варианты осуществления предусматривают сохранение свободного N-конца, однако могут быть сделаны альтернативные точки для дериватизации. Дополнительным альтернативным способом является дериватизация пептида посредством крупного химического фрагмента, такого как высокомолекулярный полиэтиленгликоль (PEG). "Пегелированный пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона" имеет цепь PEG, ковалентно связанную с ним. Дериватизацию пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, например, пегелирование, можно выполнять по лизину, который является пальмитоилированным, или в качестве альтернативы по остатку, такому как цистеин, который замещен или включен в результате удлинения с целью обеспечения возможности дериватизации. Вышеуказанные формы пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, можно характеризовать *in vitro* и/или *in vivo* в отношении относительной специфической активности и соотношения между активацией рецепторов GLP-1 и глюкагона.

Общий термин "цепь полиэтиленгликоля" или "цепь PEG" относится к смесям конденсированных полимеров этиленоксида и воды с разветвленной или прямой цепью, представленных общей формулой $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где n представляет собой целое число, равное 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или больше. Цепи PEG включают полимеры этиленгликоля со средней суммарной молекулярной массой, выбранной из диапазона от приблизительно 500 до приблизительно 40000 дальтон. Средняя молекулярная масса цепи PEG указывается числом, например, PEG-5000 обозначает цепь полиэтиленгликоля, имеющую среднюю суммарную молекулярную массу, составляющую приблизительно 5000.

Пегелирование можно выполнять с помощью любой из реакций пегелирования, известных из уровня техники. См., например, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10, 1992 и заявки на европейский патент EP 0154316 и EP 0401384. Пегелирование можно проводить с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой полиэтиленгликоля (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Способы получения пегелированных пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, в целом предусматривают стадии

(а) обеспечения вступления в реакцию пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное PEG) в

условиях, при которых молекула присоединяется к одной или нескольким группам PEG; и

(b) получения продукта(продуктов) реакции.

Фармацевтические композиции.

Дополнительно предусмотрены композиции, например фармацевтические композиции, которые содержат эффективное количество предусмотренного в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, которые составлены для лечения заболеваний обмена веществ, например ожирения.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии с известными способами. Подходящие способы получения описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Композиция может быть представлена во множестве форм, в том числе без ограничения в форме водного раствора, эмульсии, геля, суспензии, лиофилизированной форме или любой другой форме, известной из уровня техники. Кроме того, композиция может содержать фармацевтически приемлемые добавки, в том числе, например, разбавители, связующие, стабилизаторы и консерванты. Непосредственно после составления композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту.

Носители, которые можно использовать с композициями по настоящему изобретению, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения, например, тироглобулин, альбумины, такие как сывороточный альбумин человека, столбнячный анатоксин и полиаминокислоты, такие как поли-L-лизин, поли-L-глутаминовая кислота, коровий белок вируса гриппа, вируса гепатита В и т.п. Можно использовать ряд водных носителей, например воду, буферную воду, 0,8% физиологический раствор, 0,3% глицин, гиалуроновую кислоту и т.п. Композиции можно стерилизовать с помощью обычных хорошо известных методик стерилизации или можно стерилизовать посредством фильтрации. Полученная в результате композиция может быть упакована для применения как есть, или лиофилизована, при этом перед введением лиофилизированный препарат объединяют со стерильным раствором. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для того, чтобы практически соответствовать физиологическим условиям, например, вещества для регулирования уровня pH и буферные вещества, вещества для регулирования тоничности, смачивающие вещества и т.п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и т.д.

Способы лечения.

Значительная потеря веса без хирургического вмешательства с эффективным контролем уровня глюкозы остается важнейшей неудовлетворенной потребностью для пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Способы лечения, предусмотренные в данном документе, могут удовлетворить эту потребность.

Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382) могут сочетать в себе эффект глюкагона, например, подавление потребления пищи или регуляцию уровней глюкозы, с эффектом GLP-1, например, подавление моторики желудка или стимуляция высвобождения инсулина. Следовательно, они могут оказывать свое действие с ускорением устранения избыточной жировой ткани, индуцированием устойчивой потери веса и улучшением гликемического контроля. Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), могут также оказывать свое действие со снижением факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как высокий уровень холестерина и высокий уровень холестерина LDL или нарушенные соотношения HDL/LDL. Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), могут также оказывать свое действие со снижением уровней триглицеридов.

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения ожирения или связанного с ожирением заболевания или нарушения, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, (например, MEDI0382). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. Дополнительно предусмотрено 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), для лечения ожирения или связанного с ожирением заболевания или нарушения. Дополнительно предусмотрено применение 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренного в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), в изготовлении лекарственного препарата для лечения ожирения или связанного с ожирением заболевания или нарушения. 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В опре-

деленных случаях у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В определенных случаях субъект имеет индекс массы тела (BMI), составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В настоящем изобретении также предусмотрен способ снижения веса тела, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ снижения содержания жира в организме, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. В определенных случаях жир представляет собой жир в печени. Снижение содержания жира в печени может привести к повышенной чувствительности к инсулину и/или улучшению функции печени. В определенных случаях содержание жира в печени снижается по меньшей мере на 20%. В определенных случаях содержание жира в печени у субъекта снижается на от приблизительно 20% до приблизительно 40%. В определенных случаях введение приводит в результате к снижению содержания жира в печени на приблизительно одну треть. В определенных случаях у субъекта снижается объем печени. В определенных случаях посредством введения обеспечивается снижение уровней гемоглобина A1c (HbA1c) (например, на по меньшей мере 0,6%, на по меньшей мере 0,9%, на от приблизительно 0,5% до приблизительно 1,5%, на от приблизительно 0,5% до приблизительно 2%, на от приблизительно 0,5% до приблизительно 3% или до приблизительно 6,3% или ниже).

В настоящем изобретении также предусмотрен способ контроля веса, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 дней или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575

или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. Посредством введения может также обеспечиваться снижение веса тела или лечение ожирения. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением.

Как предусмотрено в данном документе, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить для предупреждения набора веса, предупреждения повышения содержания жира (например, жира в печени), содействия потере веса, содействия снижения содержания жира (например, жира в печени), снижения избыточного веса тела, снижения содержания жира (например, жира в печени) или лечения ожирения (например, посредством контроля аппетита, питания, потребления пищи, потребления калорий и/или расхода энергии), в том числе патологического ожирения. Повышенный расход энергии может быть результатом, например, повышенного окисления жирных кислот и/или глюкозы в печени. В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния, вызванного или характеризующегося избыточным весом тела или избыточным содержанием жира в организме, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно применять для лечения других связанных с ожирением нарушений обмена веществ. 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). Примеры других связанных с ожирением (связанных с избыточным весом тела) нарушений включают без ограничения инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе, преддиабет, повышенный уровень глюкозы натощак, диабет 2 типа, гипертензию, дислипидемию (или комбинацию этих факторов риска, связанных с обменом веществ), формы глюкагономы, сердечно-сосудистые заболевания, такие как застойная сердечная недостаточность, атеросклероз, артериосклероз, коронарное заболевание сердца или заболевание периферических артерий, инсульт, нарушение функции дыхательной системы или заболевание почек. В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения сахарного диабета 2 типа, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или отдельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. Посредством введения может также обеспечиваться снижение веса тела или лечение ожирения. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ улучшения гликемического контроля или достижения гликемического контроля, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лече-

нии, 50-600 мкг или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или раздельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. Посредством введения может также обеспечиваться снижение веса тела или лечение ожирения. В определенных случаях у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. Улучшение гликемического контроля можно оценивать с помощью теста толерантности к пище. В определенных случаях улучшение гликемического контроля приводит в результате к по меньшей мере 10% снижению площади под кривой зависимости концентрации глюкозы от времени (AUC) после проведения теста толерантности к пище (например, по сравнению с AUC до лечения). В определенных случаях улучшение гликемического контроля приводит в результате к по меньшей мере 15% снижению AUC после проведения теста толерантности к пище (например, по сравнению с AUC до лечения). В определенных случаях улучшение гликемического контроля приводит в результате к по меньшей мере 20% снижению AUC глюкозы после проведения теста толерантности к пище (например, по сравнению с AUC до лечения). В определенных случаях улучшение гликемического контроля приводит в результате к по меньшей мере 25% снижению AUC глюкозы после проведения теста толерантности к пище (например, по сравнению с AUC до лечения). В определенных случаях улучшение гликемического контроля приводит в результате к по меньшей мере 30% снижению AUC глюкозы после проведения теста толерантности к пище (например, по сравнению с AUC до лечения). Улучшение гликемического контроля также можно оценивать на основании уровня гемоглобина A1c и фруктозамина.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ снижения веса и контроля уровня глюкозы, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382). 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в одной или раздельных дозах. Кроме того, 50-600 или 100-600 мкг раскрытого в данном документе пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. Посредством введения может также обеспечиваться снижение веса тела или лечение ожирения. В определенных случаях у субъекта имеется сахарный диабет 2 типа. В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект имеет BMI, составляющий по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. В определенных случаях введение приводит в результате к потере веса на по меньшей мере 1,0 кг, по меньшей мере 1,3 кг или от приблизительно 1,3 кг до приблизительно 2,0 кг. В определенных случаях вес субъекта снижается на по меньшей мере 3,5 кг или по меньшей мере 5 кг. В определенных случаях вес субъекта снижается на от приблизительно 2 кг до приблизительно 30 кг. В определенных случаях вес субъекта снижается на по меньшей мере 2%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5% или по меньшей мере 10%. В определенных случаях вес субъекта снижается на от приблизительно 2% до приблизительно 20%, от приблизительно 2% до приблизительно 25% или от приблизительно 2% до приблизительно 30%.

В определенных случаях введение предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), приводит в результате к потере веса на по меньшей мере 1 кг. В определенных случаях введение предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), приводит в результате к потере веса на по меньшей мере 1,3 кг. В определенных случаях введение предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, приводит в результате к потере веса на по меньшей мере 1,5 кг. В определенных случаях введение предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), приводит в результате к потере веса на 1-3 кг после четырех недель повторного введения дозы один раз в день. В определенных случаях введение преду-

смотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), приводит в результате к потере веса на 1,3-2 кг после четырех недель повторного введения дозы один раз в день. Путь введения предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), может представлять собой, например, пероральный, парентеральный, ингаляционный или местный. Термин "парентеральный", используемый в данном документе, предусматривает, например, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Другим примером формы для введения является раствор для инъекций, в частности для внутривенных или внутриартериальных инъекций или капельного введения. Предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в однократной дозе или многократных дозах. В определенных вариантах осуществления 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, вводят с помощью подкожной инъекции.

Составы для парентерального введения могут представлять собой однократную болюсную дозу, инфузионную или нагрузочную болюсную дозу с последующей поддерживающей дозой. Эти композиции можно вводить с конкретными фиксированными или переменными интервалами, например, один раз в день или по мере необходимости. Схемы дозирования также можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

В определенных случаях 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить один раз в день. В определенных случаях 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить один раз в день посредством инъекции (например, подкожного введения). В определенных случаях 50-600 или 100-600 мкг (например, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить один раз в день посредством инъекции (например, подкожного введения) в течение периода, составляющего по меньшей мере одну неделю, в течение периода, составляющего по меньшей мере две недели, в течение периода, составляющего по меньшей мере три недели, или в течение периода, составляющего по меньшей мере четыре недели. В определенных случаях 50-600 или 100-600 мкг (например, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в однократной дозе или разделенных дозах. В определенных случаях 50-600 или 100-600 мкг (например, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 мкг) предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в возрастающих дозах (например, титрование дозы, как, например, начальная доза, составляющая 100 мкг, вторая доза, составляющая 150 или 200 мкг, и необязательно третья доза, составляющая 200, 300 или 400 мкг, например, где начальную дозу и/или вторую дозу вводят в течение 3-10 или 3-7 дней). В определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в начальной дозе, составляющей 100 мкг, в течение четырех дней, во второй дозе, составляющей 150 мкг, в течение четырех дней, и затем в третьей дозе, составляющей 200 мкг, которую вводят ежедневно. В определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в начальной дозе, составляющей 100 мкг, в течение пяти дней, во второй дозе, составляющей 150 мкг, в течение пяти дней, в третьей дозе, составляющей 200 мкг, в течение пяти дней, и затем в четвертой дозе, составляющей 300 мкг, которую вводят ежедневно. В определенных вариантах осуществления предусмотренные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), можно вводить в начальной дозе, составляющей 100 мкг, в течение пяти дней, во второй дозе, составляющей 200 мкг, в течение пяти дней, и затем в третьей дозе, составляющей 300 мкг, которую вводят ежедневно.

В определенных случаях период полувыведения предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), составляет от приблизительно 7 до 13 ч. В определенных случаях период полувыведения предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), составляет от приблизительно 9 до 13 ч. В определенных случаях период полувыведения предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), составляет от приблизительно 7 до 12 ч. В определенных случаях период полувыведения предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), составляет от приблизительно 10 до 12 ч. В определенных случаях период полувыведения предусмотренных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона (например, MEDI0382), составляет от приблизительно 8 до 11 ч.

Наборы.

В еще одних вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы, содержащие пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, которые можно применять для выполнения способов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления набор содержит раскрытый в данном документе пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, в одном или нескольких контейнерах. Специалист в данной области техники без труда поймет, что раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, могут быть легко включены в один из установленных форматов набора, которые хорошо известны из уровня техники.

Примеры

Пример 1. Синтез, модификации и определение характеристик пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона.

Список сокращений.

Woc: трет-бутилоксикарбонил;

трет-Bu: трет-бутил;

DCM: дихлорметан;

DIC: диизопропилкарбодиимид;

Fmoc: 9-флуоренилфенилметоксикарбонил;

HOBT: 1-гидроксибензотриазол;

HPLC: высокоэффективная жидкостная хроматография;

Mtt: 4-метилтритил;

NMP: N-метилпирролидон;

Pbf: 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил;

TFA: трифторуксусная кислота;

TIS: триизопропилсилан;

Ttt: трифенилметил, тритил.

Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, синтезировали следующим образом. Удлинение пептидных цепей на смоле TGR NovaSyn или предварительно нагруженной Fmoc смоле Ванга (NovaBiochem) выполняли с помощью твердофазного пептидного синтезатора PRELUDE™ (Protein Technologies, Тусон, Аризона, США). Протоколы, предоставляемые производителем, применяли для связывания сложных гидроксibenзотриазоловых эфиров аминокислот в N-метилпирролидоне (NMP). Флуоренилметоксикарбонильную (Fmoc) группу использовали для временной защиты альфа-аминогрупп аминокислот, тогда как боковые цепи защищали трет-бутилом (трет-Bu) в случае серина, треонина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, тирозина, и 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf) в случае аргинина, и тритилом (Ttt) в случае гистидина. N-концевую аминогруппу гистидина в положении 1 защищали трет-бутилоксикарбонильной группой (Woc). Lys(Mtt) включали в пептидную цепь в случае, если требовалась последующая химическая модификация боковой цепи.

По завершении удлинения пептидной цепи Mtt-группу удаляли путем промывания смолы с пептидом с помощью DCM, содержащего 2% TFA и 5% TIS (10×7 мл, каждый по 0,5 мин). Связывание липидного фрагмента с боковой цепью Lys выполняли на пептидном синтезаторе PRELUDE™ с применением DIC в качестве связующего реагента в присутствии HOBT. Пептиды отщепляли от смолы с применением смеси TFA:TIS:вода (95:2,5:2,5). Спустя 2 ч пребывания при комнатной температуре смолу с пептидом фильтровали, промывали с помощью TFA и объединенные фильтраты испаряли *in vacuo*. Остаток растирали с простым эфиром, и образованный осадок фильтровали, промывали простым эфиром и высушивали. Неочищенные пептиды растворяли в 5% уксусной кислоте в воде и анализировали с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления на колонке C8-A Polaris 3, соединенной с системой Varian 920-LC. Для анализа использовали стандартную градиентную систему из 10-90% буфера В в течение 15 мин. Буфер А представлял собой 0,1% TFA в воде и буфер В представлял собой 0,1% TFA в ацетонитриле. Профили HPLC регистрировали при 210 нм. Разделения посредством препаративной хроматографии выполняли на системе Varian ProStar с применением полупрепаративной колонки C18 RP XBridge от Waters. Для разделения использовали вышеописанную систему растворителей на основе воды и ацетонитрила в градиенте из 30-70% буфера В в течение 30 мин. Хроматографически гомогенные продукты (чистота >97%) анализировали с помощью масс-спектрометрии с электрораспылением (MassLynx, Waters).

Пример 2. Исследования *in vitro*.

Опосредованная рецептором глюкагона и GLP-1 выработка cAMP.

Биологическая активность пептидов в клеточном анализе активности cAMP (анализ 1).

Биологическую активность пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, синтезированных с помощью способа из примера 1, тестировали в отношении биологической активности, например стимуляции ответов со стороны одного или нескольких клеточных рецепторов, с помощью следующих способов. Стабильные линии клеток, экспрессирующие рецептор GLP-1 (GLP-1R) человека, мыши, крысы или собаки, рецептор глюкагона (GCGR) или рецептор глюкозозависимого инсулиноподобного пептида

(желудочного ингибиторного полипептида) (GIPR), создавали из клеток HEK293 или клеток CHO с помощью стандартных способов. Пептидная активация таких различных рецепторов приводила в результате к последующей выработке вторичного мессенджера cAMP, уровень которого можно было измерять в ходе анализа функциональной активности. Анализы cAMP выполняли с применением "среды для анализа".

Среда для анализа: 10% FBS в DMEM (Gibco № 41966), содержащая 0,5 мМ IBMX (Sigma № I7018).

Применяли 384-луночные планшеты с низкой способностью связывания белков (Greiner № 781280) для выполнения одиннадцати серийных разведений 1 к 5 тестируемых образцов, которые проводили в среде для анализа. Все разведения образцов получали в двух повторностях.

Замороженную криопробирку с клетками, экспрессирующими рецептор, представляющий интерес, быстро размораживали на водяной бане, переносили в предварительно нагретую среду для анализа и центрифугировали при 240×g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в среде для анализа в оптимальной концентрации (например, клетки, экспрессирующие hGCGR, в количестве 1×10^5 клеток/мл, клетки, экспрессирующие hGLP-1R и hGIPR, в количестве $0,5 \times 10^5$ клеток/мл).

Из планшета для разведений 5 мкл повтора вносили в 384-луночный планшет с черными мелкими лунками с U-образным дном (Corning № 3676). К нему добавляли 5 мкл суспензии клеток и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Уровни cAMP измеряли с помощью коммерчески доступного набора cAMP dynamic 2 HTRF (Cisbio, № по кат. 62AM4PEJ) согласно двухстадийному протоколу в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце отдельно получали меченное криплатом антитело к cAMP (донорный флуорофор) и cAMP-d2 (акцепторный флуорофор) путем разведения каждого 1/20 в буфере для конъюгата и лизиса, который предоставлялся в наборе. Во все лунки планшета для анализа добавляли 5 мкл меченого криплатом антитела к cAMP, и во все лунки добавляли 5 мкл cAMP-d2, за исключением лунок для неспецифического связывания (NSB), в которые добавляли буфер для конъюгата и лизиса. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем считывали на Envision (Perkin Elmer) с применением длины волны возбуждения 320 нм и длин волн испускания 620 и 665 нм. Последовательности синтезированных пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, и их значения EC_{50} , определенные в анализах cAMP, выполняемых в "среде для анализа", показаны в табл. 2. Все пептиды из табл. 2 синтезировали с амидом на C-конце. Дополнительные пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, синтезировали с кислотой на C-конце, и значения EC_{50} , определенные в анализах cAMP, выполняемых в "среде для анализа", показаны в табл. 3. Значения EC_{50} для дополнительных пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, которые получали в "среде для анализа", показаны в табл. 4. Все пептиды из табл. 4 имели амид на C-конце, если только они не обозначены как "кислота", в случае чего они имели кислоту на C-конце.

