

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044997**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.24(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)(21) Номер заявки
201991047(22) Дата подачи заявки
2017.10.26

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛ, СВЯЗАННЫЙ С ЦИКЛИЧЕСКИМ ПЕПТИДОМ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И НАБОР, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/413,586; 62/413,613**(32) **2016.10.27**(33) **US**(43) **2019.10.31**(86) **PCT/US2017/058455**(87) **WO 2018/081370 2018.05.03**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

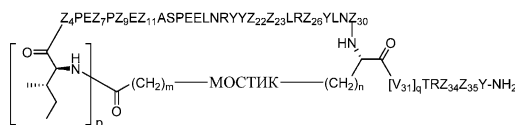
**Свансон Роналд В., Цзянь Вэньин,
Чжан Юэ-Мэй, Уолл Марк, Чи Эллен
(US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(72) Изобретатель:
**Мэсилаг Марк, Патч Рэймонд Дж.,
Чжан Жуй, Кейс Мартин А., Рангвала
Шамина М., Леонард Джеймс Н.,
Камачо Рауль К., Хангер Майкл Дж.,
Д'акуино Катарин Э., Эдвардс Уилсон,**

(56) US-A1-20150258209
"Analog of pancreatic polypeptide and peptide YY with a locked PP-fold structure are biologically active" (Germain et al.) Peptides 39 (2013) 6-10; abstract, Fig. 1B
US-A1-20160108098

(57) Изобретение раскрывает конъюгаты, содержащие моноклональное антитело, конъюгированное с циклическим пептидом PYY или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью с общей формулой



Раскрыты фармацевтические композиции и наборы, содержащие конъюгат. Кроме того, предложены способы получения конъюгатов и фармацевтической композиции. Раскрыты способы лечения заболевания или расстройства у пациента, выбранного из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или типа II, метаболического синдрома, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии, гипертензии, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH). Также способы уменьшения потребления пищи у пациента и модуляции активности рецепторов Y2 у пациента.

B1**044997****044997****B1**

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится по существу к новым конъюгатам антител, связанных с циклическим пептидом (РУУ). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, набору и способам их получения и применения. Новые фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты, используют для лечения заболеваний и расстройств, таких как, среди прочих, ожирение, диабет 2 типа, метаболический синдром, резистентность к инсулину и дислипидемия, для снижения потребления пищи у пациента, модуляции активности рецептора Y2.

Предпосылки создания изобретения

Рецепторы нейропептида Y (NPY) активируются близкородственной группой пептидных агонистов, называемой "семейством NPY", которые имеют разные аффинности для каждого подтипа рецептора. NPY, пептидный тирозин-тирозиновый (РУУ) и панкреатический полипептид (PP), каждый из которых имеет длину 36 аминокислот, являются агонистами семейства рецепторов NPY. NPY представляет собой нейротрансмиттер, который синтезируется, совместно хранится и высвобождается совместно с норэпинефрином и эпинефрином. NPY является одним из наиболее часто встречающихся и широко распространённых пептидов в центральной нервной системе (ЦНС) людей и грызунов, и он экспрессируется в областях головного мозга, связанных с питанием и стрессом. В периферической нервной системе нейроны, содержащие NPY, преимущественно являются симпатическими. РУУ преимущественно синтезируется и высвобождается эндокринными клетками кишечника. Расщепление NPY и РУУ эндотелиальной серин-протеазой, дипептидилпептидазой IV (DPP-IV) генерирует NPY₃₋₃₆ и РУУ₃₋₃₆, которые являются селективными лигандами для подтипов Y2 и Y5 семейства рецепторов NPY. PP, главным образом, встречается в клетках панкреатических островков, отличных от содержащих инсулин, глюкагон или соматостатин.

На сегодняшний день установлено пять различных рецепторов NPY, четыре из которых, как известно, имеют отношение к физиологии человека. Рецепторы Y1, Y2 и Y5 предпочтительно связывают NPY и РУУ, тогда как рецептор Y4 предпочтительно связывает PP. Рецепторы Y2 и Y5 также эффективно активируются с помощью NPY₃₋₃₆ и РУУ₃₋₃₆. В основном, семейство лигандов NPY обладает переменной селективностью к каждой изоформе рецептора NPY, причем ранее сообщалось, что РУУ₃₋₃₆ имеет селективность к изоформе Y2 от умеренной до сильной. Каждый из этих рецепторов сочетается с ингибированием аденилатциклазы посредством чувствительного к токсину коклюша Gαi.

РУУ секретируется из эндокринных L-клеток в ответ на прием пищи, и в частности после приема жира. РУУ₁₋₃₆ доминирует в состоянии натощак, причем РУУ₃₋₃₆ является основной формой, обнаруживаемой после приема пищи у людей, при этом концентрации в плазме отрицательно коррелирует с количеством потребленных калорий. Показано, что РУУ₃₋₃₆ снижает потребление пищи у людей, обезьян, крыс, кроликов и мышей (Batterham RL et al. Nature 2002 Aug 8; 418 (6898): 650-4; Batterham RL et al. N Engl J Med 2003 Sep 4; 349 (10) : 941-8; Challis BG et al., Biochem Biophys Res Commun 2003 Nov 28;311 (4):915-9). Считается, что анорексигенные эффекты РУУ₃₋₃₆ являются Y2-опосредованными, основанными на предпочтительном связывании с этим рецептором и потерей эффективности питания у мышей с дефицитом Y2 (Batterham RL, et al. Nature 2002 Aug 8; 418(6898):650-4). Внутридуговая инъекция РУУ₃₋₃₆ снижает потребление пищи у крыс и мышей (Batterham et al. Nature 2002 Aug 8; 418 (6898): 650-4), что указывает на возможность опосредования этих эффектов за счет взаимодействия гипоталамических рецепторов Y2. Кроме того, показано, что острые эффекты в качестве отклика на питание обеспечивают дозозависимые эффекты в отношении массы тела у мышей линий ob/ob, мышей DIO и мышей Zucker fa/fa (Pittner RA et al. Int J Obes relat Metab Disord 2004 Aug; 28 (8) : 963-71). Кроме того, показано, что РУУ₃₋₃₆ также улучшает опосредованное инсулином удаление глюкозы и чувствительность к инсулину у грызунов DIO (Vrang N et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol Aug; 291(2):R367-75). Бариатрическая хирургия приводит к увеличению иммунореактивности по отношению к циркулирующему РУУ (le Roux CW et al., Ann Surg 2006 Jan; 243 (1):108-14), которая, по-видимому, играет роль в снижении веса после операции.

Учитывая его роль в контроле аппетита и потребления пищи, а также его анти-секреторные эффекты и эффекты, стимулирующие всасывание, в желудочно-кишечном тракте у млекопитающих, РУУ₃₋₃₆ может быть эффективен при лечении ожирения и связанных с ним состояний, а также при ряде желудочно-кишечных расстройств. Однако терапевтическая полезность самого РУУ₃₋₃₆ в качестве лечебного агента ограничена его быстрым метаболизмом и результирующим коротким периодом полужизни в кровотоке (Torang et al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310:R866-R874 (2016)).

Таким образом, желательным является получение аналога или производного РУУ с улучшенными метаболической стабильностью и фармакокинетическим профилем по сравнению с РУУ₃₋₃₆. Такие производные с длительным периодом полужизни в условиях *in vivo* обеспечат модуляцию рецептора Y2 с большей продолжительностью действия, что делает их приемлемыми для использования в качестве терапевтических агентов для пациентов, нуждающихся в такой модуляции.

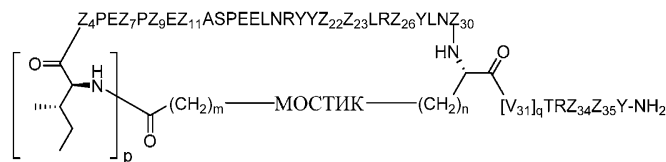
Приведенное выше описание представлено исключительно для лучшего понимания природы проблем, стоящих перед данной областью техники, и не должно толковаться каким-либо образом как признание предшествующего уровня техники; а также цитирование какой-либо ссылки в настоящем документе не должно толковаться как признание того, что такая ссылка представляет собой "предшествую-

щий уровень техники" в сравнении с настоящим изобретением.

Изложение сущности изобретения

Изобретение можно отнести к новому конъюгату антител, связанному с циклическим пептидом (PYY).

В настоящем документе раскрыт конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с циклическим пептидом PYY, причем циклический пептид PYY представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

где p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-,

-SCH₂C(O)NH-, - (OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

Z₂₂ представляет собой A или K;

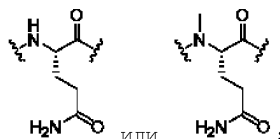
Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

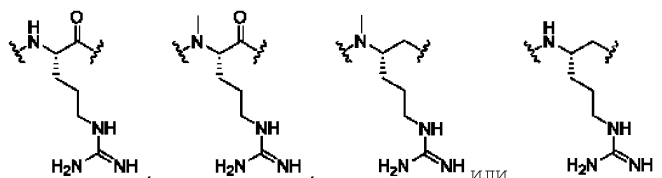
Z₃₀ представляет собой L, W, K или отсутствует;

при условии, что Z₃₀ отсутствует, только если q равно 1;

Z₃₄ представляет собой



Z₃₅ представляет собой



причем циклический пептид PYY формулы I ацилирован по аминогруппе боковой цепи по меньшей мере одного остатка лизина (K) с образованием ацилированного циклического пептида PYY, который дополнительно напрямую или посредством линкера связан с цистеиновой группой HCDR3 моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения ацилированный циклический пептид PYY характеризуется следующим образом:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

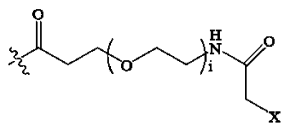
n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазилил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, - (OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

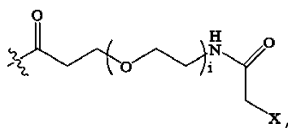
Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



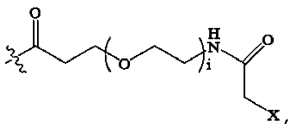
где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,
 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_9 представляет собой G или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



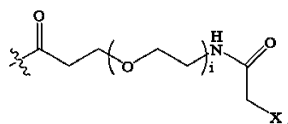
где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,
 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{11} представляет собой D или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



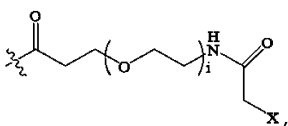
где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,
 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{22} представляет собой A или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,
 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{23} представляет собой S или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



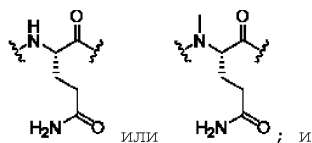
где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,
 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{26} представляет собой A или H ;

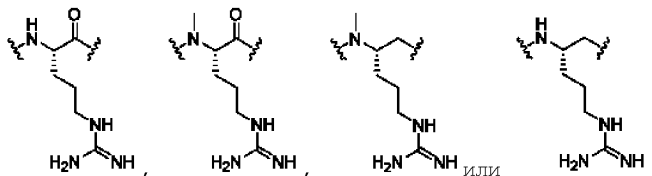
Z_{30} представляет собой L или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



Z_{34} представляет собой



Z_{35} представляет собой



где группа X представляет собой уходящую группу, позволяющую остатку формулы (I) быть ковалентно связанным с цистеиновым фрагментом HCDR3 моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В предпочтительном варианте ацилированный циклический пептид PYY характеризовать следующим образом:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

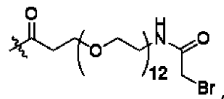
n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q может быть равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазолил-, -NHC(O)CH₂S-, - (OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S, -NHC(O)- или -CH₂S-;

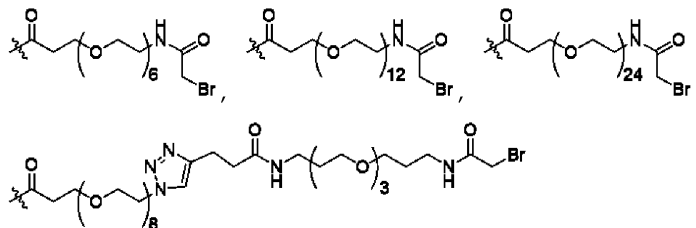
Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



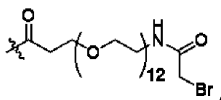
Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью

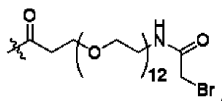


-C(O)CH₂Br,

Z₂₂ представляет собой A или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью

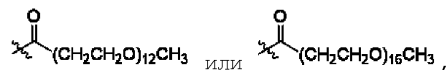


Z₂₃ представляет собой S или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью

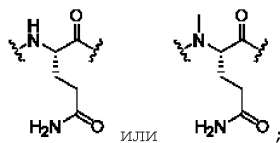


Z₂₆ представляет собой A или H;

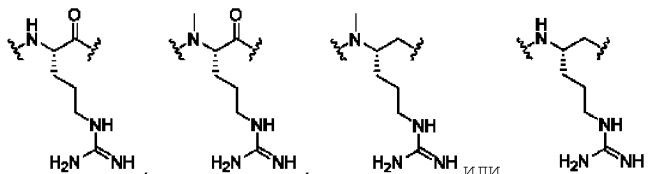
Z₃₀ представляет собой L или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



Z₃₄ представляет собой



Z₃₅ представляет собой



Еще одним изобретением является конъюгат в котором ацилированный циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 73-100 или их фармацевтически приемлемой соли.

Другим вариантом осуществления является конъюгат в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связано с циклическим пептидом PYY на остатке лизина (K) циклического пептида PYY посредством линкера.

Другим вариантом осуществления является конъюгат, в котором линкер представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG)8-триазолил-CH₂CH₂CO-PEG4, цепочки PEG из 2-24 PEG-звеньев, алкильной цепочки, содержащей 2-10 атомов углерода, (Gly4Ser)_j, причем j=1-4, (AlaPro)_u, при этом u=1-10, и связи.

Другим вариантом осуществления является конъюгат, в котором только один из Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ и

Z23 в формуле I представляет собой лизин и лизин ковалентно связан с внедренным цистеиновым остатком моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера.

Другим вариантом осуществления является конъюгат, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно; и причем конъюгат содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 102-127.

Другим вариантом осуществления является конъюгат, в котором выделенное моноклональное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 137, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 139. Данный конъюгат также дополнительно содержит участок Fc.

Другим вариантом осуществления является конъюгат, содержащий тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 138, и легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 140.

Другим вариантом осуществления является конъюгат, в котором: ацилированный циклический пептид PYY содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 73-100; и

моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с циклическим пептидом PYY на остатках 7, 9, 11, 22 или 23 циклического пептида PYY напрямую или посредством линкера.

Кроме того, предложены способы получения конъюгатов. Способы включают реакцию электрофильного соединения, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь циклического пептида PYY, предпочтительно в боковую цепь остатка лизина циклического пептида PYY, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка из SEQ ID NO: 143 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с образованием, таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом PYY и моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Кроме того, раскрыты фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предложены способы лечения заболевания или расстройства у пациента, причем указанное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или типа II, метаболического синдрома, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии, гипертензии, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH). Способы включают введение пациенту эффективного количества фармацевтических композиций изобретения.

Кроме того, предложены способы уменьшения потребления пищи у пациента. Способы включают введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции изобретения.

Кроме того, предложены способы модуляции активности рецепторов Y2 у пациента. Способы включают введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции изобретения.

В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят путем инъекции или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с по меньшей мере одним противодиабетическим агентом. Предпочтительно, противодиабетический агент может, например, представлять собой модулятор рецептора глюкагон-подобного пептида-1. В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в комбинации с лираглутидом.

Кроме того, раскрыты наборы, содержащие конъюгаты согласно изобретению, дополнительно содержащие лираглутид и устройство для инъекции.

Кроме того, предложены способы получения фармацевтических композиций согласно изобретению. Способы включают объединение конъюгата с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции. Предпочтительно в нем электрофил представляет собой бромацетамид или малеимид или боковая цепь циклического пептида PYY является боковой цепью остатка лизина циклического пептида PYY.

Дополнительные аспекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут более понятны после прочтения представленного ниже подробного описания изобретения и формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

Приведенное выше краткое описание, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, будут более понятны при изучении вместе с приложенными рисунками. Однако необходимо понимать, что применение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1 показана общая стратегия конъюгации пептида с mAb в соответствии с вариантом осуществления изобретения. X представляет собой электрофил, введенный в боковую цепь терапевтического пептида, такой как бромацетамид или малеимид, который сайт-специфически реагирует с сульфгидриль-

ной группой цистеинового остатка, искусственно внедренного в CDR увеличивающего период полужизни mAb, с образованием ковалентной связи между пептидом и mAb.

На фиг. 2 показано краткое представление остатков CDR, выбранных для замены в PH9H5_VH (SEQ ID NO: 129) и в PH9L3_VL (SEQ ID NO: 128). Остатки, замещенные цистеином, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

На фиг. 3 показана фармакокинетика соединения 1 у мышей с алиментарным ожирением (DIO).

На фиг. 4 показана фармакокинетика соединения 1 у яванских макак.

На фиг. 5 представлено потребление пищи мышами DIO, получавшими лечение соединением 1: острое дозирование.

На фиг. 6 показана потеря веса у мышей DIO, получавших лечение соединением 1: острое дозирование.

На фиг. 7 представлено потребление пищи мышами DIO, получавшими лечение соединением 1: хроническое дозирование.

На фиг. 8 показана потеря веса у мышей DIO, получавших лечение соединением 1: хроническое дозирование.

На фиг. 9 показана потеря веса у мышей DIO, получавших лечение соединением 1 в комбинации с лираглутидом: хроническое дозирование.

На фиг. 10 показан график, демонстрирующий среднее еженедельное потребление пищи в течение 3 недель до начала введения лираглутида, через 1 неделю после введения лираглутида и через 2 недели после введения лираглутида. Указано процентное снижение среднего еженедельного потребления пищи при лечении в сравнении с исходным средним показателем за 3 недели.

На фиг. 11A-11D показаны графики, демонстрирующие влияние соединения 1 с добавкой лираглутида на уровень глюкозы, инсулина и триглицеридов у страдающих ожирением макак-резусов. На фиг. 11A представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни глюкозы. На фиг. 11B представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни инсулина. На фиг. 11C представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на HOMA-IR. На фиг. 11D представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни триглицеридов.

На фиг. 12A-12D показаны графики влияния соединения 1 с добавкой лираглутида на уровень холестерина и ферментов печени у страдающих ожирением макак-резусов. На фиг. 12A представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни холестерина. На фиг. 12B представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни HDL. На фиг. 12C представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни ALT. На фиг. 12D представлен график, демонстрирующий влияние монотерапии соединением 1 (PYY) и комбинированной терапии с лираглутидом (PYY+Lira) на уровни ALT.

Подробное описание изобретения

В разделе "Предпосылки создания изобретения" и в тексте в настоящем изобретении приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т.п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании.

Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1 до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). В контексте настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует пони-

мать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления, раскрытого в настоящем документе.

Подразумевается, что такие эквиваленты указаны в изобретении.

Используемые в настоящем документе термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", или любая другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и являются не исключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано иное, термин "или" относится к включающему, а не к исключающему "или". Например, условие "А или В" выполняется в любой одной из следующих ситуаций: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует) и оба элемента А и В истинны (или присутствуют).

Следует также понимать, что термины "около", "приблизительно", "в основном", "главным образом" и подобные термины, используемые в настоящем документе при упоминании размера или характеристики компонента, указывают на то, что описанные размер/характеристика не являются строгой границей или параметром и не исключают незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или сходны, как будет понятно обычному специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, содержащие числовой параметр, будут включать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т.д.), не изменят наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процентная "идентичность" в контексте двух или большего числа нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, циклических полипептидных последовательностей РYУ₃₋₃₆, последовательностей легких или тяжелых цепей) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании, обеспечивающих максимальное соответствие, по результатам измерения с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального контроля с помощью способов, известных в данной области техники, применительно к настоящему описанию.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытываемую последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводят испытываемую и эталонную последовательности, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма последовательности. Впоследствии алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательности для испытываемой (-ых) последовательности (-ей) по отношению к эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с использованием алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или путем визуального контроля (см. в основном Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие компаний Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (Дополнение, 1995) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, приемлемых для определения процентной идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации.

Дополнительным показателем по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух полипептидов, является иммунологическое перекрестное реагирование полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком по существу идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот является гибридизация этих двух молекул друг с другом в строгих условиях, как описано ниже.

В настоящем документе термин "пациент" означает любое животное, предпочтительно млекопи-

тающее, наиболее предпочтительно человека. Используемый в настоящем документе термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.п. и более предпочтительно человека.

Термин "введение" применительно к способам означает способ терапевтической или профилактической профилактики, лечения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания, как описано в настоящем документе, посредством применения конъюгата или его формы, композиции или лекарственного средства. Такие способы включают введение эффективного количества указанного конъюгата, формы, композиции или лекарственного средства в разное время в течение курса лечения или одновременно с другими конъюгатами в комбинированной форме. Способы следует понимать как включающие все известные терапевтические схемы лечения.

Термин "эффективное количество" означает такое количество активного конъюгата или фармацевтического средства, которое вызывает биологический или медицинский отклик системы тканей, животного или человека, к которому стремится исследователь, ветеринар, врач или иной специалист, который включает профилактику, лечение или облегчение синдрома, расстройства или заболевания, на которые направлено лечение, или симптомов синдрома, расстройства или заболевания, на которые направлено лечение.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "композиция" охватывает продукт, содержащий установленные ингредиенты в установленных количествах, а также к любому продукту, который можно получать прямо или косвенно из комбинаций установленных ингредиентов в установленных количествах.

Используемый в настоящем документе термин "связанный" относится к объединению или соединению двух или более объектов друг с другом. Применительно к химическим или биологическим соединениям термин "связанный" может означать ковалентную связь между двумя или более химическими или биологическими соединениями. В качестве не имеющего ограничительного характера примера антитело может быть связано с интересующим пептидом с образованием связанного с антителом пептида. Связанный с антителом пептид может быть образован путем проведения специфических химических реакций, предназначенных для конъюгирования антитела с пептидом. Антитело может быть ковалентно связано с пептидом посредством линкера. Линкер может быть, например, сначала ковалентно соединен с антителом или пептидом, а впоследствии ковалентно соединен с пептидом или антителом.

Используемый в настоящем документе термин "линкер" относится к химическому модулю, содержащему ковалентную или атомарную цепь, которая ковалентно соединяет антитело с пептидом. Линкер может, например, включать, без ограничений, пептидный линкер, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, и углеводородную цепь.

Используемый в настоящем документе термин "конъюгат" относится к антителу или его фрагменту, ковалентно связанному с фармацевтически активной группой. Термин "конъюгированный с" относится к антителу или его фрагменту, ковалентно связанному или ковалентно соединенному с фармацевтически активной группой, предпочтительно терапевтическим пептидом, напрямую или посредством линкера. В качестве не имеющего ограничительного характера примера антитело может представлять собой моноклональное антитело, а фармацевтически активная группа может представлять собой терапевтический пептид, такой как циклический РУУ или интересующий пептид.

Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, представлены в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если явно не указано иное.

Антитела.

Изобретение можно отнести к новому антителу, которое было сконструировано как ненацеленное и содержащее цистеиновый остаток, с возможной химической конъюгацией (т.е. связыванием) с фармацевтически активной группой, такой как терапевтический пептид (например, циклический пептид РУУ), сайт-специфическое, при этом связанный с антителом пептид имеет удлиненный/увеличенный период полужизни по сравнению с неконъюгированным пептидом. В настоящем изобретении термин "ненацеленный" в контексте антитела относится к антителу, которое специфически не связывается с какой-либо мишенью в условиях *in vivo*. При использовании в настоящем документе антитело, которое "специфически связывается с мишенью" означает антитело, которое связывается с целевым антигеном с KD, равной 1×10^{-8} или менее, предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее, или 1×10^{-10} М или менее. Термин "KD" означает константу диссоциации, которая представляет собой отношение K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражается молярной концентрацией (М). Значения KD для антител можно определять, используя способы из уровня техники, относящиеся к настоящему описанию. Например, KD антитела может быть определена с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с помощью системы биодатчиков, например системы Biacore®, или с использованием технологии интерферо-

метрии биослоев, например системы Octet RED96. Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с целевым антигеном.

Моноклональные антитела (полные или их фрагменты) можно использовать в качестве группы, увеличивающей период полужизни. Моноклональные антитела представляют собой хорошо изученные белки, которые используются и описаны в условиях *in vivo*, и поэтому механизмы, которые обеспечивают их длительный период полужизни в условиях *in vivo*, и механизмы их разрушения в условиях *in vivo*, хорошо известны. Кроме того, пространственное разделение и представление двух "плеч" моноклонального антитела может быть преимущественным для эффективного двухвалентного представления терапевтической группы (т.е. терапевтического пептида). Раскрыты терапевтические средства, в которых токсины или другие низкомолекулярные лекарственные средства химически связаны с моноклональным антителом, но в них, как правило, использовано моноклональное антитело, которое связывается со специфическим антигеном и нацеливает конъюгат лекарственного средства с антителом на интересующую ткань/клетку, которая предпочтительно экспрессирует антиген, и, как правило, лекарственное средство/малая молекула присоединены к антителу способом, который не влияет на связывание антигена с антителом.

Для терапевтических пептид-mAb конъюгатов антиген-специфическое связывание моноклональным антителом, увеличенный период полужизни, является нежелательным. В связи с этим пара вариабельных (V) доменов тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), которые не специфических для какой-либо мишени, использованы для получения способного связываться ненацеленного моноклонального антитела. Для получения способного связываться ненацеленного моноклонального антитела цистеиновый остаток встраивают в одну из определяющих комплементарность областей (CDR) выбранного ненацеленного антитела. Фармацевтически активная группа (например, терапевтический пептид/соединение) может содержать подходящую химическую группу для обеспечения конъюгации фармацевтически активной группы со встроенным цистеиновым остатком ненацеленного моноклонального антитела. Общая стратегия конъюгации пептида с моноклональным антителом показана на фиг. 1.

Термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает нечеловеческие (например, мышьиные, крысиные), человеческие, адаптированные для человека, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, а также одноцепочечные антитела.

Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ). Соответственно, антитела могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела могут включать константные области тяжелой и/или легкой цепи, мышьиных или человеческих антител. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; (CDR1, CDR2 и CDR3)). Домены вариабельной области легкой цепи альтернативно называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgG является наиболее стабильным из пяти типов иммуноглобулинов, причем период полужизни в сыворотке у людей составляет около 23 дней. IgA и IgG дополнительно классифицируют как изоформы IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Каждый из четырех подклассов IgG имеет различные биологические функции, известные как эффекторные функции. Эти эффекторные функции, как правило, опосредованы через взаимодействие с Fc-рецептором (FcγR) или путем связывания C1q и фиксации комплемента. Связывание с FcγR может приводить к антителозависимому клеточно-опосредованному цитолизу, тогда как связывание с факторами комплемента может приводить к комплемент-опосредованному лизису клеток. Антитело, используемое в связи с его способностью увеличивать период полужизни терапевтического пептида, не обладает или обладает минимальной эффекторной функцией, но сохраняет способность связываться с FcRn, связывание с которым может быть основным способом, с помощью которого антитела увеличивают период полужизни в условиях *in vivo*.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельную область легкой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, за исключением HCDR3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически не связывается с каким-либо человеческим антигеном в условиях *in vivo*. В другом случае конъюгат может содержать выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, и вари-

бельную область тяжелой цепи, имеющую полностью человеческие последовательности V-гена зародышевой линии Ig, за исключением HCDR3, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, и фармацевтически активную группу (например, циклический пептид PYY), причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически не связывается с каким-либо человеческим антигеном в условиях *in vivo*. В настоящем описании в отношении антитела или его антигенсвязывающего фрагмента фраза "конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтически активная группа, конъюгированная с ним", используется взаимозаменяемо с фразой "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с фармацевтически активной группой".

Использованный в настоящем документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и сегмент Fd (т.е. участок тяжелой цепи, который включен в Fab-фрагмент). В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

Использованный в настоящем документе термин "одноцепочечное антитело" относится к стандартному для данной области одноцепочечному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом размером от около 15 до около 20 аминокислот. Использованный в настоящем документе термин "однодоменное антитело" относится к стандартному для данной области однодоменному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только вариабельную область тяжелой цепи.

Словосочетание "выделенное антитело или фрагмент антитела" означает антитело или фрагмент антитела, по существу свободный от других антител, имеющих отличающиеся антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с целевым антигеном, по существу свободно от антител, которые специфически не связываются с целевым антигеном). Более того, выделенное антитело или фрагмент антитела может быть по существу свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Вариабельная область антитела состоит из "каркасной" области, разделенной тремя "антигенсвязывающими сайтами". Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), на основании вариабельности последовательностей (Wu and Kabat, *J Exp Med* 132:211-50, 1970; Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) "гипервариабельные участки", HVR или HV - три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3) - обозначают участки вариабельных доменов антитела, которые являются гипервариабельными по структуре согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk *Mol Biol* 196:901-17, 1987). Другие термины включают "IMGT-CDR" (Lefranc et al., *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003) и "использование остатков, определяющих специфичность" (SDRU) (Almagro *Mol Recognit* 17:132-43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (http://www_mgt_org) представлена стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано у Lefranc et al., *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003.

Термины "каркас" или "каркасные последовательности" представляют собой остаточные последовательности вариабельной области, которые отличаются от тех, которые определены как антигенсвязывающие сайты. Так как антигенсвязывающие сайты, как описано выше, могут определяться различными терминами, точная аминокислотная последовательность каркаса зависит от определения антигенсвязывающего сайта.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельную область легкой цепи, имеющую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145 и SEQ ID NO: 146 соответственно, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142 и SEQ ID NO: 143 соответственно.

Выделенное антитело дополнительно может содержать Fc-область, полученную из Fc-области человеческого IgG4. Fc-область человеческого IgG4 обладает пониженной способностью к связыванию с FcγR и факторами комплемента по сравнению с IgG других подтипов. Fc-область предпочтительно содержит Fc-область человеческого IgG4, имеющую замены, которые исключают эффекторную функцию. Таким образом, выделенное антитело дополнительно может включать Fc-область, имеющую модифици-

рованную Fc-область человеческого IgG4, содержащую одну или более из следующих замен: замену пролина на глутамат в положении 233, аланина или валина на фенилаланин в положении 234 и аланина или глутамата на лейцин в положении 235 (нумерация ЕС, Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, Md., NIH Publication no. 91-3242). Удаление участка N-связанного гликозилирования в Fc-области IgG4 путем замены аланина на аспарагин в положении 297 (нумерация ЕС) является еще одним способом устранения остаточной эффекторной активности.

Антитело может существовать в виде димеров, соединенных вместе дисульфидными мостиками и различными нековалентными взаимодействиями. Таким образом, Fc-участок, используемый для антитела, может представлять собой Fc-область человеческого IgG4, содержащую замену, такую как замена серина на пролин в положении 228 (нумерация ЕС), которая стабилизирует образование димера тяжелой цепи и предотвращает образование половинных Fc-цепей IgG4.

В другом варианте может быть удален C-концевой остаток лизина в тяжелой цепи, что часто наблюдается в полученных путем рекомбинации моноклональных антителах.

Термин "антитело человека" относится к антителу, имеющему переменные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит переменные области тяжелой или легкой цепи, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, если переменные области антитела получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулина. Такие системы включают библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши, несущих локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. Антитело человека может содержать аминокислотные отличия по сравнению с зародышевой линией человека или перестроенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, соматическими мутациями природного происхождения или намеренным введением замен в каркасные или антигенсвязывающие сайты. Как правило, антитело человека по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческой зародышевой линии или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в публикации Knappik et al., J Mol Biol 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO 2009/085462). Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

Выделенные гуманизированные антитела могут быть синтетическими. Антитела человека, хотя и полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включая синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антител, что приводит к получению антител, которые в естественных условиях не входят в набор антител человека зародышевой линии в условиях *in vivo*.

Термин "рекомбинантное антитело" в настоящем документе включает все антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, например антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам человеческого иммуноглобулина, или из полученной из него гибридомы, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые включают сплайсинг генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК, или антитела, созданные *in vitro* с помощью обмена плеч Fab.

Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе относится к препарату молекул антитела одномолекулярной композиции. Моноклональные антитела можно получать с использованием гибридомного способа, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов одиночных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В предпочтительных вариантах термин "mAb" можно отнести к моноклональному антителу, имеющему последовательность переменного участка тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO: 137, и последовательность переменного участка легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 139. В предпоч-

ительных вариантах mAb может представлять собой полностью человеческое моноклональное антитело, имеющее последовательность тяжелой цепи (HC), содержащую SEQ ID NO: 138, и последовательность легкой цепи (LC), содержащую SEQ ID NO: 140. В предпочтительных остаток лизина в положении 446 в SEQ ID NO: 138 может отсутствовать.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Варибельная область легкой и тяжелой цепей часто соответствует варибельной области антитела, полученного из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющего желаемые специфичность, аффинность и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного из другого вида млекопитающего (например, человека), для предотвращения возникновения иммунного ответа у данного вида.

Использованный в настоящем документе термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, которое содержит множество последовательностей варибельного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность варибельного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания к первому эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, а вторая последовательность варибельного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и при этом первый и/или второй варибельные домены иммуноглобулина необязательно включают конъюгированную фармацевтически активную группу (например, терапевтический пептид). В одном варианте первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). Возможны следующие варианты: первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются; первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются; первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка; первый и второй варибельные домены иммуноглобулина включают одну и ту же конъюгированную фармацевтически активную группу; первый и второй варибельные домены иммуноглобулина включают различные фармацевтически активные группы; первый варибельный домен иммуноглобулина включает конъюгированную фармацевтически активную группу; только второй варибельный домен иммуноглобулина включает конъюгированную фармацевтически активную группу; мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый варибельный домен иммуноглобулина; мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, триспецифического антитела или тетраспецифического антитела.

Использованный в настоящем документе термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов и/или содержит две конъюгированные фармацевтически активные группы (например, одинаковые или различные фармацевтически активные группы). Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью варибельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и второй последовательностью варибельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу или содержит последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и при этом первый и/или второй варибельные домены иммуноглобулина необязательно включают конъюгированную фармацевтически активную группу. Первый и второй эпитопы могут быть расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). И возможны следующие варианты: первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются; первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка; первый и второй варибельные домены иммуноглобулина включают одну и ту же конъюгированную фармацевтически активную группу; первый и второй варибельные домены иммуноглобулина включают различные фармацевтически активные группы; только первые варибельные домены иммуноглобулина включают конъюгированную фармацевтически активную группу; только второй варибельный домен иммуноглобулина включает конъюгированную фармацевтически активную группу. Возможно также, что биспецифическое антитело содержит первую последовательность варибельного домена тяжелой цепи и последовательность варибельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания к первому эпитопу или содержат последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и вторую последовательность варибельного домена тяжелой цепи и последовательность варибельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания ко второму эпитопу или содержат последовательности зародышевой линии, не имеющие какой-либо известной специфичности связывания, и при этом первый и/или второй варибельные домены тяжелой цепи необязательно включают конъюгированную фармацевтически активную группу. Также возможно, что первый и второй варибельные домены тяжелой цепи включают одну и ту же конъюгированную фармацевтически активную группу; первый и второй варибельные

домены тяжелой цепи включают различные конъюгированные фармацевтически активные группы; только первый переменный домен тяжелой цепи включает конъюгированную фармацевтически активную группу; только второй переменный домен тяжелой цепи включает конъюгированную фармацевтически активную группу.

Термин "полноразмерное антитело" в настоящем документе означает антитело, имеющее две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Тяжелая цепь (HC) полноразмерного антитела состоит из хорошо известных переменных и константных доменов тяжелой цепи VH, CH1, CH2 и CH3. Полноразмерная легкая цепь антитела (LC) состоит из хорошо известных переменных и константных доменов легкой цепи VL и CL. Полноразмерное антитело может не содержать C-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях.

Термин "Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару "тяжелая цепь - легкая цепь", которая специфически связывается с антигеном.

Полноразмерные биспецифические антитела можно получать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, посредством введения в CH3-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замен, способствующих образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации CH3-доменов. Восстановлены дисульфидные мостики тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидный мостик тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно происходит высвобождение CH3-доменов исходных антител и перестроение путем диссоциации-ассоциации. CH3-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча или полумолекулы, каждое из которых могут связываться с отдельным эпитопом.

Термин "гомодимеризация" в настоящем документе применительно к антителам обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности CH3. При использовании в настоящем документе термин "гомодимер" по отношению к антителам означает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями CH3.

При использовании в настоящем документе термин "гетеродимеризация" по отношению к антителам означает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности CH3. При использовании в настоящем документе термин "гетеродимер" по отношению к антителам означает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями CH3.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию PCT № WO 2006/028936). Другими словами, выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами CH3 в человеческом IgG, можно подвергнуть мутациям в положениях, влияющих на взаимодействия доменов CH3, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в CH3, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности CH3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности CH3, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US 2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене CH3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам биспецифического антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде посредством введения асимметричных мутаций в CH3-участках двух моноспецифи-

ческих гомодимерных антител и образования биспецифических гетеродимерных антител из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации международной патентной заявки № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело конструируют с возможностью обладания определенными заменами в домене СН3, способствующими стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая, таким образом, биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (DTT), дитиозеритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

Нумерация аминокислотных остатков в константном участке антитела в настоящем описании осуществляется в соответствии с каталогом ЕС, как описано в публикации Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), если явно не указано иное.

Конъюгаты.

Изобретение также можно отнести к конъюгату, содержащему антитело, ковалентно конъюгированное с фармацевтически активной группой, такой как синтетический терапевтический пептид (например, циклический пептид), сайт-специфическим образом так, что связанный с антителом пептид имеет удлиненный/увеличенный период полужизни по сравнению с неконоъюгированным пептидом. Изобретение также можно отнести к фармацевтическим композициям и способам их применения. Конъюгаты используют для профилактики, лечения или облегчения симптомов заболеваний или нарушений, например, среди прочих, ожирения, диабета 2 типа, метаболического синдрома (т.е. синдрома X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (ЧИ), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечнососудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы.

Антитело можно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало по меньшей мере одну замену цистеинового остатка, которая обладает возможностью конъюгирования с фармацевтически активной группой для удлинения/увеличения периода полураспада фармацевтически активной группы. В предпочтительных вариантах по меньшей мере одна замена цистеинового остатка содержится в определяющей комплементарности области антитела. В предпочтительных вариантах по меньшей мере одна замена цистеинового остатка находится в определяющей комплементарности области тяжелой цепи (HCDR). В предпочтительных вариантах по меньшей мере одна замена цистеинового остатка находится в HCDR3, причем HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143. В предпочтительных вариантах антитело, содержащее HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143, имеет по меньшей мере одну дополнительную цистеиновую замену, которая обладает возможностью конъюгирования с фармацевтически активной группой.

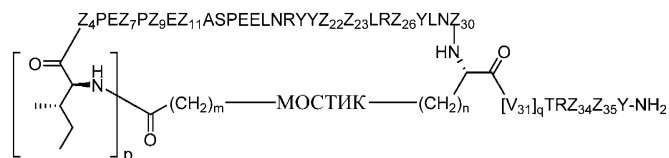
Фармацевтически активная группа может содержать линкер. Линкер можно химически модифицировать для обеспечения конъюгирования антитела с фармацевтически активной группой. Линкер может, например, включать, без ограничений, пептидный линкер, углеводородный линкер, полиэтиленгликолевый (PEG) линкер, полипропиленгликолевый (PPG) линкер, полисахаридный линкер, полиэфирный линкер, гибридный линкер, состоящий из PEG и внедренного гетероцикла, или углеводородную цепь. ПЭГ-линкеры могут, например, содержать 2-24 ПЭГ-звеньев.

Моноклональное антитело может быть конъюгировано с одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью интересующими фармацевтически активными группами (например, терапевтическим(-ими) пептидом(-ами)). Ненацеленное моноклональное антитело конъюгировано с двумя интересующими фармацевтически активными группами. Если моноклональное антитело конъюгировано с по меньшей мере двумя интересующими фармацевтически активными группами, интересующие фармацевтически активные группы могут представлять собой одну и ту же фармацевтически активную группу или могут представлять собой различные фармацевтически активные группы.

Способы конъюгирования антител изобретения с фармацевтически активными группами изобретения известны в данной области. Другими словами, антитела можно восстанавливать с помощью восста-

навливающего агента (например, ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфин)), очищенного (например, посредством адсорбции на белке А или гель-фильтрации) и конъюгированного с фармацевтически активной группой (например, посредством добавления лиофилизированного пептида к восстановленному антителу в условиях, обеспечивающих конъюгацию). После реакции конъюгации конъюгат может быть очищен с помощью ионообменной хроматографии или гидрофобной хроматографии (НІС) с последующим выполнением конечной стадии очистки путем адсорбции на белке А. В предпочтительных вариантах антитела могут быть очищены перед восстановлением с использованием способов НІС. Более подробное описание способов конъюгации приведено, например, в примере 103 и публикации Dennler et al., *Antibodies* 4:197-224 (2015).

В настоящем изобретении раскрыты конъюгаты, содержащие моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с циклическим пептидом РУУ, причем циклический пептид РУУ представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

где p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

Z_7 представляет собой A или K;

Z_9 представляет собой G или K;

Z_{11} представляет собой D или K;

Z_{22} представляет собой A или K;

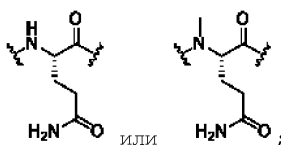
Z_{23} представляет собой S или K;

Z_{26} представляет собой A или H;

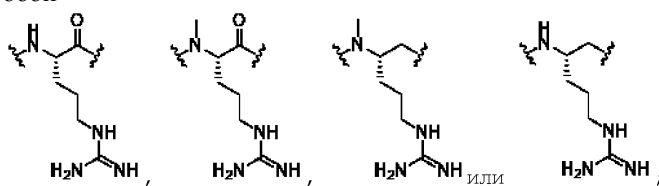
Z_{30} представляет собой L, W, K или отсутствует;

при условии, что Z_{30} отсутствует, только если q равно 1;

Z_{34} представляет собой



Z_{35} представляет собой



причем производное представляет собой соединение формулы I, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, гликозилирования, карбамилрования, сульфирования, фосфорилирования, циклизации, липидизации и пегилирования.

Циклический пептид РУУ может представлять собой производное циклического пептида РУУ формулы I, которое модифицировано одним или более процессами, выбранными из группы, состоящей из амидирования, липидизации и пегилирования, или его фармацевтически приемлемую соль.

