

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391287** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.07

(51) Int. Cl. *C07K 7/06* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.09

(54) **СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ,
ОПОСРЕДОВАННЫХ ТАХИКИНИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ**

(31) 20206509.0

(32) 2020.11.09

(33) EP

(86) PCT/EP2021/081057

(87) WO 2022/096736 2022.05.12

(71) Заявитель:
ЭМБАРК БАЙОТЕК АПС (DK)

(72) Изобретатель:

Густафссон Магнус Бернт Фредрик,
Мадсен Джонни, Мульвад Оливия,
Хогендорф Вутер Фредерик Йохан,
Хансен Якоб Бондо (DK)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) Изобретение относится к соединениям и их применению для лечения нарушений, опосредованных тахикининовым рецептором, как, например, тахикининовым рецептором 2.

A1

202391287

202391287

A1

СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, ОПОСРЕДОВАННЫХ ТАХИКИНИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к соединениям и их применению для лечения нарушений, опосредованных тахикининовыми рецепторами, как например, тахикининовым рецептором 2.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Семейство нейропептидных тахикининовых рецепторов состоит из трех рецепторов, связанных с G-белком (GPCR): Тахикининовый рецептор (Tacr) 1, Tacr2 и Tacr3, также известные как рецептор нейрокина 1-3 (NK1-3R). Эндогенными лигандами для тахикининовых рецепторов являются нейропептиды Вещество P (SP), являющееся предпочтительным лигандом для NK1R, Нейрокинин A (NKA), предпочтительный лиганд для NK2R, и Нейрокинин B, предпочтительный лиганд для NK3R. Ни один из эндогенных лигандов не является специфичным для его рецептора. Таким образом, каждый пептидный лиганд может перекрестно активировать все члены семейства тахикининовых рецепторов с эффективностью, близкой к активности в отношении его предпочтительного рецептора. При активации тахикининовые рецепторы предпочтительно связываются с Gq, генерируя внутриклеточный сигнальный ответ инозитолтрифосфата (IP₃). Кроме того, все рецепторы также могут связываться с Gs и индуцировать накопление cAMP, хотя и с меньшей эффективностью, чем Gq-активация.

Ожирение, резистентность к инсулину и сахарный диабет 2 типа являются многофакторными заболеваниями. Все заболевания взаимосвязаны, и точные патологические механизмы неизвестны.

Общепризнано, что ожирение вызвано дисбалансом между потреблением и расходом энергии (ЕЕ). Таким образом, полагают, что повышенное потребление калорий в сочетании с отсутствием активности является основной причиной ожирения. Полагают, что в дополнение к энергетическому дисбалансу высокий уровень циркулирующего инсулина, наблюдаемый при резистентности к инсулину, увеличивает прибавку в весе из-за увеличения запаса питательных веществ, опосредованного инсулином.

Резистентность к инсулину представляет собой состояние, при котором клетки организма не отвечают надлежащим образом на эндокринный гормон инсулин. Роль инсулина состоит в позволении клеткам организма поглощать глюкозу для использования

в качестве энергетического топлива или для хранения в виде жира. Это означает, что, сталкиваясь с резистентностью к инсулину, организм с большей вероятностью накапливает глюкозу в крови, что приводит к повышению уровня глюкозы в крови (гипергликемия). В результате организм вырабатывает больше инсулина, пытаясь справиться с гипергликемией, поэтому у индивидуумов с резистентностью к инсулину часто вырабатывается больше инсулина по сравнению со здоровыми индивидуумами.

Сахарный диабет представляет собой заболевание, при котором клетки организма, продуцирующие инсулин, не могут удовлетворить потребность в инсулине для регулирования уровня глюкозы в крови. В общем, сахарный диабет можно разделить на три различных типа: гестационный сахарный диабет, который возникает во время беременности; сахарный диабет 1 типа, который является аутоиммунным заболеванием, при котором бета-клетки разрушаются и продукция инсулина у индивидуума не возможна; сахарный диабет 2 типа, наиболее распространенная форма диабета, вызванная прогрессирующей потерей бета-клеток и резистентностью к инсулину. Полагают, что потеря бета-клеток при сахарном диабете 2 типа вызвана истощением бета-клеток из-за повышенной потребности в инсулине в сочетании с повреждением клеток в результате повышенного уровня глюкозы в крови и циркулирующих жирных кислот.

Из-за взаимосвязи ожирения, резистентности к инсулину и сахарного диабета лечение, направленное на расход энергии, т.е. путем активации В/ВАТ, может лечить все три состояния. Таким образом, повышенный расход энергии имеет потенциал для лечения ожирения посредством снижения запасов энергии, резистентности к инсулину посредством снижения уровня глюкозы натощак и сахарного диабета посредством снижения уровня глюкозы натощак как такового и защиты бета-клеток от истощения посредством снижения потребности в инсулине.

Коричневая и бежевая жировая ткань (В/ВАТ) может быть физиологически стимулирована воздействием холода для значительного потребления глюкозы и жирных кислот, происходящих из триглицеридов, из крови и увеличения расхода энергии. Классически коричневая и бежевая жировая ткань активируется при стимуляции Gs-связанных бета-адренергических GPCR с вызовом внутриклеточного ответа cAMP, который активирует липолиз, поглощение глюкозы и липидов с периферии и разобщение цепи транспорта электронов в митохондриях путем активации разобщающего белка 1. Поглощение липидов и глюкозы активированной коричневой и бежевой жировой тканью превосходит любые другие ткани, и поэтому активация этих тканей привлекательна для разработки терапий для лечения ожирения, резистентности к инсулину и сахарного диабета.

В настоящее время попытки активировать В/ВАТ у людей были сосредоточены на

бета-адренергическом/сАМР пути. Этот путь действительно оказался способным индуцировать значительный ЕЕ, но с сопутствующим увеличением нежелательных побочных эффектов, таких как частота сердечных сокращений, артериальное давление и уровень глюкозы в крови (гипергликемия).

Помимо активации В/ВАТ, NK2R и лиганд НКА способны активировать NK2R на висцеральных гладких мышцах и стимулировать сокращение толстой кишки и мочевого пузыря. Сократительная активность активации NK2R сохраняется у разных видов, включая крыс, собак, свиней и людей.

Несколько исследований на мышах, крысах, собаках и макаках показали, что агонисты NK2R являются прокинетическими агентами желудочно-кишечного тракта и мочевого пузыря, вызывающими зависимость от дозы сокращения гладких мышц путем активации NK2R, расположенных на клетках гладких мышц. Рвота и гипотензия являются распространенными побочными эффектами, вызываемыми перекрестной активацией NK1R, и, следовательно, желательна разработка специфических агонистов NK2R для уменьшения побочных эффектов этих терапий.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения разработали ряд соединений, нацеленных на тахикининовый/нейрокининовый рецептор 2 (NK2R). NK2R является членом семейства тахикининовых рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), также содержащего тахикининовые/нейрокининовые рецепторы 1 и 3 (NK1R и NK3R). Эндogenous лигандом для NK2R является нейрокинин А (НКА), тогда как вещество Р и нейрокинин В являются эндогенными лигандами для NK1R и NK3R, соответственно. НКА представляет собой нейропептид местного действия, состоящий из 10 аминокислот, в основном продуцируемый энтерохромаффинными клетками, и известно, что он активирует сокращение гладких мышц. NK2R преимущественно связывается с Gq-белками, но также может рекрутировать Gs, и Gбета-гамма, и бета-аррестины. Первичными органами экспрессии мРНК *Tacr2* являются надпочечники (мышь) и желудочно-кишечный тракт (люди и мышь).

Авторы настоящего изобретения предоставили синтез химически стабильных агонистов NK2R в качестве активаторов расхода энергии для лечения нарушений, опосредованных NK2R, таких как нарушение, опосредованное NK2R, выбранное из группы, состоящей из: ожирения, дисфункционального опорожнения, сахарного диабета, как например, сахарный диабет типа II, и нарушений, связанных с сахарным диабетом.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к соединению согласно формуле (I):

(A)-(B) (I),

где

(A) представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где

X_1 выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X_2 выбран из группы, состоящей из лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H),

X_3 выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), фенилаланина (F), мета-тирозина (m-Y), валина (V), триптофана (W), метионина (M), лейцина (L), изолейцина (I) и аланина (A),

X_4 выбран из группы, состоящей из валина (V), треонина (T), серина (S), аспарагина (N), глутамина (Q), глицина (G) и аланина (A),

X_5 выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), серина (S), аланина (A), валина (V), лейцина (L), бета-аланина (bA) и изолейцина (I),

X_6 выбран из группы, состоящей из лейцина (L), изолейцина (I), аланина (A) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X_7 выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF),

(B) представляет собой конъюгированный фрагмент общей формулы (II)

Fa-Lg (II),

где

Fa представляет собой C_{10} - C_{20} жирную кислоту, необязательно замещенную одной или несколькими группами карбоновой кислоты,

Lg представляет собой связывающую группу, которая ковалентно связывает (B) с пептидом (A),

и где (B) ковалентно связан с концевой аминокислотой или с неконцевой аминокислотой.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, как определено в настоящем документе, и один или несколько фармацевтически приемлемых адъювантов, вспомогательных веществ, носителей, буферов и/или разбавителей.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к соединению, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, предусматривающему введение соединения, как определено в

настоящем документе, для лечения нарушения, опосредованного NK2R.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к способу модуляции активности NK2R, предусматривающему контакт NK2R с соединением, как определено в настоящем документе.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к соединению, как определено в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения метаболического нарушения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Положение 6 (X₃): Phe-Tyr мутация. Замена на тирозин в аналогах NKA(4-10) повышает селективность hNK2R. Данные о мутациях в положении 6 (X₃). Активацию рецептора измеряли посредством IP₃-анализа для соединений 304 и 305 на человеческих (h)NK1R (фиг. 1, А), hNK2R (фиг. 1, В) или hNK3R (фиг. 1, С) и проводили IP₃-анализ с использованием указанных пептидных соединений в качестве агонистов (лигандов). Нейрокинин А (NKA) применяли для всех рецепторов в качестве сравнения, тогда как Вещество Р (SP) и Нейрокинин В (NKВ) применяли только для hNK1R и hNK3R, соответственно. Графики показывают активацию рецепторов (сигнал ³Н-миоинозитола) указанных рецепторов после инкубации пептидного соединения в зависимости от концентрации соединения (log[лиганд]). Данные представлены как средний сигнал ³Н-миоинозитола +/- SD. Нелинейную регрессию выполняли с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8.

Фиг. 2: Положение 7 (X₄): Val-Thr мутация. Замена на треонин в положении 7 работает как направляющая селективности, независимая от Tyr6 в аналогах NKA(4-10). Данные о мутациях в положении 7 (X₄). Активацию рецептора измеряли посредством IP₃-анализа для соединений 344, 366, 381, 382, 383 и 384 на человеческих (h)NK1R (фиг. 2, А), hNK2R (фиг. 2, В) или hNK3R (фиг. 2, С) и проводили IP₃-анализ с использованием указанных пептидных соединений в качестве агонистов (лигандов). Нейрокинин А (NKA) применяли для всех рецепторов в качестве сравнения, тогда как Вещество Р (SP) и Нейрокинин В (NKВ) применяли только для hNK1R и hNK3R, соответственно. Активация рецептора (сигнал ³Н-миоинозитола в виде процента 10⁻⁶М NKA) указанных рецепторов после инкубации пептидного соединения в зависимости от концентрации соединения (log[лиганд]). Данные представлены как средняя активация рецептора (в процентах) +/- SD. Нелинейную регрессию выполняли с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8.

Фиг. 3: Положение 10: (X₇) мутация. Met замена. Замена на метионин на норлейцин

или метоксинин улучшает селективность hNK2R независимо от направляющей селективности, но незначительно снижает эффективность hNK2R. Данные о мутациях в положении 10 (X₇). Активацию рецептора измеряли посредством IP₃-анализа для соединений 395, 316, 305, 344 и 394 на человеческих (h)NK1R (фиг. 3, А), hNK2R (фиг. 3, В) или hNK3R (фиг. 3, С) и проводили IP₃-анализ с использованием указанных пептидных соединений в качестве агонистов (лигандов). Нейрокинин А (НКА) применяли для всех рецепторов в качестве сравнения, тогда как Вещество Р (SP) и Нейрокинин В (НКВ) применяли только для hNK1R и hNK3R, соответственно. Активация рецептора (сигнал ³H-миоинозитола в виде процента 10⁻⁶М НКА) указанных рецепторов после инкубации пептидного соединения в зависимости от концентрации соединения (log[лиганд]). Данные представлены как средняя активация рецептора (в процентах) +/- SD. Нелинейную регрессию выполняли с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8.

Фиг. 4: Пептидные аналоги с нейтральными и положительно заряженными линкерами являются предпочтительными. Данные анализа заряда линкера протрактора. Активацию рецептора измеряли посредством IP₃-анализа для соединений 305, 318, 319 и 321 на человеческих (h)NK1R (фиг. 4, А), hNK2R (фиг. 4, В) или hNK3R (фиг. 4, С) и проводили IP₃-анализ с использованием указанных пептидных соединений в качестве агонистов (лигандов). Нейрокинин А (НКА) применяли для всех рецепторов в качестве сравнения, тогда как Вещество Р (SP) и Нейрокинин В (НКВ) применяли только для hNK1R и hNK3R, соответственно. Активация рецептора (сигнал ³H-миоинозитола в виде процента 10⁻⁶М НКА) указанных рецепторов после инкубации пептидного соединения в зависимости от концентрации соединения (log[лиганд]). Данные представлены как средняя активация рецептора (в процентах) +/- SD. Нелинейную регрессию выполняли с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8.

Фиг. 5: Состав протрактора важен для селективности рецепторов и периода полужизни *in vivo* аналогов НКА(4-10) с протрактором на N-конце. Данные анализа одноосновных или двухосновных жирных кислот. Активацию рецептора измеряли посредством IP₃-анализа для соединений 305, 344, 390 и 391 на человеческих (h)NK1R (фиг. 5, А), hNK2R (фиг. 5, В) или hNK3R (фиг. 5, С) и проводили IP₃-анализ с использованием указанных пептидных соединений в качестве агонистов (лигандов). Нейрокинин А (НКА) применяли для всех рецепторов в качестве сравнения, тогда как Вещество Р (SP) и Нейрокинин В (НКВ) применяли только для hNK1R и hNK3R, соответственно. Активация рецептора (сигнал ³H-миоинозитола в виде процента 10⁻⁶М НКА) указанных рецепторов

после инкубации пептидного соединения в зависимости от концентрации соединения ($\log[\text{лиганд}]$). Данные представлены как средняя активация рецептора (в процентах) \pm SD. Нелинейную регрессию выполняли с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение $\log(\text{концентрация})$ в Graphpad Prism 8.

Фиг. 6: Агонизм NK2R улучшает уровень глюкозы в крови натощак, а также толерантность к глюкозе и инсулину у мышей с ожирением, вызванным диетой. Мышам C57BL/6NRj с ожирением, вызванным диетой дикого типа, однократно вводили посредством подкожной инъекции соединение 344 (325 нмоль/кг) и подвергали интраперитонеальному тесту толерантности к глюкозе (ipGTT, Фиг. 6, А.) или интраперитонеальному тесту толерантности к инсулину (ipITT, Фиг. 6, В.) через 24 часа после обработки. Данные представлены как среднее значение \pm SEM, $n=5-7$, проанализировано с помощью двустороннего дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Бонферрони, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $****p<0,0001$.

Фиг. 7: NK2R корректирует дисфункциональное опорожнение у мышей. Дисфункциональное опорожнение индуцировали путем перорального введения через зонд лоперамида (LP, 5 мг/кг) за 30 мин до подкожного введения различных доз селективного агониста NK2R, соединения 344. Мышей, получавших среду (Veh), использовали в качестве контроля нормального опорожнения. Опорожнение оценивали по количеству шариков кала, образовавшихся в течение шести часов. Данные представлены в виде средних значений \pm SEM, $n=5-7$, проанализировано с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественного сравнения обработки соединением 344 по сравнению с LP, $**p<0,01$.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Термины и определения

Для облегчения понимания следующего описания в следующих абзацах представлен ряд определений.

Термин «алкил», независимо от того, используется ли он сам по себе или как часть группы заместителя, относится к прямым и разветвленным углеродным цепям, имеющим от 1 до 8 атомов углерода, как например, от 1 до 6 атомов углерода. Следовательно, указанные числа атомов углерода (например, C₁₋₈) независимо относятся к числу атомов углерода в алкильном фрагменте или к алкильному фрагменту более крупного алкилсодержащего заместителя.

В группах заместителей с несколькими алкильными группами, как например, (C₁₋₆алкил)₂амино-, C₁₋₆алкильные группы диалкиламино могут быть одинаковыми или

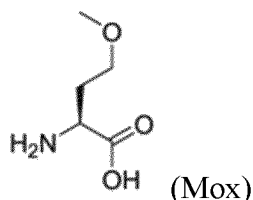
разными. Алкил, как определено в настоящем документе, может быть замещен одним или несколькими заместителями, такими как галоген или один или несколько галогенов. Согласно одному варианту осуществления алкил замещен 1,2 или 3 атомами фтора. Согласно одному варианту осуществления алкил замещен карбоксильной группой (CO₂), как например, карбоксиметил (CO₂Me).

Понятно, что заместители и паттерны замещения соединений согласно настоящему изобретению могут быть выбраны специалистом в данной области техники для получения соединений, которые являются химически стабильными и которые могут быть легко синтезированы способами, известными в данной области техники, а также такими способами, представленными в настоящем документе.

Термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему и наиболее предпочтительно человеку.

Протеиногенные «аминокислоты» (AA) указаны в настоящем документе с использованием либо их однобуквенного, либо трехбуквенного кода в соответствии с рекомендациями IUPAC, см., например, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>. Аббревиатуры с заглавными буквами обозначают L-аминокислоты, тогда как аббревиатуры со строчными буквами обозначают D-аминокислоты.

В настоящем документе указан ряд непротеиногенных аминокислот. Используемые названия должны быть ясными и понятными специалисту. *Мета*-Тирозин (m-Y) представляет собой 3-гидроксифенилаланин. Структура метоксина (Mox) показана ниже:



Аминокислота бета-аланин (bA), как применяется в настоящем документе, также известна как 3-аминопропановая кислота. Аминокислота *N*-метил-лейцин упоминается в настоящем документе как NmLeu.

Термин «концевую жирную кислоту» представляет собой жирную кислоту, в которой группа карбоновой кислоты расположена при концевом атоме углерода цепи жирной кислоты. Таким образом, «концевая C₁₆-C₂₀ жирная кислота» представляет собой цепь жирной кислоты, состоящую из 16-20 атомов углерода, где кислотная группа расположена на конце, а атом углерода группы карбоновой кислоты является концевым атомом углеродом цепи.

Активность тахикининового рецептора

Индукцированную агонистом активацию рецептора, связанного с G-белком, (GPCR) можно измерить с помощью радиорецепторного анализа инозитол-1,4,5-трифосфата [^3H] (IP_3 -анализ), как описано в примере 1. IP_3 -анализ использует преимущества способности тахикининовых рецепторов индуцировать продукцию вторичного мессенджера инозитолтрифосфата (IP_3) при связывании агониста (лиганда) с клетками, экспрессирующими рецептор, после начального периода мечения ^3H -инозитолом. Фактически это означает, что продукцию вторичного мессенджера IP_3 как меру активности рецептора можно оценить путем оценки ^3H -активности.

«Агонист NK2R» может обладать различной степенью селективности относительно активности в отношении рецептора NK1 и/или рецептора NK3, как измерено в биологических анализах, таких как IP_3 -анализ, представленный в настоящем документе. «Селективный агонист NK2R» в настоящем документе имеет определение лиганда, который связывается с рецептором NK2 или активирует его по меньшей мере приблизительно в 10 раз или более эффективно, чем он связывается с рецепторами NK1 и/или NK3 или активирует их. Молекула необязательно должна быть признана селективной как в анализе связывания, так и в функциональном (активационном) анализе, чтобы быть селективным агонистом NK2R. Эффективность связывания обычно приводят как EC_{50} , при этом более низкое значение EC_{50} соответствует большей эффективности. Таким образом, селективный агонист NK2R обладает EC_{50} связывания NK2R, которая по меньшей мере приблизительно в 10 раз или более ниже, чем его EC_{50} связывания NK1 и/или NK3. Эффективность активации рецептора также обычно приводят как K_i , при этом более низкое значение K_i соответствует большей эффективности.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, представляющему собой агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R). Согласно одному варианту осуществления соединение представляет собой селективный агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R).

Согласно одному варианту осуществления соединение имеет EC_{50} в отношении человеческого NK2R 300 нМ или менее, как например, 250 нМ или менее, как например, 200 нМ или менее, как например, 150 нМ или менее, как например, 100 нМ или менее, как например, 90 нМ или менее, как например, 80 нМ или менее, как например, 70 нМ или менее, как например, 60 нМ или менее, как например, 50 нМ или менее.

Согласно одному варианту осуществления соединение имеет EC_{50} в отношении человеческого NK2R 50 нМ или менее, как например, 40 нМ или менее, как например, 30 нМ или менее, как например, 20 нМ или менее, как например, 15 нМ или менее, как

например, 14 нМ или менее, как например, 13 нМ или менее, как например, 12 нМ или менее, как например, 11 нМ или менее, как например, 10 нМ или менее.

Согласно одному варианту осуществления соединение имеет EC50 в отношении человеческого NK1R по меньшей мере 100 нМ, как например, по меньшей мере 200 нМ, как например, по меньшей мере 300 нМ, как например, по меньшей мере 400 нМ, как например, по меньшей мере 500 нМ.

Согласно одному варианту осуществления соединение имеет EC50 в отношении человеческого NK3R по меньшей мере 100 нМ, как например, по меньшей мере 200 нМ, как например, по меньшей мере 300 нМ, как например, по меньшей мере 400 нМ, как например, по меньшей мере 500 нМ.

Нарушения, опосредованные тахикининовым рецептором

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства. Авторы настоящего изобретения предоставляют синтез химически стабильных агонистов NK2R в качестве активаторов расхода энергии для лечения метаболических нарушений, как например, ожирения, а также для лечения дисфункционального опорожнения.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, предусматривающему введение соединения, как определено в настоящем документе, для лечения нарушения, опосредованного NK2R.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к нарушению, опосредованному NK2R, выбранному из группы, состоящей из ожирения, дисфункционального опорожнения, сахарного диабета, как например, сахарный диабет типа II, и нарушений, связанных с сахарным диабетом.