Таблица 2

Активность пептидов с амидом на C-конце, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, в отношении cAMP (анализ 1)

Анализ в среде для анализа			
Пептид	EC_{50} для GlucR человека	EC_{50} для GLP1R человека	EC_{50} для GIPr человека
	М	М	М
G730	6,23E-12	1,8E-11	4,5E-08
G797	6,14E-12	1,4E-11	3,4E-09
G849	2,26E-12	9,0E-12	1,7E-08
G865	1,26E-11	8,3E-12	2,2E-08
G796	1,76E-12	1,3E-11	1,4E-08
G812	8,17E-12	1,1E-11	2,7E-09
G380	2,17E-10	7,7E-11	1,3E-07
GLP1		8,1E-11	
Глюкагон	3,3E-12		

Таблица 3

Активность пептидов с кислотой на С-конце, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, в отношении cAMP (анализ 1)

Пептид	EC50 для GlucR человека	EC50 для GLP1R человека	EC50 для GIPr человека
	М	М	М
G931	1,78E-11	1,30E-10	0,00E+00
G933	5,92E-12	3,20E-11	9,70E-09
G934	6,30E-12	1,80E-11	3,60E-09
G973	8,90E-12	1,20E-11	4,70E-08

Таблица 4

Активность дополнительных пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, в отношении cAMP (анализ 1)

Исходная последовательность HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LVAGG всех пептидов, представленных в данном разделе, содержит LVAGG в положениях, соответствующих остаткам 26-30				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Участок и характер пальмитоилирования, замещений в исходной последовательности
	EC50 М	EC50 М	EC50 М	
Глюкагон	3,3E-12	4,2E-09	1,99E-07	
GLP1	1,53E-07	8,1E-11	1,53E-07	
g715	2,53E-12	2,04E-11	9,98E-10	K(gEpal)10
g716	2,46E-09	1,29E-08	1,18E-08	K(gEpal)11
g702	1,49E-09	3,35E-09	0,00E+00	K(gEpal)12, E17
g728	2,44E-09	1,69E-10	3,95E-07	K(gEpal)12, E17 R20 A24
g729	3,19E-11	7,29E-11	2,09E-07	K(gEpal)13 E17
g730	1,50E-11	3,95E-11	5,66E-08	K(gEpal)13 E17 R20 A24
g875	1,29E-10	2,98E-11	2,90E-08	K(gEpal)13 R20 A24, E17 Aib2
g841	Нет данных			K(gEpal)13 R20 A24, S18 R12 кислота
g802	1,81E-09	9,64E-11	9,12E-08	K(gEpal)13, R20 A24, E17, E12
g820	1,17E-11	3,39E-11	7,11E-08	K(gEpal)13, R20 A24, E17, R12
g842	8,31E-12	5,12E-11	8,83E-08	K(gEpal)13, R20 A24, E17, R12 кислота
g733	6,20E-08	2,31E-11	8,17E-07	K(gEpal)14, G2 E3
g803	1,08E-11	2,96E-11	3,29E-08	K(gEpal)14, R20 E24, S18
g843	Нет данных			K(gEpal)14, R20 E24, S18 R12, кислота
g732	3,96E-11	2,32E-11	2,94E-08	K(gEpal)14, R20 A24, E17 G2
g777	1,24E-12	2,74E-11	4,53E-09	K(gEpal)14, R20 A24, E17
g844	Нет данных			K(gEpal)14, R20 A24, E17 R12 Aib2 кислота
g845	Нет данных			K(gEpal)14, R20 A24, E17 R12, кислота
g821	4,63E-12	5,58E-11	1,40E-08	K(gEpal)14, R20 A24, E17, R12

g846	3,41E-11	4,38E-11	1,18E-08	K(gEpalм)14, R20 A24, E17, E12
g731	2,77E-11	4,22E-11	4,07E-08	K(gEpalм)14, E12
g670	8,00E-12	2,03E-11	1,49E-08	K(gEpalм)14, S18
g335	1,05E-11	7,33E-11	5,82E-07	K(gE-palm)17
g336	1,77E-12	3,66E-11	1,96E-08	K(gE-gE-palm)17
g384	4,29E-11	2,72E-11	1,70E-08	K(gEpalм)17, Aib2
g380	3,62E-10	1,00E-10	6,09E-07	K(gEpalм)17, G2
g736	9,19E-10	8,54E-11	0,00E+00	K(gEpalм)17, G2, A20 A24
g381	1,93E-09	9,08E-11	5,45E-07	K(gEpalм)17, E3
g678	4,52E-09	1,06E-10	1,23E-07	K(gEpalм)17, G2 E20
g599, g688	6,98E-11	1,20E-10	1,12E-07	K(gEpalм)17, E20
g679	1,89E-10	1,35E-10	1,17E-07	K(gEpalм)17, G2 E24
g600, g689	5,47E-12	6,66E-11	8,28E-08	K(gEpalм)17, E24
g680	3,68E-09	1,95E-10	9,67E-08	K(gEpalм)17, G2 E20 E24
g639	8,21E-08	2,44E-10	8,21E-08	K(gEpalм)17, S2 E3 E20 E24
g681	3,99E-08	2,83E-10	1,24E-07	K(gEpalм)17, G2, E3 E20 E24
g720	3,52E-10	5,34E-11	0,00E+00	K(gEpalм)17, G2 R20 E24 R12
g660	1,52E-09	1,06E-09	3,32E-07	K(gEpalм)17, G2 R20 E24
g835	4,24E-10	1,91E-10	9,72E-08	K(gEpalм)17, R20 E24, E12
g776	4,65E-12	7,02E-11	4,79E-08	K(gEpalм)17, R20 E24
g823	9,48E-12	9,73E-11	8,42E-08	K(gEpalм)17, R20 E24, R12
g867	7,04E-12	4,48E-11	4,17E-08	K(gEpalм)17, R20 A24
g736	9,20E-10	8,54E-11	0,00E+00	K(gEpalм)17, A20 A24, G2
g737	7,34E-07	8,14E-11	0,00E+00	K(gEpalм)17, A20 A24, G2 E3
g675	3,84E-08	1,51E-10	1,61E-06	K(gEpalм)17, E12 R20 A24 G2
Исходная последовательность HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFLVQW LEAGG всех пептидов, представленных в данном разделе, имеет последовательность LEAGG в положениях от остатка 26 и далее, если не указано иное, например, LERGG				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Участок и характер пальмитоилирования, замещений в исходной последовательности
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
g717	4,55E-13	5,77E-12	1,48E-09	K(gEpalм)10, LEAGG
g796	1,81E-12	1,40E-11	1,74E-08	K(gEpalм)10, LEAGG, R20 A24 S12
g847	Нет данных			K(gEpalм)10, LEAGG, R20 A24 S18 E12 Aib2 кислота
g797	9,64E-12	2,26E-11	4,64E-09	K(gEpalм)10, LEAGG, R20 A24 E17 E12
g798	5,10E-13	9,07E-12	1,51E-09	K(gEpalм)10, LEAGG, R20 A24 E17
g848	9,66E-13	9,42E-12	2,77E-09	K(gEpalм)10, LEAGG, R20 A24 E17 R12
g849	2,28E-12	9,07E-12	1,81E-08	K(gEpalм)10, LEAGG, R20 A24 S18 R12
g701	3,83E-09	7,40E-09	0,00E+00	K(gEpalм)12, LERGG, G2 E17
g840	5,30E-12	1,45E-10	1,02E-07	LEAGG, R20 A24, E17
g824	1,05E-12	4,71E-11	5,74E-08	K(gEpalм)14, LEAGG, R20, E24
g780	7,92E-13	1,20E-11	6,40E-08	K(gEpalм)14, LEAGG, R20 A24
g601	4,93E-13	3,98E-11	7,41E-08	K(gEpalм)14, LEAGG
g816	1,10E-12	3,16E-11	2,00E-08	K(gEpalм)14, LEAGG, E17
g817	1,68E-12	2,51E-11	1,52E-08	K(gEpalм)14, LEAGG, A18
g876	1,04E-11	8,63E-11	7,90E-08	K(gEpalм)14, LEAGG, R20, E24, E12
g805	1,44E-12	2,28E-11	9,97E-08	K(gEpalм)14, LEAGG, R20 E24
g850	2,19E-12	2,12E-11	8,96E-08	K(gEpalм)14, LEA, R20, A24, S18 R12

g836	1,55E-11	1,24E-10	1,00E-07	K(gEpalm)14, LEAGG, R20 E24, E17
g804	1,95E-12	7,15E-11	9,97E-08	K(gEpalm)14, LEA, R20, A24
g618	Нет данных			K(Ahx-palm)20, LEKGR
g781	2,86E-12	1,04E-10	4,02E-07	K(gEpalm)16, LEAGG, R20 A24
g782	1,56E-10	2,54E-11	1,43E-06	K(gEpalm)18, LEAGG, R20 A24
g744	3,92E-11	2,45E-09	0,00E+00	K(gE-palm)20, LEAGG
g746	3,54E-11	1,15E-08	0,00E+00	K(gE-palm)24, LEAGG
g747	9,42E-11	3,16E-09	1,04E-06	K(gE-palm)31, LEAGG
g512	6,06E-11	9,80E-11	4,07E-07	K(gEpalm)17, LEAGG, G2,
g513	7,23E-10	1,75E-10	2,98E-07	K(gEpalm)17, LEAGG, E3,
g734	8,28E-08	6,95E-11	1,17E-06	K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24, E3 E12
g837	2,13E-10	4,67E-10	1,14E-07	K(gE-palm)17, LEAGG, R20 A24 E12
g838	5,68E-12	2,37E-11	8,43E-08	K(Ahx-palm)17, LEAGG, R20 A24 E12
g783	9,11E-11	4,24E-11	8,46E-07	K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24 E12
g851	Нет данных			K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24, R12 кислота
g852	Нет данных			K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24, R12 Aib2 кислота
g819	2,34E-12	1,80E-11	1,03E-07	K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24
g536	4,78E-12	7,45E-11	0,00E+00	
g600	5,47E-12	6,66E-11	1,24E-07	K(gE-palm)17, LVAGG, E24
g599	9,62E-11	8,76E-11	1,13E-07	K(gE-palm)17, LVAGG, E20
Исходная последовательность HSQGT5 FTSDY10 SKYLD15 SRRAQ20 DFVQW25 LERGG-амид всех пептидов, представленных в данном разделе, имеет последовательность LERGG в положениях от остатка 26 и далее, если не указано иное, например, LENT				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Участок и характер пальмитоилирования, замещений в исходной последовательности
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
g825	3,67E-12	1,91E-11	8,67E-08	K(Ahx-palm)17, LENT, R20 E24, E12
g588	7,23E-11	1,10E-10	9,80E-08	K(gEpalm)17, LERGG, G2
g614	3,65E-12	9,31E-12	9,93E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, E12
g684	1,64E-10	1,51E-11	1,46E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2
g721	3,23E-09	4,11E-10	9,79E-07	K(gE-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2
g724	3,09E-08	1,90E-11	9,33E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2 E3
g772	1,84E-10	2,92E-10	1,54E-06	K(gE-palm)17, LERGG, R20 A24 E12
g795	1,10E-10	7,34E-11	5,79E-07	K(bA-palm)17, LERGG, R20 A24 E12
g794	4,69E-12	1,57E-11	3,22E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12
g826	4,23E-12	2,93E-11	5,80E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 кислота

g727	2,18E-10	2,63E-11	1,77E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2 кислота
g683	3,72E-10	1,59E-11	1,26E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, A20 A24 E12 G2
g722	1,11E-08	4,26E-10	1,67E-06	K(gE-palm)17, LERGG, A20 A24 E12 G2
g725	5,99E-08	2,52E-11	1,48E-06	K(Ahx-palm)17, LERGG, A20 A24 E12 G2 E3
g818	8,90E-12	2,10E-11	9,40E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, A20 A24 E12
g682	1,95E-10	1,43E-11	1,22E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 E24 E12 G2
g723	8,95E-09	3,30E-10	7,61E-07	K(gE-palm)17, LERGG, R20 E24 E12 G2
g726	1,31E-08	7,91E-12	2,15E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 E24 E12 G2 E3
g771	5,51E-12	1,75E-11	3,71E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 E24 E12
g617	Нет данных			K(Ahx-palm)20, LERGG, G2, E12,
g787	4,36E-11	6,65E-09	0,00E+00	K(Ahx-palm)20, LERGG, A24 E17
g806	9,9E-12	1,71E-10	1,05E-07	K(Ahx-palm)21, LERGG, A18
g616	Нет данных			K(Ahx-palm)24, LERGG, G2, E12
g701	3,83E-09	7,4E-09	0,00E+00	K(gE-palm)12, LERGG, G2 E17
Удлинение исходной последовательности HSQGT5 FTSDY10 SKYLD15 SRRAQ20 DFVQW25 LVAGG пептидов, представленных в данном разделе, имеют остатки, обозначенные по отношению к С-концу остатка 30, и амид на С-конце				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Удлинение последовательности
	EC50 M	EC50 M	EC50 M	
g316	1,06E-11	3,14E-11	3,65E-09	SSGGSS
g317	0,00E+00	2,63E-09	0,00E+00	SSGGSS K
g318	9,04E-09	1,14E-09	0,00E+00	SSGGSSK (palm)
g402	5,96E-11	8,57E-11	0,00E+00	SGSGSG
g319	1,04E-11	3,61E-11	0,00E+00	PSSGA PPPSK
g320	3,20E-12	9,38E-12	1,01E-09	PSSGA PPPSK (palm)
g315	5,04E-12	2,73E-11	1,97E-08	GGGG
g325	1,03E-11	2,61E-11	0,00E+00	GGGGK
g326	2,82E-12	2,47E-11	1,26E-08	GGGGK (palm)
g327	2,32E-12	1,93E-11	1,28E-08	GGGGK (gE-palm)
g321	2,79E-11	2,72E-11	6,41E-09	KNNRNNIAK
g322	3,55E-12	1,06E-11	1,72E-09	KNNRNNIAK (palm)

Сокращения.

K(gE-palm)=лизин с пальмитоиловой группой, конъюгированной с азотом в положении эpsilon посредством линкера на основе гамма-глутаминовой кислоты.

K(Ahx-palm)=лизин с пальмитоиловой группой, конъюгированной с азотом в положении эpsilon посредством линкера на основе аминоксептановой кислоты.

K(bA-palm)=лизин с пальмитоиловой группой, конъюгированной с азотом в положении эpsilon посредством линкера на основе бета-аланина; Aib, аминоксептановая кислота.

K(palm)=лизин с пальмитоиловой группой, непосредственно конъюгированной с азотом в положении эpsilon.

Анализ опосредованной рецептором глюкагона и GLP-1 выработки cAMP в присутствии плазменных концентраций сывороточного альбумина (анализ 2).

Показатели агонистической специфической активности пептидов, индуцирующих выработку cAMP, измеряли в клетках CHO, экспрессирующих рецепторы глюкагона (сокращенно GlucR или GCGR) или рецепторы GLP-1 человека, крысы или мыши, в присутствии сывороточного альбумина человека, крысы или мыши в концентрации 4,4, 3,2 и 3,2% соответственно следующим образом.

Клетки CHO со стабильной рекомбинантной экспрессией рецептора GlucR или GLP-1 человека, мыши или крысы культивировали в DMEM с 10% FBS и генетицином (100 мкг/мл). Криоконсервированные исходные суспензии клеток получали в 1× бессывороточной среде для замораживания клеток на основе DMSO (Sigma Aldrich) в количестве 2×10^7 /флакон и хранили при -80°C. Клетки быстро размораживали при 37°C и затем разводили в буфере для анализа (DMEM), содержащем сывороточный альбумин в концентрации 4,4, 3,2 и 3,2% соответственно в случае сывороточного альбумина человека, крысы и мыши. Пептиды серийно разводили в DMSO, а затем разводили в 100 раз в DMEM, содержащей сывороточный альбумин в указанной конечной концентрации. Разведенные пептиды затем переносили в 384-луночные микротитрационные планшеты для анализа с черными мелкими лунками. В планшеты для

анализа добавляли клетки и инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре. После инкубирования анализ прекращали и измеряли уровни cAMP с применением набора для анализа HTRF® dynamic d2 cAMP, доступного от CisBio Bioassays, в соответствии с руководствами производителя. Планшеты считывали на флуоресцентных планшет-ридерах ENVISION® от Perkin Elmer. Сывороточный альбумин человека и крысы приобретали у Sigma Aldrich, а сывороточный альбумин мыши у Equitech Bio Ltd. Данные преобразовывали в % дельта F, как описано в руководствах производителя, и анализировали с помощью 4-параметрической логистической модели для определения значений EC₅₀. Значения EC₅₀ в анализе 2 для определенных пептидов показаны в табл. 5. Определенные значения EC₅₀ в анализе 2 зависели как от характерной специфической активности тестируемых пептидов в отношении рецепторов GLP1 и глюкагона в рекомбинантных линиях клеток, так и от аффинности пептида к сывороточному альбумину, с помощью которой определяли количество свободного пептида. Связывание с сывороточным альбумином способствовало повышению получаемого значения EC₅₀. Долю свободного пептида при плазменных концентрациях альбумина и значение EC₅₀ при 0% HSA можно рассчитывать исходя из изменения выработки cAMP при определенной концентрации HSA. Например, для G730 и G933 получали значения содержания свободного пептида, составляющие 0,85 и 0,29%, при 4,4% HSA, и значения EC₅₀ в отношении GLP1R, составляющие 7 и 6 пМ, при 0% HSA соответственно. Для G797 и G849 получали значения содержания свободного пептида, составляющие 0,82 и 0,48%, при 4,4% HSA, и значения EC₅₀ в отношении GLP1R, составляющие 7 и 2 пМ, при 0% HSA соответственно. Для сравнения соотношения активностей в отношении GLP1R и GlucR среди разных пептидов и при разных условиях, можно было провести корреляционный анализ с применением расчета, приведенного ниже, где значения EC₅₀ соотносили со значениями EC₅₀ природных лигандов.

Таблица 5

Выраженные в EC₅₀ специфические активности пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, в присутствии плазменных концентраций сывороточного альбумина (анализ 2)

Пептид	Анализ с 4,4% сывороточного альбумина человека			Анализ с 3,2% сывороточного альбумина мыши			Анализ с 3,2% сывороточного альбумина крысы		
	EC50 для GLP1R человека	EC50 для GlucR человека	Соотношение GlucR/ GLP1R человека	EC50 для GLP1R мыши	EC50 для GlucR мыши	Соотношение GlucR мыши/ GLP1R мыши	EC50 для GLP1R крысы	EC50 для GlucR крысы	Соотношение GlucR /GLP1R крысы
G730	455	402	0,122	1100	5460	0,04	81	45080	0,06
G797	739	1137	0,07	290	764	0,08	60	23170	0,08
G849	172	79	0,235	88	103	0,17	44	4055	0,33
G933	943	564	0,179	540	377	0,29	136	15500	0,27
G865	150	570	0,027	96	1100	0,021	18	87100	0,01
G796	140	53	0,275	130	34	0,78	23	2000	0,36
G812	316	764	0,044	130	947	0,032	19	14100	0,04
G380	6543	53590	0,013	15000	576000	0,006			
GLP1	25			21			1,9		
Глюкагон		2,7		9700	4,97		557	60	

¹ Соотношения GlucR/GLP1R определяли следующим образом:

относительная специфическая активность в отношении GlucR=EC₅₀ глюкагона/EC₅₀ тестируемого пептида;

относительная специфическая активность в отношении GLP1R=EC₅₀ GLP1/EC₅₀ тестируемого пептида;

соотношение GlucR/GLP1R=относительная специфическая активность в отношении GlucR/относительная специфическая активность в отношении GLP1R.

Тестирование стабильности пептидов в плазме крови.

Стабильность пептидов G730, G797, G849 и G933 в плазме крови определяли следующим образом.

Исходные растворы пептидов с концентрацией приблизительно 200 мкмоль/л получали путем взвешивания пептида в виде твердого вещества в пробирке Eppendorf с низкой связывающей способностью и растворения в DMSO. 10 мкл исходных растворов добавляли к 990 мкл плазмы крови в пробирке Eppendorf с низкой связывающей способностью с получением в результате начальных концентраций

пептидов в плазме крови, составляющих приблизительно 2 мкмоль/л. Замороженную контрольную плазму крови, полученную от человека, крысы и мыши, размораживали и нагревали до температуры 37°C перед добавлением исходного раствора. Образцы плазмы крови с добавлением известного количества измеряемого вещества осторожно смешивали и обеспечивали уравнивание в течение приблизительно 5 мин перед началом эксперимента. Образцы плазмы крови инкубировали в течение 48 ч в CO₂ инкубаторе от GalaxyR при 37° С. Взятие образцов (30 мкл) выполняли через 0, 1, 2, 6,5, 17, 24 и 48 ч. Образцы хранили при -70°C до проведения анализа.

Образцы плазмы крови анализировали следующим образом. Образцы плазмы крови объемом 30 мкл подвергали осаждению белков с помощью 180 мл холодного этанола в 96-луночном планшете с низкой связывающей способностью (Eppendorf Protein LoBind). После смешивания и центрифугирования 100 мкл надосадочной жидкости переносили в новый планшет и 1 мкл вводили в аналитическую колонку.

