

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392052** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.09.29

(22) Дата подачи заявки  
2022.03.02

(51) Int. Cl. *C07K 14/605* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)  
*A61K 38/22* (2006.01)

---

(54) **АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА АМИЛИНА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) 63/155,894

(32) 2021.03.03

(33) US

(86) PCT/US2022/018434

(87) WO 2022/187305 2022.09.09

(71) Заявитель:

ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Абрахам Милата Мэри, Бриер Дэниэл  
Энтони, Гуо Лили, Кисер Саманта  
Грейс Лайонс, Ли Джон, Цюй Хунчан  
(US)

(74) Представитель:

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

---

(57) Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области лечения диабета, ожирения и/или длительного контроля веса, дислипидемии и/или неалкогольного стеатогепатита (НАСГ). Настоящее изобретение относится к соединениям, которые являются агонистами рецептора амилина и могут снижать потребление пищи, массу тела, уровень глюкозы и/или триглицеридов, поэтому их можно использовать для лечения диабета, ожирения и/или дислипидемии. Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, и терапевтическое применение таких соединений и композиций.

---

**A1**

**202392052**

**202392052**

**A1**

## **АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА АМИЛИНА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области лечения диабета, ожирения и/или длительного контроля веса, дислипидемии и/или неалкогольного стеатогепатита (НАСГ). Настоящее изобретение относится к соединениям, которые являются агонистами амилинового рецептора и, следовательно, могут снижать потребление пищи, массу тела, уровень глюкозы, HbA1c (гликозилированного гемоглобина) и/или триглицеридов и могут применяться для лечения диабета, ожирения и/или длительного контроля веса, дислипидемии и/или НАСГ. Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, и терапевтическое применение таких соединений и фармацевтических композиций.

Последние несколько десятилетий продолжается рост заболеваемости диабетом. Сахарный диабет 2 типа (СД2) является наиболее распространенной формой диабета, составляющей примерно 90% всех случаев заболевания диабетом. СД2 характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови и связан, главным образом, с инсулинорезистентностью. Необходимые способы лечения пациентов с диабетом должны снижать уровень глюкозы в крови и стабилизировать уровень HbA1c.

Ожирение представляет собой комплексное медицинское нарушение, приводящее к чрезмерному накоплению массы жировой ткани. В настоящее время ожирение является глобальной проблемой общественного здравоохранения, которая часто связана с нежелательными последствиями для здоровья и заболеваемостью. Предпочтительные способы лечения пациентов с ожирением должны привести к снижению избыточной массы тела, уменьшению сопутствующих заболеваний, связанных с ожирением, и/или поддержанию долгосрочного снижения веса.

Дислипидемия представляет собой аномальный уровень холестерина и других липидов, также называемых жирами, в крови. Дислипидемия повышает вероятность закупорки артерий (атеросклероза) и возникновения инфарктов, инсультов и других нарушений кровообращения, особенно у курящих людей.

НАСГ означает неалкогольный стеатогепатит. Это печеночное проявление метаболических нарушений и наиболее тяжелая форма неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). НАСГ тесно связан с такими сопутствующими заболеваниями, как диабет и ожирение.

Амилин представляет собой пептидный гормон из 37 аминокислот, который совместно с инсулином секретируется  $\beta$ -клетками поджелудочной железы и является дефицитным у людей с диабетом. Он ингибирует секрецию глюкагона, задерживает опорожнение желудка и действует как агент, вызывающий чувство сытости.

5 Следовательно, амилин помогает регулировать количество глюкозы в организме после приема пищи. Однако физико-химические свойства человеческого амилина затрудняют его использование в качестве лекарственного средства. Например, сложно получить амилин, поскольку он химически нестабилен и осаждается при физиологическом значении рН, что требует его получения в кислотном растворе. Также период полувыведения этого  
10 лекарственного средства составляет менее часа, и его применяют во время еды, поэтому пациенту необходимо принимать несколько доз в один день, чтобы использовать это лекарственное средство в терапии.

Прамлинтид — коммерчески доступный пептид-агонист амилина, применяемый для лечения сахарного диабета в качестве дополнения к инсулину. Прамлинтид химически  
15 нестабилен при нейтральном рН как из-за наличия дисульфидной связи (-S-S-), так и из-за деамидирования. Таким образом, он предложен в кислой композиции. По сравнению с человеческим амилином аминокислоты в положении 25, 28 и 29 в прамлинтиде замещены пролином. Эти модификации снижают тенденцию пептида к фибриллогенезу. Однако прамлинтид по-прежнему имеет очень короткий период полувыведения из плазмы крови,  
20 поэтому его необходимо вводить два-три раза в день, что может привести к неудобствам и нарушению соблюдения предписаний и, как следствие, к неполной или менее оптимальной эффективности. Кроме того, состав с низким рН несовместим с составами с нейтральным рН, используемыми для инсулина и аналогов GLP-1, что затрудняет его совместное применение с этими соединениями, которые могли бы оказывать  
25 синергическое действие и тем самым повышать клиническую эффективность.

Человеческий амилин связывается с двумя различными рецепторными комплексами. Эти два комплекса также содержат рецептор кальцитонина и белки активности рецептора: RAMP1 или RAMP3. Рецептор кальцитонина встречается во многих тканях в организме, и считается, что он участвует в регуляции метаболизма  
30 костной ткани. Однако, помимо регуляции костной ткани, очень мало известно о физиологии рецепторов кальцитонина у человека, и поэтому при использовании молекул с высокой афинностью к рецепторам кальцитонина может повышаться риск развития нецелевой токсичности. Таким образом, считается, что полипептиды на основе амилина, обладающие повышенной селективностью к рецептору амилина по сравнению с

рецептором кальцитонина, могут иметь более выгодный фармакокинетический и фармакологический профиль.

Учитывая тесную связь между рецепторами кальцитонина и амилина, можно ожидать некоторой перекрестной реактивности агонистов рецептора амилина к рецептору кальцитонина. Например, прамлинтид, пептид-агонист амилина, обладает определенной аффинностью к рецепторам кальцитонина, но в 14 раз сильнее действует на рецепторы амилина.

Описаны полипептиды, включающие пептиды-агонисты амилина человека и имеющие альбуминсвязывающий фрагмент. См. WO 2010/046357, WO 2009/034119 и WO 2009/034119. Даже если эти полипептиды с альбуминсвязывающими фрагментами демонстрируют улучшенные фармакокинетические (ФК) или фармакодинамические (ФД) свойства по сравнению с прамлинтидом, при определенных условиях они все равно могут проявлять низкую физическую стабильность. Кроме того, полипептиды, как правило, не проявляют селективности в отношении рецептора амилина по сравнению с рецептором кальцитонина. US2014/0087995 относится к полипептидам, включающим пептиды-агонисты амилина, обладающие селективностью в отношении рецептора амилина по сравнению с рецептором кальцитонина. Однако по-прежнему существует потребность в пептидных препаратах агониста амилина, обладающих более высокой активностью, меньшим риском проблем для разработки, меньшим риском иммуногенности, улучшенной химической стабильностью и совместимостью с составами при нейтральном рН.

Существует потребность в соединениях (например, пептидах), проявляющих селективность в отношении агонизма рецептора амилина по сравнению с рецептором кальцитонина. Кроме того, существует потребность в агонистах рецепторов амилина с пролонгированным временем действия и сохраненной эффективностью. Терапевтически желательные соединения будут выступать агонистами рецепторов амилина и обеспечивать одно или более преимущественных свойств, таких как снижение потребления пищи, снижение массы тела, снижение уровня глюкозы в крови, снижение содержания HbA1c, триглицеридов и/или инсулина. Кроме того, терапевтически желательные соединения могут обладать одним или более дополнительными полезными свойствами, такими как пролонгированное время действия с сохраненной или улучшенной активностью в отношении агонизирующего действия на рецептор амилина, низкий риск иммуногенного ответа и/или низкий риск фибрилляции.

Кроме того, для лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии необходима комбинация агониста рецептора амилина по настоящему изобретению,

необязательно в комбинации с инкретином или аналогом инкретина. Такая комбинация также предпочтительно будет более эффективной, чем любая молекула по отдельности. Например, такое лечение такой комбинацией может позволить использовать более низкие дозы одной или обеих молекул по сравнению с каждой молекулой по отдельности, что потенциально может привести к меньшим побочным эффектам (или более короткой продолжительности одной или другой терапии) при сохранении эффективности. Считается, что предложенная в настоящем документе новая комбинация (комбинации) будет эффективным средством лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии.

Соответственно, в настоящем описании предложен способ лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста рецептора амилина по настоящему изобретению и эффективного количества дополнительного агента.

Соответственно, в настоящем описании предложены новые соединения (пептиды), которые имеют агонизирующее действие на рецептор амилина и обладают одним или несколькими из следующих свойств: (1) эффективное снижение потребления пищи и массы тела; (2) снижение уровня глюкозы и инсулина; (3) снижение риска иммуногенности и низкий риск фибрилляции по сравнению с прамлинтидом; (4) значительное увеличение периода полувыведения по сравнению с прамлинтидом. Увеличенный период полувыведения описанных в настоящем документе соединений позволит использовать их в терапии в режиме дозирования один раз в неделю.

Один вариант осуществления настоящего описания представляет собой соединение, содержащее:

Хаа<sub>1</sub>-С-Хаа<sub>3</sub>-ТАТСАТ- Хаа<sub>10</sub>- Хаа<sub>11</sub>-Хаа<sub>12</sub>-АЕ-Хаа<sub>15</sub>-LVRSS-Хаа<sub>21</sub>-Хаа<sub>22</sub>-FGP-Хаа<sub>26</sub>-LPPTVEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где Хаа<sub>1</sub> представляет собой К или γЕ; Хаа<sub>3</sub> представляет собой Е, N или G; Хаа<sub>10</sub> представляет собой G или Q; Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn или К; Хаа<sub>12</sub> представляет собой L или αMeL; Хаа<sub>15</sub> представляет собой αMeF или F; Хаа<sub>21</sub> представляет собой N или H; Хаа<sub>22</sub> представляет собой NMeD, nMeN или N; Хаа<sub>26</sub> представляет собой I или K, или его фармацевтически приемлемую соль. (SEQ ID No:14). Необязательно, соединения, содержащие SEQ ID NO:14, дополнительно содержат дополнительный элемент для расширения профиля действия этого соединения. Эти дополнительные элементы включают, с линкером или без него и в любом подходящем положении в последовательности, Fc-часть иммуноглобулина, фрагменты Fc-части иммуноглобулина, человеческий сывороточный альбумин (HSA), вариант VHH (вариабельный домен тяжелой цепи антител), нанотело, фрагменты человеческого сывороточного альбумина, монокислоту C<sub>20</sub>, двухкислоту C<sub>20</sub> и фрагмент

полиэтиленгликоля (ПЭГ) или другие типы высокомолекулярных полимеров.

Предпочтительно дополнительный элемент присоединен необязательно с помощью линкера к лизину на соединении. Кроме того, в любом из описанных в настоящем документе вариантов осуществления пептиды-агонисты амилина и соединения,

5 содержащие пептиды-агонисты амилина, могут дополнительно содержать такие элементы либо в дополнение к любым уже присутствующим элементам, которые присоединены или связаны с пептидной последовательностью и которые расширяют профиль времени действия, либо в качестве альтернативы существующему элементу.

В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, Хаа<sub>26</sub> представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 26, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ . В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 26, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой: АЕЕА<sub>2</sub>- $\gamma E-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ . В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 26, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $\gamma E-AEEA_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ . В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 26, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2-AEEA-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ . В других вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 26, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через другой линкер, известный в данной области. Кроме того, в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, пептиды-агонисты амилина и соединения, содержащие пептиды-агонисты амилина, могут содержать другой линкер для присоединения жирной кислоты в соответствии с формулами, описанными в настоящем документе.

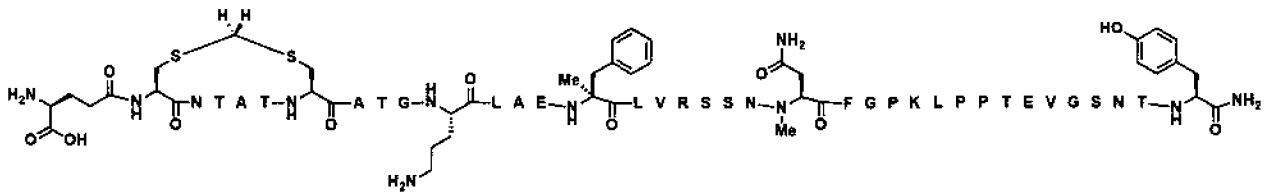
В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, Хаа<sub>1</sub> представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 1, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ . В других вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO: 14, лизин в положении 1, если он присутствует, присоединен к жирной кислоте через другой линкер, известный в данной области.