Циклический пептид РУУ можно представить соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

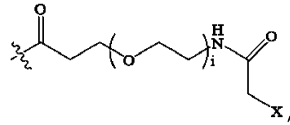
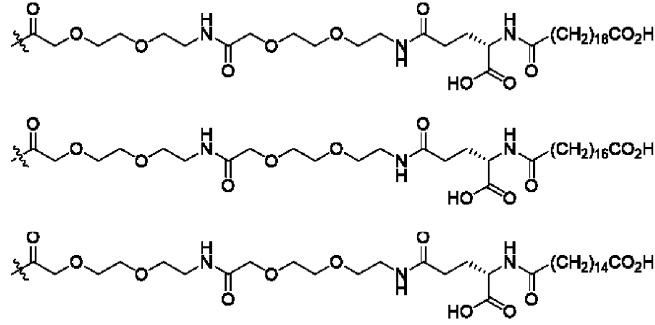
q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой К, А, Е, S или R;

Z_7 представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замеще-

на

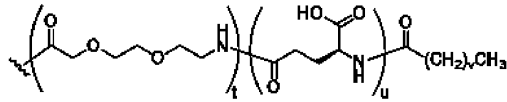


где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_9 представляет собой G или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замеще-

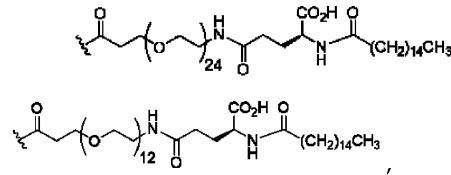
на

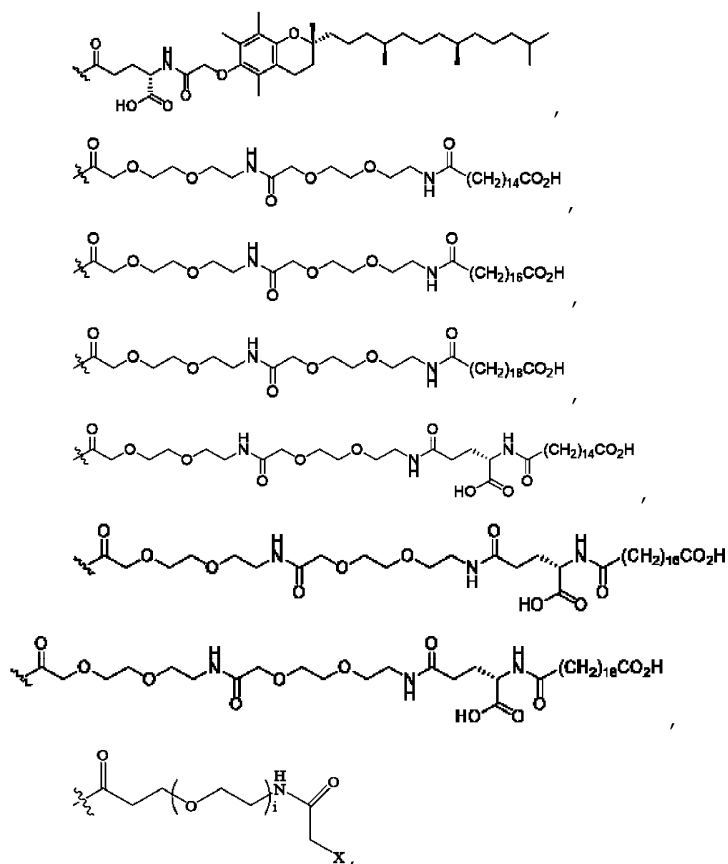


где t равно 0, 1 или 2;

u равно 0 или 1; и

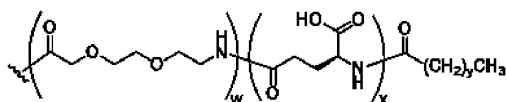
v равно 14, 16 или 18;





где i представляет собой целое число от 0 до 24 и $X = \text{Br}$, I или Cl , $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

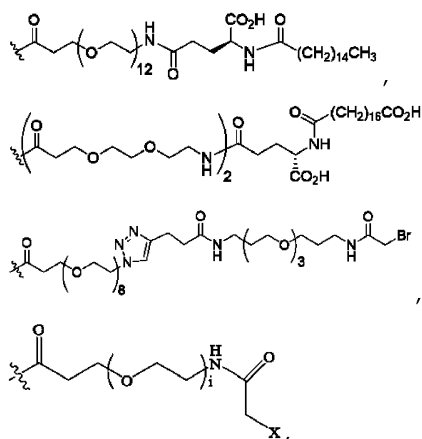
Z_{11} представляет собой D или K, причем боковая аминная цепь указанного K необязательно замещена



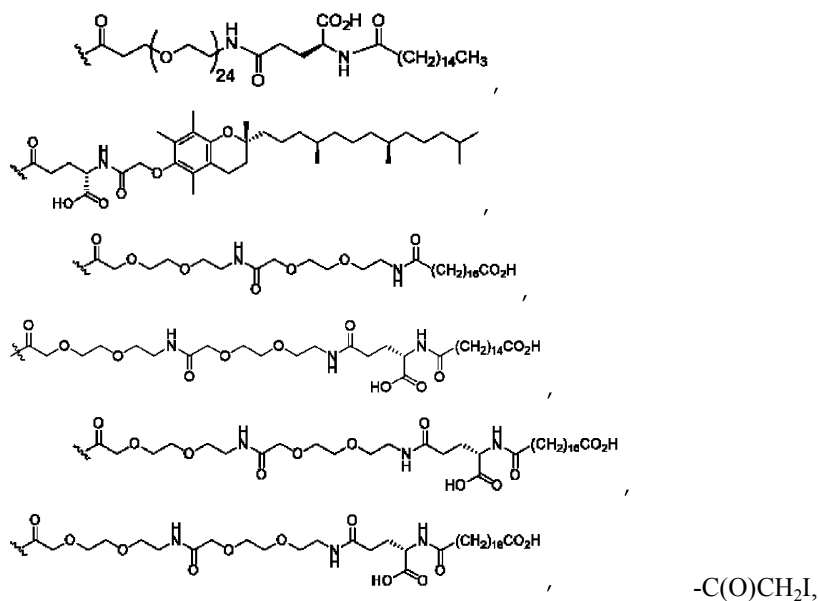
где w равно 0, 1, 2 или 4;

x равно 0 или 1; и

y равно 14, 16 или 18;

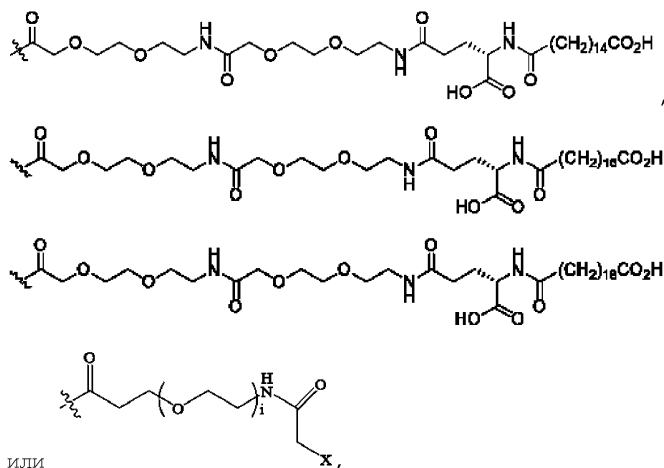


где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,



-C(O)CH₂Cl или -C(O)CH₂Br;

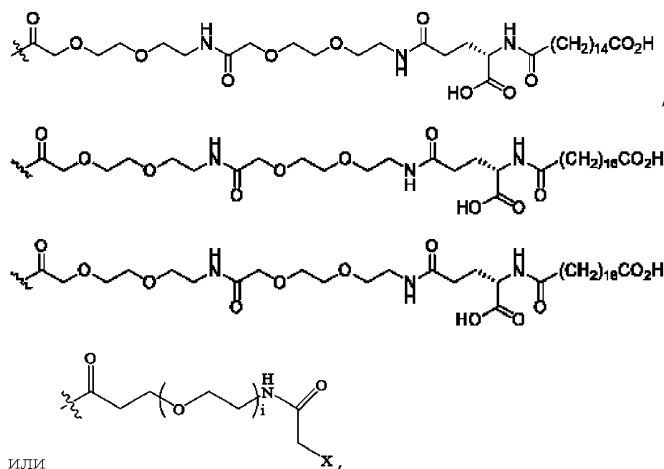
Z₂₂ представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замещена



где *i* представляет собой целое число от 0 до 24 и X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₃ представляет собой S или К; причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замещена

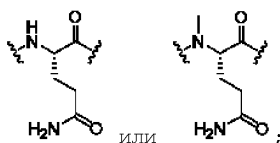


где *i* представляет собой целое число от 0 до 24 и X=Br, I или Cl,

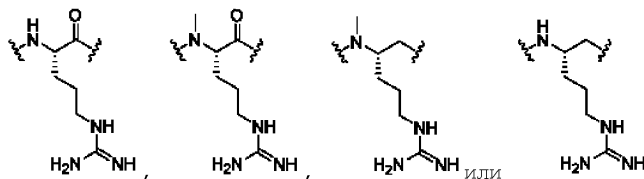
-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

Z₂₆ представляет собой А или Н;

Z₃₀ представляет собой L, W, К или отсутствует при условии, что Z₃₀ отсутствует, только если q



Z_{35} представляет собой



Кроме того, циклический пептид РУУ можно представить соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

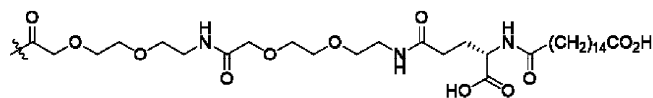
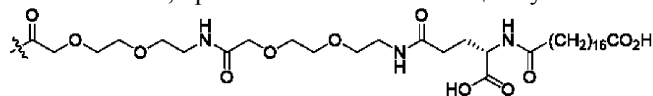
n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

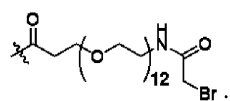
МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой К, А, Е, S или R;

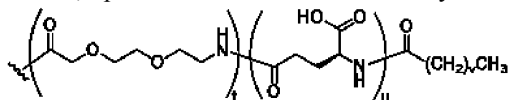
Z_7 представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена



ИЛИ



Z_9 представляет собой G или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

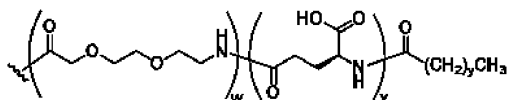


где t равно 0;

u равно 1; и

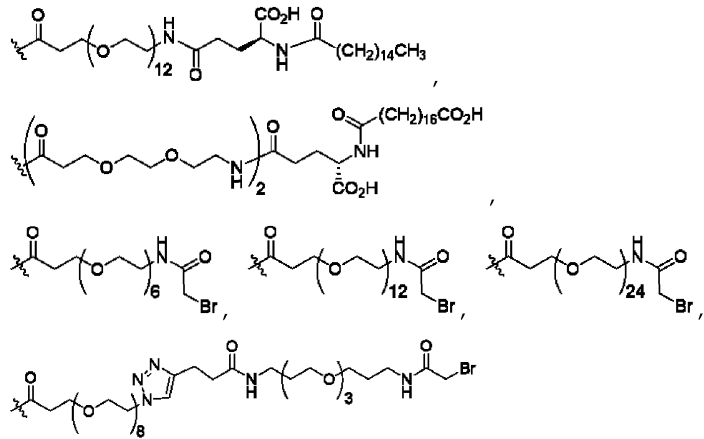
v равно 14;

Z_{11} представляет собой D или К, причем боковая аминная цепь указанного К необязательно замещена

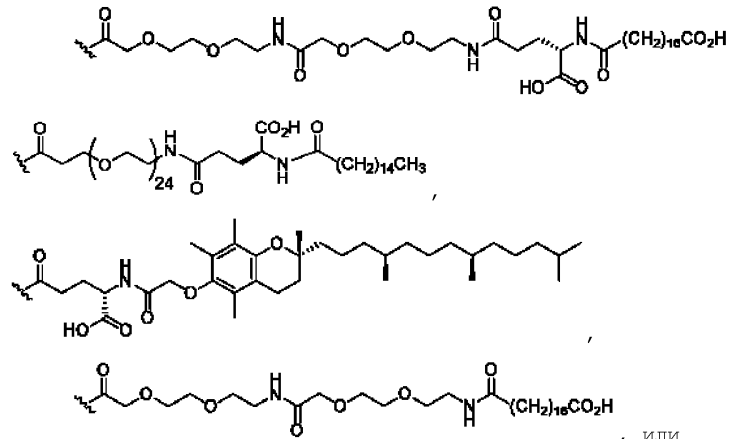


где w равно 0 или 4; x равен 1; и

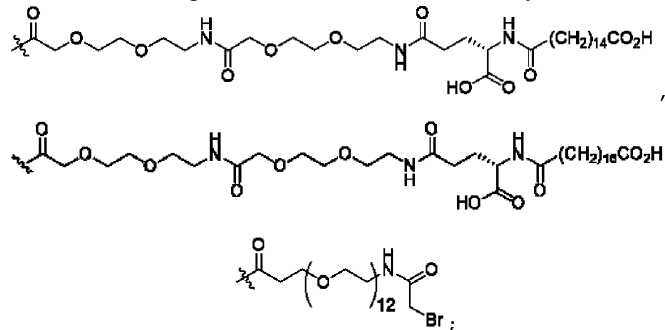
u равен 14;



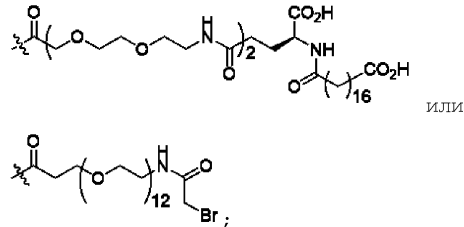
-C(O)CH₂Br,



Z₂₂ представляет собой А или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

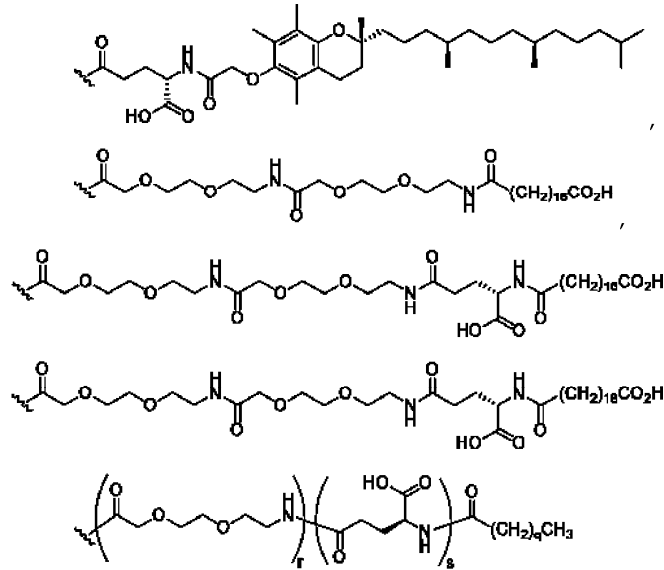


Z₂₃ представляет собой S или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена

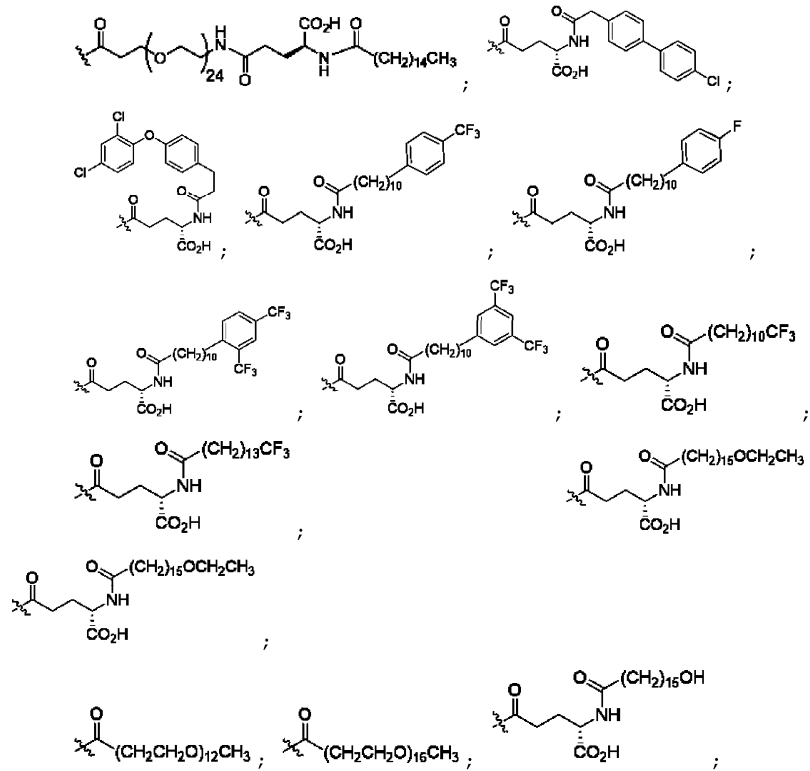


Z₂₆ представляет собой А или Н;

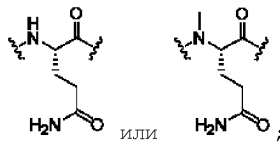
Z₃₀ представляет собой L или К, причем боковая аминная цепь указанного К замещена



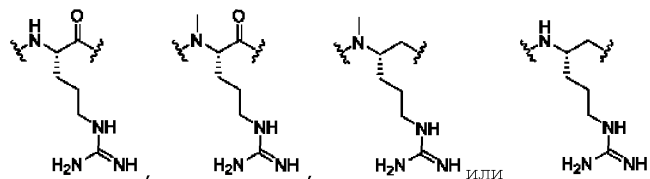
где r составляет 0 или 2;
 s составляет 1; и
 q равно 14, 16 или 18; или



Z_{34} представляет собой



Z_{35} представляет собой



Конъюгат может содержать моноклональное антитело или его фрагмент, конъюгированный с цик-

лическим пептидом PYY, причем циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1-100 и SEQ ID NO: 147-156. Конъюгат может содержать моноклональное антитело или его фрагмент, конъюгированный с циклическим пептидом PYY, причем циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73-100 и SEQ ID NO: 147-156.

Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть ковалентно связано с циклическим пептидом PYY остатком лизина циклического пептида PYY посредством линкера. Линкер может, например, представлять собой линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG)8-триазолил-CH₂CH₂CO-PEG4, цепочки PEG из 2-24 PEG-звеньев, алкильной цепочки, содержащей 2-10 атомов углерода, (Gly₄Ser)_j, причем j=1-4, (AlaPro)_u, при этом u=1-10, или связи.

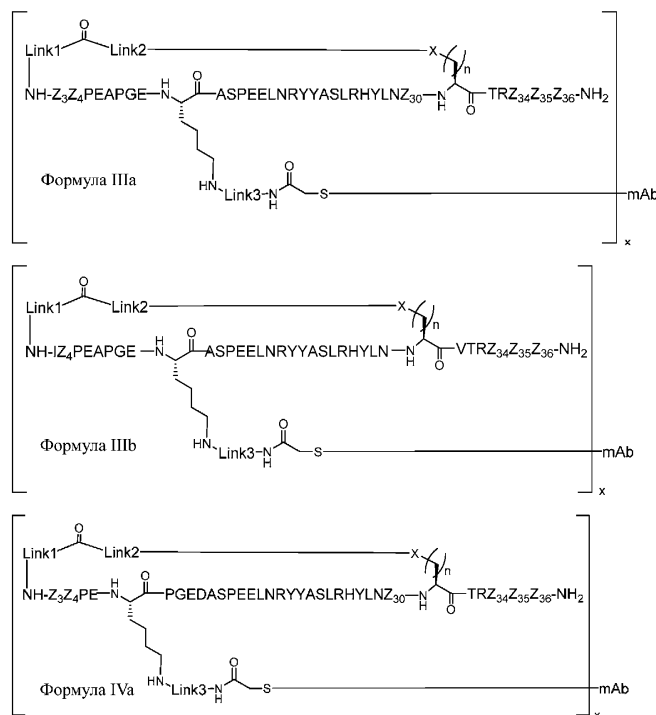
Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгировано с циклическим пептидом PYY в одном или большем числе положений аминокислот циклического PYY, таких как аминокислотный остаток 4, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 30 или 31 PYY, с применением способов, известных в данной области техники. Нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации hPYY₃₋₃₆. Причем только один из Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ и Z₂₃ в формуле I может представлять собой лизин, и лизин ковалентно связан с внедренным цистеиновым остатком моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера.

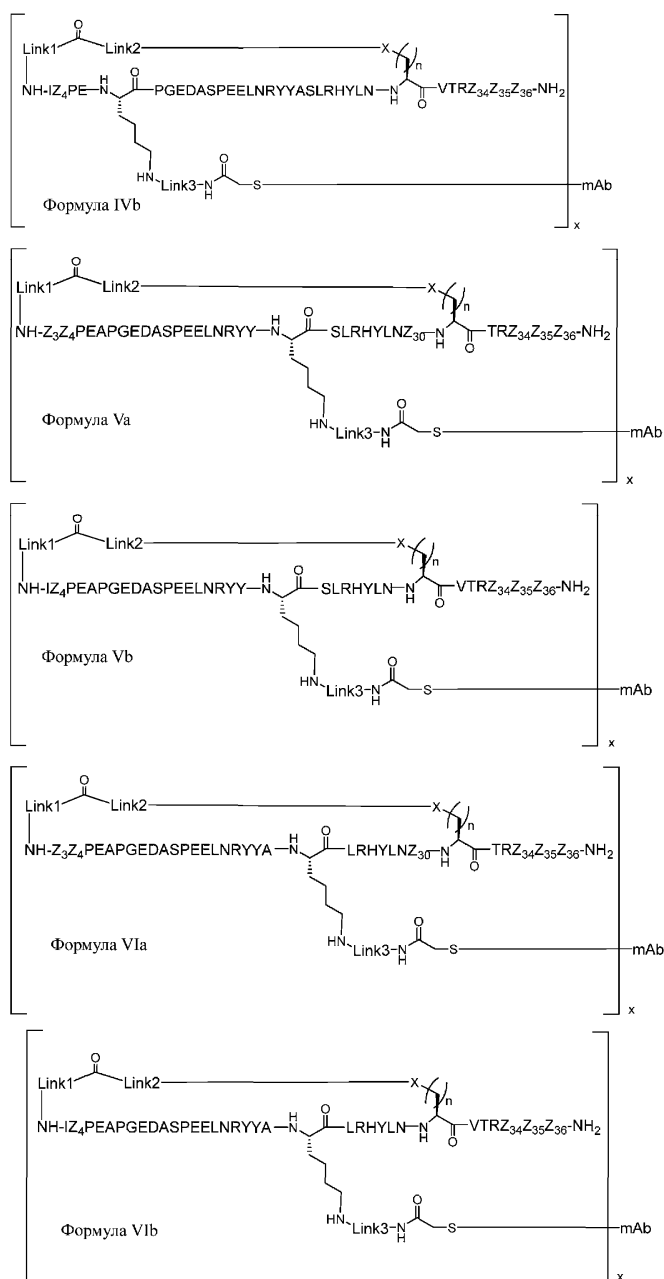
Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть конъюгирован с циклическим пептидом PYY на остатке 11 циклического PYY. Электрофильное соединение, такое как бромацетамид или малеимид, также можно вводить в боковую цепь циклического PYY, например в аминную боковую цепь лизина в остатке 11 циклического PYY, и это электрофильное соединение вступает в реакцию сайт-специфическим образом с сульфгидрильной группой остатка Cys, встроенного в участок CDR, предпочтительно HCDR3, моноклонального антитела или его фрагмента с образованием, таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом PYY и моноклональным антителом или его фрагментом.

Циклический пептид PYY может быть выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 73-100 и SEQ ID NO: 147-156. В одном варианте электрофильное соединение можно вводить непосредственно в боковую цепь циклического PYY. В другом варианте электрофильное соединение можно вводить в боковую цепь циклического PYY напрямую при помощи линкера.

Кроме того, в изобретении раскрыты фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты и дополнительно содержащие фармацевтически приемлемый носитель.

Конъюгаты могут содержать моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанные с циклическим пептидом PYY, причем конъюгаты представлены формулой IIIa-b, IVa-b, Va-b и/или VIa-b соответственно.





В формулах IIIa-b, IVa-b, Va-b и VIa-b,

x может быть равен, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 2.

Соединительный элемент 1 может, например, представлять собой G, β A, $-\text{COCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, γ -аминобутианоил, GG, CO $(\text{CH}_2)_m\text{SCH}_2-$ (при условии, что соединительный элемент 2= $-\text{NH}-$, m=1, 2) или связь;

соединительный элемент 2 может, например, представлять собой $-\text{CH}_2-$, бензил, этилтриазолил, $-\text{NH}-$ или связь;

n может быть равно, например, 1, 2 или 3;

X может, например, представлять собой $-\text{S}-$ или $-\text{CH}_2-$;

Z₃ может, например, представлять собой I или связь;

Z₄ может, например, представлять собой K, S или R;

Z₃₀ может, например, представлять собой L, W, K (mPEG16) или K (mPEG12);

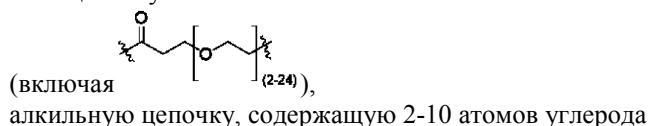
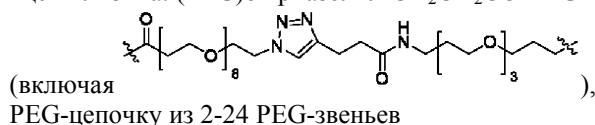
Z₃₄ может, например, представлять собой Q, причем указанный Q необязательно N-метилирован по альфа-амидному азоту;

Z₃₅ может, например, представлять собой R, причем указанный R необязательно N-метилирован по альфа-амидному азоту, или R является декарбонилированным с образованием ψ -(Z₃₅Z₃₆)-амидной связи, или R является как N-метилированным по альфа-амидному азоту, так и декарбонилированным с образованием ψ -(Z₃₅Z₃₆)-амидной связи;

Z₃₆ может, например, представлять собой Y (Tyr), Cha (β -циклогексилаланин), Aic (2-аминоиндан-2-

карбоновую кислоту) или F (Phe), причем указанный F необязательно содержит в пара-положении заместитель в виде фтора (4-F-Phe), хлора (4-Cl-Phe), брома (4-Br-Phe), йода (4-I-Phe), аминогруппы (4-NH₂-Phe); и

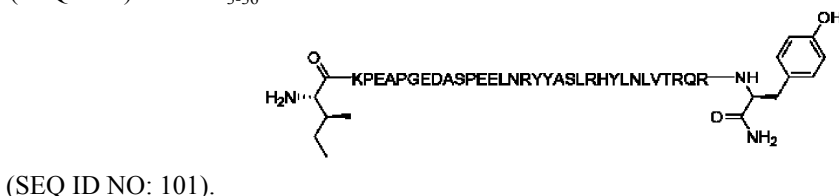
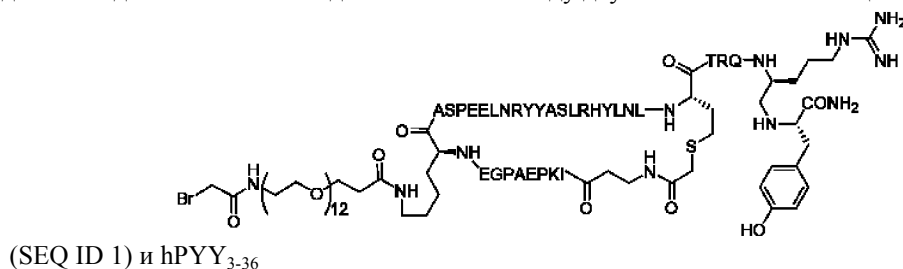
соединительный элемент 3 может, например, содержать любое из следующих амидирований в боковой цепи лизина: (PEG)8-триазилил-CH₂CH₂CO-PEG4



(включая C_{(1-9)alkyl}), (Gly₄Ser)_j, причем j=1-4, (AlaPro)_u, при этом u=1-10, или -NH-соединительный элемент 3- может быть замещен связью.

Кроме того, может быть получен конъюгат, содержащий моноклональное антитело (mAb) или его антигенсвязывающий фрагмент, связанное с циклическим пептидом PYY (сPYY) посредством линкера (L):сPYY-L₂-mAb, причем конъюгат содержит последовательность циклического PYY, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102-127 или ее фармацевтически приемлемой соли, mAb представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент а]₂ представляет собой 1 или 2 циклических пептида PYY, которые ковалентно связаны с mAb.

Кроме того, в настоящем документе описаны циклические аналоги PYY с N-концом, присоединенным к боковой цепи, демонстрирующие по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичность последовательности по отношению к человеческому PYY₃₋₃₆ (hPYY₃₋₃₆). В качестве примера способа определения идентичности последовательности между двумя аналогами совмещены два пептида



Идентичность последовательности аналога по отношению к hPYY₍₃₋₃₆₎ выражается общим числом выравненных остатков за вычетом числа отличных остатков (т. е. числом выравненных идентичных остатков), поделенным на общее число остатков в hPYY₃₋₃₆. В данном примере отличными остатками являются D11, которые заменили на замещенный K11, затем на V31, который заменили на hC31, и, наконец, R35 декарбонилировали. Соответственно, в указанном примере идентичность последовательности составляет (34-3)/34×100.

Циклические пептиды PYY.

PYY₃₋₃₆ представляет собой эндогенный гормон, секретируемый L клетками в дистальном отделе кишечника, который выступает в качестве агониста рецептора Y2 для ингибирования потребления пищи. Учитывая его роль в контроле аппетита и потребления пищи, а также его анти-секреторные эффекты и эффекты, стимулирующие всасывание, в желудочно-кишечном тракте у млекопитающих, PYY₃₋₃₆ может быть эффективен при лечении ожирения и связанных с ним состояний, а также при ряде желудочно-кишечных расстройств. Однако терапевтическая полезность самого PYY₃₋₃₆ в качестве лечебного агента ограничена его быстрым метаболизмом и коротким периодом полужизни в кровотоке. Таким образом, настоящее изобретение можно отнести к модифицированным конъюгатам PYY₃₋₃₆, которые увеличивают период полужизни пептида PYY₃₋₃₆ и снижают метаболизм пептида в условиях *in vivo*.

В предпочтительных вариантах модифицированные пептиды PYY₃₋₃₆ могут представлять собой циклические пептиды PYY. Термины "циклический пептид PYY", "циклический аналог PYY₃₋₃₆" и "циклический аналог пептида PYY₃₋₃₆" можно использовать взаимозаменяемо. Примеры циклических пепти-

дов PYY, которые можно использовать в конъюгатах, описаны в заявке на патент США № 62/413,613, поданной 27 октября 2016 г., и в заявке на патент США под названием "Cyclic peptide tyrosine tyrosine compounds as modulators of neuropeptide receptors", поданной в тот же день, что и настоящая заявка с номером досье патентного поверенного № PRD3411, содержание которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

В контексте настоящего документа, термин "NTSC-PYY" предназначен для описания циклических аналогов PYY между N-концом и боковой цепью.

Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, написаны в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если явно не указано иное. Для удобства описания молекул настоящего используются традиционные и нетрадиционные аббревиатуры различных аминокислот (включающие кодировку как одной, так и тремя буквами) и функциональных фрагментов. Эти сокращения хорошо известны специалистам в данной области техники, но для ясности они перечислены следующим образом: A=Ala=аланин; R=Arg=аргинин; N=Asn=аспарагин; D=Asp=аспарагиновая кислота; β A= β Ala =бета-аланин; C=Cys=цистеин; hC=hCys=гомоцистеин; E=Glu=глутаминовая кислота; Q=Gln=глутамин; G=Gly=глицин; H=His=гистидин; I=Ile=изолейцин; L=Leu=лейцин; K=Lys=лизин; Nle=норлейцин; F=Phe=фенилаланин; P=Pro=пролин; S=Ser=серин; T=Thr=треонин; W=Trp=триптофан; Y=Tyr=тирозин и V=Val=валин.

Для удобства, порядок нумерации аминокислотных остатков, используемый для наименования пептидов NTSC-PYY, соответствует порядку нумерации hPYY₃₋₃₆. Специфические замены аминокислот, которые были введены в пептиды NTSC-PYY, по отношению к нативным остаткам в соответствующих положениях в hPYY₃₋₃₆, обозначены соответствующим кодом аминокислоты, за которым следует положение замещения. Таким образом, "S4" в пептиде NTSC-PYY относится к пептиду, в котором соответствующий нативный остаток lys4 hPYY₃₋₃₆ заменили серином. Аналогичным образом "hC31" в пептиде NTSC-PYY относится к пептиду, в котором соответствующий нативный остаток val31 hPYY₃₋₃₆ заменили гомоцистеином. Дополнительные замены аминокислот, имеющие место в пептидах NTSC-PYY, описаны в соответствии с данным порядком и будут признаны специалистами в данной области техники как таковые.

Кроме того, для удобства порядок наименования, используемый для пептидов NTSC-PYY согласно изобретению, включает аминокислотные остатки, включенные в цикл вместе со связующей группой (-ами) между ними, в направлении слева направо, начиная с N-концевого остатка, включенного в цикл. Во всех случаях N-концевой аминокислотный остаток цикла связан посредством своей α -аминной функциональной группы со связующей группой, которая, в свою очередь, соединяется с остатком боковой цепи аминокислоты в положении 31 пептида NTSC-PYY. Таким образом, термин "цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31)" используют для описания цикла пептида NTSC-PYY, в котором α -аминная функциональная группа Пе3 ацилирована с остатком мета-толуоловой кислоты, чья метильная группа дополнительно связана посредством тиоэфирной связи с боковой цепью остатка hCys31. Аналогичным образом термин "цикло-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31)" используют для описания цикла пептида NTSC-PYY, в котором удален нативный остаток Пе3 и чья (теперь N-концевая) α -аминная функциональная группа lys4 ацилирована 3-ацетамидопропаноильной группой, в которой ацетамидо-метиленовый атом углерода присоединен к боковой цепи остатка hCys31 посредством тиоэфирной связи.

Остатки лизина могут быть введены в различные положения последовательности hPYY₃₋₃₆ для обеспечения удобной функциональной подцепи для дополнительной дериватизации. Лизиновые остатки можно модифицировать как для прямого, так и для непрямого связывания с моноклональным антителом. В непрямом связывании с моноклональным антителом лизиновый остаток можно модифицировать таким образом, чтобы он содержал линкер, который позволит связать циклический пептид PYY с моноклональным антителом. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в качестве таковых можно также эффективно использовать соответствующие ортологи, рассмотренные в настоящем документе.

Термин "K(γ -Glu)", присутствующий в пептидной последовательности, представляет собой лизинильный остаток, ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована γ -карбоксылльной группой глутаминовой кислоты.

Термин "K(γ -Glu-Pal (пальмитоил))" означает лизинильный остаток, ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована γ -карбоксылльной группой N-гексадекан-1-оилглутаминовой кислоты.

Термин "K (γ -Glu-Stear (стеароил))" означает лизинильный остаток, ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована γ -карбоксылльной группой N-октадекан-1-оилглутаминовой кислоты.

Термин "K (γ -Glu-Arach (арахидоил))" означает лизинильный остаток, ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована γ -карбоксылльной группой N-додекан-1-оилглутаминовой кислоты.

Термин "K(OEG) (8-амино-3,6-диоксаоктаноил)" означает лизинильный остаток, ϵ -аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислотой.

Термин "(OEG)₂" означает два OEG-звена, последовательно связанных друг с другом посредством

амидной связи (т.е. 17-амино-10-оксо-3,6,12,15-тетраокса-9-азагептадекановую кислоту).

Термин "K(OEG)₂" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 17-амино-10-оксо-3,6,12,15-тетраокса-9-азагептадекановой кислотой.

Термин "K((OEG)₂-γ-Glu" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована (22S)-22-амино-10,19-диоксо-3,6,12,15-тетраокса-9,18-дiazатрикозандикарбоновой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K((OEG)₂-γ-Glu-Stear)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована (22S)-10,19-диоксо-22-стеарамидо-3,6,12,15-тетраокса-9, 18-diazатрикозандикарбоновой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована (21S)-9, 18, 23-триоксо-2,5,11,14-тетраокса-8,17,22-триазанонантриаконтан-1,21,39-трикарбоновой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Аналогичным образом термин "K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₈CO₂H)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована (21S)-9, 18, 23-триоксо-2,5,11,14-тетраокса-8,17,22-триазагептактетрааконтан-1,21,41-трикарбоновой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K((OEG)₂-COC₁₆CO₂H)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 10,19-диоксо-3,6,12,15-тетраокса-9,18-diazагексаатриаконтандикарбоновой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(PEG24-AcBr)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована N-бромацетил-75-амино-4,7,10,13,16, 19,22,25,28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73-тетракозаоксапентагептактантановой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(PEG12-AcBr)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована N-бромацетил-39-амино-4,7,10,13,16,19,22,25, 28,31,34,37-додекаоксанонатриаконтантановой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(PEG6-AcBr)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована N-бромацетил-3-[(17-амино-3,6,9,12,15-пентаоксагептадец-1-ил)окси]-пропановой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(PEG8-триазолил-CH₂CH₂CO-PEG4-AcBr)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 27-[4-[2-[3-[2-[2-[3-(N-бромацетиламино)пропокси]этокси]этокси]пропиламинокарбонил]этил]тетразол-1-ил]-4,7,10,13,16,19,22,25-октагептакозановой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(mPEG16)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49-гексаоксапентактантановой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "K(mPEG12)" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-додекаоксаоктатриаконтантановой кислотой посредством ее 1-карбоксильной функциональной группы.

Термин "VitE" означает α-токоферолильное звено в молекуле.

Термин "AcVitE" означает α-токоферолильное звено, фенольная группа которого имеет метиленил-карбоксылную функциональную группу, связанную с эфиром.

Термин "K-γ-Glu-AcVitE" означает лизинильный остаток, ε-аминогруппа боковой цепи которого ацилирована (2-(((2R)-2,5,7, 8-тетраметил-2- ((4R, 8R)-4,8,12-триметилтридецил)хроман-6-ил)окси)ацетил)-L-глутаминовой кислотой посредством ее γ-карбоксильной функциональной группы.

Многие из соединений/конъюгатов настоящего изобретения, включают восстановленную амидную связь между C-концевым остатком последовательности, Y36 и смежным с ним остатком R35. Эта восстановленная амидная связь представлена термином "psi-(R35,Y36)".

Различные аминокислотные остатки, содержащие определенные последовательности, составляющие предмет настоящего изобретения, содержат метилированные α-аминогруппы. Таким образом, термины "N-Me-Q34" или "N-Me-R35" означают α-N-метилированный глутамин в положении 34 последовательности, и α-N-метилированный аргинин в положении 35 последовательности соответственно.

Термин "N-Me-Q34, psi-(R35,Y36)" в описании последовательности относится к последовательности, содержащей как α-метилглутаминовый остаток в положении 34, так и восстановленную амидную связь между остатками R35 и Y36.

Аналогичным образом термин "N-Me-R35, psi-(R35,Y36)" в описании последовательности относится к последовательности, содержащей как α-метиларгининовый остаток в положении 35, так и восстановленную амидную связь между этим остатком и Y36.

Фрагменты, продлевающие период полужизни.

В дополнение к антителу настоящей заявки или его антигенсвязывающему фрагменту конъюгаты могут включать одну или более других групп для увеличения периода полужизни фармацевтически активной группы (например, циклический пептид), например, посредством ковалентного взаимодействия. Примеры других продлевающих период полужизни групп включают, без ограничений, альбумин, варианты альбумина, альбумин-связывающие белки и/или домены, трансферрин и их фрагменты и аналоги. Дополнительные увеличивающие период полужизни группы, которые могут быть введены в конъюгаты, включают, например, молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, мирилат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандикарбоновая кислота, тетрадекадикарбоновая кислота, октадекадикарбоновая кислота, докозандикарбоновая кислота и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлоза, олиго- или полисахариды) для получения желаемых свойств. Данные фрагменты могут представлять собой результаты прямого слияния с кодирующими белковый каркас последовательностями, и их можно получать с помощью стандартных методик клонирования и экспрессии. В альтернативном варианте осуществления для присоединения групп к полученным путем рекомбинации или химической модификации конъюгатам можно использовать хорошо известные способы химического связывания.

К молекулам пептида можно добавлять, например, пегильный фрагмент путем добавления цистеинового остатка к С-концу молекулы и присоединения пегильной группы к цистеину с помощью хорошо известных способов.

Пептидные молекулы, включающие дополнительные группы, можно сравнивать по функциональности с помощью нескольких известных анализов. Например, биологическую или фармакокинетическую активность интересующего неконъюгированного или конъюгированного терапевтического пептида можно анализировать с применением известных анализов *in vitro* или *in vivo* и сравнивать.

Фармацевтические композиции.

Изобретение можно отнести к фармацевтической композиции, содержащей конъюгаты, и соединения, и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция" в контексте настоящего документа означает продукт, содержащий конъюгат, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Конъюгаты и соединения и содержащие их композиции также используют при производстве лекарственного средства для терапевтических целей, упомянутых в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин "носитель" относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солнобилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. В контексте настоящего документа термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активностью композиции. В соответствии с конкретными вариантами в свете настоящего описания можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

Фармацевтически приемлемые кислые/анионные соли включают, без ограничений, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камзилат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдисилат, эстолат, эзилат, фумарат, глицептат, глюконат, глутамат, гликолиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат и триэтиодид. Органические или неорганические кислоты также включают, без ограничений, йодистоводородную, перхлорную, серную, фосфорную, пропионовую, гликолевую, метансульфоновую, гидроксипропансульфоновую, щавелевую, 2-нафталинсульфоновую, *p*-толуолсульфоновую, циклогексансульфаминовую, сахариную или трифторуксусную кислоту.

Фармацевтически приемлемые основные/катионные соли включают, без ограничений, соли алюминия, 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол (также известен как трис(гидроксиметил)аминометан, триметан или "ТРИС"), соли аммония, бензатин, трет-бутиламин, соли кальция, хлоропрокаин, холин, циклогексиламин, диэтанолламин, этилендиамин, соли лития, L-лизин, соли магния, меглумин, N-метил-6-глюкамин, пиперидин, соли калия, прокаин, хинин, соли натрия, триэтиноламин или соли цинка.

Фармацевтические композиции могут содержать конъюгаты в количестве от около 0,001 до около 100 мг/мл, от около 0,01 до около 50 мг/мл или от около 0,1 до около 25 мг/мл. Фармацевтические составы могут иметь pH от около 3,0 до около 10, например от около 3 до около 7 или от около 5 до около 9. Состав может дополнительно содержать по меньшей мере один ингредиент, выбранный из группы, состоящей из буферной системы, консерванта (-ов), агента (-ов), регулирующего (-их) тоничность, хелатирующего (-их) агента (-ов), стабилизатора (-ов) и поверхностно-активного (-ых) вещества (веществ).

Состав, содержащий фармацевтически активные ингредиенты с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области техники, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, издание 21 (2005) и любые последующие издания). Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных ингредиентов включают буферные растворы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие токсичность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций

Фармацевтическая композиция может представлять собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т. п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды, или по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90%, или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

Фармацевтическую композицию также можно готовить в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, посредством инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может быть, например, доставлена подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно.

Фармацевтическая композиция может представлять собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно применять в состоянии как есть или к которой врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или таблетки, покрытые оболочкой, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также быть в форме, например, пакетов саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для растворения.

Лекарственные формы могут представлять собой формы с немедленным высвобождением, причем в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, с замедленным высвобождением или с модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте.

Фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, внутривенно или сублингвально.

Значение pH в водном составе может находиться в диапазоне от pH 3 до pH 10. Предпочтительно pH состава равен от около 7,0 до около 9,5. В другом варианте осуществления pH состава равен от около 3,0 до около 7,0.

Фармацевтическая композиция как правило содержит буферный раствор. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бичин, цитрат, двузамещенный гидрофосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)-аминометан и их смеси. Буферный раствор может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 до около 50 мг/мл, например от около 0,1 до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических буферных растворов, представляют собой альтернативу.

Фармацевтическая композиция может содержать консервант. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомерсал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 до около 50 мг/мл, например от около 0,1 до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических консервантов, представляют собой альтернативу.

Фармацевтическая композиция может содержать изотонический агент. Неограничивающие примеры данного варианта включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновую кислоту, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол, пропиленгликоль, 1,3-пропандиол, 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического агента включает сахар. Не имеющие ограничительного характера примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-ГПЦД, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического агента является сахарный спирт, причем термин "сахарный спирт" определяют как C (4-8) углеводород, имеющий по меньшей мере одну гидроксильную группу. Не имеющие ограничительного характера примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Фармацевтические композиции, содержащие каждый изотонический агент, указанный в данном пара-

графе, представляют собой альтернативные варианты. Изотонический агент может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 до около 50 мг/мл, например от около 0,1 до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических изотонических агентов, представляют собой альтернативу.

Фармацевтическая композиция может содержать хелатирующий агент. Не имеющие ограничительного характера примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 до около 50 мг/мл, например от около 0,1 до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты.

В другом варианте фармацевтическая композиция может содержать стабилизатор. Не имеющие ограничительного характера примеры стабилизаторов включают один или более ингибиторов агрегации, один или более ингибиторов окисления, одно или более поверхностно-активных веществ и/или один или более ингибиторов протеазы.

Фармацевтическая композиция может содержать стабилизатор, причем указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как ГПЦ, ГПЦ-SL, ГПЦ-L и ГПМЦ), циклодекстрины, 2-метилглицерин, полиэтиленгликоль (такой как PEG 3350), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие соединения, такие как моноглицерин или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативу.

Фармацевтическая композиция может включать одно или более поверхностно-активных веществ, предпочтительно одно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, которые образованы из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерийных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,1 до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативу.

В дополнительном варианте фармацевтическая композиция может содержать один или более ингибиторов протеазы, таких как, например, ЭДТА и/или гидрохлорид бензамидина (НС1). Ингибитор протеазы может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеазы, представляют собой альтернативу.

Фармацевтическая композиция может содержать некоторое количество аминокислотного основания, достаточное для уменьшения образования агрегатов полипептида во время хранения композиции. Термин "аминокислотное основание" относится к одной или более аминокислотам (таким как метионин, гистидин, имидазол, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан, треонин) или их аналогам. Любая аминокислота может присутствовать либо в форме свободного основания, либо в форме соли. Может присутствовать любой стереоизомер (т.е. L, D или их смесь) аминокислотного основания. Аминокислотное основание может присутствовать отдельно или в комбинации с другими аминокислотными основаниями в концентрации от около 0,01 до около 50 мг/мл, например от около 0,1 до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих специфических аминокислотных оснований, представляют собой альтернативу.

Специалисту в данной области также очевидно, что терапевтически эффективная доза конъюгатов или их фармацевтической композиции будет варьироваться в зависимости от желаемого эффекта. Следовательно, специалист в данной области техники может легко определить оптимальные дозы для введения, и они будут варьироваться в зависимости от конкретного применяемого конъюгата, способа введения, концентрации препарата и степени прогрессирования состояния заболевания. Кроме того, факторы, связанные с конкретным пациентом, получающим лечение, включая возраст пациента, массу тела, рацион питания и время введения, приводят к необходимости корректировки дозы до соответствующего терапевтического уровня.

Для всех указаний конъюгаты предпочтительно вводить периферически в дозе от около 1 мкг до около 5 мг в сутки в однократных или разделенных дозах (например, однократную дозу можно разделять на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 поддоз) или от около 0,01 до около 500 мкг/кг, более предпочтительно от около 0,05 до около 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно ниже около 50 мкг/кг. Дозировки в этих диапазонах будут различаться по активности каждого агониста, и специалист в данной области техники может легко определять их. Следовательно, приведенные выше дозы представляют собой примеры для среднего случая. Несомненно, возможны индивидуальные случаи, требующие применения более высо-

ких или более низких диапазонов доз, которые входят в объем данного

В предпочтительных вариантах конъюгаты можно вводить в дозе от около 1 мкг до около 5 мг или в дозе от около 0,01 до около 500 мкг/кг, более предпочтительно в дозе от около 0,05 до около 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно в дозе ниже около 50 мкг/кг с дозой второго терапевтического агента (например, лираглутид) в дозе от около 1 мкг до около 5 мг или в дозе от около 0,01 до около 500 мкг/кг, более предпочтительно в дозе от около 0,05 до около 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно в дозе около 50 мкг/кг.

Фармацевтически приемлемые соли конъюгатов согласно изобретению могут включать традиционные нетоксичные соли или четвертичные аммонийные соли, образованные из неорганических или органических кислот или оснований. Примеры таких кислотно-аддитивных солей включают ацетат, адипат, бензоат, бензолсульфонат, цитрат, камфорат, додецилсульфат, гидрохлорид, гидробромид, лактат, малеат, метансульфонат, нитрат, оксалат, пивалат, пропионат, сукцинат, сульфат и тартрат. Основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, таких как натрий и калий, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли органических оснований, такие как дициклогексаминовые соли, а также соли аминокислот, таких как аргинин. Кроме того, основные азотсодержащие группы могут переводиться в четвертичное состояние с помощью, например, алкилгалогенидов.

Фармацевтические композиции можно вводить любыми способами, подходящими для намеченной цели. Примеры включают парентеральное, подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, трансдермальное, буккальное введение или закапывание в глаза. Введение можно осуществлять пероральным путем. Приемлемые растворимые составы для парентерального введения включают водные растворы активных конъюгатов в водорастворимой форме, например водорастворимые соли, кислые растворы, щелочные растворы, растворы в воде с добавлением декстрозы, изотонические углеводные растворы и комплексы включения с циклодекстрином.

Способ получения фармацевтической композиции, включающий предусматривает смешивание фармацевтически приемлемого носителя с любым из конъюгатов изобретения, причем фармацевтические композиции могут быть получены путем смешивания одного или более фармацевтически приемлемых носителей с любым из конъюгатов.

Конъюгаты могут дополнительно существовать в одной или более полиморфных или аморфных кристаллических формах, и подразумевается, что они включены в объем. Кроме того, конъюгаты могут образовывать сольваты, например, с водой (т.е. гидраты) или обычными органическими растворителями. В настоящем документе термин "сольват" означает физическую связь конъюгатов согласно изобретению с одной или более молекулами растворителя. Такое физическое связывание включает разные степени ионной и ковалентной связи, включая водородную связь. В предпочтительных случаях сольват обладает возможностью выделения, например, если одна или более молекул растворителя включены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. Подразумевается, что термин "сольват" охватывает как сольваты в фазе раствора, так и сольваты со способностью к выделению. Не имеющие ограничительного характера примеры приемлемых сольватов включают этанолаты, метанолаты и т.п.

Таким образом, в способах лечения термин "введение" охватывает средства лечения, облегчения или профилактики синдрома, расстройства или заболевания, описанного в настоящем документе, с помощью конъюгатов или их полиморфа или сольвата.

В целом пролекарства представляют собой функциональные производные конъюгатов, которые в условиях *in vivo* легко превращаются в требуемый конъюгат. Таким образом, в способах лечения термин "введение" охватывает лечение различных описанных расстройств с использованием конкретного описанного конъюгата или с использованием конъюгата, который не был конкретно описан, но который превращается в установленный конъюгат в условиях *in vivo* после введения пациенту. Традиционные процедуры выбора и получения приемлемых производных пролекарств описаны, например, в публикации "Design of Prodrugs", ed. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Более того, предполагается, что любой элемент, конкретно упоминаемый применительно к конъюгатам, будет включать все изотопы и смеси изотопов указанного элемента природного происхождения или синтетического происхождения, с природной распространенностью или в обогащенной изотопами форме. Например, ссылка на водород также охватывает ^1H , ^2H (D) и ^3H (T). Аналогично ссылки на углерод и кислород охватывают ^{12}C , ^{13}C , и ^{14}C , и ^{16}O , и ^{18}O соответственно. Изотопы могут быть радиоактивными или нерадиоактивными. Содержащие радиоактивную метку конъюгаты могут содержать радиоактивный изотоп, выбранный из группы ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{122}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br и ^{82}Br . Радиоактивный изотоп предпочтительно выбран из группы, состоящей из ^3H , ^{11}C и ^{18}F .

Некоторые описанные в изобретении конъюгаты могут существовать в виде атропоизомеров. Атропоизомеры представляют собой стереоизомеры, полученные путем затрудненного поворота вокруг одиарных связей, причем барьер стерической деформации при повороте достаточно высок, чтобы позволять выделять конформеры. Следует понимать, что все такие конформеры и их смеси входят в объем настоящего изобретения.

Когда конъюгаты имеют по меньшей мере один стереоцентр, они могут соответственно существовать в виде энантиомеров или диастереомеров.

Если в ходе способов получения конъюгатов образуются смеси стереоизомеров, эти стереоизомеры можно выделять с помощью традиционных методик, таких как препаративная хроматография. Конъюгаты можно получать в рацемической форме, или отдельные энантиомеры можно получать в результате энантиоспецифического синтеза или посредством разделения. Конъюгаты можно, например, разделять на составляющие их энантиомеры с помощью стандартных методик, таких как формирование диастереомерных пар посредством формирования соли с оптически активной кислотой, такой как (-)-ди-п-толуоил-6-винная кислота и/или (+)-ди-п-толуоил-L-винная кислота, с последующей фракционной кристаллизацией и регенерацией свободного основания. Конъюгаты можно также разделять посредством образования диастереомерных сложных эфиров или амидов с последующим хроматографическим разделением и удалением хирального вспомогательного соединения. В альтернативном варианте конъюгаты могут быть разделены с применением хиральной колонки посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или СФХ. В некоторых случаях могут существовать ротамеры конъюгатов, наблюдаемые на 1Н ЯМР, приводящие к появлению сложных мультиплетов и объединению пиков на спектре 1Н ЯМР.