Анализ выполняли с применением μ LC-системы (LC Exigent μ LC), сопряженной с масс-спектрометром с умеренным и высоким разрешением (PenTOF от Perkin Elmer) с ионизацией распылением в режиме положительных ионов. Аналитическая колонка представляла собой колонку Poroshell от Agilent (изготовленную по заказу) с характеристиками: 5 см, 1 мм, C18, с размером частиц 2,7 мкм. Расход: 0,1 мл/мин, с применением медленного градиента в обратной фазе. Применяемые подвижные фазы представляли собой ацетонитрил и воду, содержащую 0,1% муравьиной кислоты.

Полученные данные оценивали неавтоматизированным способом в отношении следующих продуктов распада: продукт с массой +1 (кислота) и продукт расщепления под действием DPP IV. Продукты с массой +1 могут образовываться в результате деамидирования на амидных группах глутамата или на С-конце. Продукты расщепления образуются в результате действия протеазы DPP IV в плазме крови. Как распад пептидов, так и образование продуктов пептидов выражали в процентном значении от начальной концентрации пептида. Пики объединяли и рассчитывали процент (%) оставшегося пептида: (площадь пика/площадь пика ОН)×100. Данные для момента времени 24 ч показаны в табл. 6. Уровни деамидирования и расщепления под действием DPP IV были низкими для G797 и G933.

Таблица 6

Стабильность пептидов в плазме крови

Пептид	Стабильность в плазме крови мыши через 24 ч.			Стабильность в плазме крови человека через 24 ч.			Стабильность в плазме крови крысы через 24 ч.		
	% стабильного пептида	% прод. с массой +1	% расщепленного под действием DPP продукта/расщепленного под действием DPP продукта с массой +1	% стабильного пептида	% прод. с массой +1	% расщепленного под действием DPP продукта/расщепленного под действием DPP продукта с массой +1	% стабильного пептида	% прод. с массой +1	% расщепленного под действием DPP продукта/расщепленного под действием DPP продукта с массой +1
G730	65	15	14 / 5	100	<1	<1	24	58	2
G797	84	<1	1	85	<1	<1	60	<1	1
G849	38	<1	22	100	<1	<1	69	16	3
G933	83		1	86		<1	85		<1
3									

Растворимость.

Растворимость пептидов оценивали в ряде буферных сред с рН в диапазоне от 4,5 до 8,0 следующим образом. Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, в формах высушенных порошков разводили в различных буферах при комнатной температуре. Поглощение измеряли при 280 нм с применением спектрофотометра NanoDrop 2000, и концентрацию пептида рассчитывали с применением следующего уравнения:

$$c = (A_{280} * M_w) / \epsilon,$$

где c - концентрация;

ϵ - коэффициент поглощения;

M_w - молекулярная масса;

A₂₈₀ - поглощение при 280 нм;

$$\epsilon = (1 \times \text{Trp} = 5560) + (1 \times \text{Tyr} = 1200).$$

Результаты показаны в табл. 7. Каждый из пептидов при концентрации 0,8 мг/мл был растворим в диапазоне рН (от 6,5 до 8,5). G730 был растворим в диапазоне рН от 4,5 до 8,0, G797 был растворим в диапазоне рН от 6 до 8,0, и G933 был растворим в диапазоне рН от 6 до 8,0. Растворимость G933 тестировали в ряде различных буферных систем, также показанных в табл. 7. G933 был растворим при концентрации

1 мг/мл по меньшей мере в следующих буферных системах: гистидин (рН 6 и 7; ионная сила: от 0,25 до 100 мМ), фосфат натрия (рН 6-7,5; ионная сила: от 0,25 до 100 мМ) и tris/гидрокси-метиламинометан (рН 7-9; ионная сила: от 0,25 до 100 мМ).

Таблица 7

Профиль растворимости пептидов (ионная сила всех буферов: 100 мМ)

Буфер	Конц. (мг/мл) при A280 Целевая 1 мг/мл			
	G730	G797	G849	G933
Глутаматный, рН 4,5	0,83	0,023	Не определено	0,02
Ацетатный, рН 5	Не определено	Не определено	Не определено	0,03
Сукцинатный, рН 5	Не определено	Не определено	Не определено	1,1
Фосфатный, рН 6	0,14	0,84	0,06	1,2
Гистидиновый, рН 6	Не определено	Не определено	Не определено	1,2
Фосфатный, рН 6,5	0,83	0,84	Не определено	Не определено
Фосфатный, рН 7,0	Не определено	Не определено	Не определено	1,1
Гистидиновый, рН 7,0	Не определено	Не определено	Не определено	1,1
Фосфатный, рН 7,5	0,85	0,86	Не определено	1,2
Tris, рН 7,5	0,83	0,89	0,89	1,2
Tris, рН 8,0	1,1	0,83	0,89	1,2

Составы.

Растворимость пептидов оценивали в трех различных изотонических составах.

1. Базовый состав (DF)=0,1 М Tris, рН 7,5, 150 мМ маннита. Конечное значение рН состава 7,2.

2. Дополнительный состав 1 (BF1)=0,05 М Tris, 50 мМ аргинина/пролина. Конечное значение рН состава 8,0.

3. Дополнительный состав 2 (BF2)=натрий-фосфатный буфер (рН 8)/1,85% вес./об., пропиленгликоля. Конечное значение рН состава 7,0.

Растворимость измеряли, как подробно описано выше, и результаты показаны в табл. 8. G730, G797 и G933 были растворимы до по меньшей мере 5 мг/мл в DF, максимальная растворимость G849 в DF составляла 3,7 мг/мл, G797 был растворим до по меньшей мере 10 мг/мл в BF1 и G933 был растворим до по меньшей мере 10 мг/мл в BF2.

Таблица 8

Растворимость пептидов в составе

Основной кандидат	Концентрация в составе	Состав	Растворимость при 10 мг/мл (BF2)
G730	5 мг/мл	DF	нет
G797	5 мг/мл	DF/BF1	да
G849	3,7 мг/мл	DF	не определено
G933	5 мг/мл	DF	да

Концентрацию определяли при A280 нм.

Стабильность в DF оценивали путем измерения чистоты с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (RP UPLC) в течение одного месяца. Условия хранения составляли 5, 25, 40 и -80°C. Результаты показаны в табл. 9 и 10.

Таблица 9

Чистота пептидов в составе спустя 1 месяц хранения в условиях исследования стабильности

Пептид	5°C	25 °C	40 °C	минус 80°C
G730_DF	97,7	96,1	86,1	97,7
G797_BF1	98,72	98,84	77,54	Не определено
G849_DF	95,5	Не определено	Не определено	Не определено
G933_DF	97,8	95,9	88,9	98,9

Таблица 10

Потеря чистоты пептидов в составе (% по сравнению с T0) спустя 1 месяц хранения в условиях исследования стабильности

Основной кандидат	5°C	25°C	40°C	минус 80°C
G730_DF	0,82	2,43	12,54	0,3
G797_BF1	0,24	0,12	21,65	0,3
G849_DF	не определено	не определено	не определено	не определено
G933_DF	0,3	2,2	9,3	(-)0,8

Все пептиды характеризовались приемлемыми свойствами в отношении растворимости, способности составления и стабильности.

Пример 3. Исследования *in vivo*.

G730, G797 и G812 (исследование А).

Определенные раскрытые в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, тестировали на мышинной модели ожирения, индуцированной рационом (DIO), следующим образом. Самок линии C57/B16JHsdO1a (полученных из Harlan Laboratories, Великобритания) в возрасте 9-11 недель помещали на рацион с высоким содержанием жиров, состоящий из D12492 (Research Diets, Нью-Джерси, США) и шоколадных изделий "delicato ball" (Delicata Bakverk, Швеция), и содержали на этом рационе в течение 16 недель до прибытия в виварий, в течение трехнедельного периода акклиматизации и в течение периода обработки лекарственным средством; содержание калорий в двух компонентах рациона показано в табл. 11. Мышей разделяли на 9 групп (n=5-6), и обработку начинали в возрасте 29 недель. Группы обработки и дозы показаны в табл. 12.

Таблица 11

Содержание рациона DIO

Продукт	Белки (%)	Углеводы (%)	Жиры (%)	Ккал жиров (%)	Всего ккал/грамм
"Delicatoball" (Delicata Bakverk AB, Гуддинге, Швеция)	5	53	31	54	5,05
D12492 (Research Diets, Нью-Джерси, США)	26,2	26,3	34,9	60	5,24

Таблица 12

Группы обработки для исследования А

Пептид	Доза	Число животных
Инертная среда	Не определяется	6
Лираглутид	26,6 нмоль/кг	6
G730	10 нмоль/кг	6
G730	20 нмоль/кг	5
G730	50 нмоль/кг	6
G797	5 нмоль/кг	5
G797	20 нмоль/кг	6
G797	50 нмоль/кг	6
G812	20 нмоль/кг	5

Пептиды G730, G797 и G812, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, а также лираглутид составляли в инертной среде, 100 mM Tris/150 mM маннита, pH 7,4. Средства для обработки вводили подкожно два раза в день в течение 14 дней, при этом животных содержали на рационе с высоким содержанием жиров. Вес тела животных контролировали ежедневно в течение периода введения доз. В день 14 получали образцы крови для измерения уровня глюкозы и инсулина в плазме крови от мышей, находящихся в сознании, после 4-часового периода голодания. Затем мышей анестезировали изофлураном и

последний образец крови собирали из капиллярного русла, расположенного за глазом. Измеряли следующие параметры: показатели биохимического анализа крови, представляющие собой уровни триглицеридов, общего холестерина, неэстерифицированных жирных кислот (NEFA), бета-гидроксибутирата и фактора роста фибробластов 21 (FGF21) (табл. 14 и 15 ниже). Влияние обработки лираглутидом и пептидами G730, G797 и G812, являющимися агонистами GLP-1/глюкагона, на вес тела по сравнению с лираглутидом и инертной средой, показано на фиг. 1-4. Животные, которых обрабатывали G730 либо G797, характеризовались дозозависимой и непрерывной потерей веса в течение 14-дневного периода введения доз. У животных, которых обрабатывали 50 нмоль/кг G730 и G797, наблюдалось приблизительно 24% изменение веса в день 14 по сравнению с животными, которых обрабатывали инертной средой.

Мыши, которых обрабатывали G730 или G797, характеризовались дозозависимым снижением уровней глюкозы в день 14 (табл. 13). Также наблюдали сниженные уровни инсулина при этих двух обработках, особенно при более высоких дозах (табл. 13). Индекс гомеостатической модели оценки чувствительности к инсулину (НОМА) значительно повышался при 20 нмоль/кг G730 и 20 и 50 нмоль/кг G797. НОМА представлял собой способ моделирования, в котором используют суммарные значения уровней инсулина и глюкозы в плазме крови для оценки функции β -клеток и инсулинорезистентности (табл. 14). Уровень общего холестерина в плазме крови снижался как посредством лираглутида, так и посредством G730 и G797 при всех дозах, при этом менее выраженные изменения были характерны для уровней неэстерифицированных жирных кислот (NEFA) в плазме крови и уровней триглицеридов (TG) в плазме крови и печени. Наблюдали тенденции к повышенным уровням бета-гидроксибутирата (BeHy) в соответствии с потерей веса тела. Уровень фактора роста фибробластов 21 (FGF21) в целом повышался при обработке пептидом, являющимся двойным агонистом GLP-1/глюкагона.

Таблица 13

Влияние обработки пептидом, являющимся агонистом GLP-1/глюкагона, на уровень глюкозы, инсулина и НОМА

Пептид	доза (нмоль/кг)	исходный bw (г)	SEM	BW в день 14 (% изменения от ср. знач. инерт. среды)	SEM	Уровень глюкозы (мМ)	SEM	Уровень инсулина (нМ)	SEM	НОМА	SEM
инертная среда	0	47,4	± 3,7	0	± 0	8,8	± 0,6	0,8	± 0,23	7,2	± 2
Лираглутид	27	47,5	± 1,8	-13,3	± 1,4	8	± 0,2	0,3	± 0,12	2,8	± 1,1
G730	10	44,5	± 2,2	-7,5	± 1,1	7,2	± 0,3	0,4	± 0,14	3,3	± 1,1
G730	20	45,9	± 3,6	-15,6	± 2,2	6,7	± 0,6	0,2	± 0,06	1,7	± 0,5
G730	50	46,1	± 2,4	-24,0	± 5,1	5,9	± 0,7	0,3	± 0,13	2,1	± 1,0
G797	5	47,5	± 1,2	-5,7	± 3,2	7,5	± 0,3	0,7	± 0,25	5,3	± 2,0
G797	20	47,4	± 2,2	-16,0	± 4,4	7,1	± 0,6	0,3	± 0,09	2,0	± 0,8
G797	50	47,2	± 1,8	-25,4	± 2	6,6	± 0,5	0,1	± 0,01	0,6	± 0,1
G812	20	49,2	± 3,4	-8,7	± 1,4	8	± 0,4	0,7	± 0,23	6	± 2,1

Результаты оценивали с помощью t-критерия для двустороннего распределения с двумя выборками при неодинаковой дисперсии.

* Указывает $p < 0,05$ по сравнению с инертной средой.

Таблица 14

Влияние обработки пептидом, являющимся агонистом GLP-1/глюкагона, на дополнительные показатели биохимического анализа крови

Пептид	доза (нмоль/кг)	уровень TG в печени (г TG/100 г ткани)	SEM	уровень TG в плазме крови (мМ)	SEM	уровень NEFA в плазме крови (мМ)	SEM	уровень холестерина в плазме крови (мМ)	SEM	уровень BeHy (мкмоль/л)	SEM	уровень FGF21 (пг/мл)	SEM
инертная среда	0	13,6	± 0,5	0,19	± 0,02	0,22	± 0,01	4,65	± 0,12	389	± 46	2757	± 317
Лираглутид	27	13,1	± 2,1	0,24	± 0,01	0,24	± 0,01	3,75	± 0,16	345	± 21	2481	± 650
G790	10	9,0	± 0,9	0,21	± 0,02	0,28	± 0,02	3,10	± 0,16	428	± 54	1963	± 219
G790	20	17,7	± 3,4	0,20	± 0,03	0,26	± 0,03	2,45	± 0,30	750	± 318	2236	± 300
G790	50	28,1	± 10,1	0,23	± 0,03	0,32	± 0,05	2,19	± 0,23	1477	± 479	5294	± 2307
G797	5	13,0	± 1,1	0,16	± 0,02	0,24	± 0,03	3,32	± 0,39	392	± 111	2362	± 342
G797	20	17,7	± 5,7	0,14	± 0,02	0,27	± 0,05	2,44	± 0,27	659	± 240	7277	± 2455
G797	50	15,6	± 5,8	0,12	± 0,02	0,24	± 0,02	1,85	± 0,07	1257	± 285	5373	± 813
G812	20	7,9	± 0,6	0,13	± 0,01	0,21	± 0,01	2,79	± 0,24	333	± 63	3207	± 388

Результаты оценивали с помощью t-критерия для двустороннего распределения с двумя выборками при неодинаковой дисперсии.

* Указывает $p < 0,05$ по сравнению с инертной средой.

G865, G933 и G796 (исследование В).

Дополнительный набор пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, тестировали на модели ожирения, индуцированной рационом, с применением аналогичного протокола, как указано выше, но с группами обработки и дозами, показанными в табл. 15.

Таблица 15

Группы обработки для исследования В

Пептид	Доза	Число животных
Инертная среда	Не определяется	6
Лираглутид	26,6 нмоль/кг	6
G865	5 нмоль/кг	6
G865	10 нмоль/кг	6
G933	5 нмоль/кг	6
G933	10 нмоль/кг	6
G796	20 нмоль/кг	6
G796	50 нмоль/кг	6

Пептиды G865, G933 и G796, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, а также лираглутид составляли в инертной среде, 100 мМ Tris/150 мМ маннита, pH 7,4. Средства для обработки вводили подкожно два раза в день в течение 14 дней, при этом животных содержали на рационе с высоким содержанием жиров. Вес тела животных контролировали ежедневно в течение периода введения доз. В день 14 получали образцы крови для измерения уровня глюкозы и инсулина в плазме крови от мышей, находящихся в сознании, после 4-часового периода голодания. Затем мышей анестезировали изофлураном и последний образец крови собирали из капиллярного русла, расположенного за глазом. Измеряли следующие параметры: показатели биохимического анализа крови, представляющие собой уровни триглицеридов, общего холестерина, неэстерифицированных жирных кислот (NEFA), бета-гидроксибутирата и фактора роста фибробластов 21 (FGF21) (табл. 16 и 17 ниже). Влияние обработки лираглутидом и пептидами G933, G865, G796, являющимися агонистами GLP-1/глюкагона, на вес тела по сравнению с лираглутидом и инертной средой, показано на фиг. 5-8. Животные, которых обрабатывали G933, G865 либо G796, характеризовались дозозависимой и непрерывной потерей веса в течение 14-дневного периода введения доз. Уровни глюкозы, уровни инсулина и НОМА в день 14 после обработки показаны в табл. 16. Уровни общего холестерина в плазме крови, уровни неэстерифицированных жирных кислот (NEFA) в плазме-крови, уровни триглицеридов (TG) в плазме крови и печени, уровни бета-гидроксибутирата (BeHy) и уровни фактора роста фибробластов 21 (FGF21) в день 14 после обработки показаны в табл. 17.

Таблица 16

Влияние обработки пептидом, являющимся агонистом GLP-1/глюкагона, на уровень глюкозы, инсулина и НОМА

Пептид	доза (нмоль/кг)	исходный bw (г)	SEM	BW в день 14 (% изменения от ср. знач. инерт. среды)	SEM	Уровень глюкозы (мМ)	SEM	Уровень инсулина (нМ)	SEM	НОМА	SEM
инертная среда	0	46,9	± 1	0	± 0	8,7	± 0,8	0,58	± 0,09	5,05	± 0,8
Лираглутид	27	46,3	± 1,7	-14	± 2,1	7,7	± 0,7	0,31	± 0,07 *	2,51	± 0,7 *
G865	5	46,9	± 0,8	-4	± 0,1	6,2	± 0,6 *	0,33	± 0,08	2,14	± 0,6 *
G865	10	47	± 0,9	-14	± 3,4	6,6	± 0,5 *	0,36	± 0,06	2,43	± 0,5 *
G933	5	48,1	± 1,6	-11	± 2,7	6,2	± 0,8 *	0,53	± 0,13	3,31	± 0,8
G933	10	48,6	± 0,5	-19	± 3,5	7,2	± 0,6 *	0,27	± 0,07 *	1,98	± 0,6 *
G796	20	50,9	± 1,3	-16	± 0,6	6,1	± 0,2 *	0,38	± 0,05	2,2	± 0,2 *
G796	50	49,7	± 0,8	-23	± 1,6	6,4	± 1,1 *	0,43	± 0,14	2,87	± 1,1

Результаты оценивали с помощью t-критерия для двустороннего распределения с двумя выборками при неодинаковой дисперсии.

* Указывает $p < 0,05$ по сравнению с инертной средой.

Таблица 17

Влияние обработки пептидом, являющимся агонистом GLP-1/глюкагона, на дополнительные показатели биохимического анализа крови

Пептид	доза (нмоль/кг)	уровень TG в печени (г TG/100 г ткани)	SEM	уровень TG в плазме крови (мМ)	SEM	уровень NEFA в плазме крови (мМ)	SEM	уровень холестерина в плазме крови (мМ)	SEM	уровень BeHy (мкмоль/л)	SEM	уровень FGF21 (пг/мл)	SEM
инертная среда	0	17,53	± 1,3	0,25	± 0,01	0,28	± 0,03	4,56	± 0,33	387,52	± 87,4	2002	± 174
Лираглутид	27	18,4	± 2,5	0,28	± 0,03 *	0,29	± 0,02	3,26	± 0,23 *	572,25	± 82,4 *	2990	± 729
G865	5	20,7	± 5,6	0,26	± 0,03	0,29	± 0,05	3,06	± 0,14 *	775,06	± 295,5 *	8151	± 4788
G865	10	22,3	± 5,1	0,23	± 0,02	0,27	± 0,03	2,89	± 0,24 *	567,46	± 169,3 *	5353	± 3409
G933	5	11,3	± 0,8 *	0,19	± 0,01 *	0,28	± 0,03	2,88	± 0,28 *	673,08	± 117,2	2682	± 248,0
G933	10	14,7	± 4,1	0,16	± 0,01 *	0,27	± 0,03	2,32	± 0,20 *	693,56	± 158,3 *	4459	± 1249,0
G796	20	9,6	± 0,9 *	0,26	± 0,05	0,24	± 0,02 *	2,11	± 0,07 *	360,49	± 51,1	6441,0	± 1784
G796	50	9,9	± 0,6 *	0,16	± 0,01 *	0,21	± 0,02	1,91	± 0,05 *	451,8	± 63,4	9830	± 3278

Результаты оценивали с помощью t-критерия для двустороннего распределения с двумя выборками при неодинаковой дисперсии.