В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:14, существует дисульфидный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7. В предпочтительном варианте осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:14, существует тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

5 Один из вариантов осуществления в настоящем документе содержит следующую последовательность:

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности:

10  $\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1). Ниже приведено изображение соединения I с использованием стандартных  
однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в  
положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной  
группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов  
15 в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeN в положении 22 и  
тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



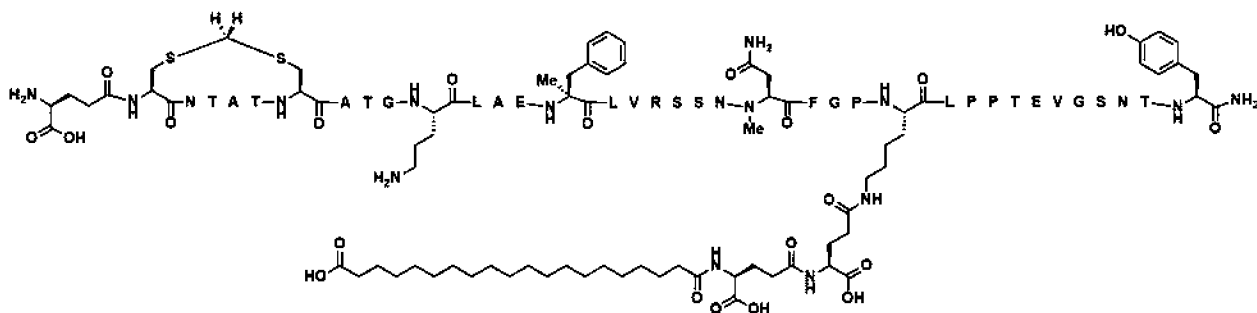
Соединение I; SEQ ID NO:1

20 В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:1 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:1 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

25 В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:1, лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер. В предпочтительном варианте осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:1, лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой: ( $\gamma$ E)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

30 Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность:

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой: ( $\gamma$ E)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:2). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности:  $\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой: ( $\gamma$ E)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:2). Ниже приведено изображение соединения II с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислоты боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeN в положении 22, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение II; SEQ ID NO:2

В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:2 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:2 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

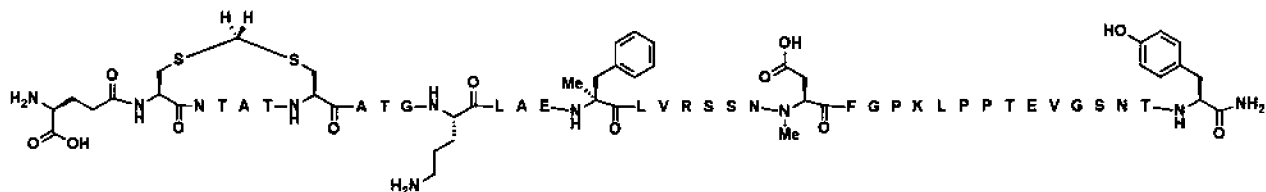
Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность:

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности:

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:3). Ниже приведено изображение соединения III с использованием стандартных



однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeN в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение III; SEQ ID NO:3

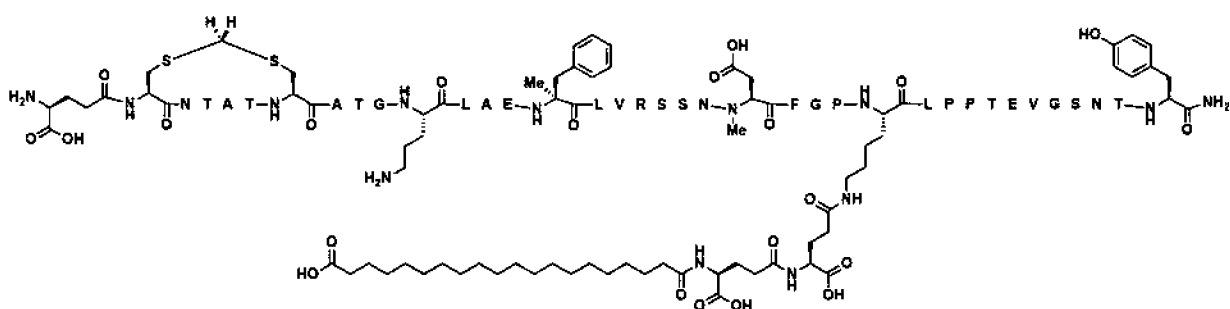
В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:3 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с соединением III (SEQ ID NO:3) по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:3, лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер. В предпочтительном варианте осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:3, лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты с формулой:  $(\gamma E)_2$ -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность:

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2$ -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:4). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности:  $\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2$ -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:4). Ниже приведено изображение соединения IV с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn

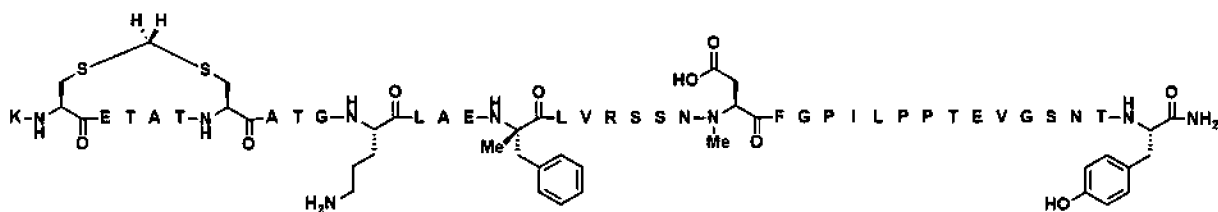
в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение IV; SEQ ID NO:4

5 В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:4 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:4 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

10 Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность: KCETATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности: KCETATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:5). Ниже приведено изображение соединения V с использованием стандартных  
15 однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



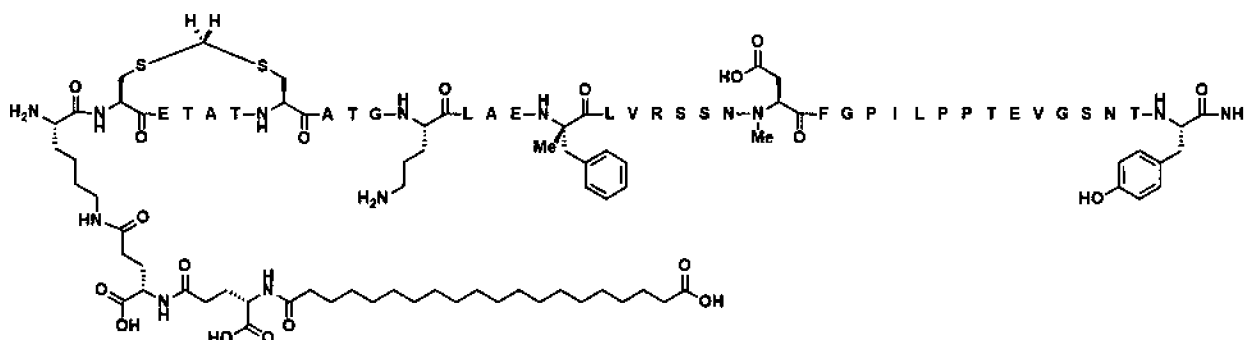
20 Соединение V; SEQ ID NO:5

В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:5 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:5 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,  
25 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:5, лизин в положении 1 присоединен к жирной кислоте через линкер. В предпочтительном

варианте осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:5, лизин в положении 1 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO}_2\text{H}$ .

Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность: KCETATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 1 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO}_2\text{H}$  (SEQ ID NO:6). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности: KCETATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 1 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO}_2\text{H}$  (SEQ ID NO:6). Ниже приведено изображение соединения VI с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением лизина в положении 1, цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:

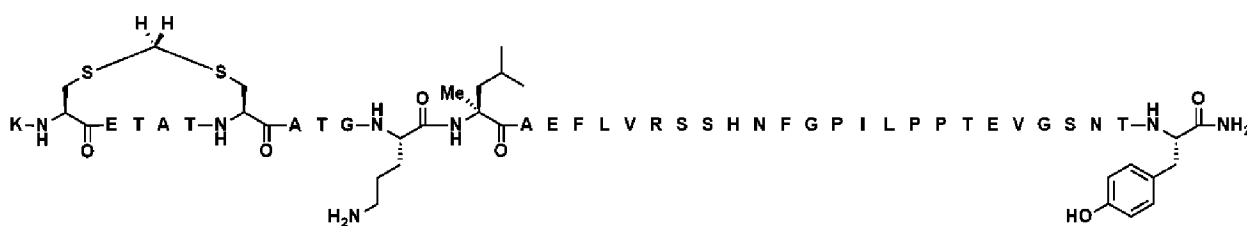


Соединение VI; SEQ ID NO:6

В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:6 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с соединением VI (SEQ ID NO:6) по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность: KCETATCATG-Orn- $\alpha$ MeL-AEFLVRSSHNFPGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности: KCETATCATG-Orn- $\alpha$ MeL-AEFLVRSSHNFPGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:7). Ниже приведено изображение соединения VII, за исключением цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,

$\alpha$ MeL в положении 12 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение VII; SEQ ID NO:7

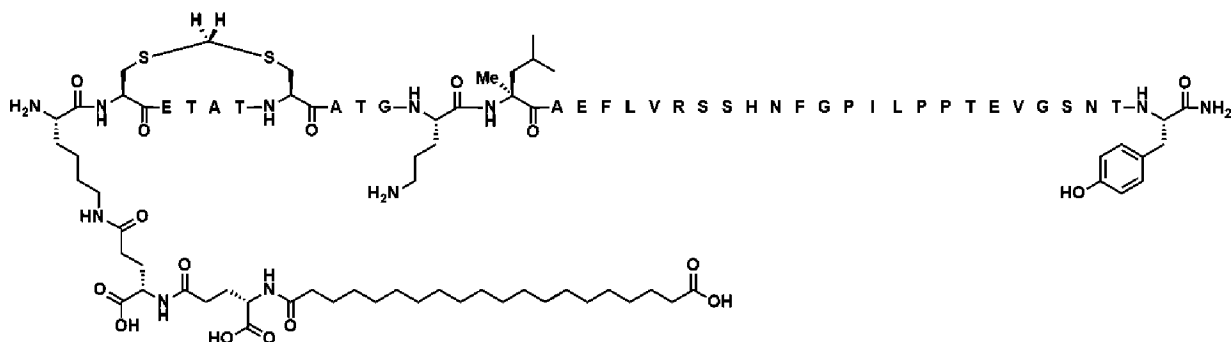
5 В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:7 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:7 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

10 В некоторых вариантах осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:7, лизин в положении 1 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты. В предпочтительном варианте осуществления соединений, содержащих SEQ ID NO:7, лизин в положении 1 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}$ .

15 Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность: KCETATCATG-Orn- $\alpha$ MeL-AEFLVRSSHNFPGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 1 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}$  (SEQ ID NO:8). Альтернативный вариант осуществления,

20 описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности: KCETATCATG-Orn- $\alpha$ MeL-AEFLVRSSHNFPGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 1 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}$  (SEQ ID NO:8). Ниже приведено изображение соединения VIII с

25 использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением лизина в положении 1, цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeL в положении 12 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение VIII; SEQ ID NO:8

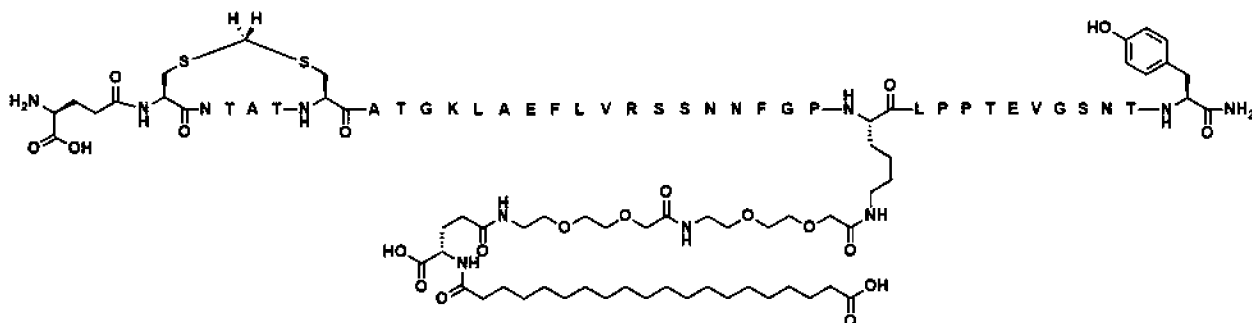
В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:8 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:8 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

Один из вариантов осуществления, описанный в настоящем документе, содержит следующую последовательность:  $\gamma$ E-

10 CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой: AEEA<sub>2</sub>- $\gamma$ E-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:9). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности:  $\gamma$ E-

15 CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой: AEEA<sub>2</sub>- $\gamma$ E-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:9). Ниже приведено изображение соединения IX с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:

20



Соединение IX; SEQ ID NO:9

В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:9 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:9 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

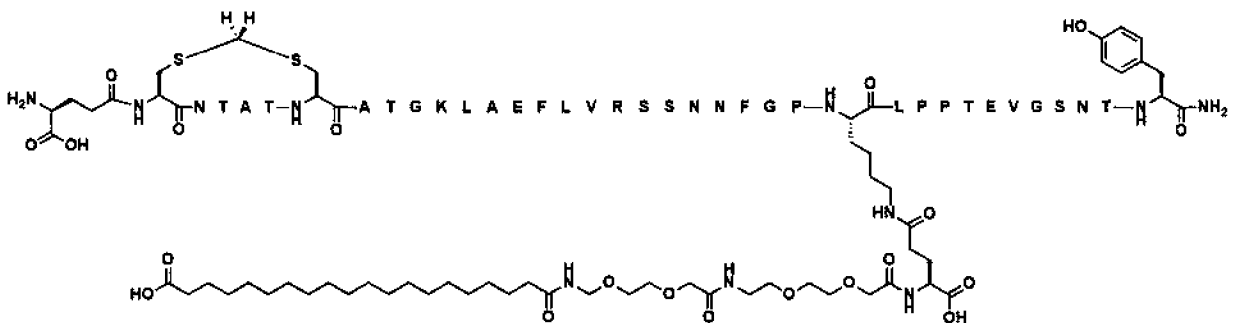
Один из вариантов осуществления, описанный в настоящем документе, содержит следующую последовательность:

$\gamma$ E-CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTVEGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует

10 тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $\gamma$ E-AEEA<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:10). Альтернативный вариант осуществления, описанный в настоящем документе, состоит из следующей последовательности:  $\gamma$ E-

CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTVEGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует

15 тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной кислоте через линкер в соответствии с формулой:  $\gamma$ E-AEEA<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:10). Ниже приведено изображение соединения X с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение X; SEQ ID NO:10

25 В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:10 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединения может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:10 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

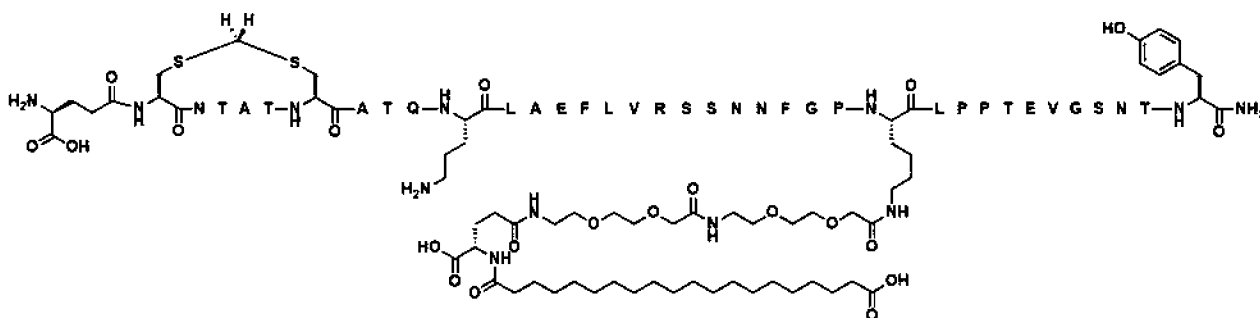


следующей последовательности:  $\gamma$ E-CNTATCATQ-Orn-

LAEFLVRSSNFGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к жирной

кислоте через линкер в соответствии с формулой: AEEA<sub>2</sub>- $\gamma$ E-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID

5 NO:12). Ниже приведено изображение соединения XII с использованием стандартных  
однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в  
положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной  
группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов  
в положениях 2 и 7, орнитина в положении 11, лизина в положении 26 и тирозина в  
10 положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение 12; SEQ ID NO:12

В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:12 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В

15 альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:12 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

Один из вариантов осуществления в данном документе содержит следующую последовательность:

20  $\gamma$ E-CGTATCATG-Orn-LAEFLVRSSNFGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $\gamma$ E<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID NO:13). Альтернативный вариант осуществления, описанный в

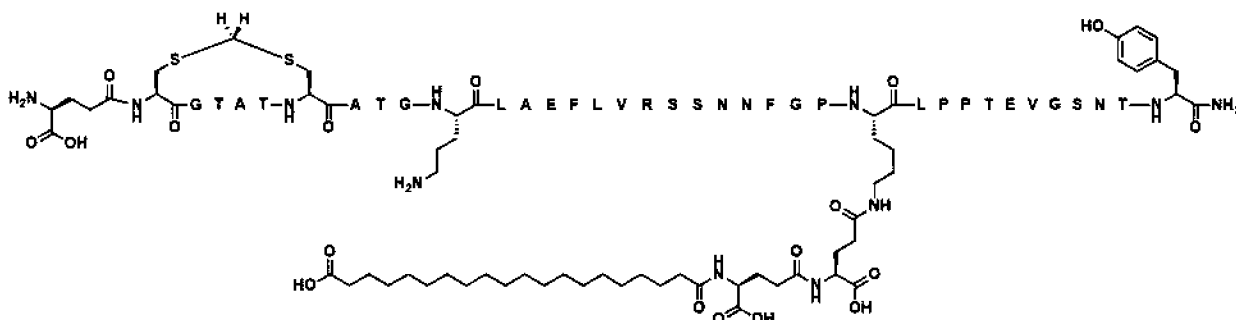
настоящем документе, состоит из следующей последовательности:  $\gamma$ E-CGTATCATG-Orn-

25 LAEFLVRSSNFGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где существует тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и где лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $\gamma$ E<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H (SEQ ID

NO:13). Ниже приведено изображение соединения XIII с использованием стандартных  
однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в  
30 положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной



группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, орнитина в положении 11, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



5 Соединение 13; SEQ ID NO: 13

В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:13 по меньшей мере от около 90% до около 99%. В альтернативном варианте соединение может иметь сходство последовательности с последовательностью SEQ ID NO:13 по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 10 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В настоящем описании предложено соединение, состоящее из SEQ ID NO:1, соединение, состоящее из SEQ ID NO:2, соединение, состоящее из SEQ ID NO:3, соединение, состоящее из SEQ ID NO:4, соединение, состоящее из SEQ ID NO:5, соединение, состоящее из SEQ ID NO:6, соединение, состоящее из SEQ ID NO:7, 15 соединение, состоящее из SEQ ID NO:8, соединение, состоящее из SEQ ID NO:9, соединение, состоящее из SEQ ID NO:10, соединение, состоящее из SEQ ID NO:11, соединение, состоящее из SEQ ID NO:12, и/или соединение, состоящее из SEQ ID NO:13, или его фармацевтически приемлемая соль. В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, содержащее SEQ ID NO:1, SEQ 20 ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14 или его фармацевтически приемлемую соль, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. В настоящем описании также предложена фармацевтическая композиция, содержащая 25 соединение, состоящее из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14 или его фармацевтически приемлемую соль, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

В настоящем описании дополнительно предложены соединения, содержащие SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, или их фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте осуществления в настоящем описании предложены соединения, состоящие из SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, или их фармацевтически приемлемая соль. Предпочтительно соединения с SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 содержат дисульфидный или тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7. Более предпочтительно соединения, содержащие SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, имеют тиоацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7 и присоединены к линкерному фрагменту жирной кислоты. Предпочтительно линкерный фрагмент жирной кислоты присоединен к лизину.

В настоящем описании предложен способ лечения диабета, ожирения, дислипидемии и/или НАСГ у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений, содержащих SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или их фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтических композиций, содержащих то же самое. В настоящем описании предложен способ снижения потребления пищи, снижения массы тела, снижения уровня глюкозы в крови, снижения содержания HbA1c и/или снижения содержания триглицеридов, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений, содержащих SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или их фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтических композиций, содержащих то же самое. Предпочтительно в настоящем описании предложен способ лечения диабета, ожирения, дислипидемии и/или НАСГ у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений, содержащих SEQ ID NO:2, или фармацевтических композиций, содержащих то же самое. Более предпочтительно в настоящем описании предложен способ лечения диабета у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений, содержащих SEQ ID NO:2, или фармацевтических композиций, содержащих то же самое. В альтернативном варианте в настоящем описании предложен способ лечения ожирения у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединений, содержащих SEQ ID NO:2, или фармацевтических композиций, содержащих то же самое.

В настоящей заявке предложены соединения, содержащие SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или их фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в терапии. В настоящей заявке дополнительно предложены соединения, содержащие SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или их фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в лечении диабета, ожирения, дислипидемии и/или НАСГ. В настоящей заявке также предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в терапии, лечении диабета, ожирения, дислипидемии и/или НАСГ. Более предпочтительно в настоящей заявке предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в лечении диабета. В альтернативном варианте в настоящей заявке предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в лечении ожирения. В альтернативном варианте в настоящей заявке предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в лечении дислипидемии. В альтернативном варианте в настоящей заявке предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль, или фармацевтические композиции, содержащие то же самое, для применения в лечении НАСГ.

В настоящей заявке предложены соединения, содержащие SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или их фармацевтически приемлемая соль, или композиции, содержащие то же самое, для применения для снижения потребления пищи, снижения массы тела, снижения уровня глюкозы в крови, снижения содержания HbA1c и/или снижения содержания триглицеридов. Более предпочтительно в настоящей заявке предложены соединения, содержащие SEQ ID NO:2, или их фармацевтически приемлемая соль, или композиции, содержащие то же самое, для применения для снижения потребления пищи,

снижения массы тела, снижения уровня глюкозы в крови, снижения содержания HbA1c и/или снижения содержания триглицеридов.

В настоящем описании дополнительно предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемая соль для производства лекарственного средства для лечения диабета, ожирения, дислипидемии и/или НАСГ. Предпочтительно в настоящем описании дополнительно предложено применение соединения, содержащего SEQ ID NO:2, для производства лекарственного средства для

лечения диабета, ожирения, дислипидемии и/или НАСГ. В настоящем описании дополнительно предложено применение соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для снижения потребления пищи, снижения массы тела, снижения уровня глюкозы в крови, снижения содержания HbA1c и/или снижения содержания триглицеридов. Предпочтительно в настоящем описании предложено применение соединения, содержащего SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для

снижения потребления пищи, снижения массы тела, снижения уровня глюкозы в крови, снижения содержания HbA1c и/или снижения содержания триглицеридов. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно использует специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем документе, можно применять на практике или при тестировании агонистов-пептидов амилина, фармацевтических композиций и способов, предпочтительные способы и материалы описаны в настоящем документе.

Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более одного элемента, если контекст явно не требует наличия одного и только одного элемента. Соответственно, термины в единственном числе, как правило, означают «по меньшей мере один».

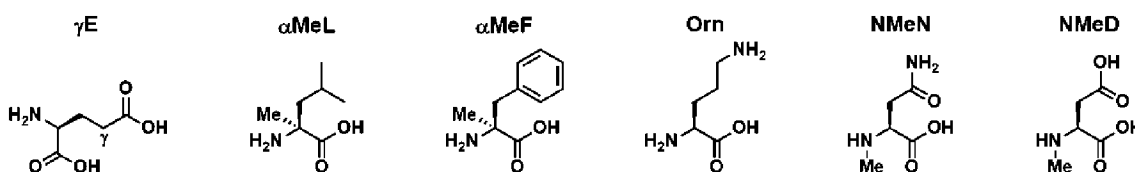
Используемый в контексте данного документа термин «около» означает в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, установленная концентрация, длина, молекулярная масса, рН, сходство

последовательности, временные рамки, температура, объем и т. д. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка величины, как правило, в пределах 20%, чаще в пределах 10% и даже более часто в пределах 5% от данного значения или диапазона.

Допустимое отклонение, включенное в термин «около», будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

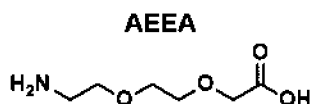
В контексте данного документа и в отношении одного или более рецепторов термины «активность», «активировать», «активирующий» и подобные означают активность соединения, такого как описанный в данном документе пептид, относительно связывания и индуцирования ответа у рецептора (-ов), что измеряется с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

В настоящем документе термин «аминокислота» обозначает как встречающиеся в природе аминокислоты, так и неcodируемые аминокислоты. Как известно из уровня техники, аминокислота представляет собой молекулу, которая с химической точки зрения характеризуется наличием одной или более аминогрупп и одной или более групп карбоновых кислот и может содержать другие функциональные группы. Кроме того, аминокислоты обычно обозначают с помощью стандартных однобуквенных кодов (например, L = лейцин), а также альфа-метилзамещенных остатков природных аминокислот (например,  $\alpha$ -метиллейцин или  $\alpha$ MeL и  $\alpha$ -метилфенилаланин или  $\alpha$ MeF) и некоторых других неcodируемых аминокислот, таких как « $\gamma$ E», «NMeN», «NMeD», «Orn» и т. п. Структуры неcodируемых аминокислот в соответствии с настоящим описанием представлены ниже:



Используемый в настоящем документе термин « $\gamma$ E» означает гамма-глутаминовую кислоту (когда пептидная связь образована с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении). В контексте настоящего документа «Orn» означает L-орнитин. В контексте настоящего документа « $\alpha$ MeL» означает альфа-метил-L-лейцин. В контексте настоящего документа « $\alpha$ MeF» означает альфа-метил-L-фенилаланин. В контексте настоящего документа «NMeN» означает N-метил-аспарагин и «NMeD» означает N-метил-аспарагиновую кислоту.

В контексте настоящего документа «АЕЕА» означает 2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]уксусную кислоту. Структура представлена ниже:



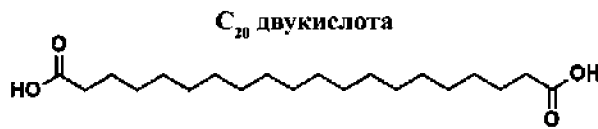
В контексте настоящего документа «агонист-пептид амилина» означает  
5 соединение, такое как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает по меньшей мере один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый нативным агонистом этого рецептора.

В контексте настоящего документа термин «длительный контроль веса» означает  
10 способ, с помощью которого субъект поддерживает снижение веса в качестве дополнения к снижению калорийности рациона и увеличению физической активности у лиц, которые в настоящее время или ранее характеризовались как страдающие ожирением.

