

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043950**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.07.10

(21) Номер заявки

202091290

(22) Дата подачи заявки

2018.12.14(51) Int. Cl. **A61K 38/26** (2006.01)**C07K 14/605** (2006.01)**A61P 3/00** (2006.01)**(54) АНАЛОГИ ИНКРЕТИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**(31) **62/608,613**(32) **2017.12.21**(33) **US**(43) **2020.09.10**(86) **PCT/US2018/065663**(87) **WO 2019/125938 2019.06.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

**Алсина-Фернандес Хорхе, Коскун
Тамер, Гуо Лили, Цюй Хунчан (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Угрюмов В.М., Христофоров А.А. (RU)**(56) **WO-A1-2015067716**

PIA K. NØRREGAARD ET AL.: "A novel GIP analogue, ZP4165, enhances glucagon-like peptide-1-induced body weight loss and improves glycaemic control in rodents", *DIABETES, OBESITY AND METABOLISM*, vol. 20, № 1, 9 June 2017 (2017-06-09), p. 60-68, XP055568531, ISSN: 1462-8902, DOI: 10.1111/dom.13034, the whole document, compound ZP4165

Anonymous: "BACHEM - Peptide Trends October 2017", 1 October 2017 (2017-10-01), XP055568606, retrieved from the Internet:

URL: <http://www.bachem.com/service-support/new-letter/peptide-trends-october-2017/> [retrieved on 2019-03-13], the whole document, table 3, compound LY3298176

WO-A2-2015067715

JENSEN LENE ET AL.: "Absorption, metabolism and excretion of the GLP-1 analogue semaglutide in humans and nonclinical species", *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 104, 16 March 2017 (2017-03-16), p. 31-41, XP085093781, ISSN: 0928-0987, DOI: 10.1016/J.EJPS.2017.03.020, the whole document

TAMER COSKUN ET AL.: "LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: From discovery to clinical proof of concept", *MOLECULAR METABOLISM*, vol. 18, 3 October 2018 (2018-10-03), p. 3-14, XP055567725, ISSN: 2212-8778, DOI: 10.1016/j.molmet.2018.09.009, the whole document

JUAN PABLO FRIAS ET AL.: "Efficacy and safety of LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist, in patients with type 2 diabetes: a randomised, placebo-controlled and active comparator-controlled phase 2 trial", *LANCET*, vol. 392, № 10160, 4 October 2018 (2018-10-04), p. 2180-2193, XP055567738, AMSTERDAM, NL, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32260-8, the whole document

(57) Предлагаются аналоги инкретина, которые обладают активностью в отношении каждого из рецепторов: GIP рецептора, GLP-1 рецептора и рецептора глюкагона. Указанные аналоги инкретина имеют структурные особенности, приводящие к сбалансированной активности и увеличенной продолжительности действия на каждый из этих рецепторов. Также предлагаются способы лечения таких заболеваний, как сахарный диабет, дислипидемия, жировая болезнь печени, метаболический синдром, неалкогольный стеатогепатит и ожирение.

B1**043950****043950****B1**

Изобретение относится к аналогам инкретина, обладающим активностью в отношении каждого из следующих рецепторов: рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP - glucose-dependent insulintropic polypeptide), рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1 - glucagon-like peptide-1) и рецептора глюкагона. Описанные в данном документе аналоги инкретина имеют структурные характеристики, которые обеспечивают сбалансированную активность и обладают увеличенной продолжительностью действия на каждый из этих рецепторов. Такие аналоги инкретина могут быть пригодны для лечения нарушений, таких как сахарный диабет 2 типа (СД₂), дислипидемия, метаболический синдром, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) и/или ожирение.

За последние несколько десятилетий распространенность диабета продолжает расти. СД₂ является наиболее распространенной формой диабета, составляющей около 90% всех форм диабета. СД₂ характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, вызванным резистентностью к инсулину. Существующий стандарт лечения СД₂ включает диету и физические упражнения, а также лечение пероральными лекарственными средствами и инъекционными препаратами, снижающими уровень глюкозы, включая препараты на основе инкретина, такие как агонисты рецептора GLP-1.

GLP-1 представляет собой пептид из 36 аминокислот, основной биологически активный фрагмент которого продуцируется в виде С-концевого амидированного пептида из 30 аминокислот (GLP-1₇₋₃₆; SEQ ID NO: 2), который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и предотвращает гипергликемию у пациентов с диабетом. В настоящее время доступны различные аналоги GLP-1 для лечения СД₂, включая дулаглутид, экзенатид и лираглутид. Однако многие продаваемые в настоящее время агонисты рецептора GLP-1 являются дозоограниченными из-за побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, таких как тошнота и рвота. Когда лечение пероральными лекарственными средствами и препаратами на основе инкретина является недостаточным, рассматривается возможность применения инсулина. Несмотря на доступные варианты лечения значительное число пациентов, получающих одобренную терапию, не достигают целей относительно гликемического контроля (см., например, Casagrande et al. (2013), *Diabetes Care*, 36:2271-2279).

Неконтролируемый диабет может привести к одному или большему количеству состояний, которые влияют на заболеваемость и смертность таких индивидуумов. Одним из основных факторов риска развития СД₂ является ожирение, и большинство индивидуумов с СД₂ (~90%) имеют избыточный вес или ожирение. Задokumentировано, что снижение степени ожирения организма благоприятно влияет на ассоциированные с ожирением сопутствующие заболевания, включая гипергликемию и осложнения со стороны сердечнососудистой системы. Таким образом, для оптимизации лечебной тактики необходима терапия, являющаяся эффективной для контроля уровня глюкозы и снижения веса.

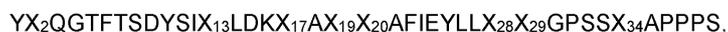
Ввиду этого новые изучаемые методы лечения включают соединения, обладающие не только активностью в отношении рецептора GLP-1, но также активностью в отношении одного или большего количества других рецепторов, таких как рецепторы GIP и/или рецепторы глюкагона. Фактически некоторые соединения были описаны как обладающие тройной агонистической активностью (т.е. активностью в отношении каждого из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона). Например, в публикации международной патентной заявки № WO 2015/067716 описаны аналоги глюкагона, обладающие тройной агонистической активностью. Аналогично в международной патентной заявке WO 2016/198624 описаны аналоги эксендина-4, который сам по себе является аналогом GLP-1 и обладает тройной агонистической активностью. Аналогично в международных патентных заявках № WO 2014/049610 и WO 2017/116204 описан ряд аналогов, обладающих тройной агонистической активностью. Кроме того, в международной патентной заявке № WO 2017/153375 описаны ко-агонисты глюкагона и GLP-1, которые также обладают активностью GIP.

Тем не менее остается потребность в разработке способов лечения, особенно при СД₂, которые будут способны обеспечить эффективный контроль за уровнем глюкозы с дополнительным преимуществом, заключающимся в потере веса, и благоприятным профилем побочных эффектов. Также существует потребность в терапевтических агентах, доступных для применения с достаточно увеличенной продолжительностью действия, чтобы получить возможность вводить дозу реже, например один раз в сутки, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

С помощью аналогов инкретина, описанных в данном документе, стремятся удовлетворить потребности, указанные выше. Соответственно в этом документе описаны аналоги инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона. Следовательно, описанные в данном документе аналоги инкретина обеспечивают преимущество, состоящее в сбалансированной активности, позволяющей вводить дозы, которые обеспечивают достаточную активность каждого рецептора для получения пользы от агонизма этого рецептора, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком высокой активностью. Кроме того, описанные в данном документе аналоги инкретина характеризуются увеличенной продолжительностью действия на каждый из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона, что позволяет вводить их дозу реже, например один раз в сутки, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Таким образом, аналоги инкретина приводят к усиленному контролю уровня глюкозы, благоприятным метаболическим эффектам, таким как снижение массы тела и/или

улучшенный композиционный состав тела, благоприятному влиянию на липидный обмен, например снижению уровня пропротеин-конвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9), и/или другим преимуществам, таким как увеличение костной массы или образование костной ткани или уменьшение резорбции кости. В этом документе также описаны эффективные способы лечения других нарушений или патологических состояний, включая ожирение, НАЖБП, НАСГ, дислипидемию и/или нарушение обмена веществ.

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается аналог инкретина, который включает формулу



где X_2 представляет собой Aib,

X_{13} представляет собой L или αMeL ;

X_{17} представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, при этом функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C_{16} - C_{22} ;

X_{19} представляет собой Q или A;

X_{20} представляет собой Aib, αMeK , Q или H;

X_{28} представляет собой E или A;

X_{29} представляет собой G или Aib;

X_{34} представляет собой G или Aib (SEQ ID NO: 5); и

C-концевая аминокислота является необязательно амидированной, или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается способ лечения заболевания, такого как дислипидемия, жировая болезнь печени, метаболический синдром, НАСГ, ожирение и СД2. Такие способы могут включать по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе. В некоторых случаях указанное заболевание представляет собой жировую болезнь печени, ожирение, НАСГ или СД2.

В другом варианте осуществления данного изобретения аналог инкретина, как описано в данном документе, предлагается для применения в терапии. Например, аналог инкретина, как описано в данном документе, предлагается для применения при лечении заболевания, такого как дислипидемия, жировая болезнь печени, метаболический синдром, НАСГ, ожирение и СД2. В некоторых случаях указанное заболевание представляет собой жировую болезнь печени, ожирение, НАСГ или СД2.

В другом варианте осуществления данного изобретения аналог инкретина, как описано в данном документе, предлагается для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения дислипидемии, жировой болезни печени, метаболического синдрома, НАСГ, ожирения и СД2. В некоторых случаях указанное заболевание представляет собой жировую болезнь печени, ожирение, НАСГ или СД2.

В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, которая включает аналог инкретина, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то что любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, можно применять на практике или при тестировании аналогов инкретина, фармацевтических композиций и способов, в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы.

Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более чем одного из элементов, если контекст явным образом не предполагает присутствия одного и только одного из элементов. Соответственно термины в единственном числе обычно означают "по меньшей мере один".

GIP представляет собой пептид из 42 аминокислот (SEQ ID NO: 4) и является инкретином, который играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы путем стимуляции секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы в присутствии глюкозы.

GLP-1 представляет собой пептид из 36 аминокислот (SEQ ID NO: 2), а также является инкретином, который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и который, как было продемонстрировано, предотвращает гипергликемию у пациентов с диабетом.

Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот (SEQ ID NO: 1), который помогает поддерживать уровень глюкозы в крови, связываясь и активируя рецепторы глюкагона на гепатоцитах, стимулируя печень высвобождать глюкозу, хранящуюся в форме гликогена, посредством процесса, называемого гликогенолизом.

Оксинтомодулин (ОХМ) представляет собой пептид из 37 аминокислот, включающий не только последовательность из 29 аминокислот глюкагона, но также удлинение карбоксиконцевого конца октапептида (SEQ ID NO: 3), которое активирует рецепторы как глюкагона, так и GLP-1, с несколько более высокой активностью по отношению к рецептору глюкагона по сравнению с рецептором GLP-1.

В дополнение к СД2, инкретины и их аналоги, обладающие активностью в отношении одного или большего количества рецепторов: GIP, GLP-1 и/или глюкагона, были описаны как обладающие потенциалом для терапевтической ценности при ряде других патологических состояний, заболеваний или нарушений, включая например, ожирение, НАЖБП и НАСГ, дислипидемию, метаболический синдром, нарушения, связанные с костной тканью, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. См., например, Jall et al. (2017), *Mol. Metab.*, 6:440-446; Carbone et al. (2016), *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 31:23-31; Finan et al. (2016), *Trends Mol. Med.*, 22:359-376; Choi et al. (2017), Potent body weight loss and efficacy in a NASH animal model by a novel long-acting GLP-1/Glucagon/GIP triple-agonist (HM15211), ADA Poster 1139-P; Ding (2008), *J. Bone Miner. Res.*, 23:536-543; Tai et al. (2018), *Brain Res.*, 1678:64-74; Müller et al. (2017), *Physiol. Rev.*, 97:721-766; Finan et al. (2013), *Sci. Transl. Med.*, 5:209; Hölscher (2014), *Biochem. Soc. Trans.*, 42:593-600.