* Указывает $p < 0,05$ по сравнению с инертной средой.

Пример 4. Исследование с однократно нарастающей дозой.

(А) Субъекты.

В общей сложности 362 субъекта дали согласие на участие в исследовании в Германии. Субъекты проходили скрининг в отношении следующих критериев включения и исключения.

Критерии включения.

Здоровые добровольцы в возрасте от 18 до 45 лет на момент скрининга.

Индекс массы тела от ≥ 22 до ≤ 30 кг/м и вес тела ≥ 70 кг.

Венозный доступ, подходящий для многократных катетеризаций.

Критерии исключения.

Любое состояние, которое будет препятствовать оценке G933 или интерпретации безопасности у субъектов или результатов исследования. Конкретные примеры включали

(а) наличие в анамнезе острого или хронического панкреатита или уровень панкреатической амилазы или липазы выше верхней границы нормы (ULN) на момент скрининга;

(b) наличие в анамнезе гастропареза, требующего лечения;

(с) наличие в анамнезе хирургического вмешательства, затрагивающего верхнюю часть желудочно-кишечного тракта, которое, вероятно, будет влиять на интерпретацию данных о безопасности и переносимости;

(d) наличие в анамнезе холелитиаза, приводящего к приступам острого холецистита, не поддающегося лечению с помощью холецистэктомии, или заболевания желчного пузыря;

(е) наличие в анамнезе или семейном анамнезе множественной эндокринной неоплазии 2 типа (MEN-2), уровня кальцитонина в сыворотке крови, указывающего на гиперплазию С-клеток щитовидной железы (уровень кальцитонина > 50 нг/л), или медуллярной карциномы щитовидной железы на момент скрининга;

(f) наличие в анамнезе клинически значимого нарушения сердечного ритма, например, перманентной или пароксизмальной фибрилляции/трепетания предсердий, пароксизмальной суправентрикулярной тахикардии, пароксизмальной вентрикулярной тахикардии, наличие имплантированного кардиостимулирующего устройства или кардиовертера/дефибриллятора;

(g) наличие в анамнезе пролеченной или симптоматической сердечной недостаточности; и

(h) наличие в анамнезе ранее полученного инфаркта миокарда или острого нарушения мозгового кровообращения (например, инсульта).

Наличие в анамнезе или наличие в данный момент заболевания желудочно-кишечного тракта, почек или печени (за исключением синдрома Жильбера) или любого другого состояния, которое, как известно, нарушает всасывание, распределение, метаболизм или выведение лекарственных средств.

Наличие в анамнезе рака за исключением немеланомного рака кожи.

Любое клинически значимое заболевание, медицинская/хирургическая процедура или травма за 4 недели до дня 1 введения доз.

Положительный результат в анализе сыворотки крови на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В или антигена к вирусу гепатита С на момент скрининга.

Положительный результат теста на наличие вируса иммунодефицита человека (HIV) на момент скрининга или применение антиретровирусных лекарственных препаратов, что устанавливает путем изучения медицинского анамнеза или со слов субъекта.

Уровень калия или кальция в сыворотке крови, выходящий за пределы нормального диапазона значений, на момент скрининга.

Уровни креатинина, аспаратаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT) или общего билирубина в сыворотке крови, превышающие ULN, на момент скрининга.

Любые другие клинически значимые отклонения от нормы в результатах клинического биохимического анализа крови, общего анализа крови или общего анализа мочи согласно оценке исследователя также должны приводить к исключению из исследования.

Применение любых из следующих медицинских продуктов:

(а) одновременное или предшествующее применение агониста рецептора GLP-1;

(b) текущее или предшествующее применение системных кортикостероидов за последние 28 дней до скрининга; или

(с) применение любых медицинских продуктов или препаратов на основе лекарственных растений, разрешенных для контроля веса тела или аппетита, запрещено, начиная за 1 неделю до дня -1 по день 7.

Не соответствующие норме показатели жизненно-важных функций после 10 мин отдыха лежа на спине, определяемые в виде любого из следующего:

(а) систолическое давление крови < 90 или ≥ 140 мм рт.ст.;

(b) диастолическое давление крови < 50 или ≥ 90 мм рт.ст.; или

(с) частота сердечных сокращений < 50 или > 90 ударов в минуту (уд./мин).

Любые клинически значимые не соответствующие норме показатели ритма, проводимости (напри-

мер, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта, синдром слабости синусового узла) или морфологии согласно ECG в 12 отведениях в состоянии покоя, или любые не соответствующие норме показатели ECG, которые, по мнению исследователя, могут препятствовать интерпретации изменений интервала QT, скорректированного с учетом частоты сердечных сокращений (QTc), в том числе не соответствующая норме морфология T-зубца или гипертрофия левого желудочка.

Удлиненный QT, рассчитанный с применением формулы Фредерика (QTcF), составляющий >450 мс, или укороченный QTcF, составляющий <340 мс, на основании результатов ECG в 12 отведениях, или наличие в семейном анамнезе синдрома удлиненного интервала QT;

Укорочение интервала PR (PQ) до <120 мс или удлинение >200 мс (атривентрикулярная блокада первой степени).

Транзиторная блокада второй степени (блокада Венкебаха во время сна не исключается), или блокада третьей степени, или атриовентрикулярная диссоциация.

Интервал QRS, выходящий за пределы диапазона 50-110 мс.

Наличие в анамнезе подтвержденного или предполагаемого злоупотребления наркотическими веществами в течение последних 3 лет.

Наличие в анамнезе злоупотребления алкоголем или избыточного потребления алкоголя в течение последних 3 лет.

Курение в данный момент (>0 сигарет в день). Также исключаются субъекты в случае положительного результата в тесте на наличие котинина на момент скрининга.

Положительный результат в анализе на наркотики на момент скрининга или приема в отделение клинического исследования или положительный результат пробы на алкоголь в выдыхаемом воздухе на момент приема в отделение клинического исследования перед введением исследуемого продукта. Субъекты, которые принимают бензодиазепины от хронической тревожности или нарушений сна, могут быть допущены для включения в исследование.

Наличие в анамнезе тяжелой формы аллергии/гиперчувствительности или текущей клинически значимой аллергии/гиперчувствительности.

Донорство цельной крови или эритроцитов или любая потеря крови в количестве >500 мл за 2 месяца до скрининга.

Прием другого нового химического соединения (определяемого как соединение, которое не было одобрено для продажи) или участие в любом другом клиническом исследовании, которое включало лечение лекарственным средством по меньшей мере за 30 дней или 5 периодов полувыведения до введения исследуемого препарата в данном исследовании (в зависимости от того, что наступает позже). Период исключения начинается за 30 дней или 5 периодов полувыведения исследуемого продукта после введения последней дозы или после последнего визита в зависимости от того, что наступает позже. Субъекты, которые дали согласие и прошли скрининг, но не были рандомизированы в данном исследовании или предшествующем исследовании, не исключаются.

Психическое заболевание, вследствие которого субъектов помещали в лечебное учреждение в результате официального или судебного решения.

После проведения скрининга 313 субъектов определили как таковых, которые не соответствовали критериям включения/исключения. Оставшихся 48 субъектов рандомизировали, и они получали G933. Демографические характеристики 48 пациентов, получавших лечение, показаны в таблице ниже.

Демографические характеристики популяции пациентов, получавших лечение

Параметр	Плацебо N = 12	G933							Всего N = 48
		5 мкг N = 6	10 мкг N = 6	30 мкг N = 6	100 мкг N = 6	150 мкг N = 6	300 мкг N = 6	Всего N = 36	
Возраст (лет)									
Среднее значение	32,8	37,3	31,8	33,2	27,8	34,5	28,3	36	32,3
SD	9,1	6,4	6,8	10,4	4,3	6,5	5,9	26,12	7,7
Медиана	29,0	37,0	34,0	32,5	28,5	33,0	26,5	2,29	31,0
Мин., макс.	22, 45	28, 45	22, 39	20, 45	20, 32	27, 44	21, 38	25,79	20, 45
Пол									
Мужской	12 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	36 (100%)	48 (100%)
Раса^a									
Американские аборигены или коренные жители Аляски	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	0	1 (2,8%)	1 (2,1%)
Азиаты	1 (8,3%)	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,1%)
Белые	11 (91,7%)	6 (100%)	5 (83,3%)	6 (100%)	6 (100%)	5 (83,3%)	6 (100%)	34 (94,4%)	45 (93,8%)
Другие	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	0	1 (2,8%)	1 (2,1%)
Этническая принадлежность									
Испанцы или латиноамериканцы	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (5,6%)	2 (4,2%)
Отличные от испанцев или латиноамериканцев	12 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	34 (94,4%)	46 (95,8%)
Вес (кг)									
Среднее значение	84,71	88,82	81,82	81,22	84,93	83,68	91,03	85,25	85,11
SD	12,10	10,48	7,66	7,28	8,23	12,90	11,07	9,79	10,28
Медиана	78,30	88,15	80,80	78,95	83,80	77,85	94,65	83,60	81,90
Мин., макс.	73,8, 108,1	77,2, 107,5	72,8, 90,5	74,2, 90,6	75,9, 95,9	71,2, 101,0	74,3, 101,0	71,2,	71,2,
								107,5	108,1
Рост (см)									
Среднее значение	181,28	179,17	182,83	181,17	180,30	177,67	182,00	180,52	180,71
SD	5,33	5,31	8,57	4,45	6,71	6,38	3,41	5,86	5,69
Медиана	180,00	177,00	179,00	181,50	180,00	175,00	182,00	179,50	180,00
Мин., макс.	174,0, 191,0	174,0, 188,0	176,0, 198,0	174,0, 186,0	171,0, 190,0	170,0, 186,0	177,0, 187,0	170,0, 198,0	170,0, 198,0
ВМІ (кг/м²)									
Среднее значение	25,67	27,61	24,47	24,74	26,09	26,36	27,44	26,12	26,01
SD	2,41	2,25	1,64	1,91	1,55	2,16	2,82	2,29	2,30
Медиана	25,27	27,39	24,24	24,51	26,19	25,42	28,64	25,79	25,79
Мин., макс.	22,3, 29,9	24,4, 30,4	22,7, 27,1	22,2, 27,5	23,7, 28,0	24,6, 29,5	22,4, 29,8	22,2, 30,4	22,2, 30,4

ВМІ=индекс массы тела;

макс.=максимальное значение;

мин.=минимальное значение;

N=число субъектов;

SD=стандартное отклонение.

^a Каждая расовая категория включает субъектов, которые выбрали лишь одну категорию.

(В) План исследования.

Выполняли рандомизированное слепое исследование фазы 1 с применением однократной нарастающей дозы. Блок-схема предполагаемого исследования представлена на фиг. 9. Планировали включить восьми субъектов на когорту. В каждой когорте субъектов рандомизировали в соотношении 3:1 к введению G933 (MEDI0382) или плацебо. На основании моделирования PK/PD, проведенного с применением данных клинической литературы по модуляторам GPL-1 и глюкагона, предсказывали клинически эффективную дозу G933, которая находилась в диапазоне от 300 до 2000 мкг/день. Таким образом, выбирали возрастание дозы G933, соответствующее 5, 10, 30, 100, 300, 600, 1200 или 2000 мкг. Данные о безопасности по каждой когорте оценивали до того, как выполняли повышение дозы. Для дополнительного повышения безопасности кратности увеличения были наибольшими на нижнем пределе предлагаемого диапазона доз, и они постепенно снижались таким образом, что последнее повышение дозы было менее чем 2-кратное. Максимальный предлагаемый уровень дозы в данном исследовании составлял 2000 мкг. Предел безопасности при максимальной предлагаемой дозе для человека, составляющей 2000 мкг, основанный на данных AUC у обезьян, составлял 0,8.

Субъекты получали 1 дозу G933 в ходе исследования. Для всех субъектов скрининговый визит проводили за 28 дней до рандомизации (со дня -29 по день -2). Субъектов помещали в отделение вечером накануне приема исследуемого продукта (день -1) в целях обеспечения повторной оценки критериев от-

бора, выполнения мониторинга посредством кардиотелеметрии в течение 4-часового периода и стандартизации уровня физической активности до начала введения доз на следующее утро. В день 1, после ночного голодания в течение как минимум 8 ч, получали оценки безопасности и образцы крови исходного уровня, и субъекту вводили однократную подкожную (SC) дозу G933 либо плацебо. Субъекты оставались на базе клинического исследования для проведения запланированных на определенное время оценок и мониторинга безопасности (в том числе мониторинга сердца посредством непрерывной телеметрии и периодических цифровых электрокардиограмм [ECG]) в течение дня 1 и дня 2, и оставались в помещении до выписки. Субъектов выписывали из отделения утром в день 3 после выполнения оценок безопасности и сбора образцов крови. Субъекты возвращались в отделение для амбулаторных визитов в дни 4, 7 и 28.

После скрининга продолжительность исследования для каждого субъекта составляла примерно 29 дней, которые включали период оценки в стационаре и период последующего наблюдения в амбулатории.

Для оценок фармакодинамических характеристик в день 1 образцы крови для измерения уровней глюкозы и инсулина отбирали перед каждым приемом пищи (завтраком, обедом и ужином) и через 1 и 2 ч (± 15 мин) после начала каждого приема пищи.

Регистрировали начало каждого приема пищи в день 1, и каждый прием пищи должен был завершиться в течение 30 мин.

Для иммунологических оценок взятие образцов для определения наличия антитела к лекарственному средству (ADA) выполняли в день 1, через примерно 1 неделю после введения дозы и через примерно 1 месяц после введения дозы.

Для оценок фармакокинетических характеристик (PK) моменты времени забора образцов представляли собой до введения дозы и через 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48 и 72 ч после введения дозы (± 15 мин для первых 2 ч и ± 30 мин для остальных моментов времени до 48 ч после введения дозы). В день 1 образцы для оценки PK также отбирали перед каждым приемом пищи (завтраком, обедом и ужином), через 1 и 2 ч (± 15 мин) после начала каждого приема пищи.

(C) Результаты.

Повышение дозы выполняли от 5 до 300 мкг, как планировали в соответствии с протоколом; однако доза, составляющая 300 мкг, не являлась переносимой, о чем свидетельствовали явления значительной рвоты, и для конечной когорты дозу снижали до 150 мкг. Блок-схема фактического исследования представлена на фиг. 9, и распределение субъектов показано на фиг. 10.

PK-параметры не могли получить для дозы G933, составляющей 5 мкг, поскольку только у 3 субъектов наблюдался по меньшей мере один подлежащий количественному определению уровень в плазме крови. Концентрации G933 в плазме крови поддавались измерению в пределах периода от 2-4,5 до 16-24 ч у всех субъектов в группах введения 5 и 10 мкг G933. Концентрации G933 в плазме крови поддавались измерению в пределах периода до 48 ч у всех субъектов в группах введения 100 и 300 мкг G933. Ни у одного из субъектов не выявляли подлежащих количественному определению концентраций G933 в плазме крови через 72 ч после введения дозы.

Профили зависимости средней концентрации от времени для всех доз G933 характеризовались очевидным моноэкспоненциальным снижением после достижения пика с умеренно быстрым падением значений концентрации в период между достижением пика и через 48 ч после введения дозы.

Оцененные PK-параметры однократной дозы G933 в плазме крови приведены с группированием по субъектах и лечению и кратко описаны с группированием по лечению в табл. 19.

Краткое описание оцененных медианных фармакокинетических параметров однократной дозы G933 (геометрическое среднее [95% CI])

Параметры	Доза (мкг)					
	5	10	30	100	150	300
С _{max} (нг/мл) ^a	0,47 [0,44-0,50] N=3	0,80 [0,62-1,03] N=6	3,00 [2,59-3,47] N=6	6,19 [4,29-8,92] N=6	8,97 [6,20-12,97] N=6	20,98 [16,21-27,14] N=6
T _{max} (ч.) ^b	7,00 [5,88-10,00] N=3	6,94 [4,00-13,50] N=6	9,00 [4,50-10,02] N=6	7,53 [4,50-10,00] N=6	9,00 [4,00-12,00] N=6	4,50 [4,00-5,88] N=6
t _{1/2} (ч.) ^a	nc	nc	11,43 [8,42-15,50] N=4	12,07 [9,58-15,20] N=6	10,97 [8,60-13,99] N=6	9,54 [8,63-10,56] N=6
AUC(0-последн.) (нг.ч./мл) ^a	1,96 [0,58-6,64] N=3	9,97 [7,01-14,17] N=6	51,99 [44,55-60,67] N=6	137,33 [106,15-177,67] N=6	194,60 [162,84-232,56] N=6	364,47 [298,50-445,02] N=6
AUC(0-∞) (нг.ч./мл) ^a	nc	nc	63,10 [51,49-77,33] N=4	150,03 [118,44-190,04] N=6	209,03 [178,45-244,86] N=6	379,12 [310,26-463,25] N=6
% экстрап. AUC(0-∞) (нг.ч./мл) ^c	nc	nc	13,97 [7,22-20,73] N=4	8,35 [3,21-13,48] N=6	6,80 [1,92-11,69] N=6	3,86 [2,64-5,07] N=6
CL/f (л/ч.) ^a	nc	nc	0,48 [0,39-0,58] N=4	0,67 [0,53-0,84] N=6	0,72 [0,61-0,84] N=6	0,79 [0,65-0,97] N=6

% экстрап. AUC(0-∞)=процентное значение AUC(0-∞), полученное в результате экстраполяции;

AUC=площадь под кривой зависимости концентрации от времени;

AUC(0-последн.)=AUC, начиная с нулевого момента времени до последней подлежащей количественному определению концентрации;

AUC(0-∞)=AUC, начиная с нулевого момента времени до бесконечности;

CL/f=кажущийся клиренс;

С_{max}=максимальная наблюдаемая концентрация;

CI=доверительный интервал;

t_{1/2}=период полувыведения;

T_{max}=время до достижения С_{max};

n=число значений, включенных в статистический анализ;

nc=не рассчитано.

^a Геометрическое среднее (95% CI).

^b Медиана (диапазон).

^c Арифметическое среднее (95% CI).

G933 всасывался с медианным временем до достижения максимальной концентрации (t_{max}), составляющим 7,0-9,0 ч после однократного введения G933 в дозах, находящихся в диапазоне от 5 до 150 мкг, и с медианным t_{max}, составляющим 4,5 ч, при наиболее высоком уровне дозы, составляющем 300 мкг.

Кажущийся конечный период полувыведения (t_{1/2}) G933 определяли с помощью по меньшей мере 3 замеров на основании визуального исследования в течение 72-часового периода взятия образцов. T_{1/2} не поддавался оценке у субъектов из группы введения дозы 5 мкг в связи со слишком низкими значениями концентрации в плазме крови. В других группах введения доз, когда %AUC_{экстр.} был выше, чем 20%, t_{1/2} и, следовательно, AUC_{0-∞} также не регистрировали. Геометрического среднее значение t_{1/2} составляло приблизительно 10-12 ч.

Межсубъектная вариабельность значений максимальной концентрации в плазме крови (C_{max}) и AUC_{0-∞}, выраженная посредством коэффициента вариации (CV), была умеренной (3-37%) для обоих параметров.

Никто из субъектов не имел положительный результат в анализе ADA на исходном уровне или после исходного уровня.

Осуществляли мониторинг показателей давления крови, пульса, потребления пищи и нежелательных явлений в ходе исследования, и они кратко описаны в табл. 20.

Все нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (TEAE), по тяжести характеризовались степенью 1 (слабые) или степенью 2 (умеренные). Они кратко описаны в табл. 21 ниже.