Согласно одному варианту осуществления нарушение, опосредованное NK2R, представляет собой метаболическое нарушение. Согласно одному варианту осуществления метаболическое нарушение представляет собой нарушение, связанное с сахарным диабетом. В частности, нарушение, связанное с сахарным диабетом, выбрано из группы, состоящей из нарушенной толерантности к инсулину и нарушенной толерантности к глюкозе.

Кроме того, согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу модуляции активности NK2R, предусматривающему контакт NK2R с соединением, как определено в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к

применению соединения, как определено в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения метаболического нарушения.

Пептиды – (A)

Согласно первому варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению согласно формуле (I):



где

(A) представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где

X_1 выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X_2 выбран из группы, состоящей из лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H),

X_3 выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), фенилаланина (F), мета-тирозина (m-Y), валина (V), триптофана (W), метионина (M), лейцина (L), изолейцина (I) и аланина (A),

X_4 выбран из группы, состоящей из валина (V), треонина (T), серина (S), аспарагина (N), глутамина (Q), глицина (G) и аланина (A),

X_5 выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), серина (S), аланина (A), валина (V), лейцина (L), бета-аланина (bA) и изолейцина (I),

X_6 выбран из группы, состоящей из лейцина (L), изолейцина (I), аланина (A) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X_7 выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксинина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF),

(B) представляет собой конъюгированный фрагмент общей формулы (II)



где

Fa представляет собой C_{10} - C_{20} жирную кислоту, необязательно замещенную одной или несколькими группами карбоновой кислоты,

Lg представляет собой связывающую группу, которая ковалентно связывает (B) с пептидом (A),

и где (B) ковалентно связан с концевой аминокислотой или с неконцевой аминокислотой.

Согласно первому варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где пептид (A) имеет общую формулу $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где

X₁ выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X₂ выбран из группы, состоящей из лизина (K) и аргинина (R),

X₃ выбран из группы, состоящей из тирозина (Y) и мета-тирозина (*m*-Y),

X₄ выбран из группы, состоящей из валина (V) и треонина (T),

X₅ выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), бета-аланина (bA) и серина (S),

X₆ выбран из группы, состоящей из лейцина (L) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X₇ выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF).

Согласно третьему варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где пептид (A) имеет общую формулу X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇, где

X₁ выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X₂ выбран из группы, состоящей из лизина (K) и аргинина (R),

X₃ выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), и фенилаланина (F), и мета-тирозина (*m*-Y),

X₄ выбран из группы, состоящей из валина (V) и треонина (T),

X₅ выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), бета-аланина (bA) и серина (S),

X₆ выбран из группы, состоящей из лейцина (L) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X₇ выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X₂ представляет собой аргинин (R).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X₃ представляет собой тирозин (Y). Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X₃ представляет собой тирозин (Y), и где X₂ представляет собой аргинин (R). Согласно одному варианту осуществления X₃ представляет собой тирозин (Y), X₂ представляет собой аргинин (R), и X₅ представляет собой 2-аминоизомасляную кислоту (Aib).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X₄ представляет собой треонин (T).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X₅ выбран из группы, состоящей из 2-аминоизомасляной кислоты (Aib) и

серина (S).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X_6 представляет собой N-метил-лейцин (Me-Leu).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X_7 представляет собой метоксинин (Mox). Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где X_7 представляет собой метоксинин (Mox), и где X_2 представляет собой аргинин (R). Согласно одному варианту осуществления X_7 представляет собой метоксинин (Mox), X_2 представляет собой аргинин (R), и X_3 представляет собой тирозин (Y).

Предпочтительно, пептид (A) амидирован на С-конце.

Согласно одному варианту осуществления пептид (A) содержит от 7 до 15 аминокислот, как например, от 7 до 14 аминокислот, как например, от 7 до 13 аминокислот, как например, от 7 до 12 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 10 аминокислот, как например, от 7 до 9 аминокислот, как например, от 7 до 8 аминокислот, где предпочтительно пептид содержит 7 аминокислот.

Согласно одному варианту осуществления пептид (A) содержит не более 15 аминокислот, как например, не более 14 аминокислот, как например, не более 13 аминокислот, как например, не более 12 аминокислот, как например, не более 11 аминокислот, как например, не более 10 аминокислот, как например, не более 9 аминокислот, как например, не более 8 аминокислот, как например, не более 7 аминокислот.

Согласно одному варианту осуществления пептид (A) состоит из 7 аминокислот общей формулы $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$. Пептид предпочтительно амидирован на С-конце.

Согласно одному конкретному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где

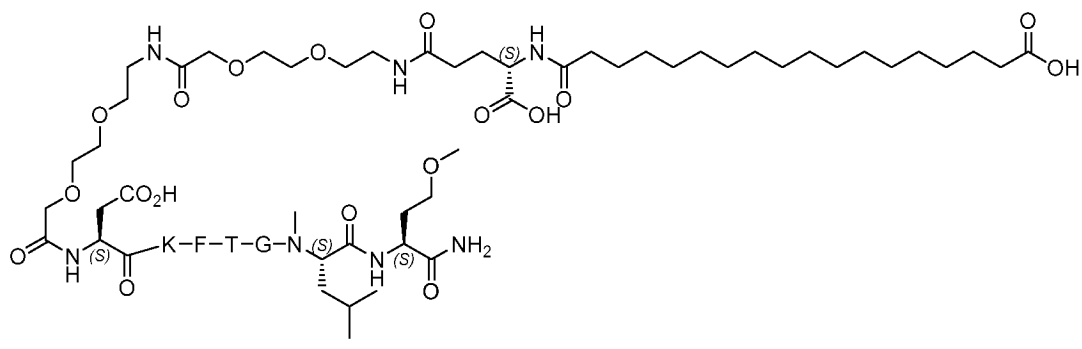
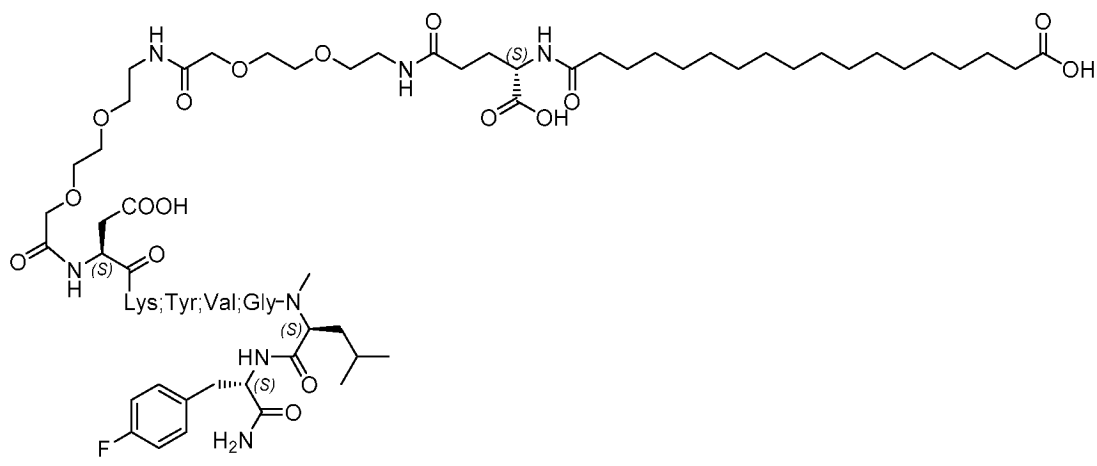
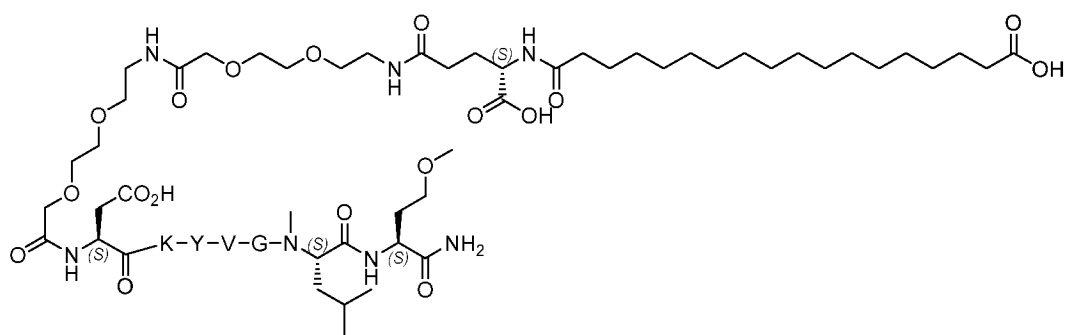
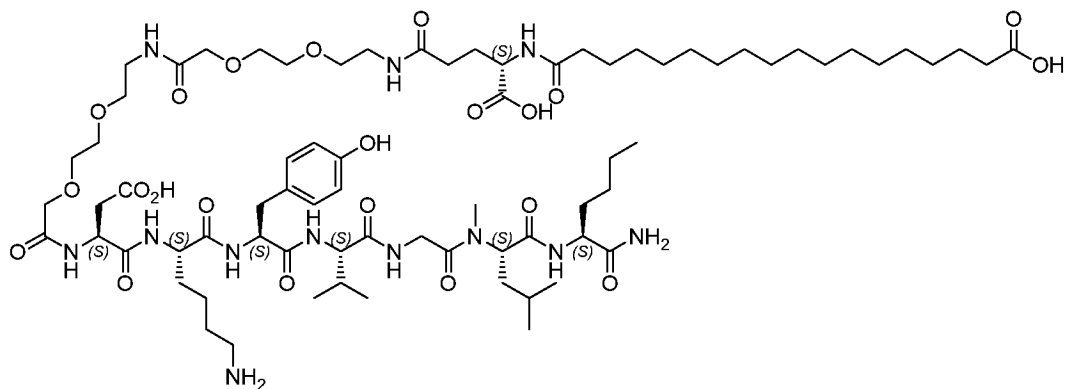
(A) представляет собой Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH₂ (соединение 305), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому аспарагину (A).

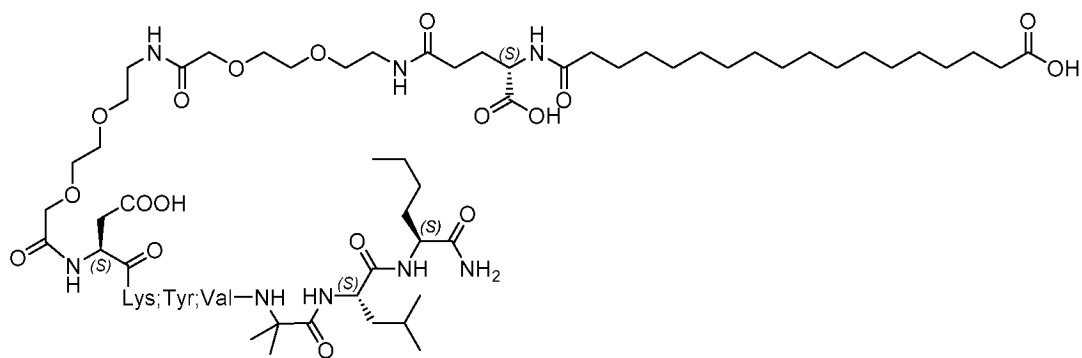
Согласно одному конкретному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где (A) представляет собой Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Metox,NH₂ (соединение 344), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому аспартату (A).

Согласно одному варианту осуществления соединение состоит из

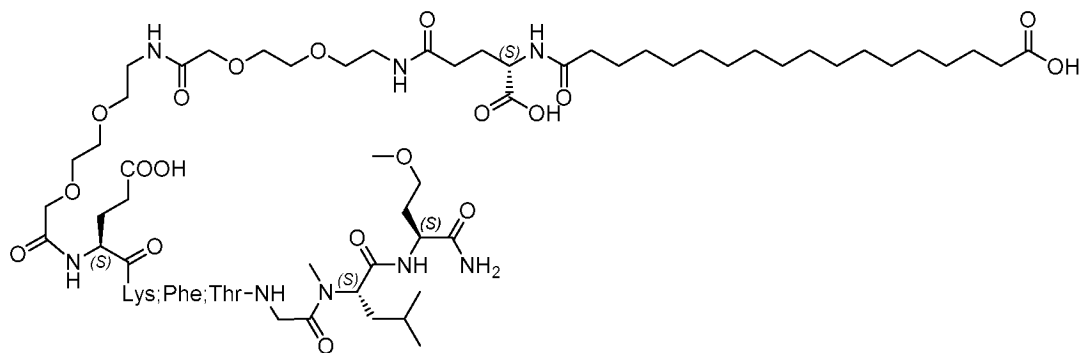
последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 57.

Согласно одному конкретному варианту осуществления соединение представляет собой:



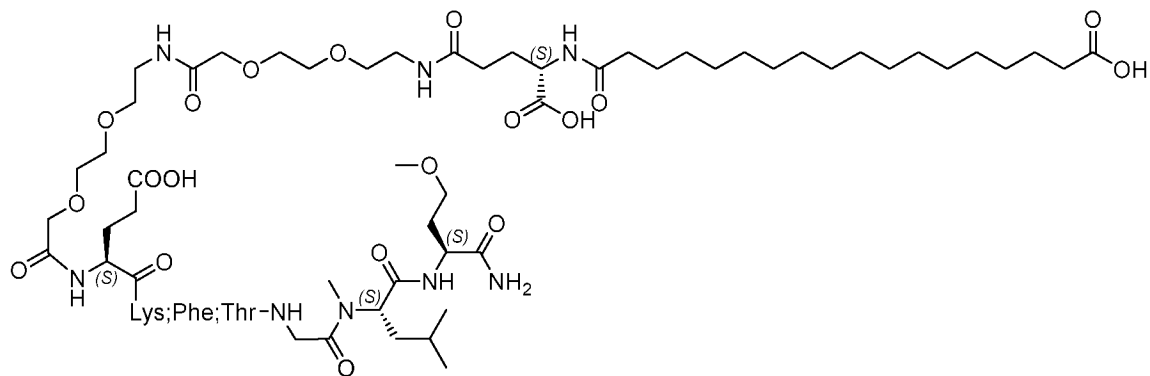


(ID 395) или



(ID 398).

В контексте настоящего раскрытия и если не указано иное, когда связь проходит от атома к аминокислоте, сокращенно обозначаемой ее однобуквенным или трехбуквенным кодом, связь присоединяется к α -аминогруппе или к карбонильному углероду основной цепи аминокислоты. Например, в случае соединения с ID 398 «Lys» соединен с соседним карбонилем через его α -аминогруппу, а «Th» соединен с «NH» через его карбонильный углерод основной цепи.



(398).

Конъюгированные фрагменты – (B)

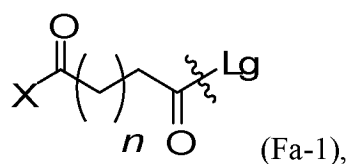
Конъюгированные фрагменты также упоминаются в настоящем документе как протракторы. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, как определено в настоящем документе, где Lg имеет формулу (Lg-1),



основной цепи, выбранных из группы, состоящей из: С, О и N, и где R выбран из группы, состоящей из H и C₁₋₆ алкила. Специалисту в данной области техники известно, что С, О и N могут быть замещены водородом в зависимости от валентности конкретного атома. Основная цепь может содержать одну или несколько карбонильных групп, как например, 1, 2, 3 или 4 карбонильные группы. Основная цепь может также содержать одну или несколько групп карбоновой кислоты, как например, 1 или 2. Согласно некоторым вариантам осуществления Z содержит фрагменты этиленгликоля, прерываемые одной или несколькими амидными функциональными группами. Пример показан в формуле (B1), где жирная кислота Fa имеет формулу (Fa-1), R в Lg-1 представляет собой H, а основная цепь Z содержит 21 атом, выбранные из группы, состоящей из С, О и N.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где Fa представляет собой концевую C₁₆-C₂₀ жирную кислоту.

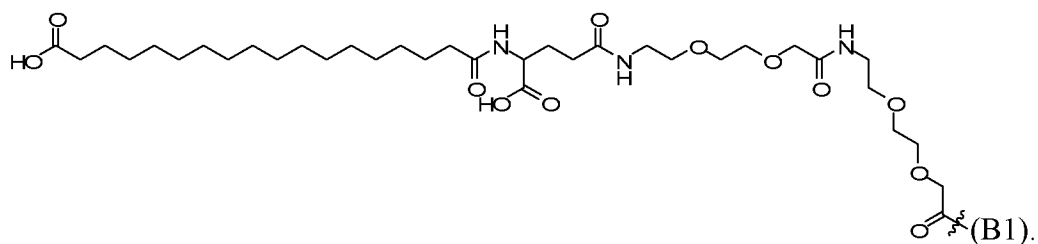
Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где Fa имеет формулу (Fa-1),



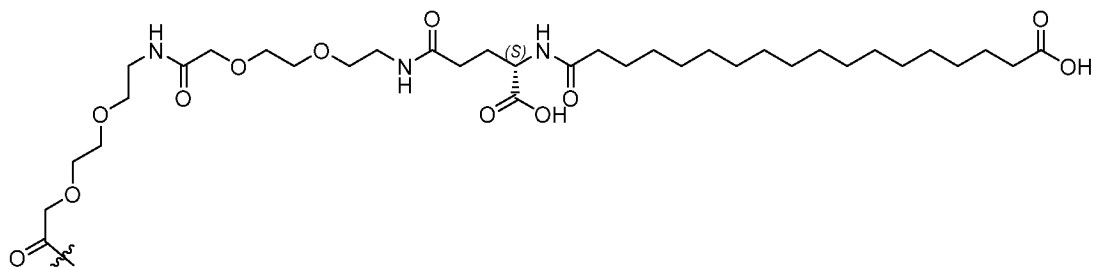
где n представляет собой от 11 до 20, как например, от 12 до 19, например, от 13 до 18, как например, от 14 до 17, предпочтительно где n представляет собой 15, и где X выбран из группы, состоящей из -OH, -OC₁₋₆, -NH₂, -NHC₁₋₆ и N(C₁₋₆)₂. Согласно конкретному варианту осуществления n представляет собой 15, и X представляет собой -OH.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, где Lg конъюгированного фрагмента не содержит функциональные группы, которые являются положительно заряженными при значении pH = 7,4. Согласно одному варианту осуществления Lg конъюгированного фрагмента не содержит более 1 функциональной группы, которая является отрицательно заряженной при значении pH = 7,4. Согласно одному варианту осуществления Lg конъюгированного фрагмента имеет суммарный нейтральный заряд или -1 при значении pH = 7,4.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, как определено в настоящем документе, где конъюгированный фрагмент имеет формулу (B1),



Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к соединению, как определено в настоящем документе, где конъюгированный фрагмент имеет формулу, приведенную ниже,



Согласно одному варианту осуществления конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A), необязательно посредством амидной связи.

Согласно одному варианту осуществления конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A) посредством амидной связи с N-концевой α -NH₂ группой.

Фармацевтические композиции

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, как определено в настоящем документе, и один или несколько фармацевтически приемлемых адъювантов, вспомогательных веществ, носителей, буферов и/или разбавителей.

Пункты

1. Соединение согласно формуле (I):

(A)-(B) (I),

где

(A) представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇, где

X₁ выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X₂ выбран из группы, состоящей из лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H),

X₃ выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), фенилаланина (F), мета-тирозина

(*m*-Y), валина (V), триптофана (W), метионина (M), лейцина (L), изолейцина (I) и аланина (A),

X₄ выбран из группы, состоящей из валина (V), треонина (T), серина (S), аспарагина (N), глутамина (Q), глицина (G) и аланина (A),

X₅ выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), серина (S), аланина (A), валина (V), лейцина (L), бета-аланина (bA) и изолейцина (I),

X₆ выбран из группы, состоящей из лейцина (L), изолейцина (I), аланина (A) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X₇ выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF),

(B) представляет собой конъюгированный фрагмент общей формулы (II)

Fa-Lg (II),

где

Fa представляет собой C₁₀-C₂₀ жирную кислоту, необязательно замещенную одной или несколькими группами карбоновой кислоты,

Lg представляет собой связывающую группу, которая ковалентно связывает (B) с пептидом (A),

и где (B) ковалентно связан с концевой аминокислотой или с неконцевой аминокислотой.

2. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) имеет общую формулу X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇, где

X₁ выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X₂ выбран из группы, состоящей из лизина (K) и аргинина (R),

X₃ выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), и фенилаланина (F), и метатирозина (*m*-Y),

X₄ выбран из группы, состоящей из валина (V) и треонина (T),

X₅ выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), бета-аланина (bA) и серина (S),

X₆ выбран из группы, состоящей из лейцина (L) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X₇ выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF).

3. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X₂ представляет собой аргинин (R).

4. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X₃ представляет

собой тирозин (Y).

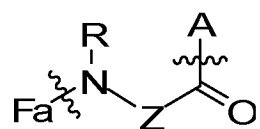
5. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X_4 представляет собой треонин (T).

6. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X_5 выбран из группы, состоящей из 2-аминоизомасляной кислоты (Aib) и серина (S).

7. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X_6 представляет собой N-метил-лейцин (Me-Leu).

8. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X_7 представляет собой метоксинин (Mox).

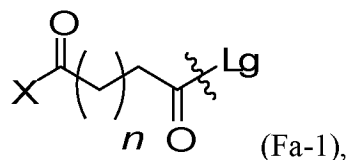
9. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Lg имеет формулу (Lg-1),



(Lg-1), где Z представляет собой цепь, содержащую от 18 до 23 атомов в основной цепи, выбранных из группы, состоящей из: C, O и N, и где R выбран из группы, состоящей из H и C_{1-6} алкила.

10. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Fa представляет собой концевую C_{16} - C_{20} жирную кислоту.

11. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Fa имеет формулу (Fa-1),



где n представляет собой от 11 до 20, как например, от 12 до 19, например, от 13 до 18, как например, от 14 до 17, предпочтительно где n представляет собой 15, и где X выбран из группы, состоящей из -OH, $-OC_{1-6}$, $-NH_2$, $-NHC_{1-6}$ и $N(C_{1-6})_2$.

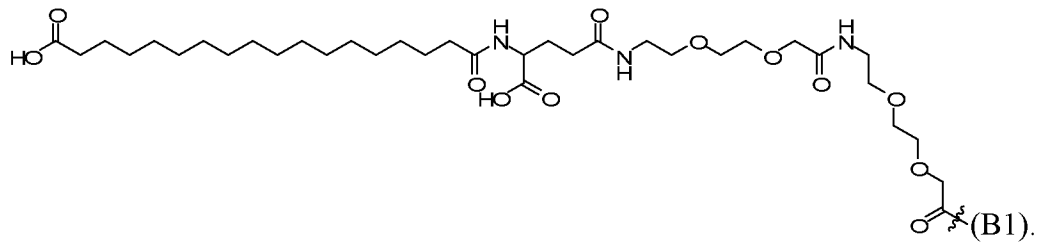
12. Соединение по пункту 11, где n представляет собой 15, и где X представляет собой -OH.

13. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Lg конъюгированного фрагмента не содержит функциональные группы, которые являются положительно заряженными при значении $pH = 7,4$.

14. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Lg конъюгированного фрагмента имеет суммарный нейтральный заряд или -1 при значении $pH = 7,4$.

15. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный

фрагмент имеет формулу (B1),



16. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A) необязательно посредством амидной связи.

17. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A) посредством амидной связи с N-концевой α -NH₂ группой.

18. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) амидирован на C-конце.

19. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) содержит от 7 до 15 аминокислот, как например, от 7 до 14 аминокислот, как например, от 7 до 13 аминокислот, как например, от 7 до 12 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 10 аминокислот, как например, от 7 до 9 аминокислот, как например, от 7 до 8 аминокислот, предпочтительно где пептид содержит 7 аминокислот.

20. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) содержит не более 15 аминокислот, как например, не более 14 аминокислот, как например, не более 13 аминокислот, как например, не более 12 аминокислот, как например, не более 11 аминокислот, как например, не более 10 аминокислот, как например, не более 9 аминокислот, как например, не более 8 аминокислот, как например, не более 7 аминокислот.

21. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) состоит из 7 аминокислот общей формулы X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇.

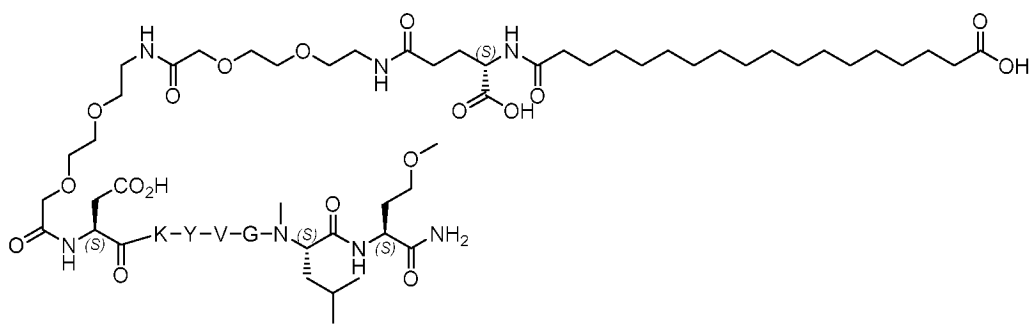
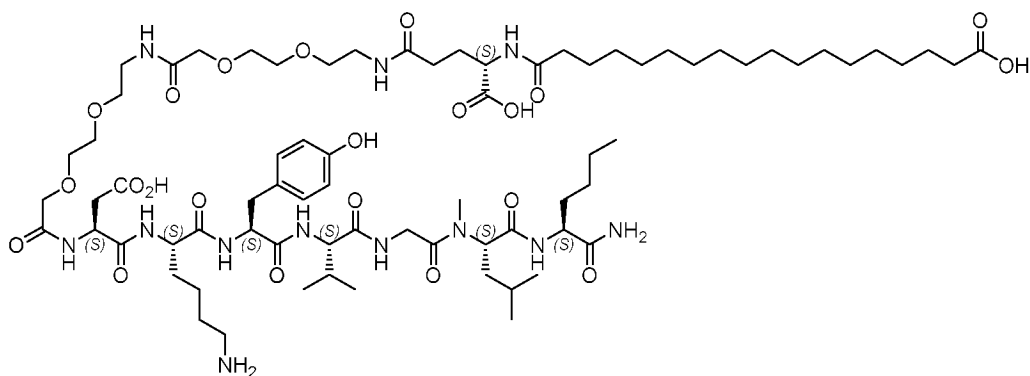
22. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где (A) представляет собой Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH₂ (соединение 305), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому аспартату (A).

23. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где (A) представляет собой Asp,Lys,Тур,Val,Gly,NmLeu,Метох,NH₂ (соединение 344), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому

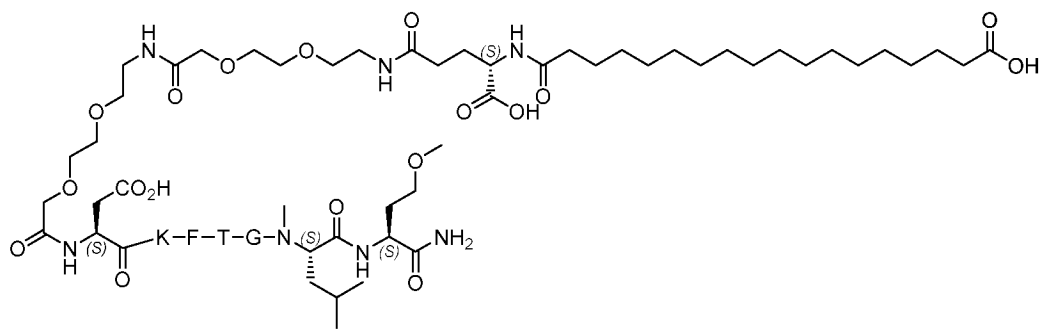
аспартату (A).

24. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение состоит из последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 57.

25. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение представляет собой:



или



26. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение представляет собой агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R).

27. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение представляет собой селективный агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R).

28. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение имеет EC50 в отношении человеческого NK2R 300 нМ или менее, как например, 250 нМ или менее, как например, 200 нМ или менее, как например, 150 нМ или менее, как например, 100 нМ или менее, как например, 90 нМ или менее, как например, 80 нМ или менее, как например, 70 нМ или менее, как например, 60 нМ или менее, как например, 50 нМ или

менее.

29. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение имеет EC50 в отношении человеческого NK2R 50 нМ или менее, как например, 40 нМ или менее, как например, 30 нМ или менее, как например, 20 нМ или менее, как например, 15 нМ или менее, как например, 14 нМ или менее, как например, 13 нМ или менее, как например, 12 нМ или менее, как например, 11 нМ или менее, как например, 10 нМ или менее.

30. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение имеет EC50 в отношении человеческого NK1R по меньшей мере 100 нМ, как например, по меньшей мере 200 нМ, как например, по меньшей мере 300 нМ, как например, по меньшей мере 400 нМ, как например, по меньшей мере 500 нМ.

31. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение имеет EC50 в отношении человеческого NK3R по меньшей мере 100 нМ, как например, по меньшей мере 200 нМ, как например, по меньшей мере 300 нМ, как например, по меньшей мере 400 нМ, как например, по меньшей мере 500 нМ.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, как определено в любом из предшествующих пунктов, и один или несколько фармацевтически приемлемых адъювантов, вспомогательных веществ, носителей, буферов и/или разбавителей.

33. Соединение, как определено в любом из пунктов 1-31, для применения в качестве лекарственного средства.

34. Способ лечения заболевания у субъекта, предусматривающий введение соединения, как определено в любом из пунктов 1-31, для лечения нарушения, опосредованного NK2R.

35. Способ по любому из предшествующих пунктов, где нарушение, опосредованное NK2R, выбрано из группы, состоящей из ожирения, дисфункционального опорожнения, сахарного диабета, как например, сахарный диабет типа II, и нарушений, связанных с сахарным диабетом.

36. Способ по любому из предшествующих пунктов, где нарушение, опосредованное NK2R, представляет собой метаболическое нарушение.

37. Способ по любому из предшествующих пунктов, где метаболическое нарушение представляет собой нарушение, связанное с сахарным диабетом.

38. Способ согласно пункту 35, где нарушение, связанное с сахарным диабетом, выбрано из группы, состоящей из нарушенной толерантности к инсулину и нарушенной толерантности к глюкозе.

39. Способ модуляции активности NK2R, предусматривающий контакт NK2R с соединением, как определено в любом из пунктов 1 - 31.

40. Применение соединения, как определено в любом из пунктов 1 – 31, для получения лекарственного средства для лечения метаболического нарушения.

Пункты II

1. Соединение согласно формуле (I):

(A)-(B) (I),

где

(A) представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где

X_1 выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X_2 выбран из группы, состоящей из лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H),

X_3 выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), фенилаланина (F), мета-тирозина (m-Y), валина (V), триптофана (W), метионина (M), лейцина (L), изолейцина (I) и аланина (A),

X_4 выбран из группы, состоящей из валина (V), треонина (T), серина (S), аспарагина (N), глутамина (Q), глицина (G) и аланина (A),

X_5 выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), серина (S), аланина (A), валина (V), лейцина (L), бета-аланина (bA) и изолейцина (I),

X_6 выбран из группы, состоящей из лейцина (L), изолейцина (I), аланина (A) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X_7 выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF),

(B) представляет собой конъюгированный фрагмент общей формулы (II)

Fa-Lg (II),

где

Fa представляет собой C_{10} - C_{20} жирную кислоту, необязательно замещенную одной или несколькими группами карбоновой кислоты,

Lg представляет собой связывающую группу, которая ковалентно связывает (B) с пептидом (A),

и где (B) ковалентно связан с концевой аминокислотой или с неконцевой аминокислотой.

2. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) имеет общую формулу $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где

X_1 выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой

кислоты (E),

X₂ выбран из группы, состоящей из лизина (K) и аргинина (R),

X₃ выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), и фенилаланина (F), и мета-тирозина (*m*-Y),

X₄ выбран из группы, состоящей из валина (V) и треонина (T),

X₅ выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), бета-аланина (bA) и серина (S),

X₆ выбран из группы, состоящей из лейцина (L) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X₇ выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF).

3. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где X₂ представляет собой аргинин (R),

X₃ представляет собой тирозин (Y),

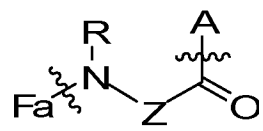
X₄ представляет собой треонин (T),

X₅ выбран из группы, состоящей из 2-аминоизомасляной кислоты (Aib) и серина (S),

X₆ представляет собой N-метил-лейцин (Me-Leu), и/или

X₇ представляет собой метоксинин (Mox).

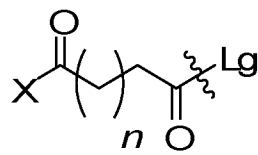
4. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Lg имеет формулу (Lg-1),



(Lg-1), где Z представляет собой цепь, содержащую от 18 до 23 атомов в основной цепи, выбранных из группы, состоящей из: C, O и N, и где R выбран из группы, состоящей из H и C₁₋₆ алкила.

5. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Fa представляет собой концевую C₁₆-C₂₀ жирную кислоту.

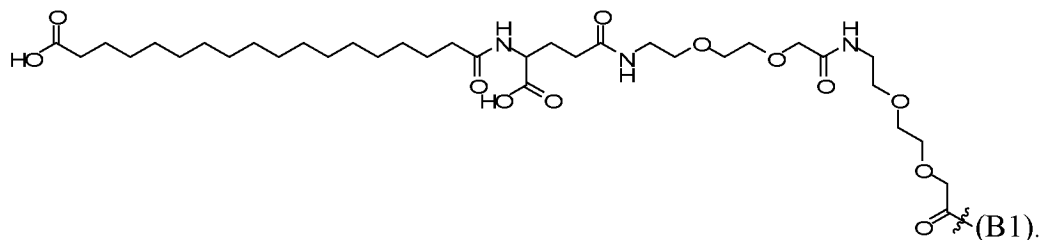
6. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где Fa имеет формулу (Fa-1),



где n представляет собой от 11 до 20, как например, от 12 до 19, например, от 13 до 18, как например, от 14 до 17, предпочтительно где n представляет собой 15, и где X выбран из группы, состоящей из -OH, -OC₁₋₆, -NH₂, -NHC₁₋₆ и N(C₁₋₆)₂.

7. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный

фрагмент имеет формулу (B1),



8. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A) посредством амидной связи с N-концевой α -NH₂ группой.

9. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) амидирован на C-конце.

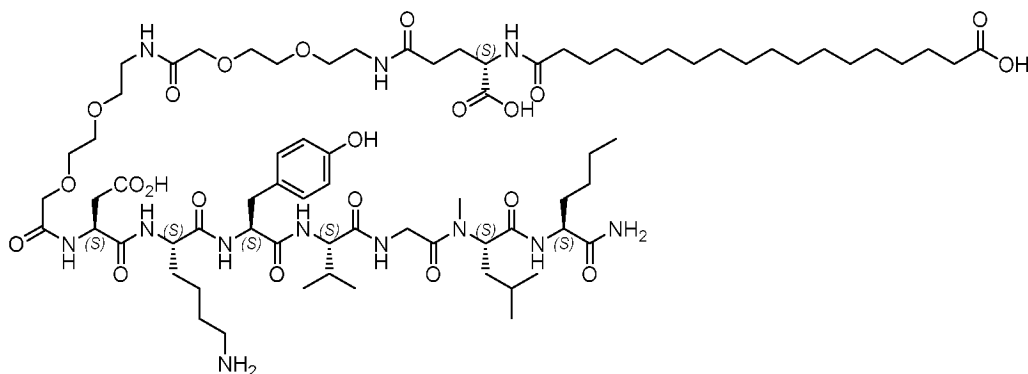
10. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) содержит от 7 до 15 аминокислот, как например, от 7 до 14 аминокислот, как например, от 7 до 13 аминокислот, как например, от 7 до 12 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 10 аминокислот, как например, от 7 до 9 аминокислот, как например, от 7 до 8 аминокислот, предпочтительно где пептид содержит 7 аминокислот.

11. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) состоит из 7 аминокислот общей формулы X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇.

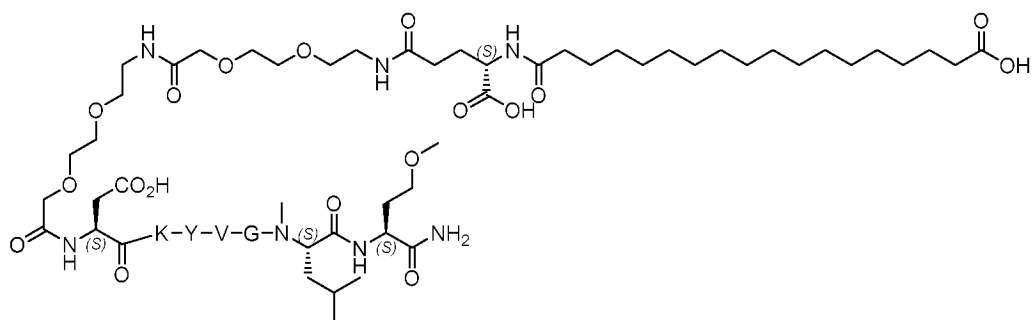
12. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение состоит из последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 57.

13. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где (A) представляет собой Asp, Lys, Tyr, Val, Gly, NmLeu, Metox, NH₂ (соединение 344), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому аспартату (A).

14. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение представляет собой:

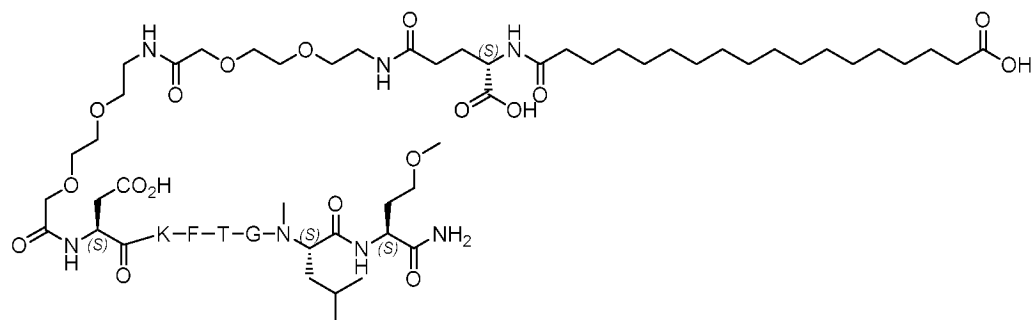


(ID 305),



(ID 344),

или



(ID 383).

15. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение представляет собой агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R), как например, селективный агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R).

Примеры

Пример 1. Определение селективности соединения посредством измерения активности и эффективности путем измерения инозитолтрифосфата (IP₃)

Материалы:

Муравьиная кислота, LiCl, CaCl₂, Трис-HCl, EDTA, HEPES, NaCl, хлорохин и овальбумин (альбумин из куриных) (Sigma Aldrich). Линию клеток почки обезьяны COS-7 получали у ATCC. DMEM 1885, FBS, пенициллин/стрептомицин (P/S) и HBSS получали у Thermo Scientific / Gibco. Прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные тканевой культурой, Costar 96, и сплошные белые 96-луночные планшеты получали у Corning. Покрытые полилизинном шарики силиката иттрия SPA (#RPNQ0010) и мио-[2-³H(N)]-инозитол – (#NET114A[005MC]) получали у Perkin Elmer. Радиорецепторный анализ инозитол-1,4,5-трифосфата [³H] (IP₃-анализ) получали у Perkin Elmer. pcDNA3.1(+), содержащие кодирующие последовательности мРНК человеческих и мышинных тахикининовых рецепторов 1, 2, 3 получали у Genscript (специальный заказ). Синтезированные пептиды разводили в физиологическом растворе + 0,2% (мас./об.) овальбумина.

ID мРНК

Человеческий Tacr1: NM_001058.4

Человеческий Tacr2: NM_001057.3

Человеческий Tacr3: NM_001059.2

Способы:

Индукцированную агонистом активацию рецептора, связанного с G-белком, (GPCR) измеряли с помощью радиорецепторного анализа инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃-анализ). Анализы проводили с использованием клеток COS-7, транзистентно трансфицированных путем трансфекции с фосфатом кальция вектором pcDNA3.1(+), кодирующим один из указанных рецепторов (Genscript). Кратко, ДНК, смешанную с CaCl₂ (2 М) и ТЕ-буфером (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, рН 7,5) по каплям добавляли к 2xHBS (50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ NaH₂PO₄, рН 7,2) и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре (22±2 °С). Смесь и конечную концентрацию 100 мкМ хлорохина добавляли к клеткам и инкубировали в течение 5 часов при 37 °С в стандартных условиях культивирования клеток (10% CO₂) перед заменой среды на свежую среду, содержащую 5 мкл/мл мио-[2-³H(N)]-инозитола (среда для мечения).

IP₃-анализ использует преимущества способности тахикининовых рецепторов индуцировать продукцию вторичного мессенджера инозитолтрифосфата (IP₃) при связывании агониста (лиганда) с клетками, экспрессирующими рецептор, после начального периода мечения ³H-инозитолом. Фактически это означает, что продукцию вторичного мессенджера IP₃ как меру активности рецептора можно оценить путем оценки ³H-активности.

Растворы, применяемые для анализа: буфер для промывки (HBSS), буфер для анализа (HBSS + 10 мМ LiCl и 0,2% мас./об. овальбумина), буфер для лизиса (10 мМ муравьиная кислота) и шарики YSI SPA (12,5 мг/мл в H₂O). Анализ проводили на следующий день после трансфекции. Кратко, среду для мечения отсасывали и планшеты промывали ×1 буфером для промывки перед добавлением 100 мкл буфера для анализа, предварительно инкубировали в течение 30 мин, с последующей инкубацией с агонистом в течение 120 мин, в обоих случаях при 37°С. После инкубации планшеты немедленно помещали на лед, среду для инкубации отсасывали и добавляли по 40 мкл 10 мМ муравьиной кислоты на лунку. Планшеты инкубировали в течение по меньшей мере 30 мин на льду. 60 мкл (1 мг/лунка) шариков YSI SPA/лунка пипетировали в сплошной белый 96-луночный планшет и 35 мкл раствора для лизиса переносили в планшет перед тем, как покрыть планшеты герметичной крышкой и встряхивать в течение 10 мин (максимальная

скорость). Планшеты подвергали центрифугированию и оставляли на 8 часов при комнатной температуре перед подсчетом планшетов на счетчике планшетов MicroBeta (Perkin Elmer).

Пример 2. Определение связывания человеческого сывороточного альбумина (HSA) путем измерения активности рецептора с использованием количественного определения инозитолтрифосфата (IP₃)

Материалы:

Муравьиная кислота, LiCl, CaCl₂, Трис-НСl, EDTA, HEPES, NaCl, NaH₂PO₄, хлорохин, овальбумин (альбумин из куриных) и человеческий сывороточный альбумин (HSA) (Sigma Aldrich). Линию клеток почки обезьяны COS-7 получали у ATCC. DMEM 1885, FBS, пенициллин/стрептомицин (P/S) и HBSS получали у Thermo Scientific / Gibco. Прозрачные 96-луночные планшеты, обработанные тканевой культурой, Costar 96, и сплошные белые 96-луночные планшеты получали у Corning. Покрытые полилизинном шарики силиката иттрия SPA (#RPNQ0010) и мио-[2-³H(N)]-инозитол – (#NET114A[005MC]) получали у Perkin Elmer. Радиорецепторный анализ инозитол-1,4,5-трифосфата [³H] (IP₃-анализ) получали у Perkin Elmer. pcDNA3.1(+), содержащие кодирующие последовательности мРНК человеческих и мышиных тахикининовых рецепторов 1, 2, 3 получали у Genscript (специальный заказ). Синтезированные пептиды разводили в физиологическом растворе + 0,2% (мас./об.) овальбумина.

Человеческий Tacr1: NM_001058.4

Человеческий Tacr2: NM_001057.3

Человеческий Tacr3: NM_001059.2

Способы:

Индукцированную агонистом активацию рецептора, связанного с G-белком, (GPCR) измеряли с помощью радиорецепторного анализа инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃-анализ). Анализы проводили с использованием клеток COS-7, транзистентно трансфицированных путем трансфекции с фосфатом кальция вектором pcDNA3.1(+), кодирующим один из указанных рецепторов (Genscript). Кратко, ДНК, смешанную с CaCl₂ (2 М) и ТЕ-буфером (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, pH 7,5) по каплям добавляли к 2xHBS (50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ NaH₂PO₄, pH 7,2) и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре (22±2 °С). Смесь и конечную концентрацию 100 мкМ хлорохина добавляли к клеткам и инкубировали в течение 5 часов при 37 °С в стандартных условиях культивирования клеток (10% CO₂) перед заменой среды на свежую среду, содержащую 5

мкл/мл мио-[2-³H(N)]-инозитола (среда для мечения).

IP₃-анализ непрямого связывания HSA использует преимущества способности тахикининовых рецепторов индуцировать продукцию вторичного мессенджера инозитолтрифосфата (IP₃) при связывании агониста (лиганда) с клетками, экспрессирующими рецептор, после начального периода мечения ³H-инозитолом. Анализ основан на предположении, что высокое связывание пептида с HSA приведет к низкому рецептор-опосредованному продуцированию вторичного мессенджера IP₃. Таким образом, анализ представляет собой непрямую оценку связывания HSA.