В данном контексте термин "около" означает показатель в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, заявленная концентрация, длина, молекулярная масса, pH, идентичность последовательности, временные рамки, температура или объем. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином "около", будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

В контексте данного документа и в отношении одного или большего количества рецепторов: GIP, GLP-1 или глюкагона, термин "активность", "активировать", "активирующий" и т.п. означает активность соединения, например, описанных в данном документе аналогов инкретина, относительно связывания и индукции ответа у рецептора(ов), что измеряется с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

В данном контексте термин "аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации" означает любую природную или не природную аминокислоту с функциональной группой, которая может быть конъюгирована с жирной кислотой посредством, например, линкера. Примеры таких функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, алкинильную, алкенильную, амино-, азидо-, бром-, карбоксильную, хлорную, йодную и тиольную группы. Примеры природных аминокислот, содержащих такие функциональные группы, включают К (амино), С (тиол), Е (карбоксил) и D (карбоксил).

В данном контексте термин "жирная кислота C₁₆-C₂₂" означает карбоновую кислоту, имеющую от 16 до 22 атомов углерода. Жирная кислота C₁₆-C₂₂, пригодная для применения по данному изобретению, может быть насыщенной монокислотой или насыщенной дикислотой. В данном контексте термин "насыщенная" означает, что жирная кислота не содержит углерод-углеродных двойных или тройных связей.

В данном контексте термин "эффективное количество" означает количество, концентрацию или дозу одного или большего количества аналогов инкретина, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемую соль, которая при введении одной или большего количества доз индивидууму, нуждающемуся в этом, обеспечивает желаемый эффект в такого индивидуума в условиях диагностики или лечения. Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники с помощью известных методов и путем наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для индивидуума рассматривается ряд факторов, включая, но не ограничиваясь этим вид млекопитающего; его размер, возраст и общее состояние здоровья; специфическое заболевание или нарушение; степень, или вовлечение, или тяжесть заболевания или нарушения; реакция отдельного пациента; определенный введенный аналог инкретина; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему введения; применение сопутствующих медикаментов; и другие соответствующие обстоятельства.

В данном контексте термин "увеличенная продолжительность действия" означает, что аффинность связывания и активность аналога инкретина сохраняется в течение периода времени, превышающего нативные пептиды GIP, GLP-1 и глюкагона человека, что позволяет вводить дозу реже, например один раз в сутки, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Профиль временного действия аналога инкретина можно измерить с помощью известных методов фармакокинетических анализов, таких как те, которые применяются в приведенных ниже примерах.

В данном контексте термин "аналог инкретина" означает соединение, имеющее структурное сходство с GIP, GLP-1 и глюкагоном, но с множественными отличиями от каждого из элементов: GIP, GLP-1 и глюкагона, особенно GIP (SEQ ID NO: 4), GLP-1 (SEQ ID NO: 2) и глюкагона (SEQ ID NO: 1) человека. Аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают аминокислотные последовательности, приводящие к соединениям, обладающим аффинностью и активностью в отношении каждого из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона (т.е. обладающие тройной агонистической активностью).

В данном контексте термин "индивидуум, нуждающийся в этом" означает млекопитающее, например человека, имеющего патологическое состояние, заболевание, нарушение или симптом, требующий лечения или терапии, включая, например, перечисленные в данном документе.

В данном контексте термин "лечить", "лечение", "воздействовать" и т.п. означает сдерживание, замедление, остановку или изменение прогрессирования или тяжести существующего патологического состояния, заболевания, нарушения или симптома.

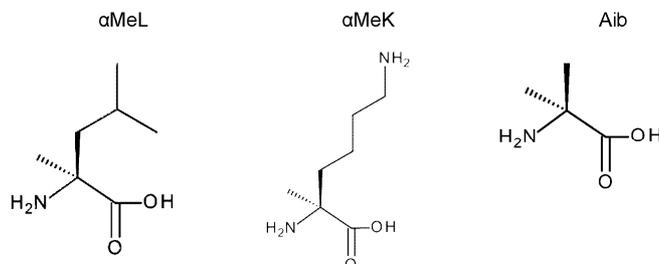
В контексте данного документа и в отношении аналога инкретина "тройная агонистическая активность" относится к аналогу инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона, особенно аналогу, обладающему сбалансированной и достаточной активностью в отношении каждого рецептора для получения пользы от агонизма этого рецептора, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком высокой активностью. Кроме того, аналоги инкретина, обладающие тройной агонистической активностью, имеют увеличенную продолжительность действия на каждый из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона, что придает им преимущество, позволяющее вводить дозу реже, например один раз в сутки, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

Структурные особенности аналогов инкретина, описанных в данном документе, приводят к тому, что аналоги обладают достаточной активностью в отношении каждого из рецепторов: GIP, GLP-1 и глюкагона, с получением благоприятных эффектов активности в отношении каждого рецептора (т.е. тройной агонистической активности), но не обладают такой степенью активности в отношении какого-либо одного рецептора, чтобы либо подавлять активность двух других рецепторов, либо приводить к нежелательным побочным эффектам при введении в дозе, достаточной, чтобы быть активными в отношении всех трех рецепторов. Неограничивающие примеры таких структурных особенностей в определенных вариантах осуществления данного изобретения и со ссылкой на SEQ ID NO: 5 включают L или α MeL в положении 13, которые, как было обнаружено, способствуют оптимальной активности глюкагона и GIP; Aib в положении 20, который, как было обнаружено, способствует оптимальной активности GIP; ацилирование в положении 17, которое, как было обнаружено, способствует оптимальной активности глюкагона; и Y в положении 25, который, как было обнаружено, способствует оптимальной активности глюкагона и/или GIP. Другие примеры таких структурных особенностей включают аминокислоты, описанные в данном документе в положениях 22, 24 и 28-39, которые, как было обнаружено, способствуют оптимальному связыванию и эффективности всех трех рецепторов.

Структурные особенности аналогов инкретина, описанных в данном документе, также приводят к тому, что аналоги имеют много других полезных свойств, относящихся к возможности их применения в качестве терапевтического лечения, в том числе для улучшения растворимости аналогов в водных растворах, улучшения стабильности химического и физического состава, расширения фармакокинетического профиля и минимизации потенциала для иммуногенности. Неограничивающие примеры конкретных структурных особенностей, которые приводят к таким признакам, включают ацилирование в положении 17 жирной кислотой C20, которое способствует оптимальным фармакокинетическим (ФК) профилям и проявляемости; Aib, α MeK, Q или H в положении 20, которые способствуют оптимальным профилям ФК и проявляемости; и положения аминокислот 22, 24 и 28-39, которые способствуют оптимальной ФК, иммуногенности, проявляемости и стабильности.

Следует отметить, что вышеприведенные перечни структурных особенностей являются типовыми, а не исчерпывающими, и что комбинация полезных характеристик типовых аналогов, описанных в данном документе, не является результатом какой-либо модификации в отдельности, а наоборот достигается с помощью новых комбинаций структурных особенностей, описанных в данном документе. Кроме того, вышеописанные эффекты вышеприведенных перечней модификаций не являются специфическими, так как многие из этих модификаций также имеют другие эффекты, важные для характеристик описанных в данном документе соединений, как описано ниже.

Аминокислотные последовательности аналогов инкретина, описанные в данном документе, включают встречающиеся в природе аминокислоты, обычно изображенные в данном документе с использованием стандартных однобуквенных кодов (например, L=лейцин), а также альфа-метилзамещенные остатки природных аминокислот (например, α -метиллейцин (α MeL) и α -метиллизин (α MeK)) и некоторые другие не природные аминокислоты, такие как альфа-аминоизомасляная кислота (Aib). Структуры этих аминокислот изображены ниже.



Как отмечено выше, описанные в данном документе аналоги инкретина имеют структурные сходства с любым из нативных пептидов человека, но имеют много структурных отличий. Например, при сравнении с нативным GIP человека (SEQ ID NO: 4) аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают модификации в одном или большем количестве положений: 2, 3, 7, 13, 14, 17, 18-21, 23-25, 28-29 и 30-42. В некоторых случаях описанные в данном документе аналоги инкретина включают модификации аминокислот нативного GIP человека (SEQ ID NO: 4) в каждом из положений 2, 3, 7, 13, 14, 17, 18,

20, 21, 23-25, 29 и 30-42. В некоторых случаях описанные в данном документе аналоги инкретина включают следующие модификации аминокислот: Aib в положении 2; Q в положении 3; T в положении 7; L или αMeL в положении 13; L в положении 14; модифицированный остаток K в положении 17, который модифицирован путем конъюгирования с ε-аминогруппой K-боковой цепи с жирной кислотой C₁₆-C₂₂ необязательно с помощью линкера; A в положении 18; A в положении 21; I в положении 23; E в положении 24; Y в положении 25; G или Aib в положении 29; и замену аминокислот в положениях 30-42 аминокислотной последовательностью, выбранной из GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 26) и GPSS-Aib-APPPS (SEQ ID NO: 27) (и укороченные аналоги хвоста). В других случаях описанные в данном документе аналоги инкретина также включают модификации в одном или большем количестве элементов: A в положении 19; αMeK, Aib или H в положении 20; и E в положении 28. В некоторых случаях описанные в данном документе аналоги инкретина являются амидированными. В дополнение к изменениям, описанным в данном документе, аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут включать одну или большее количество дополнительных модификаций аминокислот при условии, что аналоги остаются способными связываться и активировать каждый из рецепторов: GIP, GLP-1 и рецептор глюкагона.

Как отмечено выше, аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают фрагмент жирной кислоты, конъюгированный, например, посредством линкера с природной или не природной аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации. Такую конъюгацию иногда называют ацилированием. В некоторых случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, может представлять собой K, C, E и D. В конкретных случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, представляет собой K, при этом конъюгация происходит с ε-амино группой K боковой цепи.

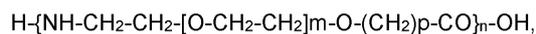
Ацилирование аналогов инкретина, описанных в данном документе, происходит в положении 17 в SEQ ID NO: 5, которое было определено как оптимальное место для включения этой структуры. Жирная кислота и в некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкер действуют как связывающие агенты альбумина и обеспечивают потенциал для образования соединений с длительным действием.

В описанных в данном документе аналогах инкретина используется жирная кислота C₁₆-C₂₂, химически конъюгированная с функциональной группой аминокислоты либо посредством прямой связи, либо с помощью линкера. Длина и состав жирных кислот влияет на период полураспада аналогов инкретина, их эффективность в моделях на животных *in vivo*, а также на их растворимость и стабильность. Конъюгирование с насыщенной жирной моноокислотой или дикислотой C₁₆-C₂₂ приводит к получению аналогов инкретина, которые демонстрируют желательный период полураспада, желательную активность в моделях на животных *in vivo* и желательные характеристики растворимости и стабильности.

Примеры насыщенных жирных кислот C₁₆-C₂₂ для применения в данном документе включают, но не ограничиваются ими, пальмитиновую кислоту (гексадекановую кислоту) (моноокислоту C₁₆), гексадекандионовую кислоту (дикислоту C₁₆), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту) (моноокислоту C₁₇), гептадекандионовую кислоту (дикислоту C₁₇), стеариновую кислоту (моноокислоту C₁₈), октадекандионовую кислоту (дикислоту C₁₈), нонадециловую кислоту (неадекановую кислоту) (моноокислоту C₁₉), неадекандиевую кислоту (дикислоту C₁₉), арахадиновую кислоту (эйкозановую кислоту) (моноокислоту C₂₀), эйкозаноидиевую кислоту (дикислоту C₂₀), генэйкозилловую кислоту (генэйкозановую кислоту) (моноокислоту C₂₁), генэйкозаноидиевую кислоту (дикислоту C₂₁), бегеновую кислоту (докозановую кислоту) (моноокислоту C₂₂), докозаноидиевую кислоту (дикислоту C₂₂), включая их разветвленные и замещенные производные.