В ходе любого из способов получения конъюгатов может возникать необходимость и/или желание защитить чувствительные или реакционноспособные группы на любой из рассматриваемых молекул. Для данных целей можно использовать стандартные защитные группы, такие как группы, описанные в публикациях "Protective Groups in Organic Chemistry", ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; и T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991, каждая из которых полностью включена в текст настоящего документа посредством ссылки для всех целей. Защитные группы можно впоследствии удалять на удобной для этого стадии с помощью способов, известных в данной области.

Способы применения.

Настоящее изобретение можно отнести к способу профилактики, лечения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания, обусловленного рецептором Y2, у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

В настоящем изобретении также предложен способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения расстройства, заболевания или состояния или любого одного или более симптомов указанного расстройства, заболевания или состояния у пациента, содержащий этапы, на которых вводят пациенту эффективное количество конъюгата, соединения или фармацевтической композиции.

При этом заболевание, расстройство или состояние выбирается из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или II, метаболического синдрома (т. е. синдрома X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (СН1), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечнососудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и/или экземы.

При этом терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которое является достаточным для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) регрессия причины заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости пациента с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (x) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у пациента; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния пациента (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли пациент человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали опти-

мальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

В контексте настоящего документа термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, связанного с заболеванием, расстройством или состоянием, который не обязательно очевиден у пациента, но может быть видимым у пациента. Термины "лечить", "лечащий" и "лечение" могут также относиться к провоцированию регрессии, профилактике прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или состоянием. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

Способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения ожирения или любого одного или более симптомов ожирения у пациента, включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. При этом масса тела пациента может уменьшаться, например, в диапазоне от около 0,01 до около 0,1%, в диапазоне от около 0,1 до около 0,5%, в диапазоне от около 0,5 до около 1%, в диапазоне от около 1 до около 5%, в диапазоне от около 2 до около 3%, в диапазоне от около 5 до около 10%, в диапазоне от около 10 до около 15%, в диапазоне от около 15 до около 20%, в диапазоне от около 20 до около 25%, в диапазоне от около 25 до около 30%, в диапазоне от около 30 до около 35%, в диапазоне от около 35 до около 40%, в диапазоне от около 40 до около 45% или в диапазоне от около 45 до около 50% по отношению к массе тела пациента до введения любого из конъюгатов, соединений, фармацевтических композиций, форм или лекарственных средств или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе.

Снижение массы тела может быть сохранено в течение, например, около 1 недели, в течение около 2 недель, в течение около 3 недель, в течение около 1 месяца, в течение около 2 месяцев, в течение около 3 месяцев, в течение около 4 месяцев, в течение около 5 месяцев, в течение около 6 месяцев, в течение около 7 месяцев, в течение около 8 месяцев, в течение около 9 месяцев, в течение около 10 месяцев, в течение около 11 месяцев, в течение около 1 года, в течение около 1,5 лет, в течение около 2 лет, в течение около 2,5 лет, в течение около 3 лет, в течение около 3,5 лет, в течение около 4 лет, в течение около 4,5 лет, в течение около 5 лет, в течение около 6 лет, в течение около 7 лет, в течение около 8 лет, в течение около 9 лет, в течение около 10 лет, в течение около 15 лет или в течение около 20 лет.

Способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения синдрома, расстройства или заболевания или любого одного или более симптомов указанного синдрома, расстройства или заболевания у пациента, предполагает, что упомянутый синдром, расстройство или заболевание выбраны из группы, состоящей из ожирения, диабетов типа I или типа II, метаболического синдрома (т. е., синдром X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной наследственным гиперинсулинизмом (СН), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечно-сосудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофией печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения.

В контексте настоящего документа метаболический синдром относится к пациенту, имеющему любое одно или более из следующего: высокий уровень сахара в крови (например, высокий уровень сахара в крови в состоянии натощак), высокое кровяное давление, аномальный уровень холестерина (например, низкие уровни HDL), аномальные уровни триглицеридов (например, высокие уровни триглицеридов), большая талия (т.е. окружность талии), повышенное отложение жира в абдоминальной области, резистентность к инсулину, непереносимость глюкозы, повышенные уровни С-реакционноспособного белка (т.е. провоспалительное состояние) и повышенные уровни ингибитора-1 активатора плазминогена плазмы и фибриногена (т.е. протромботическое состояние).

Способ снижения потребления пищи у пациента включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления потребление пищи пациентом уменьшено, например, в диапазоне от около 0,01 до около 0,1%, в диапазоне от около 0,1 до около 0,5%, в диапазоне от около 0,5 до около 1%, в диапазоне от около 1 до около 5%, в диапазоне от около 2 до около 3%, в диапазоне от около 5 до около 10%, в диапазоне от около 10 до около 15%, в диапазоне от около 15 до около 20%, в диапазоне от около 20 до около 25%, в диа-

пазоне от около 25 до около 30%, в диапазоне от около 30 до около 35%, в диапазоне от около 35 до около 40%, в диапазоне от около 40 до около 45% или в диапазоне от около 45 до около 50% по отношению к потреблению пищи пациентом до введения любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций, описанных в настоящем документе.

При этом уменьшение потребления пищи может быть сохранено, например, в течение около 1 недели, в течение около 2 недель, в течение около 3 недель, в течение около 1 месяца, в течение около 2 месяцев, в течение около 3 месяцев, в течение около 4 месяцев, в течение около 5 месяцев, в течение около 6 месяцев, в течение около 7 месяцев, в течение около 8 месяцев, в течение около 9 месяцев, в течение около 10 месяцев, в течение около 11 месяцев, в течение около 1 года, в течение около 1,5 лет, в течение около 2 лет, в течение около 2,5 лет, в течение около 3 лет, в течение около 3,5 лет, в течение около 4 лет, в течение около 4,5 лет, в течение около 5 лет, в течение около 6 лет, в течение около 7 лет, в течение около 8 лет, в течение около 9 лет, в течение около 10 лет, в течение около 15 лет или в течение около 20 лет.

Способ снижения гликированного гемоглобина (A1C) у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах A1C пациента снижен, например, в диапазоне от около 0,001 до около 0,01%, в диапазоне от около 0,01 до около 0,1%, в диапазоне от около 0,1 до около 0,2%, в диапазоне от около 0,2 до около 0,3%, в диапазоне от около 0,3 до около 0,4%, в диапазоне от около 0,4 до около 0,5%, в диапазоне от около 0,5 до около 1%, в диапазоне от около 1 до около 1,5%, в диапазоне от около 1,5 до около 2%, в диапазоне от около 2 до около 2,5%, в диапазоне от около 2,5 до около 3%, в диапазоне от около 3 до около 4%, в диапазоне от около 4 до около 5%, в диапазоне от около 5 до около 6%, в диапазоне от около 6 до около 7%, в диапазоне от около 7 до около 8%, в диапазоне от около 8 до около 9% или в диапазоне от около 9 до около 10% по отношению к A1C пациента до введения любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций, описанных в настоящем документе.

Способы снижения уровней глюкозы в крови натощак у пациента содержат этапы на которых вводят пациенту эффективное количество конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. Уровни глюкозы в крови в состоянии натощак могут быть снижены до менее от около 140 до около 150 мг/дл, менее от около 140 до около 130 мг/дл, менее от около 130 до около 120 мг/дл, менее от около 120 до около 110 мг/дл, менее от около 110 до около 100 мг/дл, менее от около 100 до около 90 мг/дл или менее от около 90 до около 80 мг/дл по отношению к уровням глюкозы в крови в состоянии натощак у пациента до введения любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций изобретения, описанных в настоящем документе, или в сравнении с контрольными пациентами, не получающими любого из конъюгатов, соединений, композиций, форм, лекарственных средств или комбинаций, описанных в настоящем документе.

Способ модуляции активности рецептора Y2 у пациента включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения. В контексте настоящего документа термин "модулирование" относится к увеличению или уменьшению активности рецептора.

Эффективное количество конъюгата или соединения или его формы, композиции или лекарственного средства можно вводить пациенту один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день, пять раз в день, шесть раз в день, семь раз в день или восемь раз в день. Кроме того, эффективное количество конъюгата или соединения или его формы, композиции или лекарственного средства можно вводить пациенту один раз в два дня, один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, два раза в месяц, три раза в месяц или четыре раза в месяц.

Способ профилактики, лечения, задержки возникновения или облегчения заболевания, расстройства или синдрома, или одного или более симптомов любого из указанных заболеваний, расстройств или синдромов у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения в виде комбинированной терапии. Комбинированная терапия может представлять собой второй терапевтический агент или хирургическую терапию.

В настоящем документе термин "в комбинации" в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии.

Используемый в настоящем документе термин "комбинированная терапия" относится к введению пациенту одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведению для пациента одной или более хирургических терапий одновременно с введением эффективного количества конъюгата или соединения или его формы, композиции или лекарственного средства. В некоторых вариантах вве-

дение одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведение одной или более хирургических терапий можно осуществлять в тот же день, что и введение эффективного количества конъюгата, а в других вариантах введение одного или более дополнительных терапевтических агентов или проведение одной или более хирургических терапий можно осуществлять в ту же неделю или в тот же месяц, что и введение эффективного количества конъюгата или соединения изобретения.

При этом заболевание или расстройство может быть выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа II, метаболического синдрома, резистентности к инсулину и дислипидемии, второе терапевтический агент может представлять собой противодиабетический агент. В предпочтительных вариантах противодиабетический агент может представлять собой модулятор рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1).

Профилактика, лечение, задержка возникновения или облегчение любого из заболеваний, расстройств, синдромов или симптомов, описанных в настоящем документе, у пациента с помощью комбинированной терапии может включать введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции изобретения в комбинации с одним или более из следующих терапевтических агентов: ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4) (например, ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, алоглиптин и т.д.); агонист рецептора GLP-1 (например, агонисты GLP-1 непродолжительного действия, такие как эксенатид и ликсисенатид; агонисты рецептора GLP-1 средней продолжительности действия, такие как лираглутид; агонисты рецептора GLP-1 с замедленным высвобождением, такие как эксенатид с замедленным высвобождением, альбиглутид, дулаглутид); ингибиторы котранспортера-2 натрия глюконоата (SGLT-2) (например, канаглифозин, дапаглифозин, эмпаглифозин и т.д.); секвестранты желчных кислот (например, колесевелам и т.д.); агонисты дофамина рецептора (например, бромпипраптин быстрого высвобождения); бигуаниды (например, метформин и т.д.); инсулин; оксинтомодулин; сульфонилмочевины (например, хлорпропамид, глимепирид, глипизид, глибурид, глибенкламид, глиборнурид, глизоксепид, гликопирамид, толазамид, толбутамид, ацетогексамид, карбутамид и т.д.); и тиазолидиндионы (например, пиоглитазон, розиглитазон, лобеглитазон, циглитазон, дарглитазон, энглитазон, нетоглитазон, ривоглитазон, троглитазон и т.д.). В некоторых вариантах дозу дополнительного (-ых) терапевтического (-их) агента (-ов) уменьшают при введении в комбинации с конъюгатом или соединением. В некоторых вариантах при использовании в комбинации с конъюгатом или соединением, дополнительный (-ые) терапевтический (-ие) агент (-ы) можно применять в более низких дозах по сравнению с использованием каждого по отдельности.

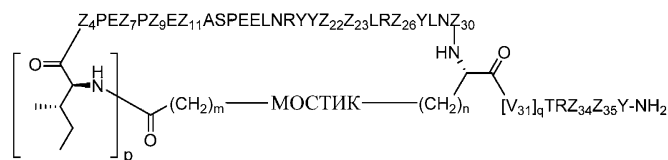
В предпочтительных вариантах, в которых заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или типа II, метаболического синдрома (т.е. синдрома X), резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе (например, непереносимость глюкозы), гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (ЧИ), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечно-сосудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы, второй терапевтический агент может представлять собой лираглутид.

Настоящее изобретение предусматривает профилактику, лечение, отсрочку возникновения или облегчение любого из заболеваний, расстройств, синдромов или симптомов, описанных в настоящем документе, у пациента с помощью комбинированной терапии, которая может включать введение пациенту эффективного количества конъюгата, соединения или фармацевтической композиции в комбинации с хирургической терапией. В предпочтительных вариантах хирургическая терапия может представлять собой бариатрическую хирургию (например, операция шунтирования желудка, такая как шунтирование желудка с гастроэюноанастомозом по Ру; рукавную гастрэктомию; регулируемое бандажирование желудка; билиопанкреатическое шунтирование с выключением двенадцатиперстной кишки; внутрижелудочный баллон; пликацию желудка; и их комбинации).

Один или более дополнительных терапевтических агентов или хирургических терапевтических средств можно вводить в тот же день, что и эффективное количество конъюгата или соединения, конъюгат или соединение можно вводить перед или одновременно с дополнительным терапевтическим агентом или после него. Применение термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором лекарственные средства вводят пациенту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства пациенту или одновременно с таким введением.

Возможные варианты.

Предпочтительный конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с циклическим пептидом PYY, причем циклический пептид PYY может быть представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

где p равно 0 или 1 ;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

Z_7 представляет собой A или K;

Z_9 представляет собой G или K;

Z_{11} представляет собой D или K;

Z_{22} представляет собой A или K;

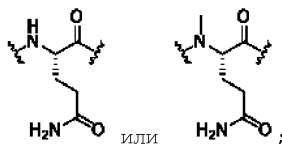
Z_{23} представляет собой S или K;

Z_{26} представляет собой A или H;

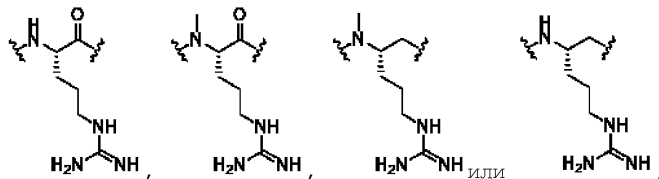
Z_{30} представляет собой L, W, K или отсутствует;

при условии, что Z_{30} отсутствует, только если q равно 1;

Z_{34} представляет собой



Z_{35} представляет собой



причем производное представляет собой соединение формулы I, которое модифицировано с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из амидирования, гликозилирования, карбамилрования, сульфирования, фосфорилирования, циклизации, липидизации и пегилирования.

Предпочтительный конъюгат, в котором циклический пептид PYY может представлять собой производное циклического пептида PYY формулы I, которое модифицировано одним или более процессами, выбранными из группы, состоящей из амидирования, липидизации и пегилирования, или его фармацевтически приемлемую соль.

Другой предпочтительный конъюгат, в котором циклический пептид PYY представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

Z_4 представляет собой K, A, E, S или R;

Z_7 представляет собой A или K;

Z_9 представляет собой G или K;

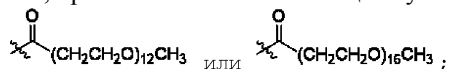
Z_{11} представляет собой D или K;

Z_{22} представляет собой A или K;

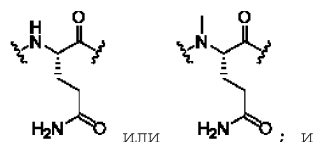
Z_{23} представляет собой S или K;

Z_{26} представляет собой A или H;

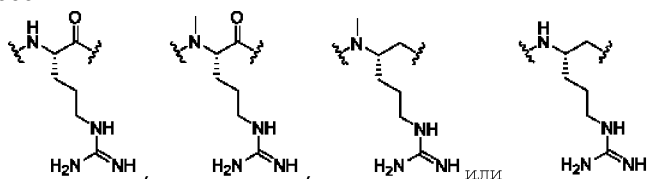
Z_{30} представляет собой L или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена



Z_{34} представляет собой



Z₃₅ представляет собой



Предпочтительный конъюгат, в котором циклический пептид PYY может быть представлен соединением формулы I, или его производным, или его фармацевтически приемлемой солью, причем:

r равно 0 или 1 ;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q может быть равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазолил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;

Z₇ представляет собой A или K;

Z₉ представляет собой G или K;

Z₁₁ представляет собой D или K;

Z₂₂ представляет собой A или K;

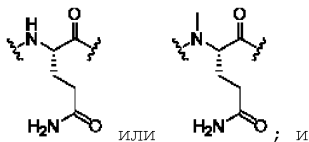
Z₂₃ представляет собой S или K;

Z₂₆ представляет собой A или H;

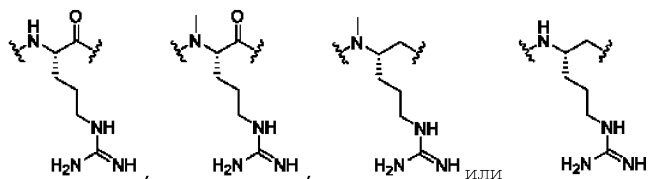
Z₃₀ представляет собой L или K, причем боковая аминная цепь указанного K замещена



Z₃₄ представляет собой



Z₃₅ представляет собой



Предпочтительный конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть связан с циклическим пептидом PYY, причем конъюгат представлен формулой IIIa-b, IVa-b, Va-b и/или VIa-b, причем в формуле IIIa-b, IVa-b, Va-b и VIa-b,

x может быть равен, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 2.

Соединительный элемент 1 может, например, представлять собой G, βA, -COCH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH-, γ-аминобутаноил, GG, CO(CH₂)_mSCH₂- (при условии, что соединительный элемент 2 = -NH-, m=1, 2) или связь;

соединительный элемент 2 может, например, представлять собой -CH₂-, бензил, этилтриазолил, -NH- или связь;

n может быть равно, например, 1, 2 или 3;

X может, например, представлять собой -S- или -CH₂-;

Z₃ может, например, представлять собой I или связь;

Z₄ может, например, представлять собой K, S или R;

Z₃₀ может, например, представлять собой L, W, K (mPEG16) или K (mPEG12);

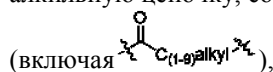
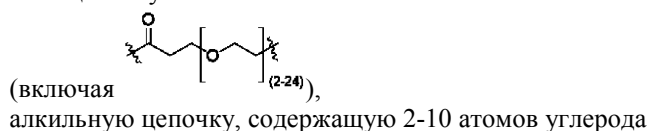
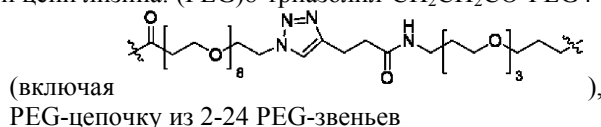
Z₃₄ может, например, представлять собой Q, причем указанный Q необязательно N-метилирован по альфа-амидному азоту;

Z₃₅ может, например, представлять собой R, причем указанный R необязательно N-метилирован по альфа-амидному азоту, или R является декарбонилированным с образованием psi-(Z₃₅Z₃₆)-амидной связи,

или R является как N-метилированным по альфа-амидному азоту, так и декарбонилированным с образованием psi-(Z₃₅Z₃₆)-амидной связи;

Z₃₆ может, например, представлять собой Y (Tyr), Cha (β-циклогексилаланин), Aic (2-аминоиндан-2-карбоновую кислоту) или F (Phe), причем указанный F необязательно содержит в пара-положении заместитель в виде фтора (4-F-Phe), хлора (4-Cl-Phe), брома (4-Br-Phe), йода (4-I-Phe), аминогруппы (4-NH₂-Phe); и

соединительный элемент 3 может, например, содержать любое из следующих амидирований в боковой цепи лизина: (PEG)8-триазилил-CH₂CH₂CO-PEG4



быть замещен связью.

Предпочтительный конъюгат, в котором циклический пептид PYY может быть выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-100.

Предпочтительный конъюгат, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть ковалентно связано с циклическим пептидом PYY на остатке лизина циклического пептида PYY посредством линкера.

Предпочтительный конъюгат, в котором линкер может представлять собой линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG) 8-триазилил-CH₂CH₂CO-PEG4, цепочки PEG из 2-24 PEG-звеньев, алкильной цепочки, содержащей 2-10 атомов углерода, (Gly₄Ser)_j, причем j=1-4, (AlaPro)_u, при этом u=1-10, и связи.

Предпочтительный конъюгат, в котором возможно только один из Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ и Z₂₃ в формуле I представляет собой лизин, и лизин ковалентно связан с внедренным цистеиновым остатком моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера.

Конъюгат может содержать моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с циклическим пептидом PYY, причем конъюгат содержит структуру, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102-127 или ее фармацевтически приемлемой соли,

при этом mAb представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а]₂ представляет собой 1 или 2 циклических пептида PYY, которые ковалентно связаны с mAb.

Предпочтительный конъюгат, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146 соответственно.

Предпочтительный конъюгат, в котором выделенное моноклональное антитело может содержать вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 137, и вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 139 и дополнительно содержащий участок Fc.

Предпочтительный конъюгат может содержать тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 138, и легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 140.

Способ получения конъюгата может включать реакцию электрофильного соединения, предпочтительно бромацетамида или малеимида, введенного в боковую цепь циклического пептида PYY, предпочтительно в аминную боковую цепь остатка лизина циклического пептида PYY, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка из SEQ ID NO: 143 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с образованием, таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом PYY и моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Фармацевтическую композицию может содержать конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель.

Способ лечения или профилактики ожирения у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции.

Этот способ, в котором введение эффективного количества фармацевтической композиции пациенту может привести к уменьшению массы тела на от приблизительно 5 до приблизительно 10%, от при-

близительно 10 до приблизительно 15%, от приблизительно 15 до приблизительно 20% или от приблизительно 20 до приблизительно 25% по сравнению с массой тела пациента до введения фармацевтической композиции.

Способ лечения или профилактики заболевания или расстройства у пациента, причем указанное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или типа II, метаболического синдрома, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, гипогликемии, обусловленной врожденным гиперинсулинизмом (СНН), дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии и других факторов риска для сердечно-сосудистой системы, таких как гипертензия и факторы риска для сердечно-сосудистой системы, связанные с неуправляемыми уровнями холестерина и/или липидов, остеопороза, воспаления, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD), неалкогольного стеатогепатита (NASH), болезни почек и экземы включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции.

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой ожирение.

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой диабет I типа.

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой диабет II типа.

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой метаболический синдром.

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой заболевание почек.

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Указанное заболевание или расстройство может представлять собой неалкогольную жировую дистрофию печени (NAFLD).

Способ снижения потребления пищи у пациента включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции.

Способ по варианту осуществления 27, в котором введение эффективного количества фармацевтической композиции пациенту приводит к снижению потребления пищи на величину от приблизительно 5 до приблизительно 10%, от приблизительно 10 до приблизительно 15%, от приблизительно 15 до приблизительно 20%, от приблизительно 20 до приблизительно 25%, от приблизительно 25 до приблизительно 30%, от приблизительно 30 до приблизительно 35%, от приблизительно 35 до приблизительно 40%, от приблизительно 40 до приблизительно 45%, от приблизительно 45 до приблизительно 50%, по сравнению с потреблением пищи у пациента до введения фармацевтической композиции.

Способ модуляции активности рецептора Y2 у пациента включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции.

Фармацевтическую композицию можно вводить путем инъекции.

Инъекцию можно делать подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутривенно.

Фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Заболевание или расстройство выбирают из группы, состоящей из ожирения, диабета 2 типа, метаболического синдрома, резистентности к инсулину и дислипидемии, а второй терапевтический агент представляет собой по меньшей мере один противодиабетический агент.

Указанный противодиабетический агент представляет собой модулятор рецептора глюкагон-подобного пептида 1.

Второй терапевтический агент представляет собой лираглутид.

Фармацевтическую композицию вводят пациенту ежедневно, еженедельно или ежемесячно.

Фармацевтическую композицию можно вводить один, два, три, четыре, пять или шесть раз в сутки.

Фармацевтическую композицию можно вводить один, два, три, четыре, пять или шесть раз в неделю.

Фармацевтическую композицию можно вводить один, два, три или четыре раза в месяц.

Набор может содержать конъюгат или фармацевтическую композицию, предпочтительно набор дополнительно содержит эффективное количество второго терапевтического агента, более предпочтительно набор дополнительно содержит эффективное количество лираглутида.

Набор дополнительно можно содержать инъекционное устройство.

Способ получения фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, может включать объединение конъюгата с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Примеры Синтез

Соединения или конъюгаты настоящего изобретения можно синтезировать в соответствии с общими способами синтеза, известными специалистам в данной области техники. Приведенное ниже описание синтеза приводится в качестве примера и никоим образом не направлено на ограничение изобретения.

Аналоги или производные NTSC циклического PYY (NTSC-PYY) можно синтезировать с помощью различных известных стандартных методик образования последовательных пептидных связей между аминокислотами, и это предпочтительно осуществляют посредством твердофазного пептидного синтеза

(SPPS), как по существу описано в работе Merrifield (J. Am. Chem. Soc, 1963, 85, 2149-2154), с использованием автоматизированного синтезатора пептидов, традиционного лабораторного синтеза или комбинации обоих подходов. Традиционные методики пептидного синтеза включают конденсацию свободной аминогруппы одного аминокислотного остатка, другие реакционно-способные функциональные группы которой надлежащим образом защищены, и свободной карбоксильной группы другой аминокислоты, реакционно-способные функциональные группы которой также надлежащим образом защищены. К примерам конденсационных агентов, обычно используемых для формирования пептидной связи, относятся диизопропилкарбодиимид (DIC) с 1-гидроксибензилтриазолом (HOBT) или без него, или этилциано(гидроксиимино)ацетат (Охума Pure), гексафторфосфат 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (HBTU), гексафторфосфат 2-(1Н-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (HATU), гексафторфосфат 2-(6-хлор-1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (HCTU), гексафторфосфат 1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси-трис-пирролидино-фосфония (PyOxim), тетрафторборат 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния (TBTU), гексафторфосфат бром-трис-пирролидино-фосфония (PyBroP) и т.п.

Методологию автоматизированного синтеза пептидов можно осуществлять при комнатной температуре (кт) или при повышенных температурах, предпочтительно путем применения микроволнового нагревания, как описано в Yu (J. Org. Chem., 1992, 57, 4781-4784) и позднее усовершенствовано в Palasek (J. Pept. Sci., 2007, 13, 143-148).

Соединения настоящему изобретению (С-концевые амиды) можно удобно получать с применением методологии защиты аминокислот с помощью N- α -FMOC (9-фторенилметиооксикарбонил), при которой карбокси-конец соответствующим образом N- α -FMOC-защищенной аминокислоты подвергают связыванию с обычной твердофазной смолой с применением подходящего агента связывания. Подходящие традиционные коммерчески доступные твердофазные смолы включают амидную MBHA-смолу Ринка, амидную AM-смолу Ринка, смолу Tentagel S RAM, смолу FMOC-PAL-PEG PS, амидную смолу Ринка SpheriTide, смолу Ринка ChemMatrix, амидную смолу Зиберы TG, смолу Зиберы TG и т.п. Затем можно снимать защиту со связанной со смолой FMOC-аминокислоты посредством воздействия 20%-го пиперидина либо в N,N-диметилформамиде (DMF), либо в 1-метил-2-пирролидоне (NMP), за счет обработки которым избирательно удаляют защитную группу FMOC. Дополнительные FMOC-защищенные аминокислоты затем последовательно подвергают связыванию и последовательно снимают с них защиту, таким образом, генерируя желаемый защищенный пептид, связанный со смолой. В предпочтительных случаях может быть необходимо использовать ортогонально реакционноспособную защитную группу для другого амина в пептидной последовательности, которая будет выдерживать условия снятия защиты FMOC. Защитные группы, такие как 4-метилтретил (Mtt) или 4-метокситретил (Mmt), каждую из которых можно удалять посредством обработки 1%-й трифторуксусной кислотой (ТФУ) / дихлорметаном (ДХМ), или предпочтительно аллоксикарбонил (alloc; который удаляют посредством обработки комбинацией Pd(PPh₃)₄ (тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0))/PhSiH₃ (фенилсилан)), 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден) этил (Dole; который удаляют посредством обработки 2-3%-ым гидразином/DMF) и 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил (ivDde; который удаляют посредством обработки 2-3%-ым гидразином/DMF), можно эффективно применять в таких случаях.

В традиционных методологиях синтеза пептидов реакционноспособные боковые цепи альфа-аминокислот по существу защищены в течение всего процесса синтеза с помощью подходящих защитных групп для обеспечения их инертностью по отношению к протоколам связывания и снятия защиты. Хотя в данной области известно множество защитных групп для боковых цепей аминокислот, наиболее предпочтительны следующие защитные группы: трет-бутил (t-Bu) для серина, треонина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты и тирозина; третил (Trt) для аспарагина, глутамина, цистеина, гомоцистеина и гистидина; трет-бутоксикарбонил (Boc) для триптофана и ϵ -аминогруппы лизина; и 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf) для аргинина. Эти защитные группы удаляют после обработки сильной кислотой, например с помощью высоких концентраций трифторуксусной кислоты (ТФУ).

После завершения SPPS со связанного со смолой пептида с защищенной боковой цепью снимают защиту и одновременно отщепляют от смолы с помощью смеси для расщепления, которая состоит преимущественно из (ТФУ) вместе с различными комбинациями поглотителей карбокатионов, таких как триизопропилсилан (ТИПС), вода, фенол и анизол. Неочищенный твердый пептид затем выделяют путем осаждения фильтра пептида/смеси холодным эфиром. В частном случае связанных со смолой Зиберы защищенных пептидов отщепление защищенного пептида от смолы может быть эффективно реализовано после многократной обработки 1-2%-й ТФУ в ДХМ без нарушения защиты боковой цепи. После выделения можно проводить дополнительные манипуляции с защищенным пептидом посредством реакций в растворе. Наконец, с защищенного пептида можно снимать общую защиту с помощью отдельной обработки смесью для расщепления и осаждать его, как описано выше. Полученный таким образом неочищенный пептид затем растворяют до низкой концентрации (приблизительно < 4 мг/мл) в преимущественно водной (водн.) системе растворителей, содержащей органический соразтворитель, такой как аце-

тонитрил или этанол. После повышения pH раствора до > 5 пептид затем подвергают реакции внутримолекулярной циклизации с образованием соответствующего неочищенного аналога NTSC PYY настоящего изобретения. Образованные таким образом аналоги NTSC PYY можно очищать с помощью методик очистки, общеизвестных в данной области техники. Предпочтительным способом очистки пептида, применяемым в настоящем документе, является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Впоследствии выполняют анализ очищенных пептидов с помощью метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХМС).

Предполагается, что следующие примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, приведены только в иллюстративных целях и что различные изменения и модификации в них будут понятны специалистам в данной области техники и подлежат включению в объем и сферу действия данного изобретения и в объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в настоящем документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Общие схемы

Общая процедура синтеза пептидов NTSC-PYY с С-концевым амидом описаны в предварительной заявке на патент США № 62/413,613, поданной 27 октября 2016 г., и в заявке на патент США под названием "Cyclic peptide tyrosine tyrosine compounds as modulators of neuropeptide receptors", поданной в тот же день, что и настоящая заявка, с номером досье патентного поверенного № PRD3411. Содержание обеих цитируемых публикаций полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример 1. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 1.

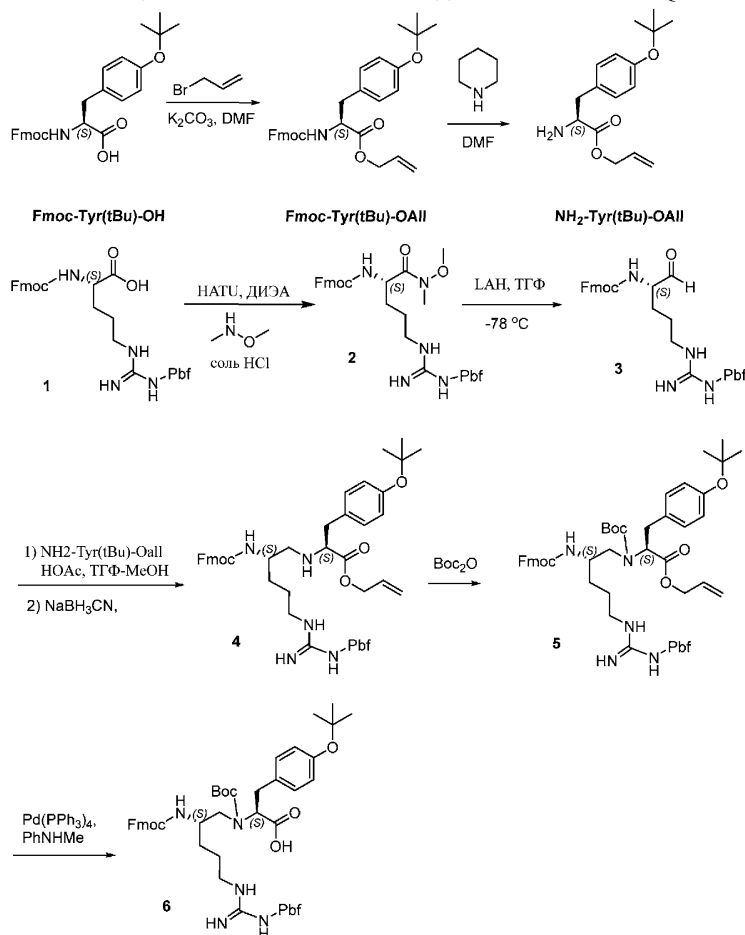


Схема 14. Синтез Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-(N-Boc)Tyr(tBu)]-OH 1. Синтез Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-(N-Boc)Tyr(tBu)]-OH.

А. Синтез $\text{H}_2\text{N-Tyr(tBu)-OAll}$.

К охлажденному на ледяной бане раствору Fmoc-Tyr(tBu)-O (69 г, 150,15 ммоль) и K_2CO_3 (62 г, 445,36 ммоль) в DMF (500 мл) добавляли аллилбромид (72 г, 595,16 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 3 ч. Затем добавляли смесь лед/вода (1 л) и смесь экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные органические экстракты сушили (Na_2SO_4) и концентрировали под пониженным давлением с получением Fmoc-Tyr(tBu)-OAll в виде масла желтого цвета. К охлажденному на ледяной бане раствору Fmoc-Tyr(tBu)-OAll (70 г, 140,1 ммоль) в DMF (600 мл) по каплям добавляли пиперидин (150 мл) в течение 20 мин. Через 3 ч реакционный раствор вливали в смесь вода/лед (1 л) и экстрагировали с помощью EtOAc (2×2 л). Объединенные органические экстракты сушили (Na_2SO_4) и концентрировали под

пониженным давлением. Полученный таким образом остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя с помощью EtOAc/петролейный эфир (10 : 1) с получением 34 г H₂N-Тур(tBu)-OAll в виде масла желтого цвета.

В. Синтез Fmoc-Arg(Pbf)-N(Me)OMe (2).

К охлажденной на ледяной бане смеси Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1) (64,8 г, 99,88 ммоль), N, O-диметилгидроксиламина гидрохлорида (20 г, 206,2 ммоль) и NATU (57 г, 149,91 ммоль) в ДХМ (500 мл) по каплям добавляли ДИЭА (52 г, 402,2 ммоль) в течение 10 мин и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение ночи. Впоследствии реакционную смесь вливали в смесь вода/лед (1л) и экстрагировали с помощью (1 л). Органические экстракты сушили (Na₂SO₄) и концентрировали под пониженным давлением с получением 70 г неочищенного Fmoc-Arg(Pbf)-N(Me)OMe (2) в виде твердого вещества желтого цвета, который затем применяли без дополнительной очистки.

С. Синтез Fmoc-Arg(Pbf)-CHO (3).

К охлажденному (-78°C) раствору ЛАГ в ТГФ (1 М, 107 мл, 0,107 ммоль) в инертной атмосфере азота по каплям добавляли посредством канюли охлажденный (-50°C) раствор Fmoc-Arg(Pbf)-N(Me)OMe (2) (50 г, 72,3 ммоль) в ТГФ (100 мл) в течение 1 ч. После перемешивания при -78°C в течение 5 ч, смесь вливали в 1н раствор HCl (300 мл) и при необходимости дополнительно добавляли 1н HCl для доведения pH до 4, а впоследствии экстрагировали с помощью EtOAc (2×2 л). Объединенные органические экстракты сушили (Na₂SO₄) и концентрировали под пониженным давлением с получением 45 г неочищенного Fmoc-Arg(Pbf)-CHO (3) в виде твердого вещества желтого цвета, который применяли без дополнительной очистки.

Д. Синтез Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-Тур(tBu)]-OAll (4).

К охлажденному на ледяной бане раствору Fmoc-Arg(Pbf)-CHO (3) с этапа С (45 г, 71,12 ммоль) и H₂N-Тур(tBu)-OAll с этапа А (32 г, 115,37 ммоль) в ТГФ (200 мл), MeOH (200 мл) и HOAc (15 мл) по порциям добавляли цианоборгидрид натрия (18,0 г, 286,4 ммоль) в течение 30 мин и перемешивали полученный раствор при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили добавлением насыщенного водного раствора NaHCO₃ (500 мл) и смесь экстрагировали с помощью EtOAc (2×2 л). Объединенные органические экстракты сушили (Na₂SO₄) и концентрировали под пониженным давлением. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя с помощью смеси EtOAc/петролейный эфир (10 : 1) с получением 40 г Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-Тур(tBu)]-OAll (4) в виде твердого вещества желтого цвета.

Е. Синтез Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Тур(tBu)]-OAll (5).

К раствору Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-Тур(tBu)-OAll] (4) (53 г, 59,28 ммоль) в MeCN (240 мл) добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (20 г, 91,3 ммоль) и перемешивали полученный раствор при 50°C в течение ночи. Впоследствии смесь концентрировали под пониженным давлением и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя смесью EtOAc/петролейный эфир (1:1) с получением 32 г Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Тур(tBu)]-OAll (5) в виде твердого вещества желтого цвета.

Ф. Синтез Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Тур(tBu)]-OH (6).

К охлажденному (-30°C) раствору Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Тур(tBu)]-OAll (5) (32 г, 32 ммоль) в ДХМ (600 мл) в инертной атмосфере азота добавляли Pd(PPh₃)₄ (3,0 г, 4,33 ммоль) с последующим добавлением по каплям N-метиланилина (10 г, 93 ммоль) в течение 30 мин. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и впоследствии концентрировали под пониженным давлением. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя смесью EtOAc/петролейный эфир (1:1) с получением 26,8 г Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Boc)Тур(tBu)]-OH (6) в виде твердого вещества желтого цвета. ¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ 7,75-7,77 (2H, m), 7,59- 7,60 (2H, m), 7,32-7,33 (4H, m), 7,09-7,11 (2H, m), 6,87-7,00 (2H, m), 4,27-4,50 (3H, m), 3,30-3,50 (4H, m), 3,02-3,23 (3H, m), 2,75- 2,98 (3H, m), 2,57 (3H, s), 2,48 (3H, s), 2,00 (3H, s), 1,31-1,41 (28H, m). ЖХМС (ЭС, m/z): масса, рассчитанная для C₅₂H₆₇N₅O₁₀S: 953,46, измеренная: 954,55 [M+H]⁺.

2. Загрузка дипептида Fmoc-psi-(R35-N(Boc)-Y36) на смолу Зибера.

В оплавленном микроволновом реакционном сосуде (поставляется компанией SEM Corporation) смолу Зибера NovaSyn TG (поставляется компанией Novabiochem) (0,2 ммоль) обрабатывали с помощью 20%-го пиперидина в DMF (10 мл) и нагревали при 50°C в течение 2,5 мин в микроволновом реакторе SEM. Реакционную смесь сливали и смолу промывали с помощью DMF и снова обрабатывали с помощью 20%-го пиперидина в DMF при 50°C в течение 5 мин в микроволновом реакторе SEM. После сливания и промывки смолы с помощью DMF обработку для снятия защиты повторяли еще один раз. Затем смолу обрабатывали раствором Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-(N-Boc)Тур(tBu)]-OH, полученным выше (3-5 экв.), NATU (2,75-4,8 экв.) и ДИЭА (6-10 экв.) в DMF (4 мл) и перемешивали при кт в течение 6-24 ч. Смесь сливали и смолу интенсивно промывали с помощью DMF, а впоследствии экпировали путем обработки с помощью 20%-й Ac₂O в DMF (5 мл) в условиях микроволнового облучения при 50°C в течение 5 мин. Реакционную смесь сливали и смолу интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ.

3. Синтез Fmoc-βA-ИКPEAPGЕК(Alloc)ASPEELNRYYYASLRHYLNL(hC) TRQ(ψ-R35Y36)-смолы Зибера.

Удлинение аминокислот на предварительно загруженной (ψ-R35, Y36)-смоле Зибера (0,2 ммоль)

осуществляли на микроволновом синтезаторе пептидов SEM Liberty Blue. Стандартные α -Fmoc-защищенные аминокислоты подвергали двойному связыванию в 3,8-кратном избытке по отношению к исходной загрузке смолы при 50°C в течение 15 мин с применением НВТУ/ДИЭА в качестве агентов связывания. Fmoc-Arg(Pbf)-ОН подвергали двойному связыванию с применением двухстадийного протокола: 25 мин при кт, затем 15 мин при 50°C и Fmoc-His(Trt)-ОН подвергали двойному связыванию с применением двухстадийного протокола: 4 мин при кт, затем 8 мин при 50°C.

4. Синтез Fmoc- β A-ИКPEAPGEEK(NH₂)ASPEELNRYYYASLRHYLNL(hC) TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зиберы. Снятие защитной группы Alloc.

Смолу, полученную выше, обрабатывали раствором фенилсилана (25 экв.) в бескислородном ДХМ (10 мл). После перемешивания в течение ~ 2 мин, добавляли раствор Pd(PPh₃)₄ (0,5 экв.) в ДХМ (10 мл) и перемешивали смесь смолы в течение 30 мин в атмосфере аргона. Реакционную смесь сливали и смолу промывали бескислородным ДХМ. Снятие защиты повторяли с применением свежих реагентов, после чего реакционную смесь сливали и смолу интенсивно промывали с помощью ДХМ и DMF.

5. Синтез Fmoc- ϵ A-ИКPEAPGEEK(NH-dPEG₁₂-NH₂Fmoc)ASPEELNRYYY ASLRHYLNL(hC)TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зиберы. Связывание N-Fmoc dPEG₁₂-карбоновых кислот на 11К.

Приведенную выше пептидную смолу Зиберы, с которой сняли защиту Alloc, обрабатывали раствором N-Fmoc-dPEG₁₂-карбоновой кислоты (5 экв), НВТУ (4,8 экв.) и ДИЭА (10 экв.) в DMF (7 мл) в микроволновом реакторе SEM при 50°C в течение 15 мин, по истечении которых реакция демонстрировала негативный результат теста Кайзера. Реакционную смесь сливали и смолу интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ.

6. Синтез BrCH₂COHN- ϵ A-ИКPEAPGEEK(NH-dPEG₁₂-NHCOCH₂Br)ASPEELNRYYYASLRHYLNL(hC)TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зиберы. Бис-бромацетилирование при РА и dPEG₁₂.

Вышеуказанную смолу подвергали снятию защиты Fmoc с применением свежего 20%-го пиперидина в DMF при 50°C в течение 5 мин в микроволновом реакторе SEM. Снятие защиты повторяли дважды. Полученную таким образом пептидную смолу, с которой сняли защиту Fmoc, обрабатывали раствором бромуксусного ангидрида (20 экв.) в DMF (5 мл) в микроволновом реакторе SEM при 50°C в течение 10 мин; по истечении которых реакция демонстрировала негативный результат теста Кайзера. Реакционную смесь сливали и смолу интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ и впоследствии сушили.

7. Синтез BrCH₂COHN- β A-ИКPEAPGEEK(NH-dPEG₁₂-NHCOCH₂Br)ASPEELNRYYYASLRHYLNL(hC)TRQ(psi-R35Y36)-CONH₂. Отщепление от смолы и снятие общей защиты.

Высушенную смолу обрабатывали раствором 1,5%-й ТФУ в ДХМ (10 мл) и перемешивали в течение 5-10 мин, впоследствии фильтровали. Эту обработку повторяли дополнительно еще 9 раз, используя свежую смесь для каждой обработки. Объединенные фильтраты впоследствии объединяли и концентрировали с получением неочищенного защищенного пептида в виде пены желтого цвета. Эту пену обрабатывали с помощью 20 мл смеси для расщепления (ТФУ/фенол/Н₂O/ТИПС=88/5/5/2) при комнатной температуре в течение 2,5 ч и впоследствии концентрировали в потоке азота до объема ~ 2,5 мл, после чего добавляли холодный эфир (40 мл) для осаждения пептида. Смесь центрифугировали (5 мин; 5000 об/мин) и декантировали. Этот процесс повторяли еще 2 раза с получением неочищенного пептида в виде порошка почти белого цвета.

В альтернативном варианте осуществления смолу обрабатывали смесью для расщепления без предварительной обработки с помощью 1-2%-й ТФУ в ДХМ с получением полностью незащищенного пептида.

8. Аналог циклического PYY SEQ ID NO. 1. Методика циклизации А и очистка.

Неочищенный пептид, описанный выше, растворяли в бескислородном 50%-м MeCN/воде (5-10 мг/мл), необязательно добавляли ЭДТА (1 мМ). Впоследствии pH реакционного раствора повышали до приблизительно 8 путем добавления 7,5 мас./об. % раствора NaHCO₃. Полученный раствор перемешивали при кт в течение 0,5-2,5 ч и впоследствии подкисляли до pH<1 путем добавления ТФУ. Затем раствор концентрировали под пониженным давлением при кт до приблизительно половины исходного объема (~24 мл). Полученный раствор очищали с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ. Очистку проводили с помощью системы для ВЭЖХ Gilson 2020 Personal Purification System с применением колонки Varian Pursuit XR_s C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до конечной концентрации 50% В в течение 36 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Фракции, содержащие продукт, анализировали с помощью аналитической ВЭЖХ на системе для ВЭЖХ Agilent 1100 с применением того же типа колонки, что и выше (4,6×250 мм, 5 мкм). Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества. ЖХМС: 1225,5 (M+4H)/4, 1633,4 (M+3H)/3 и 2450,0 (M+2H)/2 для пика продукта при 12,27 мин (ЖХ: колонка Atlantis T3 C18, 5 мкм, 4,6×250 мм, 1,0 мл/мин, градиент 15-60%).

Пример 2. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 2.

1. Синтез смолы H₂N-ИКPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG.

Защитную пептидную смолу синтезировали с применением стратегии Fmoc, как описано выше, на микроволновом синтезаторе пептидов CEM Liberty Blue с применением амидных смол Ринка низкой загрузки, предпочтительно смолы Fmoc-PAL-PEG PS (приблизительно 0,16-0,2 мэкв/г, поставляемой компанией Applied Biosystems) в масштабе 0,1 ммоль, как изображено на схеме 1. Стандартные Fmoc-защитные аминокислоты подвергали связыванию в 5-кратном избытке по отношению к загрузке смолы с применением ДИК/Оксима в качестве агентов связывания и температуры реакции приблизительно 90°C в течение 4 мин. Каждую Fmoc-Arg(Pbf)-ОН подвергали двойному связыванию при 90°C в течение 4 мин, а Fmoc-His(Trt)-ОН подвергали связыванию с применением двухстадийного протокола: 4 мин при кт, затем 8 мин при 50°C. Снятие индивидуальных Fmoc-защит осуществляли с применением 20%-го пиперидина в DMF (раствор для снятия защиты) при 90 °C в течение 1,5 мин.

2. Синтез смолы m-BrCH₂PhCOHN-ИКPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG.

Пептидную смолу, с которой сняли защиту Fmoc (0,1 ммоль), описанную выше, обрабатывали раствором м-бромметилбензойной кислоты (20 экв.) и ДИК (10 экв.) в DMF (4 мл) в микроволновом реакторе при 75°C в течение 15 мин; по истечении данного времени реакцию в целом определяли как завершённую, согласно нингидриновому тесту Кайзера (Kaiser, et al., Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598). В случаях, когда связывание было определено как неполное, связывание повторяли со свежими реагентами. Реакционную смесь сливали и смолу интенсивно промывали DMF и ДХМ.

3. Синтез m-BrCH₂PhCOHN-ИКPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-CONH₂. Снятие защиты и отщепление от смолы.