Растворы, применяемые для анализа: буфер для промывки (HBSS), буфер для анализа 0,2% OvAlb (HBSS + 10 мМ LiCl и 0,2% мас./об. овальбумина) или буфер для анализа 1% HSA (HBSS + 10 мМ LiCl и 1% мас./об. HSA), буфер для лизиса (10 мМ муравьиная кислота) и шарики YSI SPA (12,5 мг/мл в H₂O). Анализ проводили на следующий день после трансфекции. Кратко, среду для мечения отсасывали и планшеты промывали ×1 буфером для промывки перед добавлением 100 мкл буфера для анализа 0,2% OvAlb или буфера для анализа 1% HSA, предварительно инкубировали в течение 30 мин, с последующей инкубацией с агонистом в течение 120 мин, в обоих случаях при 37°C. После инкубации планшеты немедленно помещали на лед, среду для инкубации отсасывали и добавляли по 40 мкл 10 мМ муравьиной кислоты на лунку. Планшеты инкубировали в течение по меньшей мере 30 мин на льду. 60 мкл (1 мг/лунка) шариков YSI SPA/лунка пипетировали в сплошной белый 96-луночный планшет и 35 мкл раствора для лизиса переносили в планшет перед тем, как покрыть планшеты герметичной крышкой и встряхивать в течение 10 мин (максимальная скорость). Планшеты подвергали центрифугированию и оставляли на 8 часов при комнатной температуре перед подсчетом планшетов на счетчике планшетов MicroBeta (Perkin Elmer).

Пример 3. Определение связывания пептид-NK2R путем измерения конкурентного связывания ³H-NKA

Материалы:

CaCl₂, Трис-НCl, EDTA, HEPES, NaCl, NaH₂PO₄, хлорохин, овальбумин (альбумин из куриных яиц, MnCl₂·4H₂O и бацитрацин от Sigma Aldrich. Линию клеток почки обезьяны COS-7 получали у ATCC. DMEM 1885, FBS, пенициллин/стрептомицин (P/S), HBSS и 1M Трис/НCl получали у Thermo Scientific/Gibco. Белые/с прозрачным дном 96-луночные планшеты от Costar. ³H-NKA (Novo Nordisk #NNC0392-0000-0497). Ultima Gold XR от Perkin Elmer.

pcDNA3.1(+), содержащие кодирующие последовательности мРНК человеческих и

мышинных тахикининовых рецепторов 1, 2, 3 получали у Genscript (специальный заказ). Синтезированные пептиды разводили в физиологическом растворе + 0,2% (мас./об.) овальбумина (OvAlb).

Человеческий Tacr1: NM_001058.4

Человеческий Tacr2: NM_001057.3

Человеческий Tacr3: NM_001059.2

Способы:

Анализ проводили с использованием клеток COS-7, транзистентно трансфицированных путем трансфекции с фосфатом кальция вектором pcDNA3.1(+), кодирующим один из указанных рецепторов (Genscript). Кратко, ДНК, смешанную с CaCl_2 (2 М) и TE-буфером (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, pH 7,5) по каплям добавляли к 2xHBS (50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ NaH_2PO_4 , pH 7,2) и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре (22 ± 2 °C). Смесь и конечную концентрацию 100 мкМ хлорохина добавляли к клеткам и инкубировали в течение 5 часов при 37 °C в стандартных условиях культивирования клеток (10% CO_2) перед заменой среды на свежую среду.

Анализ связывания ^3H -НКА измеряет связывание пептида с рецептором по конкурентному принципу связывания рецептора между радиоактивно меченой (^3H) НКА (метка) и синтезированными пептидными лигандами на живых клетках, экспрессирующих представляющий интерес рецептор.

Растворы, применяемые для анализа: TKR буфер (50 мМ Tris/HCl pH 7,5, 5 мМ MnCl_2 и 150 мМ NaCl), буфер для промывки (буфер TKR + 0,2% мас./об. OvAlb), буфер для связывания (буфер для промывки + 0,1 мг/мл бацитрацина) и раствор индикатора (буфер для связывания + ~15000 импульсов в минуту/лунка ^3H -индикатор).

Анализ проводили на льду на следующий день после трансфекции. Кратко, поддерживающую среду отсасывали и планшеты промывали $\times 1$ холодным буфером для промывки перед добавлением 100 мкл холодного буфера для связывания и помещали при 4°C для охлаждения планшетов. В холодные планшеты сразу добавляли указанные пептиды (лиганд) с последующим добавлением раствора холодного индикатора (~15000 импульсов в минуту на лунку). Планшеты немедленно доводили до 4°C и инкубировали в течение 4 часов. После инкубации связывание останавливали двукратной промывкой холодным буфером для промывки перед добавлением 225 мкл Ultima Gold XR. Планшеты встряхивали со средней скоростью в течение приблизительно 30 минут и оставляли на ночь при комнатной температуре перед подсчетом планшетов на счетчике планшетов MicroBeta (Perkin Elmer).

Пример 4. Определение активности и эффективности путем измерения циклического аденозинмонофосфата (сАМР)

Материалы:

CaCl₂, Tris-HCl, EDTA, HEPES, NaCl, хлорохин, 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX) и овальбумин (альбумин из куриных яиц) (Sigma Aldrich). Линию клеток почки обезьяны COS-7 получали у ATCC. DMEM 1885, FBS, пенициллин/стрептомицин (P/S) и HBSS получали у Thermo Scientific/Gibco. Сплошные белые 96-луночные планшеты от Corning. Nithunter cAMP анализ от Biologics Discover X. pcDNA3.1(+), содержащие кодирующие последовательности мРНК человеческих и мышинных тахикининовых рецепторов 1, 2, 3 получали у Genscript (специальный заказ). Синтезированные пептиды разводили в физиологическом растворе + 0,2% (мас./об.) овальбумина (OvAlb).

Человеческий Tacr1: NM_001058.4

Человеческий Tacr2: NM_001057.3

Человеческий Tacr3: NM_001059.2

Способы:

В качестве вторичного показателя индуцированной агонистом активации рецептора, связанного с G-белком, (GPCR) циклинаденозинмонофосфат (сАМР) измеряли с помощью анализа Nithunter cAMP от DiscoverX. Анализы проводили с использованием клеток COS-7, временно трансфицированных путем трансфекции с фосфатом кальция вектором pcDNA3.1(+), кодирующим один из указанных рецепторов (Genscript). Кратко, ДНК, смешанную с CaCl₂ (2 М) и ТЕ-буфером (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ EDTA, pH 7,5) по каплям добавляли к 2xHBS (50 мМ HEPES, 280 мМ NaCl, 1,5 мМ NaH₂PO₄, pH 7,2) и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре (22±2 °С). Смесь и конечную концентрацию 100 мкМ хлорохина добавляли к клеткам и инкубировали в течение 5 часов при 37 °С в стандартных условиях культивирования клеток (10% CO₂) перед заменой среды на свежую поддерживающую среду.

В анализе сАМР используется преимущество способности тахикининовых рецепторов индуцировать продукцию вторичного мессенджера сАМР при связывании агониста (лиганда) с клетками, экспрессирующими рецептор. Продукция сАМР возникает в результате связывания рецептора с Gs-белком, хотя связывание с Gq-белком (продукция IP₃) считается первичным сигнальным механизмом тахикининовых рецепторов.

Анализ проводили на следующий день после трансфекции. Кратко, поддерживающую среду отсасывали и планшеты промывали ×1 HBSS перед добавлением буфера для анализа (HBSS + 1 мМ IBMX), предварительно инкубировали в течение 30

минут при 37°C, а затем инкубировали в течение 15 минут с агонистом (лигандом) при 37°C. После инкубации планшеты подвергали лизису клеток и инкубации с анти-cAMP-антителом, как описано производителем. Люминесценцию измеряли с помощью EnVision Multimode Plate Reader от Perkin Elmer.

Пример 5. Синтез и определение характеристик пептидов

Общие способы

Нижеследующее раскрытие относится к способам синтеза пептидов, связанных со смолой (способы SPPS, включая способы удаления защитных групп аминокислот, способы отщепления пептида от смолы и его очистки), а также способы обнаружения и определения характеристик полученного пептида (способы LCMS и UPLC).

Способ SPPS

Используемые Fmoc-защищенные аминокислотные производные были стандартно рекомендованными: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(BOC)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(BOC)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH и Fmoc-Lys(Mtt)-OH, поставляемыми, например, Anaspec, Bachem, Iris Biotech или NovabioChem.

N-концевая аминокислота защищена Boc при альфа-аминогруппе (например, Boc-Asp(OtBu)-OH для пептидов с Asp на N-конце).

Введение заместителя при эpsilon-азоте лизина осуществляли с использованием лизина, защищенного Mtt (Fmoc-Lys(Mtt)-OH). Для введения заместителя использовали соответственно защищенные строительные блоки, такие как Fmoc-8-амино-3,6-диоксаоктановая кислота и Fmoc-Glu-OtBu. Введение фрагмента жирной кислоты достигали с использованием строительных блоков, таких как моно-трет-бутиловый сложный эфир октадекандиовой кислоты.

SPPS проводили на твердофазном синтезаторе пептидов SymphonyX от Protein Technologies (Tucson, AZ 85714 USA) в масштабе 100 мкмоль, 150 мкмоль, 300 мкмоль или 450 мкмоль с использованием 4, 6, 12 или 18-кратного избытка Fmoc-аминокислот (300 мМ в DMF с 300 мМ Охума Pure®) относительно загрузки смолы. Fmoc-PAL AM смолу (Novabiochem, загрузка, например, 0,61 ммоль/г), Rink Amide AM полистирольную смолу (Novabiochem, загрузка, например, 0,64 ммоль/г) или 2-хлортритилхлоридную смолу (загрузка 1,42 ммоль/г) применяли в качестве твердой подложки. Удаление Fmoc-защиты

проводили с использованием 20% пиперидина в DMF. Связывание проводили с использованием 1:1:1:1 аминокислота/(Охума Pure®)/DIC/коллидин в DMF. DCM (1×1,5 мл), и верхние промывки DMF (6×6 мл) проводили между стадиями удаления защиты и связывания. Время связывания в общем составляло 60 минут (в интервале от 60 мин до 8 часов). Некоторые аминокислоты, включая без ограничения Fmoc-Arg(Pbf)-OH и Fmoc-Gly-OH, были «дважды связанными», что означает, что после первого связывания (например, 60 мин) смола истощается и добавляют еще реагенты (аминокислота, Охума Pure®, DIC и коллидин) и смеси снова позволяют реагировать (например, 60 мин). Группу Mtt удаляли посредством первой промывки смолы с DCM (1 × 1 мин) с последующим суспендированием смолы в HFIP/DCM/TIS (75/23/2) (1 × 5 мин). Смолу промывали с DCM и суспендировали в HFIP/DCM/TIS (75/23/2) (2 × 25 с промежуточной промывкой DCM) с последующей последовательной промывкой DMF(1×), DCM(4×), DMF(2×), пиперидин/DMF (20:80), DMF(1×), DCM(1×), DMF(6×).

Отщепление от смолы

После синтеза смолу промывали DCM и пептид отщепляли от смолы посредством 2-3-часовой обработки TFA/TIS/вода (95/2,5/2,5) с последующим осаждением диэтиловым простым эфиром. Осадок промывали диэтиловым простым эфиром.

Очистка

Неочищенный пептид растворяли в подходящей смеси растворителей (такой как, например, 10/20/70 уксусная кислота/MeCN/вода) и очищали посредством препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой (Waters Prep) на колонке, содержащей C18-силикагель. Элюцию проводили с возрастающим градиентом MeCN в воде, содержащей 0,1% TFA, или с возрастающим градиентом 80:20 MeCN:MQ-вода в фосфатном буфере (20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 10% MeCN в MQ при значении pH 7,2). Релевантные фракции анализировали комбинацией способов UPLC и LCMS, и подходящие фракции объединяли и лиофилизировали.

Способы обнаружения и определения характеристик

LCMS способы

LCMS проводили на установке, состоящей из системы Waters Acquity UPLC и масс-спектрометра LCT Premier XE от Micromass. Анализ проводили при комнатной температуре путем введения соответствующего объема образца (предпочтительно 2-10 мкл) в колонку (Waters Acquity UPLC BEH, C-18, 1,7 мкм, 2,1 мм × 50 мм), которую элюировали градиентом A, B (и D).

Способ: LCMS34

Элюенты: А: 0,1% Муравьиная кислота в MQ-воде. В: 0,1% Муравьиная кислота в ацетонитриле. Градиент: Линейный 5% - 95% ацетонитрила в течение 4,0 мин при 0,4 мл/мин. Обнаружение: 214 нм (аналоговый выход TUV (настраиваемый УФ-детектор)), режим ионизации MS: API-ES (положительный режим). Сканирование: 100-2000 атомных единиц массы (альтернативно 500-2000 атомных единиц массы), шаг 0,1 атомных единиц массы.

Способ: LCMS43

Элюенты: А: MQ-вода. В: ацетонитрил D: 100 mM ацетат триэтиламмония в воде: ацетонитрил 1:1 (значение pH довели до 7,8 с помощью Et₃N + AcOH). Градиент: Линейный 0% - 97,5% ацетонитрил + изократный 2,5% D в течение 4,0 мин 0,4 мл/мин. Обнаружение: 214 нм (аналоговый выход TUV (настраиваемый УФ-детектор)), режим ионизации MS: API-ES (отрицательный режим). Сканирование: 100-2000 атомных единиц массы (альтернативно 500-2000 атомных единиц массы), шаг 0,1 атомных единиц массы.

Способы UPLC

Обращенно-фазовый анализ проводили с использованием системы Waters UPLC, оснащенной двухдиапазонным детектором. УФ-детектирование при 214 нм проводили с использованием колонки ACQUITY UPLC BEH, C18, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм. Систему UPLC соединяли с двумя резервуарами для элюента А и В.

Способ UPLC01:

Температура колонки: 40 °С. Элюенты: А: 99,95% MQ-вода, 0,05% TFA, В: 99,95% CH₃CN, 0,05% TFA. Применяли следующий линейный градиент: 95% А, 5% В - 40% А, 60% В за 16 минут при скорости потока 0,40 мл/мин.

Способ UPLC02:

Температура колонки: 40 °С. Элюенты: А: 99,95% MQ-вода, 0,05% TFA, В: 99,95% CH₃CN, 0,05% TFA. Применяли следующий линейный градиент: 95% А, 5% В - 5% А, 95% В за 16 минут при скорости потока 0,40 мл/мин.

Способ UPLC60:

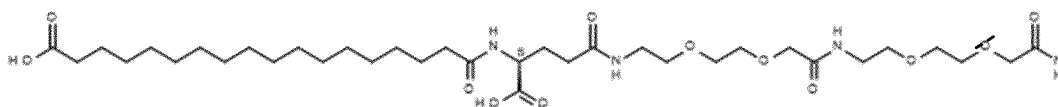
Температура колонки: 60 °С. Элюенты: А: 0,02 mM Na₂SO₄, 0,002 mM Na₂HPO₄, 0,002 mM NaHPO₄, В: 70% CH₃CN в MQ-воде. Ступенчатый градиент: 10-20% В за 3 минуты, затем 20-50% В за 17 минут, затем 50-80% В за 1 минуту. Время выполнения ступенчатого градиента: 21 минут при скорости потока 0,40 мл/мин.

Способ: UPLC61:

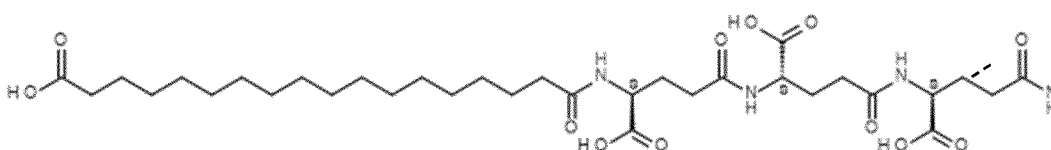
Температура колонки: 60 °С. Элюенты: А: 0,02 mM Na₂SO₄, 0,002 mM Na₂HPO₄, 0,002 mM NaHPO₄, В: 70% CH₃CN в MQ-воде. Ступенчатый градиент: 10-20% В за 3

минуты, затем 20-80% В за 17 минут, затем 80-90% В за 1 минуту. Время выполнения ступенчатого градиента: 21 минут при скорости потока 0,40 мл/мин.

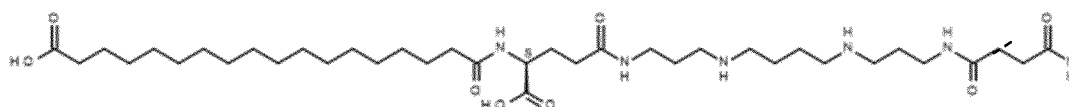
Пример 6. Структуры конъюгированных фрагментов



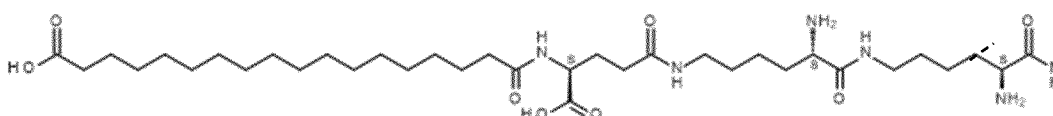
Семаглутидный протрактор: 2xOEG-гаммаGlu-C18 двухосновная кислота.
Нейтральный линкер, называемый «Conj-Neu-C18DA».



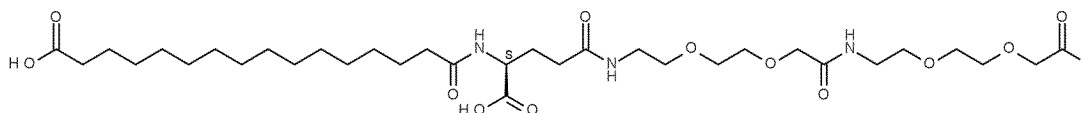
3xгамма-Glu-C18 двухосновная кислота. Отрицательно заряженный линкер, называемый «Conj-Neg».



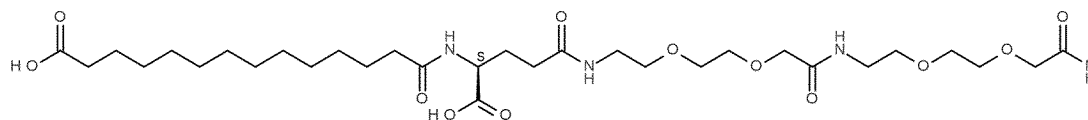
Glu-C18 двухосновная кислота. Положительно заряженный линкер, называемый «Conj-Pos1».



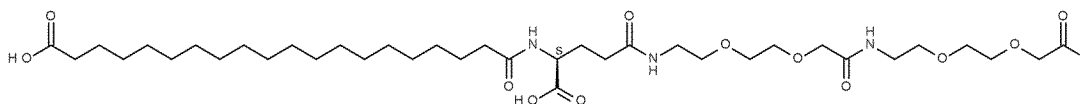
Glu-C18 двухосновная кислота. Положительно заряженный линкер, называемый «Conj-Pos2».



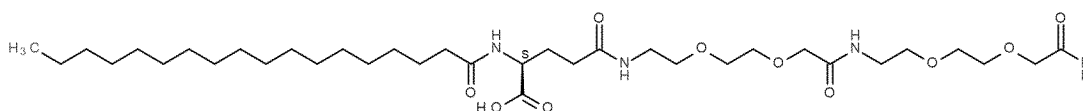
2xOEG-гамма-Glu-C16 двухосновная кислота



2xOEG-гамма-Glu-C14 двухосновная кислота



2xOEG-гамма-Glu-C20 двухосновная кислота



2xOEG-гамма-Glu-C18 одноосновная кислота

Пример 7. Исследование аминокислотных замен в аналогах NKA(4-10) в отношении активации, передачи сигнала и селективности NK2R

Мутации в положении 4 (X₁)

Селективность и активацию измеряли посредством IP₃-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1. Gs-связывание исследовали посредством накопления cAMP, как описано в примере 4. Связывание измеряли посредством конкурентного связывания ³H-NKA, как описано в примере 3.

Результаты:

ID	Последовательность	hNK1R, IP ₃		hNK2R, IP ₃		hNK3, IP ₃		hNK2R, cAMP		hNK2R, связывание
		EC50 (нМ)	Эффективность (%)	EC50 (нМ)	Эффективность (%)	EC50 (нМ)	Эффективность (%)	EC50 (нМ)	Эффективность (%)	
304*	Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,	34	80	2,1	90	66	65	ND	ND	ND

Nle,NH2										
335 *Glu,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,	36	70	1,6	80	113	100	ND	ND	ND	
Nle,NH2										
305 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,	520	30	3,7	80	~730	10	0,7	50	21	
Nle,NH2										
336 *Glu,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,	~26,000	30	4,0	80	~3800	10	-	0	80	
Nle,NH2										
306 *Asp,Arg,Phe,Val,Gly,NmLeu,	19	80	2,0	90	36	65	ND	ND	ND	
Nle,NH2										
337 *Glu,Arg,Phe,Val,Gly,NmLeu,	23	70	4,0	80	43	100	ND	ND	ND	
Nle,NH2										

Таблица 7. Сравнение селективности и активации рецептора соединений 304, 335, 305, 336, 306 и 337. Положение протрактора при аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*». Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Данные представлены как EC50 или эффективность, вычисленная как нелинейная регрессия с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение $\log(\text{концентрация})$ в Graphpad Prism 8. ND: не определено.

Краткий обзор результатов

- Замена Asp4 на Glu4 не изменяет активацию IP₃ hNK2R у аналогов NKA(4-10) (соединения: 304-337).
- Замена Asp4 на Glu4 не изменяет селективность в отношении hNK2R у Tyr-аналога, но снижает аффинность связывания (соединения: 305 и 336).
- Glu4 Tyr-аналог не активирует Gs (соединение 336).

Мутации в положении 5 (X₂)

Селективность и активацию измеряли посредством IP₃-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1.

Результаты:

ID Последовательность	hNK1R,		hNK2R,		hNK3,	
	IP ₃	Эффектив-	IP ₃	Эффектив-	IP ₃	Эффектив-
	EC50	ность (%)	EC50	ность (%)	EC50	ность (%)
	(нМ)		(нМ)		(нМ)	
304 *Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	34	80	2,1	90	66	65

304	* Asp,Lys,Phe, Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	40	80	2,1	90	66	60	2,3	100	25
305	* Asp,Lys,Tyr, Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	520	30	3,7	80	~720	0	0,7	50	210
361	* Asp,Lys,3-OH-Phe, Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	200	70	2,3	100	~47,00	60	ND	ND	ND
362	* Asp,Lys,Pro, Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	-	0	-	0	-	0	ND	ND	ND
363	* Asp,Lys,Val, Tyr,Gly,NmLeu, Nle,NH2	-	0	-	0	-	0	ND	ND	ND
330	* Asp,Lys,4-I-Phe, Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	~170	40	-	0	-	0	ND	ND	ND
356	* Asp,Lys,dPhe, Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	-	0	-	0	-	0	ND	ND	ND

Таблица 9. Сравнение селективности и активации рецептора соединений 304, 305, 361, 362, 363, 330 и 356. NmLeu представляет собой *L-N*-метиллейцин. Положение протрактора при аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*». Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Данные представлены как EC50 или эффективность, вычисленная как нелинейная регрессия с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8. ND: не определено.