В некоторых случаях жирная кислота C₁₆-C₂₂ может представлять собой насыщенную моноокислоту C₁₈, насыщенную дикислоту C₁₈, насыщенную моноокислоту C₁₉, насыщенную дикислоту C₁₉, насыщенную моноокислоту C₂₀, насыщенный дикислоту C₂₀ и их разветвленные и замещенные производные. В более конкретных случаях, жирной кислотой C₁₆-C₂₂ может быть стеариновая кислота, арахадиновая кислота и эйкозандиевая кислота, особенно арахадиновая кислота.

В некоторых случаях линкер может содержать от одной до четырех аминокислот, аминополитиленгликолькарбоксилат или их смеси. В некоторых случаях аминополитиленгликолькарбоксилат имеет следующую структуру:



где m представляет собой любое целое число от 1 до 12,

n представляет собой любое целое число от 1 до 12, а

p равно 1 или 2.

В некоторых случаях линкер может иметь один или большее количество фрагментов (2-[2-(2-амино-этоксид)этоксид]ацетил) необязательно в комбинации с одной-четырьмя аминокислотами.

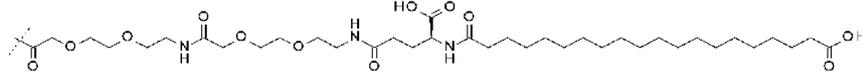
В тех случаях, когда линкер включает по меньшей мере одну аминокислоту, указанная аминокислота может представлять собой от одного до четырех аминокислотных остатков Glu или γGlu. В некоторых случаях линкер может включать один или два аминокислотных остатка Glu или γGlu, включая их D-формы. Например, линкер может включать один или два аминокислотных остатка γGlu. В альтернативном варианте линкер может включать от одного до четырех аминокислотных остатков (таких как, например, аминокислоты Glu или γGlu), применяемых в комбинации с вплоть до тридцати шести фраг-

ментами (2-[2-(2-амино-этокси)этокси]ацетил). В частности, линкер может представлять собой комбинации от одной до четырех аминокислот Glu или γ Glu и от одного до четырех фрагментов (2-[2-(2-амино-этокси)этокси]ацетил). В других случаях линкер может представлять собой комбинации одной или двух аминокислот γ Glu и одного или двух фрагментов (2-[2-(2-амино-этокси)этокси]ацетил).

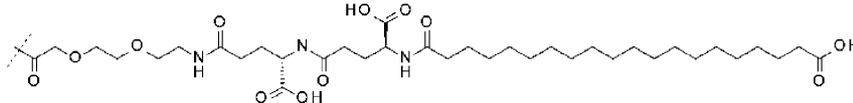
В конкретном случае аналоги инкретина, описанные в данном документе, содержат линкер и компоненты жирных кислот, имеющие структуру следующей формулы:



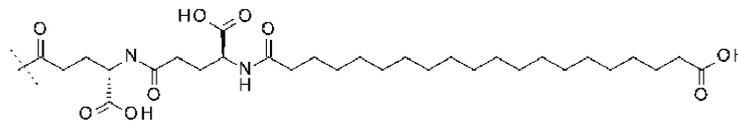
где a равно 0, 1 или 2, b равно 1 или 2 и c равно 16 или 18. В конкретном случае a равно 2, b равно 1 и c равно 18, структура которого изображена ниже.



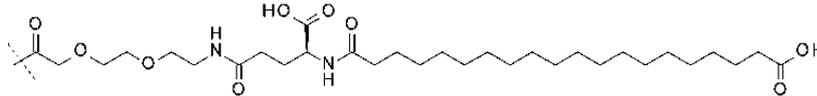
В другом конкретном случае a равно 1, b равно 2 и c равно 18, структура которого изображена ниже.



В другом конкретном случае a равно 0, b равно 2 и c равно 18, структура которого изображена ниже.



В другом конкретном случае a равно 1, b равно 1 и c равно 18, структура которого изображена ниже.



Как показано в химических структурах примеров 1-20 ниже, фрагменты линкер-жирная кислота, описанные выше, могут быть связаны с эpsilon (ϵ)-аминогруппой боковой цепи лизина (K).

Аффинность аналогов инкретина, описанных в данном документе, к каждому из рецепторов: GIP, GLP-1 и рецептору глюкагона может быть измерена с помощью методик, известных в данной области техники, для измерения уровней связывания с рецептором, включая, например, методики, описанные в приведенных ниже примерах, и обычно выражается в виде величины ингибирующей константы (K_i). Активность аналогов инкретина, описанных в данном документе, для каждого из рецепторов также может быть измерена с помощью методик, известных в данной области техники, включая, например, анализы активности *in vitro*, описанные ниже, и обычно выражается в виде величины эффективной концентрации 50 (EC_{50}), которая представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальное моделирование на кривой доза-эффект.

Описанные в данном документе аналоги инкретина могут быть составлены в виде фармацевтических композиций, которые можно вводить парентеральным путем (например, подкожным, внутривенным, внутривнутренним, внутримышечным или трансдермальным). Такие фармацевтические композиции и способы их приготовления хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington: the Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, editor, 21st edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В отдельных случаях аналоги инкретина вводят подкожно.

Описанные в данном документе аналоги инкретина могут реагировать с любой(ым) из ряда неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей при соединении кислот/оснований. Фармацевтически приемлемые соли и обычные способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Stahl et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd revised edition (Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для применения в данном изобретении включают соли натрия, трифторацетаты, гидрохлориды и/или ацетаты.

В данном изобретении также предлагаются и, следовательно, охватываются новые промежуточные соединения и способы синтеза аналогов инкретина, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей. Промежуточные соединения и аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. Например, в приведенных ниже примерах иллюстрируется способ с применением химического синтеза. Конкретные этапы синтеза для каждого из описанных путей могут комбинироваться различными способами для получения аналогов инкретина, описанных в данном документе. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалисту в данной области техники.

Определенные аналоги инкретина, описанные в данном документе, как правило, являются эффективными в широком диапазоне доз. Например, дозы для введения один раз в неделю могут находиться в диапазоне от около 0,01 мг/чел/нед до около 30 мг/чел/нед, в диапазоне от около 0,1 мг/чел/нед до около 10 мг/чел/нед или даже в диапазоне от около 0,1 мг/чел/нед до около 3 мг/чел/нед. Таким образом, аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно вводить ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю или раз в неделю, в частности один раз в неделю.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно применять для лечения различных патологических состояний, нарушений, заболеваний или симптомов. В частности, предлагаются способы лечения СД2 у индивидуума, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предлагаются способы лечения ожирения у индивидуума, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предлагаются способы индуцирования нетерапевтической потери веса у индивидуума, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предлагаются способы лечения метаболического синдрома у индивидуума, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предлагаются способы лечения НАСГ у индивидуума, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предлагаются способы лечения НЖБП у индивидуума, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

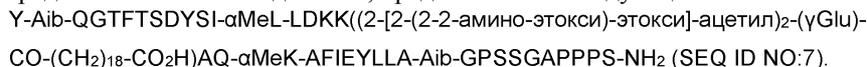
В этих способах эффективность аналогов инкретина можно оценить, например, наблюдая значительное снижение уровня глюкозы в крови, наблюдая значительное повышение уровня инсулина, наблюдая значительное снижение HbA1c и/или наблюдая значительное снижение массы тела.

В альтернативном варианте, описанные в данном документе аналоги инкретина или их фармацевтически приемлемые соли могут применяться для улучшения прочности кости у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых случаях индивидуум, нуждающийся в этом, имеет гипоостоз или гипоостеодоз или получает лечение по поводу перелома кости, подвергается ортопедическим процедурам, протезированию, зубной имплантации и/или спондилодезу. Аналоги инкретина, описанные в данном документе, также можно применять для лечения других нарушений, таких как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера.

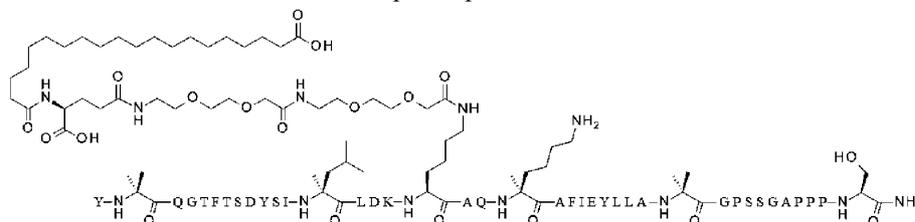
Синтез пептидов.

Пример 1.

Пример 1 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:



Ниже приведено описание структуры соединения по примеру 1 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, α MeL13, K17, α MeK20 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Пептидный каркас соединения по примеру 1 синтезировали с применением химии флуорениметилоксикарбонила (Fmoc)/трет-бутила (t-Bu) на 12-канальном синтезаторе пептидов Sympony Multiplex (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

Смола состоит из 1% сшитого полистирола DVB (смола низкой нагрузки Fmoc-Rink-MBHA, 100-200 меш, EMD Millipore) с замещением 0,3-0,4 экв/г. Применяли стандартные защитные группы боковых цепей. Fmoc-Lys(Mtt)-OH применяли для лизина в положении 17, а Boc-Tyr(tBu)-OH применяли для тирозина в положении 1. Группы Fmoc удаляли перед каждым этапом сочетания (2×7 мин), ис-

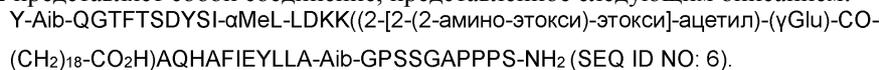
пользуя 20% пиперидин в ДМФА. Все стандартные сочетания аминокислот проводили в течение 1 ч с первичным амином и в течение 3 ч - со вторичным амином с применением равного молярного соотношения аминокислоты Fmoc (0,3 мМ), диизопропилкарбодиимида (0,9 мМ) и Охута (0,9 мМ) при 9-кратном молярном избытке по сравнению с теоретической пептидной нагрузкой. Исключением являлись сочетания с C α -метилированными аминокислотами, сочетания с которыми проводили в течение 3 ч. После завершения синтеза пептидного каркаса смолу 6 раз тщательно промывали дихлорметаном (ДХМ) для удаления остаточного ДМФА. Защитную группу Mtt на лизине в положении 17 селективно удаляли из пептидной смолы с помощью двух обработок 30% гексафторизопропанолом (Oakwood Chemicals) в ДХМ (2×40-минутная обработка).

Последующее присоединение фрагмента жирная кислота-линкер осуществляли путем сочетания 2-[2-(2-Fmoc-амино-этокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH, ChemPer, Inc.), α -трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), моно-OtBu-эйкозаноидиевой кислоты (WuXi AppTec, Shanghai, China). 3-кратный избыток реагентов (AA: PyAOP: DIPEA=1:1:1 моль/моль) применяли для каждого сочетания, которое длилось в течение 1 ч.