Впоследствии смолу, указанную выше, обрабатывали смесью для расщепления (масштаб 10 мл/0,1 ммоль), состоящей из ТФУ/воды/фенола/ТИПС (88 : 5 : 5 : 2), и нагревали в микроволновом реакторе при 38°C в течение 40 мин, затем фильтровали. Смолу промывали с помощью ТФУ и объединенные фильтраты концентрировали под потоком азота до объема приблизительно 2,5 мл и пептид осаждали путем добавления холодного диэтилового эфира (40 мл). Суспензию пептид/эфир центрифугировали и декантировали слой эфира. Пептидную таблетку ресуспендировали в эфире, центрифугировали и декантировали и повторяли этот процесс в третий раз. Полученный таким образом неочищенный пептид высушивали в мягком потоке азота.

4. Аналог циклического РYУ с последовательностью SEQ ID NO. 2. Методика циклизации А и очистка.

Неочищенный пептид, упомянутый выше, растворяли в бескислородном MeCN/воде (60%-й MeCN) в концентрации ≤ 4 мг/мл. Впоследствии pH раствора пептида повышали до приблизительно 7-9 путем добавления водн. NH₄OAc (200 мМ, pH 8,4) и перемешивали полученный раствор при кт до завершения циклизации согласно ЖХМС (обычно 3-4 ч). Реакционную смесь циклизации подкисляли до pH 1,5-3 путем добавления ТФУ и концентрировали раствор для удаления большей части органического соразтворителя до точки, в которой происходило легкое помутнение. Для придания смеси однородности при необходимости минимальное количество MeCN добавляли обратно и впоследствии очищали полученный раствор непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ во множестве инъекций с применением колонки C18 Varian Pursuit XRS C18 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до конечной концентрации 40% В в течение 45 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Фракции, содержащие продукт, анализировали с помощью аналитической ВЭЖХ на системе для ВЭЖХ Agilent 1100 с применением соответствующей колонки. Чистые фракции объединяли, концентрировали для удаления большей части органической фазы и впоследствии лиофилизировали.

Пример 3. Синтез аналога циклического РYУ с последовательностью SEQ ID NO: 3.

1. Синтез смолы (H₂N)-ИКPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL-(азидо-НорLeu)-TRQRYPAL-PEG.

Пептид, связанный со смолой, получали в масштабе 0,1 ммоль в соответствии со способом, описанным в примере 2, этап 1, посредством замены Fmoc-hCys(trt)-ОН на Fmoc-азидонорL-ОН в положении 31.

2. Синтез смолы (HCCN(CH₂)₂CONH) -ИКPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL-(азидо-НорLeu)-TRQRYPAL-PEG.

4-Пентиновую кислоту подвергали связыванию со смолой, упомянутой выше, в условиях микроволнового облучения с применением протокола ДИК/НОВТ (75°C, 10 мин). Реакционную смесь сливали и смолу интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ.

3. Синтез (HCCN(CH₂)₂CONH)-ИКPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL-(азидо-НорLeu)-TRQRYPAL-CONH₂

Смолу, упомянутую выше, обрабатывали с помощью 10 мл смеси для расщепления, состоящей из ТФУ/DODT/H₂O/TIS (92,5:2,5 :2,5:2,5) в условиях микроволнового облучения (38°C, 40 мин). Реакцион-

ную смесь сливали и промывали смолу с помощью ТФУ (10 мл). Впоследствии концентрировали объединенный фильтрат под потоком азота до объема ~2,5 мл. Затем добавляли холодный эфир (40 мл) для осаждения пептида и центрифугировали смесь (5 мин; 5000 об/мин) и декантировали. Этот процесс повторяли еще 2 раза с получением неочищенного пептида в виде порошка почти белого цвета.

4. Аналог циклического PYY SEQ ID NO: 3.

Готовят 7 мг CuSO_4 в 2 мл бескислородной H_2O . Готовят 30 мг ТВТА в 5,4 мл EtOH и 0,6 мл MeCN. Предварительно смешивают 0,94 мл раствора CuSO_4 и 4,8 мл раствора ТВТА. Готовят 30 мг Na аскорбата в 3 мл бескислородной H_2O .

К раствору неочищенного азидсодержащего пептида с этапа 3 (100 мг) в 20 мл добавляли предварительно смешанный раствор $\text{CuSO}_4/\text{ТВТА}$, с последующим добавлением 2,4 мл раствора Na аскорбата (раствор немедленно принимал молочное окрашивание). Смесь нагревали до 40°C и перемешивали в течение 1,5 ч, после которых анализ ЖХМС указывал на завершение реакции. Смесь разбавляли до ~40 мл водой (0,1%-я ТФУ); смесь центрифугировали и очищали супернатант с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ. Очистку проводили с применением колонки Varian Pursuit XRS C18 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при 35°C . Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 10% В до промежуточной концентрации 18% В (21 мл/мин), и впоследствии до конечной концентрации 33% В (10,5 мл/мин) в течение 35 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Фракции, содержащие продукт, анализировали с помощью аналитической ВЭЖХ на системе для ВЭЖХ Agilent 1100 с применением того же типа колонки, что и выше (4,6×250 мм, 5 мкм). Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества.

Пример 4. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 4.

1. Синтез смолы (Dde)K(NH₂)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG.

Пептид, связанный со смолой, получали с применением способа, описанного в примере 2, этап 1.

2. Синтез смолы (Dde)K(NH-Glu-(OtBu)NH₂)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG.

Fmoc-Glu-OtBu (5 экв.) подвергали связыванию со смолой, упомянутой выше, в условиях микроволнового облучения с применением способов связывания ДИК/Оксима (90°C , 6 мин; двойное связывание). Смолу сливали и промывали с помощью DMF. Впоследствии снимали защиту Fmoc с применением 20%-го пиперидина в DMF с использованием 3-стадийного протокола (75°C в течение 0,5 мин; 75°C в течение 3 мин; 75°C в течение 3 мин), выполняя промывки с помощью DMF на каждой стадии.

3. Синтез смолы (Dde)K(NH-Glu-(OtBu)NH-Pal)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG

Пальмитиновую кислоту (5 экв.) подвергали связыванию со смолой, упомянутой выше, в условиях микроволнового облучения с применением способов связывания ДИК/Оксима (90°C , 5 мин). Смолу сливали и интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ.

4. Синтез смолы (H₂N)K(NH-Glu-(OtBu)NH-Pal)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG

После промывания смолы, упомянутой выше, с помощью DMF, ее обрабатывали раствором 2%-го гидразина в DMF (6 мл/0,1 ммоль смолы) при кт в течение 5 мин, впоследствии сливали и промывали с помощью DMF. Обработку дополнительно повторяли еще 5 раз.

5. Синтез смолы (H₂N)IKPEAPGEK(NH-Glu-(OtBu)NH-Pal)ASPEELNRYASLRHYLNL(hC) TRQRY-PAL-PEG.

Оставшиеся аминокислотные связывания осуществляли с применением способа, описанного в примере 2, этап 1.

6. Аналог циклического PYY SEQ ID NO: 4.

Остаток синтеза проводили с применением способов, описанных в примере 2, этапы 2-4. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRS C18 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от 23% В до промежуточной концентрации 33% В (21 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 48% В (10,5 мл/мин) в течение 55 мин.

Пример 5. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 5.

Соединение, указанное в заголовке, получали согласно методике, описанной в примере 4, посредством замены пальмитиновой кислоты α -токоферилоксиуксусной кислотой (AcVitE) (8) на этапе 3. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Agilent 300SB C8 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 35% В до промежуточной концентрации 45% В (21 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 60% В (10,5 мл/мин) в течение 60 мин.

Пример 6. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 6.

1. Синтез смолы (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNL(Dde)-(азидо-НорLeu)-TRQRY-PAL-PEG.

Пептид, связанный со смолой, получали, как описано в примере 3, этап 1, посредством замены Fmoc-Leu-OH на Fmoc-Lys(Dde)-OH в положении 30 и введения 4-пентиновой кислоты (подвергнутой связыванию в два этапа) на данном этапе в положении 2, а затем Fmoc-Ile-OH в положении 3.

2. Синтез смолы (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(NH₂)-(азидо-НорLeu)-TRQRY-PAL-PEG.

Вышеуказанную смолу обрабатывали 3%-м гидразином в DMF (в масштабе 8 мл/0,1 ммоль) в течение 5 мин при кт, и впоследствии смесь сливали и промывали с помощью DMF. Эту процедуру повторяли приблизительно 5 раз, после чего смолу интенсивно промывали с помощью DMF и впоследствии ДХМ.

3. Синтез смолы (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(NH-γ-Glu-AcVitE)-(азидо-НорLeu)-TRQRY-PAL-PEG.

Fmoc-Glu-OtBu подвергали связыванию со смолой, упомянутой выше, с применением протокола связывания, описанного в примере 2, этап 1, с временем связывания 5 мин. Защиту со смолы снимали путем обработки 20%-м пиперидином в DMF с применением 3-стадийного микроволнового протокола (75 °С, 0,5 мин; 75 °С, 3 мин; 75 °С, 3 мин), после чего смолу интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ. Впоследствии α-токоферилоксиуксусную кислоту (AcVitE) (8) подвергали связыванию со смолой с применением той же самой методики, которую применяли для связывания Fmoc-Glu-OtBu.

4. Синтез (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(NH-γ-Glu-AcVitE)-(азидо-НорLeu)-TRQRY-CONH₂.

Отщепление пептида от смолы, упомянутой выше, и его осаждение осуществляли с применением методики, описанной в примере 3, этап 3.

5. Аналог циклического PYY SEQ ID NO: 6.

Соединение, указанное в заголовке, получали с применением методики, описанной в примере 3, этап 4. Очистку продукта выполняли на колонке Varian Pursuit XRs C8 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при 35 °С. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 35% В до промежуточной концентрации 48% В (21 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 63% В (10,5 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 7. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 7.

Соединение, указанное в заголовке, получали с применением методики, описанной в примере 4 с остатком К(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 9 вместо положения 11. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Agilent 300SB C8 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 23% В до промежуточной концентрации 43% В (21 мл/мин) и впоследствии до итоговой концентрации 43% В (10,5 мл/мин) в течение 40 мин. Загрязненные фракции, содержащие продукт, подвергали повторной очистке на колонке Waters T3 C18 (250×19 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт с применением градиента от исходной концентрации 25% В до промежуточной концентрации 35% В (21 мл/мин) и впоследствии до конечной концентрации 45% В (10,5 мл/мин) в течение 80 мин.

Пример 8. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 8.

Соединение, указанное в заголовке, получали с применением методики, описанной в примере 4 с остатком К(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11. Очистку продукта выполняли с применением колонки Agilent 300SB C8 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при 35 °С. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 21% В до промежуточной концентрации 31% В (21 мл/мин) и впоследствии до конечной концентрации 41% В (10,5 мл/мин) в течение 40 мин. Загрязненные фракции, содержащие продукт, повторно очищали на колонке Waters T3 C18 (250×19 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт с применением градиента от исходной концентрации 21% В до промежуточной концентрации 31% В (21 мл/мин) и впоследствии до конечной концентрации 40% В (10,5 мл/мин) в течение 80 мин.

Пример 9. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 9.

1. Синтез H₂N-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(hC) TRQ (psi-R35Y36)-смолы Зибера.

Удлинение аминокислот на предварительно загруженной (psi-R35, Y36)-смоле Зибера из примера 1, этап 2 (0,1 ммоль) осуществляли, как описано в примере 1, этап 3, с модификацией, заключающейся в применении 5-кратного избытка защищенных аминокислот.

2. Синтез m-BrCH₂PhCOHN-IKPEAPGEDASPEELNRYASLRHYLNK(hC) TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера.

m-Бромметилбензойную кислоту подвергали связыванию со смолой, упомянутой выше, в соответствии с методикой, описанной в примере 1, этап, с модификацией, подразумевающей связывание при 50 °С вместо 75 °С.

3. Аналог циклического PYY SEQ ID NO: 9.

Соединение, указанное в заголовке, получали из смолы, упомянутой выше, в соответствии с методиками, описанными в примере 1, этапы 7 и 8. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при 35°C. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 10% В до промежуточной концентрации 18% В (21 мл/мин) в течение 10 мин и впоследствии до конечной концентрации 33% В (10,5 мл/мин) в течение 35 мин.

Пример 10. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 10.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, посредством замены Fmoc-Leu-OH на Dde-Lys(Fmoc)-OH в положении 30 и пальмитиновой кислоты на α-токоферилоксиуксусную кислоту (AcVitE) (8) на этапе 3. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Agilent 300SB C8 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 30% В до промежуточной концентрации 40% В (21 мл/мин) в течение 10 мин и впоследствии до конечной концентрации 55% В (21 мл/мин) в течение 35 мин. Загрязненные фракции, содержащие продукт, повторно очищали с применением модифицированного градиента от исходной концентрации 35% В до промежуточной концентрации 43% В (21 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 58% В (10,5 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 11. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 11.

1. Синтез (Alloc)K(NH₂)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера. Смолу, упомянутую выше, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 9, этап 1, с применением Alloc-Lys(Fmoc)-OH вместо Fmoc-Leu-OH в положении 30.

2. Синтез (Alloc)K(NH-γ-Glu-AcVitE)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера Fmoc-Glu-OtBu и α-токоферилоксиуксусную кислоту (AcVitE) (8) (5 экв. каждая) последовательно подвергали связыванию со смолой, упомянутой выше, с применением НВТУ/ДИЭА-опосредованных связываний в условиях микроволнового облучения при 50°C в течение 15-20 мин.

3. Синтез H₂N-K(NH-γ-Glu-AcVitE)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера.

Защитную группу alloc удаляли следуя методике, описанной в примере 1, этап 4.

4. Аналог циклического РУУ SEQ ID NO: 11.

Соединение, указанное в заголовке, получали из смолы, упомянутой выше, в соответствии с методиками, описанными в примере 9, этапы 1-3, с модификацией, подразумевающей применение буферного раствора 1 М трис/HCl, pH 7,5 вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (21×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при 35°C. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 10% В до промежуточной концентрации 18% В (21 мл/мин) в течение 10 мин и впоследствии до конечной концентрации 33% В (10,5 мл/мин) в течение 35 мин.

Пример 12. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 12.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 2, посредством замены Fmoc-Arg(pbf)-OH на Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH в положении 35 на этапе 1 и с модификацией, подразумевающей применение буферного раствора 1 М NaHCO₃ вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 10-60% Н (30 мл/мин В) в течение 36 мин.

Пример 13. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 13.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, применяя пальмитиновую кислоту вместо α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на этапе 2, и с модификацией, подразумевающей применение 60% EtOH/H₂O в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O, и насыщ. водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 15% В до промежуточной концентрации 20% В (100 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 35% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 14. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 14.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, и с Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH вместо Fmoc-Arg(pbf)-OH в положении 35 на этапе 1, и с модификацией, подразумевающей применение буферного раствора 1 М NaHCO₃ вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 6, для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А

(0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин. Загрязненные фракции повторно очищали на колонке с дифенилом Varian Pursuit XRs (30×100 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт с применением градиента 30-50% В (30 мл/мин) в течение 25 мин.

Пример 15. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 15.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, посредством замены связывания Fmoc-Phe-OH на Fmoc-βAla-OH в положении 3, и с модификациями, подразумевающими применение буферного раствора 1 М NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации, и связывания с бромуксусным ангидридом вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 6 (этап 2 из примера 2) с применением следующей методики: пептидную смолу, с которой сняли защиту Fmoc, (0,1 ммоль) обрабатывали раствором бромуксусного ангидрида (10 экв.) в DMF (5 мл) в микроволновом реакторе при 50°C в течение 5-10 мин; по истечении данного времени реакцию обычно определяли как завершенную согласно нингидринному тесту Кайзера. В случаях, когда связывание было определено как неполное, связывание повторяли со свежими реагентами. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин. Загрязненные фракции повторно очищали на колонке с дифенилом Varian Pursuit XRs (30×100 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт с применением градиента 30-50% В (30 мл/мин) в течение 25 мин.

Пример 16. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 16.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, опуская связывание Fmoc-Phe-OH в положении 3, и с применением п-бромметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 6 (этап 2 из примера 2). Кроме того, вместо буферного раствора NH₄OAc применяли 1 М буферного раствора NaHCO₃ для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин. Загрязненные фракции повторно очищали на колонке с дифенилом Varian Pursuit XRs (30×100 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт с применением градиента 30-50% В (30 мл/мин) в течение 25 мин.

Пример 17. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 17.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11 и Fmoc-Ala-OH, применяемым вместо Fmoc-Lys(Вос)-OH в положении 4 на этапе 1. Буферный раствор трис/HCl (1 М, pH 7,5) применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 6 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Agilent Polaris C18-A (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 35% В (40 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 45% В (40 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 18. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 18.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, и Fmoc-Glu(OtBu)-OH, применяемым вместо Fmoc-Lys(Вос)-OH в положении 4 на этапе 1. Буферный раствор трис/HCl (1 М, pH 7,5) применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 6 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Agilent Polaris C18-A (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 35% В (40 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 45% В (40 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 19. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 19.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH-γ-Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH вместо Fmoc-Arg(pbf)-OH в положении 35 на этапе 1, Fmoc-Cys(trt)-OH вместо Fmoc-hCys(trt)-OH, и с применением п-бромметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 6 (этап 2 из примера 2).

Следующую модификацию производили на этапе 6 (этапы 3 и 4 из примера 2). Неочищенный пептид, полученный до циклизации, очищали с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли и обрабатывали твердым NaHCO₃ для по-

вышения pH до ~7-8; полученный раствор перемешивали при кт в течение 4 ч, впоследствии подкисляли до pH 4 с помощью ТФУ. Раствор концентрировали до объема 5-10 мл и добавляли MeCN для солубилизации возможного осадка. Очистку продукта выполняли, как описано выше, с градиентом 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 20. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 20.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH- γ -Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-OH вместо Fmoc-Arg(pbf)-OH в положении 35 на этапе 1 и Fmoc-Cys(trt)-OH вместо Fmoc-hCys(trt)-OH. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19. Окончательную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% Н (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 21. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 21.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH- γ -Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, Fmoc-Ala-OH, применяемым вместо Fmoc-His(trt)-OH в положении 26, и Fmoc-Ala-OH, применяемым вместо Fmoc-Lys(Вос)-OH в положении 4 на этапе 1. Буферный раствор трис/HCl (1 М, pH 7,5) применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 6 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Agilent Polaris C18-A (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 35% В (40 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 45% В (40 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 22. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 22.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 4, с остатком Lys(NH- γ -Glu-Pal), введенным в положение 30 вместо положения 11, Fmoc-Ala-OH, применяемым вместо Fmoc-His(trt)-OH в положении 26, и Fmoc-Glu(OtBu)-OH, применяемым вместо Fmoc-Lys(Вос)-OH в положении 4 на этапе 1. Буферный раствор трис/HCl (1 М, pH 7,5) применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 6 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Agilent Polaris C18-A (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 33% В (40 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 43% В (40 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 23. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 23.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением октадекандикарбоновой кислоты, моно-трет-бутилового эфира (доступного у компании AstaTech, Inc.) вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), протокола связывания, использовавшего НАТУ/ДИЭА при 50 °С в течение 30 мин и NMP в качестве растворителя вместо DMF на этапе 2 и связыванием двух звеньев Fmoc-OEG-OH последовательно перед сочетанием Fmoc-Glu-OtBu на этапе 2. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 24. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 24.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 23, с применением 20-(трет-бутокси)-20-оксоикозановой кислоты (доступной у компании Key Organics, Inc.) вместо октадекандикарбоновой кислоты, моно-трет-бутилового эфира. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 25. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 25.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением стеариновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), протокола связывания, использующего НАТУ/ДИЭА при 50°C в течение 30 мин и NMP в качестве растворителя вместо DMF на этапе 2. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-80% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-80% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 26. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 26.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением арахидиновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), протокола связывания, использующего НАТУ/ДИЭА при 50°C в течение 30 мин и NMP в качестве растворителя вместо DMF на этапе 2. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-90% В. Конечную очи-

стку продукта выполняли с применением градиента 20-90% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 27. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 27.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 23, но опуская связывание Fmoc-Glu-OtBu после последовательных связываний Fmoc-OEG-OH. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 28. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 28.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением пальмитиновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), опуская связывание Fmoc-Phe-OH в положении 3, и с применением п-бромметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 29. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 29.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением пальмитиновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), посредством замены Fmoc-Phe-OH на Fmoc- β Ala-OH в положении 3 и связывания бромуксусного ангидрида вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2) с применением модификации, описанной в примере 15. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 30. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 30.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением пальмитиновой кислоты α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), посредством замены Fmoc-Phe-OH на Fmoc- β u-OH в положении 3, и связывания бромуксусного ангидрида вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2) с применением модификации, описанной в примере 15. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 31. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 31.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 23, с применением стеариновой кислоты вместо октодекандикарбоновой кислоты, моно-трет-бутилового эфира. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 32. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 32.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением пальмитиновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на этапе 2, применением Fmoc-Ala-OH вместо Fmoc-His(trt)-OH в положении 26 и применением Fmoc-Ala-OH вместо Fmoc-Lys(Вос)-OH в положении 4 на этапе 4 (пример 9, этап 1).

Буферный раствор ТРИС/НСl (1 М, рН 7,5) применяли вместо буферного раствора NH_4OAc на этапе 6 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Agilent Polaris C18-A (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 35% В (40 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 45% В (40 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 33. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 33.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением пальмитиновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на этапе 2 и Fmoc-N(Me)-Gln(trt)-OH вместо Fmoc-Gln(trt)-OH в положении 34 на этапе 4 (пример 9, этап 1). В данном случае связывания проводили при кт с применением NMP в качестве растворителя и протокола НАТУ/ДИЭА (1 ч, одно связывание); Fmoc-N(Me)-Gln(trt)-OH и Fmoc-Arg(pbf)-OH подвергали двойному связыванию. В ходе операции применяли двухстадийный протокол снятия защиты Fmoc (20%-го пиперидина в DMF; кт; 10 мин, 15 мин). Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 34. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 34.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением пальмитиновой кислоты вместо α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8), по-

средством замены Fmoc-hCys(trt)-ОН на Fmoc-Cys(trt)-ОН в положении 31, Fmoc-Ile-ОН на 6-Fmoc-аминогексановую кислоту в положении 3 и связывания бромуксусного ангидрида вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2) с применением модификации, описанной в примере 15. Водн. NaHCO₃ (2н) применяли вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 35. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 35.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 9, со следующими модификациями: Fmoc-psi-[N-Me-Arg(Pbf)-N(Вос)Tyr(tBu)]-ОН, полученный из Fmoc-N-Me-Arg(pbf)-ОН вместо Fmoc-Arg(Pbf)-ОН, в соответствии с методикой, описанной в примере 1, этап 1, применяли вместо Fmoc-psi-[Arg(Pbf)-N(Вос)Tyr(tBu)]-ОН (6) для получения загруженной смолы Зи-бера, применяемой в настоящем документе; Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-ОН (от компании Active Peptide) применяли вместо Leu в положении 30; м-хлорметилбензойную кислоту применяли вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 2; связывания проводили при кт с применением NMP в качестве растворителя и применяли протокол НАТУ/ДИЭА (1 ч, одно связывание); Fmoc-Arg(pbf)-ОН подвергали двойному связыванию. В ходе операции применяли двухстадийный протокол снятия защиты Fmoc (20%-го пиперидина в DMF; кт; 10 мин, 15 мин). Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 36. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 36.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 35, посредством замены Fmoc-Ile-ОН на Fmoc-βAla-ОН в положении 3 и связывания бромуксусного ангидрида вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2) с применением модификации, описанной в примере 15. Модифицированную обработку, указанную в примере 19, опускали. Fmoc-βAla-ОН подвергали связыванию в условиях микроволнового облучения при 50°C в течение 20 мин. Насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 37. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 37.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 9, посредством замены Fmoc-hCys(trt)-ОН на Fmoc-Cys(trt)-ОН в положении 31 и Fmoc-Leu-ОН на Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-ОН (от компании Active Peptide) в положении 30. Кроме того, Fmoc-Abu-ОН добавляли к последовательности в положении 2 на этапе 1 и применяли связывание с бромуксусным ангидридом вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 2 с применением модификации, описанной в примере 15. Насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 3 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 38. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 38.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 35, со следующими модификациями: Fmoc-βAla-ОН добавляли к последовательности в положении 2 после этапа 1 с применением микроволнового облучения при 50°C в течение 20 мин и применяли связывание с бромуксусным ангидридом вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 2 с применением модификации, описанной в примере 15. Насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-80% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 39. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 39.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, с применением арахидиновой кислоты вместо α-токоферилуксусной кислоты (AcVitE) (8) на этапе 2. Fmoc-Ser(tBu)-ОН применяли вместо Fmoc-Lys(Вос)-ОН в положении 4 на этапе 4 (пример 9, этап 1) и м-хлорметилбензойную кислоту применяли вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклиза-

ции. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 25% В (100 мл/мин) в течение 5 мин, и затем до конечной концентрации 40% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 40. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 40.

1. Синтез (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNK(Dde)-(азидо-hopLeu)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зиберы.

Удлинение аминокислот на предварительно загруженной (psi-R35, Y36)-смоле Зиберы из примера 1, этап 2 (0,1 ммоль) осуществляли при кт с применением NMP в качестве растворителя, 5-кратного избытка защищенных аминокислот и протокола HATU/ДИЭА (1 ч, одно связывание); Fmoc-Arg(pbf)-OH и Fmoc-His(trt)-OH подвергали двойному связыванию. В ходе операции применяли двухстадийный протокол снятия защиты Fmoc (20%-го пиперидина в DMF; кт; 10 мин, 15 мин).

2. Синтез (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNK (NH₂) - (азидо-) -TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зиберы.

Смолу, упомянутую выше, обрабатывали 2% гидразином в DMF (в масштабе 12 мл/0,2 ммоль) в течение 2 мин при кт и затем смесь сливали. Эту процедуру повторяли приблизительно 4х, после чего смолу интенсивно промывали с помощью DMF и впоследствии ДХМ.

3. Синтез (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNK((OEG) 2-γ-Glu-Pal)-(азидо-hopLeu) -TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зиберы.

Смолу, упомянутую выше, подвергали связыванию с (S)-10,19-диоксо-22-пальмитамидо-3,6,12,15-тетраокса-9,18-диазатрикозандикарбоновой кислотой (5 экв.) [полученной в соответствии с методикой, описанной в синтезе промежуточного соединения 3, посредством замены 18-трет-бутокси-18-оксооктадекановой кислоты на пальмитиновую кислоту на этапе G], с применением протокола HBTU/ДИЭА при кт в течение 1,5 ч. Смолу сливали и интенсивно промывали с помощью DMF и ДХМ.

4. Синтез (HCCH(CH₂)₂CONH)-IKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNK ((OEG) 2-γ-Glu-Pal) - (азидо-hopLeu) -TRQ(psi-R35Y36)-CONH₂.

Высушенную смолу обрабатывали раствором 2% ТФУ в ДХМ (20 мл) и перемешивали в течение 20 мин, впоследствии фильтровали. Эту обработку повторяли дополнительно еще 2 раза, используя свежую смесь для каждой обработки. Объединенные фильтраты впоследствии объединяли и концентрировали с получением неочищенного защищенного пептида в виде пены желтого цвета. Данную пену обрабатывали с помощью 20 мл смеси для расщепления (ТФУ/Н₂О/ТИПС=95/2, 5/2, 5) при кт в течение 2,5 ч, а затем концентрировали под потоком азота до объема около 2,5 мл. Затем добавляли холодный эфир (40 мл) для осаждения пептида и центрифугировали смесь (5 мин; 5000 об/мин) и декантировали. Этот процесс повторяли еще 2 раза с получением неочищенного пептида в виде порошка почти белого цвета.

В альтернативном варианте осуществления смолу обрабатывали смесью для расщепления без предварительной обработки с помощью 1-2% ТФУ в ДХМ с получением напрямую полностью незащищенного пептида. Неочищенный пептид очищали с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-70% В в течение 36 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Фракции, содержащие продукт, анализировали с помощью аналитической ВЭЖХ на системе для ВЭЖХ Agilent 1100 с применением того же типа колонки, что и выше (4,6×250 мм, 5 мкм). Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества. ЖХМС: 1211,8 (M+4H) / 4, 1615,4 (M+3H) / 3 и 2422,9 (M+2H) / 2 для пика продукта при 16,87 мин (ЖХ: Колонка Atlantis T3 C18, 5 мкм, 4,6 × 250 мм, 1,0 мл/мин, градиент 30-60%).

5. Аналог циклического РУУ SEQ ID NO: 40.

Готовят 5,1 мг CuSO₄ в 1 мл Н₂О. Готовят 10,4 мг ТВТА в 3 мл EtOH. Предварительно смешивают 400 мкл раствора CuSO₄ и 3 мл раствора ТВТА. Готовят 13 мг Na аскорбата в 2 мл Н₂О.

К раствору очищенного азидсодержащего пептида с этапа 4 (37 мг) в 4 мл HEPES (0,1 М, pH 7,4) добавляли 1,7 мл предварительно смешанного раствора CuSO₄/ТВТА с последующим добавлением 1 мл раствора Na аскорбата. Корректируют соотношение EtOH/Н₂О до полного осветления реакционного раствора. Смесь перемешивали при кт и контролировали с помощью ВЭЖХ. Через 30 мин реакция была завершена. Смесь доводили до pH 4 и очищали с помощью обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ. Очистку проводили с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-60% В в течение 36 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Фракции, содержащие продукт, анализировали с помощью аналитической ВЭЖХ на системе для ВЭЖХ Agilent 1100 с применением того же типа колонки, что и выше (4,6×250 мм, 5 мкм). Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества.

Пример 41. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 41.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 40, посредством замены (S)-10,19-диоксо-22-пальмитамидо-3,6,12,15-тетраокса-9,18-дiazатрикозандикарбоновой кислоты на L-глутаминовую кислоту, N-(1-оксогексадецил), 1-(1,1-диметилэтил) эфир на этапе 3.

Пример 42. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 42.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 40, посредством замены (S)-10,19-диоксо-22-пальмитамидо-3,6,12,15-тетраокса-9,18-дiazатрикозандикарбоновой кислоты на (S)-22-(трет-бутоксикарбонил)-43,43-диметил-10,19,24,41-тетраоксо-3,6,12,15,42-пентаокса-9,18,23-триазатетратетраконтан-1-карбоновую кислоту (16) (промежуточное соединение 2) на этапе 3.

Пример 43. Синтез аналога циклического РУУ SEQ ID NO: 43.

1. Синтез (Alloc)Lys((OEG)₂-γ-Glu-NH₂)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера.

Удлинение аминокислот на предварительно загруженной (psi-R35, Y36)-смоле Зибера из примера 1, этап 2 (0,1 ммоль) осуществляли при кт с применением NMP в качестве растворителя, 5-кратного избытка защищенных аминокислот и протокола HATU/ДИЭА (1 ч, одно связывание); Fmoc-Arg(pbf)-OH подвергали двойному связыванию. В ходе операции применяли двухстадийный протокол снятия защиты Fmoc (20%-го пиперидина в DMF; кт; 10 мин, 15 мин).

2. Синтез (Alloc)Lys((OEG)₂-γ-Glu-Pal)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера.

Пальмитиновую кислоту подвергали связыванию со смолой с этапа 1 с применением условий микроволнового облучения, используя HATU/ДИЭА при 50°C в течение 20-30 мин и NMP в качестве растворителя.

3. Синтез (H₂N)Lys((OEG)₂-γ-Glu-Pal)-(hC)-TRQ(psi-R35Y36)-смолы Зибера.

Защитную группу alloc смолы, упомянутой выше, удаляли согласно методике, описанной в примере 1, этап 4.

4. Аналог циклического РУУ SEQ ID NO: 43.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 9, этапы 1-3, с применением м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 2. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 44. Синтез аналога циклического РУУ SEQ ID NO: 44 Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 43, модифицированными таким образом, что спаренные звенья Fmoc-OEG-OH и звено Fmoc-Glu-OtBu вводили на этапе 2 вместо этапа 1. Октодекандикарбоновую кислоту, моно-трет-бутиловый эфир (AstaTech, Inc.) применяли вместо пальмитиновой кислоты на этапе 2 и линкер-липидную последовательность устанавливали в положение 11 вместо положения 30. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 45. Синтез аналога циклического РУУ SEQ ID NO: 45.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 43, модифицированными таким образом, что Fmoc-dPEG24-карбоновую кислоту применяли вместо тандемных звеньев Fmoc-OEG-OH и ее вводили на этапе 2 вместе с пальмитиновой кислотой. Линкер-липидную последовательность устанавливали в положение 11 вместо положения 30. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-90% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-90% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 46. Синтез аналога циклического РУУ SEQ ID NO: 46.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 9, с применением Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-OH (полученного у компании Active Peptide) вместо Leu в положении 30. Кроме того, Fmoc-βAla-OH добавляли к последовательности в положении 2 после этапа 1 с применением условий микроволнового облучения при 50°C в течение 20 мин и применяли связывание с бромуксусным ангидридом вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 2 с применением модификации, описанной в примере 15. Твердый неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 47. Синтез аналога циклического РУУ SEQ ID NO: 47.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 44, посредством ввода линкер-липидной последовательности в положение 7 вместо положения 11. Очистку продукта выполняли с применением колонки Varian Pursuit XRs C18 (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией,

описанной в примере 19, с применением градиента 20-60% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-60% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 48. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 48 Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 43, с применением октадекандикарбоновой кислоты, моно-трет-бутилового эфира (AstaTech, Inc.) вместо пальмитиновой кислоты на этапе 2 со временем связывания 30 мин, и установкой линкер-липидной последовательности в положение 22 вместо положения 30. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 49. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 49.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 16-тетрагидропиран-2-илоксипальмитиновую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 10% В (100 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 30% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 50. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 50.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 48, и посредством установки линкер-липидной последовательности в положение 23 вместо положения 30.

Пример 51. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 51.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 9, с применением Fmoc-Lys(Pal-Glu-OtBu)-OH (полученного у компании Active Peptide) вместо Fmoc-Leu-OH в положении 30 и Fmoc-Ser(tBu)-OH вместо Fmoc-Lys(Вос)-OH в положении 4 на этапе 1. 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 10% В до промежуточной концентрации 20% В (100 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 30% В (100 мл/мин) в течение 40 мин. Загрязненные фракции повторно хроматографировали с применением градиента, состоящего из исходной концентрации 10% В и промежуточной концентрации 20% В (100 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до конечной концентрации 30% В (100 мл/мин) в течение 60 мин.

Пример 52. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 52.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 43, с применением Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты вместо tandemных звеньев Fmoc-OEG-OH и введением ее вместе с Fmoc-Glu-OtBu и пальмитиновой кислотой на этапе 2. Линкер-липидную последовательность устанавливали в положение 11 вместо положения 30. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 53. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 53.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 52, с применением четырех tandemных звеньев Fmoc-OEG-OH вместо Fmoc-dPE612-карбоновой кислоты.

Пример 54. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 54.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 53, посредством установки двух tandemных звеньев Fmoc-OEG-OH вместо двух.

Пример 55. Синтез аналога циклического PYY SEQ ID NO: 55.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 43, посредством установки линкер-липидной последовательности в положение 23 вместо положения 30. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 56. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 56.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии со способами, описанными в примере 11, посредством замены α -токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на (4'-хлорбифенил-4-ил)-

уксусную кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 10-28% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 57. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 57.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 3-[(2,4-дихлорфеноксифен-4-ил]пропионовую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 10-30% В (80 мл/мин) в течение 40 мин. Фракции, содержащие продукт, объединяли, подкисляли с помощью ТФУ, концентрировали и повторно хроматографировали на колонке Agilent Polaris C18-A (30×250 мм, 100 Å, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне от исходной концентрации 20% В до промежуточной концентрации 15% В (40 мл/мин) до конечной концентрации 45% В (40 мл/мин) в течение 45 мин.

Пример 58. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 58.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 11-(4-фторфенил)ундекановую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-35% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 59. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 59.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 43, опуская этап 2 и вводя связывание пальмитиновой кислоты на этапе 1. Линкер-липидную последовательность устанавливали в положение 22 вместо положения 11. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-70% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-70% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 60. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 60.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 53, посредством установки двух тандемных звеньев FMOC-OEG-OH вместо четырех и установки линкер-липидной последовательности в положение 7 вместо положения 11. Неочищенный линейный пептид очищали и подвергали циклизации в соответствии с модификацией, описанной в примере 19, с применением градиента 20-80% В. Конечную очистку продукта выполняли с применением градиента 20-80% В (30 мл/мин) в течение 36 мин.

Пример 61. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 61.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 11-[(4-трифторметил)фенил]ундекановую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-35% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 62. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 62.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 11,11,11-трифторундекановую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в каче-

стве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 10-28% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 63. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 63.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 15,15,15-трифторпентадекановую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-30% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 64. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 64.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 16-этоксипальмитиновую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-30% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 65. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 65.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 13,13,14,14,15,15,16,16,16-D9-пальмитиновую кислоту (Cambridge Isotopes) на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-20% В (100 мл/мин) в течение 5 мин и впоследствии до 35% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 66. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 66.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 11-[(2,4-бис(трифторметил)фенил)ундекановую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-35% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 67. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 67.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 11, посредством замены α-токоферилоксиуксусной кислоты (AcVitE) (8) на 11-[(3,5-бис(трифторметил)фенил)ундекановую кислоту на этапе 2 и посредством применения м-хлорметилбензойной кислоты вместо м-бромметилбензойной кислоты на этапе 4 (пример 9, этап 2). 60% EtOH/H₂O применяли в качестве растворителя вместо MeCN/H₂O и насыщенный водн. NaHCO₃ применяли вместо буферного раствора NH₄OAc на этапе 4 для осуществления циклизации. Очистку продукта выполняли с помощью колонки Waters XBridge C18 OBD (50×250 мм, 5 мкм) при кт. Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (10 мМ NH₄OH в воде, pH ~ 9) и буферного раствора В (MeCN) в диапазоне 15-35% В (100 мл/мин) в течение 40 мин.

Пример 68. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 68.

1. Синтез (Fmoc)-βA-IKPEAPGEK(Alloc)ASPEELNRYASLRHYLNCVTRQ(psi-R35Y36)-смола Зибера.

Удлинение аминокислот на предварительно загруженной (psi-R35, Y36)-смоле Зибера из примера 1, этап 2 (0,1 ммоль) осуществляли при кт с применением DMF в качестве растворителя, 6-кратного избыт-

ка защищенных аминокислот и протокола HATU/ДИЭА (10 мин, двойное связывание). В ходе операции применяли двухстадийный протокол снятия защиты Fmoc (20%-го пиперидина в DMF; кт; 10 мин, 15 мин).

2. Синтез (Fmoc)-βA-ИКPEAPGEEK((OEG)₂-γ-Glu-NHCO(CH₂)₁₆CO₂tBu)-ASPEELNRYASLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-смолы Зибера.

Снятие защиты с указанной выше смолы проводили в соответствии со способом, описанным в примере 1, этап 4, с применением модифицированного времени реакции 10 мин для каждой обработки. Впоследствии смолу подвергали связыванию с промежуточным соединением 2 (15) (5 экв.) с применением протокола HATU/ДИЭА в DMF (1 ч, кт).

3. Синтез (BrAc)-βA-ИКPEAPGEEK((OEG)₂-γ-Glu-NHCO(CH₂)₁₆CO₂tBu)-ASPEELNRYASLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-смолы Зибера.

После снятия Fmoc-защиты (20%-го пиперидина/DMF) вышеупомянутую смолу обрабатывали бромуксусным ангидридом (10 экв.; кт, 30 мин) с получением бромацетилированной смолы.

4. Синтез (BrAc)-βA-ИКPEAPGEEK((OEG)₂-γ-Glu-NHCO(CH₂)₁₆CO₂tBu)-ASPEELNRYASLRHYLNCVTRQ(ψ-R35Y36)-CONH₂.

Вышеуказанную смолу обрабатывали смесью для расщепления, содержащей ТФУ/Н₂О/ТИПС (95:2,5:2,5), в течение 1,5 ч при кт. Неочищенный пептид осаждали эфиром в соответствии с процедурой, описанной в примере 1, этап 7.

5. Аналог циклического PYY SEQ ID NO: 68.

Полученный выше неочищенный пептид растворяли в концентрации 10 мг/мл в 10% MeCN/Н₂О и добавляли ТЭА для повышения pH раствора до 8-9. После перемешивания при кт в течение ~20 мин. добавляли ТФУ для понижения pH до 2 и очищали раствор непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке Kinetics C18 Evo (30×100 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 20-60% В в течение 22 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества.

Пример 69. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 69.

1. Синтез (Boc)-G-ISPEAPGEEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLNLE(OAllyl)TRQ(ψ-R35Y36)-смолы Зибера.

Удлинение аминокислот на предварительно загруженной (ψ-R35, Y36)-смоле Зибера из примера 1, этап 2 (0,1 ммоль) осуществляли при кт с применением DMF в качестве растворителя, 6-кратного избытка защищенных аминокислот и протокола HATU/NMM (10 мин, двойное связывание). В ходе операции применяли двухстадийный протокол снятия защиты Fmoc (20%-го пиперидина в DMF; кт; 10 мин, 15 мин).

2. Синтез (Boc)-G-ISPEAPGEEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLNLE(NHS)TRQ(ψ-R35Y36)-смолы Зибера.

Снятие аллос-защиты с вышеуказанной смолы проводили в соответствии со способом, описанным в примере 1, этап 4, с применением модифицированного времени реакции 10 мин для каждой обработки. Впоследствии смолу подвергали связыванию с NHS (10 экв.) с применением протокола HATU/ДИЭА в DMF (1 ч, кт, двойное связывание).

3. Синтез (NH₂)-G-ISPEAPGEEK(dde)ASPEELNRYASLRHYLNLE(NHS)TRQ(ψ-R35Y36).

Вышеуказанную смолу обрабатывали смесью для расщепления, содержащей ТФУ/Н₂О/ТИПС (95 : 2,5 : 2,5), в течение 1,5 ч при кт. Неочищенный пептид осаждали эфиром в соответствии с процедурой, описанной в примере 1, этап 7.

4. Аналог циклического PYY SEQ ID NO: 69.

Полученный выше неочищенный пептид растворяли в концентрации 80 мг/мл в ДМСО и добавляли ТЭА (25 экв.) для осуществления лактамизации. После перемешивания при кт в течение ~30 мин реакционную смесь разбавляли в 10 раз с помощью 10%-го MeCN/воды, доводили pH до 2 и неочищенный пептид очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке Kinetics C18 Evo (30×100 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиента буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 10-60% В в течение 22 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением К (Dole) -защищенного пептида. Защитную группу Dole удаляли с применением 2% гидразина/DMF (10 мг пептида/мл) в течение 30 мин при кт. Реакционную смесь разбавляли в 10 раз с помощью 10% MeCN/вода и доводили pH до 2 с помощью ТФУ и очищали раствор неочищенного пептида, как описано выше, с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества.

Пример 70. Синтез аналога циклического PYY с последовательностью SEQ ID NO: 70.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методиками, описанными в примере 69, посредством замены Fmoc-E(OAl)-ОН на Fmoc-Leu-ОН в положении 30 и замены Fmoc-Val-ОН на Fmoc-E(OAl)-ОН в положении 31.

Пример 71. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 71.

1. Синтез смолы (Boc)-G-ISPEAPGEK(dde)ASPEELNRYYSASLRHYLN E(OAllyl)VTRQ(N-Me-R)Y-NovaSyn TGR.

Удлинение аминокислот на смоле NovaSyn TGR (0,1 ммоль) осуществляли с применением методики, описанной в примере 69, на этапе 1.

2. Аналог циклического РУУ SEQ ID NO: 71.

Соединение, указанное в заголовке, получали из смолы, упомянутой выше, в соответствии с методиками, описанными в примере 69, этапы 2-4.

Пример 72. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 72.

1. Синтез (S)-22-(трет-бутоксикарбонил)-43,43-диметил-10,19,24,41-тетраоксо-3,6,12,15,42-пентакса-9,18,23-триазатетраоктан-1-ового N-гидроксисукцинимидного эфира.

К раствору (S)-22-(трет-бутоксикарбонил)-43,43-диметил-10,19,24,41-тетраоксо-3,6,12,15,42-пентакса-9,18,23-триазатетраоктан-1-овой кислоты (промежуточное соединение 2(16))(54,0 мг, 0,063 ммоль), N-гидроксисукцинимид (14,6 мг, 0,127 ммоль) и HATU (24,1 мг, 0,063 ммоль) в 1, 0 мл DMF добавляли ДИЭА (0,022 мл, 0,127 ммоль) и смесь перемешивали в течение 30 мин при кт и применяли на следующем этапе напрямую без дополнительной очистки.

2. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 72.

К раствору [цикло-(G2-E30), S4, K11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36 (полученного в примере 70) (4 мг, 0,96 мкмоль) в DMF (0,2 мл) добавляли 24 мкл раствора N-гидроксиэфира (полученного на этапе 1) и ТЭА (0,66 мкл; 5 экв.) и смесь перемешивали в течение ночи при кт. Реакционную смесь разбавляли в 10 раз с помощью 10%-го MeCN/воды, доводили pH до 2 с помощью ТФУ и очищали неочищенный пептид непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке Kinetics C18 Evo (30×100 мм, 100 Å, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из градиентного элюирования буферного раствора А (0,1%-я ТФУ в воде) и буферного раствора В (0,1%-я ТФУ в MeCN) в диапазоне 10-60% В в течение 22 мин. УФ-детектирование контролировали при 220 и 254 нм. Чистые фракции объединяли и впоследствии лиофилизировали с получением трет-бутиловый эфир-защищенного пептида. Защитные группы трет-бутилового эфира удаляли с применением смеси ТФУ/Н₂О/ТИПС (95 : 2,5 : 2,5) в течение 1,5 ч при кт. Смесь концентрировали и очищали пептид, как описано выше, с получением продукта в виде твердого хлопкоподобного вещества.

Пример 73. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 73.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены N-Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на N-Fmoc-dPEG6-карбоновую кислоту на этапе 5.

Пример 74. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 74

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, но пропуская этап 5 связывания линкера PEG.

Пример 75. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 75.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-Cys(trt)-OH на Fmoc-hCys(trt)-OH в положении 31 и посредством пропуска этапа связывания Fmoc-βA-OH на этапе 3.

Пример 76. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 76.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, с модифицированными этапом 3 и этапом 4. На этапе А Fmoc-K(Alloc)-OH и Fmoc-K (dde) -OH применяли для положения 30 и положения 11 соответственно. После снятия Alloc-защиты в положении 30 с помощью Pd(PPh₃)₄-фенилсилана mPEG16-карбоновую кислоту подвергали связыванию с HATU-DIPEA. На этапе 4 dde в позиции 11 удаляли с помощью 2% гидразина в DMF.

Пример 77. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 77.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 76, посредством замены mPEG12-карбоновой кислоты вместо mPEG16-карбоновой кислоты на этапе А и посредством пропуска этапа связывания Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на этапе 5.

Пример 78. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 78.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-N-Me-Gln(trt)-OH на Fmoc-Gln(trt)-OH на этапе 3.

Пример 79. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 79.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-N-Me-R(pbf)-OH на Fmoc-R(pbf)-OH на этапе 1В.

Пример 80. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 80.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 79, посредством замены Fmoc-R(pbf)-OH на Fmoc-K(Boc)-OH в положении 4 и посредством замены Fmoc-W(Boc)-OH на Fmoc-L-OH в положении 30 на этапе 3.

Пример 81. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 81.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 80, посредством замены Fmoc-C(trt)-OH на Fmoc-hC(trt)-OH в положении 31 и посредством замены Fmoc-γ-аминобутановой кислоты на Fmoc-βA-OH на этапе 3.

Пример 82. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 82.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-PEG2-карбоновой кислоты на Fmoc-βA-OH и Fmoc-C(trt)-OH на Fmoc-hC(trt)-OH в положении 31, а также посредством пропуска связывания Fmoc-Пе-OH на этапе 3.

Пример 83. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 83.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-K(N3)-OH на Fmoc-hC(trt)-OH в положении 31, посредством замены пент-4-иновой кислоты вместо Fmoc-βA-OH на этапе 3 и следуя методике циклизации В, как описано ниже.