Краткий обзор результатов

- Замена Pheб на Tyr6 у аналогов NKA(4-10) способствует NK2R-селективности с небольшой потерей эффективности, эффективности связывания с рецептором и Gs-связывания (соединения: 304 и 305).
- Изменение положения гидроксильной группы в фенильной группе тирозина от положения 4 на положение 3 в фениле Pheб приводит к снижению селективности в отношении NK2R и восстановлению эффективности NK1R до уровней Phe-аналога (соединения: 304, 305 и 361).
- Введение пролина или переключение Tyr6 и Val7 вызывает полную потерю активации рецептора для NK1-3R (соединения: 362 и 363).
- Замена I-4-Phe и dPhe полностью нарушает активацию NK2R (соединения: 330 и 356).

Мутации в положении 7 (X4)

Селективность и активацию измеряли посредством IP3-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1. Gs-связывание исследовали посредством накопления сАМР, как описано в примере 4. Связывание измеряли посредством конкурентного связывания 3Н-НКА, как описано в примере 3.

Результаты

ID	Последовательность	hNK1R, IP ₃		hNK2R, IP ₃		hNK3, IP ₃		hNK2R, сАМР		hNK2R, связывание
		EC50 (нМ)	Эффек-тивность (%)	Эффек-тивность (%)	Эффек-тивность (%)	Эффек-тивность (%)	Эффек-тивность (%)	Эффек-тивность (%)		
314	*Glu,Lys,Tyr,Arg,Gly, NmLeu,Nle,NH2	-	0	~3100	45	-	0			
315	*Glu,Lys,Phe,Arg,Gly, NmLeu,Nle,NH2	-	0	47	60	-	0			
335	*Glu,Lys,Phe,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	36	72	1,6	80	113	100			
305	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	520	30	3,7	100	~720	0	0,7	50	210
348	*Asp,Lys,Tyr,Ile(S),Gly, NmLeu,Nle,NH2	191	50	3,5	100	-	0	-	-	1400
351	*Asp,Lys,Tyr,Ile(R),Gly, NmLeu,Nle,NH2	950	50	14	100	-	0	-	-	-
304	*Asp,Lys,Phe,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	34	80	2,1	100	66	60	ND	ND	ND
387	*Asp,Lys,Phe,Thr,Gly, NmLeu,Nle,NH2	5,5	100	3,3	100	34	100	ND	ND	ND
336	*Glu,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	~26000	25	4,0	75	-	0			
397	*Glu,Lys,Phe,Thr,Gly, NmLeu,Nle,NH2	-	0	28	75	-	0			
344	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Metox,NH2	~160	30	2,2	90	~24000	30	28	96	94
366	*Asp,Lys,Tyr,Thr,Gly,	-	0	12	100	-	0	~120	80	~104

NmLeu, Metox, NH ₂										
381	*Glu, Lys, Tyr, Thr, Gly,	-	0	9,3	85	-	0			
NmLeu, Metox, NH ₂										
382	*Glu, Lys, Tyr, Val, Gly,	~3800	30	3,7	95	-	20			
NmLeu, Metox, NH ₂										
383	*Asp, Lys, Phe, Thr, Gly,	290	50	1,6	95	313	60	~11	89	11
NmLeu, Metox, NH ₂										
384	*Asp, Lys, Phe, Val, Gly,	16	80	0,9	95	10	85			
NmLeu, Metox, NH ₂										
386	*Asp, Lys, Tyr, Ser, Gly,	-	0	29	63	-	0			
NmLeu, Nle, NH ₂										

Таблица 10. Сравнение селективности и активации рецептора соединений 314, 315, 335, 305, 348, 351, 304, 387, 336, 397, 344, 366, 381, 382, 383, 384 и 386. Положение протрактора при аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*». Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Данные представлены как EC₅₀ или эффективность, вычисленная как нелинейная регрессия с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8. ND: не определено.

Краткий обзор результатов

- Замена на аргинин в положении 7 вызывает потерю свойств активации рецептора у аналогов NKA(4-10) (соединения: 314, 315, 335 и 336).
- Замена на изолейцин (S-изоформа) в положении 7 возможна и не меняет активность, эффективность и селективность аналогов Tug6 NKA(4-10). Однако, изолейцин (R-изоформа) снижает активность NK2R. Обе замены на изолейцин снижают передачу сигналов Gs и способность связывания рецептора (соединения: 348 и 351).
- Замена на треонин в аналогах NKA(4-10) снижает активность NK2R, но может действовать как направляющая селективности у аналогов Phe6-NKA(4-10). Thr7 способствует связыванию с рецептором и поддерживает активацию Gs подобно NKA (соединения: 304, 387, 305, 397, 344, 366, 381, 382, 383, 384).
- Замена на серин в положении 7 снижает активность и эффективность NK2R, не влияя на селективность (соединения: 305 и 386).

Мутации в положении 8 (X₅)

Селективность и активацию измеряли посредством IP3-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1. Связывание измеряли посредством конкурентного связывания 3H-NKA, как описано в примере 3.

ID Последовательность	hNK1R, IP ₃		hNK2R, IP ₃		hNK3, IP ₃		hNK2R, связыва- ние
	EC50 (нМ)	Эффек- тивность (%)	EC50 (нМ)	Эффек- тивность (%)	EC50 (нМ)	Эффек- тивность (%)	
310 *Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,bAla,NmLeu,Nle, NH ₂	-	0	45	65	-	80	
312 *Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle, NH ₂	~178	44	25	65	513	80	
322 *Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,bAla,Leu,Nle, NH ₂	-	0	~130	53	~160	80	
308 *Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,Gly,Leu,Nle, NH ₂	~164	60	96	65	1000	93	
389 *Asp,Lys,Phe,Val,Gly,Leu,Nle,NH ₂	16	108	2,8	83	35	100	
373 *Asp,Lys,Phe,Val,Aib,Leu,Nle,NH ₂	~136	66	4,3	89	-	0	
402 *Asp,Lys,Tyr,Val,dSer,Leu,Nle,NH ₂	-	0	15	77	-	0	121
392 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,Leu,Nle,NH ₂	205	52	5,4	72	-	0	25
385 *Asp,Lys,Phe,Val,dSer,Leu,Nle,NH ₂	-	0	4,5	46	-	0	
396 *Asp,Lys,Tyr,Val,dSer,Leu,Metox,NH ₂	-	0	20	92	-	0	316
393 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,Leu,Metox,NH ₂	342	52	10	100	-	36	40

Таблица 11. Сравнение селективности и активации рецептора соединений 310, 312, 322, 308, 389, 373, 402, 392, 385, 396 и 393. Положение протрактора при аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*». Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Данные представлены как EC50 или эффективность, вычисленная как нелинейная регрессия с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8. ND: не определено.

Краткий обзор результатов

- Замена на бета-аланин у NKA(2-10) способствует селективности в отношении NK2- NK3R, но снижает активность и эффективность NK2R (соединения: 310, 312, 322 и 308).
- Замена Aib8 способствует селективности у аналогов Phe6-NKA(4-10) (соединения: 389 и 373).
- Замена d-Ser в положении 8 способствует селективности у аналогов NKA(4-

10) с эндогенной основной цепью NKA(4-10), а также Phe6- и Tug6-NKA(4-10) аналогов, но снижает аффинность NK2R (соединения: 389, 402, 392, 385, 396, 393).

Мутации в положении 9 (X6)

Селективность и активацию измеряли посредством IP₃-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1.

ID Последовательность	hNK1R, IP ₃		hNK2R, IP ₃		hNK3, IP ₃	
	EC50 Эффек- (нМ) тивность (%)		EC50 Эффек- (нМ) тивность (%)		EC50 Эффек- (нМ) тивность (%)	
304 *Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	34	80	2,1	100	65	100
389 *Asp,Lys,Phe,Val,Gly,Leu,Nle,NH2	15	100	2,9	80	35	60
305 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	520	30	3,7	80	~730	0
392 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,Leu,Nle,NH2	200	30	5,4	70	-	0
344 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Metox,NH2 -		50	3,1	100	-	30
393 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,Leu,Metox,NH2	3400	50	10	100	-	30

Таблица 12. Сравнение селективности и активации рецептора соединений 304, 389, 305, 392, 344 и 393. Положение протрактора при аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*». Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Данные представлены как EC50 или эффективность, вычисленная как нелинейная регрессия с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8. ND: не определено.

Краткий обзор результатов

- N-метил-лейцин индуцирует умеренное увеличение активности hNK2R для аналогов NKA(4-10) (соединения: 304-393).
- N-Me-Leu индуцирует селективность в отношении NK2R у аналогов NKA(4-10) (соединения: 304-393).

Мутации в положении 10 (X7)

Селективность и активацию измеряли посредством IP₃-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1. Gs-связывание исследовали посредством накопления сАМР, как описано в примере 4. Связывание измеряли посредством конкурентного связывания ³H-NKA, как описано в примере 3.

ID Последовательность	hNK1R, IP ₃		hNK2R, IP ₃		hNK3, IP ₃		hNK2R, сAMP		hNK2R, связывание
	EC50 (нМ)	Эффек- тив- ность (%)	EC50 (нМ)	Эффек- тив- ность (%)	EC50 (нМ)	Эффек- тив- ность (%)	EC50 (нМ)	Эффек- тив- ность (%)	EC50 (нМ)
316 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Met,NH ₂	20	100	12	120	~160	50	20	100	41
305 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH ₂	-	~30	4	100	-	40	~0,8	70	~100
344 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Metox,NH ₂	-	~30	5	110	~170	0	28	100	90
369 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,4-F-Phe,NH ₂	~250	40	1,7	90	~190	25	54	80	76
353 *Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Phe,NH ₂	-	20	2,5	90	-	0	~1,3	50	27
313 *Asp:Lys:Tyr:Val:Gly: NmLeu:cHexAla:NH ₂	-	20	23	70	-	0	ND	ND	ND
370 *Asp:Lys:Phe:Val:Gly: NmLeu:4-MeOPhe:NH ₂	-	20	10	90	-	0	ND	ND	ND
395 *Asp,Lys,Tyr,Val,Aib,Leu, Nle,NH ₂	-	0	9	68	-	0	-	0	~104
394 *Asp,Lys,Tyr,Val,Aib,Leu, Metox,NH ₂	~940	35	5	90	-	0	306	100	~108

Таблица 13. Сравнение селективности и активации рецептора соединений 316, 305, 344, 369, 353, 313, 370, 395 и 394. cHexAla представляет собой L-циклогексилаланин. 4-MeOPhe представляет собой L-4-Метоксифенилаланин. Положение протрактора при аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*». Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Данные представлены как EC50 или эффективность, вычисленная как нелинейная регрессия с помощью сигмоидальной нелинейности, 4PL, X представляет собой уравнение log(концентрация) в Graphpad Prism 8. ND: не определено.

Краткий обзор результатов

- Метионин в положении 10 улучшает активацию и связывание NK2R по сравнению с норлейцином и метоксинином. Однако метоксинин и норлейцин обеспечивают лучшую селективность, причем аналоги метоксинина более эффективны по сравнению с аналогами норлейцина (соединения: 316, 305, 344, 394 и 395).

- Замена метионина на 4F-Phe возможна при сохранении селективности, активности, передачи сигнала и связывания (соединения: 313, 353, 369 и 370).

Пример 8. Материалы и способы для *in vivo* исследований

Материалы:

NaH₂PO₄•H₂O, Na₂HPO₄•2H₂O, пропиленгликоль, текущая диета для крыс и мышей (обычный корм, #1320, Altromin), C57BL/6NRj мыши (Janvier Labs), диета с высоким содержанием жиров (HFD) с 60% энергии из жира (#D12492, Research Diets Inc.), пептидные аналоги (Novo Nordisk), d-глюкоза (Sigma), инсулин (Novo Nordisk), стерильный физиологический раствор (Apoteket), Tween-80 (Sigma), лоперамид (Sigma), глюкометр и полоски для измерения глюкозы (Bayer) и Promethion System (Sable Systems International) для оценки метаболической и поведенческой информации.

Жидкостная хроматография и масс-спектрометрия с временем прохода (TF-LC-MS): этанол, метанол, ацетонитрил, муравьиная кислота, milli-q-вода, TurboFlow Cyclone колонка 0,5×50 мм, Aeris Peptide XB-C18 2,1×50 мм (3,6 мкм), тройной квадрупольный масс-спектрометр Thermo TSQ Altis.

Жидкостная хроматография и масс-спектрометрия с идентификацией метаболита (MetID-LC-MS): метанол, ацетонитрил, муравьиная кислота, milli-q-вода, Water Acquity UPLC Protein BEH C4 2,1×50 мм 300Å (1,7 мкм), Bruker MaXis QTOF.

In vivo буфер для пептидных аналогов: 8 mM фосфат и 240 mM пропиленгликоль, pH 8,2.

In vivo для лоперамида: физиологический раствор с добавлением 1 % (об./об.) Tween-80.

Способы:

Животных содержали с доступом к текущей диете с момента отнятия от груди до приблизительно 6-10-недельного возраста. В любое время, кроме голодания, мыши имели свободный доступ к пище и воде с 12-часовым циклом свет-темнота и температурой 22-24 градуса Цельсия. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами Датской инспекции животных.

Для исследований с использованием мышей с ожирением, вызванным диетой, мышей кормили HFD в течение по меньшей мере 20 недель до эксперимента. В частности, для мышей, проходящих тесты на толерантность к глюкозе и инсулину, отбирали мышей весом более 45 г.

Непрямую калориметрию использовали для оценки способности отдельных

пептидных аналогов зависимым от дозы образом увеличивать расход энергии (EE), использовали метаболические клетки и непрямую калориметрию, измеряемую с помощью системы Promethion. С этой целью потребление кислорода использовали в качестве косвенной оценки EE. Предпочтение субстрата (жир или углевод) оценивали с использованием коэффициента дыхательного обмена (RER). Параллельно записывали поведенческую информацию, такую как пройденное расстояние, потребление воды и пищи.

Перед экспериментом мышей DIO переводили в клетки для обучения по меньшей мере на 10 дней (5 дней вне и по меньшей мере 5 дней в модуле газоанализатора Sable Systems) для акклиматизации. Для всех испытаний соединений *in vivo* для оценки EE мышам вводили подкожные инъекции между 14 и 16 часами дня.

Фармакокинетика: для оценки периода полужизни отдельных пептидных аналогов *in vivo* использовали худых мышей дикого типа в возрасте приблизительно 10 недель, которым однократно вводили пептидный аналог. Для каждого момента времени образца использовали 3-4 мыши, и кровь брали из поднижнечелюстной вены в указанные моменты времени после инъекции. Перед инъекцией мышам давали свободный доступ к стандартной диете. Мышам путем подкожной инъекции вводили 0,5 мг/кг пептидного аналога в объеме 2 мл/кг.

Количество пептидного аналога и метаболита (метаболитов), присутствующих в образцах крови, измеряли с помощью TF-LC-MS и MetID-LC-MS, соответственно.

TF-LC-MS:

Получение образца: один объем плазмы осаждали тремя объемами этанола (с внутренним стандартом). Смесь центрифугировали при 13000 g в течение 20 мин. Один объем супернатанта разбавляли двумя объемами воды Milli-Q (1% муравьиной кислоты).

Калибровочная кривая: пептидный аналог добавляли в плазму контрольных мышей. Диапазон: от 0,5 до 2000 нМ (линейный $1/\times 2$).

Хроматография, подвижная фаза: Подвижная фаза А: 5% (50/50 метанол/ацетонитрил) + 95% Milli-Q + 1% муравьиная кислота. Подвижная фаза В: 5% Milli-Q + 95% (50/50 метанол/ацетонитрил) + 1% муравьиная кислота.

Колонки: TurboFlow Cyclone 0,5×50 мм и Aeris Peptide XB-C18 2,1×50 мм (3,6 мкм)

Масс-спектрометрия: Thermo TSQ Altis тройной квадрупольный, режим положительной ионизации электрораспылением, режим.

MetID-LC-MS:

Получение образца: один объем плазмы осаждали тремя объемами метанола. Смесь центрифугировали при 13000 g в течение 20 мин. Один объем супернатанта разбавляли двумя объемами воды Milli-Q (1% муравьиной кислоты)

Калибровочная кривая: пептидный аналог добавляли в плазму контрольных мышей.
Диапазон: 20, 200 и 2000 нМ (линейный 1/x2)

Хроматография: подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде Milli-Q.
Подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле.

Колонка: Water Acquity UPLC Protein BEH C4 2,1×50 мм 300Å (1,7 мкм)

Масс-спектрометрия: Bruker MaXis QTOF, режим положительной ионизации электрораспылением

Полное сканирование (m/z от 300 до 1800) и MS/MS.

Скрининг расхода энергии: после привыкания мышам подкожно вводили 0,5 мг/кг пептидного аналога в объеме 2 мл/кг. Мышам вводили инъекции через день (q.a.d.) и вводили в общей сложности две инъекции. Оценивали ЕЕ и рассчитывали увеличение по сравнению со средой как процент от среднего потребления кислорода в течение 30-часового периода после инъекции. Перед инъекцией пептидные аналоги растворяли до концентрации 0,25 мг/мл в буфере *in vivo*.

Расход энергии и фармакодинамика потери веса: оценивали способность отдельных пептидных аналогов зависимым от дозы образом повышать ЕЕ с помощью непрямой калориметрии у мышей DIO. Массу тела контролировали с начала привыкания до конца эксперимента. После привыкания мышам вводили ежедневные инъекции аналогов NKA(4-10) в четырех различных дозах или среду путем ежедневных подкожных инъекций в течение девяти дней.

ЕЕ, массу тела, потребление пищи, потребление воды и дистанцию ходьбы наблюдали в течение всех 9 дней. Увеличение ЕЕ по сравнению со средой рассчитывали как процент от среднего потребления кислорода в течение 30-часового периода после инъекции. Перед инъекцией пептидные аналоги растворяли и разбавляли буфером *in vivo*. Для того, чтобы принять во внимание различные периоды полужизни тестируемых соединений, дозы для каждого соединения рассчитывали на основе индивидуальных рк-профилей данного соединения. Целевые AUC для каждого соединения рассчитывали относительно соединения 305, как показано ниже, чтобы достичь той же AUC тестируемых соединений.

305 рК доза: 330 нмоль/кг

305 C_{max}: 3453 нМ

305 AUC: 28771

Тест на толерантность к инсулину: влияние на толерантность к инсулину определяли с помощью интраперитонеального теста толерантности к инсулину (ipITT) через 24 часа после однократной подкожной инъекции NK2R-селективного аналога мышам

DIO. В день эксперимента мыши голодали за два часа до введения 1,5 ЕД/кг инсулина, разведенного в физиологическом растворе (0,2 мл/кг) посредством внутривентриальной инъекции. Изменение уровня глюкозы контролировали с помощью глюкометра.

Тест на толерантность к глюкозе: влияние на толерантность к глюкозе определяли с помощью интраперитонеального теста толерантности к глюкозе (ipGTT) через 24 часа после однократной подкожной инъекции NK2R-селективного аналога мышам DIO. В день эксперимента мыши голодали за четыре часа до введения 1 г/кг глюкозы, разведенной в физиологическом растворе (0,1 мл/кг) посредством внутривентриальной инъекции. Изменение уровня глюкозы контролировали с помощью глюкометра.

Тест на дисфункциональное опорожнение: для того, чтобы исследовать влияние на дисфункциональное опорожнение вызывали запор у худых мышей дикого типа, самцов и самок, с помощью лоперамида (5 мг/кг). Через 30 минут после введения через зонд мышам подкожно вводили либо среду, либо 130, либо 260, а самцам также 325 нмоль/кг EB344. Через 6 часов после введения лоперамида через желудочный зонд мышам удаляли из клетки и подсчитывали количество шариков кала.

Пример 9. Исследование положения и состава «конъюгированного фрагмента» на аналогах NKA и NKA(4-10) в отношении активации, передачи сигналов и селективности NK2R

Положение и состав «конъюгированного фрагмента», т.е. «протрактора», исследовали на эндогенных и NK2R-селективных аналогах NKA(4-10).

Положение протрактора рассматривали в N-концевой области аналогов NKA(4-10). Исследовали заряд линкера между пептидной основной цепью и жирной кислотой. Исследовали соединения жирных кислот.

Селективность и активацию измеряли посредством IP3-анализа на человеческих NK1-, NK2- и NK3R, как описано в примере 1. Gs-связывание исследовали посредством накопления cAMP, как описано в примере 4. Связывание измеряли посредством конкурентного связывания 3H-NKA, как описано в примере 3. Связывание альбумина определяли по активации рецептора с использованием анализа IP3 в присутствии или в отсутствие 1% человеческого сывороточного альбумина, как описано в примере 2. Расход энергии измеряли у мышей с ожирением, вызванным диетой, помещенных в метаболические клетки, как описано в примере 8. Фармакокинетику и концентрацию измеряли в плазме худых мышей, получавших соединение, как описано в примере 8.