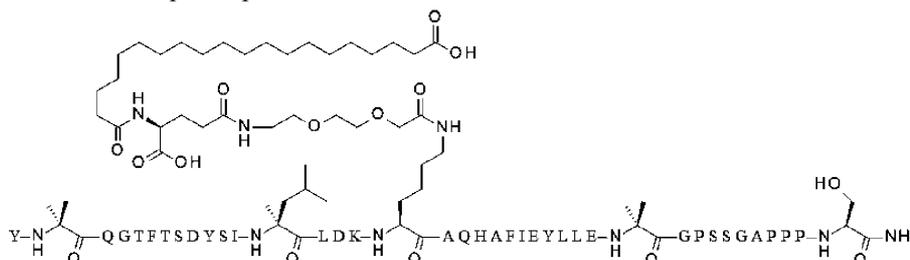
После завершения синтеза пептидную смолу промывали ДЭМ и затем тщательно высушивали на воздухе. Сухую смолу обрабатывали 10 мл коктейля для расщепления (трифторуксусная кислота:вода:триизопропилсилан, 95:2,5:2,5 об/об) в течение 2 ч при комнатной температуре. Смолу фильтровали, дважды промывали чистой трифторуксусной кислотой (ТФУК) и объединенные фильтраты обрабатывали холодным диэтиловым эфиром (-20°C) для осаждения неочищенного пептида. Затем пептидно/эфирную суспензию центрифугировали при 3500 об/мин с образованием твердого осадка, сцеживали супернатант, а твердый осадок растирали с эфиром два (2) дополнительных раза и сушили в вакууме. Неочищенный пептид растворяли в 20% ацетонитрила/20% уксусной кислоты/60% воды и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ на препаративной колонке Luna 5 мкм с фенилгексилем (21×250 мм, Phenomenex) с линейными градиентами 100% ацетонитрила и буферной системой 0,1% ТФУК/вода (30-50% ацетонитрила в течение 60 мин). Чистоту пептида оценивали с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, а критерии объединения составлял >95%. Обнаружено, что чистота основного пула в примере 1 составляет 98,8%. В результате последующей лиофилизации конечного основного пула продуктов получали лиофилизированную ТФУ соль пептида. Молекулярную массу определяли методом ЖХ-МС (набл: M+4H+/4 = 1226,8; расч: M+4H+/4=1226,9).

Пример 2.

Пример 2 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:



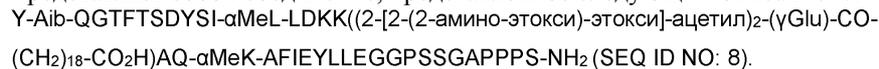
Ниже приведено изображение структуры примера 2 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, α MeL13, K17 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



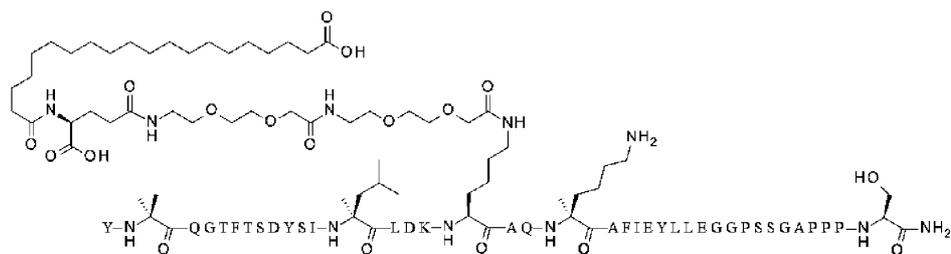
Для синтеза пептидного каркаса для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 2 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 3.

Пример 3 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:



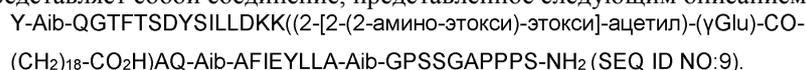
Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 3 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, α MeL13, K17 и α MeK20, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



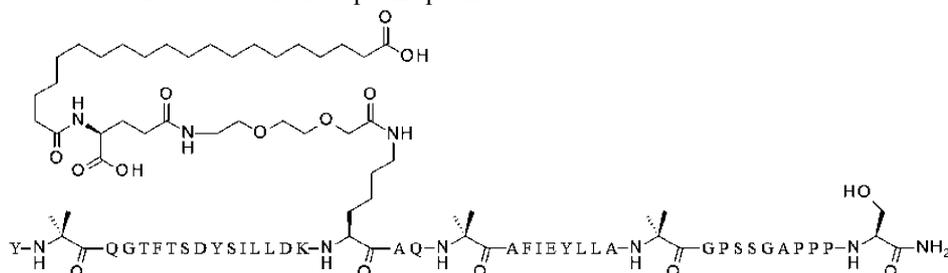
Для синтеза пептидного каркаса для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 3 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 4.

Пример 4 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:



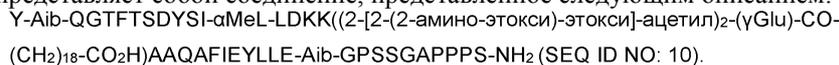
Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 4 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, K17, Aib20 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



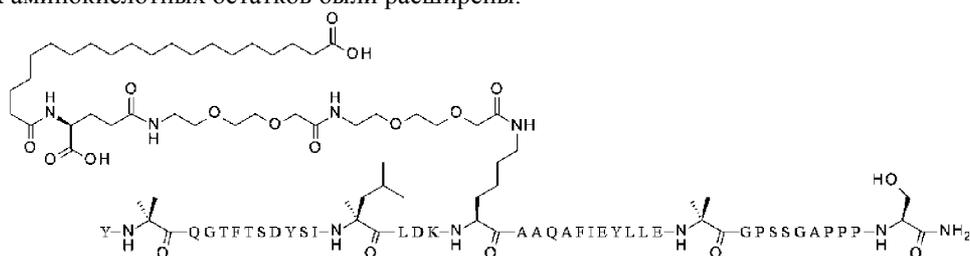
Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 4 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 5.

Пример 5 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:



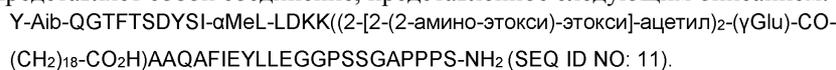
Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 5 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13, K17 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



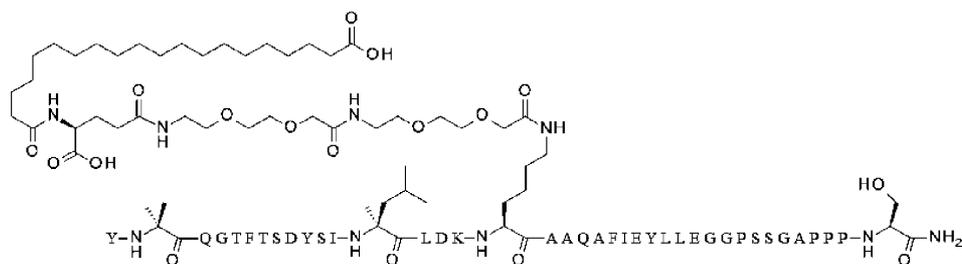
Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 5 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 6.

Пример 6 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:



Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 6 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13 и K17, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 6 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

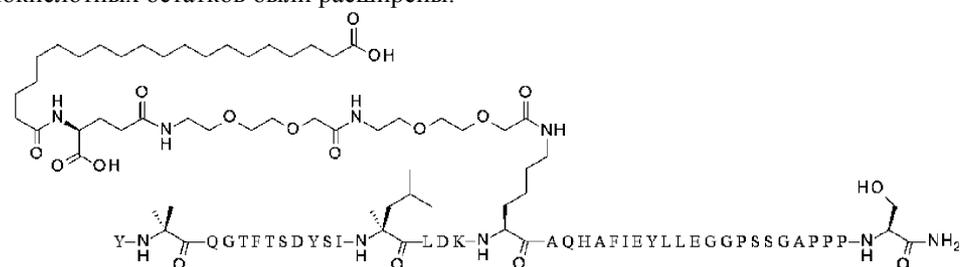
Пример 7.

Пример 7 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)2-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 12).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 7 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13 и K17, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 7 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

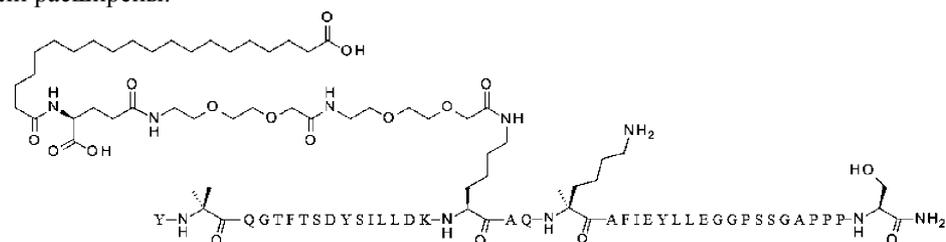
Пример 8.

Пример 8 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)2-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-αMeK-AFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 13).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 8 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов Aib2, K17 и αMeK20, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 8 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

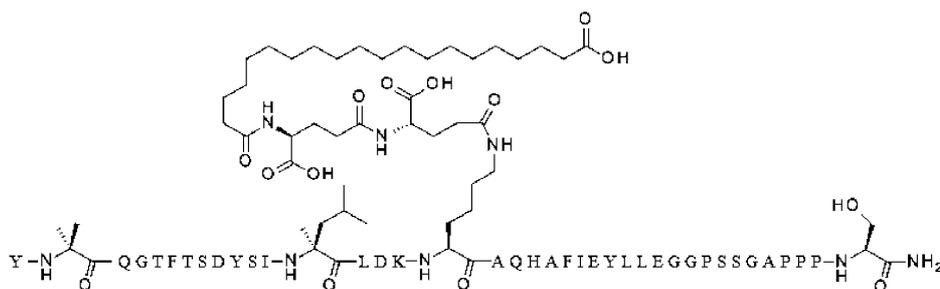
Пример 9.

Пример 9 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-

CO₂H)AQHAFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 14).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 9 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, αMeL13 и K17, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



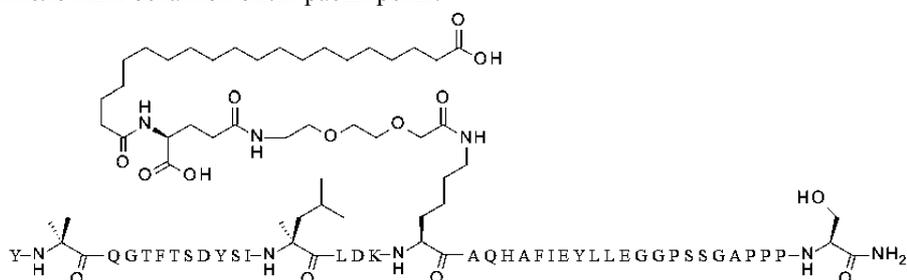
Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 9 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 10.

Пример 10 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 15).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 10 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13 и K17, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



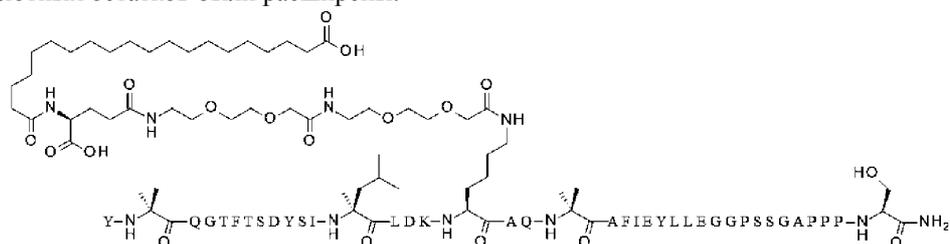
Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 10 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 11.

Пример 11 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 16).

Ниже приведено изображение структуры примера 11 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13, K17 и Aib20, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



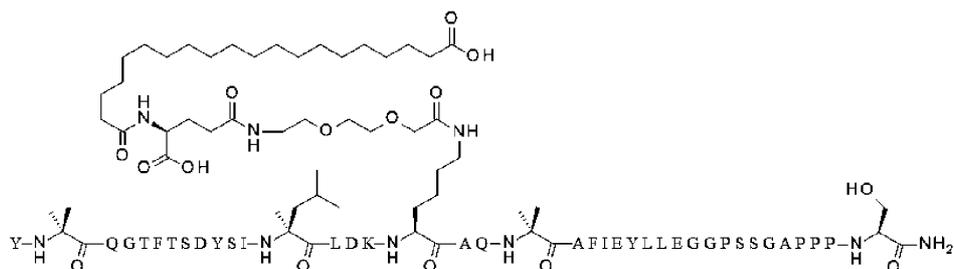
Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 11 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Пример 12.