Методика циклизации В. К раствору полностью незащищенного пептида с PEG12-AcBR, установленной в положении 11 (38 мг, 0,0067 ммоль) в 2 мл HEPES (pH 7,4), добавляли 1,7 мл предварительно смешанного раствора CuSO₄/TBTA (раствор готовили путем смешивания раствора 2,2 мг CuSO₄ в воде (0,4 мл) с раствором 11 мг TBTA в EtOH) с последующим добавлением 7 мг натрия аскорбата в воде (1 мл). Продолжали перемешивать прозрачный реакционный раствор при комнатной температуре и контролировали с помощью ВЭЖХ. Через 30 мин реакция завершалась, и реакционную смесь доводили до pH 4 с применением ТФУ и подвергали ВЭЖХ-очистке (колонка Pursuit XRS 5 250×30 мм C18, со скоростью потока @ 30 мл/мин, контролируя длину волны 214 нм, с градиентом в диапазоне от 20-60% ACN-вода/вода, оба с 0,1%-й ТФУ, в течение 36 мин). Желаемую фракцию собирали и лиофилизировали.

Пример 84. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 84.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством пропуска этапа связывания Fmoc-βA-OH, посредством замены N3-PEG8-карбоновой кислоты вместо Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на этапе 5 и посредством замены связывания 3-(бромметил)бензойной кислоты с ДИК на ацилирование бромуксусного ангидрида на этапе 3 и следуя методике циклизации С, как описано ниже.

Методика циклизации С. К раствору полностью незащищенного пептида (20 мг, 0,0035 ммоль) в 5 мл дегазированной воды добавляли водн. раствор NaHCO₃ для доведения реакционной смеси до pH 6,4 или выше. Через 20 мин ЖХМС показала, что реакция завершена, и реакционную смесь доводили до pH 4 с помощью ТФУ и подвергали ВЭЖХ-очистке (колонка Pursuit XRS 5 250×30 мм C18, со скоростью потока @ 30 мл/мин, контролируя длину волны 214 нм, с градиентом в диапазоне от 10-60% ACN-вода/вода, обе с 0,1%-й ТФУ, в течение 36 мин). Желаемую фракцию собирали и лиофилизировали.

После циклизации циклизованное промежуточное соединение подвергали удлинению линкера путем "клик-химии", следуя методике циклизации В с N-(1-бромо-2-оксо-7, 10, 13-триокса-3-азагексадекан-16-ил)пент-4-инамидом, который получали путем связывания N-Вос-PEG4-NH₂ с пент-4-иновой кислотой с применением HATU-DIPEA с последующим снятием Вос-защиты с помощью ТФУ и ацилированием с помощью бромуксусного ангидрида в присутствии ТЭА.

Пример 85. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 85.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, с линкером PEG12-AcBr, установленным в положении 23 вместо положения 11.

Пример 86. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 86.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, с линкером PEG12-AcBr, установленным в положении 22 вместо положения 11.

Пример 87. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 87.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, с линкером PEG12-AcBr, установленным в положении 7 вместо положения 11.

Пример 88. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 88.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-V-OH на Fmoc-hC(trt)-OH в положении 31, посредством замены Fmoc-C(trt)-OH на Fmoc-L-OH в положении 30 и посредством замены Fmoc-G-OH на Fmoc-βA-OH на этапе 3.

Пример 89. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 89.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 88, посредством пропуска этапа 1 для получения восстановленного дипептида посредством замены загрузки Fmoc-Y(tBu)-OH с последующим соединением с Fmoc-(N-Me)R-OH на загрузку Fmoc-psi-(R35-N(Вос)-Y36)-OH на этапе 2.

Пример 90. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 90.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 89, посредством замены Fmoc-βA-OH на Fmoc-G-OH на этапе 3.

Пример 91. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 91.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 89, посредством замены Fmoc-hC(trt)-OH на Fmoc-C(trt)-OH в положении 30 на этапе 3.

Пример 92. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 92.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 90, посредством замены Fmoc-hC(trt)-ОН на Fmoc-V-ОН в положении 31 и посредством замены Fmoc-L-ОН на Fmoc-C(trt)-ОН в положении 30 на этапе 3.

Пример 93. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 93.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-V-ОН на Fmoc-hC(trt)-ОН в положении 31, посредством замены Fmoc-C(trt)-ОН на Fmoc-L-ОН в положении 30 и посредством замены Fmoc-G-ОН на Fmoc-βA-ОН на N-конце на этапе 3.

Пример 94. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 94.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-V-ОН на Fmoc-hC(trt)-ОН в положении 31 и посредством замены Fmoc-C(trt)-ОН на Fmoc-L-ОН в положении 30 на этапе 3.

Пример 95. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 95.

Соединение, указанное в заголовке, получали (в масштабе 0,05 ммоль) в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-V-ОН на Fmoc-hC(trt)-ОН в положении 31, посредством замены Fmoc-Glu(OAlloc)-ОН на Fmoc-L-ОН в положении 30, посредством замены Fmoc-Lys (dole)-ОН на Fmoc-Lys(Alloc)-ОН в положении 11, посредством замены Fmoc-Ser(tBu)-ОН на Fmoc-K(Boc)-ОН в положении 4 и посредством замены Boc-G-ОН на Fmoc-βA-ОН на N-конце на этапе 3.

К полученной выше смоле добавляли бескислородный ДХМ (10 мл), фенилсилан (10 экв.) и раствор Pd(PPh₃)₄ (0,2 экв.) в ДХМ (1 мл) и перемешивали смесь в течение 10 мин. Реакционную смесь сливали и смолу промывали бескислородным ДХМ и снятие защиты повторяли один раз.

К смоле, полученной выше, добавляли DMF (10 мл), НАТУ (5 экв) и ДИЭА (10 экв) и смесь перемешивали в течение 5 мин, впоследствии добавляли раствор N-гидроксисукцинимид (10 экв) в DMF и перемешивали в течение еще 20 мин. Смолу фильтровали и процедуру повторяли один раз.

Защиту со смолы, полученной выше, снимали в течение 2 ч при кт в ТФУ/ТИПС/вода (95/2,5/2,5) (10 мл). Смесь для расщепления концентрировали до приблизительно 1 мл и впоследствии добавляли к 40 мл эфира. Полученный осадок собирали центрифугированием и сушили в атмосфере N₂.

Материал, полученный выше, растворяли в 9 мл ДМСО, к которому добавляли 10 экв ТЭА и реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 3 ч при кт. Полученный раствор разбавляли до 30 мл водой, рН доводили до 2 и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке 30 мм × 250 мм C18, элюируя с линейным градиентом 20-40% ACN в воде (0,1%-я ТФУ) в течение 30 мин. Фракции, содержащие продукт, лиофилизировали.

Материал, полученный выше, впоследствии обрабатывали 1-2% гидразина/DMF (1 мл) для удаления Dole из лизина. Полученную смесь разбавляли до 10 мл водой, доводили рН до 2 и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ, как описано выше.

Полученный продукт затем растворяли в 10% ACN/вода, доводили рН до 10 и добавляли раствор бромуксусного N-гидроксисукцинимидного эфира (раствора 3 экв. 0,1 M/DMF) и реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 10 мин при кт. Полученную смесь разбавляли до 10 мл водой, доводили рН до 2 и впоследствии очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ, как описано выше, с получением продукта, указанного в заголовке.

Пример 96. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 96.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены N-Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на N-Fmoc-dPEG24-карбоновую кислоту на этапе 5.

Пример 97. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 97.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 1, посредством замены Fmoc-G-ОН на Fmoc-βA-ОН на этапе 3.

Пример 98. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 98.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 89, но пропуская этап связывания Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на этапе 5.

Пример 99. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 99.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 90, но пропуская этап связывания Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на этапе 5.

Пример 100. Синтез аналога циклического РУУ с последовательностью SEQ ID NO: 100.

Соединение, указанное в заголовке, получали в соответствии с методикой, описанной в примере 94, но пропуская этап связывания Fmoc-dPEG12-карбоновой кислоты на этапе 5.

Пример 101. Определение подлинности и получение mAb MSCB97.

Выбор PH9L3 VL и PH9H5 VH в качестве исходных переменных областей для конструирования Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела PH9L3 (SEQ ID NO: 128) (Teplakov et al., "Structural diversity in a human antibody germline library," mAbs Aug-Sep 8(6):1045-63 (2016)) и вариабельная

область тяжелой цепи (VH) PH9H5 (SEQ ID NO: 129) (Teplyakov et al., "Structural diversity in a human antibody germline library" *mAbs* Aug-Sep 8(6):1045-63 (2016)) были выбраны в качестве исходных вариабельных областей для конструирования mAb, пригодных для конъюгации с пептидом. PH9L3 состоит полностью из человеческих последовательностей гена зародышевой линии вариабельной области Ig и поэтому не содержит каких-либо мутаций последовательностей, полученных в процессе созревания аффинности в условиях *in vivo*, что обеспечивает высокоаффинное антиген-специфическое связывание. CDR3 PH9H5 является единственным сегментом, который не состоит из человеческих последовательностей гена зародышевой линии вариабельной области в этой VH. CDR3 PH9H5 относится к антителу к человеческому CCL2, CNTO 888, и его описывают последовательностью SEQ ID NO: 130. Получали Fab, содержащий пару PH9H5/PH9L3 VH/VL.

Последовательности PH9L3, PH9H5 и человеческие последовательности зародышевой линии V-области и J-области, с которыми они наиболее схожи, выравнивали для определения идентичности или сходства последовательности с последовательностями зародышевой линии. PH9H5 выравнивали с цепочкой (SEQ ID NO: 131) соединенных человеческих генов зародышевой линии Ig IGHV3-23*01 (PubMed ID: M99660) (SEQ ID NO: 132) и человеческих IGHJ1*01 (PubMed ID: J00256) (SEQ ID NO: 133), причем единственное различие между аминокислотной последовательностью PH9H5 и соединенной человеческой последовательностью IGHV3-23*01-IGHJ1*01 находится в участке VH CDR3, который в случае PH9H5 представлял собой SEQ ID NO: 130. PH9L3 выравнивали с цепочкой (SEQ ID NO: 134) соединенных человеческих генов зародышевой линии Ig IGKV3-11*01 (PubMed ID: X01668) (SEQ ID NO: 135) и IGKJ1*01 (PubMed ID: J00242) (SEQ ID NO: 136), причем единственным различием является одно отклонение в участке соединения гена V с геном J.

Конструирование и получение Cys-замещенных вариантов PH9H5 и PH9L3.

Варианты VH PH9H5, которые содержат одну цистеиновую замену в выбранных остатках CDR во всех трех CDR V-области, конструировали, получали и клонировали в виде полных тяжелых цепей с константной областью человеческого IgG1 в экспрессионный вектор млекопитающего-хозяина. Структуру Fab PH9H5/PH9L3 использовали для облегчения выбора остатков CDR для замены, которые более доступны для конъюгации, а в некоторых вариантах дополнительные остатки глицина (Gly) вставляли на одной из сторон введенного цистеинового остатка для потенциального увеличения доступности цистеина для конъюгации. Конструировали и получали аналогичные варианты VL PH9L3, за исключением того, что их клонировали в виде полных легких цепей с человеческой константной областью каппа в экспрессионный вектор. Всего создавали 24 экспрессионных конструкта вариантов PH9H5 с единичным цистеином и 22 экспрессионных конструкта вариантов PH9L3 с единичным цистеином. Остатки, выбранные для замены в пределах PH9H5_VH (SEQ ID NO: 129) и в пределах PH9L3_VL (SEQ ID NO: 128), представлены на фиг. 2.

Полученные экспрессионные конструкты использовали для экспрессирования Cys-вариантов путем временной котрансфекции каждой конструкции Cys-варианта HC на основе PH9H5 вместе с конструкцией LC PH9L3 дикого типа или котрансфекции каждой конструкции Cys-варианта LC на основе PH9L3 вместе с конструкцией HC PH9H5 дикого типа. Для начальных пробных трансфекций использовали клетки Expi293, полученные из HEK, в качестве клетки-хозяина для экспрессии в объеме 20 мл. Большинство Cys-вариантов HC и LC демонстрировали хороший уровень экспрессии при определении на основе количественного анализа в культуре супернатанта.

Пять исходных Cys-вариантов HC (MSCB33-MSCB37) экспрессировали в клетках Expi293 в объеме 750 мл и очищали варианты белков. Выход после очистки и качественные свойства очищенных вариантов были практически идентичными и достаточными для использования очищенных белков в начальных реакциях конъюгации пептидов.

Оценка конъюгации пептидов с Cys-вариантами HC на основе PH9H5.

Аналитическое определение массы белка MSCB33 и других вариантов белков показало наличие цистеиновых аддуктов в цистеиновых остатках, предназначенных для конъюгации (два на одном mAb), а также отсутствие лизинового остатка на C-конце HC, что обычно наблюдается в полученных путем рекомбинации моноклональных антителах. Для получения варианта mAb для конъюгации аддукты удаляли с помощью процесса восстановления, разработанного для сохранения исходных дисульфидных связей в mAb (см. пример 103). Начальные пробные конъюгации с аналогом человеческого пептида оксинтомодулина (ОХМ) (GCG Aib2, Glu16,24, Arg20, Leu27, Lys30-ε-(PEG₁₂)-NH₂) проводили малеимидным способом для всех пяти Cys-вариантов HC mAb. Эффективность конъюгации различалась между вариантами mAb, которую качественно оценивали по продуктам реакции конъюгации и относительному процентному содержанию каждого из них. По сравнению с другими I102C-вариантами, содержащими фланкирующие глициновые остатки, наибольшую эффективность, определенную по наибольшему процентному содержанию гомодимера, наблюдали с MSCB33, а при использовании Y103C-вариантов MSCB35 или MSCB37 конъюгация была слабой или отсутствовала.

Несколько других Cys-вариантов HC и LC с выполненными цистеиновыми заменами в различных CDR (замена T28C, S30C и S54C в PH9H5_VH (SEQ ID NO: 129) и замена S30C и S92C в PH9L3_VL (SEQ ID NO: 128)) были экспрессированы в большом объеме в Expi293. Удаление цистеиновых аддуктов

из этих очищенных белков путем восстановления было сложным, и эти варианты дополнительно не исследовали. В связи с проблемами, возникшими с большинством Cys-вариантов, и исходной высокой эффективностью конъюгации, наблюдаемой с I102C-вариантом PH9H5 mAb (MSCB33), усилия по разработке и дополнительному конструированию сосредоточили на данном конкретном варианте.

Конструирование Fc-области MSCB33.

Для снижения функции Fc в условиях *in vivo* MSCB33 реконструировали с возможностью включения неактивной Fc-области человеческого IgG4 PAA. Человеческий IgG4 PAA имеет мутации S228P/F234A/L235A на человеческом IgG4 аллотипе nG4m(a) (на основании аллеляIGHG4*01, определенного как указано в IMGT). Создавали экспрессионный конструктор с VH MSCB33, слитой с Fc-областью IgG4_PAA, и использовали ее вместе с тем же экспрессионным конструктором LC, который использовали для экспрессии MSCB33, с получением IgG4_PAA-варианта MSCB33, обозначенного как MSCB97. Аминокислотные последовательности VH, HC, VL и LC MSCB97 представлены в SEQ ID NO: 137, 138, 139 и 140 соответственно.

Пробную экспрессию MSCB97 проводили временно в объеме 20 мл в клетках Expi293, и этот вариант mAb имел хороший уровень экспрессии. MSCB97 очищали из большого объема клеток Expi293, в которых проводили экспрессию. Выход MSCB97 после очистки составлял 264,53 мг/л, а качество составляло 85% мономерных молекул. Выход и качество при последующих этапах экспрессии в больших объемах были такими же или лучше и указывали на стабильность, с которой может быть получено данное mAb.

Оценка конъюгации пептидов в основе MSCB97 и возможность проведения реакции конъюгации в различных объемах.

Дисульфидные связи LC-HC отличаются между изотипами IgG1 и IgG4, поэтому была изучена возможность переноса восстановления и малеимидной конъюгации с mAb IgG1 MSCB33 на mAb IgG4_PAA MSCB97 посредством восстановления TCEP и конъюгации пробного пептида OXM-малеимида, описанного выше. Известно, что связь, образующаяся при малеимидной конъюгации, потенциально обратима, поэтому адаптировали и успешно применяли способ бромацетамидной конъюгации, который приводит к созданию более стабильной связи в объеме 10 мг на основе исходного MSCB97.

Конъюгат MSCB97 и аналога OXM-пептида GCG Aib2, Glu16,24, Arg20, Leu27, Lys30-ε-(PEG)₁₂-NH₂ (MSCB97-OXM1), полученный бромацетамидным способом, анализировали для определения эффективности *in vitro* GLP-1R и GCGR. Активности по сравнению с эталонными пептидами и эталонными неструктурированными полипептидными конъюгатами были приемлемыми и схожими с таковыми конъюгата, полученного с тем же пептидом, что и в случае MSCB33 (IgG1). Это показало, что единственное различие между MSCB97 (IgG4_PAA) и MSCB33 (IgG1), то есть различие в изотипе, не оказывает влияния на активность конъюгатов, содержащих один и тот же пептид. Кроме того, эти данные показали, что желаемые активности в условиях *in vitro* могут сохраняться в конъюгате пептид-mAb, полученном с помощью бромацетамидного способа, который обеспечивает создание стабильной *in vivo* связи. Другие аналоги OXM были также конъюгированы с MSCB97 и оценивали активности *in vitro* этих конъюгатов. Эти конъюгаты имели активности GLP-1R и GCGR, аналогичные MSCB97-OXM1, что указывает на способность MSCB97 конъюгировать с различными пептидами с сохранением при этом активности пептида.

Оценка связывания конъюгата пептид-MSCB97 с человеческим CCL2.

Хотя MSCB97 выбирали и конструировали с возможностью отсутствия в нем специфического связывания с антигеном, наиболее вероятным антигеном, которым mAb может связываться, является человеческий CCL2, на основании происхождения VH CDR3. Демонстрирует ли MSCB97 какое-либо специфическое связывание с CCL2, оценивали с использованием двух конъюгатов пептид-MSCB97 с аналогом пептида OXM или аналогом пептида PYY.

Потенциальное связывание с CCL2 напрямую измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в котором конъюгаты иммобилизовали на поверхности с использованием способа захвата антителами к Fc. В качестве положительного контроля использовали доступные в продаже мышинные mAb к CCL2, а в качестве отрицательных контролей выступали два неспецифических человеческих антитела CNTO 9412 и HN3B33. Все контроли аналогичным образом иммобилизовали на поверхности, а рекомбинантный человеческий CCL2 прогоняли над иммобилизованными конъюгатами и контролями в концентрациях до 400 нМ. На основе предварительно заданных критериев анализа наблюдали накопление CCL2, указывающее на специфическое связывание с антигеном, в положительном контроле, но не в отрицательном контроле и не в конъюгате пептид-MSCB97. Это подтверждает, что MSCB97 в соответствующей терапевтической форме конъюгата пептид-mAb не имеет связывания с человеческим CCL2.

Пример 102. Экспрессия и очистка mAb.

Полностью человеческие моноклональные антитела (mAb) могут быть рекомбинантно экспрессированы в экспрессионной клетке-хозяине млекопитающего и очищены из супернатанта клеточной культуры с помощью стандартных способов, известных в данной области. Например, последовательность кДНК, кодирующую легкую (LC) и тяжелую цепи (HC) mAb, причем каждая из них включает подходящий сигнальный пептид для обеспечения секреции, можно клонировать в отдельные экспрессионные векторы млекопитающего или в один экспрессионный вектор с помощью стандартных способов молеку-

лярной биологии. Применяемые экспрессионные векторы могут представлять собой любые из доступных в продаже векторов, таких как pEE12.4, pcDNA™ 3.1(+) или pIRESpuo3 или любой нестандартный экспрессионный вектор с аналогичными функциональными возможностями. В таких векторах транскрипция каждой из тяжелой и легкой цепей mAb индуцирована любым из известных эффективных промоторов, таких как промотор hCMV-MIE. Плазмидную ДНК для трансфекции получают для отдельных экспрессионных конструкторов LC и HC или одного конструктора, экспрессирующего как LC, так и HC, с использованием стандартных способов, таких как набор QIAGEN Plasmid Midi Kit.

Очищенную плазмидную ДНК подготавливают для трансфекции с помощью реактива для трансфекции на основе липидов, такого как трансфекционный реагент Freestyle™ Max, следуя инструкциям производителя, и впоследствии трансфицируют в стандартную экспрессионную линию клеток-хозяев млекопитающего, такую как CHO-S или HEK 293-F. Если LC и HC mAb закодированы отдельными экспрессионными конструкторами, трансфекция этих двух конструкторов происходит одновременно. Перед трансфекцией и после нее клетки млекопитающего культивируют для поддержания или для экспрессии mAb в соответствии со стандартными способами культивирования клеток, при этом плотность клеток находится в диапазонах для поддержания, а культуральная среда для применения и другие условия культивирования клеток определяют конкретной используемой линией клеток-хозяев млекопитающего. Эти параметры, как правило, указаны поставщиком, который предоставил клеточную линию, или в научной литературе. Например, клетки CHO-S поддерживали в среде CHO Freestyle™ в суспензии с перемешиванием при 125 об/мин в увлажненном инкубаторе при температуре 37°C и 8% CO₂ и разделяли, когда концентрация клеток составляла от 1,5 до 2,0 × 10⁶ клеток в мл.

Супернатанты клеточной культуры из временно трансфицированных клеток млекопитающего, экспрессирующих mAb, собирали через несколько дней после трансфекции, очищали путем центрифугирования и фильтровали. Продолжительность экспрессии для клеток CHO-S, как правило, составляет четыре дня, но может быть скорректирована и может отличаться для разных линий клетки-хозяина млекопитающего. Трансфекции больших объемов (> 10 литров) концентрируют в 10 раз с помощью концентратора, такого как Centramate. MAb очищают из осветленного супернатанта с помощью колонки с белком A для проведения аффинной хроматографии, например HiTrap MabSelect Sure, используя стандартные способы связывания mAb со смолой, содержащей белок A, промывки смолы и элюирования белка с использованием буферного раствора с низким pH. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие буферный раствор с pH 7, а пиковые фракции объединяли, фильтровали и диализировали против фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), pH 7,2, в течение ночи при 4°C. После диализа mAb снова фильтровали (фильтр с размером пор 0,2 мкм) и определяли концентрацию белка по поглощению на длине волны 280 нм. Качество очищенного белка mAb оценивали с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (PAGE) и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ, а концентрации эндотоксина измеряли с помощью анализа с лизатом амёбоцитов мечехвоста (LAL). Очищенные mAb хранили при 4°C.

Экспрессия и очистка MSCB97 из временно трансфицированных клеток CHO.

MSCB97 экспрессировали в клетках ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific, г. Уолтем, штат Массачусетс, США; кат. № A29127) путем временной трансфекции клеток очищенной плазмидной ДНК экспрессионного конструктора MSCB97 в соответствии с рекомендациями производителя. Другими словами, клетки ExpiCHO-S™ поддерживали в суспензии в экспрессионной среде ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, кат. № A29100) в инкубаторе с функцией встряхивания при 37°C, 8% CO₂ и 125 об/мин. Клетки пересевали таким образом, чтобы в день трансфекции можно было обеспечивать разведения до 6,0×10⁶ клеток на мл, поддерживая жизнеспособность клеток на уровне 98% или выше. Временные трансфекции проводили с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific, кат. № A29131). На каждый мл разведенных клеток, подлежащих трансфекции, использовали один микрограмм плазмидной ДНК, который разбавляли в комплексообразующей среде OptiPRO™ SFM. Реагент ExpiFectamine™ CHO использовали в соотношении 1 : 3 (об./об., ДНК : реагент), а также разбавляли в OptiPRO™. Разведенную ДНК и трансфекционный реагент объединяли на одну минуту, позволяя сформироваться комплексу ДНК/липид, а затем добавляли к клеткам. После инкубации в течение ночи к клеткам добавляли питательную среду ExpiCHO™ и усилитель ExpiFectamine™ CHO. Клетки культивировали при встряхивании и температуре 32°C в течение пяти дней перед сбором супернатантов культуры.

Супернатанты культуры из временно трансфицированных клеток ExpiCHOST™ собирали путем осветления посредством центрифугирования (30 мин, 6000 об/мин) с последующей фильтрацией (мембрана PES 0,2 мкм, Corning). Трансфекции большого объема (от 5 до 20 л) сначала концентрировали в 10 раз, используя систему тангенциальной проточной фильтрации Pall Centramate. К фосфатно-солевому буферному раствору Дульбекко (DPBS) в концентрации 10x, pH 7,2 добавляли супернатант до достижения конечной концентрации 1x перед помещением полученного раствора на уравновешенную (DPBS, pH 7,2) колонку HiTrap MabSelect Sure с белком A (GE Healthcare; г. Литл Чалфонт, Великобритания) в относи-

тельной концентрации ~20 мг белка на мл смолы, используя хроматографическую систему АКТА FPLC. После загрузки колонку промывали 10 объемами колонки DPBS, pH 7,2. Белок элюировали 10 объемами колонки 0,1 М ацетата Na, pH 3,5. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие 2,0 М трис, pH 7, при объеме элюируемой фракции 20%. Пиковые фракции объединяли и при необходимости доводили pH до ~5,5 с помощью дополнительного объема трис. Очищенный белок фильтровали (0,2 мкм) и определяли концентрацию по поглощению на длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра SynergyHT™. Качество очищенных белков оценивали методами SDS-PAGE и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Dionex). Концентрации эндотоксина измеряли с помощью турбидиметрического LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

Пример 103. Конъюгация mAb и циклического аналога РУУ.

Способ А.

Частичное сокращение mAb с помощью ТСЕР.

Раствор mAb в концентрации 10 мг/мл в трис-ацетатном буферном растворе (20 мл, 1 мМ в ЭДТА) обрабатывали 3 эквивалентами ТСЕР. Показатель pH раствора доводили до 6 и через 1 ч при кт высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ЖХМС) показала, что дисульфидные аддукты в положении С102 полностью восстановлены. Восстановленное mAb очищали путем адсорбции на белке А и элюирования (4 объема колонки 100 мМ уксусной кислоты) с образованием 180 мг восстановленного mAb.

Конъюгация восстановленных mAb и циклического аналога РУУ.

Лиофилизированный пептид (5 экв. по отношению к mAb) добавляли к восстановленным mAb, описанным выше. ЭДТА добавляли до получения конечной концентрации 1 мМ и доводили pH до 7. Концентрацию доводили до 8 мг/мл и выдерживали реакционную смесь при осторожном перемешивании в течение 16 ч при кт. Добавляли ТСЕР (0,5 экв. по отношению к mAb) и реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 4 ч при кт при осторожном перемешивании, после чего количество соединений с высокой молекулярной массой (ММ) сократилось до менее 3%.

Реакционную смесь доводили до pH 5,5 и очищали с помощью ионообменной хроматографии на смоле CarptoSP с использованием градиента от 100% А (100 мМ трис-ацетата, pH 5,5) до 100% В (100 мМ трис-ацетата, pH 5,5; 0,5 М NaCl) за 20 объемов колонки. Фракции, содержащие желаемый конъюгат, объединяли и извлекали 140 мг конъюгата, совместно элюируя небольшое количество непрореагировавшего пептида. Окончательную очистку проводили посредством адсорбции на белке А и элюирования (4 объема колонки, 100 мМ уксусная кислота). Значение pH продукта доводили до 6 с получением 120 мг конъюгата (выход 60%) с чистотой > 90% и содержанием высокомолекулярных соединений < 3%.

Способ В.

Очистка mAb посредством гидрофобной хроматографии (HIC).

Раствор mAb 20 мг/мл в трис-ацетатном буферном растворе помещали на колонку для гидрофобной хроматографии (TOSOH TSKgel phenyl 7,5×21 см) и элюировали с линейным градиентом (0-70% В/А, растворитель А: 5% iPrOH, 1М (NH₄)₂SO₄, 100 мМ фосфатный буферный раствор, pH 6,0; растворитель В: 20% iPrOH, 100 мМ фосфатный буферный раствор). Пики мономеров mAb объединяли, концентрировали (5-10 мг/мл) и диализировали против 3-(N-морфолино)пропансульфонокислотного (MOPS) буферного раствора (100 мМ, pH 5,5).

Частичное восстановление с помощью ТСЕР и конъюгация восстановленного mAb с аналогом циклического РУУ.

К очищенным mAb (27 мл, 9,28 мг/мл) добавляли 4 экв. ТСЕР с последующим добавлением ЭДТА (1 мМ). Через 2 ч при комнатной температуре ЖХМС показала, что дисульфидные аддукты в положении С102 были полностью восстановлены. Восстановленные mAb обрабатывали на колонке для обессоливания Zebra (7×10 мл, 7К MWCO, предварительное уравнивание с помощью 100 мМ MOPS, pH 5,5) для удаления освобожденных цистеинов/глутатиона. К объединенным фракциям восстановленных mAb (28 мл) добавляли раствор пептида РУУ в воде Milli Q (6,5 экв. по отношению к mAb, 15-20 мг/мл) с последующим добавлением ЭДТА (1 мМ). Показатель pH реакционной смеси доводили до 7,2-7,4 путем добавления по каплям 1 н. NaOH. Реакционную смесь выдерживали в течение 18 ч при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Реакционную смесь выдерживали еще в течение 12 ч после добавления дополнительных 0,5 экв. ТСЕР для восстановления димера mAb-mAb, образованного в ходе реакции, и обеспечения превращения в желаемый гомодимер mAb. Показатель pH реакционной смеси снижали до pH 5,5 путем добавления 2 М уксусной кислоты, и неочищенный конъюгат очищали с помощью гидрофобной хроматографии и элюировали линейным градиентом (0-100% В/А, растворитель А: 5% iPrOH, 1М (NH₄)₂SO₄, 100 мМ фосфатный буферный раствор, pH 6,0; растворитель В: 20% iPrOH, 100 мМ фосфатный буферный раствор). Окончательную очистку проводили путем адсорбции на белке А (PBS) и элюирования (NaOAc, pH 3,5). Показатель pH продукта доводили до 6 и диализировали против PBS с получением конечной пробы (56%).

В альтернативном варианте осуществления mAb восстанавливали с помощью глутатиона и/или цистеина. После удаления восстанавливающего агента путем тангенциальной проточной фильтрации (TFF)

к восстановленным mAb добавляли избыток пептида необязательно в присутствии 0,2-0,5 эквивалента ТСЕР.

Пример 104. Определение характеристик конъюгатов mAb.

Аналитическое определение характеристик конъюгатов РУУ-mAb проводили с использованием (i) гидрофобной хроматографии (HIC), (ii) измерения интактной массы с помощью ЖХ ИЭР/МС, (iii) эксклюзионной хроматографии размеров (SEC). Результаты аналитического определения характеристик конъюгатов РУУ-mAb и способ конъюгации показаны в табл. 1.

Таблица 1

Аналитические данные для конъюгатов РУУ-mAb

№	Конъюгация	MS	MS	SEC,	HIC,
соед.		(расчетн.), Да	(измер.), Да	чистота, %	чистота, %
1	Способ В	156144	156142	97,89	100
2	Способ В	155616	155617	н/п	100
3	Способ В	154945	154947	н/п	100
4	Способ В	155972	155966	н/п	100
5	Способ В	157668	157670	н/п	100
6	Способ В	156116	156118	н/п	100
7	Способ В	156172	156155	н/п	100
8	Способ В	156173	156154	н/п	100
9	Способ В	156347	156350	н/п	98
10	Способ В	156347	156349	н/п	100
11	Способ В	156039	156040	н/п	100
12	Способ В	156450	156448	н/п	100
13	Способ В	156138	156162	н/п	100
14	Способ В	156201	156202	н/п	100
15	Способ В	156233	156145	93,79	97
16	Способ В	156233	156236	н/п	100
17	Способ В	156060	156062	98,64	100
18	Способ А	156116	156104	98,64	н/о
19	Способ А	156144	156129	98,15	н/о
20	Способ А	156144	156130	98,21	н/о
21	Способ А	156200	156187	98,22	н/о
22	Способ В	156082	156082	100	96
23	Способ В	156082	156083	93	100
24	Способ В	154714	154722	86	81
25	Способ В	157202	157196	97,55	100
26	Способ В	156117	156111	99,00	100

Пример 105. Анализы *in vitro*.

Оценивали способность соединения 1 активировать рецепторы NPY *in vitro* в клональных клетках (НЕК или СНО), экспрессирующих рецепторы Y2 человека, крысы, мыши и макаки резус и рецепторы Y1, Y4 и Y5 человека. В эти анализы в качестве исследуемых контролей включали РУУ3-36, NPY и PP.

Клеточные линии.

Для применения в анализах с цАМФ разработали стабильные трансфицированные клональные клеточные линии, экспрессирующие рецепторы NPY. Другими словами, клеточные линии НЕК293 трансфицировали с использованием набора Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в соответствии с прилагаемым протоколом, экспрессионными плазмидами, несущими последовательности, кодирующие человеческий рецептор Y2 (учетный номер: NM_000910.2), человеческий рецептор Y5 (учетный номер: NM_006174.2), мышинный рецептор Y2 (учетный номер: NM_008731) и рецептор Y2 макаки резус (учетный номер: NM_001032832). Через сорок восемь часов после трансфекции клетки повторно высевали с селективной средой (DMEM с высоким содержанием глюкозы и 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 50 МЕ пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия и 600 мкг/мл G418). Клетки выдерживали в селективной среде в течение 2 недель, а затем отбирали одиночные клоны с использованием способа предельного разведения. Впоследствии трансфицированные клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Cellgro), обогащенной 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой, 1%-м L-глутамином, 1%-м пируватом натрия, 1%-м пенициллином/стрептомицином

и 600 мкг/мл G418.

Кроме того, в компании DiscoverX Corporation приобретали клеточные линии CHO-K1, экспрессирующие человеческий рецептор Y1 (кат. №: 93-0397C2) и человеческий рецептор Y4 (кат. №: 95-0087C2). Клетки DiscoverX культивировали в среде F12 (Gibco), обогащенной 10% FBS, и в условиях селекции G418 (800 мкг/мл). Крысиный рецептор Y2 экспрессировали в линии Glo-Sensor CHO-K1, полученной от компании Promega Corporation. Эти клетки были трансфицированы плазмидой цАМФ pGloSensor™-23F Camp для люминесцентного анализа цАМФ, но были протестированы и одобрены для применения в анализе цАМФ Perkin-Elmer LANCE. Крысиные клетки Y2 выращивали в среде F12 (Gibco), обогащенной 10% FBS и 800 мкг/мл G418.

Все клеточные линии помещали во флаконы (4×10⁶ клеток/флакон) и хранили в жидком азоте до применения. За день до анализа флаконы размораживали и их содержимое добавляли к 15мл подходящей среды. Клетки центрифугировали при 450 × g в течение 5 мин, супернатанты отсасывали и клетки ресуспендировали в не содержащей G418 среде с плотностью 0,2×10⁶ клеток/мл. Клетки помещали (25 мкл/лунка) в белые 384-луночные покрытые коллагеном планшеты Biocoat до достижения конечной плотности 5000 клеток/лунка. Планшеты с клетками инкубировали в течение ночи в увлажненном инкубаторе для тканевой культуры при 37°C в атмосфере 5% CO₂/90% O₂.

Протокол эксперимента.

Для различных рецепторов выполняли один и тот же анализ цАМФ. Набор цАМФ LANCE (Perkin Elmer Corporation; г. Уолтем, штат Массачусетс, США) использовали во всех экспериментах для количественного определения внутриклеточных концентраций цАМФ. В день анализа готовую среду сливали с клеток и в лунки добавляли по 6 мкл пептидов (концентрация 2X). Пептиды готовили в виде 11 разведений (начиная с 100 нМ или 10 мкМ с последовательными разведениями 1 : 3) в буферном растворе для стимуляции для оценивания ответа в зависимости от дозы. Буферный раствор для стимуляции состоит из 5 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), 500 мкМ IBMX и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнка). К клеткам добавляли следующие 6 мкл буферного раствора для стимуляции, содержащего форсколин (2X, конечная концентрация 5 мкМ) и антитело к цАМФ LANCE (1:100). После инкубации в течение 25 мин при кт в каждую лунку добавляли 12 мкл аналитической детекционной смеси. Детекционную смесь получали путем разбавления комплексов биотин-цАМФ (1:750) и Europium-W8044 (1 : 2250) в детекционном буферном растворе, входящем в набор цАМФ LANCE. Планшет инкубировали в течение 2 ч при кт, а затем считывали как анализ TR-FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции с временным разрешением) на планшетном спектрофотометре Envision (возбуждение 320 нм, эмиссия 615 нм и 665 нм). Данные флуоресценции канала 1 (относительные единицы флуоресценции при 615 нм) и канала 2 (относительные единицы флуоресценции при 665 нм), а также значения их отношения экспортировали в файл Excel.

Анализ данных.

Данные, полученные с помощью планшетного спектрофотометра Envision, выражали в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ), рассчитанных как (615 нм/665 нм) × 10 000. Все образцы анализировали трижды. Данные анализировали с применением внутреннего программного обеспечения для анализа данных Crucible, разработанного Eudean Shaw. Неизвестные концентрации сАМР в каждой лунке интерполировали по стандартным образцам известных концентраций сАМР, включенным в каждый планшет. Параметры, такие как EC₅₀ Log(EC₅₀), наклон кривой Хилла (nH), верх и низ определяли путем откладывания значений концентрации сАМР от логарифма концентрации соединений, осуществляя подгонку с помощью модели 4-R с применением нелинейного приложения взвешенных наименьших квадратов в среде R (открытый источник <http://cran.us.r-project.org/>) реализованного отделом неклинической статистики и вычислений компании Janssen R&D.

Таблица 2

Данные in vitro

Соединение	Активность человеческой изоформы (EC ₅₀ нМ)				Межвидовая активность (EC ₅₀ нМ)		
	hY2	hY1	hY4	hY5	Мышиный Y2	Крысиный Y2	Y2 макаки- резуса
Соединение 1	0,006	> 2910	> 2910	345,7	0,004	0,04	0,004
РУУЗ-36	0,08	66,4	136,7	12,3	0,03	0,50	0,06

Таблица 3

Человеческая изоформа *in vitro* и межвидовое значение EC₅₀

Соед. №	Человек, EC ₅₀ (нМ)				Межвидовое EC ₅₀ (нМ)		
	hY2	hY1	hY4	hY5	mY2	rY2	rhY2
1	0,0065	> 2910	> 2910	345,7	0,004	0,04	0,004
2	0,012						
3	0,012						
4	7,75						
5	0,42						
6	0,065						
7	0,02	678,7	> 1186	10,8			
8	0,295						
9	0,01						
10	0,06						
11	0,015						
12	0,015	1990	520,8	154,5			
13	0,008	> 3000	> 3000	294,2			
14	0,04						
15	0,25						
16	0,04						
17	0,007						
18	0,0085						
19	0,015						
20	0,0075						
21	0,08						
22	0,0085						
23	0,0075						
24							
25	0,0055						
26	0,0085						

Пример 106. Анализ стабильности на мышах в условиях *in vivo*.

Самцы мышей C57BL/6N (возраст 9-12 недель) были получены от компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-часовым циклом свет/темнота. Мышам давали *ad libitum* доступ к воде и содержали на питательной диете (5001, Lab Diet).

Мышам подкожно вводили 1 мг/кг соединения. Приблизительно 100 мкл крови от 3 животных собирали в моменты времени $t=4, 24$ и 48 ч посредством надреза хвоста. Кровь (приблизительно 600 мкл) от 2-3 животных на каждую временную точку также собирали в моменты времени $t=4, 24$ и 48 ч посредством пункции сердца. Пробы крови собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки, содержащие 4% полного раствора ингибиторов протеаз и 1% ингибитора DPPIV. Пробы крови помещали на жидкий лед, а затем центрифугировали со скоростью 10000 об/мин в течение 10 мин в условиях охлаждения ($\sim 5^{\circ}\text{C}$) для удаления клеток в течение 30 мин после сбора в каждый момент времени и всю доступную плазму переносили на 96-луночный планшет. Планшет с лунками хранили в морозильной камере при -80°C . Концентрации соединения измеряли с использованием способа ЖХМС, описанного ниже. Полученные данные показаны в табл. 4.

Масс-спектрометрические анализы для определения % интактного конъюгата.

Пробы плазмы обрабатывали путем иммуноаффинного захвата с использованием антитела к человеческому Fc с последующей обращенно-фазовой ЖХ с масс-спектрометрическим анализом с высоким разрешением и полным сканированием на времяпролетном масс-спектрометре TripleTOF. Необработанные МС-спектры подвергали деконволюции для определения молекулярных масс компонентов во введенных пробах. Для количественного определения непревращенного интактного конъюгата использовали пик молекулярного иона интактного конъюгата. В отдельном анализе образцы плазмы обрабатывали методом иммуноаффинного захвата с использованием антитела к человеческому Fc с последующим расщеплением трипсином и анализом методом ЖХ-МСМС трехквардулольным масс-спектрометре. Для количественного определения общего mAb отслеживали пептид, находящийся в Fc-участке mAb. Для

обоих анализов пробы для построения стандартной кривой и пробы для контроля качества получали путем добавления эталонного стандарта в плазму и обработки с применением той же процедуры и в то же время, что и опытные пробы. Было рассчитано соотношение концентрации интактного конъюгата к общему mAb в виде значения % оставшегося.

Таблица 4
Данные стабильности на мышах в условиях *in vivo*

Соед. №	% оставш. через 48 ч, мышь
1	90,8
2	65,6
3	51,8
4	Н/П
5	80,4
6	49,7
7	75,4
8	51,6
9	51,5
10	42,4
11	60
12	63,5
13	74,4
14	102
15	Н/П
16	96
17	
18	77
19	87,4
20	74,4
21	85,8
22	
23	
24	
25	81,5
26	71,9

Пример 107. Фармакокинетика (ФК).

ФК у мышей DIO.

Самцов мышей DIO C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-часовым циклом свет/темнота. Мышам давали *ad libitum* доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet).

Мышам подкожно (п/к) вводили 1 мг/кг соединения 1, в каждый момент времени умерщвляли 3 животных и собирали кровь через $t=4, 8, 24, 48, 72, 120$ и 168 ч. Кроме того, собирали кровь 3 интактных животных. Приблизительно 300 мкл крови от каждого животного собирали через яремную вену после декапитации под газовой анестезией, индуцированной смесью 70% CO₂ и 30% O₂. Пробы крови (приблизительно 300 мкл) собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки Sarstedt Microvette®, содержащие 12 мкл (соотношение 4%) полного раствора ингибитора протеазы и 3 мкл (соотношение 1%) ингибитора DPP-IV. Пробы крови помещали на жидкий лед, а затем центрифугировали со скоростью 10 000 об/мин в течение ~ 4 мин в условиях охлаждения (~ 5°C) для удаления клеток в течение 30 мин после сбора в каждый момент времени и всю доступную плазму переносили на 96-луночный планшет. Луночный планшет хранили на сухом льду, а затем помещали в морозильник при -80°C. Полученные данные представлены в табл. 5 и на фиг. 3. ФР у крыс

Соединение 1 вводили подкожно и внутривенно самцам крыс линии Спрег-Доули (Charles River Laboratories, г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США) с уровнем дозы 1,0 мг/кг в PBS (pH 7,0-7,6). Приблизительно 500 мкл крови собирали у трех животных в каждый момент времени через подкожную вену ($t=1, 4, 24, 48, 72, 96, 168$ и 240 ч после введения дозы). Через 336 ч после введения дозы собирали пробы крови через яремную вену после декапитации под газовой анестезией, индуцированной смесью 7 0% CO₂

и 3 0% O₂. Пробы крови собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки Sarstedt Microvette®, содержащие 20 мкл (соотношение 4%) полного раствора ингибитора протеазы и 5 мкл (соотношение 1%) ингибитора DPPIV. Пробы крови помещали на жидкий лед, а затем центрифугировали со скоростью 10 000 об/мин в течение ~ 4 мин в условиях охлаждения (~5°C) для удаления клеток в течение 60 мин после сбора в каждый момент времени, и всю доступную плазму переносили на 96-луночный планшет. Концентрации соединения 1 измеряли с использованием способа ЖХМС, описанного ниже. Полученные данные показаны в табл. 6.

ФК у яванского макака.

Все животные голодали по меньшей мере в течение восьми часов перед дозированием и первых четырех часов после сбора проб крови. Трое животных получали однократную в/в дозу 1 мг/кг соединения 1, и трое животных получали однократную п/к дозу 1 мг/кг соединения 1. Кровь собирали до введения дозы и через 1, 6, 10, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 432 и 504 ч после введения дозы. Дополнительную пробу собирали через 0,5 ч после введения дозы для в/в группы. Приблизительно 1 мл крови от каждого животного собирали в покрытые КЗЕ (ЭДТА) пробирки Sarstedt Microvette®, содержащие 4% полного раствора ингибитора протеазы и 1% ингибитора DPPIV. Пробы крови помещали на мокрый лед, а затем центрифугировали в течение 30 мин после сбора в каждый момент времени, а полученную плазму разделяли на три части и переносили в трех повторениях в 96-луночный планшет. Луночный планшет хранили на сухом льду, а затем помещали в морозильник при -80°C. Полученные данные представлены в табл. 7 и на фиг. 4.

Интактный масс-спектрометрический анализ для определения концентраций в плазме.

Пробы плазмы обрабатывали путем иммуноаффинного захвата с использованием антитела к человеческому Fc с последующей обращенно-фазовой ЖХ с масс-спектрометрическим анализом с высоким разрешением и полным сканированием на времяпролетном масс-спектрометре TripleTOF. Необработанные МС-спектры подвергали деконволюции для определения молекулярных масс компонентов во введенных пробах. Для количественного определения использовали пик молекулярного иона интактного конъюгата. Пробы для построения стандартной кривой и пробы для контроля качества получали путем добавления эталонного стандарта в плазму и обработки с применением той же процедуры и в то же время, что и опытные пробы. Данные по ФК у мышей DIO, крыс и яванских макак показаны в табл. 5, 6 и 7 соответственно. Данные по ФК у мышей DIO и яванских макак также показаны на фиг. 3 и 4 соответственно.

Таблица 5

ФК у мышей DIO

Анализ	Доза (мг/кг)	T _{1/2} ч	T _{макс} ч	C _{макс} нг/мл	AUC _{посл} ч * нг/мл
Интактный	1,0	81,05	48	8750	995 460

Таблица 6

ФК у крыс

Путь введения	Доза (мг/кг)	T _{1/2} ч	T _{макс} ч	C _{макс} нг/мл	AUC _{посл} ч * нг/мл
в/в	1,0	93,0	1	19,5	809,2
п/к	1,0	88,7	48	4,2	602,0

Таблица 7

ФК у яванского макака

Путь введения	Доза (мг/кг)	T _{1/2} ч	T _{макс} ч	C _{макс} нг/мл	AUC _{посл} ч * нг/мл
в/в	1,0	178,39	0,67	30 290	1207,39
п/к	1,0	104,32	10	5590	712,19

Пример 108. Исследования эффективности в условиях *in vivo*.

Снижение веса у мышей с алиментарным ожирением (DIO). Острое дозирование

Оценивали способность соединения 1 уменьшать потребление пищи и массу тела у самцов мышей DIO C57B1/6 после однократной дозы. Самцов мышей DIO C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-часовым циклом свет/темнота. Мышам давали *ad libitum* доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet). Животных акклиматизировали к помещению по меньшей мере за одну неделю до начала эксперимента.

За день до введения дозы мышей группировали в когорты из восьми животных в зависимости от индивидуальной массы тела. На следующий день в 15:00-16:00 животных взвешивали и лечили несущей средой (dPBS, pH 7,2), соединением 1 в дозе 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 7,5 нмоль/кг или дулаглутидом в дозе

0,3 нмоль/кг посредством подкожного (п/к) введения. Массу тела и потребление пищи измеряли через 24, 48 и 72 ч после дозирования и рассчитывали снижение веса в процентах и снижение потребления пищи. Статистический анализ проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки в программе Prism. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего) (фиг. 5 и 6).

Снижение веса у мышей с алиментарным ожирением. Хроническая дозировка.

Оценивали способности соединения 1 уменьшать потребление пищи и массу тела, а также улучшать гомеостаз глюкозы при многократном дозировании у самцов мышей DIO C57BL/6 в течение 8 дней. Самцов мышей DIO C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-часовым циклом свет/темнота. Мышам давали ad libitum доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet). Животных акклиматизировали к помещению по меньшей мере за одну неделю до начала эксперимента.