Термин «диабет» относится к заболеванию, при котором способность организма  
вырабатывать или реагировать на гормон инсулин нарушена, что приводит к аномальному  
15 метаболизму углеводов и повышенному уровню глюкозы в крови и моче. В контексте настоящего документа термин «диабет» может относиться к хроническому состоянию, которое влияет на то, как организм перерабатывает сахар или глюкозу в крови, такому как сахарный диабет 2 типа (СД2); хроническому состоянию, при котором поджелудочная железа вырабатывает незначительное количество инсулина или не вырабатывает вовсе, такому как сахарный диабет 1 типа (СД1); состоянию, при котором содержание сахара в  
20 крови является высоким, но недостаточно высоким для диагностирования диабета 2 типа, такому как преддиабет; форме высокого содержания сахара в крови у беременных женщин, такому как гестационный диабет.

Термин «дислипидемия» относится к нарушению метаболизма липопротеинов,  
включая сверхпродукцию или дефицит липопротеинов. Дислипидемии могут проявляться  
25 повышением концентрации общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов и/или снижением концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в крови. Дислипидемия может развиваться или не развиваться в связи с диабетом.

В контексте настоящего документа термин «жирная кислота» состоит из прямой  
30 цепи с четным числом атомов углерода, с атомами водорода по всей длине цепи и карбоксильной группой (-COOH) на одном конце (монокислота) или на обоих концах (двукислота) цепи. В предпочтительном варианте осуществления фрагмент «жирной кислоты» представляет собой C<sub>20</sub> двукислоту.



В контексте настоящего документа термин «тиоацетальный мостик» относится к органическому синтезу тиоацетальной группы для функционального регенерирования мостиковой (-ых) дисульфидной (-ых) связи (-ей) в пептидных структурах. Тиоацетальный мостик (-S-CH<sub>2</sub>-S-) показан ниже с метиленовой группой, вставленной между двумя атомами серы.



Используемый в настоящем документе термин «лечение» или «лечить» относится к ведению пациента и уходу за пациентом, имеющим состояние, при котором показано введение агониста-пептида рецептора амилина с целью борьбы с симптомами и осложнениями состояния или их облегчения. Лечение включает введение соединения или фармацевтической композиции, содержащей соединение из описанных в настоящем изобретении соединений, пациенту, нуждающемуся в этом, для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения заболевания, состояния или расстройства. Предпочтительно лечение включает введение соединения или фармацевтической композиции, содержащей соединение в соответствии с настоящим описанием, пациенту, нуждающемуся в этом, для достижения чистой потери массы тела, уменьшения потребления пищи, снижения уровня глюкозы в крови, снижения содержания HbA<sub>1c</sub> и/или снижения уровня триглицеридов. Пациент, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее и, предпочтительно, человека.

В контексте настоящего документа термин «эффективное количество» означает количество или дозу одного или более соединений в соответствии с настоящим документом, которые при однократном или многократном введении субъекту, нуждающемуся в этом, обеспечивают желаемый эффект у такого субъекта, находящегося на диагностике или лечении (т. е. могут вызывать клинически измеримые различия в состоянии индивида, такие как, например, чистая потеря массы тела, уменьшение потребления пищи, снижение уровня глюкозы в крови, снижение содержания HbA<sub>1c</sub> и/или снижение уровней триглицеридов). Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники путем применения известных способов и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для данного субъекта учитывается ряд факторов, в том числе, но не ограничиваясь ими, вид млекопитающего, его размер,

возраст и общее состояние здоровья, конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение, степень поражения или тяжесть заболевания или нарушения, реакция субъекта, конкретное введенное соединение, способ введения, характеристики биодоступности вводимого препарата, выбранная схема введения дозы, применение 5 сопутствующих лекарственных препаратов и другие соответствующие обстоятельства. Предпочтительно эффективное количество соединения или фармацевтической композиции, содержащей соединение в соответствии с настоящим описанием, вводимое нуждающемуся в этом пациенту, должно приводить к чистой потере массы тела, уменьшению потребления пищи, снижению уровня глюкозы в крови и/или снижению 10 содержания HbA1c и/или уровня триглицеридов. Доза может включать в себя более высокую начальную нагрузочную дозу с последующей более низкой дозой. Эффективная доза соединений, предложенных в настоящем документе, может составлять от 0,05 мкг/кг до 5000 мкг/кг или от 0,01 нмоль/кг до 1000 нмоль/кг.

Используемый в контексте данного документа термин «период полувыведения» 15 или « $t_{1/2}$ » означает время, необходимое для того, чтобы половина количества соединения, такого как пептид, описанный в настоящем документе, была удалена из жидкости или другого физиологического пространства, такого как сыворотка или плазма субъекта, с помощью биологических процессов. В качестве альтернативы  $t_{1/2}$  также может означать время, за которое некоторое количество такого пептида теряет половину своей 20 фармакологической, физиологической или радиологической активности.

В контексте настоящего документа «полуМаксимальная эффективная концентрация» или « $EC_{50}$ » означает концентрацию соединения, которая приводит к 50% активации/стимуляции конечной точки анализа, такой как кривая зависимости доза-ответ.

Используемый в контексте данного документа термин «продолженного действия» 25 означает, что аффинность связывания и активность композиции, описанной в настоящем документе, сохраняется в течение периода времени, превышающего период времени, характерного для нативного пептида или белка, что позволяет вводить дозу реже, например, один раз в день или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю или ежемесячно. Профиль временного действия соединений, описанных в 30 настоящем документе, можно измерить с помощью известных способов фармакокинетических анализов, таких как те, которые описаны в приведенных ниже примерах.

Термин «НАСГ» относится к неалкогольному стеатогепатиту, также известному как жировая болезнь печени. «НАСГ» также относится к воспалению печени и 35 повреждению, вызванному накоплением жира в печени. «НАСГ» также относится к



подтипу неалкогольной жировой болезни печени («НАЖБП»). В некоторых вариантах реализации «НАСГ» может быть синонимом «НАЖБП».

Термин «ожирение», используемый в настоящем документе, относится к расстройству, связанному с избытком жира в организме, которое увеличивает риск возникновения проблем со здоровьем. Термин «ожирение» также относится к массе тела, превышающей нормальную массу тела для данного роста. Термин «ожирение» также относится к ИМТ более 30,0 или ИМТ 27,0 или более (избыточный вес) в сопровождении по меньшей мере одного связанного с весом коморбидного состояния (например, гипертензия, сахарный диабет 2 типа или дислипидемия).

Используемый в настоящем документе индекс массы тела (ИМТ) относится к массе тела человека в килограммах, деленному на квадрат роста в метрах.

Используемые в контексте настоящего документа термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо и обозначают млекопитающее, предпочтительно человека. В некоторых вариантах реализации пациент, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется заболеванием, расстройством или состоянием, при котором было бы благоприятным введение соединения, выступающего агонистом как рецепторов амилина, так и рецепторов кальцитонина.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие описанные в настоящем документе соединения, можно вводить перорально пациентам, нуждающимся в таком лечении. Фармацевтические композиции, содержащие описанные в настоящем документе соединения, можно вводить парентерально пациентам, нуждающимся в таком лечении. Парентеральное введение может осуществляться путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или механического инжектора. В качестве альтернативы, парентеральное введение может быть осуществлено с помощью инфузионного насоса. В вариантах реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, подходящие для введения пациенту, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению и одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из множества способов с применением традиционных эксципиентов для фармацевтических продуктов, хорошо известных в данной области техники. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, PA, USA (2006)).

Используемый в контексте данного документа термин «сходство последовательностей» означает количественное свойство двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей биологических соединений, такое как, например, соответствие по всей длине или окна сравнения двух или более последовательностей. Сходство последовательностей можно измерить по (1) проценту идентичности или (2) проценту сходства. Процент идентичности измеряет процент остатков, идентичных у двух биологических соединений, деленный на длину самой короткой последовательности; тогда как процент сходства измеряет идентичность и, кроме того, включает в оценку пробелы в последовательностях и сходство остатков. Способы и алгоритмы определения сходства последовательностей хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости в их исчерпывающем описании в данном документе. Установленный процент идентичных положений нуклеотидов или аминокислот составляет по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 86%, 76%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше.

Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более дополнительных терапевтических агентов, которые полезны для стимулирования потери массы, лечения диабета, состояний, связанных с диабетом, ожирения и/или длительного контроля веса, дислипидемии и/или НАСГ. Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать с заявленными соединениями, включают: инсулин или аналоги инсулина; бигуаниды; сульфонилмочевины; тиазолидиндионы; ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (DPP-4); натрий-зависимые ингибиторы транспортера глюкозы (SGLT2); соединения инкретина, такие как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) или аналоги GLP-1, желудочный ингибиторный полипептид (GIP) или аналоги GIP, оксинтомодулин или аналоги оксинтомодулина; соединения-агонисты фактора роста и дифференцировки-15 (GDF15); аналоги пептида YY (PYY); двойные агонисты GIP/GLP-1; тройные агонисты Gcg/GIP/GLP-1 (тройные агонисты глюкагона, GIP и GLP-1); или комбинацию любых из вышеизложенных агентов. Заявленные соединения и дополнительный (-ые) терапевтический (-ие) агент (-ы) могут быть введены совместно при помощи одного и того же способа и устройства доставки, например одного драже, капсулы, таблетки или инъекционной лекарственной формы; или введены по отдельности в одно и то же время при помощи отдельных устройств или способов доставки; или введены последовательно.

Другой вариант осуществления настоящего описания представляет собой способ лечения состояния у нуждающегося в этом пациента, выбранного из группы, состоящей из диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий введение пациенту эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством инкретина или аналога инкретина. Предпочтительно в варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения состояния у нуждающегося в этом пациента, выбранного из группы, состоящей из диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий введение пациенту эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством инкретина или аналога инкретина.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения состояния у нуждающегося в этом пациента, выбранного из группы, состоящей из диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с агонистом GLP-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с агонистом GLP-1, содержащим соединение XVII (SEQ ID NO:18). В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с агонистом GLP-1, содержащим соединение XVII (SEQ ID NO:18).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID

NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с аналогом оксинтомодулина. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту,

5 нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с аналогом оксинтомодулина, содержащего соединение XVIII (SEQ ID NO:19). В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения

10 пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с аналогом оксинтомодулина, содержащим соединение XVIII (SEQ ID NO:19).

15 В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID

20 NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с тройным агонистом глюкагона, GIP и GLP-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения,

25 содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с тройным агонистом глюкагона, GIP и GLP-1, содержащим соединение XIX (SEQ ID NO:20). В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения

30 предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с тройным агонистом глюкагона, GIP и GLP-1, содержащим соединением XIX (SEQ ID NO:20).

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ

5 ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с двойным агонистом GIP/GLP-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту,

10 нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с двойным агонистом GIP/GLP-1, содержащим SEQ ID NO:21. В другом конкретном

15 варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с двойным агонистом GIP/GLP-1, содержащим SEQ ID NO:21.

20 В другом варианте осуществления настоящего изобретения предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14, или его фармацевтически приемлемая соль для применения отдельно, одновременно или в последовательной

25 комбинации с инкретином или аналогом инкретина для лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии. Предпочтительно в другом варианте осуществления настоящего изобретения предложено соединение, содержащее SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль для применения отдельно, одновременно или в последовательной комбинации с инкретином или аналогом инкретина для лечения диабета, ожирения, НАСГ

30 и/или дислипидемии. Более предпочтительно инкретин или аналог инкретина представляет собой двойной агонист GIP/GLP-1, содержащий SEQ ID NO:21.

Некоторые сокращения, используемые в настоящем документе, имеют следующие определения: «АСN» означает ацетонитрил; «AMY1R» означает рецептор амилина 1; «цАМФ» означает циклический аденозинмонофосфат; «СТ» означает кальцитонин;

35 «ДХМ» означает дихлорметан; «DIEA» означает диизопропилэтиламин; «ДМФА»

означает *N,N*-диметилформаид; «ДМСО» означает диметилсульфоксид; «DODT»  
означает 2,2'-(этилендиокси)диэтанэтиол; «FBS» означает эмбриональную бычью  
сыворотку; «Fmoc» означает фторэтилметилоксикарбонил; «GDF15» означает  
коэффициент дифференцировки роста 15; «GPCR» означает сопряженный (-ые) с G-  
5 белком рецептор (-ы) «HEPES» означает 4-(2-гидроксиэтил)-1-  
пиперазинетансульфовую кислоту; «HTRF» означает гомогенную флуоресценцию с  
временным разрешением; «IBMX» означает 1-метил-3-изобутилксантин; «MEM» означает  
минимальную питательную среду; «Mtt» означает 4-метилтретил; «НАСГ» означает  
неалкогольную жировую болезнь печени; «NEAA» означает заменимую аминокислоту;  
10 «РуАОР» означает (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфоновый  
гексафторфосфат; «ОФ-ВЭЖХ» означает обращенно-фазовую жидкостную  
хроматографию высокого давления; «ТСЕР» означает трис(2-  
карбоксиэтил)фосфингидрохлорид; «TFA» означает трифторуксусную кислоту; и «TRIS»  
означает трис(гидроксиметил)аминометан.