Пример 12 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 17).

Ниже приведено изображение структуры примера 12 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13, K17 и Aib20, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 12 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

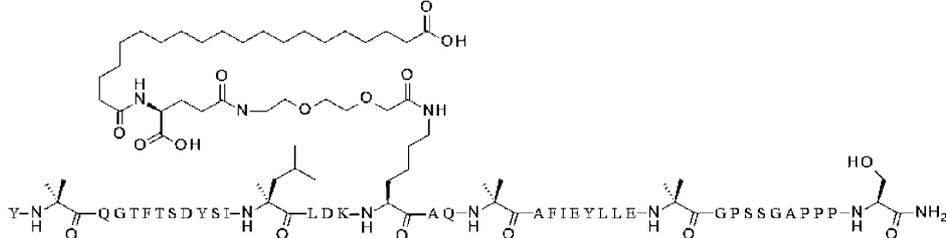
Пример 13.

Пример 13 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 18).

Ниже приведено изображение структуры примера 13 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13, K17, Aib20 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 13 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

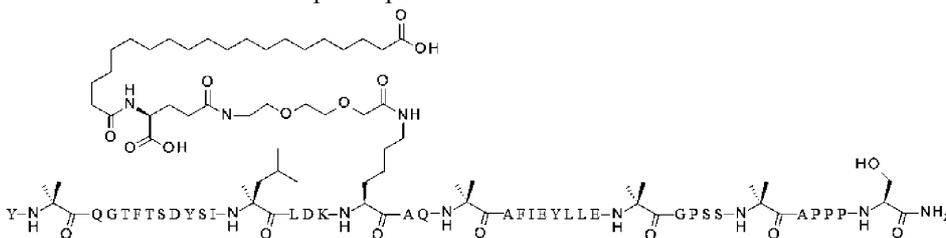
Пример 14.

Пример 14 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSS-Aib-APPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 19).

Ниже приведено изображение структуры примера 14 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, αMeL13, K17, Aib20 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 14 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

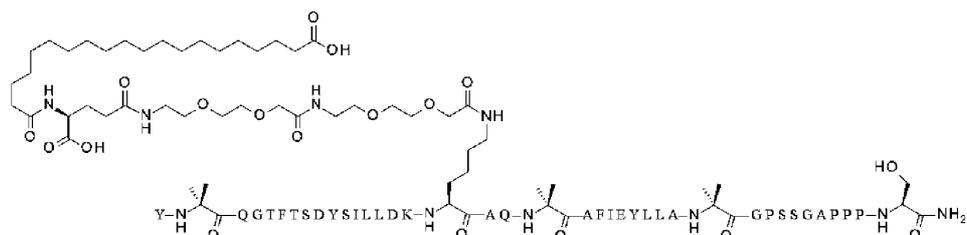
Пример 15.

Пример 15 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLA-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 20).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 15 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, K17, Aib20 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 15 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

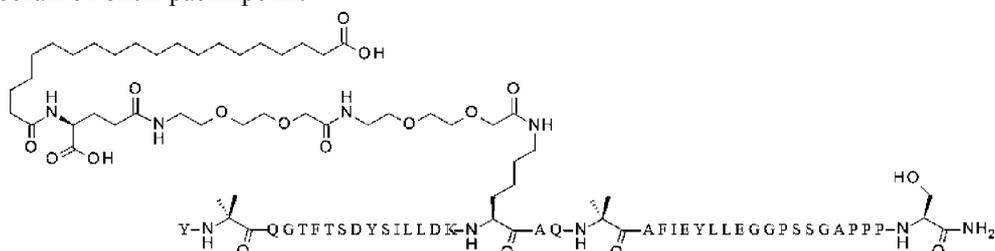
Пример 16.

Пример 16 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 21).

Ниже приведено изображение структуры примера 16 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, K17 и Aib20, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 16 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

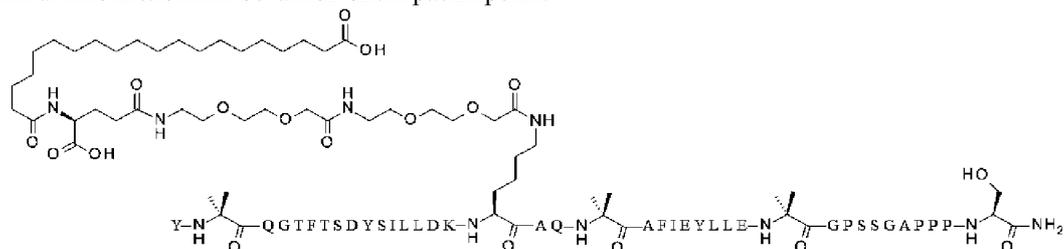
Пример 17.

Пример 17 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 22).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 17 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, K17, Aib20 и Aib29, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 17 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

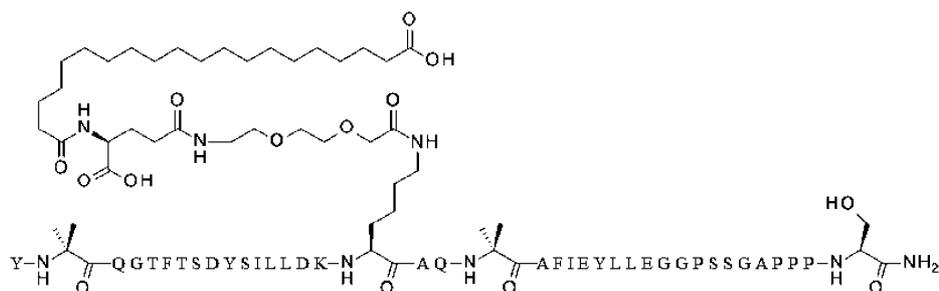
Пример 18.

Пример 18 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 23).

Ниже приведено изображение структуры примера 18 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib2, K17 и Aib20, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 18 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

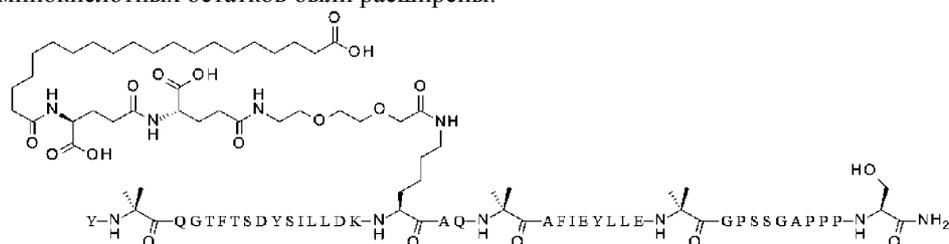
Пример 19.

Пример 19 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)₂-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 24).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 19 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib₂, K17, Aib₂₀ и Aib₂₉, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 19 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

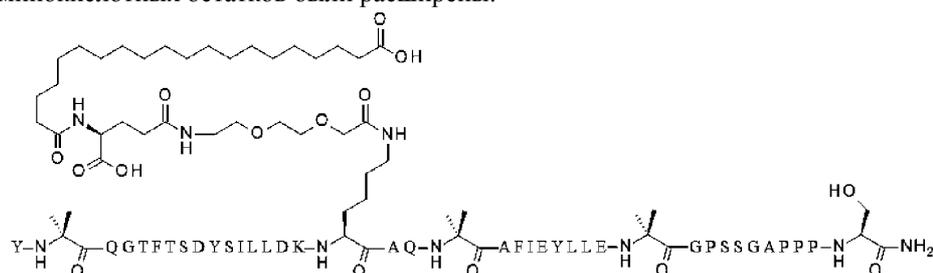
Пример 20.

Пример 20 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 25).

Ниже приведено изображение структуры соединения по примеру 20 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов за исключением остатков Aib₂, K17, Aib₂₀ и Aib₂₉, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Для синтеза пептидного каркаса, для конъюгирования фрагмента жирная кислота-линкер, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы соединения по примеру 20 применяли процессы, аналогичные описанным выше для примера 1.

Функция *in vitro*.

Аффинность связывания.

Анализ конкурентного связывания радиолиганда проводили для определения равновесной константы диссоциации для типовых соединений и молекул-компараторов. В таком анализе применяли методы сцинтилляционного анализа сближения (SPA) и мембраны, полученные из трансфицированных клеток HEK293, сверхэкспрессирующих рецептор GIP человека (GIPR), рецептор GLP-1 (GLP-1R) или рецептор глюкогона человека (GcgR).

Анализ проводили в присутствии бацитрацина в качестве неспецифического блокирующего агента для предотвращения связывания ацилированных фрагментов тестируемых аналогов с белковыми компонентами, применяемыми в стандартных аналитических буферах (например, альбумин).

Кривые конкуренции представлены в виде процента специфического ингибирования (ось y) по отношению к логарифмической концентрации соединения (ось x) и проанализированы с помощью подгонки четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменным наклоном (ABase или Genedata). Значения K_i рассчитывали согласно уравнению

$$K_i = IC_{50} / (1 + (D/K_d))$$

где IC_{50} представляет собой концентрацию соединения, приводящую к 50% ингибированию связывания;

D представляет собой концентрацию радиолиганда, применяемого в анализе; и

K_d представляет собой равновесную константу диссоциации для рецептора и радиолиганда, определенную из анализа связывания насыщения (продемонстрировано в табл. 1 ниже).

Таблица 1
Равновесные константы диссоциации (K_d),
определенные из анализа связывания насыщения

K _d , нМ		
GLP-1R	GcgR	GIPR
1,2	3,9	0,14

Значения K_i типовых аналогов и молекул-компараторов приведены в табл. 2.

Таблица 2
Аффинность связывания *in vitro* (K_i) соединений по
примерам и компараторам для GIPR, GLP-1R и GcgR человека

Молекула	K _i , нМ (SEM, n)		
	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	3,1 (0,5, 4)		
hGIP		0,12 (0,02, 4)	
hGLP-1			1,2 (0,2, 4)
Пример 1	8,41 (2,71, 5)	0,0469 (0,00558, 4/5)	2,64 (0,501, 5)
Пример 2	3,71 (1,49, 2)	0,0665 (0,0377, 2)	4,50 (0,735, 2)
Пример 3	12,0 (2,74, 4)	0,0446 (0,00838, 4)	6,06 (0,849, 4)
Пример 4	2,55 (0,411, 4)	0,0374 (0,0137, 4)	3,54 (0,503, 6)
Пример 5	0,422 (0,0887, 3)	0,179 (0,0466, 3)	36,7 (8,99, 3)
Пример 6	0,835 (0,369, 3)	0,249 (0,0369, 3)	36,7 (10,5, 3)
Пример 7	16,3 (2,37, 5)	0,110 (0,0206, 5)	21,4 (3,53, 5)
Пример 8	30,4 (38,9, 3)	0,0958 (0,0295, 3)	29,4 (29,8, 3)
Пример 9	8,27 (0,855, 4)	0,126 (0,0274, 4)	11,5 (1,85, 4)
Пример 10	7,37 (1,38, 4)	0,118 (0,0363, 4)	12,0 (2,75, 4)
Пример 11	10,8 (1,11, 4)	0,0890 (0,0369, 3/4)	9,97 (1,53, 4)
Пример 12	5,60 (0,796, 4)	0,0570 (0,00322, 4)	7,17 (1,68, 4)
Пример 13	1,91 (0,128, 3)	0,0452 (0,00297, 3)	6,43 (1,89, 5)
Пример 14	2,64 (0,231, 4)	0,0350 (0,00326, 4)	6,27 (1,12, 6)
Пример 15	4,56 (2,68, 2)	0,0972 (n = 1/2)	5,80 (1,80, 3)
Пример 16	11,5 (1,97, 5)	0,106 (0,0182, 5)	16,1 (2,30, 6)
Пример 17	5,81 (0,875, 3)	0,0895 (0,0290, 3)	10,2 (1,74, 3)
Пример 18	5,71 (0,588, 4)	0,0835 (0,0128, 4)	8,06 (2,04, 4)
Пример 19	5,20 (0,572, 3)	0,0789 (0,0261, 3)	12,0 (2,07, 3)
Пример 20	3,76 (0,397, 3)	0,109 (0,0247, 3)	9,23 (2,14, 3)

Примечание.