За день до введения дозы мышшей группировали на основании индивидуальной массы тела. В 15:00-16:00 каждого из последующих 8 дней взвешивали животных и потребляемую пищу. Животных лечили несущей средой (dPBS, pH 7,2) или дулаглутидом в дозе 0,3 нмоль/кг посредством ежедневного подкожного введения или соединением 1 в дозах 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 нмоль/кг посредством подкожного введения один раз в три дня. Через 8 дней мышшей не кормили в течение 5 ч, а затем им перорально болюсно вводили 2 г/кг глюкозы при t=0. Через t=0, 30, 60, 90 и 120 мин после введения глюкозы измеряли концентрацию глюкозы в крови, а через t=0, 30 и 90 мин забирали кровь для измерения инсулина в плазме. Статистический анализ проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа или двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки в программе Prism. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (фиг. 7 и 8 и табл. 8-11).

Таблица 8

Влияние соединения 1 на массу тела (г) в течение 8 дней лечения

Лечение	Несущая среда	Соединение 1 (нмоль/кг)				Дулаглутид (нмоль/кг)
		0,1	0,3	1,0	3,0	
День	Н/П	0,1	0,3	1,0	3,0	0,3
-1	46,3 \pm 0,6	46,3 \pm 0,6	46,7 \pm 0,8	46,3 \pm 0,6	46,3 \pm 0,6	46,3 \pm 0,6
0	46,1 \pm 0,7	46,0 \pm 0,6	46,8 \pm 0,7	46,3 \pm 0,6	46,3 \pm 0,6	45,9 \pm 0,6
1	45,8 \pm 0,7	45,0 \pm 0,6	45,2 \pm 0,7	43,9 \pm 0,5	43,9 \pm 0,6	44,1 \pm 0,6
2	45,2 \pm 0,7	43,9 \pm 0,6	43,6 \pm 0,7	42,4 \pm 0,7*	41,8 \pm 0,7*	42,2 \pm 0,6*
3	45,1 \pm 0,7	43,9 \pm 0,6	42,8 \pm 0,6	41,0 \pm 0,6*	40,1 \pm 0,6*	40,6 \pm 0,6*
4	44,7 \pm 0,7	43,4 \pm 0,6	42,0 \pm 0,6	39,9 \pm 0,6*	38,5 \pm 0,6*	39,3 \pm 0,6*
5	44,5 \pm 0,7	43,0 \pm 0,6	41,5 \pm 0,5*	39,1 \pm 0,6*	36,8 \pm 0,7*	38,1 \pm 0,7*
6	44,5 \pm 0,7	43,1 \pm 0,6	41,4 \pm 0,5*	38,6 \pm 0,6*	35,5 \pm 0,8*	37,1 \pm 0,8*
7	44,3 \pm 0,7	43,1 \pm 0,7	41,3 \pm 0,5*	38,2 \pm 0,6*	34,8 \pm 0,9*	36,4 \pm 1,0*
8	45,2 \pm 0,6	46,3 \pm 0,7	41,9 \pm 0,5*	38,8 \pm 0,6	34,7 \pm 1,0*	36,5 \pm 1,1*

Значения представляют среднее \pm SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе *p<0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 9

Влияние соединения 1 на концентрацию глюкозы в крови (мг/дл) в тесте переносимости перорального введения глюкозы (OGTT), проведенном через 8 дней лечения

Лечение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)					Полная AUC (мг/дл/120 мин)	Дельта AUC (мг/дл/120 мин)
		0	30	60	90	120		
Несущая среда	Н/П	148 ± 6	227 ± 15	272 ± 12	206 ± 9	209 ± 13	26492 ± 1232	8702 ± 1082
Соед. 1	0,1	151 ± 4	213 ± 9	249 ± 10	186 ± 11	194 ± 15	24598 ± 849	6433 ± 677
	0,3	137 ± 6	191 ± 11	208 ± 10*	146 ± 8*	160 ± 8*	20786 ± 728*	4379 ± 364*
	1,0	117 ± 5	146 ± 9*	203 ± 10*	135 ± 8*	136 ± *	18285 ± 769*	4319 ± 522*
	3,0	73 ± 11*	129 ± 5*	149 ± 10*	93 ± 9*	101 ± 9*	13703 ± 913*	5004 ± 585
Дулаглутид	0,3	76 ± 9*	151 ± 14*	174 ± 17*	104 ± 10*	119 ± 9*	15758 ± 1054*	6668 ± 1846

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе *p<0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки для значений уровней глюкозы; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки для AUC.

Таблица 10

Влияние соединения 1 на концентрацию инсулина (нг/мл) в тесте OGTT, проведенном через 8 дней лечения

Лечение	Доза (нмоль/ кг)	Время после стимуляции глюкозой (мин)			Полная AUC (мг/дл/120 мин)
		0	30	90	
Несущая среда	Н/П	5,6 ± 1,4	11,3 ± 3,0	4,0 ± 0,6	711,4 ± 164,1.
Соед. 1	0,1	3,0 ± 0,4	6,6 ± 0,8*	2,4 ± 0,2	415,6 ± 44,2
	0,3	2,3 ± 0,2	4,0 ± 0,6*	1,7 ± 0,2	264,3 ± 33,0*
	1,0	1,3 ± 0,2*	2,2 ± 0,1*	1,1 ± 0,2	151,6 ± 12,5*
	3,0	0,4 ± 0,1*	1,2 ± 0,1*	0,4 ± 0,1*	73,9 ± 9,0*
Дулаглутид	0,3	0,6 ± 0,1*	1,7 ± 0,2*	0,7 ± 0,2	108,8 ± 12,3*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

*p<0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки для значений уровней глюкозы; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки для AUC.

Таблица 11
Влияние соединения 1 на концентрацию глюкозы в крови (мг/дл) после приема пищи через 8 дней лечения

Лечение	Доза	Концентрация
	(нмоль/кг)	глюкозы (мг/дл)
Несущая среда	Н/П	180 ± 5
Соединение 1	0,1	164 ± 6
	0,3	160 ± 5
	1,0	149 ± 6
	3,0	105 ± 12*
Дулаглутид	0,3	114 ± 13*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки.

Потеря веса у мышей с алиментарным ожирением в комбинации с лираглутидом. Хроническая дозировка.

Оценивали способности соединения 1 в комбинации с агонистом GLP-1 длительного действия лираглутидом уменьшать потребление пищи и массу тела, а также улучшать гомеостаз глюкозы при многократном введении самцам мышей DIO C57B1/6 в течение 9 дней.

Самцов мышей DIO C57BL/6N (возраст 20 недель, 14 недель на диете с высоким содержанием жиров) приобретали в компании Taconic Laboratory. Мышей содержали по одной особи в клетке с подстилкой AlphaDri в комнате с контролируемой температурой с 12-часовым циклом свет/темнота. Мышам давали ad libitum доступ к воде и поддерживали на диете с высоким содержанием жиров (D12492, Research Diet). Животных акклиматизировали к помещению по меньшей мере за одну неделю до начала эксперимента.

За день до введения конституцию тела измеряли с помощью МРТ и группировали мышей на основе индивидуальной массы тела. В день 0 в 15:00-16:00 взвешивали животных и определяли потребление пищи. Животным из группы однократного лечения вводили несущую среду (dPBS, pH 7,2) или лираглутид в дозе 10 нмоль/кг путем ежедневного подкожного введения или соединение 1 в дозах 0,1 или 1,0 нмоль/кг путем подкожного введения один раз в три дня. Животным в группах комбинированного лечения ежедневно вводили лираглутид (10 нмоль/кг) и соединение 1 в дозах 0,1 или 1,0 нмоль/кг каждые три дня. На 8 день измеряли конституцию тела с помощью МРТ. На 9 день мышей не кормили в течение 5 ч и измеряли уровень глюкозы и инсулина в крови натощак. Статистический анализ проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа или двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки в программе Prism. Все данные представлены в виде среднего значения ±SEM (фиг. 9 и табл. 12-17).

Таблица 12
Влияние соединения 1, лираглутида и комбинаций соединения 1 и лираглутида на ежедневное потребление пищи (г) в течение 9 дней лечения

Лечение	Несущая среда	Соединение 1 (нмоль/кг)				
		0,1	1,0	Н/П	0,1	1,0
		Лираглутид (нмоль/кг)				
День	Н/П	Н/П	Н/П	10,0	10,0	10,0
0	2,6 ±	2,4 ±	2,3 ±	2,4 ±	2,5 ± 0,1	2,8 ±
	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1
1	2,5 ±	2,0 ±	1,2 ±	1,1 ±	0,8 ±	0,5 ±
	0,1	0,2*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*
2	2,5 ±	2,0 ±	0,8 ±	1,1 ±	0,7 ±	0,2 ±

	0,1	0,2	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*
3	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2*	1,5 ± 0,2*	1,2 ± 0,1^	0,5 ± 0,1*
4	2,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1*	1,9 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	0,3 ± 0,1*
5	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1*	1,3 ± 0,2*^	0,5 ± 0,1*
6	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1*	1,5 ± 0,2*^	0,3 ± 0,1*^
7	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1*	0,3 ± 0,2*^
8	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1*^	2,3 ± 0,1*	1,8 ± 0,1*	1,4 ± 0,1*	0,5 ± 0,2*^
9	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2*^

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных на временную точку и на группу, за исключением данных для n=7, которые отмечены значком ^.

*p<0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 13

Влияние соединения 1, лираглутида и комбинаций соединения 1 и лираглутида на массу тела (г) в течение 9 дней лечения

Лечение	Несущая среда	Соединение 1 (нмоль/кг)				
		0,1	1,0	Н/П	0,1	1,0
		Лираглутид (нмоль/кг)				
День	Н/П	Н/П	Н/П	10,0	10,0	10,0
-1	46,8 ± 0,5	46,8 ± 0,5	46,8 ± 0,5	46,8 ± 0,5	46,8 ± 0,5	46,8 ± 0,4
0	46,9 ± 0,4	46,8 ± 0,5	46,8 ± 0,5	47,0 ± 0,5	46,8 ± 0,5	47,0 ± 0,4
1	47,0 ± 0,5	46,4 ± 0,5	45,5 ± 0,5	45,6 ± 0,4	44,9 ± 0,5*	44,3 ± 0,4*
2	46,8 ±	45,9 ±	44,1 ±	44,4 ±	43,7 ±	42,4 ±
	0,5	0,5	0,4*	0,5*	0,5*	0,5*
3	46,6 ± 0,5	45,8 ± 0,5	43,5 ± 0,5*	43,9 ± 0,6*	43,0 ± 0,5*	40,9 ± 0,4*
4	46,5 ± 0,4	45,7 ± 0,5	43,2 ± 0,4*	43,6 ± 0,6*	42,1 ± 0,4*	39,1 ± 0,5*
5	46,4 ± 0,5	45,5 ± 0,6	42,7 ± 0,4*	43,3 ± 0,6*	41,2 ± 0,5*	37,4 ± 0,4*
6	46,8 ± 0,5	46,0 ± 0,6	43,0 ± 0,5*	43,2 ± 0,6*	40,7 ± 0,5*	35,9 ± 0,5*
7	46,7 ± 0,5	45,8 ± 0,6	42,9 ± 0,5*	43,2 ± 0,7*	40,3 ± 0,5*	34,4 ± 0,4*
8	46,6 ± 0,5	45,5 ± 0,6	42,6 ± 0,5*	42,4 ± 0,6*	39,5 ± 0,4*	33,2 ± 0,5*
9	47,0 ± 0,6	45,8 ± 0,6	43,1 ± 0,5*	42,6 ± 0,6*	39,4 ± 0,4*	32,5 ± 0,5*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

*p<0,05 по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 14

Сравнение влияния совместного введения соединения 1 и лираглутида на процентное изменение массы тела по сравнению с суммарным процентным изменением массы тела для соединения 1 или лираглутида, введенных по отдельности на 9 день

Лечение	Соединение 1 (нмоль/кг)			Сумма соед. 1 (0,1) и Lira (10,0)	Соединение 1 (нмоль/кг)			Сумма соед. 1 (1,0) и Lira (10,0)
	0,1	Н/П	0,1		1,0	Н/П	1,0	
День	Лираглутид (нмоль/кг)				Лираглутид (нмоль/кг)			
	Н/П	10,0	10,0		Н/П	10,0	10,0	
9	-2,2 ± 0,7	-9,3 ± 1,1	-15,8 ± 0,8*	-11,5 ± 1,1*	-7,8 ± 1,1	-9,3 ± 1,1	-30,8 ± 0,9*	-17,1 ± 1,9*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ сумма для соединения 1 и лираглутида в сравнении с совместным введением; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 15

Влияние соединения 1, лираглутида и комбинаций соединения 1 и лираглутида на уровень глюкозы в крови (мг/дл), уровень инсулина и НОМА-IR после 9 дней лечения

		Соединение 1 (нмоль/кг)					
		0,1	1,0	Н/П	0,1	1,0	
		Лираглутид (нмоль/кг)					
Несущая среда		Н/П	Н/П	Н/П	10,0	10,0	10,0
Уровень глюкозы в крови после еды (мг/дл)	140,8 ± 11,7	132,6 ± 2,9	126,4 ± 5,1	112,5 ± 4,3	112,9 ± 6,7	79,4 ± 10,1*	
Уровень глюкозы в крови натощак (мг/дл)	173,8 ± 7,8	149,8 ± 4,9	133,1 ± 6,6*	124,1 ± 4,9*	109,8 ± 4,3*	68,6 ± 7,7*	
Концентрация инсулина натощак (нг/мл)	7,2 ± 1,1	8,1 ± 1,1	5,8 ± 0,9	3,9 ± 0,6*	1,9 ± 0,3*	0,5 ± 0,1*	
НОМА-IR	92,1 ± 18,6	86,4 ± 10,7	54,7 ± 9,2	34,8 ± 6,0*	14,5 ± 2,6*	2,9 ± 0,6*	

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 16

Влияние соединения 1, лираглутида и комбинаций соединения 1 и лираглутида на конституцию тела (г), измеренную методом МРТ, после 8 дней лечения

Лечение	Несущая среда	Соединение 1 (нмоль/кг)				
		0,1	1,0	Н/П	0,1	1,0
		Лираглутид (нмоль/кг)				

	Н/П	Н/П	Н/П	10,0	10,0	10,0
Жировая ткань (г), день 1	18,6 ± 0,4	18,6 ± 0,4	18,8 ± 0,6	18,2 ± 0,5	18,1 ± 0,6	18,1 ± 0,7
Жировая ткань (г), день 8	18,9 ± 0,4	18,3 ± 0,5	16,1 ± 0,8*	15,6 ± 0,5*	13,3 ± 0,4*	9,3 ± 0,7*
Нежировая ткань (г), день 1	26,3 ± 0,4	26,3 ± 0,4	26,1 ± 0,7	26,6 ± 0,5	26,7 ± 0,5	27,0 ± 0,6
Нежировая ткань (г), день 8	25,9 ± 0,5	25,4 ± 0,3	24,7 ± 0,6	25,0 ± 0,5	24,4 ± 0,4	22,1 ± 0,4*

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 17

Влияние соединения 1, лираглутида и комбинаций соединения 1 и лираглутида на конституцию тела (%), измеренную методом МРТ, после 8 дней лечения

Лечение	Несущая среда	Соединение 1 (нмоль/кг)				
		0,1	1,0	Н/П	0,1	1,0
		Лираглутид (нмоль/кг)				
	Н/П	Н/П	Н/П	10,0	10,0	10,0
Жировая ткань (%), день 1	39,0 ± 0,8	39,1 ± 0,6	39,4 ± 1,3	38,3 ± 0,9	38,1 ± 1,1	38,1 ± 1,3
Жировая ткань (%), день 8	39,9 ± 0,8	39,6 ± 0,6	37,3 ± 1,6	36,2 ± 0,9	33,4 ± 0,9*	27,7 ± 1,7*
Нежировая ткань (%), день 1	55,3 ± 0,8	55,2 ± 0,6	54,9 ± 1,3	56,0 ± 1,0	56,0 ± 1,2	56,8 ± 1,3
Нежировая ткань (%), день 8	54,7 ± 0,7	55,1 ± 0,6	57,4 ± 1,5	58,1 ± 0,9	61,2 ± 1,0*	66,3 ± 1,7*

Значения представляют среднее + SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки.

Пример 109. Влияние однократного введения соединения 1 на потребление пищи и массу тела крыс линии Sprague-Dawley.

Оценивали способность соединения 1 уменьшать потребление пищи и массу тела у крыс Sprague-Dawley после однократного введения. Животных получили от компании Charles Rivers Labs (г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США), они имели массу тела 200-225 г и были использованы в течение одной недели после доставки. Животных размещали в клетках по отдельности на подстилках Alpha Dru и с пластиковой трубкой для подачи в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом чередования освещения и темноты. Им предоставляли неограниченный доступ к воде и кормили кормом для лабораторных грызунов; корм для грызунов Irradiated Certified PicoLab® Rodent Diet 20, 5K75* (поставщик: Purina Mills, г. Сент-Луис, штат Миссури, США через ASAP, г. Квекертаун, штат Пенсильвания, США). Перед введением дозы каждую крысу взвешивали и регистрировали массу тела.

За день до введения дозы крыс группировали в когорты из восьми животных в зависимости от индивидуальной массы тела. На следующий день животных взвешивали и вводили несущую среду (dPBS, pH 7,2), соединение 1 в дозе 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 нмоль/кг или дулаглутид в дозе 0,3 нмоль/кг путем подкожного введения. Массу тела и потребление пищи измеряли через 1, 2 и 3 ч после введения и рассчитывали снижение массы в процентах и снижение потребления пищи. Статистический анализ проводили с

применением двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки в программе Prism. Все данные представлены в виде среднего значения \pm SEM (табл. 18-20).

Таблица 18

Влияние однократного введения соединения 1 на ежедневное потребление пищи и общее потребление пищи за три дня у крыс линии Sprague-Dawley

Лечение	Доза (нмоль/ кг)	День 0	День 1	День 2	День 3	Общее потребле- ние пищи
Несущая среда		26,7 \pm 0,7	28,6 \pm 1,0	29,4 \pm 0,7	29,7 \pm 0,8	87,7 \pm 1,6
Соединение 1	0,1	25,9 \pm 1,0	27,6 \pm 1,0	29,1 \pm 1,0	29,1 \pm 1,0	85,7 \pm 2,7
	0,3	24,3 \pm 0,7	25,8 \pm 1,1	27,2 \pm 1,3	27,9 \pm 0,9	80,9 \pm 2,7
	1	27,0 \pm 1,1	23,7 \pm 0,6*	25,0 \pm 2,0*	27,1 \pm 0,9	75,8 \pm 3,2*
	3	27,0 \pm 0,8	19,6 \pm 1,4*	19,1 \pm 1,0*	23,6 \pm 1,0*	62,3 \pm 2,5*
Дулаглутид	0,3	26,6 \pm 0,8	27,3 \pm 1,2	30,0 \pm 0,7	30,1 \pm 0,7	87,4 \pm 2,0

Значения представляют среднее \pm SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Даннета для общего потребления пищи; двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений для ежедневного употребления пищи.

Таблица 19

Влияние однократного введения соединения 1 на абсолютную массу тела в течение трех дней у крыс линии Sprague-Dawley

Лечение	Доза (нмоль/ кг)	День -1	День 0	День 1	День 2	День 3
Несущая среда		263,9 \pm 4,9	271,6 \pm 4,7	281,2 \pm 5,0	289,5 \pm 5,3	299,0 \pm 5,9
Соединение 1	0,1	266,0 \pm 2,3	274,1 \pm 2,9	284,3 \pm 2,7	293,3 \pm 2,8	301,4 \pm 2,8
	0,3	264,9 \pm 3,6	270,8 \pm 3,8	278,2 \pm 4,5	285,9 \pm 4,8	294,3 \pm 4,9
	1	266,5 \pm 3,6	276,1 \pm 3,7	280,9 \pm 3,7	287,1 \pm 4,5	294,3 \pm 4,1
	3	265,1 \pm 3,6	272,7 \pm 3,4	274,8 \pm 3,8	275,7 \pm 3,4*	282,1 \pm 3,7*
Дулаглутид	0,3	264,0 \pm 3,1	270,3 \pm 3,0	280,8 \pm 4,2	292,47 \pm \pm 3,6	299,0 \pm 3,3

Значения представляют среднее \pm SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; двухфакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки.

Таблица 20

Влияние однократного введения соединения 1 на изменение массы тела в течение трех дней у крыс линии Sprague-Dawley

Лечение	Доза (нмоль/ кг)	День -1	День 0	День 1	День 2	День 3
Несущая среда		-7,7 ± 1,5	0,0 ± 0,0	9,6 ± 1,5	18,0 ± 1,4	27,4 ± 1,8
Соединение 1	0,1	-8,2 ± 0,9	0,0 ± 0,0	10,2 ± 1,6	19,1 ± 1,0	27,3 ± 1,4
	0,3	-5,9 ± 0,9	0,0 ± 0,0	7,3 ± 1,1	15,1 ± 1,1	23,4 ± 1,7
	1	-9,7 ± 0,8	0,0 ± 0,0	4,7 ± 0,8*	11,0 ± 1,4*	18,2 ± 1,0*
	3	-7,6 ± 1,4	0,0 ± 0,0	2,2 ± 1,6*	3,0 ± 1,5*	9,4 ± 1,9*
Дулаглутид	0,3	-6,3 ± 0,8	0,0 ± 0,0	10,6 ± 1,6	22,5 ± 0,8	28,7 ± 0,6

Значения представляют среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе.

* $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой; однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Даннета для чистого изменения массы тела на 3 день; двухфакторный дисперсионный анализ, критерий множественного сравнения Тьюки для ежедневного изменения массы тела.

Пример 110. Эффекты соединения 1, вводимого отдельно или в комбинации с лираглутидом, у страдающих ожирением макак-резусов.

Оценивали способность соединения 1 к снижению потребления пищи у страдающих ожирением макак-резусов. Кроме того, оценивали дополнительную эффективность введения лираглутида в сочетании с эффективной дозой соединения 1. Во-первых, проводили сокращенное исследование диапазона доз с целью определения дозы лираглутида для применения при комбинированном введении. Шесть животных получали один раз в день в течение трех недель подкожно физиологический раствор. Потребление пищи измеряли ежедневно и определяли исходное потребление пищи как среднее ежедневное потребление в течение трех недель введения несущей среды. Эти шесть животных затем разделяли на две группы; 0,01 мг/кг ($n=3$) и 0,02 мг/кг ($n=3$). Каждая группа получала ежедневное подкожное введение лираглутида в течение одной недели для определения влияния на потребление пищи относительно исходного уровня и для определения максимальной переносимой дозы. Потребление пищи также измеряли в течение двух недель после прекращения введения лираглутида. Все данные представлены в виде среднего еженедельного потребления пищи ±SEM (фиг. 10).

Для оценки эффективности соединения 1 использовали десять (10) страдающих ожирением макак-резусов. После 2-недельного исходного периода подкожно вводили соединение 1 ежедневно в течение 4 недель. Животным вводили в течение 7 дней дозу 0,01 мг/кг, впоследствии 7 дней - дозу 0,03 мг/кг, затем 9 дней - дозу 0,015 мг/кг и в конце 5 дней - совместно соединение 1 в дозе 0,015 мг/кг в комбинации с лираглутидом в дозе 0,01 мг/кг. Потребление пищи контролировали ежедневно, а массу тела измеряли еженедельно. Концентрации глюкозы, инсулина, общего холестерина, HDL, LDL, ALT и AST оценивали в исходном состоянии после лечения соединением 1 и после лечения комбинацией. Все данные представлены в виде среднего значения ±SEM (табл. 21, 22 и фиг. 11 и 12).

Таблица 21

Влияние соединения 1 с добавкой лираглутида на потребление пищи у страдающих ожирением макак-резусов

Дни введения	Соединение 1 (мг/кг)
--------------	----------------------

	0,01	0,03	0,015	0,015+ лираглутид
2 исходные недели	190 ± 15			
1	160 ± 9	149 ± 12	117 ± 18	50 ± 11
2	167 ± 19	149 ± 14	72 ± 14	13 ± 5
3	175 ± 13	94 ± 16	72 ± 12	15 ± 10
4	196 ± 14	181 ± 13	86 ± 14	34 ± 17
5	166 ± 15	101 ± 12	77 ± 8	34 ± 12
6	180 ± 14	99 ± 27	91 ± 12	
7	146 ± 12	73 ± 11	75 ± 4	
8			97 ± 12	
9			118 ± 21	

Таблица 22

Влияние соединения 1 с добавкой лираглутида на массу тела у страдающих ожирением макак-резусов

Лечение	Доза (мг/кг)	Масса тела (BW) (кг)
До введения	Н/П	15,8 ± 0,9
Соединение 1	0,01	15,9 ± 0,9
	0,03	15,7 ± 0,9
	0,015	15,4 ± 0,8*
Соединение 1+лираглутид	0,015	15,0 ± 0,8*

Значения представляют собой среднее ±SEM по данным от 8 животных в каждой группе.

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

Однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений

Специалистам в данной области техники следует понимать, что в варианты осуществления, описанные выше, можно вносить изменения без отступления от общей концепции, обладающей признаками изобретения, представленной в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, и предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определяемых настоящим описанием.

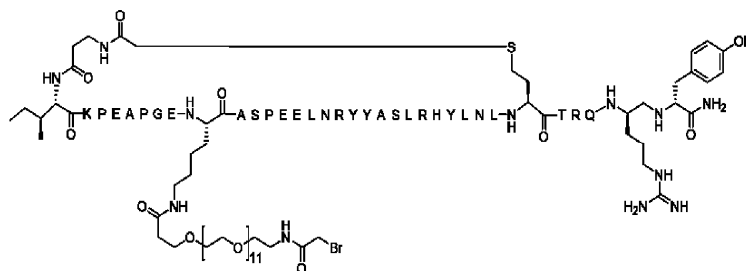
Все процитированные здесь документы включены путем ссылки.

К примерам последовательностей циклического РУУ или его конъюгатов изобретения относятся:

SEQ ID NO: 1

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(35R,36Y)]-PYY2-36

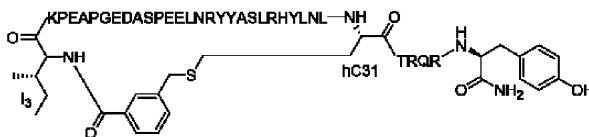
Структура:



SEQ ID NO: 2

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31)]-PYY3-36

Структура:

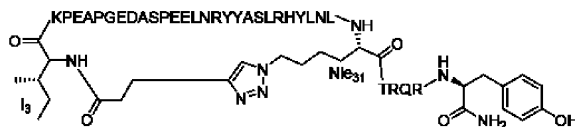


SEQ ID NO: 3

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₂триазилил-Nle31)]-PYY3-36

Структура:

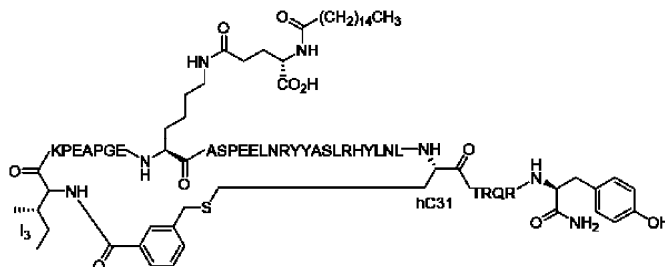
044997



SEQ ID NO: 4

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)11]-PYY3-36

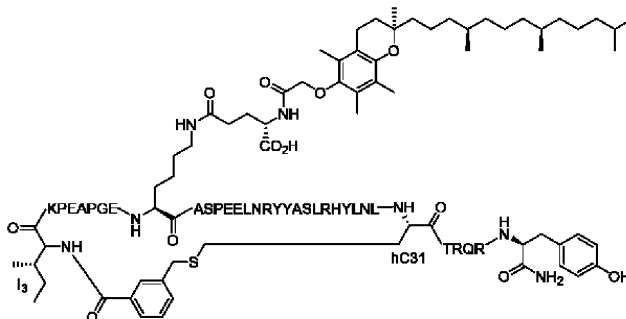
Структура:



SEQ ID NO: 5

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-AcVitE)11]-PYY3-36

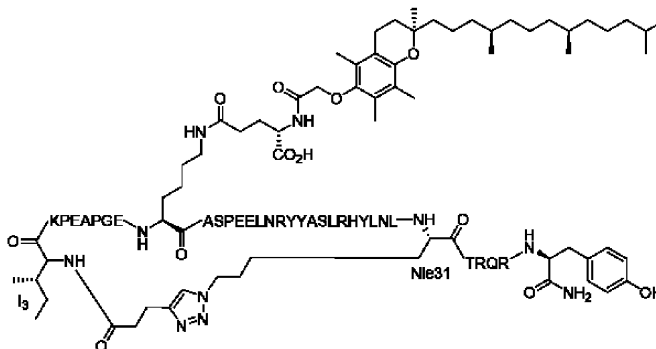
Структура:



SEQ ID NO: 6

Название: [цикло-(13-CO (CH₂)₂триазолил-Nle31), K(γ-Glu-AcVitE)11]-PYY3-36

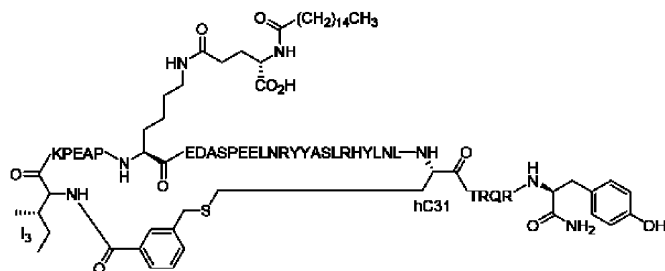
Структура:



SEQ ID NO: 7

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)9]-PYY3-36

Структура:

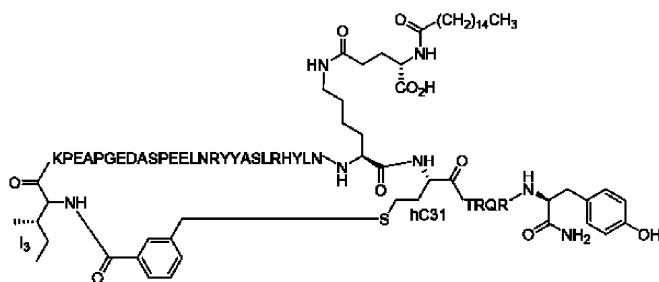


SEQ ID NO: 8

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)30]-PYY3-36

Структура:

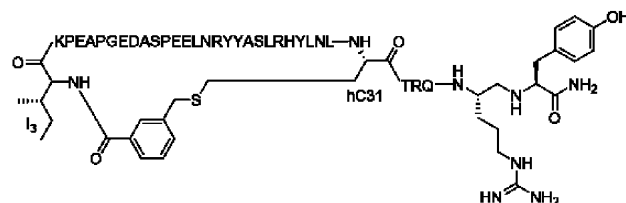
044997



SEQ ID NO: 9

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), psi-(R35Y36)]-PYY3-36

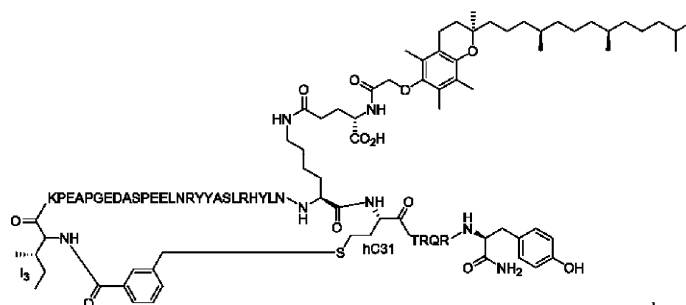
Структура:



SEQ ID NO: 10

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-AcVitE)30]-PYY3-36

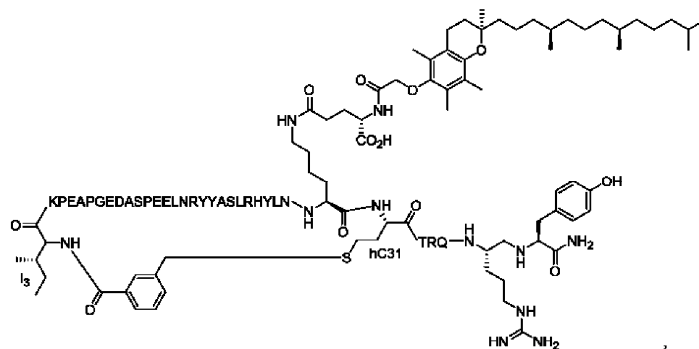
Структура:



SEQ ID NO: 11

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-AcVitE)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

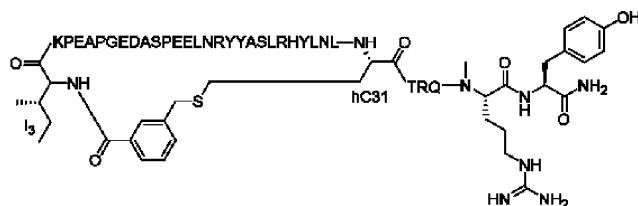
Структура:



SEQ ID NO: 12

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), (N-Me-R35)]-PYY3-36

Структура:

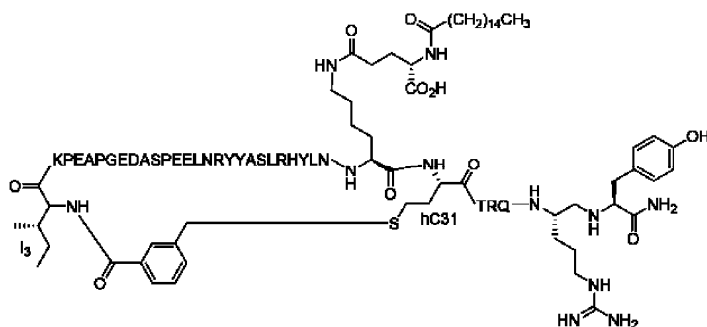


SEQ ID NO: 13

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Структура:

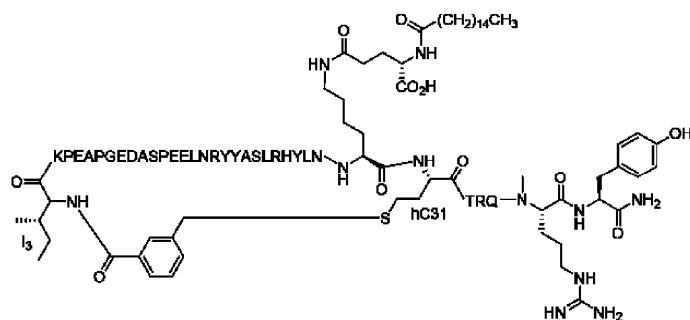
044997



SEQ ID NO: 14

Название: [цикло-(I₃-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, (N-Me-R35)]-PYY3-36

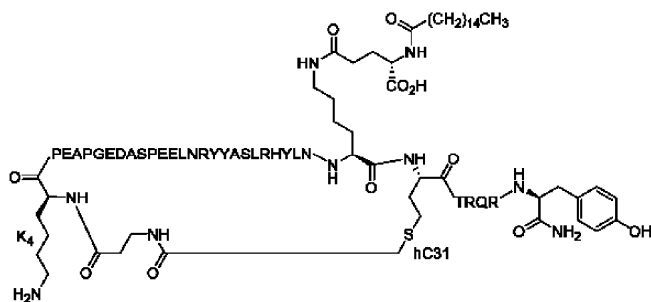
Структура:



SEQ ID NO: 15

Название: [цикло-(K₄-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀]-PYY4-36

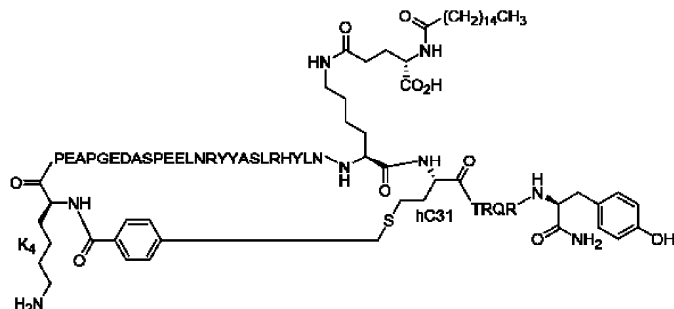
Структура:



SEQ ID NO: 16

Название: [цикло-(K₄-p-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀]-PYY4-36

Структура:

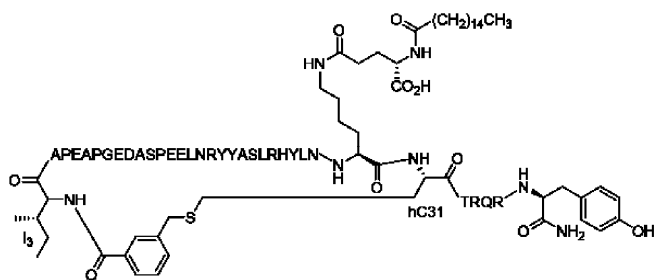


SEQ ID NO: 17

Название: [цикло-(I₃-m-COPhCH₂-hC31), A₄, K(γ-Glu-Pal)₃₀]-PYY3-36

Структура:

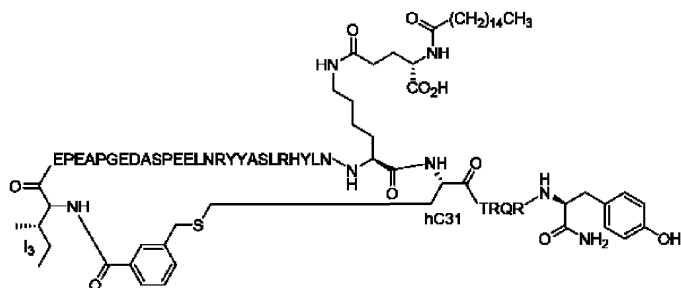
044997



SEQ ID NO: 18

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31), E4, K(γ-Glu-Pal)30]-PYY3-36

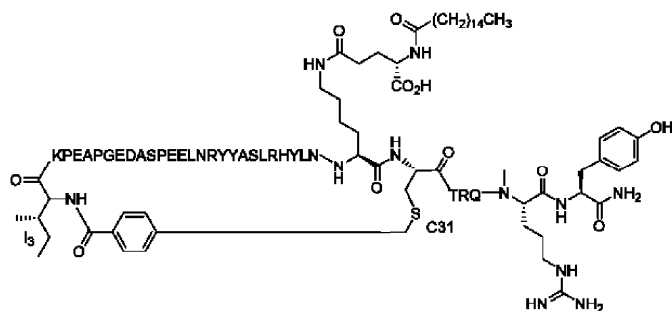
Структура:



SEQ ID NO: 19

Название: [цикло-(13-p-COPhCH₂-C31), K(γ-Glu-Pal)30, (N-Me-R35)]-PYY3-36

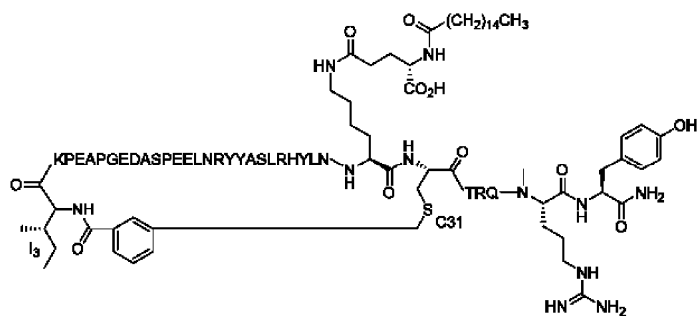
Структура:



SEQ ID NO: 20

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-C31), K(γ-Glu-Pal)30, (N-Me-R35)]-PYY3-36

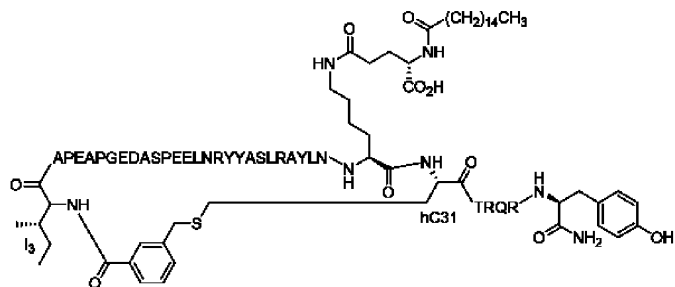
Структура:



SEQ ID NO: 21

Название: [цикло-(13-m-COPhCH₂-hC31), A4, A26, K(γ-Glu-Pal)30]-PYY3-36

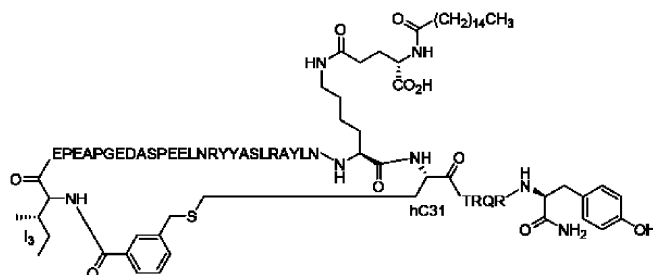
Структура:



SEQ ID NO: 22

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), E4, A26, K(γ -Glu-Pal)30]-PYY3-36

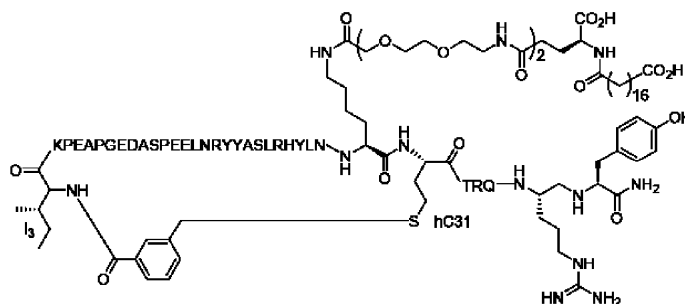
Структура:



SEQ ID NO: 23

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂- γ -Glu-COC₁₆CO₂H) 30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

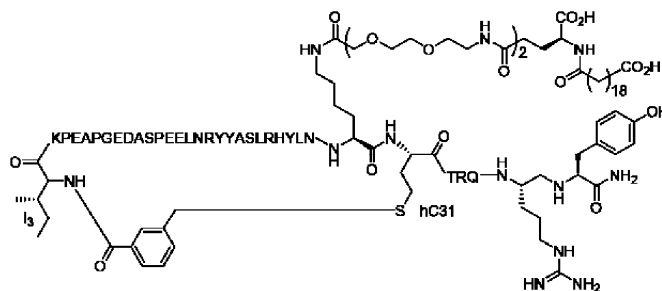
Структура:



SEQ ID NO: 24

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂- γ -Glu-COC₁₈CO₂H)30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

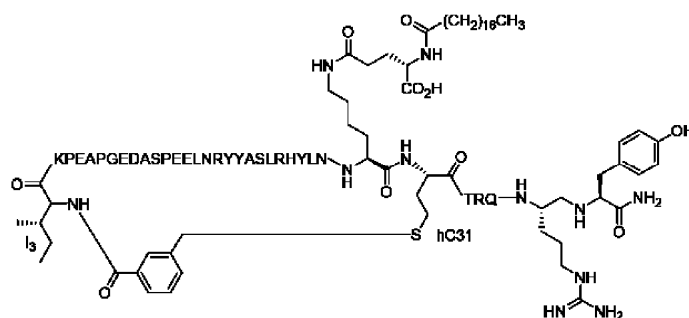
Структура:



SEQ ID NO: 25

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ -Glu-Stear)30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

Структура:

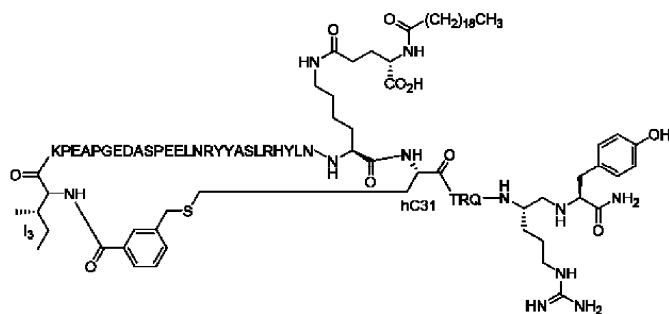


SEQ ID NO: 26

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ -Glu-Arach)30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

Структура:

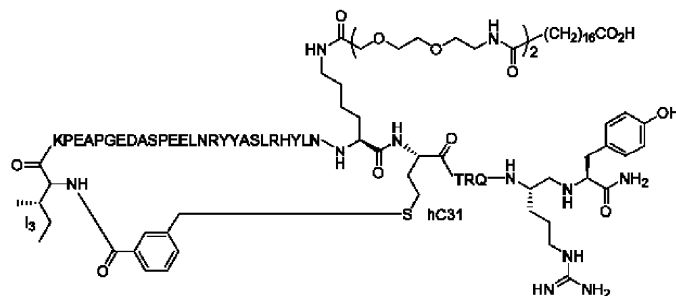
044997



SEQ ID NO: 27

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-COC₁₆CO₂H)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

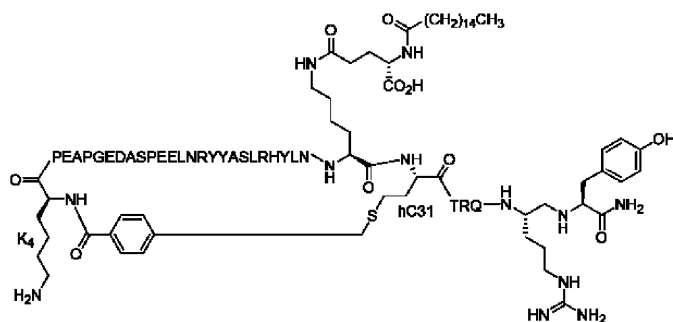
Структура:



SEQ ID NO: 28

Название: [цикло-(K4-p-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

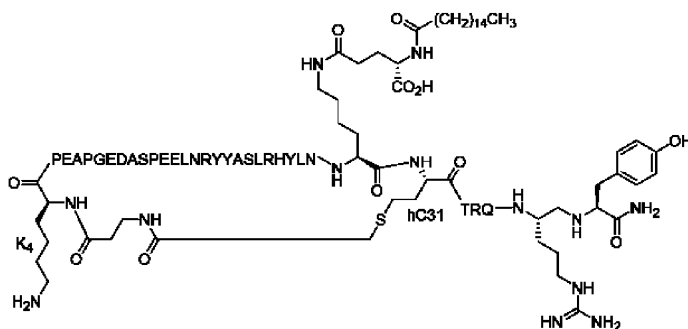
Структура:



SEQ ID NO: 29

Название: [цикло-(K4-CO-(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

Структура:

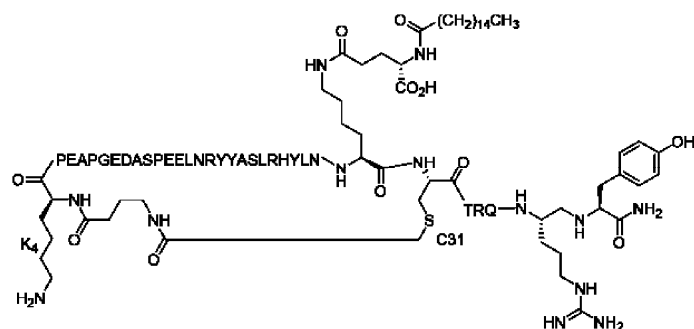


SEQ ID NO: 30

Название: [цикло-(K4-CO(CH₂)₃NHCOCH₂-C31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

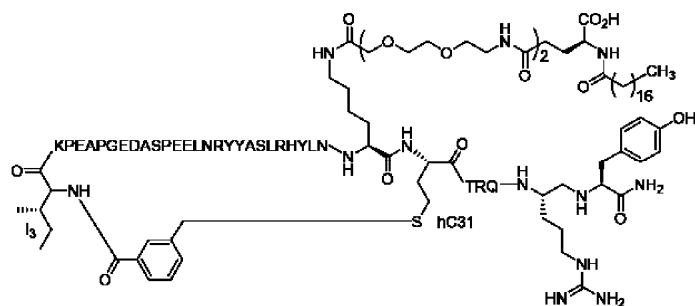
Структура:

044997



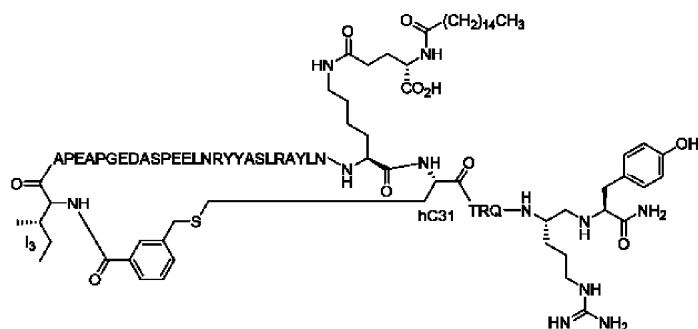
SEQ ID NO: 31

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Stear)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