Таблица 20

Доза (мкг)	Медиана пиковых значений пульса (уд./мин.) (a)	Медиана максимальных значений пульса после изменения дозы (уд./мин.) (b)	Медиана пиковых значений диастолического ВР (мм рт.ст.)	Медиана максимальных значений диастолического ВР после изменения дозы (мм рт.ст.)	Медиана пиковых значений систолического ВР (мм рт.ст.)	Медиана максимальных значений систолического ВР после изменения дозы (мм рт.ст.)	Число субъектов с наличием рвоты (приступов рвоты)	Общее суточное потребление пищи по сравнению с плацебо (%) (c)	Медиана пиковых значений уровня глюкозы (ммоль/л) после завтрака (d)	Медиана пиковых значений уровня глюкозы (ммоль/л) после обеда (e)	Медиана пиковых значений уровня глюкозы (ммоль/л) после ужина (f)
0	72,2	11,8	77	8,5	134	12	0 (0)	100	7,5	5,2	7,1
5	79,7	11,3	79,5	13	122	10,5	0 (0)	100	6,2	4,9	7,0
10	72,8	12,7	71,5	8	124,5	9,5	0 (0)	100	5,8	5,1	6,0
30	70	9,8	76,5	10,5	124	13,5	0 (0)	96	5,4	4,4	5,2
100	72	16,8	86,5	16	129,5	8,5	1 (1)	82	5,5	4,7	5,2
150	81	15,7	75	15	128,5	7,5	4 (9)	60	5,1	5,1	5,2
300	102	35,5	80	19	138,5	26	5 (30)	23	4,7	5,1	4,9

ВР=давление крови.

(a) Медиану пиковых значений пульса определяли как медиану максимальных значений пульса, полученных начиная с момента до введения дозы до дня 28.

(b) Медиану максимальных значений пульса после изменения дозы определяли как медиану максимального изменения пульса, начиная с момента до введения дозы до дня 28.

(c) Общее суточное потребление пищи во время завтрака, обеда и ужина.

(d) Медиана значений уровня глюкозы, собранных через примерно 1 ч после завтрака, что соответствовало 3,5 ч после введения дозы.

(e) Медиана значений уровня глюкозы, собранных через примерно 1 ч после обеда, что соответствовало 7 ч после введения дозы.

(f) Медиана значений уровня глюкозы, собранных через примерно 1 ч после ужина, что соответствовало 13,5 ч после введения дозы.

Таблица 21

Возникшие в ходе лечения побочные явления, сгруппированные по системно-органному классу и предпочтительному термину, у популяции пациентов, получавших лечение

Системно-органный класс ^a Предпочтительный термин (MedDRA, версия 18.0)	Плацебо N = 12	G933						Всего N = 36
		> 5 мкг N = 6	> 10 мкг N = 6	> 30 мкг N = 6	> 100 мкг N = 6	> 150 мкг N = 6	> 300 мкг N = 6	
Субъекты с по меньшей мере одним явлением	2 (16,7%)	2 (33,3%)	3 (50,0%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	21 (58,3%)
Нарушения со стороны сердца	0	0	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	3 (8,3%)
Аритмия	0	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	1 (2,8%)
Атриовентрикулярная блокада второй степени	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	0	1 (2,8%)
Желудочковые экстрасистолы	0	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	1 (2,8%)
Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта	1 (8,3%)	0	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)	12 (33,3%)
Вздутие живота	0	0	0	0	0	2 (33,3%)	0	2 (5,6%)
Боль в животе	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	0	1 (2,8%)
Диарея	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	0	1 (2,8%)
Тошнота	1 (8,3%)	0	0	0	1 (16,7%)	4 (66,7%)	3 (50,0%)	8 (22,2%)
Рвота	0	0	0	0	1 (16,7%)	4 (66,7%)	5 (83,3%)	10 (27,8%)
Общие нарушения и осложнения в месте введения	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	1 (16,7%)	2 (5,6%)
Эрозия в месте введения	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Повреждение, связанное с устройством	0	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	1 (2,8%)
Нарушения со стороны иммунной системы	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Сезонная аллергия	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Инфекционные и паразитарные заболевания	1 (8,3%)	1 (16,7%)	0	0	0	0	0	1 (2,8%)
Назофарингит	1 (8,3%)	1 (16,7%)	0	0	0	0	0	1 (2,8%)
Травмы, отравления и осложнения после проведения процедур	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Связанное с процедурами головокружение	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Нарушения со стороны обмена веществ и питания	0	0	0	0	0	2 (33,3%)	0	2 (5,6%)

Снижение аппетита	0	0	0	0	0	2 (33,3%)	0	2 (5,6%)
Нарушения со стороны скелетно-мышечного аппарата и соединительной ткани	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Скелетно-мышечная боль в груди	0	0	0	1 (16,7%)	0	0	0	1 (2,8%)
Нарушения со стороны нервной системы	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	7 (19,4%)
Головокружение	0	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)	0	2 (33,3%)	1 (16,7%)	5 (13,9%)
Головная боль	0	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	0	4 (11,1%)
Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	0	1 (2,8%)
Орофарингеальная боль	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	0	1 (2,8%)

^a Субъектов учитывали один раз для каждого системно-органный класс и предпочтительного термина независимо от числа явлений.

В целом G933 был хорошо переносимым, при этом рвоту, повышение частоты пульса и давления крови наблюдали при более высоких дозах. Предварительно определенные исследовательские конечные точки предусматривали сокращение общего суточного потребления пищи у субъектов, получавших лечение с помощью G933 при всех дозах, по сравнению с плацебо.

Индивидуальные показатели уровней глюкозы и инсулина в крови в определенные моменты времени приема пищи и медианные уровни глюкозы в плазме крови и инсулина в плазме крови в зависимости от дозы показаны соответственно на фиг. 11 и 12 при временном интервале 2,5-14 ч после введения дозы. Эффект снижения уровня глюкозы наблюдали по уровням глюкозы в плазме крови у субъектов, получавших лечение G933 при всех дозах. Этот эффект был более заметен во время первого приема пищи. Аналогично уровни инсулина в плазме крови характеризовались зависимостью от дозы, особенно при дозах, составляющих 100 мкг или выше, в соответствии с моментом времени первого приема пищи.

Наиболее частыми ТЕАЕ (встречаемость >10% субъектов) были рвота, тошнота, головокружение и головная боль. ТЕАЕ в виде рвоты встречались только при наиболее высоких дозах G933 (100, 150 и 300 мкг). Всего было 40 приступов рвоты для 10 субъектов, которые испытывали рвоту. Тридцать приступов наступали у 5 субъектов при дозе 300 мкг, 9 приступов - у 4 субъектов при дозе 150 мкг и 1 приступ - у 1 субъекта при дозе 100 мкг.

О значительной рвоте, определяемой как 3 или более приступов рвоты в один день или в течение 2 последовательных дней, вне зависимости от корректировки режима питания, сообщали у 2 из 6 субъектов (33,3%) в группе введения 150 мкг G933 и 5 из 6 субъектов (83,3%) в группе введения 300 мкг G933. В результате явлений значительной рвоты, наблюдаемой при дозе 300 мкг, дозу G933 для конечной когорты снижали до 150 мкг. При дозах, составляющих не более 150 мкг, переносимость G933 была приемлемой, что касается тошноты, рвоты, тахикардии и давления крови. При дозе 300 мкг G933 наблюдали неприемлемые уровни рвоты, также происходило значительное повышение систолического давления крови и частоты пульса. Значительное повышение пульса, наряду с тошнотой и рвотой, наблюдалось у ряда продаваемых на рынке агонистов GLP-1 после введения однократной дозы, особенно у здоровых добровольцев. Учитывая, что эффекты G933 в отношении желудочно-кишечного тракта (рвота) наблюдались при однократной дозе 150 мкг без каких-либо эффектов в отношении сердечно-сосудистой системы, существовал диапазон, в пределах которого G933 можно было безопасно вводить субъектам с сахарным диабетом 2 типа при дозе, которая, как ожидается, улучшает гликемический контроль и способствует снижению веса, без отрицательного влияния на профиль риска сердечно-сосудистого заболевания. G933 отвечал конечным точкам безопасности и переносимости в данном исследовании однократной дозы с участием здоровых добровольцев.

Пример 5. Исследование с многократными нарастающими дозами, часть I.

(A) Субъекты.

Примерно 75 субъектов с избыточным весом или ожирением с относительно эффективно контролируемым сахарным диабетом 2 типа (T2DM) включали для участия в исследовании. Включенные в исследование субъекты соответствовали следующим критериям включения и исключения.

Критерии включения.

Мужчина или женщина в возрасте от 18 до 65 лет на момент скрининга.

Индекс массы тела от 27 до 40 кг/м² (включительно).

Диагноз T2DM и контроль уровней глюкозы, осуществляемый монотерапией метформином, при котором значительного изменения дозы (повышения или понижения ≥ 500 мг/день) не происходило в течение 3 месяцев до скрининга:

(a) значение уровня гемоглобина A1C (гликолизированный гемоглобин; HbA1c) на момент скрининга должно находиться в целевом диапазоне от 6,5 до 8,5% или необязательно от 7,0 до 8,5%;

(b) субъекты, которым назначали ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPPIV) в дополнение к монотерапии метформином, могут быть включены в исследование после 4-недельного отмывочного периода с выведением ингибитора DPPIV до скрининга;

(c) субъекты, которым назначали менее чем 50% разрешенной дозы сульфонилмочевы в дополнение к терапии метформином, могут быть включены в исследование после 4-недельного отмывочного периода с выведением сульфонилмочевы; и

(d) субъекты, которым назначали ингибитор натрий-зависимого котранспортера глюкозы 2 (SGLT2) в дополнение к терапии метформином, могут быть включены в исследование после 4-недельного отмывочного периода с выведением ингибитора SGLT2.

Венозный доступ, подходящий для многократных катетеризации.

Субъекты когорты 4 должны принимать ≥ 10 мг суточную дозу статина в течение периода по меньшей мере 4 недели до скрининга.

Субъекты когорты 4 должны хотеть и иметь возможность самостоятельно выполнять ежедневные подкожные (SC) инъекции после начальной самостоятельной инъекции плацебо в ходе скринингового периода.

Критерии исключения.

Любое состояние, которое будет препятствовать оценкам исследуемого продукта или интерпретации безопасности у субъектов или результатов исследования. Конкретными примерами являются

(a) наличие в анамнезе острого или хронического панкреатита или уровень панкреатической амилазы или липазы, превышающий в два раза верхнюю границу нормы (ULN) диапазона лабораторного эталона, на момент скрининга;

(b) наличие в анамнезе гастропареза, требующего лечения;

(c) наличие в анамнезе хирургического вмешательства, затрагивающего верхнюю часть GI тракта, которое, вероятно, будет влиять на интерпретацию данных о безопасности и переносимости;

(d) наличие в анамнезе холелитиаза, приводящего к приступам острого холецистита, не поддающегося лечению с помощью холецистэктомии, или заболевания желчного пузыря; и

(e) уровень кальцитонина в сыворотке крови, указывающий на гиперплазию C-клеток щитовидной железы (уровень кальцитонина > 50 нг/л), наличие в анамнезе или семейном анамнезе медуллярной карциномы щитовидной железы или множественной эндокринной неоплазии на момент скрининга.

Наличие в анамнезе или наличие в данный момент заболевания GI тракта, почек или печени (за исключением синдрома Жильбера) или любого другого состояния, которое, как известно, нарушает всасывание, распределение, метаболизм или выведение лекарственных средств.

Наличие в анамнезе рака (необязательно в течение последних 10 лет), за исключением немеланомного рака кожи.

Наличие в анамнезе или наличие в данный момент язв, обусловленных синдромом диабетической стопы.

Любое клинически значимое заболевание (помимо T2DM для субъектов с подтвержденным диабетом), медицинская/хирургическая процедура или травма за 4 недели до дня 1 введения доз.

Симптомы инсулинопении или неудовлетворительный контроль уровня глюкозы в крови (например, значительная жажда, ноктурия, полиурия, полидипсия или потеря веса).

Уровень глюкозы в крови натощак ≥ 200 мг/дл (11,11 ммоль/л).

Положительный результат в анализе сыворотки крови на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В или антитела к вирусу гепатита С на момент скрининга.

Положительный результат теста на наличие вируса иммунодефицита человека (HIV) на момент скрининга или применение субъектом антиретровирусных лекарственных препаратов, что устанавливается путем изучения медицинского анамнеза или со слов субъекта.

Уровень аспартаттрансаминазы (AST) $\geq 2,5 \times \text{ULN}$ на момент скрининга.

Уровень аланинтрансаминазы (ALT) $\geq 2,5 \times \text{ULN}$ на момент скрининга.

Уровень общего билирубина $\geq 2 \times \text{ULN}$ на момент скрининга.

Уровень гемоглобина ниже нижнего предела нормального диапазона на момент скрининга.

Уровень нейтрофилов $< 1,5 \times 10^9$ /л на момент скрининга.

Уровень тиреостимулирующего гормона (TSH) выше нормального диапазона на момент скрининга.

Нарушенная функция почек, определяемая как скорость клубочковой фильтрации (GFR) ≤ 60 мл/мин/1,73 м² (GFR оценивали в соответствии с Modification in Renal Disease).

Устойчивая (определяемая как зафиксированные ≥ 2 предыдущих случаев лечащим врачом субъекта) макроальбуминурия (> 300 мг/л).

Значительные поздние диабетические осложнения (макроангиопатия с симптомами застойной сердечной недостаточности или заболевания периферических артерий, микроангиопатия с симптомами нейропатии, гастропареза, ретинопатии, нефропатии).

Нарушение сердечной проводимости (например, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта, синдром слабости синусового узла) в ходе скринингового периода.

Не соответствующие норме показатели жизненно-важных функций после 10 мин отдыха лежа на спине, определяемые в виде любого из следующего:

(a) для возраста < 60 лет, систолическое BP < 90 или ≥ 140 мм рт.ст.; для возраста ≥ 60 лет, систолическое BP < 90 или ≥ 150 мм рт.ст.,

(b) диастолическое BP < 50 или ≥ 90 мм рт.ст., или

(c) HR < 45 или > 85 уд./мин.

Любые клинически значимые не соответствующие норме показатели ритма, проводимости или морфологии ECG в состоянии покоя и любые не соответствующие норме показатели ECG в 12 отведениях, которые могут препятствовать интерпретации изменений интервала QT, в том числе не соответствующая норме морфология ST-T-зубца или гипертрофия левого желудочка.

Удлиненный QTcF >450 мс (для обоих полов) или укороченный QTcF <340 мс, или наличие в семейном анамнезе синдрома удлиненного интервала QT.

Укорочение интервала PR (PQ) <120 мс (PR <120, но >110 мс является допустимым, если отсутствуют признаки предвозбуждения желудочков).

Удлинение интервала PR (PQ) (>240 мс), транзиторная AV-блокада второй или третьей степени или AV диссоциация.

Продолжительность QRS >120 мс, в том числе устойчивая или транзиторная блокада ножки пучка.

Имплантированный кардиодефибриллятор или постоянный кардиостимулятор и симптоматические желудочковые и/или предсердные тахикардии.

Нестабильная стенокардия или стабильная стенокардия, классифицируемая выше, чем класс II согласно Канадскому обществу кардиологов, или инфаркт миокарда, или инсульт.

Случай госпитализации, вызванной сердечной недостаточностью, или диагноз сердечной недостаточности.

Наличие в анамнезе подтвержденного или предполагаемого злоупотребления наркотическими веществами в течение последних 3 лет.

Наличие в анамнезе злоупотребления алкоголем или избыточного потребления алкоголя в течение последних 3 лет.

Положительный результат в анализе на наркотики на момент скрининга или приема в отделение клинического исследования или положительный результат пробы на алкоголь в выдыхаемом воздухе на момент приема в отделение перед введением исследуемого продукта. Пациенты, которые принимают бензодиазепины от хронической тревожности или нарушений сна, могут быть допущены для включения в исследование.

Наличие в анамнезе тяжелой формы аллергии/гиперчувствительности или текущей клинически значимой аллергии/гиперчувствительности.

Донорство цельной крови или эритроцитов или любая потеря крови в количестве >500 мл в течение 2 месяцев до скрининга.

Прием другого нового химического соединения (определяемого как соединение, которое не было одобрено для продажи) или участие в любом другом клиническом исследовании, которое включало лечение лекарственным средством по меньшей мере за 30 дней или 5 периодов полувыведения до первого введения исследуемого препарата в данном исследовании (в зависимости от того, что наступает позже). Период исключения начинается за 30 дней или 5 периодов полувыведения исследуемого продукта после введения последней дозы или после последнего визита в зависимости от того, что наступает позже. Субъекты, которые дали согласие и прошли скрининг, но не были рандомизированы в данном исследовании или предшествующем исследовании фазы I, не исключаются.

Одновременное участие в другом исследовании любого типа.

Применение любого из следующих медицинских продуктов:

- (a) одновременное или предшествующее применение агониста GLP-1;
- (b) применение системных кортикостероидов в течение 28 дней до скрининга;
- (c) применение соединений, которые, как известно, удлиняют интервал QTc; или
- (d) применение любых препаратов или медицинских продуктов на основе лекарственных растений, разрешенных для контроля веса тела или аппетита, за 1 неделю до дня I.

Психическое заболевание, вследствие которого субъектов помещали в лечебное учреждение в результате официального или судебного решения.

Наличие в анамнезе лактацидоза или кетоацидоза.

(B) План исследования.

Рандомизированное двойное слепое исследование фазы 1/2 с применением многократных нарастающих доз выполняли в двух частях (A и B). Блок-схема исследования представлена на фиг. 13. В части A устанавливали схему титрования дозы для G933 (MEDI0382) и максимальную эффективную дозу после титрования у субъектов с T2DM, которых поддерживали на терапии метформином в течение периода примерно 12 дней, которую затем применяли в течение продленного периода дозирования (часть B) в целях определения эффективности G933 в отношении контроля веса и гликемического контроля.

Часть A предусматривала 3 когорты. В когорте 1 предусматривали стабильную дозу (например, 100 мкг) исследуемого продукта, вводимого ежедневно в течение 7 дней (9 субъектов; 6 G933, 3 плацебо). В когорте 2 предусматривали начальную дозу (например, 100 мкг) исследуемого продукта в течение 4 дней и стадию повышения дозы (титрационная доза 1; например, 150 мкг) в течение 7 дней (9 субъектов; 6 G933, 3 плацебо), и в когорте 3 предусматривали начальную дозу (например, 100 мкг) исследуемого продукта в течение 4 дней, стадию повышения дозы (титрационная доза 1; например, 150 мкг) в течение 4 дней и вторую стадию повышения дозы (титрационная доза 2; например, 200 мкг) в течение 7 дней

(9 субъектов; 6 G933, 3 плацебо). Часть В предусматривала 1 когорту. Субъектам в этой когорте (когорта 4) вводили исследуемый продукт в начальной дозе (например, 100 мкг) в течение 4 дней, в дозе стадии повышения дозы (титрационная доза 1; например, 150 мкг) в течение 4 дней, в дозе второй стадии повышения дозы (титрационная доза 2; например, 200 мкг) в течение 4 дней и затем в титрационной дозе 2 (например, 200 мкг) в течение 28 дней на дому (48 субъектов; 24 G933, 24 плацебо).

Начальная доза составляла 100 мкг. Титрационные дозы 1 и 2 не превышали 300 мкг. Продолжительность исследования для каждого субъекта варьировала в зависимости от когорты и предусматривала период в стационаре с применением многократных нарастающих доз (MAD) или период оценки с повышением доз (начиная с дня -2 и заканчивая после дня 8 для когорты 1, дня 12 для когорты 2, дня 16 для когорты 3 и дня 13 для когорты 4) и период последующего наблюдения в амбулатории. Дополнительно только для когорты 4 включали 28-дневный период самостоятельного введения исследуемого продукта на дому (с еженедельными визитами в исследовательский центр) после второй стадии повышения дозы в стационаре и до визита окончания исследования. Субъектов помещали вечером за два дня до приема исследуемого продукта в целях обеспечения повторной оценки критериев отбора и выполнения теста толерантности к пище (ММТ) на исходном уровне и стандартизации уровня физической активности до начала введения доз на следующее утро. В день 1, после ночного голодания в течение как минимум 8 ч, забирали образцы крови исходного уровня для проведения лабораторных тестов в отношении безопасности, эффективности, фармакокинетических характеристик (ПК), фармакодинамических характеристик (PD) и наличия антитела к лекарственному средству (ADA). Кроме того, регистрировали показатели ECG в 12 отведениях, и субъекту вводили однократную SC дозу G933 либо плацебо. Субъект оставался на базе клинического исследования для наблюдения и проведения тестов в отношении безопасности, в том числе ECG, телеметрии, мониторинга показателей жизненно-важных функций и оценок места инъекции на наличие возможных реакций в течение дня и в ходе периода лечения. Дополнительно для когорты 4 выполняли 24-часовой амбулаторный мониторинг давления крови (ABPM).