Квалификатор (>) указывает, что данные не достигли 50%-ного ингибирования относительно максимального связывания, в результате чего K_i рассчитывали с учетом самой высокой концентрации, протестированной в анализе, n=1/x означает, что только одно значение из общего числа повторов (x) применяется для выражения среднего значения. SEM рассчитывали только при наличии n=2 или более некачественных результатов.

Как видно из табл. 2, типовые аналоги обладают аффинностью связывания с рецептором каждого из элементов: GIP, GLP-1 и глюкагона.

Функциональная активность.

Функциональную активность определяли в клональных клеточных линиях НЕК-293, экспрессирующих GIP-R-GLP-1R- и GcgR. Клеточную линию, сверхэкспрессирующую каждый рецептор, обрабатывали пептидом (20-точечный CRC, 2,75-кратное разбавление Labcyte Echo) в DMEM (Gibco Cat # 31053) с добавлением 1X GlutaMAX™ (Gibco Cat # 35050), 0,25% FBS (фетальная бычья сыворотка, Gibco Cat # 26400), 0,05% фракция V BSA (бычий сывороточный альбумин, Gibco Cat # 15260), 250 мкМ IBMX и 20 мМ HEPES (Gibco Cat # 15630) в объеме анализа 20 мкл.

После 60-минутной инкубации при комнатной температуре полученное увеличение внутриклеточного цАМФ количественно определяли с помощью набора для анализа CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Вкратце уровни цАМФ в клетке детектировали путем добавления конъюгата цАМФ-d2 в буфер для лизиса клеток с последующим добавлением антитела анти-цАМФ-Eu³⁺-криптит, также в буфере для лизиса клеток. Полученный конкурентный анализ инкубировали в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре и затем детектировали с помощью прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и излучением при 665 и 620 нм. Единицы измерения Envision (эмиссия при 665/620 нм×10000) являлись обратно пропорциональными количеству присутствующего цАМФ и были преобразованы в нМ цАМФ на лунку с помощью стандартной кривой цАМФ.

Количество вырабатываемого цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразовывали в процент от максимального ответа, наблюдаемого либо с GLP-1(7-36)NH₂ человека, Gcg человека, либо с GIP(1-42)NH₂ человека. Относительное значение EC₅₀ и верхний процент (E_{max}) получали путем нелинейного регрессионного анализа с использованием процентного максимального отклика по отношению к концентрации добавляемого пептида, подогнанного к четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Данные для типовых аналогов и hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂ и hGcg приведены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Функциональная эффективность цАМФ (EC₅₀) для типовых аналогов и компараторов в присутствии FBS и BSA

	цАМФ EC ₅₀ , нМ (SEM, n)		
	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	0,0125 (0,000280014, 112)		
gGIP амид		0,133 (0,0082, 60)	
hGLP-1 амид			0,0591 (0,00091, 113)
Пример 1	2,54 (0,199, n=6)	0,914 (0,0915, 6)	7,49 (1,02, 6)
Пример 2	2,66 (0,175, 5)	2,19 (0,392, 5)	12,8 (2,50, 5)
Пример 3	8,03 (0,997, 6)	1,91 (0,205, 6)	12,9 (1,58, 6)
Пример 4	2,49 (0,371, 7)	1,55 (0,245, 7)	10,4 (1,80, 7)
Пример 5	1,47 (0,171, 6)	4,86 (0,682, 6)	22,3 (3,78, 6)
Пример 6	1,99 (0,201, 6)	7,41 (0,667, 6)	21,2 (2,02, 6)
Пример 7	14,2 (2,24, 6)	4,38 (0,750, 6)	15,5 (2,40, 6)
Пример 8	6,24 (0,673, 6)	2,23 (0,164, 6)	9,39 (0,959, 6)
Пример 9	6,32 (0,290, 4)	4,17 (0,695, 4)	9,76 (1,98, 4)
Пример 10	8,42 (1,17, 4)	4,30 (0,987, 4)	19,3 (1,52, 4)
Пример 11	11,9 (0,727, 6)	1,50 (0,124, 6)	10,3 (0,808, 6)
Пример 12	6,61 (0,512, 6)	2,24 (0,303, 6)	12,4 (1,41, 6)
Пример 13	3,61 (0,197, 8)	1,76 (0,126, 8)	12,2 (1,00, 8)
Пример 14	4,05 (0,255, 7)	1,55 (0,165, 7)	14,4 (1,71, 7)
Пример 15	5,92 (1,10, 4)	1,47 (0,264, 4)	10,7 (1,85, 4)
Пример 16	13,2 (1,93, 6)	4,37 (0,589, 6)	19,0 (2,39, 6)
Пример 17	8,05 (1,26, 3)	2,38 (0,212, 3)	18,4 (3,75, 3)
Пример 18	5,71 (0,256, 4)	5,89 (1,05, 4)	16,1 (2,61, 4)
Пример 19	8,45 (0,828, 3)	3,13 (0,179, 3)	24,4 (2,85, 3)
Пример 20	3,97 (0,284, 3)	3,70 (1,02, 3)	20,6 (5,10, 3)

Примечание.

Определение EC₅₀ GLP-1(7-36)NH₂ человека с GLP-1R человека, Gcg человека с GcgR человека и GIP(1-42)NH₂ человека с GIP-R человека:

диапазоны концентрации пептида составляли от 448 до 99,5 нМ. Определение EC_{50} соединений по примерам в GLP-1R человека, GcgR человека и GIP-R человека: диапазоны концентраций пептида составляли от 51,5 фМ до 11,4 мкМ.

Как видно из табл. 3, в присутствии FBS и BSA типовые аналоги обладают агонистической активностью, которая определяется с помощью анализов цАМФ GIP-R, GLP-1R и GcgR, которые являются ниже, чем у нативных лигандов.

Дополнительный набор анализов цАМФ проводили в клетках HEK293, экспрессирующих рецепторы GLP-1, GIP и глюкагона человека. С помощью методов гомогенной флуоресценции с временным разрешением проводили анализы для определения собственной активности типовых аналогов и молекул-компараторов в присутствии казеина (вместо сывороточного альбумина) в качестве неспецифического блокатора, который не взаимодействует с фрагментами жирной кислоты анализируемых молекул.

Внутриклеточные уровни цАМФ определяли экстраполяцией с применением стандартной кривой. Кривые доза-эффект для соединений представляли в виде процентного соотношения стимуляции, нормализованного к минимальным (только буфер) и максимальным (максимальная концентрация каждого контрольного лиганда) значениям, и анализировали с помощью подгонки четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменным наклоном (Genedata Screener 13). EC_{50} представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальное моделирование на кривой доза-эффект.

Данные приведены ниже в табл. 4.

Таблица 4

Функциональная активация hGLP-1R, hGIPR, hGcgR в присутствии 0,1% казеина

	цАМФ EC_{50} , нМ (SEM, n)		
	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	0,0119 (0,00356, 163)		
hGIP амид		0,154 (0,037, 118)	
gGLP-1 амид			0,063 (0,022, 197)
Пример 1	0,114 (0,0203, 5)	0,0523 (0,0112, 5)	0,153 (0,0132, 12)
Пример 2	0,0553 (0,00975, 4)	0,0474 (0,00485, 4)	0,207 (0,0213, 6)
Пример 3	0,152 (0,0147, 7)	0,0376 (0,00284, 7)	0,107 (0,0108, 7)
Пример 4	0,0674 (0,00532, 15)	0,0648 (0,00507, 14)	0,180 (0,0144, 17)
Пример 5	0,0226 (0,00304, 10)	0,0757 (0,0127, 5)	0,147 (0,0204, 7)
Пример 6	0,0282 (0,00409, 7)	0,274 (0,0377, 7)	0,142 (0,0127, 10)
Пример 7	0,180 (0,0190, 6)	0,0798 (0,0111, 6)	0,109 (0,0134, 5)
Пример 8	0,120 (0,0210, 5)	0,114 (0,0101, 4)	0,117 (0,0151, 7)
Пример 9	0,139 (0,0281, 5)	0,0522 (0,00816, 4)	0,0931 (0,00852, 8)
Пример 10	0,123 (0,00784, 15)	0,0928 (0,00721, 16)	0,143 (0,0103, 12)
Пример 11	0,205 (0,0175, 11)	0,0425 (0,00744, 12)	0,123 (0,0119, 13)
Пример 12	0,122 (0,00931, 15)	0,0529 (0,00394, 18)	0,162 (0,0100, 18)
Пример 13	0,0815 (0,00835, 12)	0,0391 (0,00315, 14)	0,125 (0,00961, 13)
Пример 14	0,0876 (0,00687, 17/18)	0,0356 (0,00242, 20)	0,146 (0,0108, 17)
Пример 15	0,131 (0,0141, 10)	0,0689 (0,00730, 9)	0,253 (0,0197, 9)
Пример 16	0,174 (0,00882, 22)	0,114 (0,0100, 20)	0,157 (0,0105, 20)
Пример 17	0,135 (0,00643, 12)	0,0439 (0,00457, 11)	0,153 (0,0135, 10)
Пример 18	0,0861 (0,00631, 16)	0,123 (0,00954, 13)	0,141 (0,00862, 13)
Пример 19	0,0874 (0,0317, 2)	0,0455 (0,00516, 2)	0,143 (0,0187, 3)
Пример 20	0,0641 (0,00369, 12)	0,0572 (0,00527, 11)	0,149 (0,00937, 11)

Как видно из табл. 4, типовые аналоги стимулируют цАМФ из рецепторов GIP, GLP-1 и глюкагона человека в присутствии 0,1% казеина.

Исследования *in vivo*.

Фармакокинетика у самцов крыс линии Sprague Dawley.

Фармакокинетику типовых аналогов оценивали после однократного подкожного введения 100 нМ/кг самцам крыс Sprague Dawley. Образцы крови собирали в течение 120 ч и данные полученных индивидуальных концентраций в плазме крови применяли для расчета фармакокинетических параметров. Концентрации пептидов в плазме (K_3 ЭДТК) определяли с помощью квалифицированного метода ЖХ/МС, который измеряет интактную массу аналога. Каждый пептид и аналог в качестве внутреннего стандарта экстрагировали из 100%-ной указанной плазмы с помощью метанола с 0,1% муравьиной кислотой. При-

бор Thermo Q-Exactive, прибор с высоким разрешением и PepMap Thermo Easy Spray комбинировали для определения ЖХ/МС. Средние фармакокинетические параметры приведены в табл. 5.

Таблица 5

Средние фармакокинетические параметры пептидов после однократного подкожного введения 100 нМоль/кг самцам крыс линии Sprague Dawley

	T _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} /D (кг * нмоль/л/нмоль)	AUCINF_D_набл (час * кг * нмоль/л/нмоль)	CL/F (мл/ч/кг)
Пример 1	11,7	8	3,5	95,7	10,4
Пример 3	19,2	16	2,5	146	6,9
Пример 4	19,9	16	2,9	140	7,2
Пример 10	23,4	24	3,1	203,5	4,9
Пример 11	24,3	20	3,7	215,1	4,7
Пример 12	26,5	24	3,7	197,1	5,1
Пример 13	21,7	20	3,8	205,7	4,9
Пример 16	29,1	20	3,8	274,9	3,6
Пример 18	34,8	24	5,0	284,3	3,6

Сокращения.