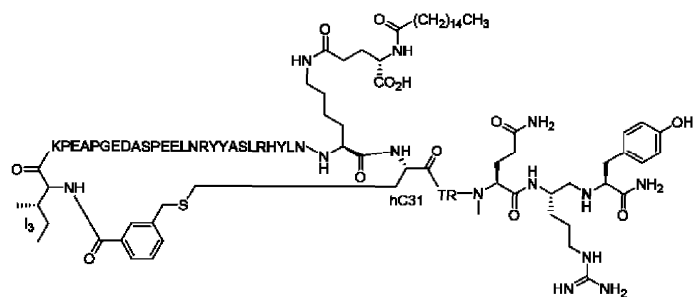
SEQ ID NO: 32

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), A4, A26, K(γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 33

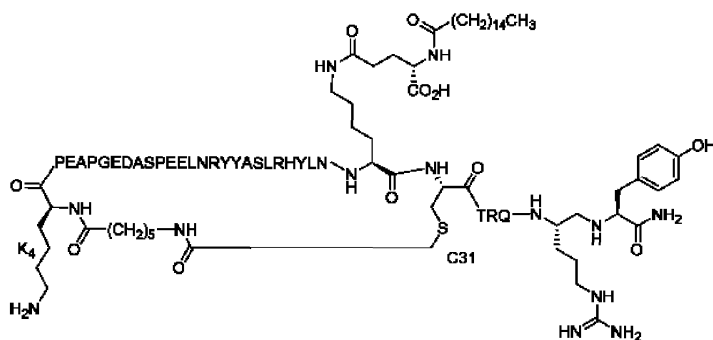
Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, (N-Me-Q34), psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 34

Название: [цикло-(K4-CO(CH₂)₅NHCOCH₂-C31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36
Структура:

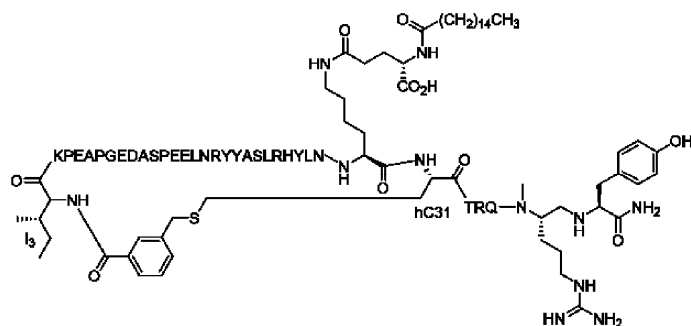
044997



SEQ ID NO: 35

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ -Glu-Pal)30, (N-Me-R35), psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

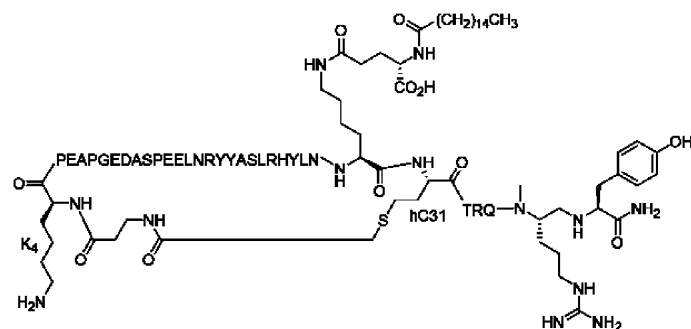
Структура:



SEQ ID NO: 36

Название: [цикло-(K4-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(γ -Glu-Pal)30, (N-Me-R35), psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

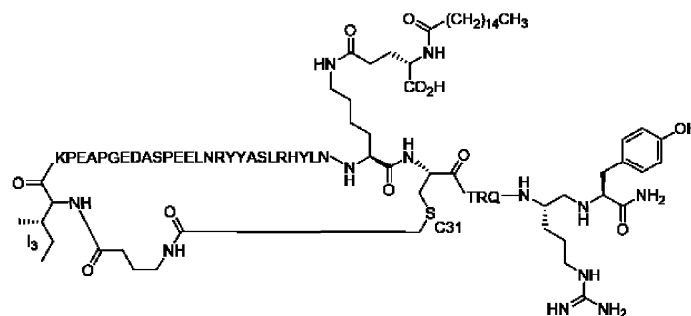
Структура:



SEQ ID NO: 37

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₃NHCOCH₂-C31), K(γ -Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Структура:



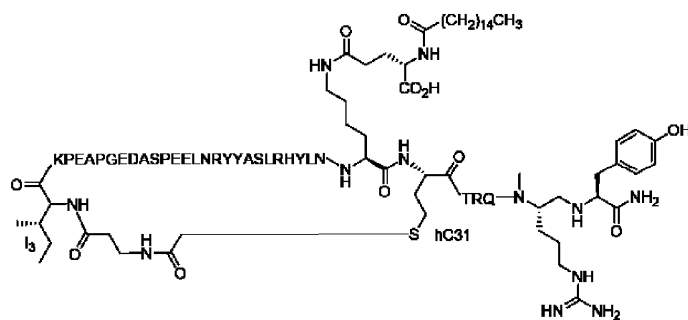
SEQ ID NO: 38

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(γ -Glu-Pal)30, (N-Me-R35), psi-(R35,Y36)]-PYY3-

36

Структура:

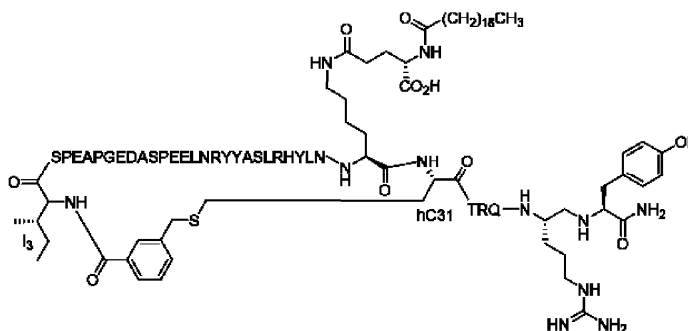
044997



SEQ ID NO: 39

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), S4, K(γ -Glu-Arach) 30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

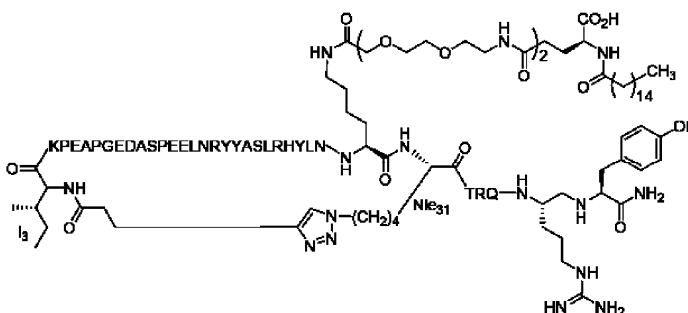
Структура:



SEQ ID NO: 40

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₂триазилил-Nle31), K((OEG)₂- γ -Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

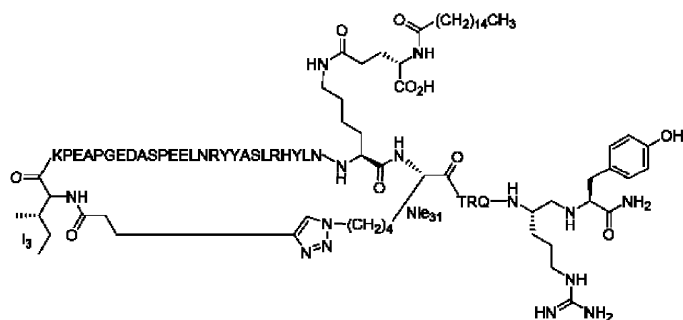
Структура:



SEQ ID NO: 41

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₂триазилил-Nle31), K(γ -Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Структура:

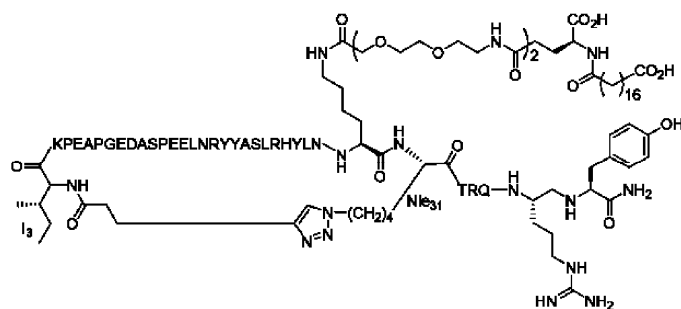


SEQ ID NO: 42

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₂триазилил-Nle31), K((OEG)₂- γ -Glu-COC₁₆CO₂H)30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

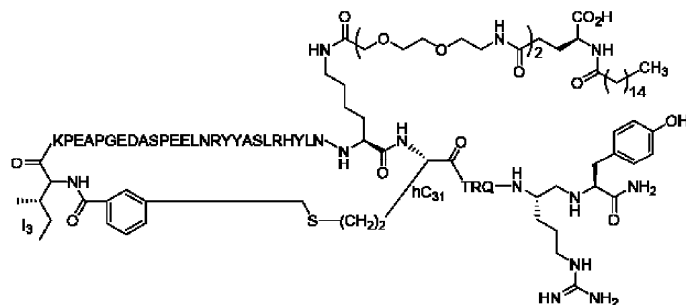
Структура:

044997



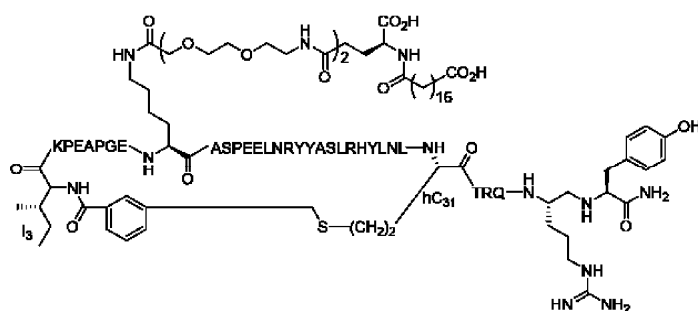
SEQ ID NO: 43

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



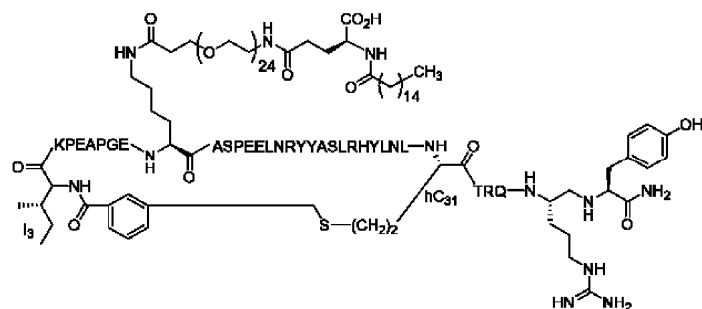
SEQ ID NO: 44

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H)₁₁, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 45

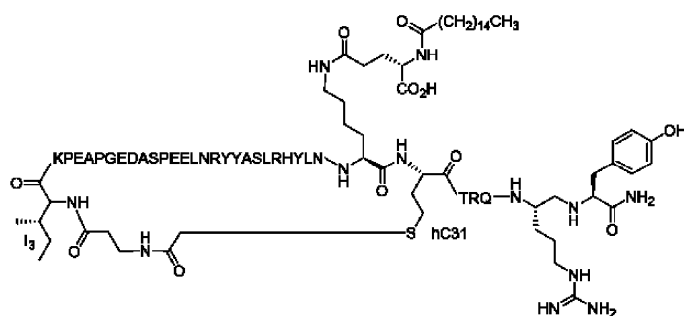
Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₂₄NH-γ-Glu-Pal)₁₁, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 46

Название: [цикло-(I3-CO-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-hC31), K(γ-Glu-Pal)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:

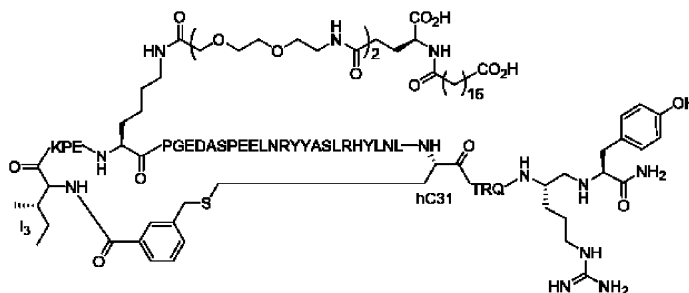
044997



SEQ ID NO: 47

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H) 7, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

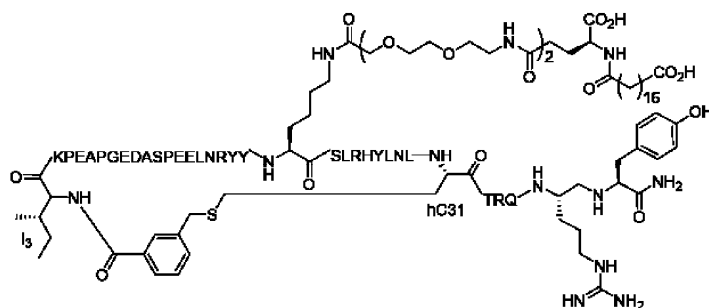
Структура:



SEQ ID NO: 48

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H) 22, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

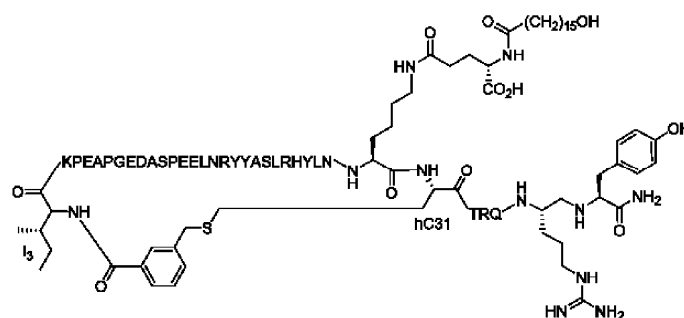
Структура:



SEQ ID NO: 49

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-(Pal-16-OH))30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

Структура:

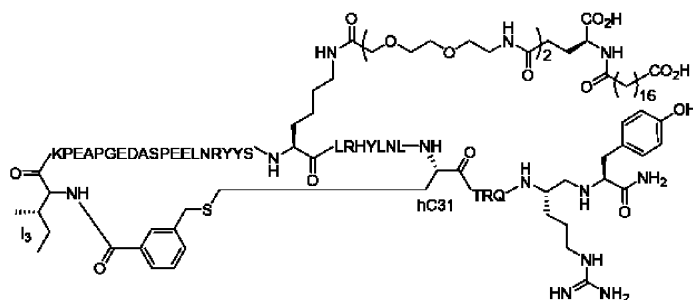


SEQ ID NO: 50

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H) 23, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

Структура:

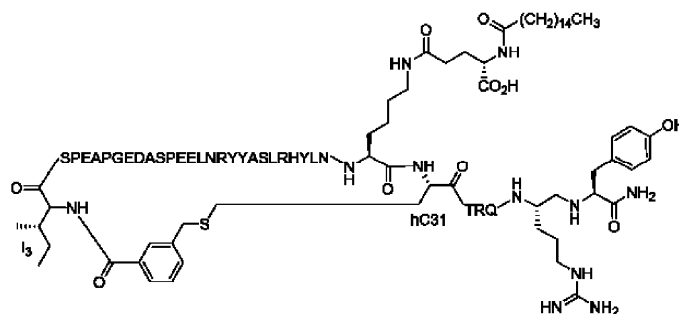
044997



SEQ ID NO: 51

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), S4, K(γ-Glu-Pal)30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

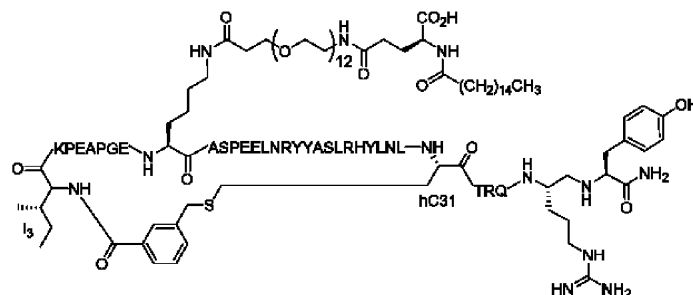
Структура:



SEQ ID NO: 52

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(COCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₁₂NH-γ-Glu-Pal)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

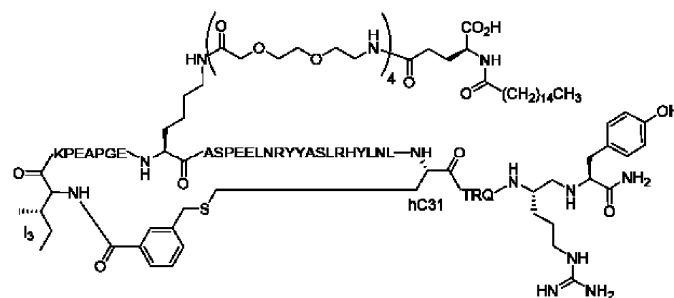
Структура:



SEQ ID NO: 53

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₄-γ-Glu-Pal)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

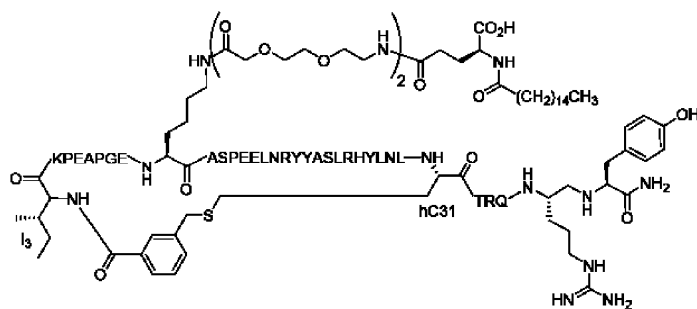
Структура:



SEQ ID NO: 54

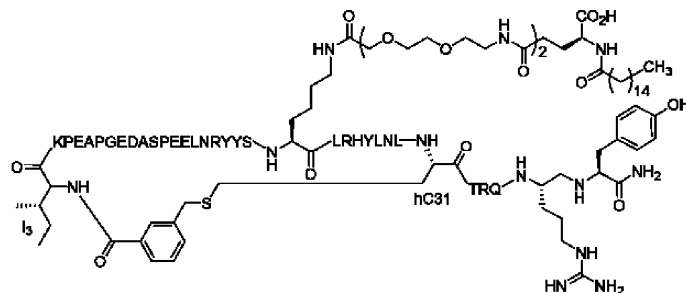
Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

Структура:



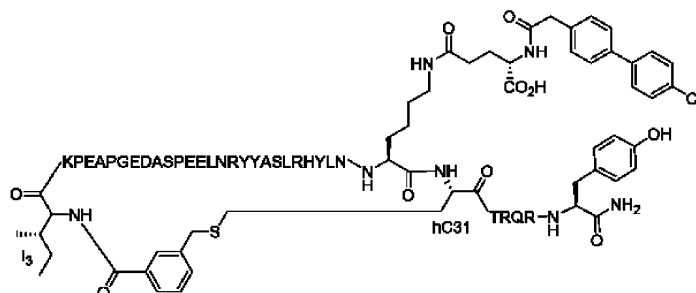
SEQ ID NO: 55

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₂₃, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 56

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-COCH₂Ph-(4-ClPh)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:

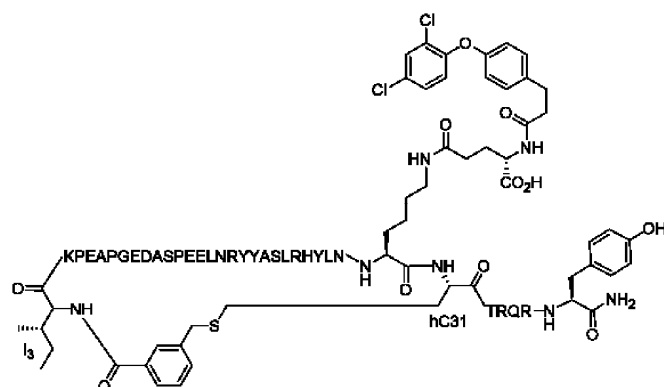


SEQ ID NO: 57

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₂PhO-(2,4-Cl₂Ph)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-

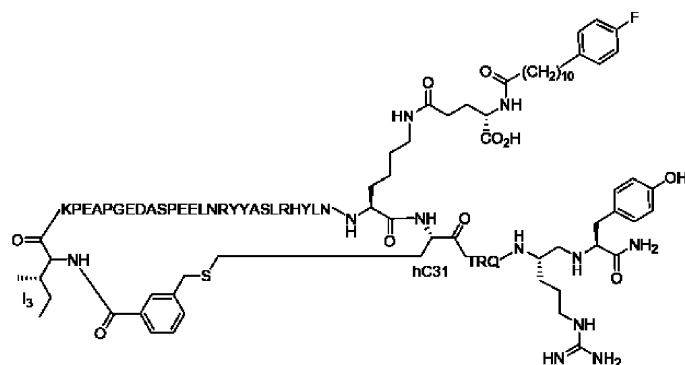
36

Структура:



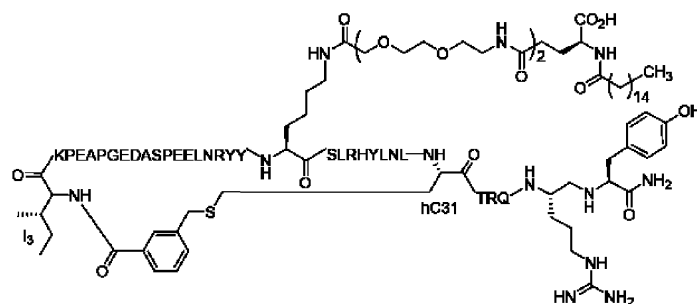
SEQ ID NO: 58

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(4-F-Ph))₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



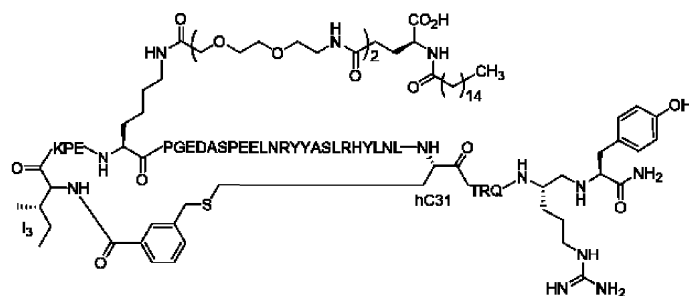
SEQ ID NO: 59

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₂₂, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



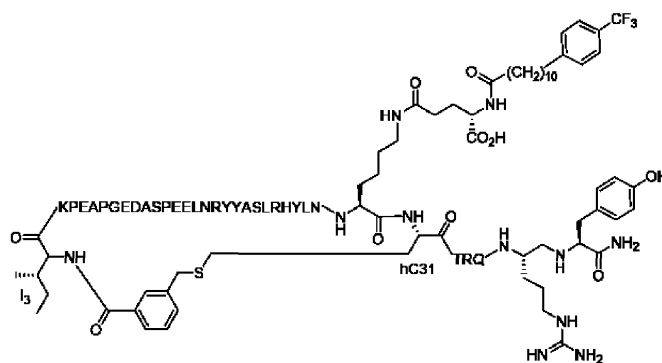
SEQ ID NO: 60

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K((OEG)₂-γ-Glu-Pal)₇, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 61

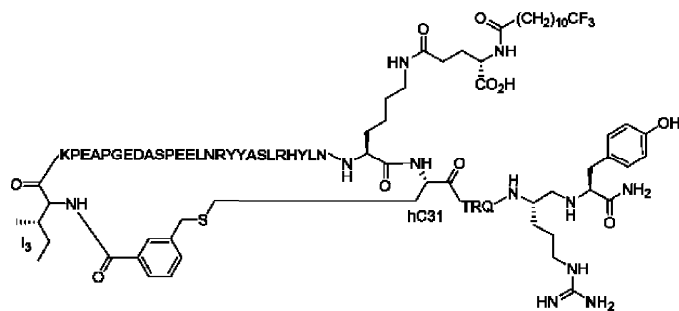
Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(4-F₃C-Ph))₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 62

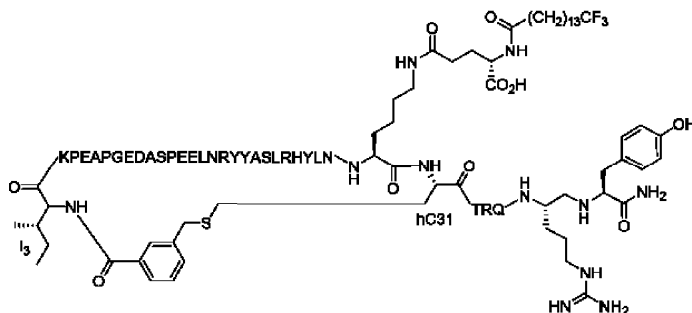
Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-CF₃)₃₀, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36
Структура:

044997



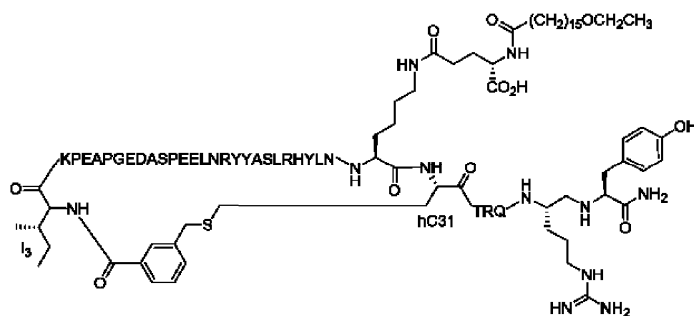
SEQ ID NO: 63

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO (CH₂)₁₃-CF₃)₃₀, psi-(R35, Y36)]-PYY3-3
Структура:



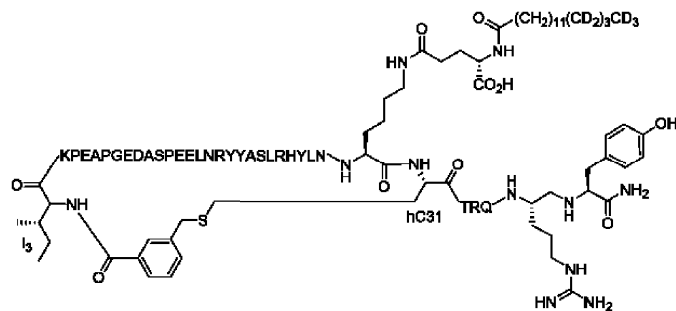
SEQ ID NO: 64

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-(Pal-16-OEt))₃₀, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36
Структура:



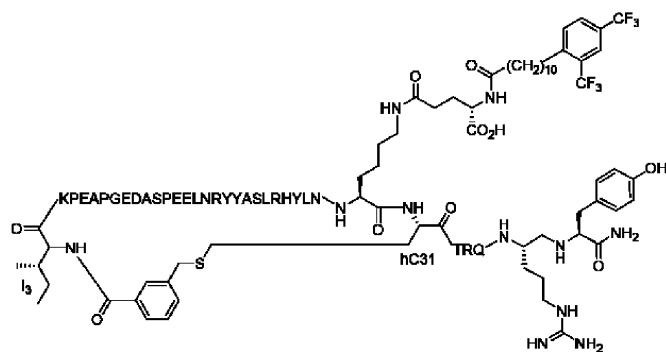
SEQ ID NO: 65

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₁(CD₂)₃CD₃)₃₀, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 66

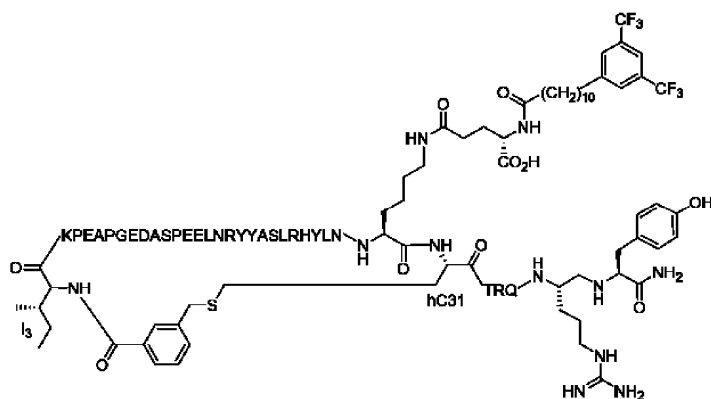
Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(2,4-(CF₃)₂-Ph))₃₀, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36
Структура:



SEQ ID NO: 67

Название: [цикло-(I3-m-COPhCH₂-hC31), K(γ-Glu-CO(CH₂)₁₀-(3,5-(CF₃)₂-Ph))₃₀, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

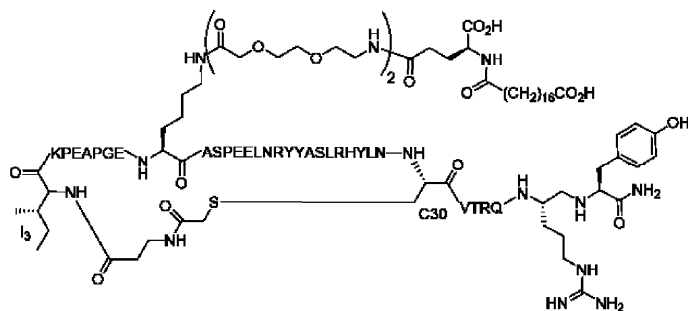
Структура:



SEQ ID NO: 68

Название: [цикло-(I3-CO(CH₂)₂NHCOCH₂-C30), K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H))₁₁, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

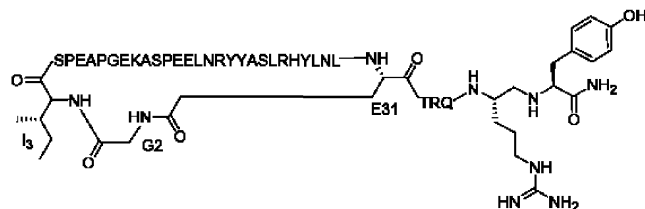
Структура:



SEQ ID NO: 69

Название: [цикло-(G2-E31), S4, K11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

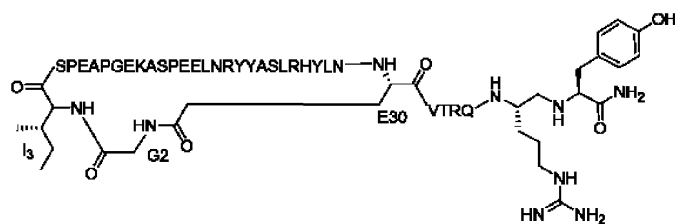
Структура:



SEQ ID NO: 70

Название: [цикло-(G2-E30), S4, K11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

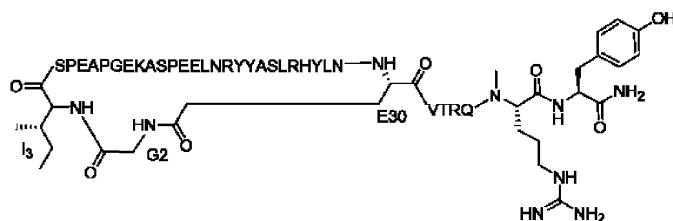
Структура:



SEQ ID NO: 71

Название: [цикло-(G2-E30), S4, K11, (N-Me-R35)]-PYY3-36

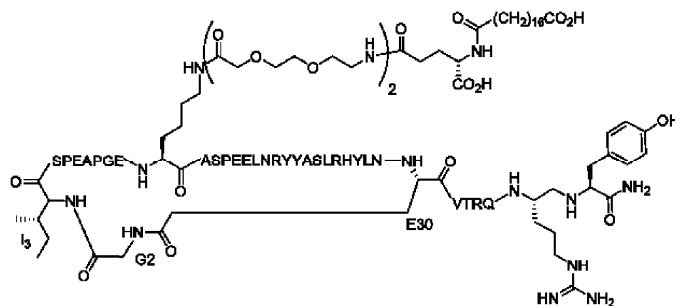
Структура:



SEQ ID NO: 72

Название: [цикло-(G2-E30), S4, K((OEG)₂-γ-Glu-COC₁₆CO₂H) 11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

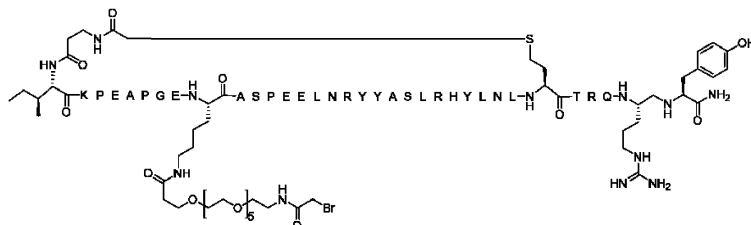
Структура:



SEQ ID NO: 73

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG6-AcBr)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

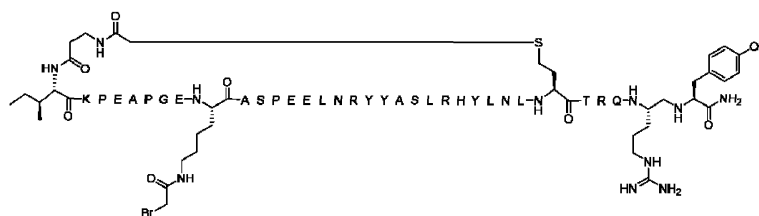
Структура:



SEQ ID NO: 74

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(AcBr)₁₁, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

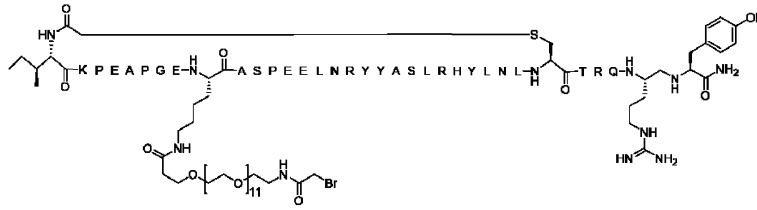
Структура:



SEQ ID NO: 75

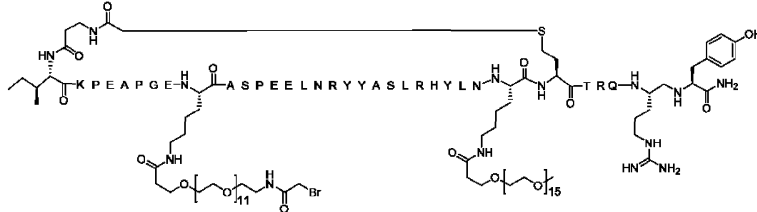
Название: [цикло-(I3-COCH₂-C31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

Структура:



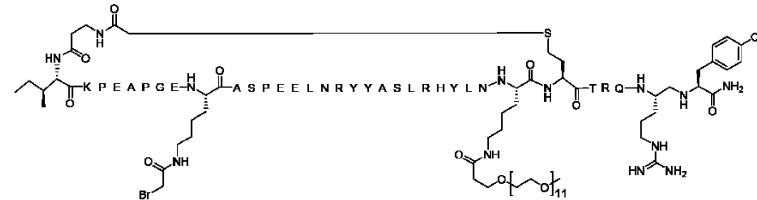
SEQ ID NO: 76

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, K(mPEG16)30, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36
Структура:



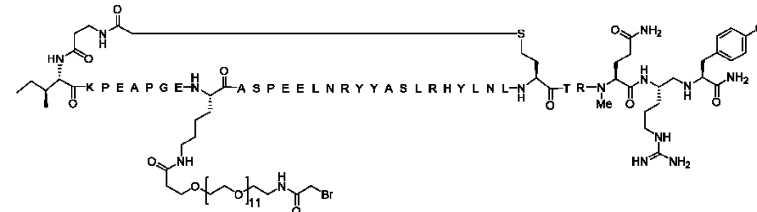
SEQ ID NO: 77

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(AcBr)11, K(mPEG12)20, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36
Структура:



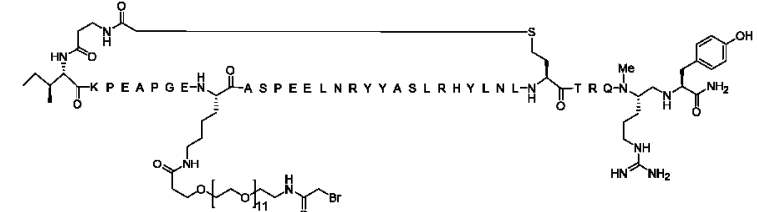
SEQ ID NO: 78

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr) 11, (N-Me)Q34, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36
Структура:



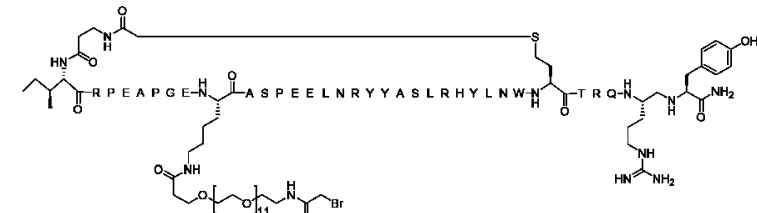
SEQ ID NO: 79

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35, psi-(R35, 36Y)]-PYY2-36
Структура:



SEQ ID NO: 80

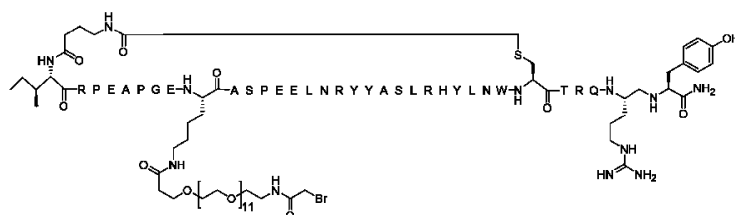
Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), R4, K(PEG12-AcBr)11, W30, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36
Структура:



SEQ ID NO: 81

Название: [цикло-(3I-COCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂-C31), R4, K(PEG12-AcBr)₁₁, W30, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36

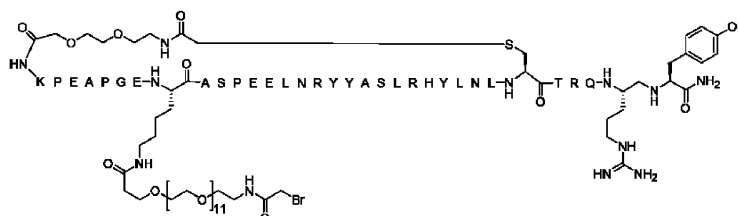
Структура:



SEQ ID NO: 82

Название: [цикло-(K4-OEG-COCH₂-C31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36

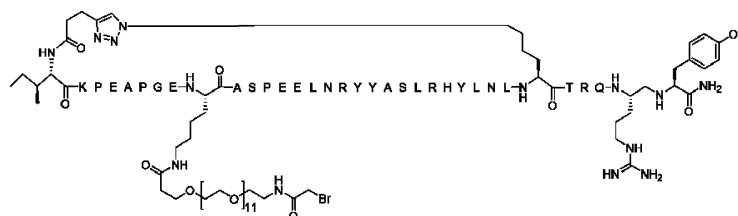
Структура:



SEQ ID NO: 83

Название: [цикло-(13-COCH₂CH₂триазилилNle31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

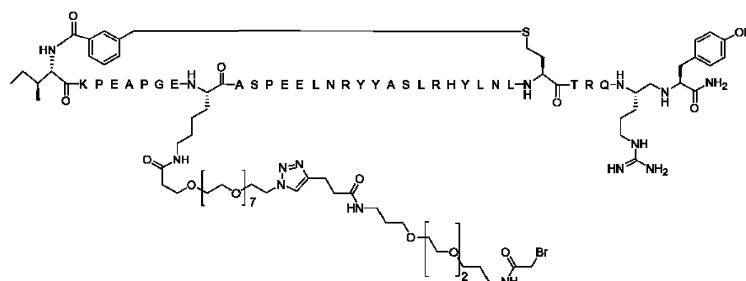
Структура:



SEQ ID NO: 84

Название: [цикло-(I3-m-CO-бензил-hC31), K(PEG8-триазилил-CH₂CH₂CO-PEG4-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36

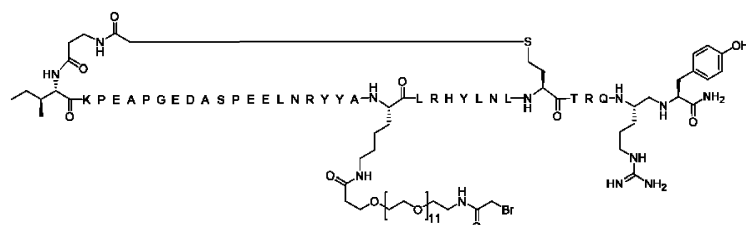
Структура:



SEQ ID NO: 85

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr) 23, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

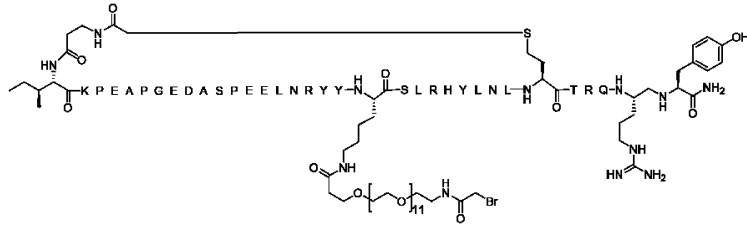
Структура:



SEQ ID NO: 86

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr) 22, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

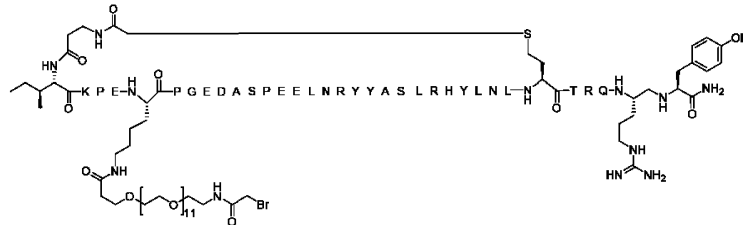
Структура:



SEQ ID NO: 87

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr)7, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

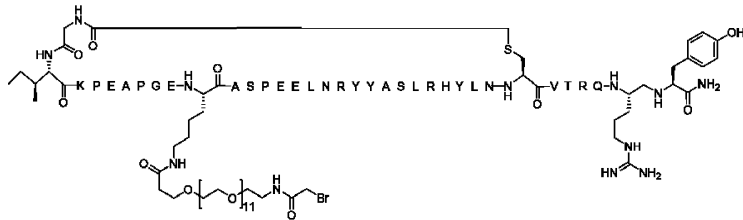
Структура:



SEQ ID NO: 88

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36

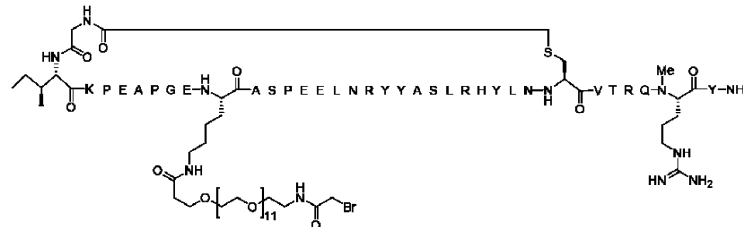
Структура:



SEQ ID NO: 89

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

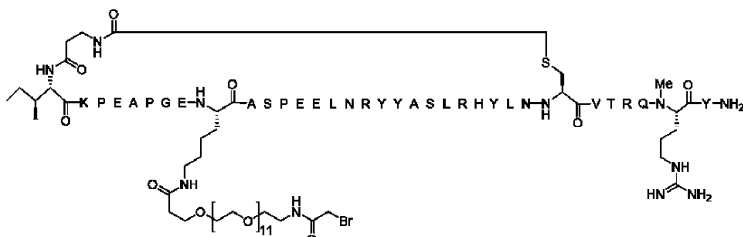
Структура:



SEQ ID NO: 90

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

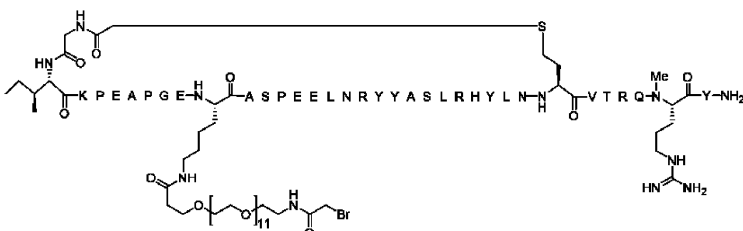
Структура:



SEQ ID NO: 91

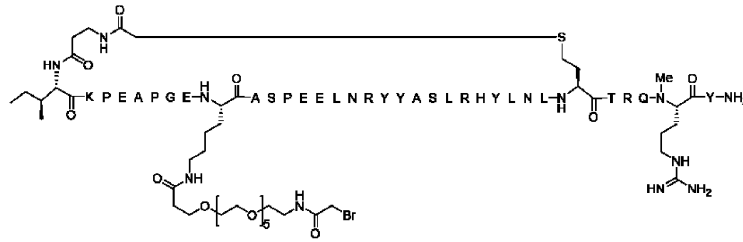
Название: [цикло-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12-AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

Структура:



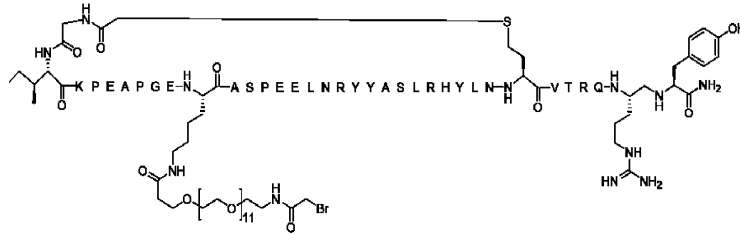
SEQ ID NO: 92

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12-AcBr) 11, N-Me-R35]PYY2-36
Структура:



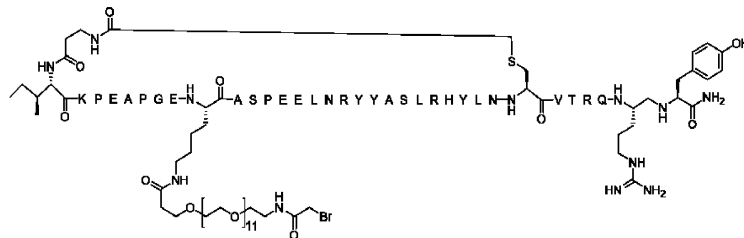
SEQ ID NO: 93

Название: [цикло-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Структура:



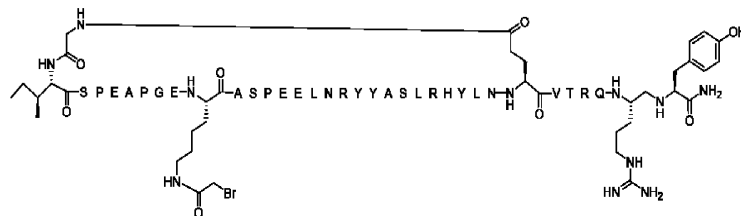
SEQ ID NO: 94

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(PEG12-AcBr) 11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Структура:



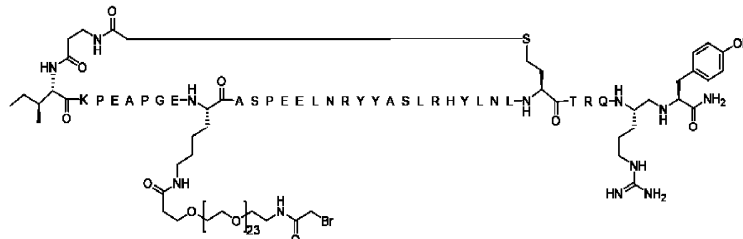
SEQ ID NO: 95

Название: [цикло-(G2-E30), S4, K(AcBr)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Структура:



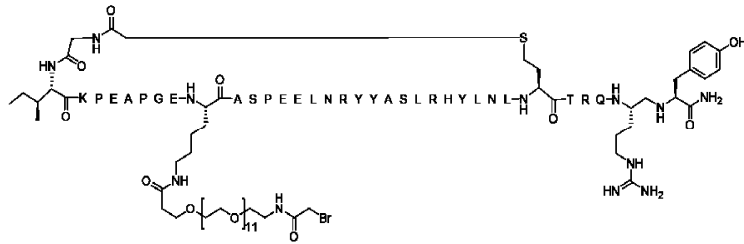
SEQ ID NO: 96

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG24-AcBr) 11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36
Структура:



SEQ ID NO: 97

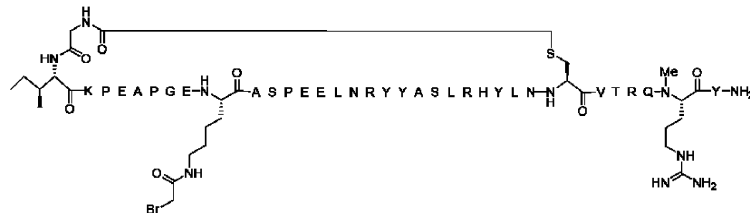
Название: [цикло-(G2-Ac-hC31), K(PEG12-AcBr)11, psi-(R35-Y36)]-PYY2-36
Структура:



SEQ ID NO: 98

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

Структура:



SEQ ID NO: 99

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(AcBr)11, N-Me-R35]-PYY2-36

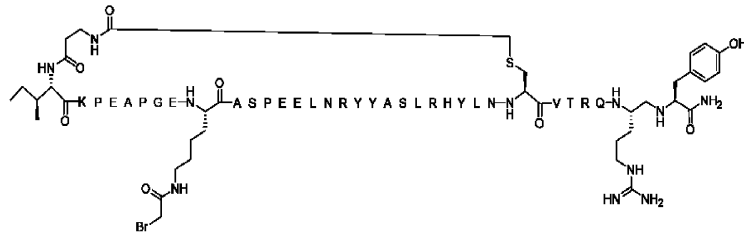
Структура:



SEQ ID NO: 100

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(AcBr)11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

Структура:



SEQ ID NO: 101

hPYY3-36

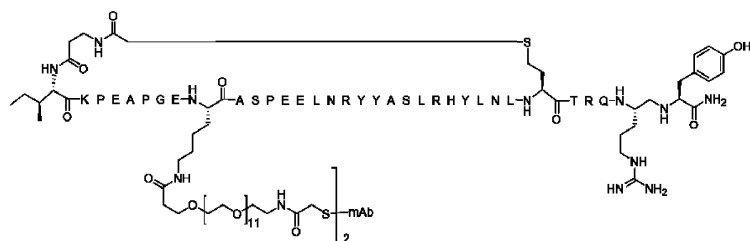
Структура:



SEQ ID NO: 102

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, psi-(35R,36Y)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 1)

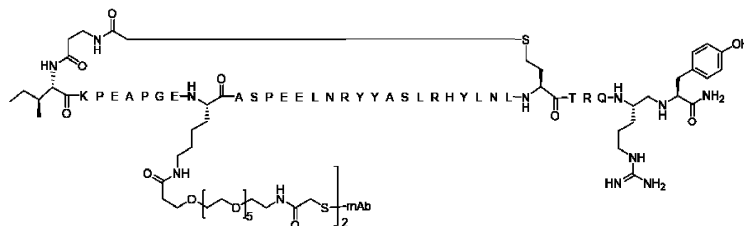
Структура:



SEQ ID NO: 103

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG6)11, psi-(35R,36Y)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 2)

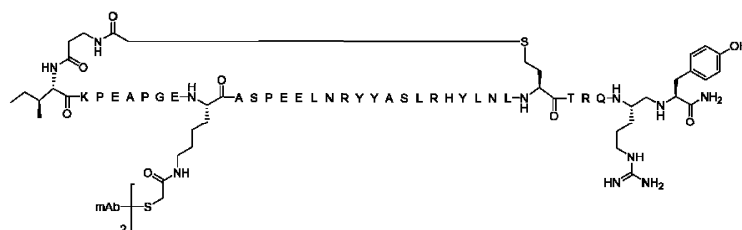
Структура:



SEQ ID NO: 104

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 3)

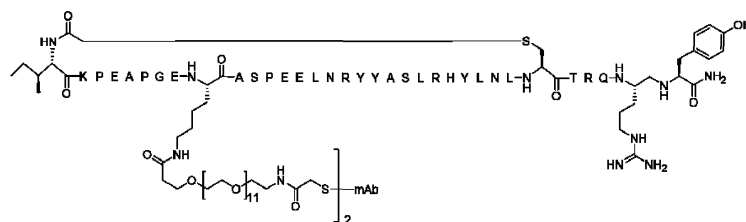
Структура:



SEQ ID NO: 105

Название: [цикло-(I3-COCH₂-C31), K(PEG12)11, psi-(R35, Y36)]-PYY3-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 4)

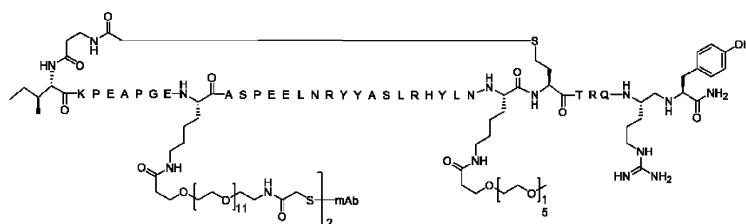
Структура:



SEQ ID NO: 106

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, K(mPEG16)30, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 5)

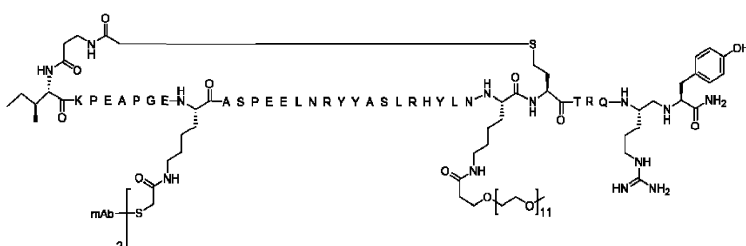
Структура:



SEQ ID NO: 107

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K11, K(mPEG12)20, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 6)

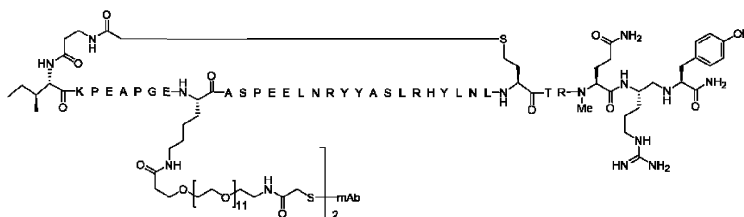
Структура:



SEQ ID NO: 108

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, (N-Me)Q34, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 7)

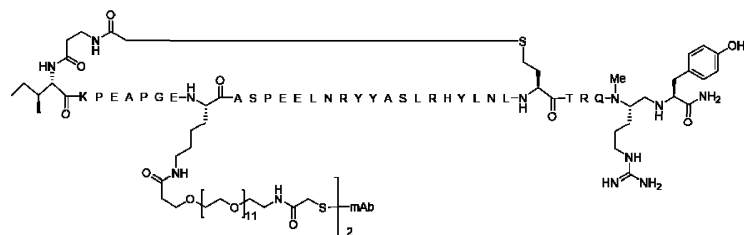
Структура:



SEQ ID NO: 109

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)11, N-Me-R35, psi-(R35,36Y)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 8)

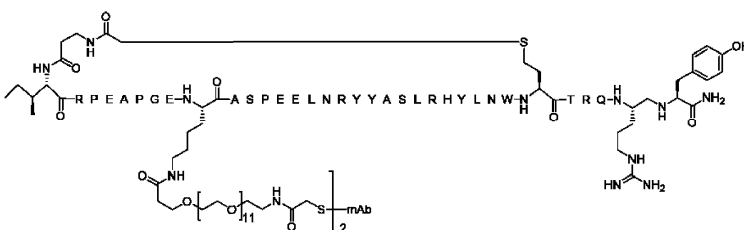
Структура:



SEQ ID NO: 110

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), R4, K(PEG12)11, W30, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 9)

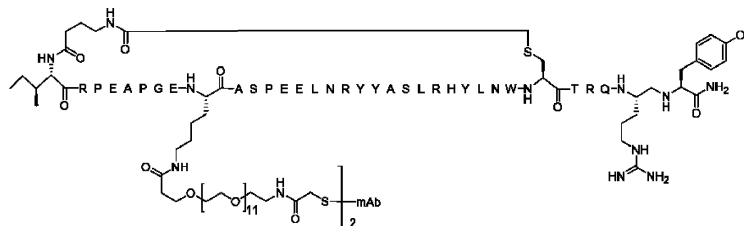
Структура:



SEQ ID NO: 111

Название: [цикло-(3I-COCH₂CH₂CH₂NHCOCH₂-C31), R4, K(PEG12)11, W30, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 10)

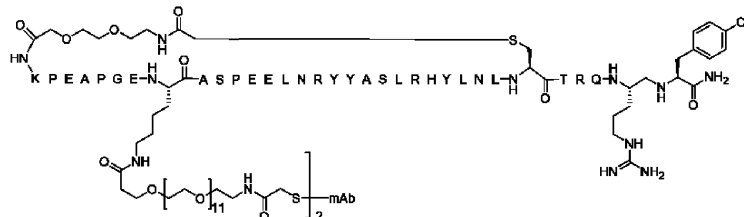
Структура:



SEQ ID NO: 112

Название: [цикло-(K4-OEG-COCH₂-C31), K(PEG12)11, psi-(R35,Y36)]-PYY4-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 11)

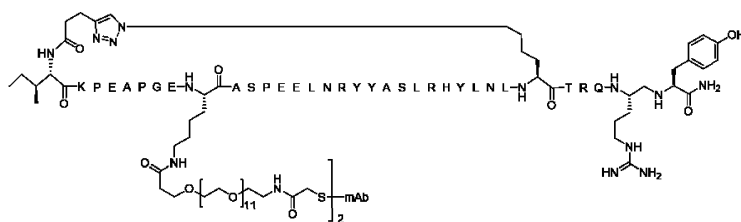
Структура:



SEQ ID NO: 113

Название: [цикло-(13-COCH₂CH₂триазилилNle31), K(PEG12)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 12)

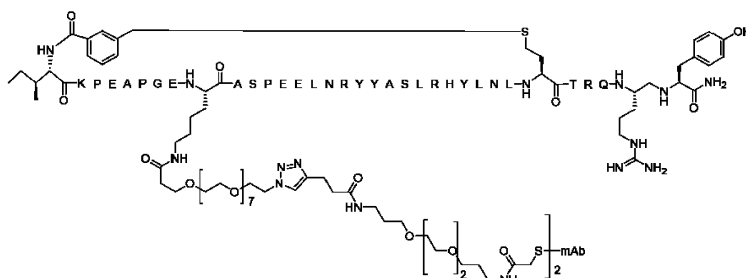
Структура:



SEQ ID NO: 114

Название: [цикло-(I3-m-CO-benzyl-hC31), K(PEG8-триазолил-CH₂CH₂CO-PEG4)11, psi-(R35,Y36)]-PYY3-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 13)

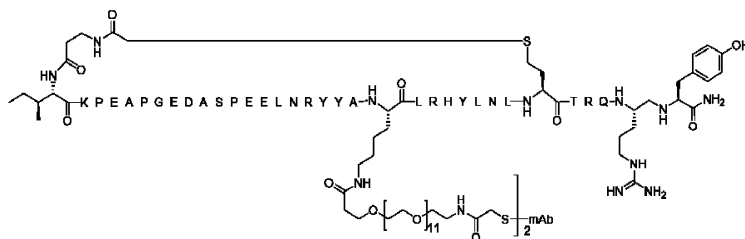
Структура:



SEQ ID NO: 115

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)23, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 14)

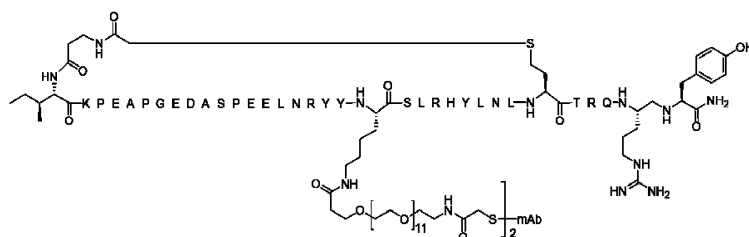
Структура:



SEQ ID NO: 116

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)22, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 15)

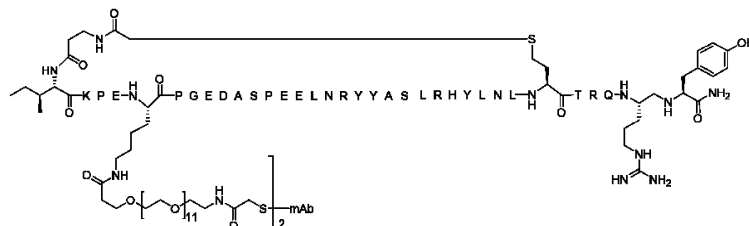
Структура:



SEQ ID NO: 117

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)7, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 16)

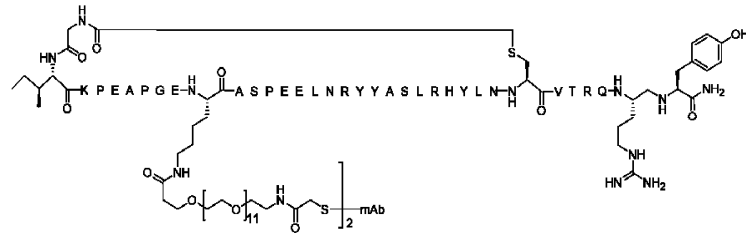
Структура:



SEQ ID NO: 118

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 17)

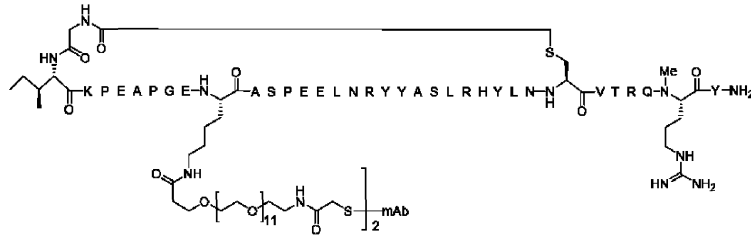
Структура:



SEQ ID NO: 119

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), K(PEG12)₁₁, N-Me-R35]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 18)

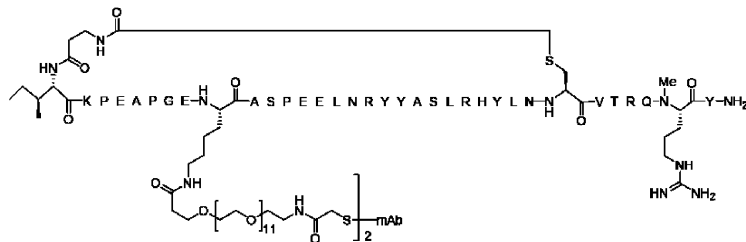
Структура:



SEQ ID NO: 120

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(PEG12)₁₁, N-Me-R35]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 19)

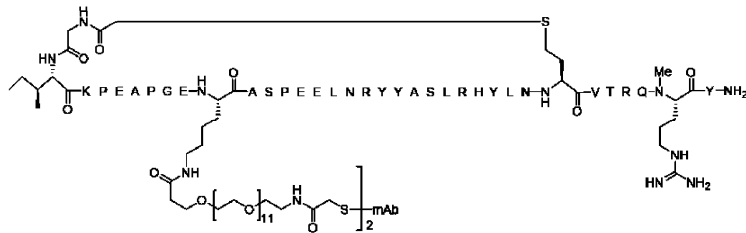
Структура:



SEQ ID NO: 121

Название: [цикло-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12)₁₁, N-Me-R35]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 20)

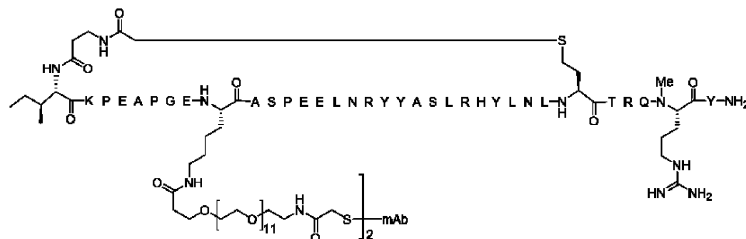
Структура:



SEQ ID NO: 122

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG12)₁₁, N-Me-R35]PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 21)

Структура:

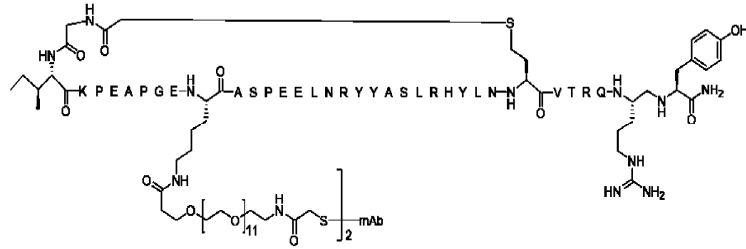


SEQ ID NO: 123

Название: [цикло-(G2-COCH₂-hC30), K(PEG12)₁₁, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 22)

Структура:

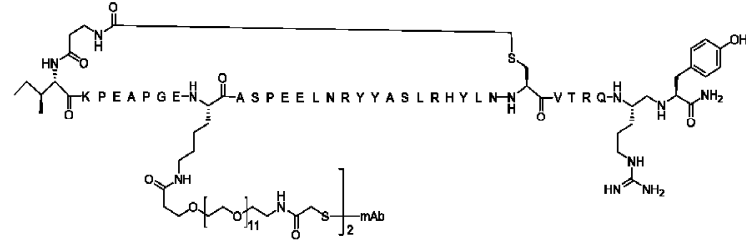
044997



SEQ ID NO: 124

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K(PEG12)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 23)

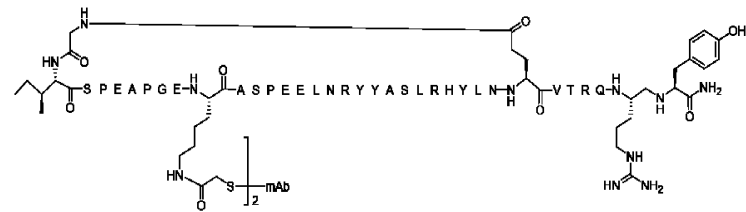
Структура:



SEQ ID NO: 125

24) Название: [цикло-(G2-E30), S4, K11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат (соединение 24)

Структура:



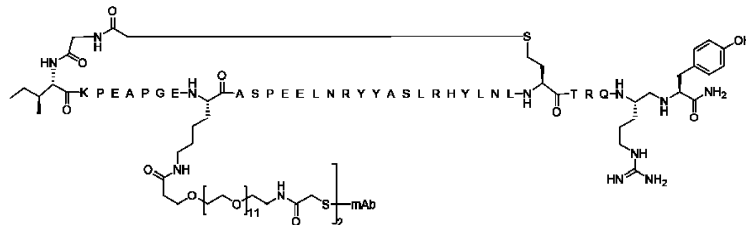
SEQ ID NO: 126

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K(PEG24)11, psi-(R35,Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 25)

SEQ ID NO: 127

Название: [цикло-(G2-Ас-hC31), K(PEG12)11, psi-(R35-Y36)]-PYY2-36, гомодимерный конъюгат с mAb (соединение 26)

Структура:



SEQ ID NO: 147

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

Структура:

044997



SEQ ID NO: 148

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-hC31), K11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

Структура:



SEQ ID NO: 149

Название: [цикло-(G2-E30), S4, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

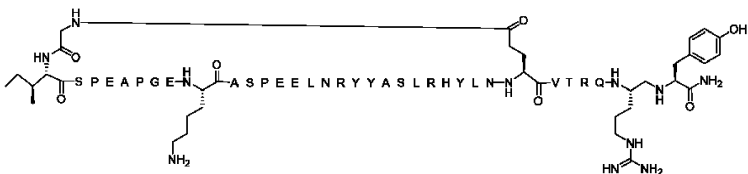
Структура:



SEQ ID NO: 150

Название: [цикло-(G2-E30), S4, K11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

Структура:



SEQ ID NO: 151

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), N-Me-R35]-PYY2-36

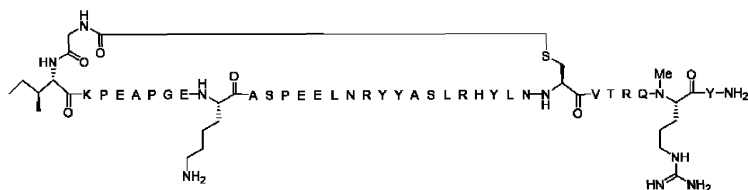
Структура:



SEQ ID NO: 152

Название: [цикло-(G2-COCH₂-C30), K11, N-Me-R35]-PYY2-36

Структура:



SEQ ID NO: 153

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), N-Me-R35]-PYY2-36

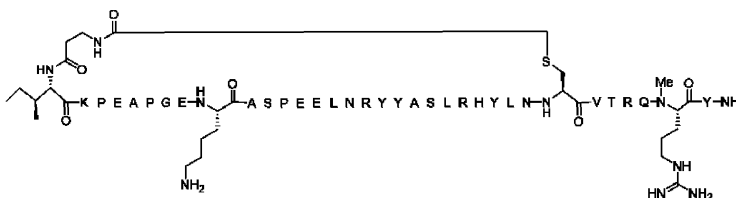
Структура:



SEQ ID NO: 154

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K11, N-Me-R35]-PYY2-36

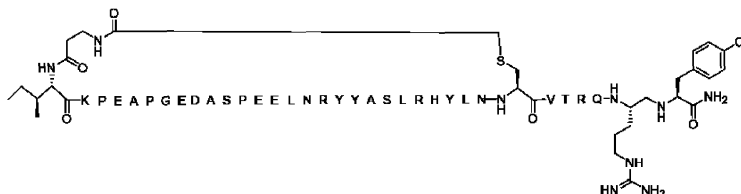
Структура:



SEQ ID NO: 155

Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

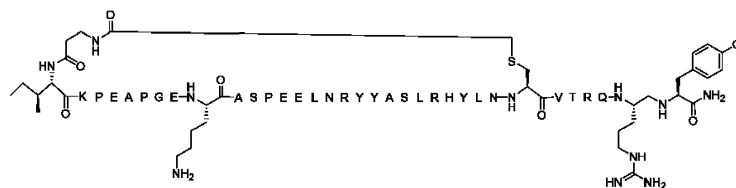
Структура:



SEQ ID NO: 156

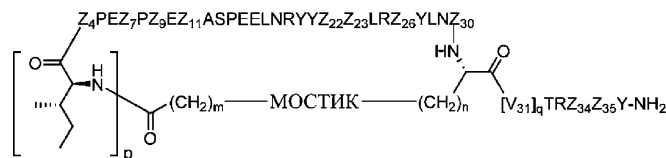
Название: [цикло-(βA2-COCH₂-C30), K11, psi-(R35, Y36)]-PYY2-36

Структура:



ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с циклическим пептидом PYY, причем моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно, и причем циклический пептид PYY представлен соединением формулы I или его фармацевтически приемлемой солью:



Формула I,

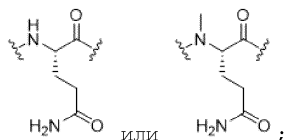
где p равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

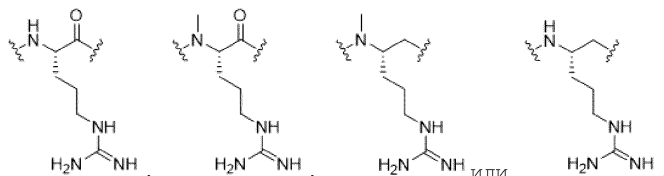
n равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z₃₀ отсутствует;МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазолил-, NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;Z₄ представляет собой K, A, E, S или R;Z₇ представляет собой A или K;Z₉ представляет собой G или K;Z₁₁ представляет собой D или K;

Z_{22} представляет собой А или К;
 Z_{23} представляет собой S или К;
 Z_{26} представляет собой А или Н;
 Z_{30} представляет собой L, W, К или отсутствует;
 при условии, что Z_{30} отсутствует, только если q равно 1;
 Z_{34} представляет собой



Z_{35} представляет собой



причем циклический пептид РУУ формулы I ацилирован по аминогруппе боковой цепи по меньшей мере одного остатка лизина (К) с образованием ацилированного циклического пептида РУУ, который дополнительно напрямую или посредством линкера связан с цистеиновой группой HCDR3 моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

2. Конъюгат по п.1, в котором ацилированный циклический пептид РУУ характеризуется следующим:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5;

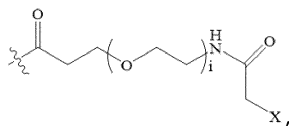
p равно 1, 2, 3 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой -Ph-CH₂-S-, -триазолил-, -NHC(O)CH₂S-, -SCH₂C(O)NH₂-, -(OCH₂CH₂)₂NHC(O)CH₂S-, -NHC(O)- или -CH₂S-;

Z_4 представляет собой К, А, Е, S или R;

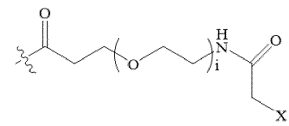
Z_7 представляет собой А или К, причем аминогруппа боковой цепи указанного К необязательно ацилирована с помощью



где i представляет собой целое число от 0 до 24, а X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

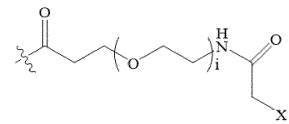
Z_9 представляет собой G или К, причем аминогруппа боковой цепи указанного К необязательно ацилирована с помощью



где i представляет собой целое число от 0 до 24, а X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

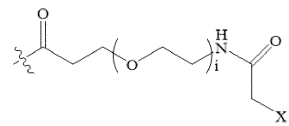
Z_{11} представляет собой D или К, причем аминогруппа боковой цепи указанного К необязательно ацилирована с помощью



где i представляет собой целое число от 0 до 24, а X=Br, I или Cl,

-C(O)CH₂Br, -C(O)CH₂I или -C(O)CH₂Cl;

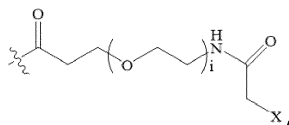
Z_{22} представляет собой А или К, причем аминогруппа боковой цепи указанного К необязательно ацилирована с помощью



где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,

$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{23} представляет собой S или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью

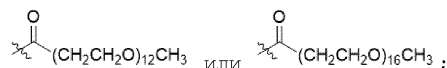


где i представляет собой целое число от 0 до 24, а $X = \text{Br}$, I или Cl ,

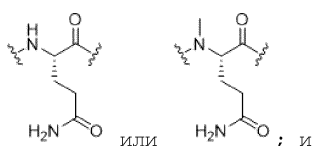
$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$;

Z_{26} представляет собой A или H ;

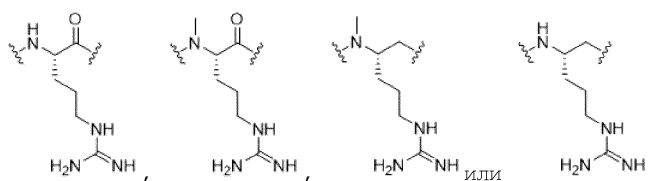
Z_{30} представляет собой L или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



Z_{34} представляет собой



Z_{35} представляет собой



где группа X представляет собой уходящую группу, позволяющую остатку формулы (I) быть ковалентно связанным с цистеиновым фрагментом HCDR3 моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

3. Конъюгат по п.1, в котором ацилированный циклический пептид PYY характеризуется следующим:

r равно 0 или 1;

m равно 0, 1, 2, 3 или 5;

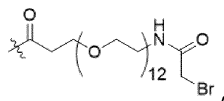
n равно 1, 2 или 4;

q равно 0 или 1; при условии, что q может быть равно 1, только если Z_{30} отсутствует;

МОСТИК представляет собой $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{триазолил}-$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}-$, $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{NHC}(\text{O})-$ или $-\text{CH}_2\text{S}-$;

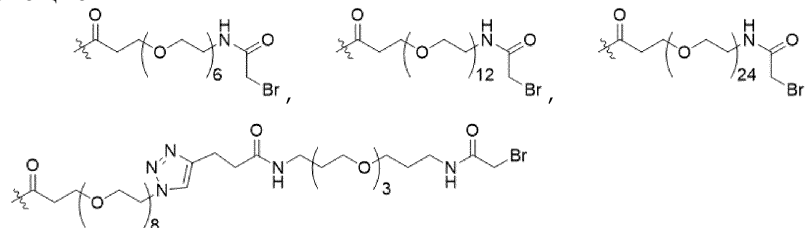
Z_4 представляет собой K , A , E , S или R ;

Z_7 представляет собой A или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



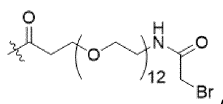
Z_9 представляет собой G или K ;

Z_{11} представляет собой D или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью

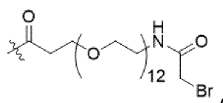


$-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$,

Z_{22} представляет собой A или K , причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



Z₂₃ представляет собой S или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью

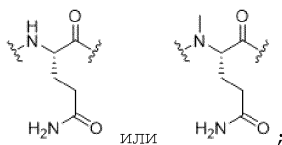


Z₂₆ представляет собой A или H;

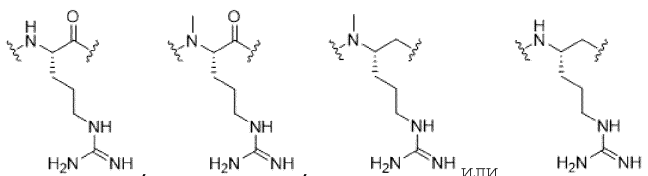
Z₃₀ представляет собой L или K, причем аминогруппа боковой цепи указанного K необязательно ацилирована с помощью



Z₃₄ представляет собой



Z₃₅ представляет собой



4. Конъюгат по п.1, в котором ацилированный циклический пептид PYY выбран из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1 и 73-100 или их фармацевтически приемлемой соли.

5. Конъюгат по любому из пп.1-4, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ковалентно связано с циклическим пептидом PYY на остатке лизина (K) циклического пептида PYY посредством линкера.

6. Конъюгат по п.5, в котором линкер представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG) 8-триазолил-CH₂CH₂CO-PEG4, цепочки PEG из 2-24 PEG-звеньев, алкильной цепочки, содержащей 2-10 атомов углерода, (Gly₄Ser)_j, причем j=1-4, (AlaPro)_u, при этом u=1-10, и связи.

7. Конъюгат по п.6, в котором только один из Z₇, Z₉, Z₁₁, Z₂₂ и Z₂₃ в формуле I представляет собой лизин и лизин ковалентно связан с внедренным цистеиновым остатком моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента посредством линкера.

8. Конъюгат по п.1, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 141, 142, 143, 144, 145 и 146, соответственно; и причем конъюгат содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 102-127.

9. Конъюгат по любому из пп.1-8, в котором выделенное моноклональное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 137, и вариабельный домен легкой цепи (VL), имеющий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 139.

10. Конъюгат по п.9, дополнительно содержащий участок Fc.

11. Конъюгат по п.10, содержащий тяжелую цепь (HC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 138, и легкую цепь (LC), имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 140.

12. Конъюгат по п.1, в котором:

ацилированный циклический пептид PYY содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 73-100; и

моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с циклическим пептидом PYY на остатках 7, 9, 11, 22 или 23 циклического пептида PYY напрямую или посредством линкера.

13. Способ получения конъюгата по п.1, включающий реакцию электрофильного соединения, введенного в боковую цепь циклического пептида PYY, с сульфгидрильной группой цистеинового остатка из SEQ ID NO: 143 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с образованием,

таким образом, ковалентной связи между циклическим пептидом РУУ и моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем электрофильное соединение представляет собой бромацетамид или малеимид.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.

15. Способ лечения заболевания или расстройства у пациента, причем указанное заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета типа I или типа II, метаболического синдрома, резистентности к инсулину, нарушения толерантности к глюкозе, гипергликемии, гиперинсулинемии, гипертриглицеридемии, дислипидемии, атеросклероза, диабетической нефропатии, гипертензии, неалкогольной жировой дистрофии печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по п.14.

16. Способ снижения потребления пищи у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по п.14.

17. Способ модуляции активности рецептора Y2 у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции по п.14.

18. Способ по любому из пп.15-17, в котором фармацевтическую композицию вводят посредством инъекции.

19. Способ по любому из пп.15-18, в котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации с по меньшей мере одним противодиабетическим агентом.

20. Способ по п.19, в котором указанный противодиабетический агент представляет собой модулятор рецептора глюкагон-подобного пептида 1.

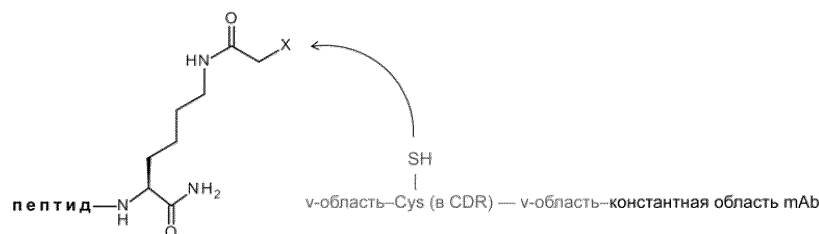
21. Способ по п.19, в котором фармацевтическую композицию вводят в комбинации с лираглутидом.

22. Набор, содержащий конъюгат по любому из пп.1-12, дополнительно содержащий лираглутид и устройство для инъекции.

23. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей конъюгат по любому из пп.1-12, включающий объединение конъюгата с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

24. Способ по п.13, в котором электрофил представляет собой бромацетамид или малеимид.

25. Способ по п.13, в котором боковая цепь циклического пептида РУУ является боковой цепью остатка лизина циклического пептида РУУ.



Фиг. 1

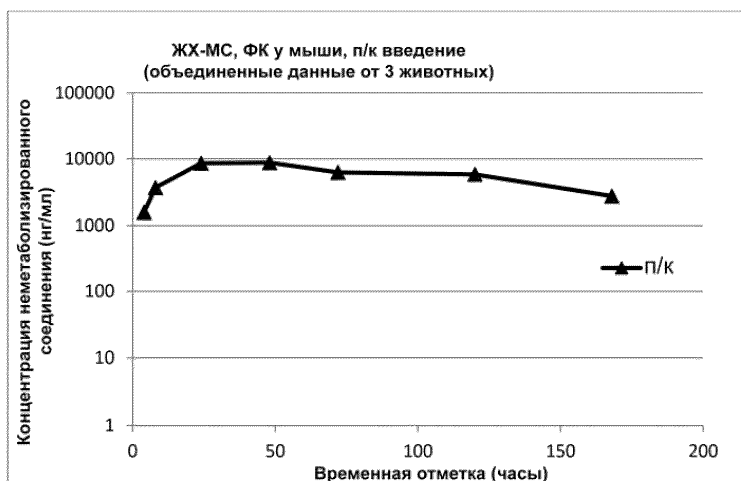
PH9H5 VH (SEQ ID NO:129)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSS**YAMSWVRQAPGKLEWVSAIS**SGGS**TYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYD**GY**GELDFWGGQGLTVTVSS

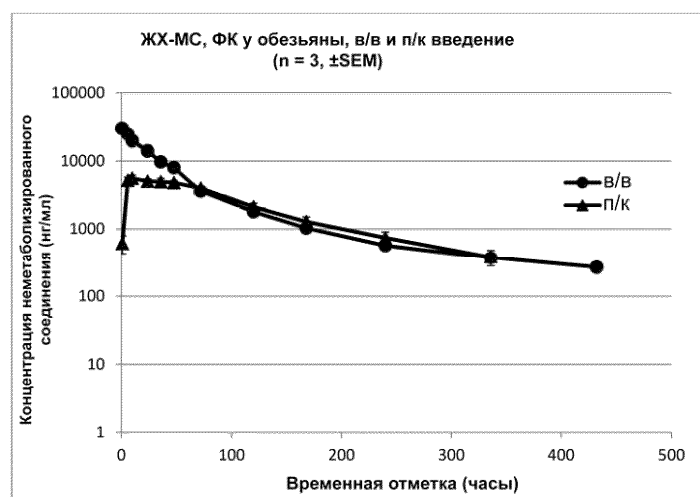
PH9L3 VL (SEQ ID NO:128)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**SQSVSS**YLAWYQQKPGQAPRLLIY**DAS**NRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC**QRSNW**PLTFGGQGTKVEIK

Фиг. 2

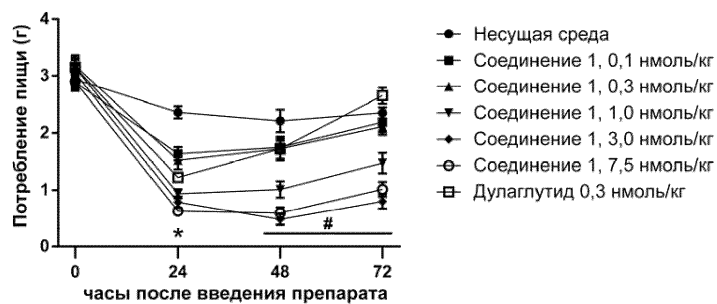


Фиг. 3



Фиг. 4

Потребление пищи у мышей D10 после введения соединения 1



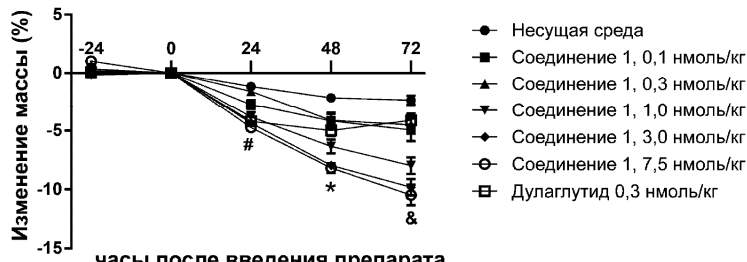
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

* $p < 0,05$, несущая среда по сравнению со всеми группами

$p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 1,0, 3,0 и 7,5 нмоль/кг

Фиг. 5

Изменение BW у мышей D10 после введения соединения 1



часы после введения препарата

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

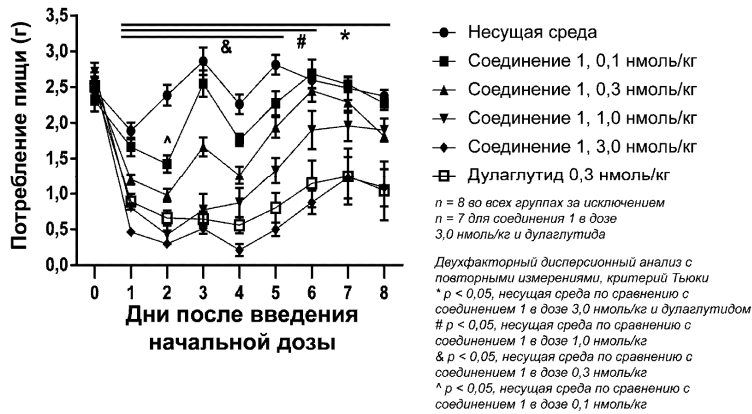
* $p < 0,05$, несущая среда по сравнению со всеми группами

$p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 1,0, 3,0, 7,5 нмоль/кг и дулаглутидом

& $p < 0,05$, несущая среда по сравнению со всеми группами с соединением 1

Фиг. 6

Потребление пищи у мышей D10 после введения соединения 1

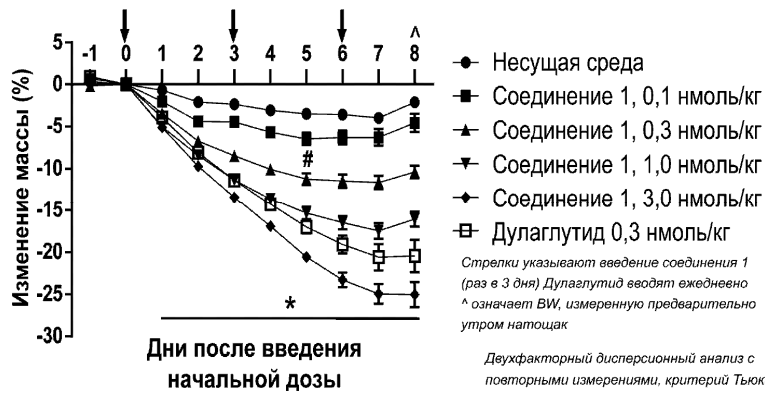


$n = 8$ во всех группах за исключением $n = 7$ для соединения 1 в дозе 3,0 нмоль/кг и дулаглутида

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки
 * $p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 3,0 нмоль/кг и дулаглутидом
 # $p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 1,0 нмоль/кг
 & $p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 0,3 нмоль/кг
 ^ $p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 0,1 нмоль/кг

Фиг. 7

Изменение BW у мышей D10 после введения соединения 1



Стрелки указывают введение соединения 1 (раз в 3 дня) Дулаглутид вводят ежедневно ^ означает BW, измеренную предварительно утром натощак

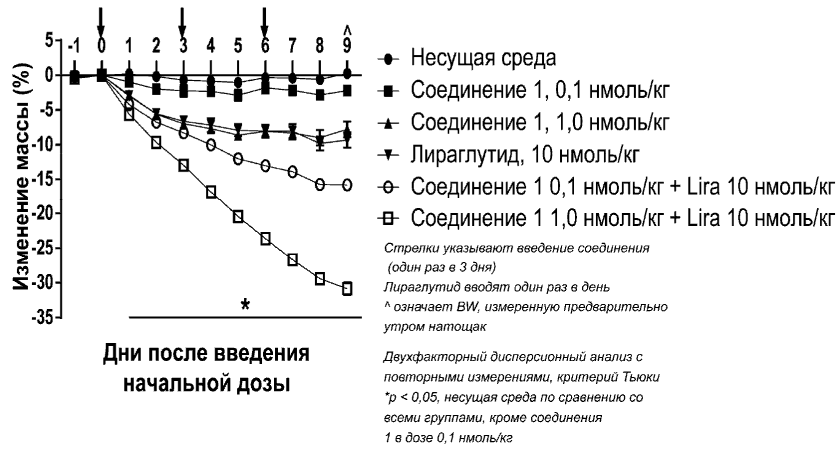
Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки

* $p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 0,3, 1,0, 3,0 нмоль/кг и дулаглутидом

$p < 0,05$, несущая среда по сравнению с соединением 1 в дозе 0,1 нмоль/кг

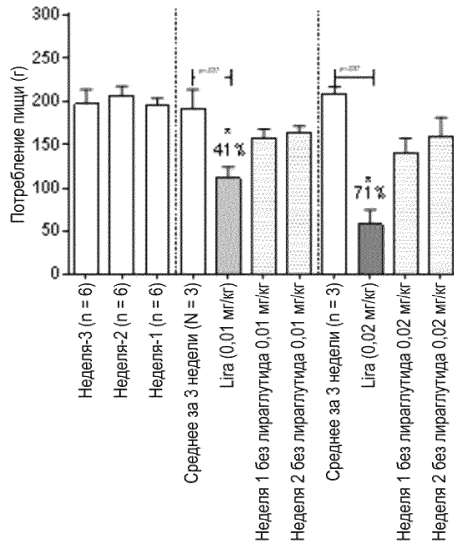
Фиг. 8

Изменение массы тела у мышей DIO

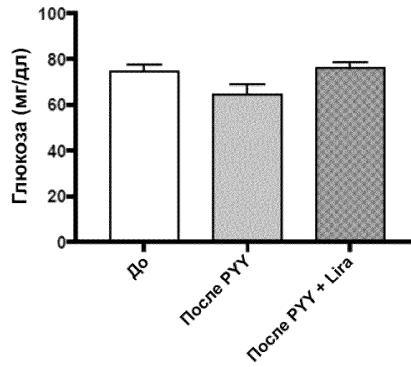


Фиг. 9

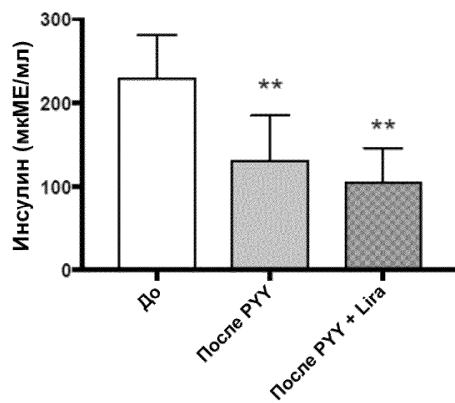
Ежедневное среднее потр.пищи



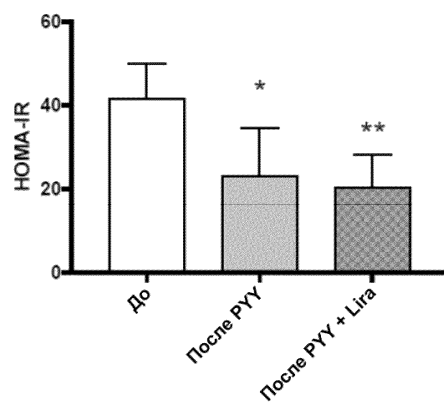
Фиг. 10



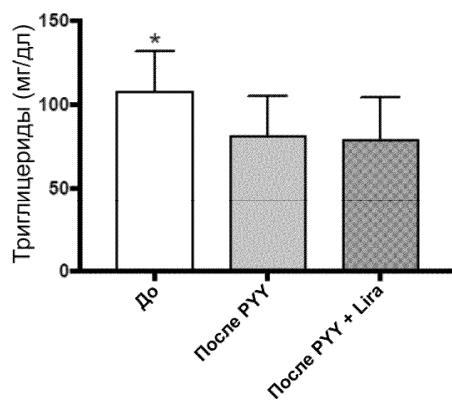
Фиг. 11А



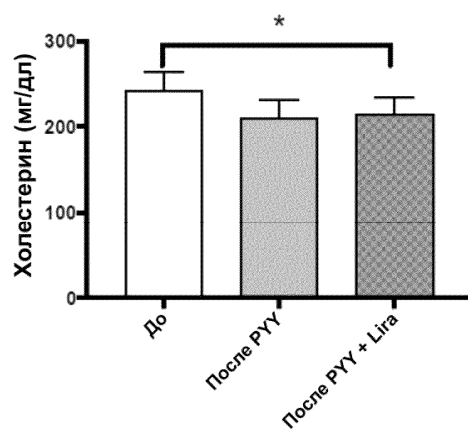
Фиг. 11В



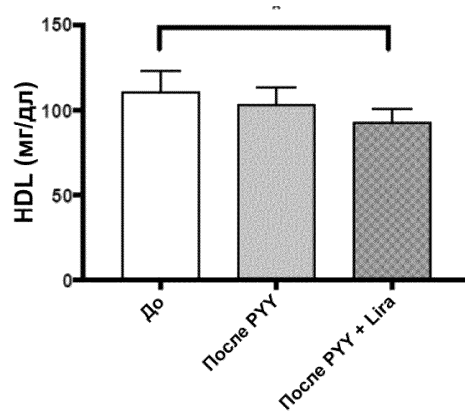
Фиг. 11С



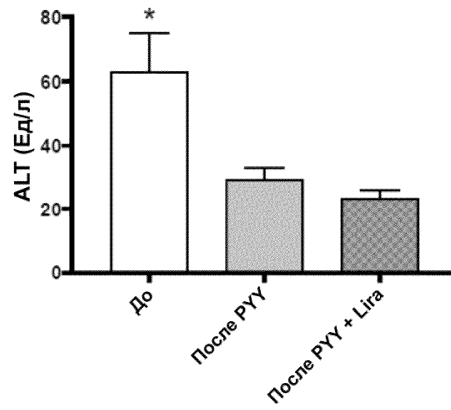
Фиг. 11D



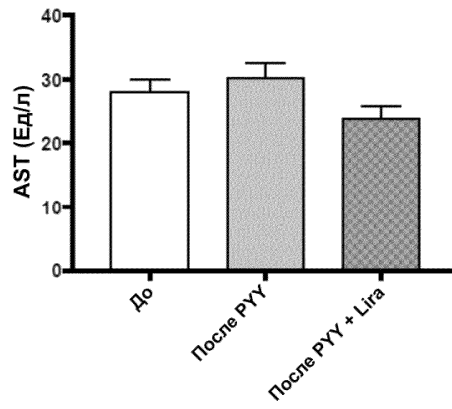
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 12D