ID	Последовательность	Протрактор	hNK1R, IP ₃		hNK2R, IP ₃		hNK3, IP ₃	
			EC50 (нМ)	Эффективность (%)	EC50 (нМ)	Эффективность (%)	EC50 (нМ)	Эффективность (%)
301	**Asp,Lys*,Phe,Val,Gly,NmLeu, Met,NH ₂	* представляет собой Conj-Neu-C18DA & ** представляет собой ацетил	~1500	64	38	63	160	85
302	*Asp,Lys*,Phe,Val,Gly,NmLeu, Met,NH ₂	* представляет собой Conj-Neu-C18DA	-	0	-	52	~2200	65
304	*Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH ₂	* представляет собой Conj-Neu-C18DA	12-250	80-85	1-11	80-90	60-~7000	85-100
305	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH ₂	* представляет собой Conj-Neu-C18DA	450-3500	17-50	2,2-13	70-75	-	0
307	Asp,Lys*,Phe,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH ₂	* представляет собой Conj-Neu-C18DA	-	64	24	80	~12000	85
318	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH ₂	* представляет собой Conj-Pos2-C18DA	~780	17	44	85	-	0
319	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH ₂	* представляет собой Conj-Neg-C18DA	-	0	~220	40	-	0
321	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH ₂	* представляет собой Conj-Pos1-C18DA	~170	45	90	70	-	0
334	Asp,Lys*,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle-NH ₂	* представляет собой Conj-Neg-C18DA	-	0	-	0	~26000	25
344	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Metox,NH ₂	* представляет собой Conj-Neu-C18DA	-	30	3,2	100	-	30
367	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,	* представляет	~31000	20	5,6	75	-	0

	Nle,NH2	собой Conj-Neu-C16DA						
368	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	* представляет собой Conj-Neu-C14DA	-	0	19	70	-	0
374	Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	Нет протрактора	200	50	5,8	90	-	0
375	Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	Нет протрактора	12	110	0,5	100	~50000	35
380	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	* представляет собой Conj-Neu-C20DA	58	20	1,5	90	~160	30
390	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Nle,NH2	* представляет собой Conj-Neu-C18MA	3,9	88	1	100	14	100
391	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu, Metox,NH2	* представляет собой Conj-Neu-C18MA	3,4	100	0,9	90	4	100

Таблица 14. Сравнение состава транспорта по активности рецептора и селективности для NK2R-селективных аналогов NKA(4-10). Положение протракторов в аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*», а структуры протракторов/конъюгированных фрагментов приведены в примере 6. Conj: конъюгированный; Neu: нейтральный заряд; Pos: положительный заряд; Neg: отрицательный заряд; MA: одноосновная кислота; DA: двухосновная кислота. Cxx относится к длине атомов углерода в липиде, т.е. C18 содержит восемнадцать атомов углерода.

ID	Последовательность	Протрактор	hNK2R, связывание				In vivo эффективность		
			альбумина	Эффе	Эффе	Эффе	Концентр	Пер	Расход
			EC50 (нМ) – овалбумин	Эффе – овалбумин (%)	EC50 (нМ) – овалбумин (%)	Эффе – овалбумин (%)	Концентрация в плазме [2ч/26ч] (нМ)	Период жизни (ч)	Расход энергии (в процентах от среды; на основе 30-

					ый альбу мин	сывор оточн ый альбу мин			часового среднего vO2)
305	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	* представляет собой Conj- Neu-C18DA	3,7	83	260	45-51	5364/183	5,5	9
318	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	* представляет собой Conj- Pos2-C18DA	6,7	77	1100	42	237/BLLQ	-	0
321	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	* представляет собой Conj- Pos1-C18DA	11	70	-	30	2266/763	-	5
344	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Metox,NH2	* представляет собой Conj- Neu-C18DA	3,1	95	260	60	-	10,3	-
390	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Nle,NH2	* представляет собой Conj- Neu-C18MA	1	100	0,7	90	-	1,7	-
391	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly, NmLeu,Metox,NH2	* представляет собой Conj- Neu-C18MA	0,9	100	0,6	90	-	-	-

Таблица 15. Сравнение влияния состава протрактора на NK2R-селективные аналоги NKA(4-10) на связывание альбумина *in vitro* и концентрации и фармакокинетики соединения *in vivo* на расход энергии *in vivo*. Положение протракторов в аминокислотной последовательности отмечено звездочкой «*», а структуры протракторов/конъюгированных фрагментов приведены в примере 6. BLLQ: ниже нижнего предела количественного определения. Conj: конъюгированный; Neu: нейтральный заряд; Pos: положительный заряд; Neg: отрицательный заряд; MA: одноосновная кислота; DA: двухосновная кислота. Cxx относится к длине атомов углерода в липиде, т.е. C18 содержит восемнадцать атомов углерода.

Результаты

Положение протрактора

- Аналоги NKA(4-10), соединения 301 и 307, показывают, что аналоги с протрактором при Lys5 активны, но снижают активность NK2R по сравнению с протрактором на N-конце, примером чего является соединение 304.

- Соединение 302 с двумя протракторами на одной пептидной основной цепи на N-конце и при Lys5 инактивирует аналог NKA(4-10) (соединение 302).

Заряд линкера

- Заряд линкера в протракторе между фрагментом жирной кислоты и пептидной основной цепью важен для активации рецепторов аналогов NKA(4-10).

- Нейтрально заряженный линкер не модулирует селективность, активность и эффективность NK2R (соединения : 304 и 305 по сравнению с 374 и 375).

- Отрицательно заряженный линкер при N-концевом протракторе или Lys5 снижает активность в отношении NK2R аналога NKA(4-10) (соединения: 319 и 333).

- Положительно заряженный линкер, как и в соединениях 318 и 321, снижает активность и увеличивает связывание альбумина, вызывая более низкие уровни экспозиции и снижение расхода энергии по сравнению с нейтрально заряженным линкером соединения 305.

- Фрагмент двухосновной жирной кислоты в протракторе важен для селективности и периода полураспада. Замена двухосновной кислоты C18, как в соединениях 305 и 344, на одноосновную жирную кислоту C18, как в соединениях 390 и 391, полностью разрушает селективность в отношении NK2R и уменьшает время полужизни.

- Длина двухосновной жирной кислоты C18 оптимальна для активности и селективности в отношении NK2R. Как уменьшение длины двухосновной жирной кислоты C18 в протракторе, как в соединении 344, до двухосновной кислоты C14 (соединение 368) или двухосновной кислоты C16 (соединение 367), так и удлинение до двухосновной кислоты C20 (соединение 380) вызывает снижение селективности и эффективности в отношении NK2R. Соединения 367 и 368 с двухосновной кислотой C16 и C14 соответственно также теряют активность в отношении NK2R.

Краткий обзор результатов

На основании данного примера сделали заключение, что протрактор, представляющий собой двухосновную кислоту 2OEG-гаммаGlu-C18, расположенную на N-конце аналогов NKA(4-10), как показано соединениями 304, 305 и 344, является оптимальным с точки зрения активации NK2R, селективности, периода полувыведения и вызова расхода энергии.

Пример 10. Исследование NK2R-селективных аналогов NKA(4-10) в отношении потери веса у мышей с ожирением, вызванным диетой

Влияние аналогов NKA, содержащих протрактор, на расход энергии и потерю веса

у мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO).

Расход энергии измеряли у мышей с ожирением, вызванным диетой, помещенных в метаболические клетки, как описано в примере 8. Фармакокинетику и экспозицию измеряли в плазме худых мышей, получавших соединение, как описано в примере 8.

ID	Последовательность	In vivo эффективность				
		Период полужизни (ч)	EC50 расхода энергии (нмоль /кг)	Эффективность расхода энергии (изменение относительно получающего среду)	EC50 потери веса (нмоль /кг)	Эффективность потери веса (изменение относительно получающего среду)
304	*Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	9,9	94	11%	16	12%
305	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	5,5	34	11%	69	6%
344	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Metox,NH2	10,3	13	12%	130	10%
383	*Asp,Lys,Phe,Thr,Gly,NmLeu,Metox,NH2	11,5	110	11%	83	11%

Таблица 16 Сравнение периода полужизни с активностью и эффективностью in vivo NK2R-селективного аналога NKA(4-10) 304 и высокоселективных в отношении NK2R агонистов соединений 305, 344 и 383. Положение транспорта при аминокислотной последовательности отмечен звездочкой «*», а структуры протракторов/конъюгированных фрагментов приведены в примере 6.

Результаты

- Все NK2R-селективные аналоги NKA(4-10) (соединения 304, 305, 344 и 383) увеличивали расход энергии с подобной эффективностью на 11-12% по сравнению со средой.
- Эффективность расхода энергии была улучшена у аналогов с мутацией Tyr5 (соединения 305 и 344) по сравнению с соединениями с Phe в положении 5 (304 и 383).
- Эффективность селективных агонистов NK2R в снижении веса определяется периодом полужизни. Таким образом, соединение 305 с периодом полужизни 5,5 часов имеет приблизительно на 50% сниженную эффективность снижения веса по сравнению с соединениями 304, 344 и 383, все из которых имеют период полужизни приблизительно 10 часов или более.
- Аналоги с высокой селективностью в отношении NK2R, такие как 305, 344 и 383, продемонстрировали несколько более низкую эффективность снижения веса по

сравнению с соединением 304. Вероятно, это связано с остаточной активацией NK1R.

Краткий обзор результатов

Данный пример демонстрирует, что высокоселективные в отношении NK2R и обладающие длинным периодом жизни соединения согласно настоящему изобретению, такие как 344 и 383, являются предпочтительными для вызова потери веса.

Пример 11. Исследование эффекта NK2R-селективного аналога NKA(4-10) на метаболизм глюкозы у мышей с ожирением, вызванным диетой

Эффект содержащих протрактор высоко NK2R-селективных аналогов NKA(4-10) на толерантность к глюкозе и инсулину у мышей с резистентностью к инсулину и преддиабетическим ожирением, вызванным диетой (DIO).

Тесты на толерантность к глюкозе и инсулину проводили на мышцах с ожирением, вызванным диетой, как описано в примере 8.

Результаты

Результаты показаны на фиг. 6. Высокоселективная в отношении NK2R молекула 344 улучшала толерантность как к глюкозе, так и к инсулину у мышей с ожирением. Влияние на толерантность к инсулину было обусловлено как снижением уровня глюкозы в крови натощак, так и повышением чувствительности к инсулину.

Краткий обзор результатов

Фармакологическая активация NK2R улучшает толерантность к глюкозе и инсулину у мышей с ожирением, вызванным диетой. Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению способны лечить резистентность к инсулину и сахарный диабет.

Пример 12. Исследование эффекта NK2R-селективного аналога NKA(4-10) на дисфункциональное опорожнение у мышей дикого типа

Эффект содержащих протрактор высоко NK2R-селективных аналогов NKA(4-10) на вызванное лоперамидом дисфункциональное опорожнение изучали на худых мышцах дикого типа.

Запор, вызванный лоперамидом, использовали в качестве модели дисфункционального опорожнения, как описано в примере 8.

Результаты

Результаты показаны на рис. 7. Высокоселективная в отношении NK2R молекула 344 улучшала вызванное лоперамидом дисфункциональное опорожнение зависимым от дозы образом.

Краткий обзор результатов

Фармакологическая активация NK2R корректирует дисфункциональное опорожнение у мышей. Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению способны лечить дисфункциональное опорожнение.

Пример 13. Последовательности

SEQ ID NO:	ID	Последовательность	Notes
1	301	** Asp,Lys*,Phe,Val,Gly,NmLeu,Met,NH ₂	** : ацетил, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин
2	302	* Asp,Lys*,Phe,Val,Gly,NmLeu,Met,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин
3	304	* Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
4	305	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
5	306	* Asp,Arg,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
6	307	Asp,Lys*,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
7	308	*Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,Gly,Leu,Nle,NH ₂	Nle: норлейцин
8	310	*Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,bAla,NmLeu,Nle,NH ₂	bAla: бета-аланин, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
9	312	*Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
10	313	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,cHexAla,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, cHexAla: L-циклогексилаланин,
11	314	*Glu,Lys,Tyr,Arg,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
12	315	*Glu,Lys,Phe,Arg,Gly,NmLeu,Nle,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
13	316	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Met,NH ₂	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин

14	318	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	*: Conj-Pos2, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
15	319	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	*: Conj-Neg, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
16	321	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	*: Conj-Pos1, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
17	322	*Lys,Thr,Asp,Ser,Phe,Val,bAla,Leu,Nle,NH2	bAla: бета-аланин, Nle: норлейцин
18	330	* Asp,Lys,4-I-Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
19	334	Asp,Lys*,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle-NH2	*: Conj-Neg, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
20	335	*Glu,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
21	336	*Glu,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
22	337	*Glu,Arg,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
23	344	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Метох,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Метох: метоксинин
24	348	* Asp,Lys,Tyr,Ile(S),Gly,NmLeu,Nle,NH2	Ile(S): Ile S изоформа, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
25	351	* Asp,Lys,Tyr,Ile(R),Gly,NmLeu,Nle,NH2	Ile(R): Ile R изоформа, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
26	353	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Phe,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин
27	356	* Asp,Lys,dPhe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин

28	357	*Glu,Arg,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
29	361	*Asp,Lys,3-OH-Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
30	362	*Asp,Lys,Pro,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
31	363	*Asp,Lys,Val,Tyr,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
32	366	*Asp,Lys,Tyr,Thr,Gly,NmLeu,Metox,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Metox: метоксинин
33	367	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	*: Conj-Neu-C16, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
34	368	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	*: Conj-Neu-C14, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
35	369	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,4-F-Phe,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин
36	370	*Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,4-MeOPhe,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, 4-MeOPhe: L-4-Метоксифенилаланин
37	373	*Asp,Lys,Phe,Val,Aib,Leu,Nle,NH2	Aib: 2-аминоизомасляная кислота
38	374	Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
39	375	Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
40	380	*Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	*: Conj-Neu-C20, NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Nle: норлейцин
41	381	*Glu,Lys,Tyr,Thr,Gly,NmLeu,Metox,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-Лейцин, Metox: метоксинин
42	382	*Glu,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Metox,NH2	NmLeu: <i>N</i> -метил-

			Лейцин, метоксинин	Metox:
43	383	* Asp,Lys,Phe,Thr,Gly,NmLeu,Metox,NH2	NmLeu: Лейцин, метоксинин	<i>N</i> -метил- Metox:
44	384	* Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Metox,NH2	NmLeu: Лейцин, метоксинин	<i>N</i> -метил- Metox:
45	385	* Asp,Lys,Phe,Val,dSer,Leu,Nle,NH2	Nle: норлейцин	
46	386	* Asp,Lys,Tyr,Ser,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: Лейцин, Nle: норлейцин	<i>N</i> -метил-
47	387	* Asp,Lys,Phe,Thr,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: Лейцин, Nle: норлейцин	<i>N</i> -метил-
48	389	* Asp,Lys,Phe,Val,Gly,Leu,Nle,NH2	Nle: норлейцин	
49	390	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: Лейцин, Nle: норлейцин	<i>N</i> -метил-
50	391	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Metox,NH2	NmLeu: Лейцин, метоксинин	<i>N</i> -метил- Metox:
51	392	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,Leu,Nle,NH2	Nle: норлейцин	
52	393	* Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,Leu,Metox,NH2	Metox: метоксинин	
53	394	* Asp,Lys,Tyr,Val,Aib,Leu,Metox,NH2	Aib: 2-аминоизомаляная кислота	
54	395	* Asp,Lys,Tyr,Val,Aib,Leu,Nle,NH2	Aib: 2-аминоизомаляная кислота	
55	396	* Asp,Lys,Tyr,Val,dSer,Leu,Metox,NH2	NmLeu: Лейцин, метоксинин	<i>N</i> -метил- Metox:
56	397	* Glu,Lys,Phe,Thr,Gly,NmLeu,Nle,NH2	NmLeu: Лейцин, Nle: норлейцин	<i>N</i> -метил-
57	402	* Asp,Lys,Tyr,Val,dSer,Leu,Nle,NH2	Nle: норлейцин	

Если не указано иное, «*» представляет собой «Conj-Neu-C18DA», структура которого представлена в примере 6. Если не указано иное, конъюгированный фрагмент присоединен к N-концевой α -аминогруппе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R) согласно формуле (I):



где

(A) представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где

X_1 выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X_2 выбран из группы, состоящей из лизина (K), аргинина (R) и гистидина (H),

X_3 выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), фенилаланина (F), мета-тирозина (m-Y), валина (V), триптофана (W), метионина (M), лейцина (L), изолейцина (I) и аланина (A),

X_4 выбран из группы, состоящей из валина (V), треонина (T), серина (S), аспарагина (N), глутамина (Q), глицина (G) и аланина (A),

X_5 выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), серина (S), аланина (A), валина (V), лейцина (L), бета-аланина (bA) и изолейцина (I),

X_6 выбран из группы, состоящей из лейцина (L), изолейцина (I), аланина (A) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

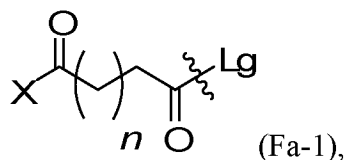
X_7 выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF),

(B) представляет собой конъюгированный фрагмент общей формулы (II)



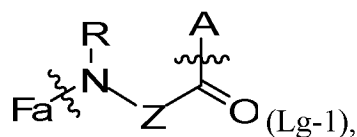
где

Fa имеет формулу (Fa-1),



где n представляет собой от 14 до 17, предпочтительно где n представляет собой 15, и где X выбран из группы, состоящей из -OH, -OC₁₋₆, -NH₂, -NHC₁₋₆ и N(C₁₋₆)₂,

Lg представляет собой связывающую группу формулы (Lg-1),



где Z представляет собой цепь, содержащую от 18 до 23 атомов в основной цепи,

выбранных из группы, состоящей из: С, О и N,

и где R выбран из группы, состоящей из H и C₁₋₆ алкила, и Lg ковалентно связывает (B) с пептидом (A),

и где (B) ковалентно связан с концевой аминокислотой.

2. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) имеет общую формулу X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇, где

X₁ выбран из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E),

X₂ выбран из группы, состоящей из лизина (K) и аргинина (R),

X₃ выбран из группы, состоящей из тирозина (Y), и фенилаланина (F), и мета-тирозина (*m*-Y),

X₄ выбран из группы, состоящей из валина (V) и треонина (T),

X₅ выбран из группы, состоящей из глицина (G), 2-аминоизомасляной кислоты (Aib), бета-аланина (bA) и серина (S),

X₆ выбран из группы, состоящей из лейцина (L) и N-метиллейцина (Me-Leu), и

X₇ выбран из группы, состоящей из норлейцина (Nle), метоксинина (Mox), метионина (M), 4-фторфенилаланина (4fF) и 4-метоксифенилаланина (4MeOF).

3. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где X₂ представляет собой аргинин (R).

4. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где X₃ представляет собой тирозин (Y).

5. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где X₄ представляет собой треонин (T).

6. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где X₅ выбран из группы, состоящей из 2-аминоизомасляной кислоты (Aib) и серина (S).

7. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где X₆ представляет собой N-метил-лейцин (Me-Leu).

8. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где X₇ представляет собой метоксинин (Mox).

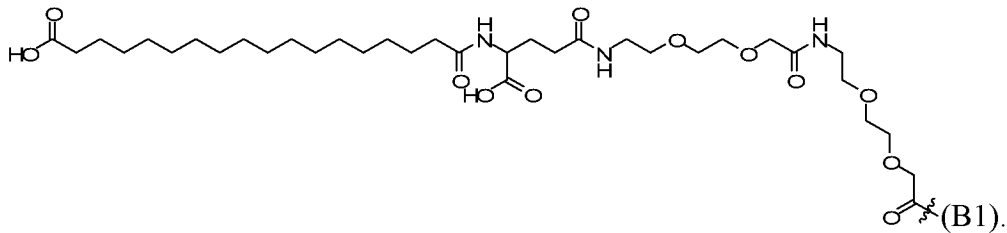
9. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где n представляет собой 15, и где X представляет собой -ОН.

10. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где Lg конъюгированного фрагмента не содержит функциональные группы, которые являются положительно заряженными при значении pH = 7,4.

11. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где Lg

конъюгированного фрагмента имеет суммарный нейтральный заряд или -1 при значении $pH = 7,4$.

12. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный фрагмент имеет формулу (B1),



13. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A) необязательно посредством амидной связи.

14. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где конъюгированный фрагмент (B) ковалентно присоединен к N-концу (A) посредством амидной связи с N-концевой $\alpha-NH_2$ группой.

15. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) амидирован на C-конце.

16. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) содержит от 7 до 15 аминокислот, как например, от 7 до 14 аминокислот, как например, от 7 до 13 аминокислот, как например, от 7 до 12 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 11 аминокислот, как например, от 7 до 10 аминокислот, как например, от 7 до 9 аминокислот, как например, от 7 до 8 аминокислот, предпочтительно где пептид содержит 7 аминокислот.

17. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) содержит не более 15 аминокислот, как например, не более 14 аминокислот, как например, не более 13 аминокислот, как например, не более 12 аминокислот, как например, не более 11 аминокислот, как например, не более 10 аминокислот, как например, не более 9 аминокислот, как например, не более 8 аминокислот, как например, не более 7 аминокислот.

18. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где пептид (A) состоит из 7 аминокислот общей формулы $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$.