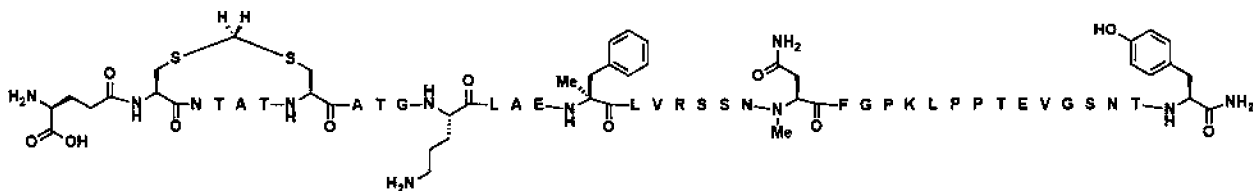
15

### **Пример 1. Получение и очистка соединений I и II**

Соединение I и соединение II получают в соответствии со следующими стадиями.  
Сначала синтезируют соединение I (SEQ ID NO:1) с использованием химии  
флуоренилметилоксикарбонила (Fmoc)/трет-бутила (t-Bu) на 12-канальном  
20 мультиплексном синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies, Inc., г. Тусон,  
штат Аризона, США).

Полистирольную смолу Ринка-МВНА LL (Novabiochem, sub: 0,35 мЭкв/г, 100–  
200 меш, кат. № 855045) используют для синтеза в масштабе 0,13 ммоль. Используют  
стандартные защитные группы боковой цепи. Boc-Glu-OtBu используют для положения 1.  
25 Fmoc-Lys(Mtt)-ОН используют для лизина в положении 26. Удаляют группы Fmoc перед  
каждой стадией сочетания (2 × 7 минут) с использованием 20% пиперидина в ДМФА. Все  
сочетания аминокислот выполняют в течение 30 минут при 60 °С с использованием  
равного молярного соотношения аминокислоты Fmoc (0,3 М), диизопропилкарбодиимида  
(0,9 М) и Охута (0,9 М) при 7,7-кратном молярном избытке по сравнению с  
30 теоретической загрузкой пептида. Аминокислотные соединения после αMeF в положении  
15 и NMeN в положении 22 выполняют в течение 3 часов и 6 часов соответственно при  
60 °С. Для соединения I (SEQ ID NO:1) смолу в это время обрабатывают расщепляющим  
коктейлем (условия, описанные после процедур добавления линкерного фрагмента  
жирной кислоты для получения соединения II). Ниже приведено схематическое  
35 изображение соединения I (SEQ ID SEQ:1) с использованием стандартных однобуквенных

аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeN в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение I; SEQ ID NO:1

Затем смолу 6 раз тщательно промывали ДХМ для удаления остаточного ДМФА.

10 Защитную группу Mtt на лизине в положении 26 селективно удаляли из пептидной смолы с помощью двух обработок 30% гексафторизопропанолом (Oakwood Chemicals) в ДХМ ( $2 \times 40$ -минутная обработка). Последующее присоединение линкерного фрагмента жирной кислоты осуществляли путем сочетания  $\alpha$ -трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), моно-OtBu-эйкозановой кислоты (WuXi AppTec, Шанхай, Китай). Используют 3-кратный избыток реагентов (AA:PyAOP: DIEA=1: 1 : 1 моль/моль) для каждого соединения длиной 1 час.

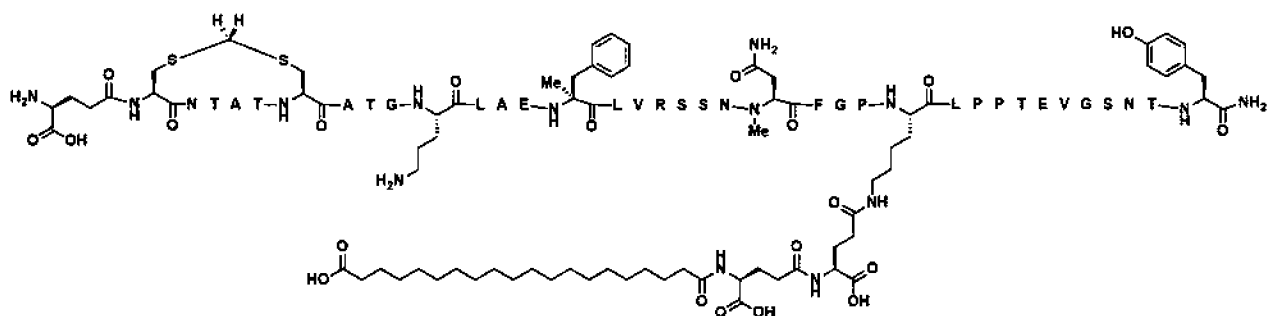
После завершения синтеза пептидную смолу промывают ДХМ и затем тщательно высушивают на воздухе. Сухую смолу обрабатывают 10 мл расщепляющего коктейля (TFA: DODT: TIS: H<sub>2</sub>O = 89 : 3 : 3 : 5 об/об) в течение 2 часов при комнатной температуре.

20 Смолу отфильтровывают, дважды промывают чистой трифторуксусной кислотой (по 2 мл) и объединенные фильтраты 4-кратно обрабатывают холодным диэтиловым эфиром (-20 °C) для осаждения неочищенного пептида. Затем пептид-этиловую суспензию центрифугируют при 3500 об/мин в течение 2 минут с получением твердого осадка, супернатант декантируют и твердый осадок растирают с эфиром еще два раза. Для

25 получения тиоацетального мостика осадок после сушки на воздухе растворяют в 5 мл 20 mM фосфатно-калиевого буфера и 3 мл ACN. После полного растворения при тщательном перемешивании добавляют TCEP в H<sub>2</sub>O (30 мкМ, 5 экв.), дийодметан (8 экв.) и триэтиламин (10 экв.) и оставляют перемешиваться в течение 5–30 минут. ЖХМС используют для контроля реакции, которая обычно завершается через 5 минут. После

30 завершения реакции в смесь добавляют 1 мл H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA вместе с 6 мл уксусной кислоты. При необходимости добавляют дополнительное количество ACN, если раствор остается мутным.

Неочищенный пептид очищают с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Phenomenex PhenylHexyl (5 мкм, 100А, 250 x 21,2 мм, номер: 00G-4257-P0-AX) с линейным градиентом с использованием 100% ацетонитрила и буферной системы 0,1%TFA/вода. Чистоту пептида оценивают с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ с использованием колонки Waters SymmetryShield RP18 (3,5 мкм, 6 × 100 мм, часть 186000179) и критериями пула >95%. Было обнаружено, что чистота основного пула соединения II (SEQ ID NO:2) составляет >98,4%. В результате последующей лиофилизации конечного основного пула продуктов получали лиофилизированную ТФУ соль пептида. Молекулярную массу соединения I (SEQ ID NO:1) определяют методом ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1315,2$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1315,5$ ; найденная ММ (средн.) = 3942,6; рассчитано: ММ (средн.) = 3943,4). Молекулярную массу соединения II (SEQ ID NO:2) определяют методом ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1509,5$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1509,7$ ; найденная ММ (средн.) = 4525,5; рассчитано: ММ (средн.) = 4526,1). Ниже приведено схематическое изображение соединения II (SEQ ID NO:2) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ Е) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислоты боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Огп в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeN в положении 22, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



20

Соединение II; SEQ ID NO:2

Процессы, аналогичные описанным выше и известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для синтеза пептидного остова, конъюгации фрагмента жирная кислота-линкер, проверки чистоты и подтверждения молекулярной массы описанных в настоящем документе соединений согласно изобретению.

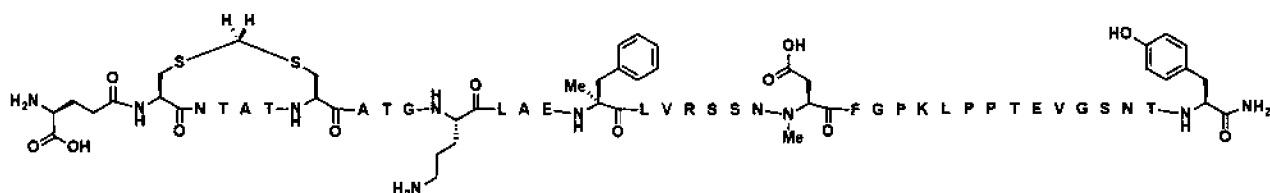
25

## Пример 2. Получение и очистка соединений III и IV

Соединения III и IV получают в соответствии с процессами, описанными в примере 1.



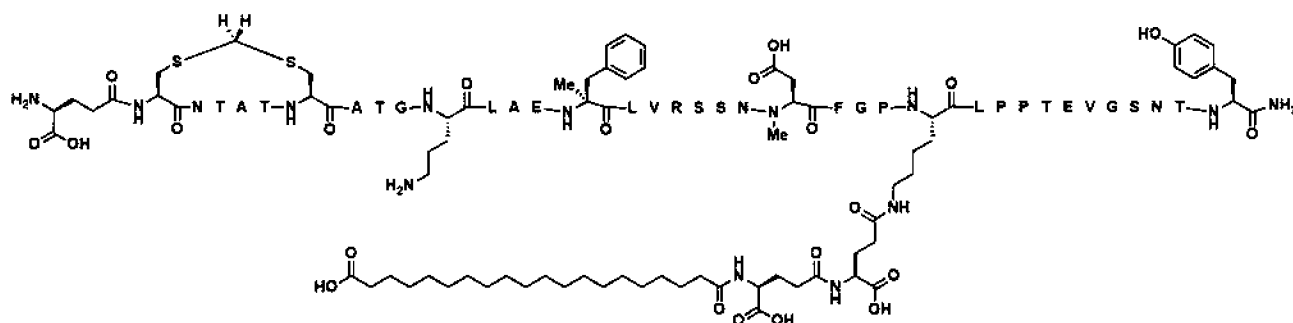
Ниже приведено схематическое изображение соединения I (SEQ ID SEQ:3) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (причем пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение III; SEQ ID NO:3

- 10 Молекулярную массу соединения III (SEQ ID NO:3) определяют методом ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1314,9$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1315,8$ ; найденная ММ (средн.) = 3941,7; рассчитано: ММ (средн.) = 3944,4).

Ниже приведено схематическое изображение соединения IV (SEQ ID NO:4) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



20

Соединение IV; SEQ ID NO:4

Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1509,7$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1510,0$ ; найденная ММ (средн.) = 4526,1; рассчитано: ММ (средн.) = 4527,1).

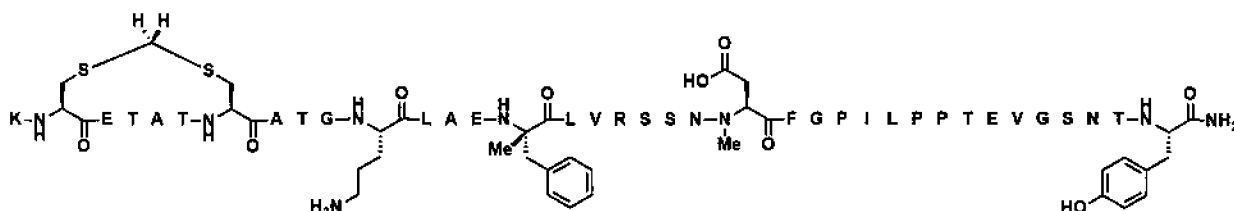
25

**Пример 3. Получение и очистка соединения V и VI**

Соединения V и VI получают в соответствии с процессами, описанными в примере

1.

Ниже приведено схематическое изображение соединения V (SEQ ID NO:5) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:

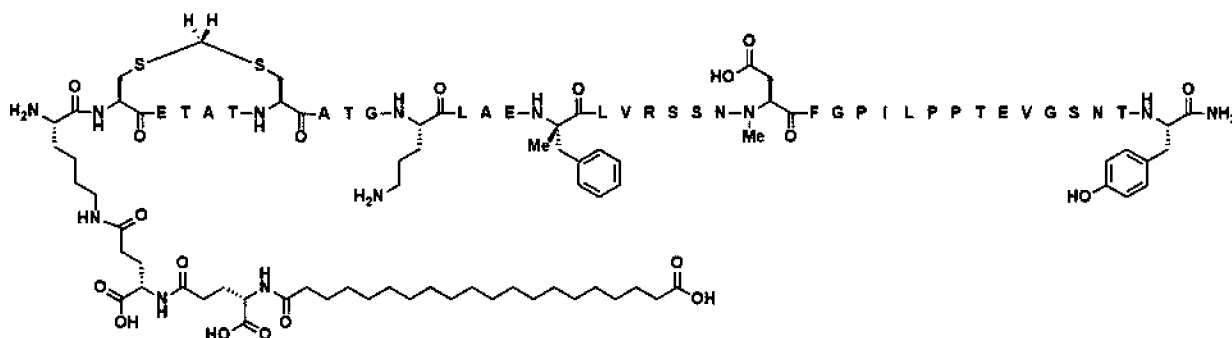


Соединение V; SEQ ID NO:5

10

Молекулярную массу соединения V (SEQ ID NO:5) определяют методом ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1314,9$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1315,5$ ; найденная ММ (средн.) = 3941,7; рассчитано: ММ (средн.) = 3943,4).

Ниже приведено схематическое изображение соединения VI (SEQ ID NO:6) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением лизина в положении 1, цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeF в положении 15, NMeD в положении 22 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



20 Соединение VI; SEQ ID NO:6

Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС(найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1509,4$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1509,7$ ; найденная ММ (средн.) = 4525,2; рассчитано: ММ (средн.) = 4526,1).

25

**Пример 4. Получение и очистка соединения VII и VIII**

Соединения VII и VIII получают в соответствии с процессами, описанными в примере 1.