Процедуры теста толерантности к пище (ММТ) выполняли в день -1 и в последний день введения наиболее высокого достигаемого уровня дозы в случае всех когорт. Дополнительные моменты времени включали первый день введения титрационной дозы 1 (когорта 2), первый день введения титрационной дозы 2 (когорта 3), день завершения периода повышения дозы в стационаре (пятый день введения титрационной дозы 2; когорта 4) и еженедельные визиты в исследовательский центр в течение 28-дневного периода самостоятельного введения на дому (когорта 4). Для проведения ММТ субъект потреблял стандартизированную пищу (Ensure Plus®) в течение 5 мин, и в течение последовательных моментов времени получали образцы крови для измерения уровня глюкозы и параметров, связанных с метаболизмом глюкозы, непосредственно до и в течение 240 мин после потребления стандартизированной пищи. Во время периода в стационаре образцы крови из пальца для определения уровня глюкозы собирали за 15 мин до и через 2 ч после завтрака, обеда и ужина и перед сном.

Субъектов когорты 4 повторно помещали на одну ночь в стационарный режим в конце периода самостоятельного введения на дому для сбора данных конечных точек. Вес тела измеряли в несколько моментов времени, включая (без ограничения) до введения первой дозы, в ходе периода введения доз в стационаре (и в ходе периода в амбулатории для когорты 4), при выписке из отделения и на визитах последующего наблюдения со дня 7 по день 14.

Образцы для оценки фармакокинетических характеристик G933 получали до и после введения дозы и в различные моменты времени в зависимости от когорты вплоть до 48 ч после введения последней дозы G933. Образцы для определения концентрации метформина получали до введения доз G933. Образцы для определения антител к лекарственному средству получали до введения дозы и в различные моменты времени вплоть до 28 дней после введения последней дозы.

Субъектов выписывали из отделения через день после введения последней дозы в исследовании. Визит последующего наблюдения выполняли для проведения конечных оценок безопасности примерно через 28 дней после введения последней дозы исследуемого продукта.

(С) Оценки эффективности.

Для оценки влияния на контроль уровня глюкозы и вес многократных доз G933 по сравнению с плацебо, процентное значение изменения AUC глюкозы в ММТ (вплоть до 240 мин после ММТ) и изменения веса от исходного уровня (день -1) до конца лечения в когорте 4 сравнивали между группами введения G933 и плацебо с помощью ковариационного анализа посредством корректировки по отношению к показателю измерения на исходном уровне и группе лечения. Недостающие показатели измерения в конце лечения заменяли последним доступным показателем измерения. Сравнение проводили при двустороннем уровне значимости, составляющем 0,1. Снижение веса (например, от 1,3 до 2,0 кг в течение 4 недель после повторного введения дозы один раз в день) в группе лечения G933 по сравнению с группой плацебо указывало на то, что G933, например, в дозе 100-300 мкг, был эффективным для снижения веса.

Изменение уровня гемоглобина A1c (гликолизированного гемоглобина, HbA1c) и фруктозамина от исходного уровня (день -2) и процентное значение изменения AUC глюкозы за 24 ч после ММТ от исходного уровня (день -1) анализировали в когорте 4 аналогичным образом. Анализы AUC глюкозы за 24 ч включали показатели измерения уровней глюкозы с помощью панели метаболизма глю-

козы до/после ММТ, а также уровни глюкозы, полученные при биохимическом анализе сыворотки крови и образцов для PD оценки уровня глюкозы, где эти результаты получали в определенные моменты времени. Повышение контроля уровня глюкозы (например, по меньшей мере 20% снижение площади под кривой зависимости концентрации глюкозы от времени (AUC) после проведения теста толерантности к пище (ММТ) и/или измеряемое по уровню гемоглобина A1c и фруктозамина) в группе лечения G933 по сравнению с группой плацебо указывало на то, что G933, например, в дозе 100-300 мкг, был эффективным для улучшения контроля уровня глюкозы.

(D) Результаты.

(i) Часть А: когорты 1-3.

G933 успешно вводили в дозах, составляющих не более 200 мкг один раз в день (QD), в течение 15 дней включительно.

Значимые снижения уровней глюкозы до нормальных уровней с применением G933 наблюдали как в случае уровня глюкозы в плазме натощак, так и в случае постпрандиального уровня глюкозы после проведения теста толерантности к пище. В тесте толерантности к пище площадь под кривой зависимости концентрации глюкозы от времени (AUC) снижалась на >40% в когортах 1-3 (фиг. 14). Изменение уровней глюкозы натощак от исходного уровня в когорте 1 (в день 7) и когорте 3 (в дни 9 и 15) показано на фиг. 15.

Наблюдали дозозависимую тенденцию к значительной потере веса до 2 кг. Результаты показаны на фиг. 16 и указывают на то, что G933 значительно снижал вес тела у пациентов с избыточным весом/ожирением с сахарным диабетом 2 типа. В когорте 3 наблюдали разницу более 2 кг.

G933 был хорошо переносимым вплоть до 200 мкг при титровании доз.

Фармакокинетические характеристики после повторного введения доз показаны на фиг. 17. PK была линейной и предсказуемой. Период полувыведения составлял примерно 11 ч. Присутствовало минимальное накопление или отсутствие такового после введения многократных ежедневных доз, а устойчивого состояния достигали в период от дня 4 до 7. Максимальные концентрации в плазме крови в тестируемом диапазоне доз составляли 4,21 и 18,90 нг/мл. Средняя суточная экспозиция находилась в диапазоне от 2,89 до 12,45 нг/мл.

Только один образец подтверждали в качестве положительного в отношении антитела к G933 после исходного уровня.

Нежелательные явления были контролируемыми и согласовывались с таковыми, которые ожидалось для моноагонистов GLP-1.

Подавляющее большинство сообщаемых явлений тошноты и рвоты происходило в начале лечения, например, при уровне дозы 100 мкг. Рвота происходила у 26% (n=5) пациентов, получавших G933, и не возникала при получении плацебо. В когорте 1 о явлениях рвоты не сообщали. В когорте 2 сообщали о трех явлениях рвоты у двух пациентов, получавших активное средство. Оба случая происходили в день 1 при уровне дозы 100 мкг и оба случая разрешались без вмешательства. В когорте 3 сообщали о тринадцати явлениях рвоты у трех пациентов, получавших активное средство. У двух субъектов рвоту отмечали в день 1, и эти случаи разрешались без вмешательства. У одного субъекта рвота наблюдалась шесть раз в течение периода от дня 1 до дня 5. Физиологический раствор для внутривенного введения вводили в день 3, и субъекта выписывали в день 5.

О нежелательных явлениях со стороны сердца сообщали у четырех (44,4%) пациентов, получавших плацебо, и у семи (36,8%) пациентов, получавших лечение с помощью G933. По-видимому, их частота не повышалась по мере роста дозы в когортах, получавших активное средство. Повышение частоты пульса на приблизительно 10 уд./мин наблюдали в каждой когорте после осуществления лечения с помощью G933. Значимого изменения систолического или диастолического давления крови не наблюдали, однако тенденцию к снижению давления крови наблюдали во всех когортах, получавших как G933, так и плацебо.

О нежелательных явлениях со стороны желудочно-кишечного тракта (GI) сообщали у четырех (44,4%) пациентов, получавших плацебо, и у тринадцати (68,4%) пациентов, получавших лечение с помощью G933. Нежелательные явления со стороны GI наблюдали у 3, 4 и 6 пациентов в когортах 1, 2 и 3 соответственно. Наиболее распространенным нежелательным явлением со стороны GI была тошнота, о которой сообщали у 6 (31,6%) пациентов, получавших лечение с помощью G933.

О сниженном аппетите сообщали у шести (85,7%) пациентов, получавших лечение с помощью G933, в когорте 3.

Сообщали об одном серьезном нежелательном явлении (SAE): пневмонии, вызванной микоплазмами.

Подводя итог, G933 был хорошо переносимым, приводил к значимым снижениям постпрандиального уровня глюкозы и демонстрировал клинически значимую дозозависимую потерю веса.

(ii) Часть В: когорта 4.

G933 эффективно снижал уровень глюкозы в крови и приводил к потере веса в течение 41-дневного периода введения доз. Среднее снижение площади под кривой зависимости уровня глюкозы (AUC) от исходного уровня (день 1) ко дню 41 показано на фиг. 18. В течение этого времени G933 приводил к 38,5% снижению (90% С.И. -47,1, -29,0), в то время как плацебо приводил только к 16,1% снижению (90% С.И. -24,9, -8,0) (р-значение: 0,001). G933 также повышал контроль уровня глюкозы, измеряемый по

HbA1c (см. фиг. 19).

Через 41 день лечения уровень HbA1c снижался на 0,92 процента от среднего значения исходного уровня, составляющего 7,2%, до среднего значения, составляющего 6,3%, в день 42. По сравнению с этим, плацебо снижал уровень HbA1c только на 0,58% от среднего значения исходного уровня, составляющего 7,3%, до среднего значения, составляющего 6,7%.

Эффекты G933 в отношении веса показаны на фиг. 20 и 21. На фиг. 20 показано, что через 41 день лечения с помощью G933 пациенты теряли приблизительно 3,83 кг, тогда как пациенты, получавшие плацебо, теряли только приблизительно 1,71 кг (разница 2,12 кг между G933 и плацебо; $p < 0,001$). Кроме того, 44% пациентов, получавших лечение с помощью G933, теряли по меньшей мере 5 кг, тогда как только 8% пациентов, получавших плацебо, теряли по меньшей мере 5 кг. На фиг. 21 показано, что через 41 день лечения с помощью G933 пациенты теряли приблизительно 4,18% своего веса, тогда как пациенты, получавшие плацебо, теряли только приблизительно 1,71% своего веса (разница 2,47% между G933 и плацебо; $p < 0,001$). Кроме того, 84% пациентов, получавших лечение с помощью G933, теряли по меньшей мере 2% своего веса, тогда как только 42% пациентов, получавших плацебо, теряли по меньшей мере 2% своего веса. Лечение G933 также приводило к снижению содержания жира в печени (см. фиг. 22). Среднее относительное снижение процента жира в печени от исходного уровня (95% CI) с применением G933 по сравнению с плацебо составляло 20,5% (7,2, 33,9) ($p = 0,004$). Значимое снижение объема печени также наблюдали у пациентов, получавших лечение с помощью G933, по сравнению с плацебо (0,14 л (-0,24, -0,03), $p = 0,01$). В целом нежелательные явления были уравновешены у пациентов, получавших лечение с помощью G933 и плацебо. Нежелательные явления кратко описаны в табл. ниже. Летальных исходов не происходило.

Субъект, имеющий	Плацебо N=26	200 мкг G933 N=25
по меньшей мере одно явление	21 (80,8%)	22 (88,8%)
по меньшей мере одно связанное с G933 явление	15 (57,7%)	20 (80,0%)
по меньшей мере одно явление \geq 3-й степени тяжести	2 (7,7%)	0
летальный исход (5-я степень тяжести)	0	0
по меньшей мере одно серьезное явление	1 (3,8%)	0
по меньшей мере одно серьезное и/или \geq 3-й степени тяжести явление	2 (7,7%)	0
по меньшей мере одно связанное с G933 серьезное явление	1 (3,8%)	0
по меньшей мере одно явление, ведущее к прекращению приема G933	1 (3,8%)	3 (12,0%)

В общей сложности о тошноте сообщали у 17 пациентов: 4, получавших плацебо (15,4%), и 13, получавших лечение G933 (52,0%). В общей сложности у 8 пациентов происходила рвота: 0, получавших плацебо, и 8, получавших лечение G933 (32,0%). Тошнота и рвота чаще всего происходили во время введения более ранних доз (см. фиг. 23). Нежелательных изменений параметров работы сердца и гемодинамических параметров не наблюдали. Повышения систолического или диастолического давления крови не наблюдали. Повышение частоты сердечных сокращений на 12,8 уд./мин наблюдали в день 13, однако оно снижалось до 6,9 уд./мин ко дню 41. В целом G933 был эффективным в отношении как снижения уровня глюкозы в крови, так и потери веса в течение 41-дневного периода. Метаболизм глюкозы на основании теста толерантности к пище нормализовался и сопровождался значимым снижением уровня HbA1c. Примечательно, что наблюдали более высокую точечную оценку в отношении снижения веса, чем ожидаемая в случае лечения лираглутидом (3 мг).

G933 был хорошо переносимым вплоть до дня 41 при повышении доз от 100 до 200 мкг, что подтверждало достижение устойчивого состояния в течение одной недели лечения при 200 мкг и минимальное накопление после многократного введения доз. Максимальные концентрации в плазме крови, наблюдаемые при уровнях дозы 200 мкг, находились в диапазоне от 1,98 до 34,30 нг/мл.

Пример 6. Исследование с применением многократных возрастающих доз, часть II.

(А) Субъекты.

Примерно 32 субъектов с избыточным весом или ожирением с относительно эффективно контролируемым сахарным диабетом 2 типа (T2DM) включали для участия в исследовании. Включенные в исследование субъекты соответствовали критериям включения и исключения, описанным в примере 5, со следующими исключениями.

Критерий включения.

Субъекты когорты 5 и 6 должны хотеть и иметь возможность самостоятельно выполнять ежедневные подкожные (SC) инъекции после начальной самостоятельной инъекции плацебо (или физиологиче-

ского раствора) в ходе скринингового периода.

Критерии исключения.

Не соответствующие норме показатели жизненно-важных функций после 10 мин отдыха лежа на спине определяли в виде любого из следующего:

- (a) систолическое ВР <90 или ≥ 140 мм рт.ст.;
- (b) диастолическое ВР <50 или ≥ 90 мм рт.ст.; или
- (c) HR <45 или >85 уд./мин.

Нестабильная стенокардия или стабильная стенокардия, классифицируемая выше, чем класс II согласно Канадскому обществу кардиологов, или наличие в предшествующем анамнезе инфаркта миокарда или инсульта; или наличие в анамнезе транзиторной ишемической атаки в течение предшествующих 12 месяцев.

(В) План исследования.

Выполняли рандомизированное двойное слепое исследование с применением многократных нарастающих доз. Блок-схема исследования представлена на фиг. 24. Данное исследование предусматривало 2 когорты: когорту 5 и когорту 6. Когорта 5 предусматривала 16 субъектов (12 активное средство, 4 плацебо), которым начинали введение G933 (MEDI0382) в дозе 100 мкг в течение 5 дней с последующим введением 150 мкг в течение 5 дней, 200 мкг в течение 5 дней и 300 мкг в течение 7 дней. Когорта 6 предусматривала 16 дополнительных субъектов (12 активное средство, 4 плацебо), которым начинали введение G933 в дозе 100 мкг в течение 5 дней с последующим введением 200 мкг в течение 5 дней и 300 мкг в течение 7 дней. Когорты 5 и 6 предусматривали в общей сложности примерно 32 субъекта и проводились параллельно. Исследование предусматривало период оценки с повышением дозы в стационаре, начиная с дня 3 в случае обеих когорт 5 и 6, и период последующего наблюдения в амбулатории. Первые 4 дня и заключительный день введения дозы 300 мкг проводили в стационаре. Субъектов помещали в клинику, как описано в примере 5 в случае когорт 1-4. Однако у них был начальный период в стационаре, заканчивающийся в день 3, с последующим самостоятельным введением G933 на дому с визитом в клинику на каждой стадии повышения дозы до начала введения дозы 300 мкг. У субъектов был второй период в стационаре для начала введения дозы 300 мкг, заканчивающийся на четвертый день, с последующим самостоятельным введением этой же дозы на дому.

Процедуры теста толерантности к пище (ММТ) выполняли в день -1 и в последний день введения наиболее высокого достигаемого уровня дозы. Дополнительные моменты времени включали момент времени до начала введения дозы 300 мкг (день 16 в случае когорты 5 и день 11 в случае когорты 6) и момент времени в конце введения доз (день 22 в случае когорты 5 и день 17 в случае когорты 6). ММТ выполняли, как описано в примере 5.

Вес тела измеряли в несколько моментов времени, включая (без ограничения) до введения первой дозы, в ходе периода введения доз в стационаре, и в ходе периода в амбулатории, при выписке из отделения, и на визитах последующего наблюдения со дня 7 по день 14, и на визите окончания исследования после 28 дней.

Образцы для оценки фармакокинетических характеристик G933 получали до и после введения дозы и в различные моменты времени в зависимости от когорты вплоть до 48 ч после введения последней дозы G933. Образцы для определения концентрации метформина получали до введения доз G933. Образцы для определения антител к лекарственному средству получали до введения дозы и в различные моменты времени вплоть до 28 дней после введения последней дозы.

Субъектов выписывали из отделения через день после введения последней дозы в исследовании. Визит последующего наблюдения выполняли для проведения конечных оценок безопасности примерно через 28 дней после введения последней дозы исследуемого продукта.

(С) Результаты.

G933 эффективно снижал уровень глюкозы в когортах 5 и 6. Уровни AUC глюкозы, наблюдаемые в когортах 5 и 6, показаны на фиг. 25 и 26 соответственно. В когорте 5 лечение с помощью G933 приводило к снижению AUC глюкозы на 41,7% (90% С.И. -49,9, -33,5), тогда как лечение с помощью плацебо приводило только к 8,0% снижению уровня глюкозы (90% С.И. -19,6, 3,6) ($p < 0,001$). В когорте 6 лечение с помощью G933 приводило к снижению AUC глюкозы на 35,8% (90% С.И. -43,3, -28,3), тогда как лечение с помощью плацебо приводило только к -6,9% снижению уровня глюкозы (90% С.И. -20,2, 6,3) ($p = 0,002$). Эффект в отношении AUC глюкозы был сопоставим с таковым у предыдущих когорт, т.е. нормализован на приблизительно 40% снижение. Процент снижения AUC глюкозы от исходного уровня во всех когортах показан на фиг. 27. G933 также эффективно снижал уровни глюкозы натощак в когортах 5 и 6, как показано на фиг. 28. G933 был также эффективным в снижении веса. Как показано на фиг. 29, через 22 дня лечения пациенты, получавшие лечение с помощью G933, в когорте 5 теряли приблизительно 3,09 кг, тогда как пациенты, получавшие лечение с помощью плацебо, теряли только приблизительно 0,98 кг (разница 2,11 кг). Аналогично через 17 дней лечения пациенты, получавшие лечение с помощью G933, в когорте 6 теряли приблизительно 2,23 кг, тогда как пациенты, получавшие лечение с помощью плацебо, теряли только приблизительно 0,35 кг (разница 1,88 кг). Обе когорты 5 (2,11 кг) и 6 (1,88 кг)

характеризовались сопоставимой потерей веса через 22 и 17 дней по сравнению с таковой, наблюдаемой в течение 41 дня введения доз в когорте 4.

Изменение веса и уровней глюкозы представлены на графике совместно на фиг. 30 и кратко описаны в табл. 22 ниже.

Таблица 22

Когорта N= получавшие активное средство	Вес (кг)	AUC глюкозы	Уровень глюкозы натощак (мг/дл)
1, 100 мкг, n=6	-1,1	-27,3	-28,00
2, 150 мкг, n=6	-0,5	-8,9	-17,90
3, 200 мкг, n=6	-2,4	-31,6	-43,20
4, 200 мкг, n=25	-2,11	-22,5	-32,62
5, 300 мкг, n=12	-2,11	-33,7	-24,40
6, 300 мкг, n=12	-1,88	-28,9	-36,94

G933 был хорошо переносимым в когортах 5 и 6, и профиль нежелательных явлений согласовывался с таковым у других продаваемых на рынке аналогов GLP-1, как, например, лираглутида. Ни в одной когорте не наблюдали летальных исходов или серьезных нежелательных явлений.

Обе схемы титрования дозы показали, что дозы G933 вплоть до 300 мкг были хорошо переносимыми, что касается тошноты и рвоты. В когорте 5 в общей сложности у 4 пациентов сообщили о 8 приступах тошноты: 1 пациент (20%), который получал плацебо, и 3 пациента (27,3%), которые получали G933. В общей сложности у 3 пациентов сообщили о 8 приступах рвоты: ни один из пациентов, которые получали плацебо (0%), и 3 пациента, которые получали G933 (27,3%). В когорте 6 в общей сложности у 5 пациентов сообщили о 6 приступах тошноты: ни один из пациентов, которые получали плацебо (0%), и 5 пациентов, которые получали G933 (41,7%). У одного пациента рвота наблюдалась дважды: ни у одного из пациентов, которые получали плацебо (0%), и у 1 пациента, который получал G933 (8,3%). Более низкую частоту тошноты (8/24=33%) и рвоты (4/24=16%) наблюдали после того, как пациенты переходили на амбулаторное лечение через 48 ч после введения первой дозы.