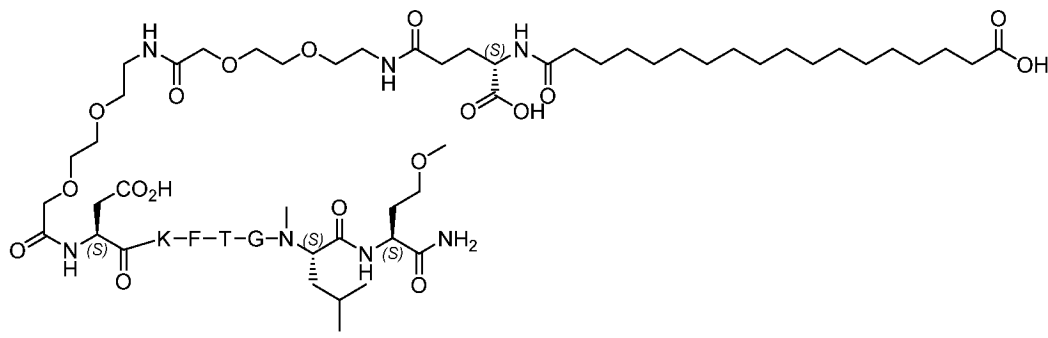
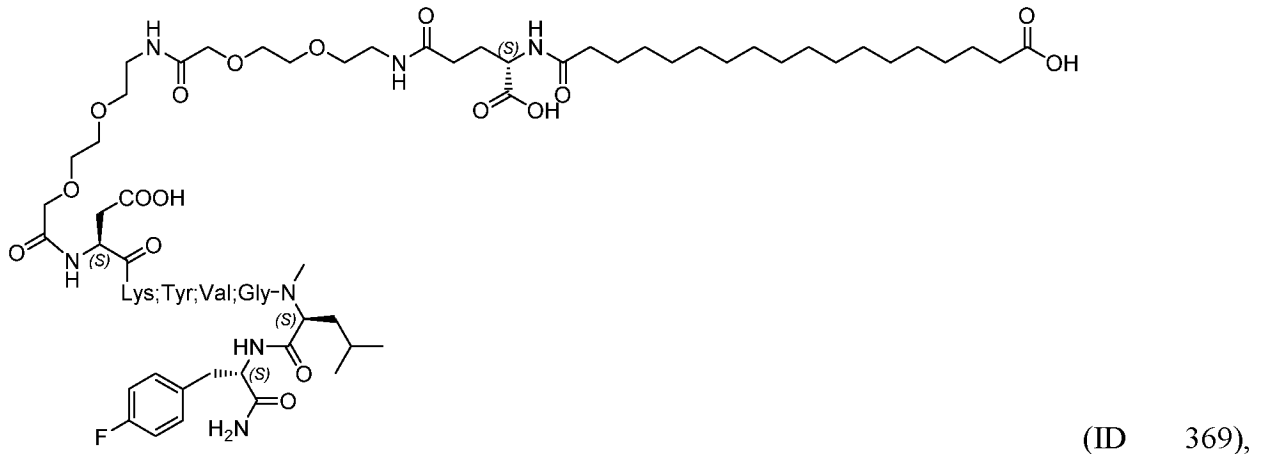
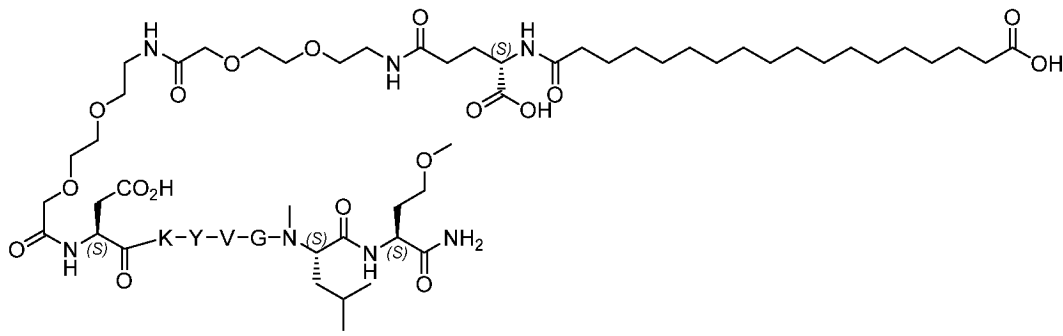
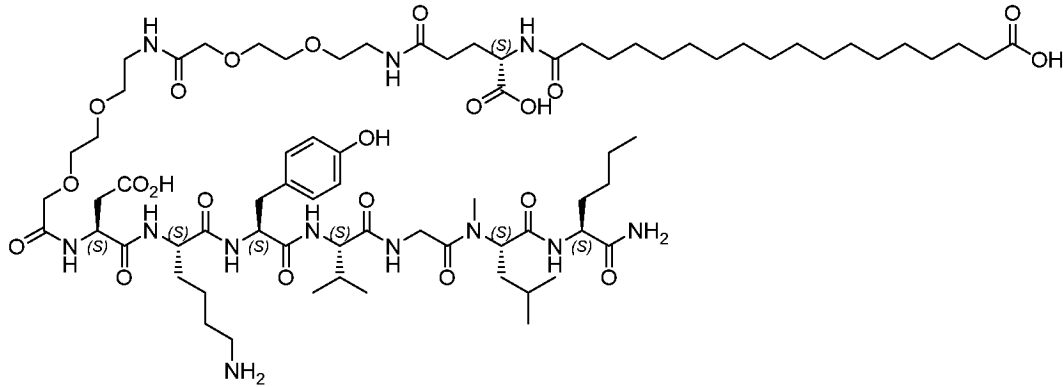
19. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где (A) представляет собой Asp,Lys,Phe,Val,Gly,NmLeu,Nle,NH₂ (соединение 305), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому аспартату (A).

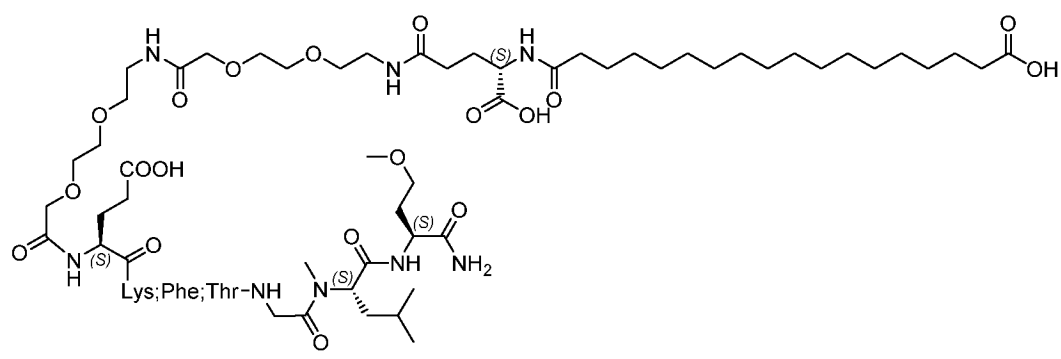
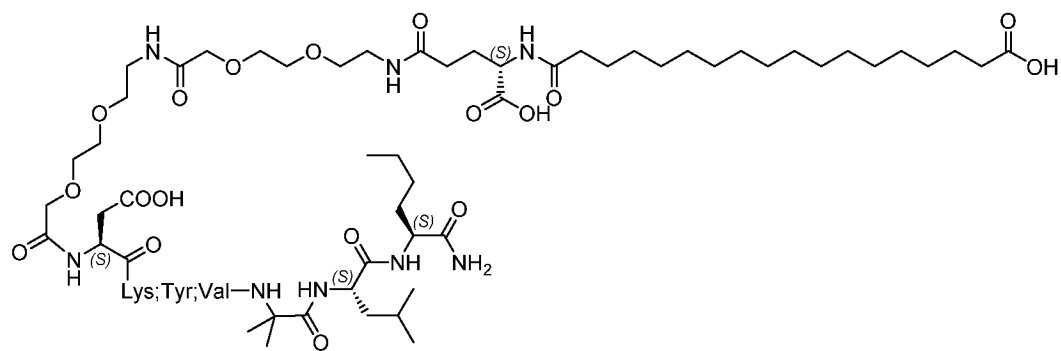
20. Агонист NK2R по любому из пп. 1-18, где

(A) представляет собой Asp,Lys,Tyr,Val,Gly,NmLeu,Метох,NH₂ (соединение 344), и (B) представляет собой формулу (B1), ковалентно присоединенную к N-концевому аспартату (A).

21. Агонист NK2R по любому из пп. 1-18, где агонист NK2R состоит из последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 57.

22. Агонист NK2R по любому из пп. 1-18, где агонист NK2R представляет собой:





23. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где агонист NK2R представляет собой селективный агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R).

24. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где агонист NK2R имеет EC50 в отношении человеческого NK2R 300 нМ или менее, как например, 250 нМ или менее, как например, 200 нМ или менее, как например, 150 нМ или менее, как например, 100 нМ или менее, как например, 90 нМ или менее, как например, 80 нМ или менее, как например, 70 нМ или менее, как например, 60 нМ или менее, как например, 50 нМ или менее.

25. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где агонист NK2R имеет EC50 в отношении человеческого NK2R 50 нМ или менее, как например, 40 нМ или менее, как например, 30 нМ или менее, как например, 20 нМ или менее, как например, 15 нМ или менее, как например, 14 нМ или менее, как например, 13 нМ или менее, как например, 12 нМ или менее, как например, 11 нМ или менее, как например, 10 нМ или менее.

26. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где агонист NK2R имеет EC50 в отношении человеческого NK1R по меньшей мере 100 нМ, как например, по меньшей мере 200 нМ, как например, по меньшей мере 300 нМ, как например, по меньшей мере 400 нМ, как например, по меньшей мере 500 нМ.

27. Агонист NK2R по любому из предшествующих пунктов, где агонист NK2R имеет EC50 в отношении человеческого NK3R по меньшей мере 100 нМ, как например, по меньшей мере 200 нМ, как например, по меньшей мере 300 нМ, как например, по меньшей мере 400 нМ, как например, по меньшей мере 500 нМ.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая агонист нейрокининового

рецептора 2 (NK2R), как определено в любом из предшествующих пунктов, и один или несколько фармацевтически приемлемых адъювантов, вспомогательных веществ, носителей, буферов и/или разбавителей.

29. Агонист нейрокининового рецептора 2 (NK2R), как определено в любом из пп. 1 - 27, для применения в качестве лекарственного средства.

30. Способ лечения заболевания у субъекта, предусматривающий введение агониста нейрокининового рецептора 2 (NK2R), как определено в любом из пп. 1 - 0, для лечения нарушения, опосредованного NK2R.

31. Способ по п. 30, где нарушение, опосредованное NK2R, выбрано из группы, состоящей из ожирения, дисфункционального опорожнения, сахарного диабета, как например, сахарный диабет типа II, и нарушений, связанных с сахарным диабетом.

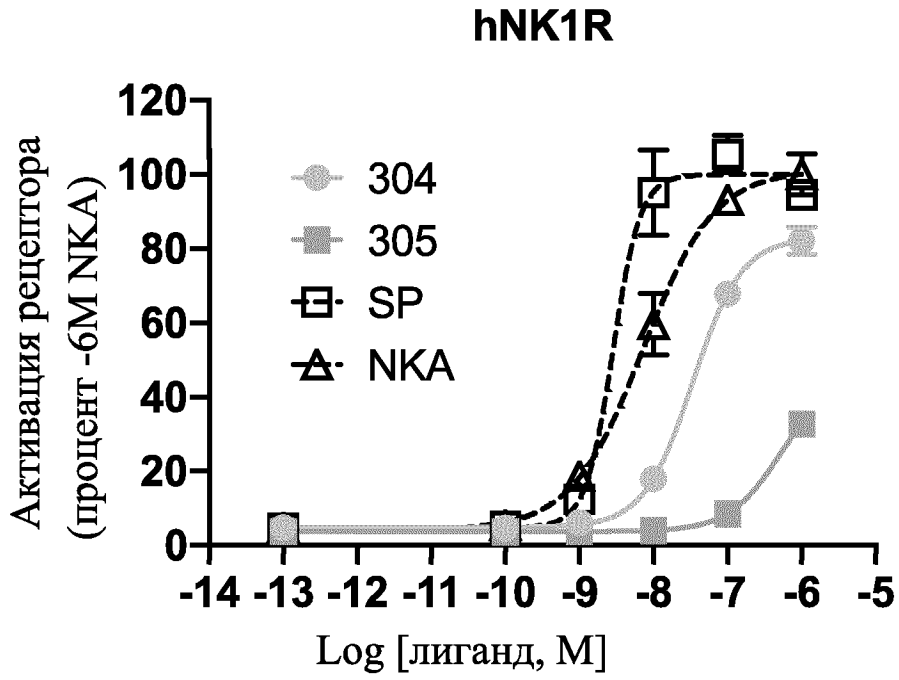
32. Способ по любому из пп 30-31, где нарушение, опосредованное NK2R, представляет собой метаболическое нарушение.

33. Способ по любому из пп. 30-32, где метаболическое нарушение представляет собой нарушение, связанное с сахарным диабетом.

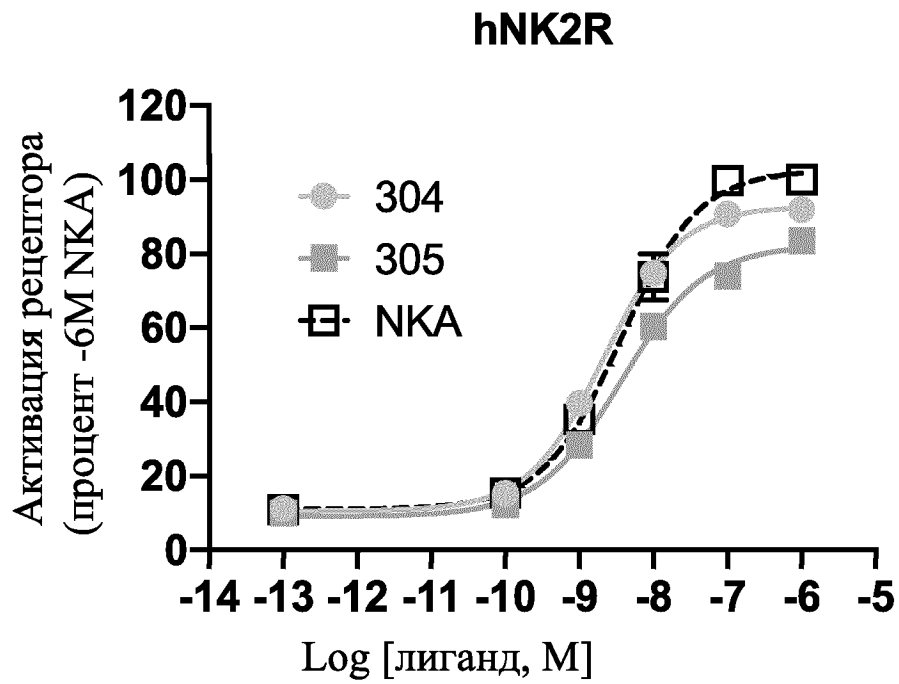
34. Способ по п. 33, где нарушение, связанное с сахарным диабетом, выбрано из группы, состоящей из нарушенной толерантности к инсулину и нарушенной толерантности к глюкозе.

35. Способ модуляции активности NK2R, предусматривающий контакт NK2R с агонистом нейрокининового рецептора 2 (NK2R), как определено в любом из пп. 1-27.

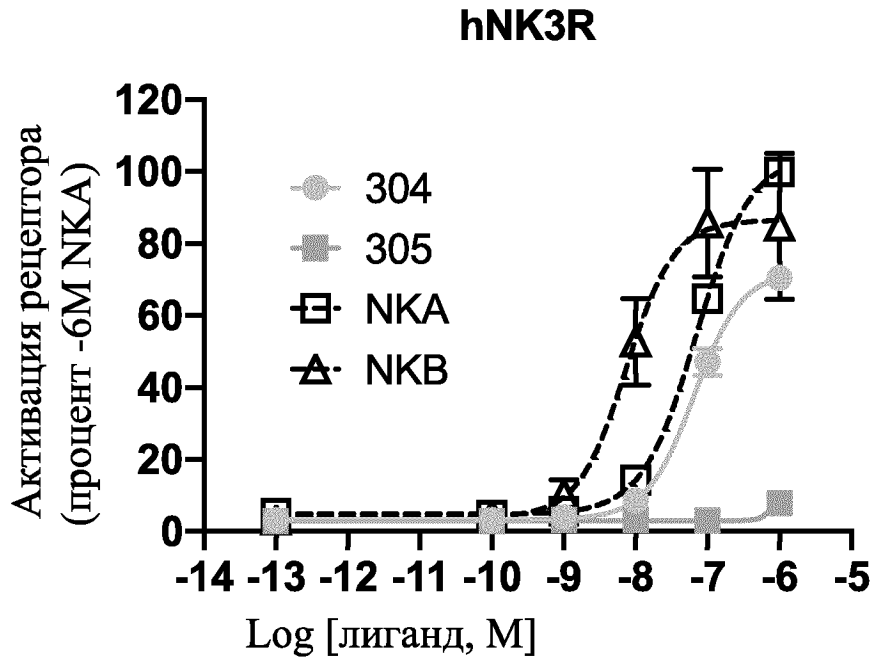
36. Применение агониста нейрокининового рецептора 2 (NK2R), как определено в любом из пп. 1-27, для получения лекарственного средства для лечения метаболического нарушения.