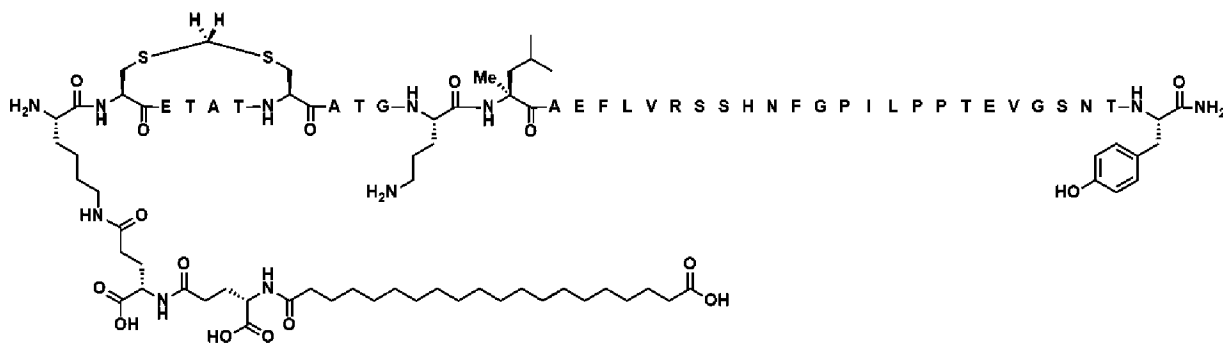
Ниже приведено схематическое изображение соединения VII (SEQ ID NO:7) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeL в положении 12 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение VII; SEQ ID NO:7

Молекулярную массу соединения VII (SEQ ID NO:7) определяют методом ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1317,9$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1318,1$ ; найденная ММ (средн.) = 3950,7; рассчитано: ММ (средн.) = 3951,4).

Ниже приведено схематическое изображение соединения VIII (SEQ ID NO:8) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением лизина в положении 1, цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11,  $\alpha$ MeL в положении 12 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение VIII; SEQ ID NO:8

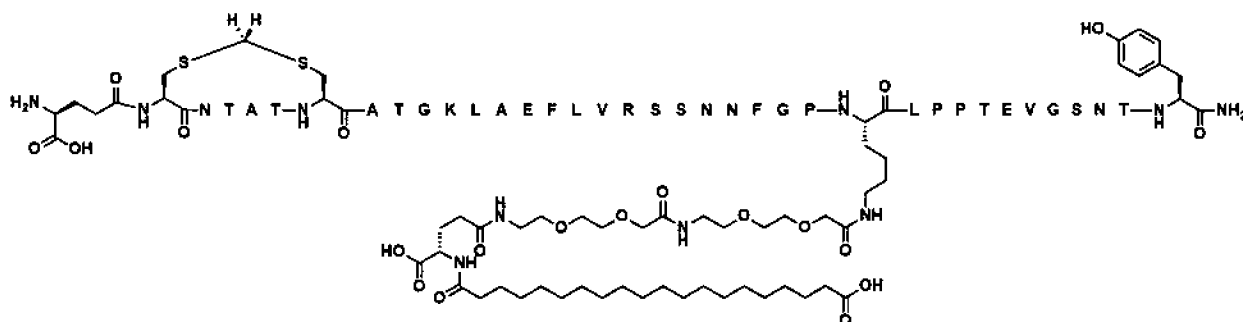
Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС (найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1512,2$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1512,4$ ; найденная ММ (средн.) = 4533,6; рассчитано: ММ (средн.) = 4534,2).

### Пример 5. Получение и очистка соединения IX

Соединение IX получают в соответствии с процессами, описанными в примере 1.

Ниже приведено схематическое изображение соединения IX (SEQ ID NO:9) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением

глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



5

Соединение IX; SEQ ID NO:9

Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС(найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1558,3$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1558,8$ ; найденная ММ (средн.) = 4671,9; рассчитано: ММ (средн.) = 4673,3).

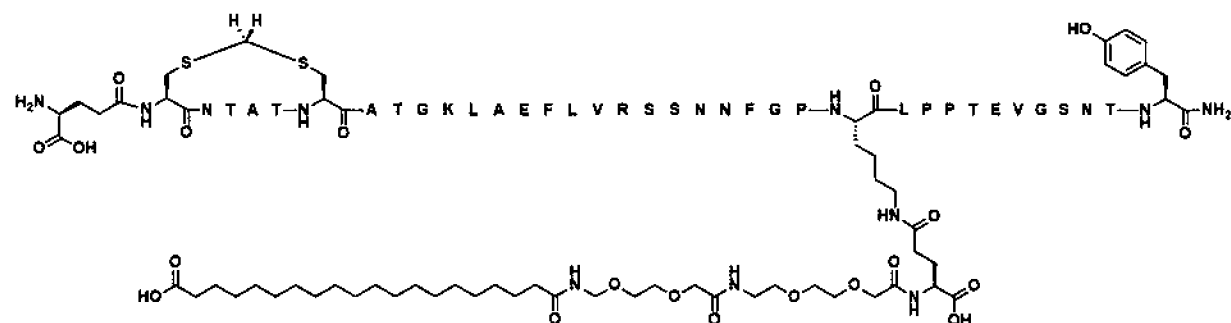
10

### Пример 6. Получение и очистка соединения X

Соединение X получают в соответствии с процессами, описанными в примере 1.

Ниже приведено схематическое изображение соединения X (SEQ ID NO:10) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma$ E) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:

15



20

Соединение X; SEQ ID NO:10

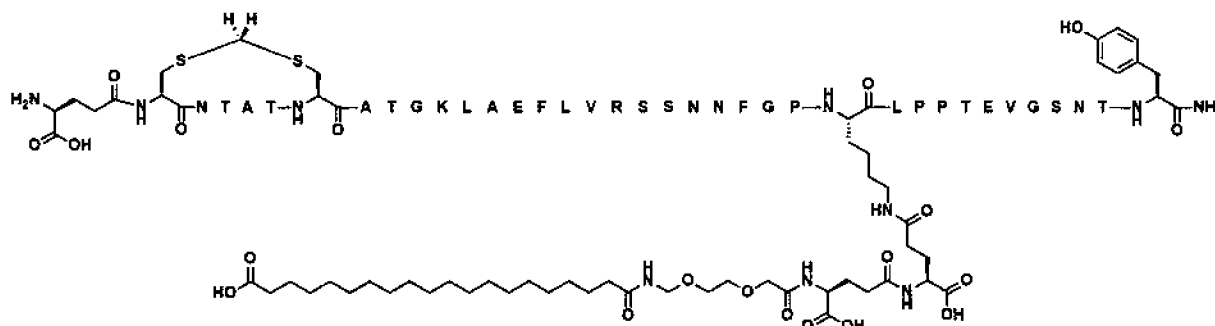
Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС(найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1558,5$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1558,8$ ; найденная ММ (средн.) = 4672,5; рассчитано: ММ (средн.) = 4673,3).

25

### Пример 7. Получение и очистка соединения XI

Соединения V и XI получают в соответствии с процессами, описанными в примере 1.

Ниже приведено схематическое изображение соединения XI (SEQ ID NO:11) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma E$ ) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение XI; SEQ ID NO:11

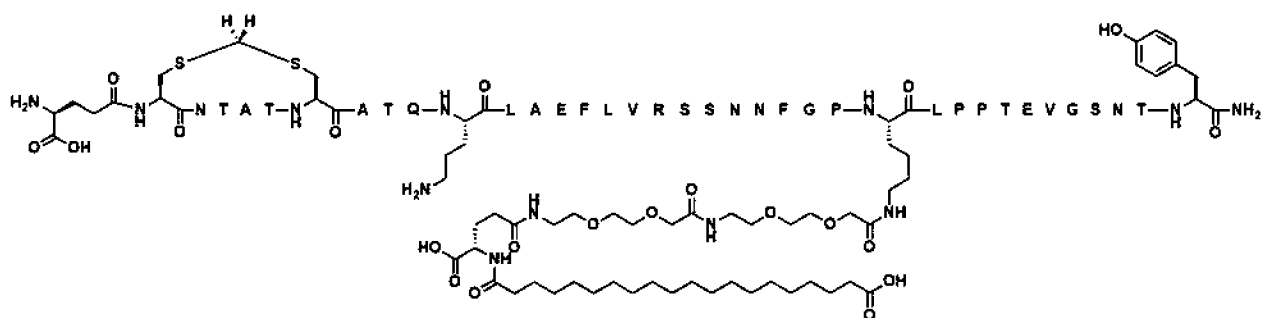
Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС (найденно:  $[M+3H]^{3+} = 1553,2$ ; рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1553,4$ ; найденная ММ (средн.) = 4656,6; рассчитано: ММ (средн.) = 4657,2).

### Пример 8. Получение и очистка соединения XII

Соединения V и XII получают в соответствии с процессами, описанными в примере 1.

Ниже приведено схематическое изображение соединения XII (SEQ ID NO:12) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma E$ ) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:

25



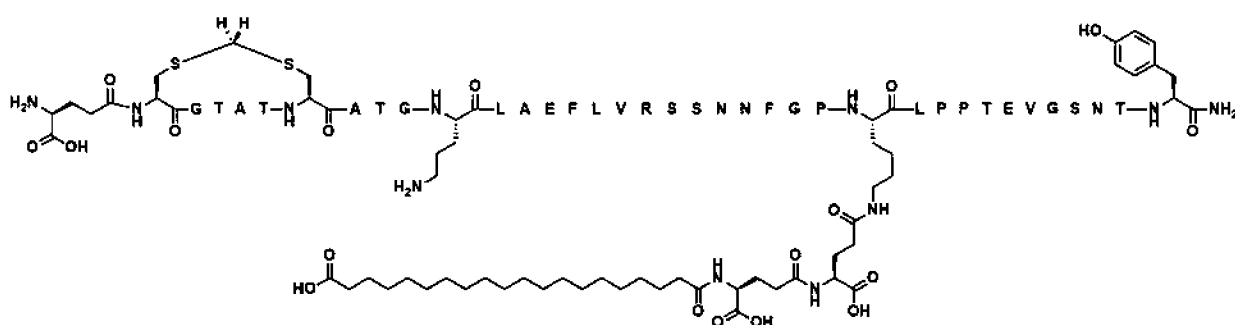
Соединение XII; SEQ ID NO:12

Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС(найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1577,4$ ;  
 5 рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1577,8$ ; найденная ММ (средн.) = 4729,2; рассчитано: ММ (средн.) = 4730,3).

### Пример 9. Получение и очистка соединения XIII

Соединения V и XIII получают в соответствии с процессами, описанными в  
 10 примере 1.

Ниже приведено схематическое изображение соединения XIII (SEQ ID NO:13) с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением глутаминовой кислоты ( $\gamma E$ ) в положении 1 (когда пептидная связь образуется с помощью карбоксильной кислотной группы боковой цепи в гамма-положении, а не в типичном  
 15 альфа-положении), цистеинов в положениях 2 и 7, Orn в положении 11, лизина в положении 26 и тирозина в положении 37, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Соединение XIII; SEQ ID NO: 13

Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС(найдено:  $[M+3H]^{3+} = 1481,2$ ;  
 20 рассчитано:  $[M+3H]^{3+} = 1481,3$ ; найденная ММ (средн.) = 1440,6; рассчитано: ММ (средн.) = 4441,0).

### Получение дисульфидного мостика

Для получения дисульфидной связи готовят окислительный раствор, добавляя 10 капель раствора йода (2% йод в АсОН) к 40 мл 20% MeCN/20% АсОН/60% воды в колбу. Отдельно пептидный раствор получают путем растворения пептидного осадка после сушки на воздухе в 5 мл АсОН. При перемешивании пептидный раствор добавляют по каплям к окислительному раствору. При необходимости добавляют дополнительное количество йода (2% йод в АсОН) для поддержания светло-желтого раствора в колбе. Светло-коричневый/желтый цвет сохраняется в течение 5 мин после добавления всего пептидного раствора. Дополнительный йод нейтрализуют путем добавления одной капли насыщенной аскорбиновой кислоты к окислительному раствору. Раствор фильтруют с помощью 0,45 мкм фильтра, затем пептид готов к очистке.

### **Пример 10. Функциональная активность агонистов-пептидов амилина *in vitro***

Рецепторы AMY1 и СТ представляют собой GPCR, которые функционально связаны с белками Gas. Стимуляция этих рецепторов приводит к увеличению продукции внутриклеточного цАМФ, что можно обнаружить с помощью стандартных технологий *in vitro*. Активность пептидов *in vitro* определяют по количеству цАМФ, образующегося в клетках со сверхэкспрессией AMY1R и CTR человека.

Рецепторы СТ человека стабильно экспрессируются в клетках мочевого пузыря человека (UM-UC-3 или UMUC3) под контролем вектора экспрессии pcDNA. Клеточную линию UMUC3 культивируют в MEM 1X (Mediatech Inc., 17-305-CV) с добавлением 10% FBS, 1% раствора антибиотика/антимикотика, 1 мМ пирувата натрия, 1X MEM NEAA, 1X GlutaMAX-I. Плазмида ДНК СТ-а-pcDNA3.1Hygro(+)(T2616) человека трансфицируется в клетки UMUC3 с использованием реагента для трансфекции LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, 11668-019). Через 20 дней после отбора измеряют уровни мРНК из разных клонов для подтверждения экспрессии hCTR. Чтобы определить функцию клеток со сверхэкспрессией hCTR, измеряют внутриклеточные уровни цАМФ в ответ на кальцитонин лосося и сравнивают с экспрессией мРНК hCTR в каждом клоне.

Стабильные клеточные линии AMY1R человека получают путем дальнейшей трансфекции RAMP1-pCMVpuroPB (T14213) человека в клетки клонов hCTR UMUC3. После отбора измеряют уровни мРНК RAMP1 человека из разных клонов для подтверждения экспрессии AMY1R человека.