Амбулаторное измерение давления крови не показало повышения систолического давления крови/диастолического давления крови (SBP/DBP) от исходного уровня у пациентов, получавших лечение с помощью G933, а показало потенциальную тенденцию к их снижению. В когорте 5 частота сердечных сокращений повышалась на примерно 7,6 уд./мин от исходного уровня через 22 дня введения G933, что согласовывалось с тем, что наблюдали ранее, и другими аналогами GLP-1, и в когорте 4. В когорте 6 частота сердечных сокращений повышалась на примерно 5,9 уд./мин от исходного уровня через 17 дней введения G933.

Концентрации G933 в плазме крови через 7 дней введения при наиболее высокой дозе 300 мкг, полученные при обеих схемах титрования доз, представлены на фиг. 31. Профили перекрывались, особенно после достижения устойчивого состояния, что указывает на то, что экспозиция при этом уровне дозы была независимой от принятой схемы титрования доз. Максимальная концентрация в плазме крови, наблюдаемая при дозе 300 мкг, находилась в диапазоне от 7,9 до 30,9 нг/мл.

Краткое описание результатов исследования с применением многократных нарастающих доз (части I и II)

В целом в диапазоне доз 100-300 мкг G933 характеризовался линейной PK с периодом полувыведения примерно 8-11 ч, минимальным накоплением после повторного ежедневного введения доз и достижением устойчивого состояния в период от дня 4 до дня 7 при всех четырех тестируемых уровнях доз. Результаты подтверждали результаты, полученные в исследовании с применением однократной дозы (пример 4). Концентрации в плазме крови, достигаемые через 7 дней введения наиболее высокой дозы, составляющей 300 мкг, не зависели от принятой схемы титрования доз. Межсубъектная вариабельность значений C_{max} составляла примерно 20-30% в более меньших когортах и 40-50% в более крупной когорте 4. Максимальные концентрации в плазме крови при тестируемом диапазоне доз и при принятой схеме титрования доз находилась в диапазоне от 1,98 до 34,3 нг/мл, при этом средняя суточная концентрация в плазме крови находилась в диапазоне от 0,87 до 16,3 нг/мл.

Профиль безопасности и переносимости был сопоставим с другими миметиками GLP-1, и, что важно, G933 приводил как к потере веса, так и к контролю уровня глюкозы.

Настоящее изобретение не подлежит ограничению по объему конкретными описанными вариантами осуществления, которые, как предполагается, являются единичными иллюстрациями отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции или способы, являющиеся функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. В действительности различные моди-

фикации настоящего изобретения, в дополнение к показанным и описанным в данном документе, станут очевидными специалистам в данной области из предшествующего описания и сопроводительных графических материалов. Предполагается, что такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации и заявки на патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пептида, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19 в способе лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), где 50-600 мкг пептида вводят в каждой дозе субъекту-человеку, нуждающемуся в этом.

2. Применение по п.1, где пептид вводят ежедневно.

3. Применение по п.2, где пептид вводят один раз в день.

4. Применение по п.3, где пептид вводят в течение по меньшей мере одной недели, в течение по меньшей мере двух недель, в течение по меньшей мере трех недель или в течение по меньшей мере четырех недель.

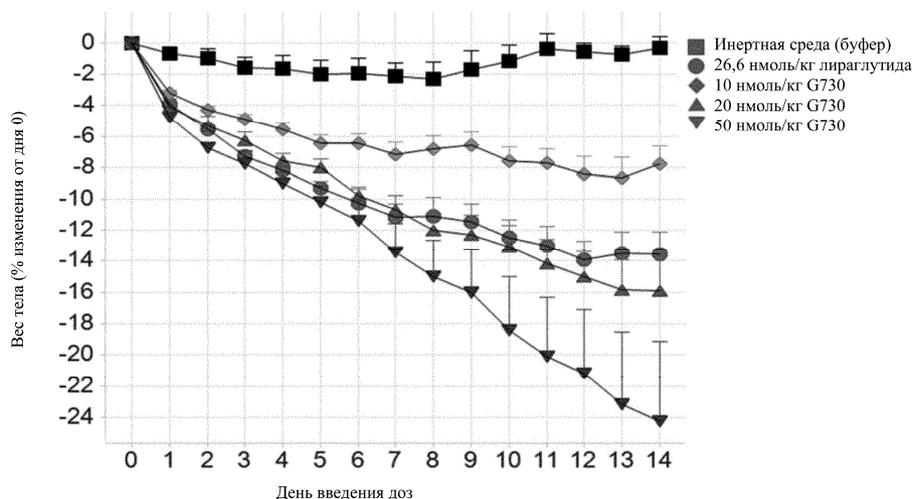
5. Применение по п.4, где пептид вводят с помощью инъекции.

6. Применение по п.5, где введение является подкожным.

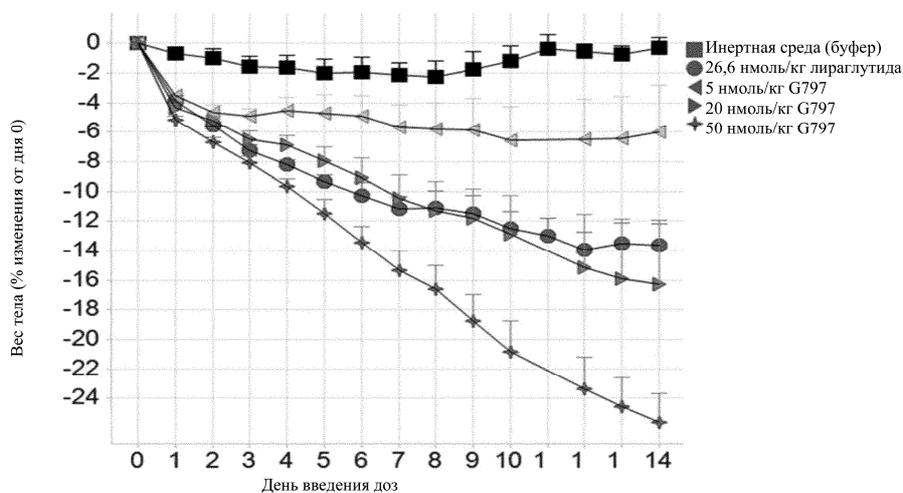
7. Применение по любому из пп.1-6, где прогрессирование заболевания прекращается.

8. Применение по любому из пп.1-6, где прогрессирование заболевания обращается.

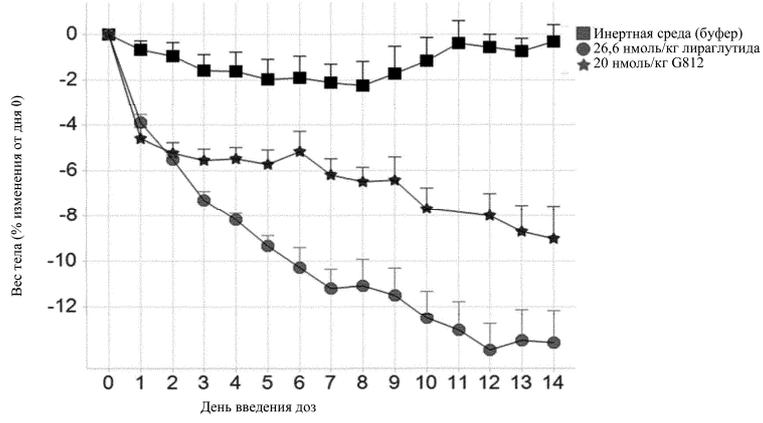
9. Применение по любому из пп.1-8, где 100-600 мкг пептида вводят в каждой дозе.



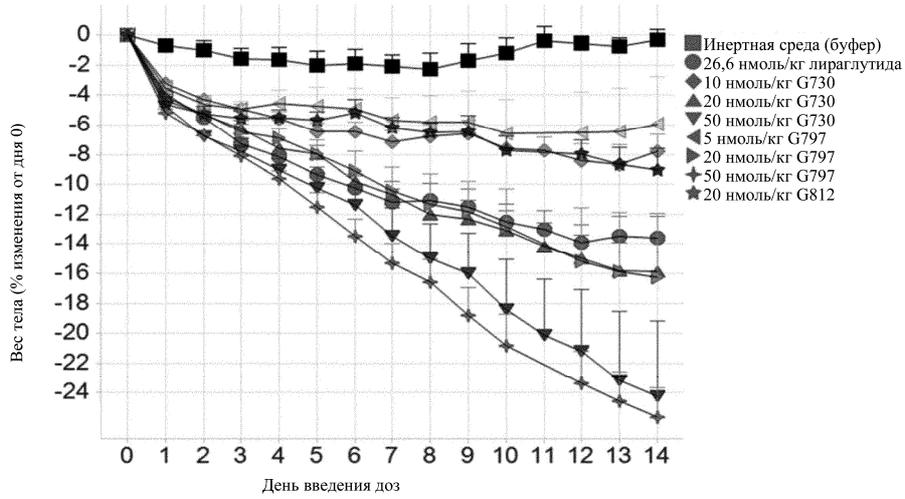
Фиг. 1



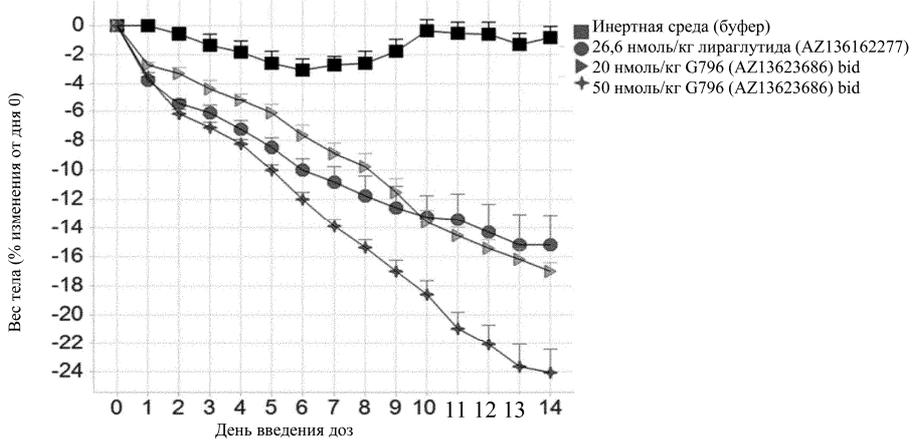
Фиг. 2



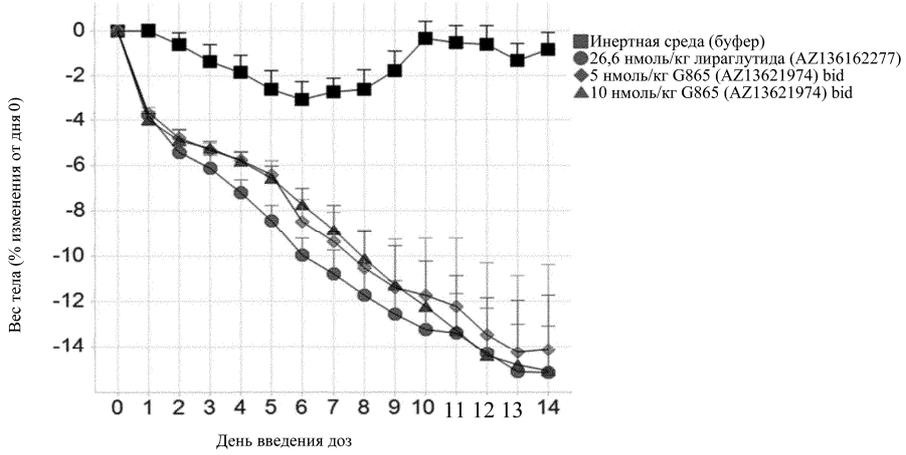
Фиг. 3



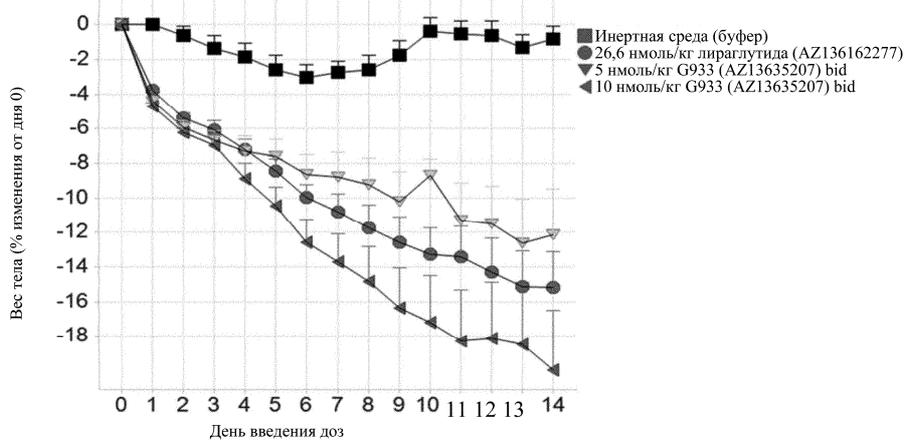
Фиг. 4



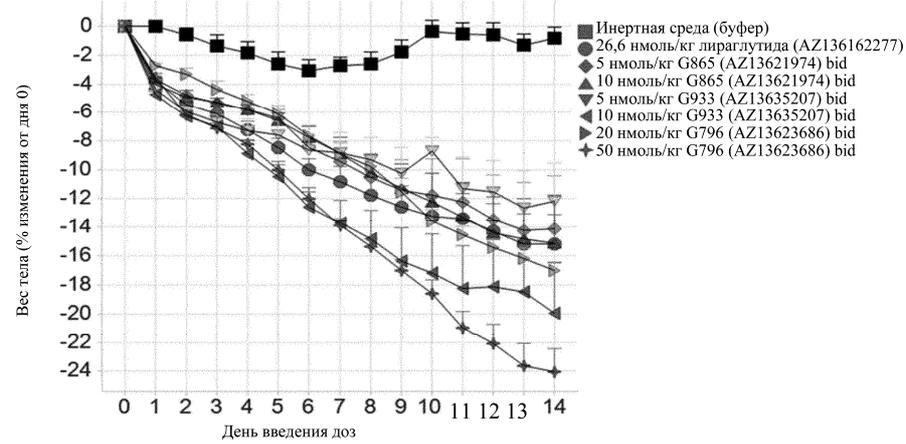
Фиг. 5



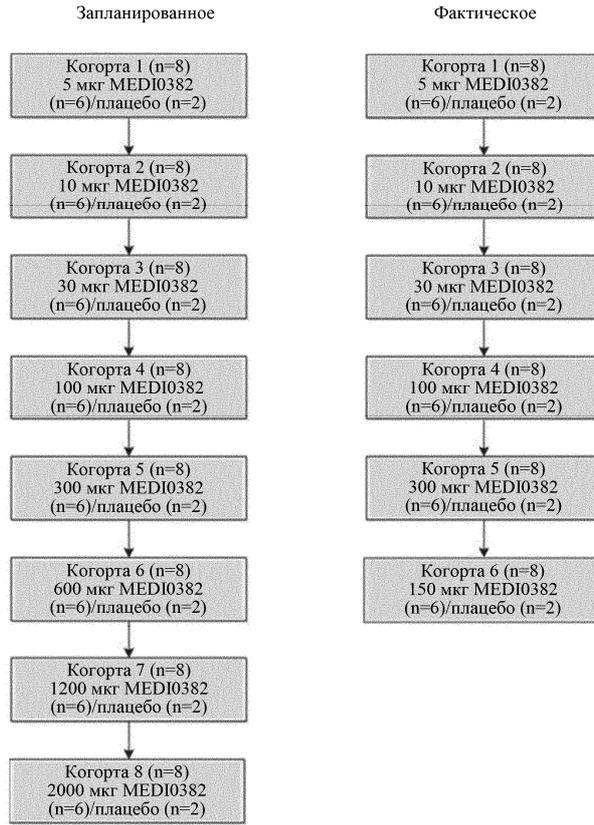
Фиг. 6



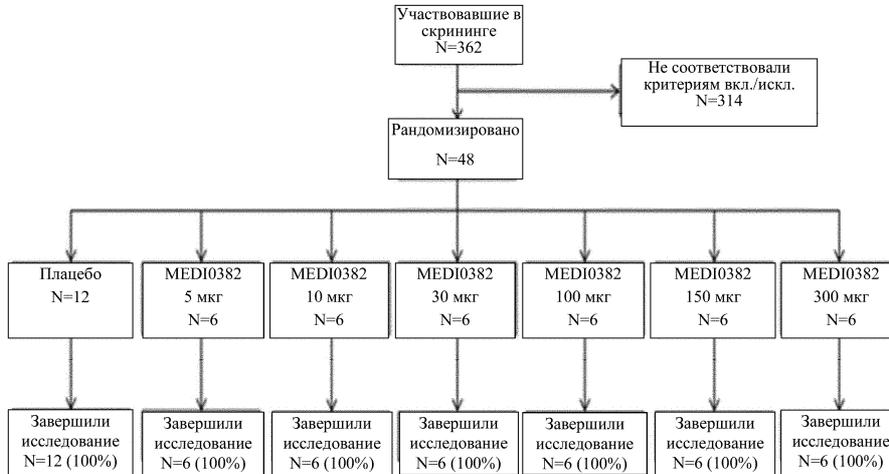
Фиг. 7



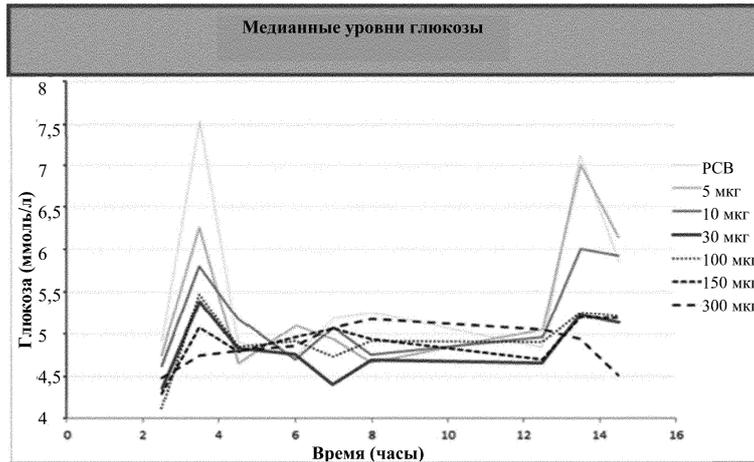
Фиг. 8



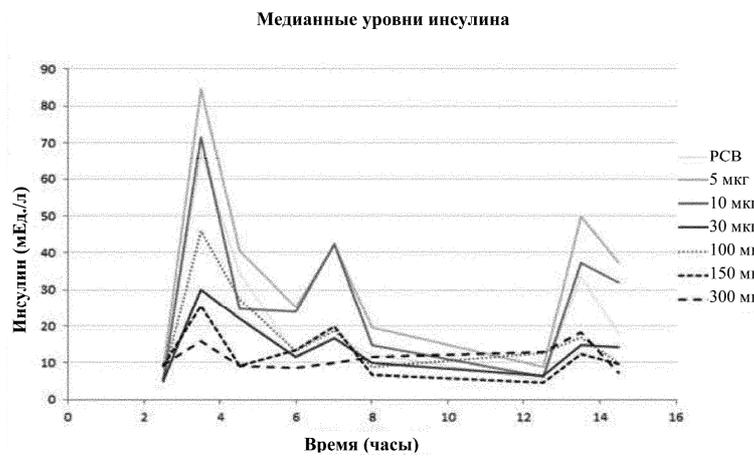
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

Часть А.