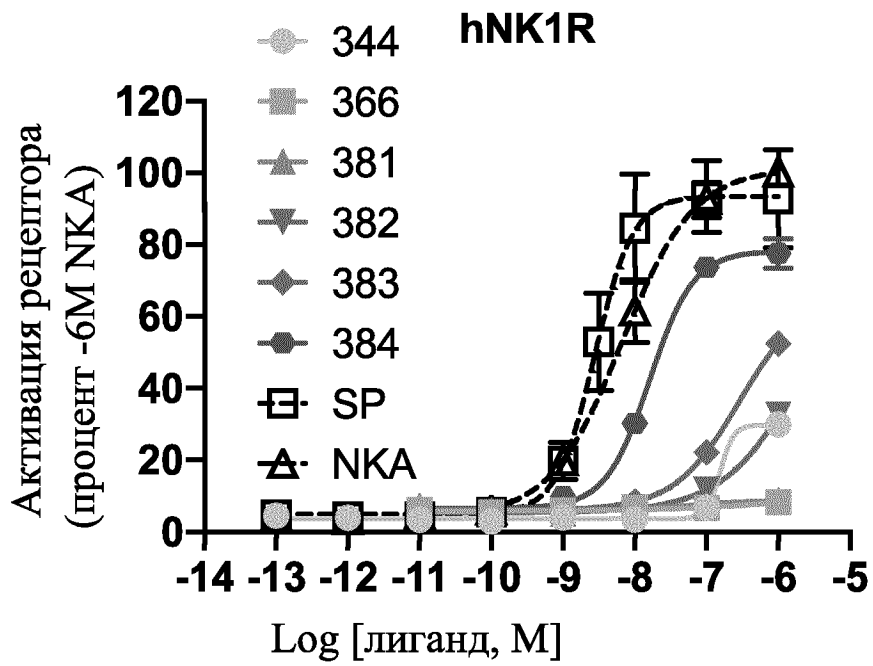
Фиг. 1А



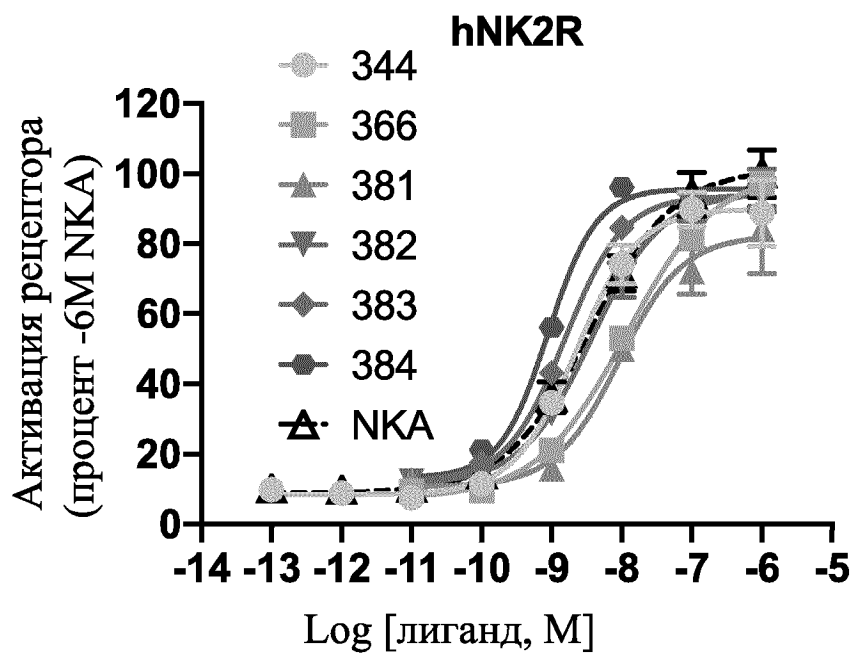
Фиг. 1В



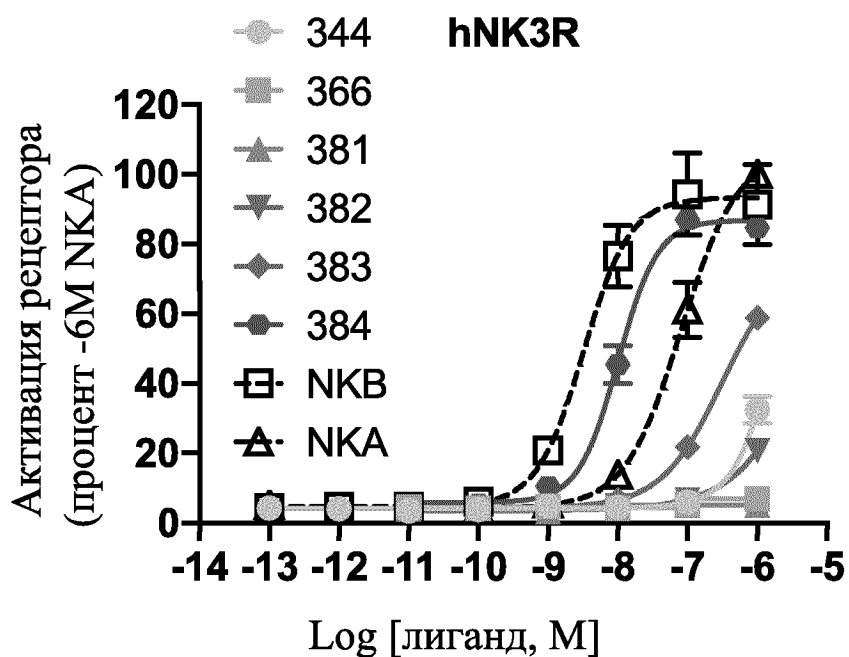
Фиг. 1С



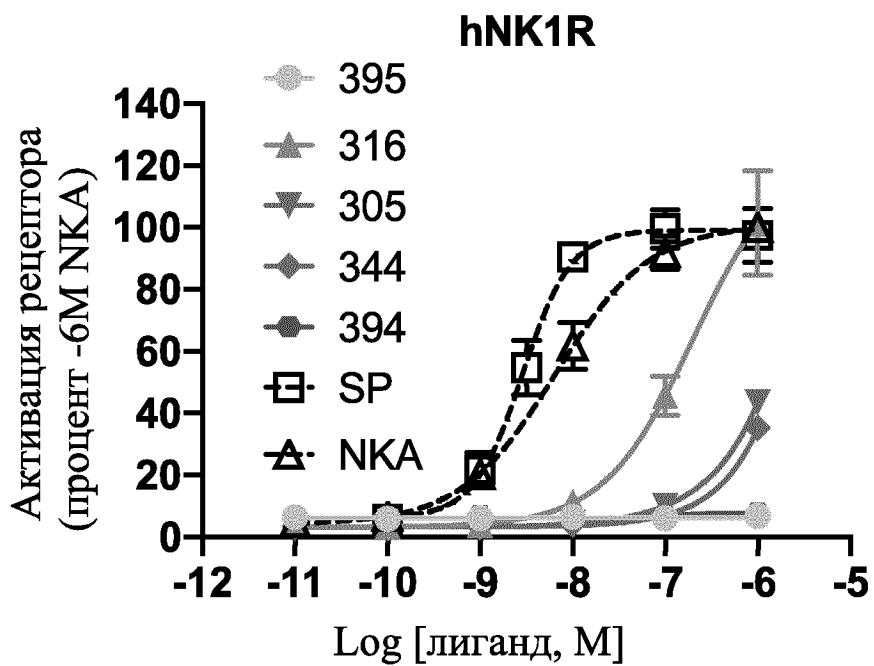
Фиг. 2А



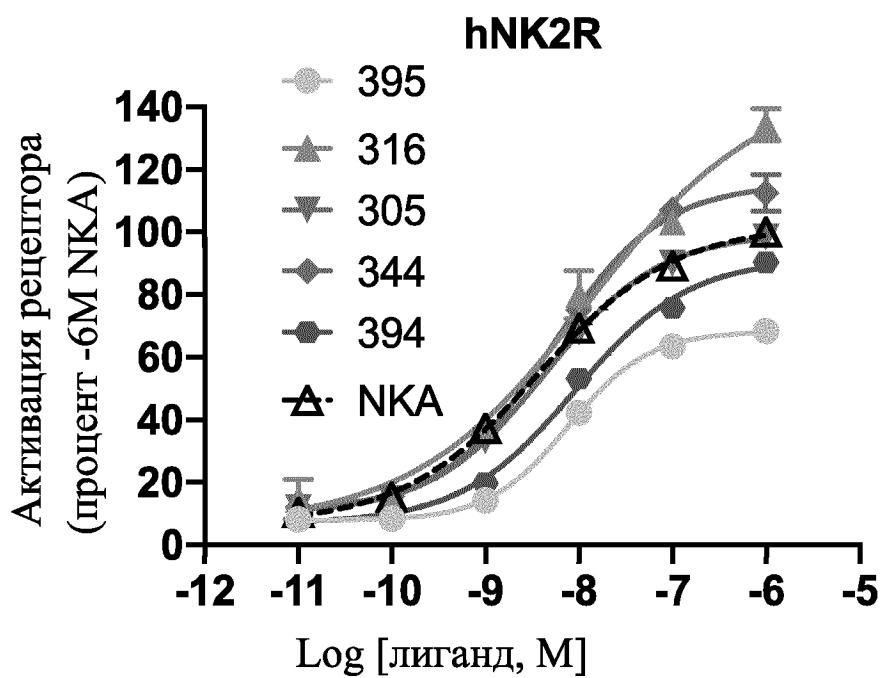
Фиг. 2В



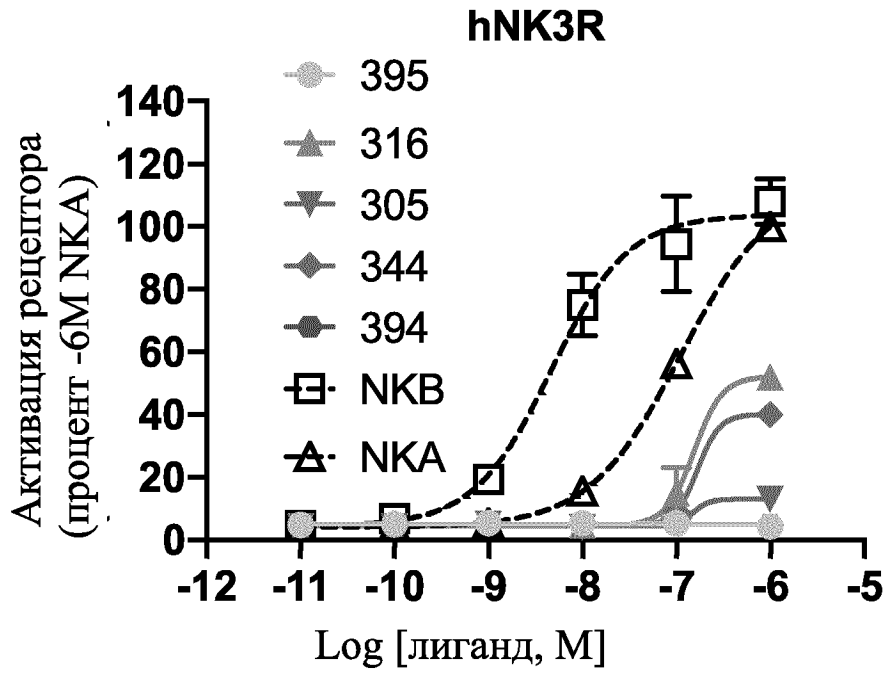
Фиг. 2С



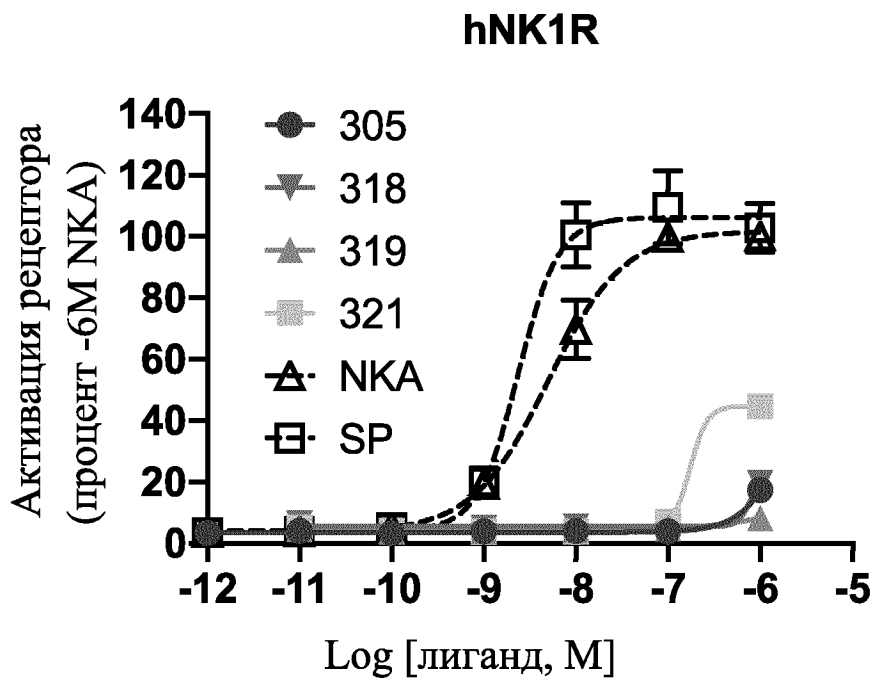
Фиг. 3А



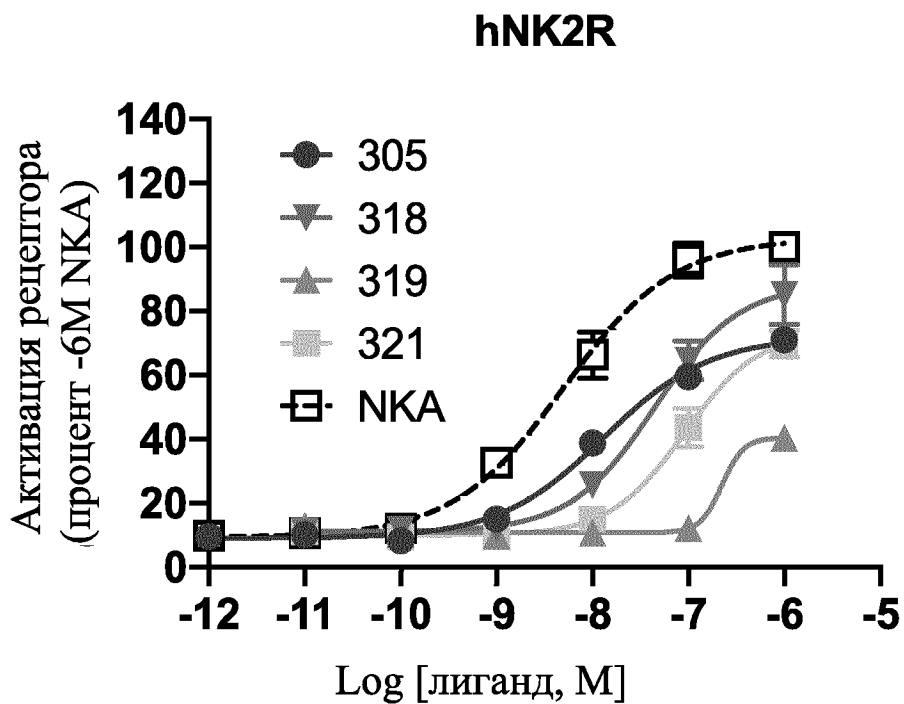
Фиг. 3В



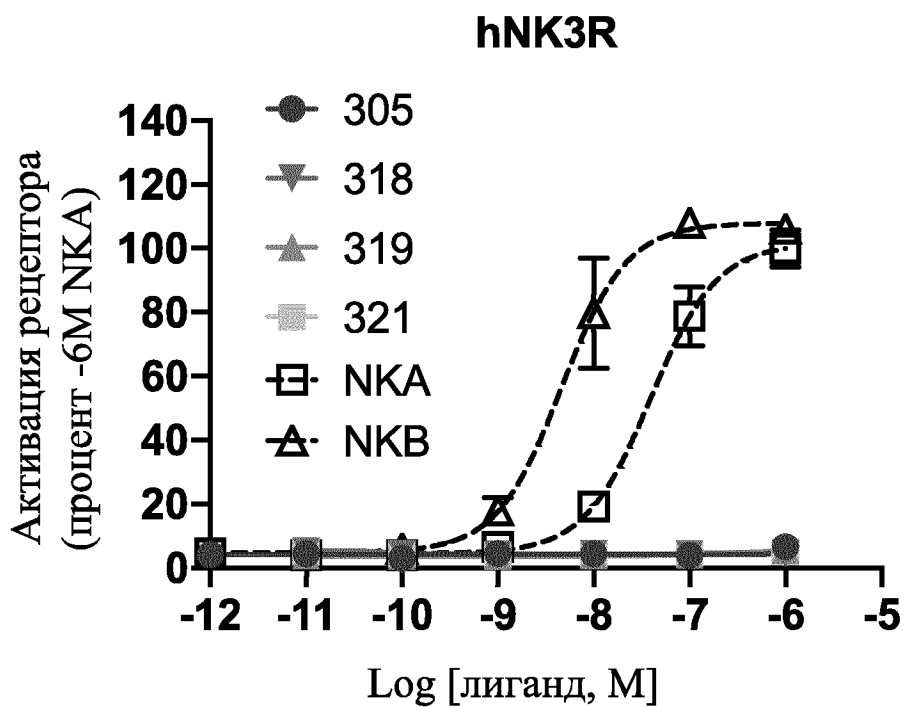
Фиг. 3С



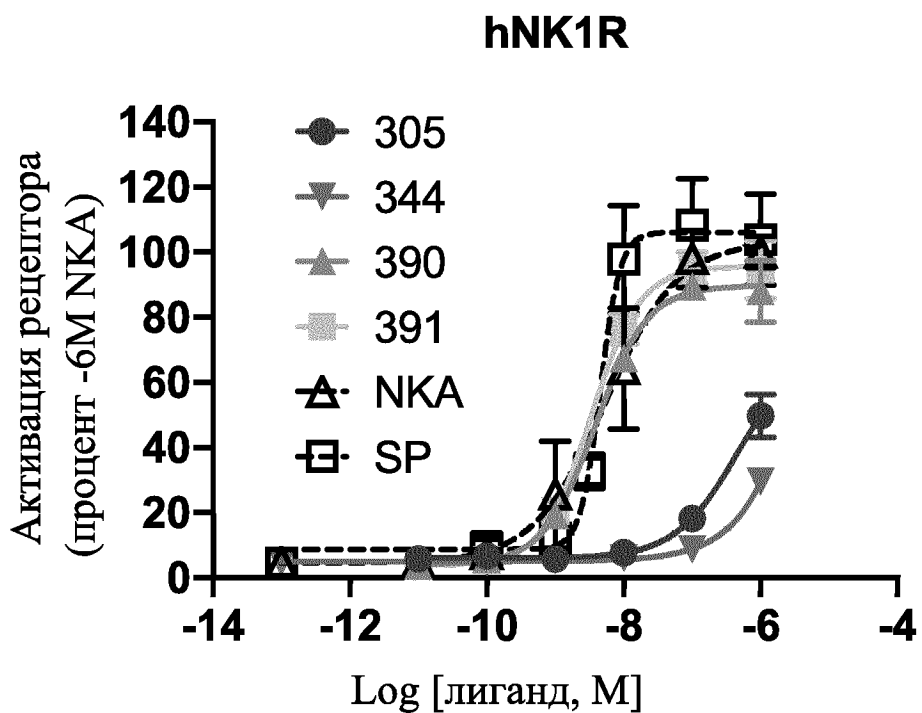
Фиг. 4А



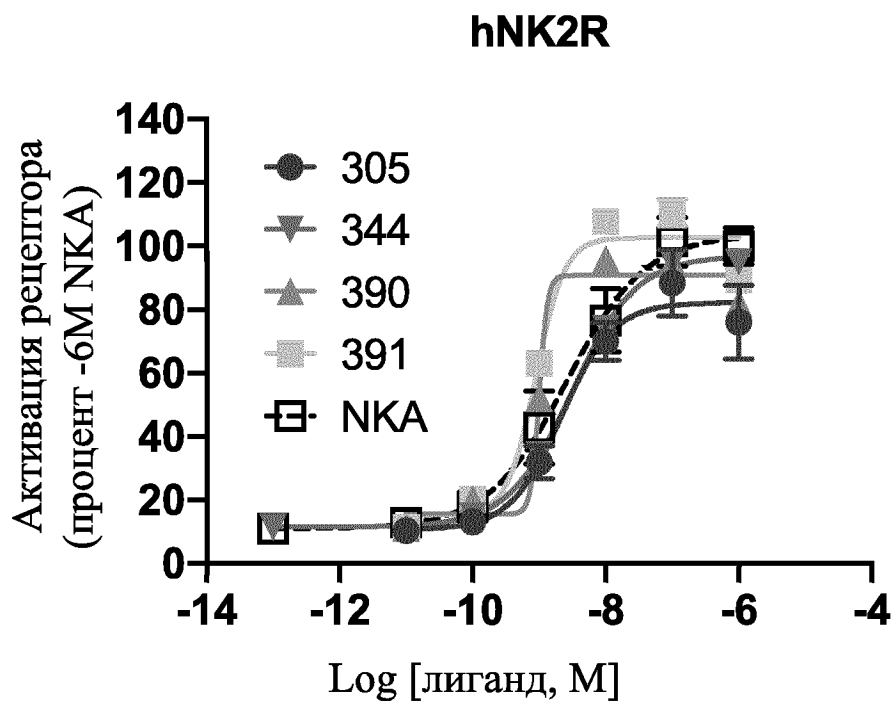
Фиг. 4В



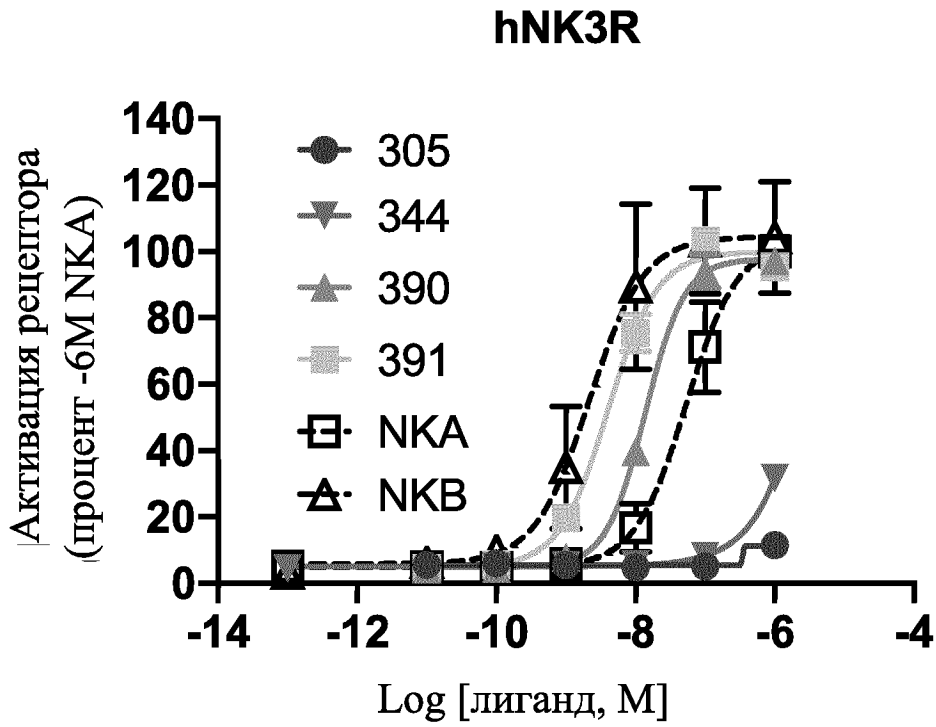
Фиг. 4С



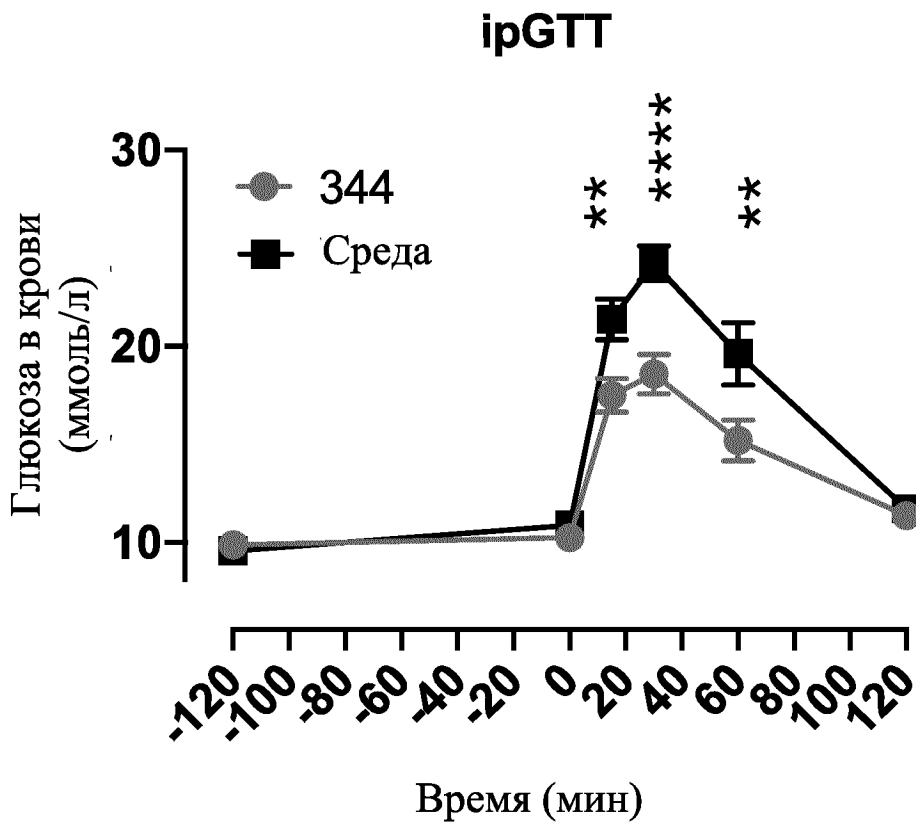
Фиг. 5А



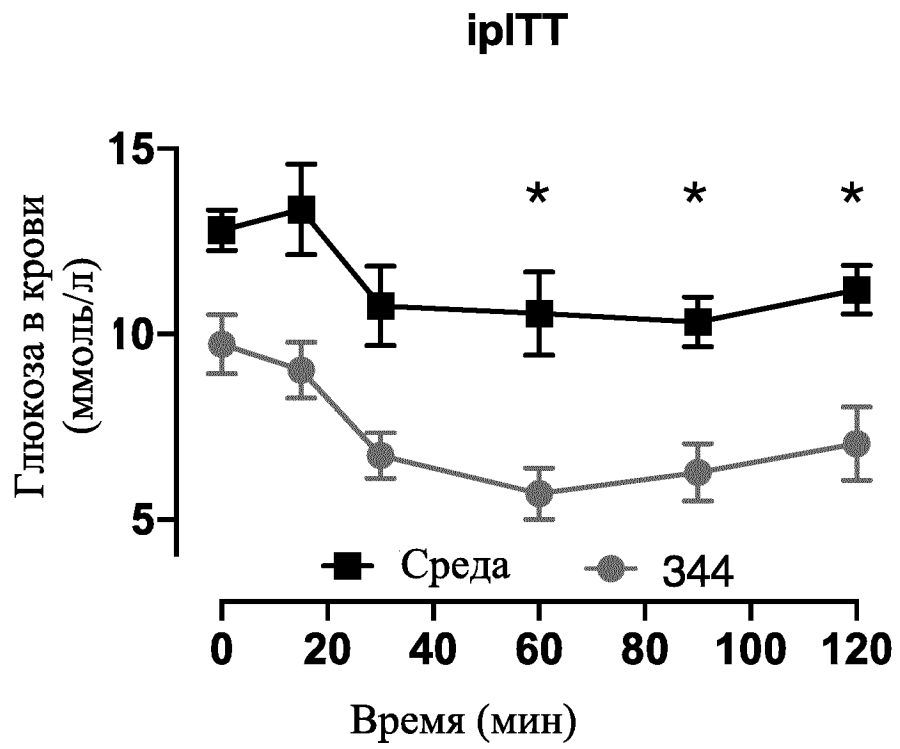
Фиг. 5В



Фиг. 5С

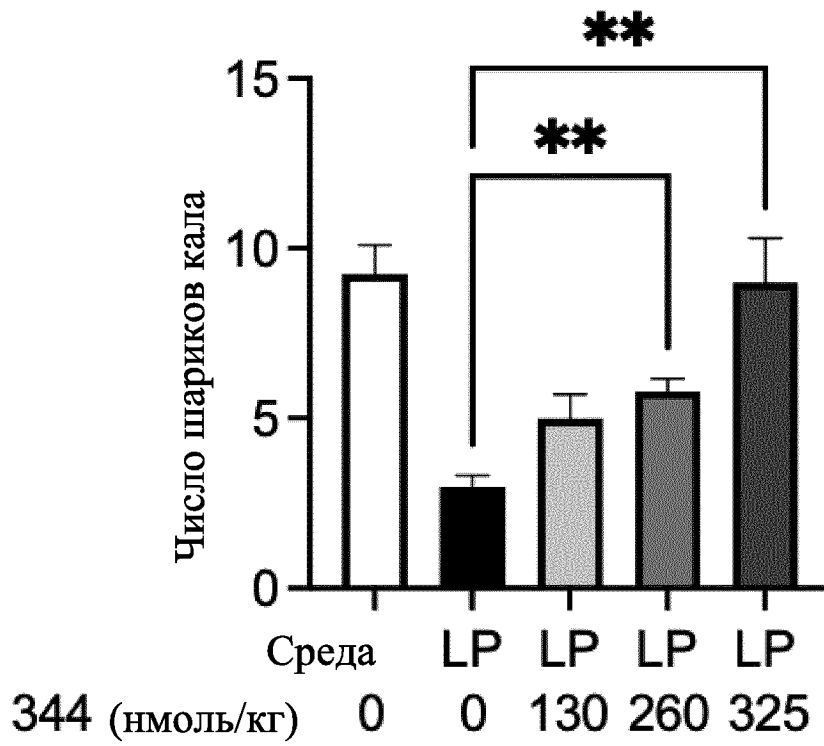


Фиг. 6А



Фиг. 6В

Опорожнение



Фиг. 7