Клетки hAMY1R культивируют в среде MEM 1X (Corning) с добавлением 10% FBS, 1% раствора антибиотика/антимикотика, 1 мМ пирувата натрия, 1X MEM NEAA, 1X GlutaMAX-I, 200 мкг/мл гигромицина В и 0,4 мкг/мл пурамицина. Клетки hCTR культивируют в той же среде, за исключением того, что в ней отсутствует

пурамицин. Культивируемые клетки выращивают до 70% слияния, а затем инкубируют в течение ночи со свежей средой.

В день анализа 10 мкл буфера для анализа (MEM без фенолового красного (Corning, кат. № 17-305-CV), 0,1% казеина, 0,5 мМ IBMX, 5 мМ HEPES, pH 7,4) вносят в 5 каждую лунку белого 384-луночного планшета, покрытого поли-D-лизином (Corning, кат. № 354661). Пептиды, разведенные в ДМСО, добавляют (200 нл/лунку) в серии разведений 1 : 3 с использованием акустического жидкостного обработчика ECHO (Beckman). Культивируемые клетки отделяют с помощью TrypLE Express (Gibco), ресуспендируют в буфере для анализа и в каждую лунку вносят 10 мкл, содержащих 1200 клеток/лунку 10 (hCTR) или 1500 клеток/лунку (hAMY1R). Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа.

Количество внутриклеточного цАМФ количественно определяют с использованием технологии HTRF (гомогенная флуоресценция с временным разрешением; Cisbio) в соответствии с инструкциями поставщика. Вкратце, 10 мкл 15 конъюгата цАМФ-d2 и 10 мкл конъюгата анти-цАМФ-криптан в лизирующем буфере инкубируют с обработанными клетками при комнатной температуре в течение 60 мин. Сигнал HTRF немедленно обнаруживают с использованием планшет-ридера Envision (Perkin-Elmer) для расчета соотношения флуоресценции при 665–620 нм. Исходные 20 данные преобразовывают в количество цАМФ (пмоль/лунку), используя стандартную кривую цАМФ, построенную для каждого эксперимента. Относительные значения EC<sub>50</sub> рассчитывают из верхнего и нижнего диапазона кривой концентрация-ответ, определенной с использованием 1 нМ СТ лосося (Bachem) в качестве максимума и только 25 буфера в качестве минимума с помощью программы подбора 4-параметрической логистической кривой (Genedata Screener<sup>®</sup> v12.0.4). Соединения в соответствии с настоящей заявкой проявляют селективную активность в отношении рецептора амилина по сравнению с рецептором кальцитонина, как показано в таблице 1.

**Таблица 1. Сравнение данных функциональной активности у рецепторов амилина и кальцитонина**

Номер соединения	hAMY1R цАМФ EC <sub>50</sub> (пМ, ±SE)	hCTR цАМФ EC <sub>50</sub> (пМ, ±SE)
I	133 ± 12	18 000 ± 1080
II	75 ± 12	2340 ± 272
III	156 ± 27	16 300 ± 3030
IV	107 ± 16	6140 ± 764
V	139 ± 17	17 000 ± 2440
VI	107 ± 15	13 200 ± 2230



VII	173 ± 34	11 900 ± 1530
VIII	107 ± 20	9690 ± 2010
IX	132 ± 20	18 900 ± 3830
X	80 ± 13	14 000 ± 3320
XI	38 ± 7,8	10 500 ± 2200
XII	113 ± 34	25 900 ± 7620
XIII	78 ± 14	9490 ± 1540
XV	43 ± 4,4	2400 ± 402
XVI	393 ± 51	103 ± 20

### Пример 11. Аффинность связывания агонистов-пептидов амилина с рецепторами hAMY1 и hCT *in vitro*

Мембраны из AMY1R человека и клеток со сверхэкспрессией CTR (описанные в примере 10) выделяли стандартным способом и использовали для анализа связывания. Равновесные константы диссоциации (Kd) для различных взаимодействий рецептор/радиолиганд определяют из анализа связывания при насыщении с использованием тех же реагентов и буферов, которые описаны ниже для исследования соединений. Значения Kd, определенные для препаратов рецепторов, используемых в данном исследовании, являются следующими: hAMY1R, 0,067 нМ; рецептор кальцитонина человека (hCTR), 0,046 нМ.

#### Протокол связывания hAMY1R

Аффинность связывания рецептора (Ki) rAMY, hCT и агонистов-пептидов hAMY определяют в ходе конкурентного избирательного анализа радиолигандного связывания. Буфер для анализа состоит из (в mM) 50 HEPES, pH 7,1, 5 MgCl<sub>2</sub> 5 KCl, 0,2% (масс./об.) бацитрацина, 0,003% (масс./об.) сапонины и используется для разбавления препарата радиолиганда и мембраны. Реакции связывания проводят в общем реакционном объеме 0,1 мл в полистироловом глубоком 96-луночном блоке для анализа. Иодированный амилин крысы (синтез под заказ ViTrax; 2200 Ci/ммоль; 125I-rAMY) первоначально разводят до приблизительно 50 пМ в буфере для анализа. Исследуемые соединения и неспецифическое связывание (NSB, определяемое как 300 нМ rAMY) добавляют к аликвотам радиоактивного буфера. Вкратце, тестируемые соединения разводят до 200 нМ начальной концентрации, серийно разводят в 4 стадии в 125I-rAMY, а затем 0,05 мл разбавленного тестируемого соединения, NSB или общего связывания (определяемого как чистый 125I-rAMY) переносят в полистироловый 96-луночный блок для анализа. Реакцию связывания инициируют добавлением 0,05 мл 200 мкг/мл hAMY1R, разбавленного в буфере для анализа, к радиоактивности. Блоки для анализа осторожно встряхивают, герметизируют парафином и инкубируют при комнатной температуре в течение

приблизительно 20 часов. За тридцать минут до завершения инкубации плоские фильтры (фильтр Perkin Elmer, кат. № 1450-421) пропитывают в растворе, состоящем из буфера для анализа без сапонины, но с добавлением 0,1% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина без жирных кислот (FAF-BSA) и 0,5% (об./об.) полиэтиленимина (PEI). По окончании инкубации связанный лиганд отделяют от свободного путем добавления 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 леяного закалочного буфера, состоящего из 100 мМ NaCl, 50 мМ TRIS-HCl, pH 7,1, и сразу же собирают на плоский фильтр путем вакуумной фильтрации с помощью 96-луночного фильтра-сборщика ТомТес по следующему протоколу фильтрации (время высыхания, 7; повтор цикла 3, 0; время промывки, 1; время пропитки, 1; 1-е время аспирации, 4; время промывки/аспирации, 7; 2-е время аспирации, 4; давление воздуха 2 PSI). Конечный диапазон концентраций в анализе для пептидов, протестированных в кривых ответа, составляет 100 нМ – 0,00038 нМ.

#### *Протокол связывания hCTR*

15 Аффинность связывания рецептора (Ki) rAMY, hCT и агонистов-пептидов hAMY на мембранах hCTR определяют в ходе конкурентного избирательного анализа радиолигандного связывания. Процедуры анализа аналогичны анализу связывания hAMY1R, за исключением использования 125I-hCT (синтез на заказ ViTrax; 2200 Ci/ммоль) в качестве горячего лиганда. Реакции связывания проводят в общем 20  
 25  
 реакционном объеме 0,2 мл с 14 пМ 125I-hCT и 20 мкг/мл мембраны hCTR и инкубируют в течение 20 часов. Конечный диапазон концентраций в анализе для пептидов, протестированных в кривых ответа, составляет 2500 нМ – 0,00128 нМ. Соединения в соответствии с настоящей заявкой проявляют селективную активность в отношении рецептора амилина по сравнению с рецептором кальцитонина, как показано в таблице 2.

**Таблица 2. Связывание (Ki) в рецепторах амилина и кальцитонина человека *in vitro***

Номер соединения	hAMY1R, Ki (нМ ± SE)	hCTR, Ki (нМ ± SE)
II	0,017 ± 0,006	202 ± 45
IV	0,0296 ± 0,0099	665 ± 113
VI	0,0445 ± 0,0082	235 ± 45
VIII	0,0435 ± 0,0072	927 ± 120
XV	0,0196 ± 0,0020	0,256 ± 0,087
XVI	0,701 ± 0,148	0,104 ± 0,043

**Пример 12. Влияние *in vivo* на потребление пищи и массу тела у нормальных крыс**

Самцов крыс линии Спрег-Доули от компании Envigo RMS (Индианаполис, штат Индиана) удерживают на кормовом рационе (2014; Teklad Global, Envigo RMS, Индианаполис, штат Индиана) и при индивидуальном размещении в помещении с контролируемой температурой (72,0 °F; 22,2 °C) с обратным 12:12-часовым световым циклом (10:00 ВЫКЛ.) и свободным доступом к пище и воде. В возрасте 10 недель регистрируют массу тела при условии отсутствия голодания и начальную массу пищи и животным вводят однократную подкожную инъекцию носителя или ацилированного пептида (1 мл/кг) с последующими ежедневными измерениями массы тела и потребления пищи в течение 4 дней после введения дозы. Площадь под анализируемой кривой зависимости (AUC) рассчитывается как для массы тела, так и для потребления пищи, в зависимости от носителя.

**Таблица 3. Изменения массы тела и потребления пищи в течение 4 дней у крыс линии Спрег-Доули после однократной дозы агониста-пептида амилина с длительным сроком действия**

Номер соединения	Доза (нмоль/кг, подкожно)	$\Delta$ массы тела (%)*	Совокупное ингибирование потребления пищи (%)**
II	0,1	1,8	-4,1
	0,3	2,4	-3,7
	1	0,5	-18,6
	3	-3,3	-37,9
	10	-7,4	-57,3
	30	-10,1	-69,8
	100	-12,9	-77,9
	300	-14,9	-84,5
	1000	-17,2	-87,1
IV	0,1	1,4	-1,1
	0,3	1,8	-2,0
	1	0,8	-5,6
	3	-2,0	-20,5
	10	-5,2	-46,8
	30	-9,2	-59,2
	100	-11,9	-68,1
	300	-14,2	-79,2
	1000	-16,4	-82,9
VI	0,1	2,2	2,3
	0,3	1,2	-0,4
	1	1,2	-0,4
	3	-0,9	-23,8
	10	-3,6	-36,4

	30	-8,3	-58,9
	100	-12,7	-73,4
	300	-14,1	-76,9
	1000	-16,2	-84,6
VIII	0,1	2,0	1,3
	0,3	1,6	3,2
	1	-1,0	-17,5
	3	-3,9	-37,7
	10	-7,2	-58,5
	30	-10,8	-67,0
	100	-13,8	-75,2
	300	-13,6	-74,9
	1000	-18,9	-84,7

\*Изменение средней массы тела через 96 часов после введения дозы по сравнению с исходным весом наивных животных.

\*\*Совокупное потребление пищи животными, получавшими пептид, через 96 часов после введения дозы по сравнению с животными, получавших носитель, через 96 часов после введения дозы.

### Пример 13. Влияние *in vivo* на потребление пищи и массу тела у крыс с алиментарным ожирением

Самцов крыс линии Лонг-Эванс от компании Envigo RMS (г. Индианаполис, штат Индиана) в возрасте 14 недель помещают на рацион с высоким содержанием жира (40% ккал из жира, TD.95217; Envigo RMS, г. Индианаполис, штат Индиана) до достижения возраста 35–45 недель. Животных размещают по отдельности в помещении с контролируемой температурой (75,0 °F; 23,9 °C) с обратным 12-часовым циклом «свет/тьма» (10:00 свет ВЫКЛ.) и свободным доступом к пище и воде. Регистрируют массу тела и определяют состав тела (масса жировой ткани) с использованием количественного анализа ядерного магнитного резонанса (ECHO MRI, 3–1 Composition Analyzer; Echo Medical Systems, г. Хьюстон, штат Техас, США) с последующей рандомизацией в экспериментальные группы (n = 5). Крысам вводят подкожные инъекции носителя или пептида (1 мл/кг) каждые три дня (день 1, 4, 7, 10 и 13). Регистрируют ежедневные показатели массы тела, а изменения в конце лечения (день 14) рассчитывают как процентные доли по сравнению с весами до начала лечения (день 1). Состав тела определяют на 14 день, а изменения массы жировой ткани и безжировой массы (масса тела — масса жировой ткани) рассчитывают по сравнению со значениям до лечения как изменения в граммах.

**Таблица 4. Изменения массы тела в течение 2-недельного исследования у крыс с алиментарным ожирением, получавших агонисты-пептиды амилина**

Номер соединения	Доза (нмоль/кг, подкожно)	$\Delta$ массы тела (%)*	$\Delta$ массы жиров (г)*	$\Delta$ безжировой массы (г)*
II	1	-7,1	-43,8	-7,5
	10	-9,0	-59,6	-5,6
	100	-10,7	-61,0	-15,4
IV	1	-4,5	-31,0	-0,2
	10	-8,5	-53,5	-6,4
	100	-8,9	-52,9	-8,6
VI	1	-3,2	-25,5	1,9
	10	-8,8	-51,9	-9,1
	100	-9,8	-54,7	-15,2
VIII	1	-6,0	-36,6	-4,7
	10	-9,0	-54,3	-7,2
	100	-11,5	-56,4	-26,9

\*Изменение средней массы тела, или массы жировой ткани, или безжировой массы через 2 недели по сравнению с исходным весом наивных животных.