T_{1/2}=период полураспада;

T_{max}=время до достижения максимальной концентрации;

C_{max}=максимальная концентрация в плазме;

AUCINF_D_набл=AUCinf, деленное на дозу;

CL/F = клиренс/биодоступность.

Примечание.

Данные представляют собой среднее значение, где n=3/группу.

Как видно из табл. 5, типовые аналоги демонстрируют расширенный фармакокинетический профиль.

Влияние in vivo на секрецию инсулина у самцов крыс линии Вистар.

Для оценки инсулинотропной активности типовых аналогов крысам (самец линии Вистар) выполняли внутривенный тест на толерантность к глюкозе (ivGTT). Семаглутид GLP-1 RA применяли в качестве положительного контроля. Крыс с хирургически имплантированными канюлями в яремной вене и сонной артерии (Envigo, Индианаполис, Индиана; 280-320 г) помещали по одной на клетку в поликарбонатные клетки с фильтром в верхней части. Крыс содержали в 12-часовом цикле "свет-темнота" при 21°C, назначали диету 2014 Teklad Global (Envigo, Индианаполис) и деионизированную воду без ограничения. Крыс рандомизировали по массе тела и вводили им подкожно (п/к) 1,5 мл/кг типовых аналогов за 16 ч до введения глюкозы, а затем оставляли без еды. Исходные концентрации 211 нМ типовых аналогов разводили в трис-буфере, pH от 8,0 до 6,667 нМоль/мл, 2,0, 0,667, 0,2 нМоль/мл; тестируемые дозы были следующие: носитель 1, 3 и 10 нМоль/кг, а в некоторых случаях 0,3 и 30 нМоль/кг. Семаглутид применяли в качестве положительного контроля и его инсулинотропные эффекты измеряли как в анализе на уровень его самого (носитель и дозы 1, 3, 10 и 30 нМоль/кг), так и в анализах с каждым типовым аналогом (доза 10 нМоль/кг).

Образец крови собирали в момент времени 0 в пробирки с ЭДТК, после чего вводили глюкозу (0,5, 5 мл/кг). Образцы крови собирали для анализа уровней глюкозы и инсулина через 2, 4, 6, 10, 20 и 30 мин после внутривенного введения глюкозы. Инсулин в плазме определяли с помощью электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale, Gaithersburg, MD). Площадь инсулина под кривой (AUC) исследовали и сравнивали с носителем, взятым в качестве контроля, с n=6 животных на группу.

Статистический анализ выполняли с помощью JMP, применяя однофакторный анализ ANOVA с последующим сравнением с помощью критерия Даннета с носителем, взятым в качестве контроля. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Эффект носителя, семаглутида и типовых аналогов на секрецию инсулина во время внутривенного теста на толерантность к глюкозе у анестезированных крыс линии Вистар

	AUC _{30 мин} инсулина после болюсной в/в дозы глюкозы				Семаглутид (10 нмоль/кг)
	Доза (нмоль/кг)				
	0	1	3	10	
Прим. 1	11,1 ± 1,3	60,1 ± 10,3 *	53,8 ± 5,1 *	71,5 ± 6,1 *	51,86 +/- 6,7 *
Прим. 3	12,6 ± 2,1	34,4 ± 2,9 *	47,5 ± 4,0 *	51,6 ± 5,4 *	45,6 +/- 6,6 *
Прим. 4	13,7 ± 2,3	27,4 ± 3,0	52,9 ± 3,0 *	70,8 ± 8,4 *	44,7 +/- 3,7 *
Прим. 11	11,3 ± 2,1	43,0 ± 6,8 *	59,2 ± 6,3 *	62,0 ± 4,6 *	55,1 +/- 9,0 *
Прим. 12	9,3 ± 1,8	32,4 +/- 2,4 *	44,8 ± 2,3 *	53,6 ± 6,0 * +	40,2 +/- 2,5 *
Прим. 13	8,9 ± 1,2	25,8 ± 2,7	47,3 ± 8,0 *	70,6 ± 4,8 *	38,4 +/- 6,0 *
Прим. 16	14,4 ± 2,1	18,9 ± 3,5	50,3 ± 4,2 *	50,1 ± 4,2 *	56,3 +/- 7,7 *
Прим. 18	12,3 ± 2,0	27,6 ± 4,6	44,8 ± 8,3 *	57,3 ± 10,0 *	48,4 +/- 6,6 *

Примечание.

Результаты выражены в виде среднего значения ± стандартная ошибка средних значений (SEM) для 6 крыс на группу. Статистический тест представляет собой однофакторный ANOVA с последующим сравнением с помощью критерия Даннета * $p < 0,05$ по сравнению с носителем; + $p < 0,05$ по сравнению с семаглутидом.

Как видно из табл. 6, типовые аналоги демонстрируют дозозависимое увеличение секреции инсулина.

Исследования у мышей линии C57BL/6 с ожирением, индуцированным диетой.

Типовые аналоги инкретина, описанные в данном документе, предлагаются в качестве лечения не только диабета, но также метаболического синдрома, который представляет собой совокупность сопутствующих заболеваний (дислипидемия, ожирение, стеатоз печени и т.д.), ассоциированных с инсулинорезистентностью и диабетом. Чтобы исследовать эффекты типовых аналогов на такие параметры, как потеря веса, метаболизм, композиционный состав тела и стеатоз печени, их вводили мышам линии C57BL/6 с ожирением, индуцированным диетой (DIO). Эти животные, хотя и не страдали диабетом, имели инсулинорезистентность, дислипидемию и стеатоз печени, все признаки метаболического синдрома, после того, как содержались на диете с высоким содержанием жиров в течение 18 недель.

В частности, в следующих исследованиях использовались самцы мышей C57BL/6 с DIO в возрасте от 24 до 25 недель, которые содержались на диете с высоким содержанием калорий. Мышей индивидуально размещали в помещении при температуре (24°C) с 12-часовым циклом "свет-темнота" (свет в 22:00) и свободным доступом к пище (TD95217) (Teklad) и воде. После как минимум 2-х недель акклиматизации в помещении мышей рандомизировали в соответствии с их весом тела, поэтому каждая экспериментальная группа животных имела сходный вес тела. Вес тела варьировался от 40 до 51 г.

Все группы насчитывали 5-6 мышей. Носитель, типовые аналоги, растворенные в носителе (40 mM Трис-HCl при pH 8,0), и семаглутид, растворенный в носителе, вводили с помощью подкожной (п/к) инъекции (10 мл/кг) мышам с DIO, вскармливаемым *ad libitum*, за 30-90 мин до начала темного цикла каждые 3 дня в течение 15 дней. П/к инъекции осуществляли в день 1, 4, 7, 10 и 13. Вес тела и потребление пищи измеряли ежедневно на протяжении всего исследования.

Абсолютные изменения веса тела рассчитывают путем вычитания веса тела того же животного перед первой инъекцией носителя, аналога или семаглутида. В дни 0 и 15 общую массу жира измеряли с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с помощью прибора Echo Medical System (Houston, TX). В день 15 животных умерщвляли перед темным фотопериодом, а печень извлекали и замораживали. Уровень триглицеридов печени в гомогенатах печени, собранных при умерщвлении, и уровень холестерина в плазме измеряли на клиническом анализаторе Hitachi Modular P.

Данные представлены как среднее ± SEM для 5-6 животных на группу в табл. 7 и 8 ниже. Статистический анализ выполняли с помощью повторных измерений ANOVA с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений. Значимые различия идентифицировали при $p < 0,05$.

Таблица 7

Изменение веса тела через пятнадцать дней после введения типовых аналогов

	Группа обработки					
	(3 нмоль/кг)		(10 нмоль/кг)		(30 нмоль/кг)	
	Δ от носителя (г)	% изменения	Δ от носителя (г)	% изменения	Δ от носителя (г)	% изменения
Прим. 1	-5,42 ± 0,54	-10,04 ± 1,14	-9,26 ± 0,36	-20,20 ± 1,51	-21,36 ± 1,08	-44,82 ± 1,54
Прим. 3			-10,14 ± 0,72	-21,18 ± 1,98		
Прим. 4			-11,58 ± 0,85	-23,64 ± 1,70	-19,98 ± 1,63	-43,88 ± 3,71
Прим. 5			-12,30 ± 2,20	-25,40 ± 4,56		
Прим. 6			-11,72 ± 1,78	-24,02 ± 3,31		
Прим. 7	-5,26 ± 0,49	-12,22 ± 1,19	-8,38 ± 0,50	-19,65 ± 1,27	-16,26 ± 2,23	
Прим. 10	-5,4 ± 0,49	-12,70 ± 1,17	-10,98 ± 0,76	-24,95 ± 1,99	-17,08 ± 1,43	-39,51 ± 3,84
Прим. 11	-7,22 ± 0,38	-16,58 ± 0,88	-11,82 ± 1,72	-26,83 ± 4,04	-16,48 ± 1,98	-37,35 ± 3,91
Прим. 12	-8,40 ± 0,77	-19,33 ± 1,66	-10,34 ± 0,69	-23,37 ± 1,40	-17,44 ± 1,37	-46,60 ± 3,78
Прим. 13	-4,92 ± 0,86	-10,14 ± 1,87	-11,02 ± 0,77	-23,80 ± 1,25	-21,12 ± 2,09	
Прим. 14	-6,12 ± 0,80	-13,38 ± 1,80	-14,76 ± 1,06	-32,32 ± 2,49	-20,04 ± 2,40	-45,26 ± 4,79
Прим. 16	-7,44 ± 0,74	-16,78 ± 1,88	-12,24 ± 1,66	-28,08 ± 4,23	-16,70 ± 1,67	-37,42 ± 3,58
Прим. 18			-13,16 ± 0,82	-28,48 ± 2,05	-19,54 ± 2,37	-43,02 ± 4,59
Прим. 20	-4,18 ± 0,50	-8,98 ± 1,26	-10,76 ± 1,57	-24,42 ± 3,74	-23,00 ± 0,59	-52,14 ± 1,74
Sema		-2,62 ± 0,49		-10,31 ± 1,25		-15,49 ± 2,44

Примечание.

"Δ от носителя" относится к разнице между весом тела на 15-й день между исследуемой группой и группой, получавшей носитель.

"% изменения" относится к процентному снижению веса тела между днями 1 и 15 в исследуемых группах.

"Sema" означает семаглутид.

Процент снижения веса тела у животных, получающих носитель, регистрировался и составлял менее 1% в каждом исследовании.

Δ от носителя и % изменения статистически значимо отличались ($p < 0,05$) от контроля для соединений всех примеров во всех исследуемых дозах.

Как видно из приведенной выше табл. 7, типовые аналоги демонстрируют дозозависимое снижение веса тела.

Данные по метаболическим параметрам при применении дозы 3 нмоль/кг приведены ниже в табл. 8.