Когорты 1-3

Ключевые конечные точки:

безопасность/переносимость и РК

Когорта 3: (6 MEDI0382 + 3 плацебо)

Начальная доза 4 дня	Титрационная доза 1 4 дня	Титрационная доза 2 7 дней
-------------------------	------------------------------	-------------------------------

Когорта 2: (6 MEDI0382 + 3 плацебо)

Начальная доза 4 дня	Титрационная доза 1 7 дней
-------------------------	-------------------------------

Когорта 1: (6 MEDI0382 + 3 плацебо)

Стабильная доза 7 дней

Часть В:

Когорта 4

Ключевые конечные точки:

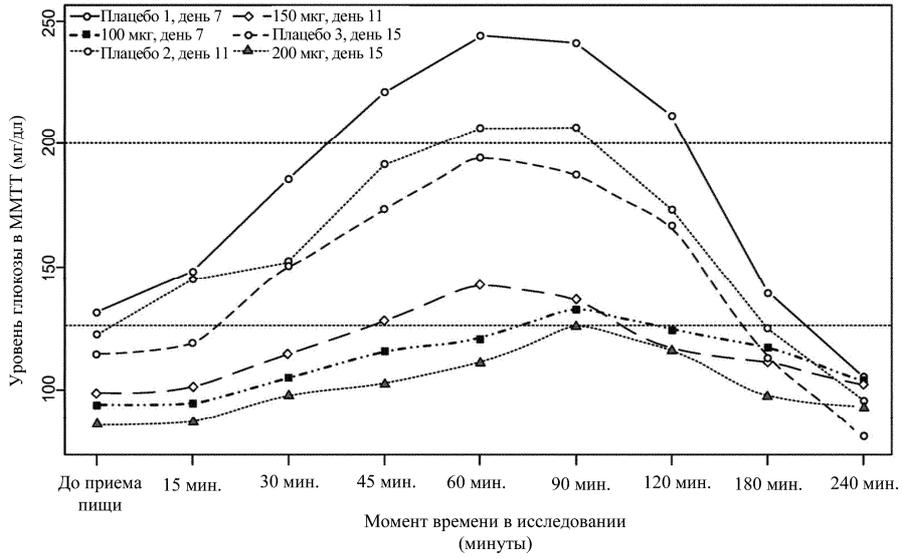
вес тела, гликемический контроль, безопасность/переносимость

(24 MEDI0382 + 24 плацебо)

Начальная доза 4 дня	Титрационная доза 1 4 дня	Титрационная доза 2 4 дня	Титрационная доза 2 28 дней на дому	Титрационная доза 2 1 день (в стационаре)
-------------------------	------------------------------	------------------------------	--	--

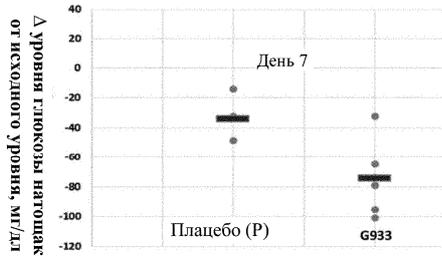
41-дневный период введения доз для каждого субъекта

Фиг. 13

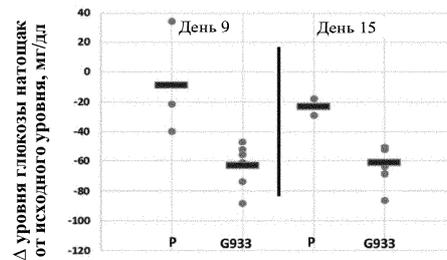


Фиг. 14

Когорта 1



Когорта 3

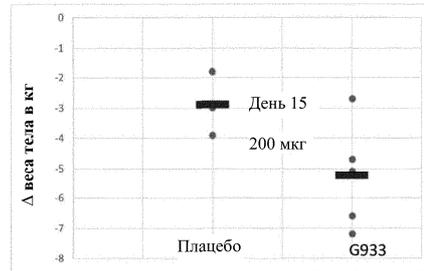
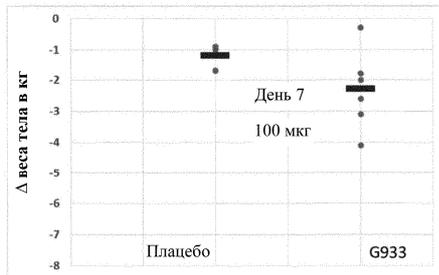
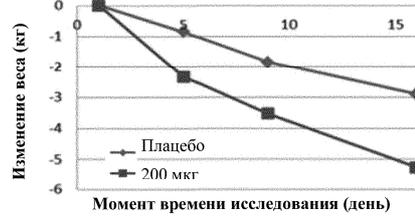


Фиг. 15

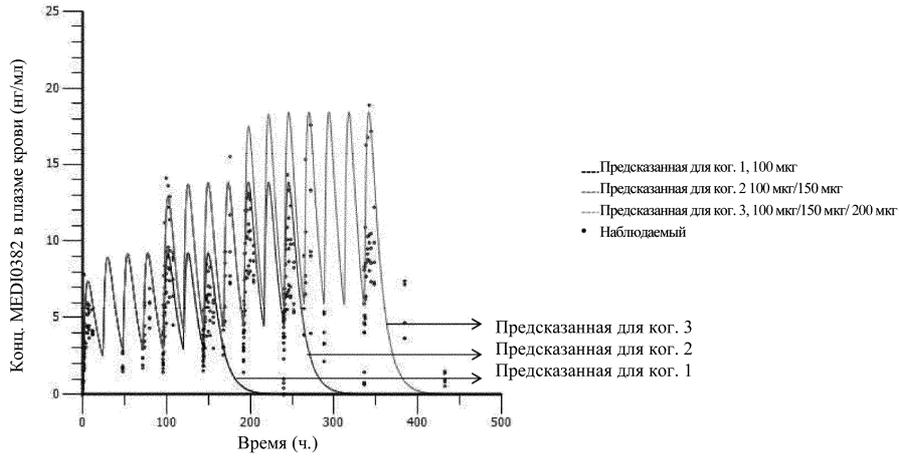
Когорта 1



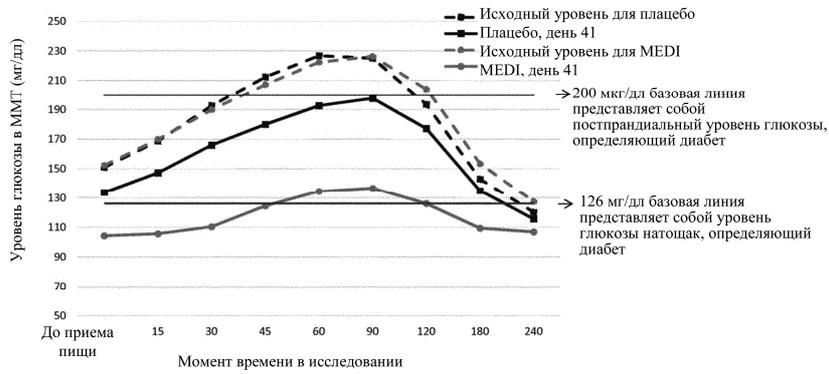
Когорта 3



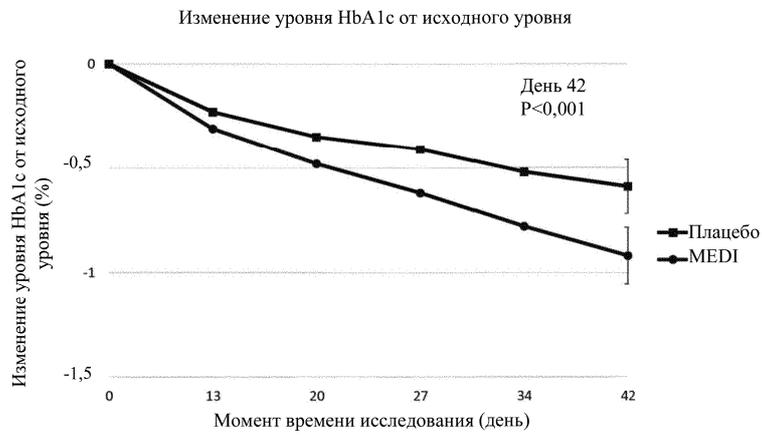
Фиг. 16



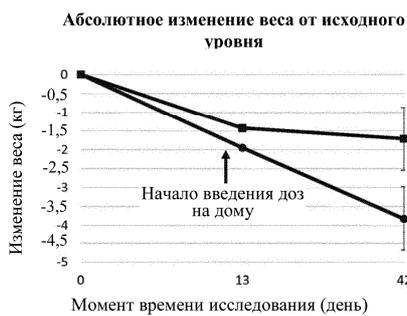
Фиг. 17



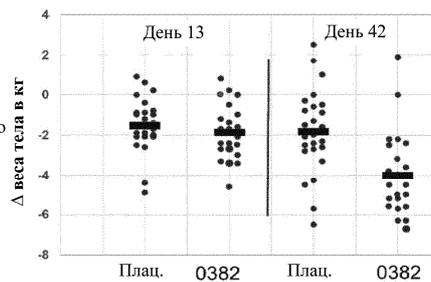
Фиг. 18



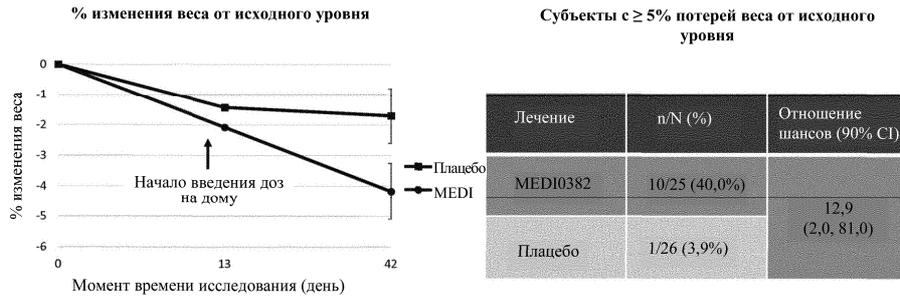
Фиг. 19



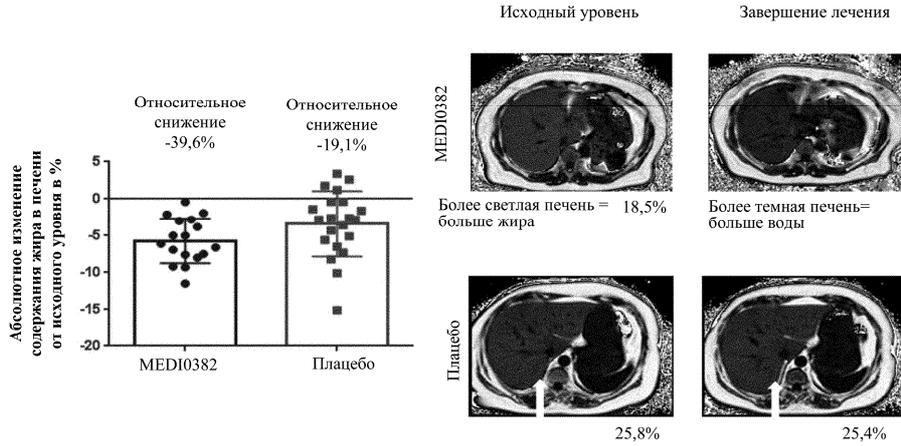
Абсолютное изменение веса для отдельных пациентов



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

	Повышение уровня дозы MEDI0382			Плацебо
	100 мкг	150 мкг	200 мкг	
Число явлений				
Тошнота	22	14	15	7
Рвота	23	18	14	0



Данные включают общее число сообщаемых явлений рвоты и случаев изначальной тошноты в день

Фиг. 23

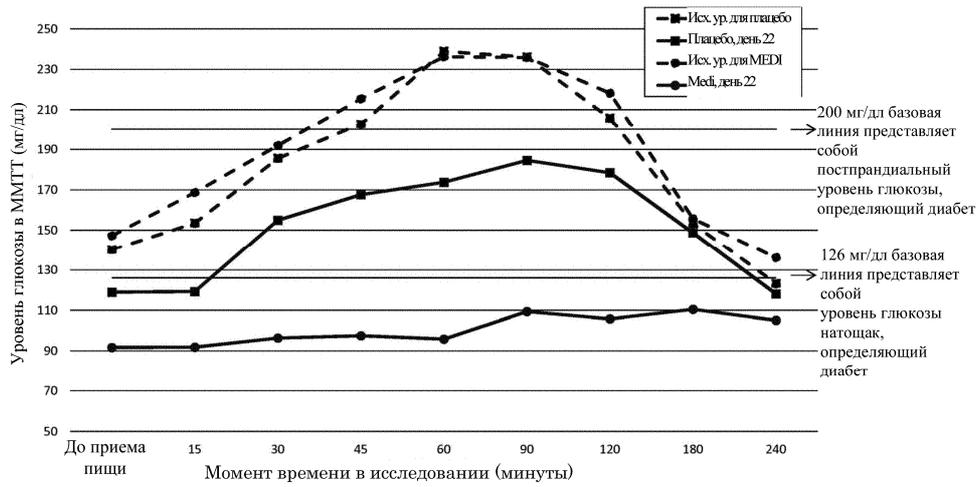
Когорта 5 – 12 активное средство + 4 плацебо

100 мкг 5 дней 3 в стационаре	150 мкг 5 дней в амбулатории	2000 мкг 5 дней в амбулатории	3000 мкг 7 дней 3+1 в стационаре
--	------------------------------------	-------------------------------------	---

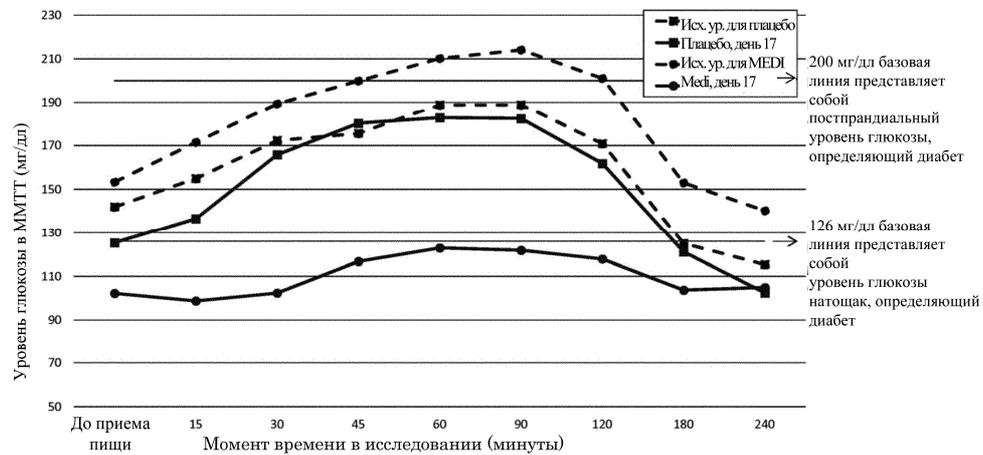
Когорта 6 – 12 активное средство + 4 плацебо

100 мкг 5 дней 3 в стационаре	2000 мкг 5 дней в амбулатории	3000 мкг 7 дней 3+1 в стационаре
--	-------------------------------------	---

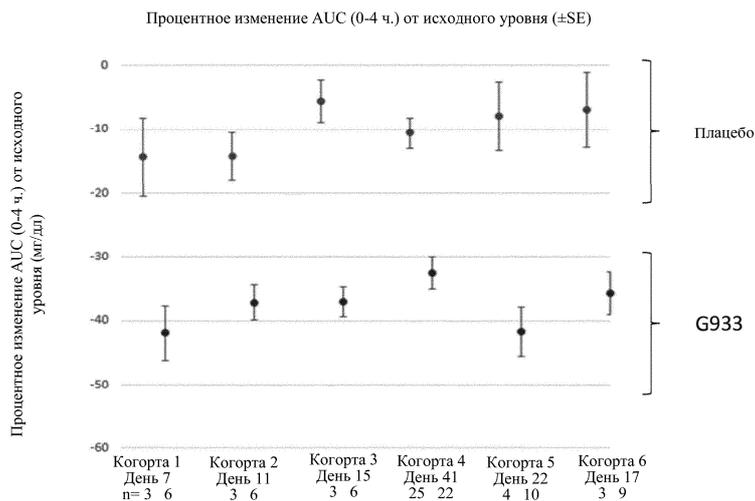
Фиг. 24



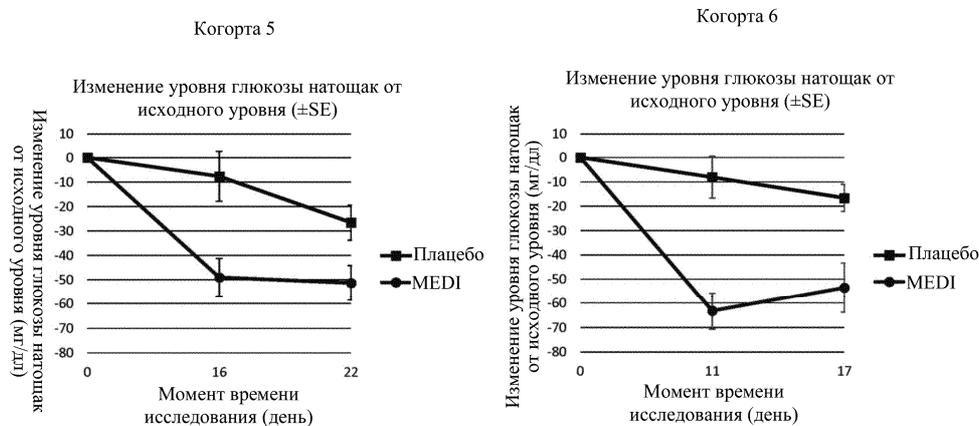
Фиг. 25



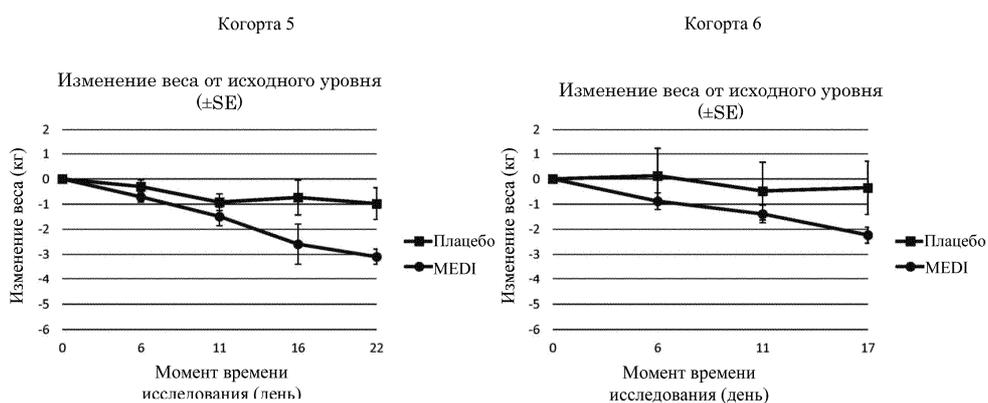
Фиг. 26



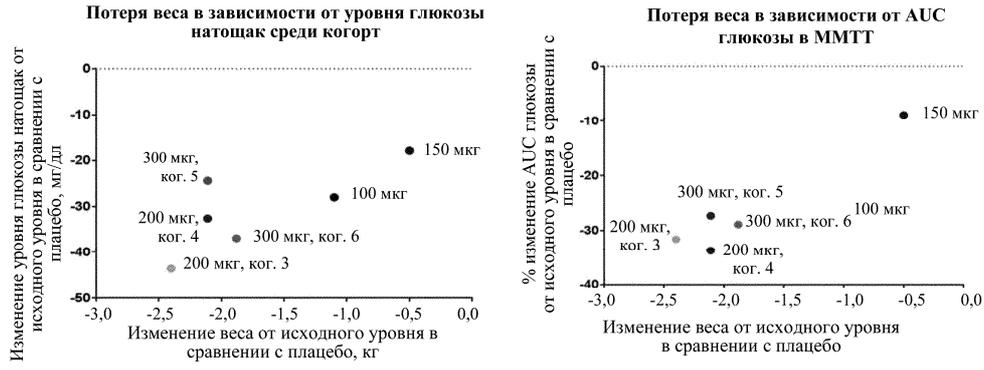
Фиг. 27



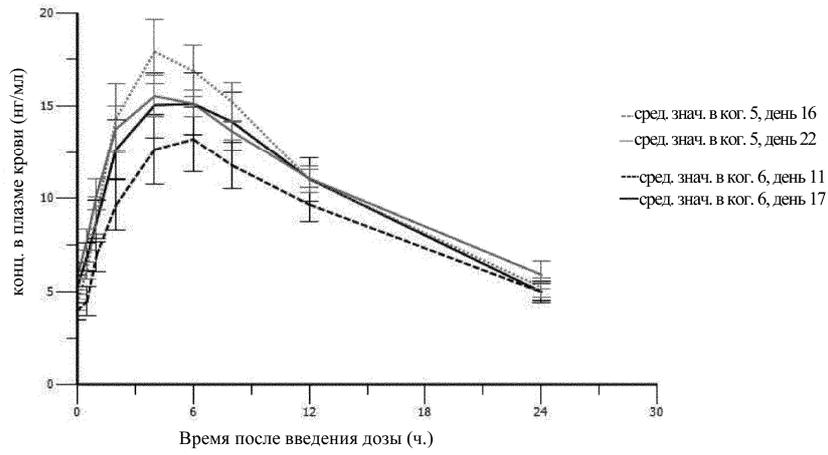
Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31