Таблица 8

Эффект воздействия типовыми аналогами в дозе 3 нмоль/кг на уровни глюкозы крови, инсулина, холестерина, аланинаминотрансферазы (ALT) и триглицериды печени после пятнадцати дней лечения

Лечение	Метаболические параметры (среднее ± SEM)				
	Глюкоза (мг/дл)	Инсулин в плазме (пг/мл)	Холестерин (мг/дл)	ALT (МЕ/л)	Триглицериды печени (мг/г ткани)
Носитель	149,7 ± 3,09	8549±1265	234,6 ± 3,42	141,8 ± 11,5	290,4 ± 13,3
Семаглутид	137,8 ± 7,34	4196 ± 1014*	218,0 ± 9,23	99,8 ± 14,84	226,4 ± 23,8
Пример 1	107,4 ± 4,38 *	3439 ± 936,4 *	191,2 ± 7,55 *	118,0 ± 20,73	150,6 ± 37,0 *
Пример 7	109,3 ± 5,78 *	2656 ± 949 *	169,2 ± 11,79 *	51,0 ± 7,78 *	97,9 ± 18,2 *
Пример 10	109,6 ± 4,81 *	571,4 ± 158,4 *	181,0 ± 6,20 *	77,2 ± 9,35 *	126,8 ± 17,0 *
Пример 11	114,7 ± 3,051 *	1569 ± 318,3 *	178,2 ± 7,95 *	56,2 ± 4,51 *	93,8 ± 21,8 *
Пример 12	114,9 ± 2,12 *	1691 ± 231,3 *	169,0 ± 8,15 *	58,6 ± 6,03 *	98,2 ± 13,2 *
Пример 13	119,7 ± 4,19 *	2903 ± 737,4 *	192,2 ± 11,44 *	54,4 ± 6,82 *	94,5 ± 22,0 *
Пример 14	111,5 ± 1,77 *	1971 ± 499,8 *	164,8 ± 5,85 *	31,4 ± 2,79 *	63,1 ± 7,3 *
Пример 16	110,1 ± 3,61 *	3227 ± 1070 *	173,8 ± 9,32 *	20,6 ± 4,43 *	40,2 ± 13,2 *
Пример 18	102,9 ± 5,37 *	1958 ± 460,5 *	190,0 ± 13,71 *	66,0 ± 10,21 *	109,5 ± 22,9 *

Примечание.

* $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель; однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета.

В дополнение к существенной потере веса, как видно из табл. 8, типовые аналоги снижают уровень глюкозы в крови, инсулина в плазме (как признак повышения чувствительности к инсулину) и холестерина в плазме, а также улучшают состояние печени, что проявляется в снижении ALT в плазме и уровня триглицеридов в печени.

SEQ ID NO: 1 - глюкагон человека

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO: 2 - GLP-1 (7-36) амид человека

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

SEQ ID NO: 3 - OXM человека

(HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNIA)

SEQ ID NO: 4 - GIP человека

YAEGTFISDYIAMDKINQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ

SEQ ID NO: 5 - аналог инкретина

YX₂QGTFTSDYSIX₁₃LDKX₁₇AX₁₉X₂₀AFIEYLLX₂₈X₂₉GPSSX₃₄APPPS

где X₂ представляет собой Aib;

X₁₃ представляет собой L или αMeL;

X₁₇ представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, при этом указанная функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C₁₆-C₂₂;

X₁₉ представляет собой Q или A;
 X₂₀ представляет собой Aib, αMeK, Q или H;
 X₂₈ представляет собой E или A;
 X₂₉ представляет собой G или Aib; и
 X₃₄ представляет собой G или Aib.

SEQ ID NO: 6 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLA-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 7 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-αMeK-AFIEYLLA-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 8 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-αMeK-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 9 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLA-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 10 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AAQAFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 11 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AAQAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 12 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 13 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-αMeK-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 14 - аналог инкретина

Y-Aib-QGFTFTSDYSI-αMeL-LDKK((γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 15 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 16 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 17 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 18 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 19 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSS-Aib-APPPS-NH₂

SEQ ID NO: 20 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLA-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 21 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 22 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 23 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 24 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 25 - аналог инкретина

Y-Aib-QGTFTSDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLE-Aib-GPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 26 - Искусственная последовательность

GPSSGAPPPS

SEQ ID NO: 27 - Искусственная последовательность

GPSS-Aib-APPPS

Перечень последовательностей

<110> Эли Лилли энд Компани

<120> АНАЛОГИ ИНКРЕТИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa в положении 34 представляет собой Gly или Aib

<400> 5

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

Xaa Ala Xaa Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Xaa Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Xaa Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 6
 <211> 39
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (17)..(17)
 <223> Lys в положении 17 модифицирован
 (2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-HCO
 2H

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa в положении 29 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 6

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

Lys Ala Gln His Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Ala Xaa Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (2)..(2)

<223> Хаа в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (13)..(13)

<223> Хаа в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
(2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)2-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO
2H)

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (20)..(20)

<223> Хаа в положении 20 представляет собой альфа-метил-Lys

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (29)..(29)

<223> Хаа в положении 29 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
ту

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 7

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Ala Xaa Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8
 <211> 39
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая конструкция

 <220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа в положении 2 представляет собой 2-аминоизомасляную кислоту

 <220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино)этокси]-этокси]-ацетил) 2-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO
 2H)

 <220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (20)..(20)
 <223> Хаа в положении 20 представляет собой альфа-метил-Lys

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

 <400> 8

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

 Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Ala Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 9
 <211> 39
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетическая конструкция

 <220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

043950

<400> 11

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

Lys Ala Ala Gln Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 12

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (2)..(2)

<223> Xaa в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (13)..(13)

<223> Xaa в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино)этокси]-этокси)-ацетил)2-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO
 2H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 12

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

Lys Ala Gln His Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 13

<211> 39

<212> БЕЛОК

<221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (гамма-Glu)2-CO-(CH2)18-CO2H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 14

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

Lys Ala Gln His Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 15
 <211> 39
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(гамма-Glu)-CO-(CH2)18-CO2
 H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 15

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

043950

Lys Ala Gln His Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 16

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (2)..(2)

<223> Хаа в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (13)..(13)

<223> Хаа в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино)этокси]-этокси]-ацетил)2-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO
 2H

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (20)..(20)

<223> Хаа в положении 20 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
 ту

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 16

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Ala Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 17

<211> 39

<212> БЕЛОК

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂
 Н

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (20)..(20)
 <223> Хаа в положении 20 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
 ту

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (29)..(29)
 <223> Хаа в положении 29 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
 ту

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 18

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 19
 <211> 39
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>
 <221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа в положении 13 представляет собой альфа-метил-Leu

043950

<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 21

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Ala Xaa Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 22
<211> 39
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<220>
<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
<222> (2)..(2)
<223> Xaa в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
(2-[2-(2-амино)этокси]-этокси)-ацетил)2-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO
2H

<220>
<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
<222> (20)..(20)
<223> Xaa в положении 20 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
ту

<220>
<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК
<222> (29)..(29)
<223> Xaa в положении 29 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
ту

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 22

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

043950

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 23

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (2)..(2)

<223> Xaa в положении 2 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Lys в положении 17 химически модифицирован путем конъюгирования
 эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂
 H

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (20)..(20)

<223> Xaa в положении 20 представляет собой альфа-амино-изомасляную кисло-
 ту

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 23

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Ala Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 24

<211> 39

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с
 (2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(гамма-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂
 Н

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (20)..(20)

<223> Хаа в положении 20 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (29)..(29)

<223> Хаа в положении 29 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser в положении 39 необязательно амидирован

<400> 25

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

Lys Ala Gln Xaa Ala Phe Ile Glu Tyr Leu Leu Glu Xaa Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 26

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 26

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<220>

<221> ПРОЧИЙ_ПРИЗНАК

<222> (5) .. (5)

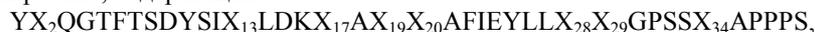
<223> Хаа в положении 5 представляет собой альфа-амино-изомасляную кислоту

<400> 27

Gly Pro Ser Ser Xaa Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аналог инкретина, содержащий

где X_2 представляет собой Aib; X_{13} представляет собой L или α MeL; X_{17} представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, при этом указанная функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C_{16} - C_{22} ; X_{19} представляет собой Q или A; X_{20} представляет собой Aib, α MeK, Q или H; X_{28} представляет собой E или A; X_{29} представляет собой G или Aib; X_{34} представляет собой G или Aib (SEQ ID NO: 5); и

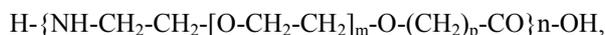
C-концевая аминокислота необязательно является амидированной, или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Аналог инкретина по п.1, отличающийся тем, что указанную аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X_{17} , выбирают из группы, состоящей из K, C, E и D.3. Аналог инкретина по п.1, отличающийся тем, что указанная аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X_{17} , представляет собой K.4. Аналог инкретина по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X_{17} , и жирная кислота C_{16} - C_{22} конъюгированы линкером между аминокислотой и жирной кислотой.

5. Аналог инкретина по п.4, отличающийся тем, что указанный линкер содержит от одной до четырех аминокислот.

6. Аналог инкретина по п.5, отличающийся тем, что указанные аминокислоты представляют собой Glu или γ Glu.

7. Аналог инкретина по любому из пп.4-6, отличающийся тем, что указанный линкер дополнительно содержит структуру

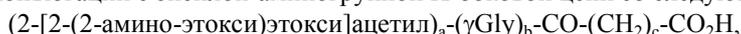


где m представляет собой любое целое число от 1 до 12;

n представляет собой любое целое число от 1 до 12; и

p равно 1 или 2.

8. Аналог инкретина по любому из пп.4-7, отличающийся тем, что указанный линкер дополнительно содержит от одного до четырех фрагментов (2-[2-(2-амино-этоксид)этоксид]ацетил).

9. Аналог инкретина по п.1, отличающийся тем, что X_{17} представляет собой K, химически модифицированную путем конъюгации с эпсилон-аминогруппой K-боковой цепи со следующей структурой:

где a равно 0, 1 или 2;

b равно 1 или 2; и

c представляет собой целое число от 16 до 18.

10. Аналог инкретина по п.9, отличающийся тем, что a равно 1.

11. Аналог инкретина по п.9, отличающийся тем, что a равно 2.

12. Аналог инкретина по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что b равно 1.

13. Аналог инкретина по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что b равно 2.

14. Аналог инкретина по любому из пп.9-13, отличающийся тем, что c равно 18.

15. Аналог инкретина по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что X_{13} представляет собой α MeL.16. Аналог инкретина по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что X_{13} представляет собой L.17. Аналог инкретина по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что X_{20} представляет собой Aib.18. Аналог инкретина по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что X_{28} представляет собой E.19. Аналог инкретина по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что X_{29} представляет собой G.20. Аналог инкретина по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что X_{34} представляет собой G.21. Аналог инкретина по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что X_{19} представляет собой Q.

22. Аналог инкретина по п.9, отличающийся тем, что

a равно 1;

b равно 1;

c равно 18;

 X_{13} представляет собой α MeL;

X₁₉ представляет собой Q;
X₂₀ представляет собой Aib;
X₂₈ представляет собой E;
X₂₉ представляет собой G; и
X₃₄ представляет собой G.

23. Аналог инкретина по п.1, отличающийся тем, что аналог инкретина имеет формулу, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

24. Аналог инкретина по п.23, отличающийся тем, что аналог инкретина имеет формулу, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23.

25. Аналог инкретина по п.24, отличающийся тем, что аналог инкретина имеет формулу SEQ ID NO: 17.

26. Способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, ожирения, жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, дислипидемии и метаболического синдрома, при этом указанный способ включает этап введения нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества аналога инкретина по любому из пп.1-25.

27. Способ лечения сахарного диабета II типа, при этом указанный способ включает этап введения нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества аналога инкретина по любому из пп.1-25.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая аналог инкретина по любому из пп.1-25; а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

29. Применение аналога инкретина по любому из пп.1-25 для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, дислипидемии, жировой болезни печени, метаболического синдрома, неалкогольного стеатогепатита и ожирения.

30. Применение аналога инкретина по любому из пп.1-25 для лечения сахарного диабета II типа.

31. Применение аналога инкретина по любому из пп.1-25 в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, дислипидемии, жировой болезни печени, метаболического синдрома, неалкогольного стеатогепатита и ожирения.

32. Применение аналога инкретина по любому из пп.1-25 в изготовлении лекарственного средства для лечения сахарного диабета II типа.

33. Способ лечения ожирения, причем способ включает стадию введения нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества аналога инкретина по любому из пп.1-25.

34. Применение аналога инкретина по любому из пп.1-25 для лечения ожирения.

35. Применение аналога инкретина по любому из пп.1-25 в изготовлении лекарственного средства для лечения ожирения.