5

#### **Пример 14. Фармакокинетика у самцов крыс линии Спрег-Доули**

Фармакокинетика соединения II (SEQ ID NO:2), соединения IV (SEQ ID NO:4), соединения VI (SEQ ID NO:6) и соединения VIII (SEQ ID NO:8) оценивают после однократного подкожного введения 30 нмоль/кг самцам крыс линии Спрег-Доули.

10 Образцы крови собирают через 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 и 96 часов после подкожного введения дозы. Для расчета фармакокинетических параметров использовали получившиеся индивидуальные концентрации в плазме. Концентрации пептидов в плазме (K<sub>3</sub>EDTA) определяют с применением сертифицированного метода ЖХ/МС, позволяющего измерять исходную массу пептидов. Каждый пептид и аналог в качестве

15 внутреннего стандарта экстрагируют из плазмы. Для обнаружения с помощью ЖХ/МС используют Thermo Q-Exactive с высоким разрешением. Средние фармакокинетические параметры приведены в Таблице 5.

**Таблица 5. Средние фармакокинетические параметры пептидов после однократного подкожного введения 30 нмоль/кг самцам крыс линии Спрег-Доули.**

20

Номер соединения	T <sub>1/2</sub> (ч)	T <sub>max</sub> (ч)	C <sub>max</sub> /доза (кг * нмоль/л/нмоль)	AUC <sub>INF</sub> /доза (час*кг*нмоль/л/нмоль)	CL/F (мл/ч/кг)
II	52,8 ± 6,6	24,0 ± 0,0	4,9 ± 0,9	473 ± 63,8	2,1 ± 0,3

IV	66,9 ± 27,6	20,0 ± 6,9	5,5 ± 2,1	551 ± 27,1	1,8 ± 0,1
VI	54,0 ± 8,4	24,0 ± 0,0	5,4 ± 0,5	506 ± 26,6	2,0 ± 0,1
VIII	36,4 ± 2,93	16,0 ± 6,9	3,8 ± 0,4	270 ± 22,4	3,7 ± 0,3

Условные сокращения:  $T_{1/2}$  = время полувыведения,  $T_{max}$  = время до достижения максимальной концентрации,  $C_{max}/\text{доза}$  = максимальная концентрация в плазме, деленная на дозу,  $AUC_{inf}/\text{доза}$  =  $AUC_{inf}$ , деленное на дозу,  $CL/F$  = клиренс/биодоступность.

Примечания: данные представляют собой среднее значение, где  $n = 3/\text{группу}$ .

5

### Пример 15. Фармакокинетика у самцов яванских макак

Фармакокинетику соединения II (SEQ ID NO:2), соединения IV (SEQ ID NO:4), соединения VI (SEQ ID NO:6) и соединения VIII (SEQ ID NO:8) оценивают после однократного подкожного введения 20 нмоль/кг самцам яванских макак. Образцы крови собирают через 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 336, 408, 504 часа после подкожного введения дозы. Для расчета фармакокинетических параметров использовали получившиеся индивидуальные концентрации в плазме. Концентрации пептидов в плазме (K<sub>3</sub>EDTA) определяют с применением сертифицированного метода ЖХ/МС, позволяющего измерять исходную массу пептидов. Каждый пептид и аналог в качестве внутреннего стандарта экстрагируют из плазмы. Для обнаружения с помощью ЖХ/МС используют Thermo Q-Exactive с высоким разрешением. Средние фармакокинетические параметры приведены в Таблице 6.

20

**Таблица 6. Средние фармакокинетические параметры пептидов после однократного подкожного введения 20 нмоль/кг самцам яванских макак.**

Номер соединения	$T_{1/2}$ (час)	$T_{max}$ (час)	$C_{max}/\text{доза}$ (кг*нмоль/л/нмоль)	$AUC_{INF}/\text{доза}$ (час*кг*нмоль/л/нмоль)	$CL/F$ (мл/час/кг)
II	159 ± 7,7	64,0 ± 13,9	6,7 ± 1,0	1752 ± 313	0,58 ± 0,1
IV	177 ± 13,5	48,0 ± 24,0	6,2 ± 1,0	1607 ± 104	0,62 ± 0,04
VI	85,0 ± 5,8	40,0 ± 13,9	4,9 ± 0,7	794 ± 27	1,26 ± 0,04
VIII	62,0 ± 4,7	28,0 ± 18,3	7,2 ± 0,3	942 ± 67	1,07 ± 0,1

Условные сокращения:  $T_{1/2}$  = время полувыведения,  $T_{max}$  = время до достижения максимальной концентрации,  $C_{max}/\text{доза}$  = максимальная концентрация в плазме, деленная на дозу,  $AUC_{INF}/\text{доза} = AUC_{inf}$ , деленное на дозу,  $CL/F$  = клиренс/биодоступность.

Примечания: данные представляют собой среднее значение, где  $n = 3/\text{группу}$ .

5

### **Пример 16. Оценка риска иммуногенности**

#### *Анализ интернализации дендритных клеток (ДК)*

В этом анализе оценивают способность ДК человека интернализировать исследуемые антитела. Клетки CD14+ культивируют и дифференцируют в незрелые DC с IL-4 и GM-CSF. Исследуемые антитела, изотипический контроль или положительный контроль предварительно инкубируют с детектирующим агентом (Fab-QSY7-TAMRA) в соотношении 1 : 1 с образованием комплекса, а затем добавляют в культуры. Клетки инкубируют в течение одного дня. После интернализации и расщепления положительный сигнал TAMRA обнаруживают с помощью проточной цитометрии, а нормализованный индекс интернализации рассчитывают с использованием изотипического контроля IgG1-EN и антитела к CXCR.

10

15

#### *Анализ MAPPs (протеомика пептидов, ассоциированных с ГКГС)*

MAPPs профилирует презентированные пептиды ГКГС-II на дендритных клетках человека, обработанных исследуемыми молекулами. Клетки CD14+, выделенные из МКПК нормальных доноров-людей, культивируют и дифференцируют в незрелые ДК путем инкубации с IL-4 и GM-CSF. На день 4 культуральную среду заменяют свежей средой, содержащей исследуемые молекулы. На день 5 добавляют LPS для трансформации клеток в зрелые дендритные клетки. На день 6 клетки лизируют в буфере RIPA с ингибиторами протеазы. Иммунопреципитацию комплексов ГКГС-II выполняют с использованием биотинилированного антитела к ГКГС-II, связанного со стрептавидиновыми гранулами. Связанный комплекс элюируют и фильтруют. Выделенные пептиды ГКГС-II анализируют методом масс-спектрометрии. Идентификацию пептидов осуществляют с помощью внутреннего протеомического конвейера с использованием алгоритмов поиска без фермента и базы данных «бычий/человеческий» с добавлением к ней тестовых последовательностей. Рабочий процесс KNIME используют для обработки идентификационных файлов из образцов. Пептиды, идентифицированные в тестовых образцах, выравнивают по исходной последовательности тестовой молекулы. Результат используют для определения процента доноров, у которых присутствуют пептиды ГКГС-II из участков исследуемой молекулы.

20

25

30

35

Соединение II, соединение IV, соединение VI, соединение VIII, соединение, представляющее US 9,023789 (далее «Соединение '789»), и прамлинтид тестируют в анализе MAPP. Соединение II, соединение IV, соединение VI, соединение VIII не демонстрируют пептидов, присутствующих в комплексах ГКГС-II, в анализе. Соединение '789 демонстрирует пептидный кластер, охватывающий остатки 8–23 на комплексах ГКГС-II. Прамлинтид демонстрирует два пептидных кластера, которые в общем охватывают остатки 1–34 на комплексах ГКГС-II.

#### *Анализ in-silico TCEM (Т-клеточный мотив)*

10           Этот анализ оценивает вероятность того, что специфические пептидные кластеры, идентифицированные MAPPs, будут активировать CD4+ Т-клетки. Идентифицированные MAPPs пептидные последовательности, содержащие остатки незародышевой линии, вводят на страницу прогнозирования связывания ГКГС-II в базе данных аналитического ресурса Immune Epitope Database (IEDB). Выбирают рекомендованный IEDB метод прогнозирования. Прогнозирование учитывает 27 наиболее частых аллелей HLA-DR, -DP и -DQ для охвата значительной доли популяции людей. Каждая входная последовательность с длиной равной или более 15 остатков разделена на перекрывающиеся 15-мерные смещения 1 аминокислоты для охвата всей последовательности. Для каждого пептида ранг процентиля получают путем сравнения 20 оценки пептида с оценками из пяти миллионов случайных 15-меров, выбранных из базы данных SWISSPROT. Аминокислоты, расположенные в положениях P-1, P2, P3, P5, P7 и P8, генерируют TCEM, и риск определяют на основе присутствия остатков незародышевой линии в этих положениях. Остатки незародышевой линии и вероятность связывания ядра с множеством аллелей представлены в графическом виде и 25 рассматриваются для оценки риска иммуногенности.

#### *Связывание сыворотки MS*

Этот анализ оценивает нецелевое связывание тестируемого кандидата с белками сыворотки человека. Исследуемые антитела покрывают на микропланшете Immulon 4 30 NBX. После блокирования добавляют сыворотку человека и инкубируют в течение ночи. Планшет промывают и связанные белки элюируют, уменьшают, алкилируют и расщепляют. Пептиды анализируют методом масс-спектрометрии. Идентификацию пептидов осуществляют с помощью внутреннего протеомического конвейера, использующего алгоритмы поиска с триптической специфичностью ферментов и базу 35 данных человека с приложением последовательностей тестовых молекул. Ионы



количественно определяют с помощью внутренних протеомических инструментов (Chrom-Alignment, Metaconsense и Quant) и анализируют в JMP с использованием платформы Oneway analysis/Each Pair, t-критерия Стьюдента. Анализ на log2auc для ионов с использованием JMP: Подгонка Y по X для каждого иона / Сравнение средних значений / Все пары, Tukey HSD.

#### *Анализ Т-клеточной пролиферации*

Этот анализ оценивает способность исследуемых антител или исследуемых пептидов MAPPs активировать CD4+ Т-клетки путем индуцирования клеточной пролиферации. МКПК, обедненные CD8+ Т-клетками, готовят и маркируют с использованием CFSE. Каждый образец испытывают с помощью контроля среды, гемоцианина лимфы улитки (KLH; положительный клинический контроль), исследуемых антител или исследуемых пептидов MAPPs. Культуры инкубируют в течение 7 дней. На день 7 образцы анализируют с помощью проточной цитометрии.

#### *Предшествующая реактивность (Формат анализа ACE)*

В этом анализе оценивают присутствие предшествующих антител (ADA) к исследуемым молекулам в нормальной человеческой сыворотке (NHS). Разбавленную NHS инкубируют в течение ночи на планшете Pierce Streptavidin, покрытом биотинилированными исследуемыми молекулами. На следующий день захваченные связывающие белки элюируют кислотой, наносят на пластину Mesoscale (MSD) и детектируют с помощью комбинации молекулы, меченной биотином, и стрептавидина, меченного рутением. Если присутствуют антитела против лекарственного средства, они связывают меченый препарат, и возникающий сигнал относится к сигналу уровня 1 (выражается в виде электрохемилюминесценции). Этот сигнал подтверждают на уровне 2, добавляя избыточную немеченую исследуемую молекулу на этапе обнаружения, что приводит к подавлению сигнала уровня 1. Присутствие предшествующих антител к лекарственному средству выражается как величина 90-го перцентиля ингибирования уровня 2. 90-ый перцентиль ингибирования уровня 2 представляет собой статистический инструмент для оценки величины специфичности реактивности уровня 1. Этот 90-ый перцентиль используют для ранжирования молекул с точки зрения риска ADA.

**Таблица 7. Сводные данные об оценке риска иммуногенности**

<b>Количествен</b>	<b>Прамлинтид</b>	<b>Соединение</b>	<b>Соединение</b>	<b>Соединение</b>	<b>Соединение</b>	<b>Соединение</b>
--------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

ный анализ		'789	II	IV	VI	VIII
<b>Анализ MAPPS</b> 10 доноров с разнообразными ГКГС	Высокий риск 10/10 доноров демонстрировали пептиды	Высокий риск 5/10 доноров демонстрировали пептиды	Низкий риск Пептиды не демонстрируются	Низкий риск Пептиды не демонстрируются	Низкий риск Пептиды не демонстрируются	Низкий риск Пептиды не демонстрируются
<b>Анализ Т-клеточной пролиферации: белок</b> 7–10 доноров с разнообразными ГКГС	Высокий риск (7/7 положительных доноров)	Низкий риск (1/7 положительных доноров)	Низкий риск (0/9 положительных доноров)	Низкий риск (0/9 положительных доноров)	Низкий риск (1/9 положительных доноров)	Низкий риск (1/9 положительных доноров)
<b>Предшествующая реактивность</b> 90-ый процентиль ингибирования T2 >50 доноров	Не применимо	58,0%	48,8%	33,2%	43,9%	51,4%

Условные сокращения: ACE = элюирование кислотным захватом; ADA = антитела к лекарственному средству; CDR = определяющая комплементарность область; ДК = дендритная клетка; H1 = VH CDR1; H2 = VH CDR2; H3 = VH CDR3; L1 = VL CDR1; L2 = VL CDR2; MAPP = протеомика пептидов, ассоциированных с ГКГС; ГКГС = главный комплекс гистосовместимости; МС = масс-спектрометрия; T2 = уровень 2; TCEM = подвергнутый воздействию Т-клеток мотив; VH = переменная область тяжелой цепи; VL = переменная область легкой цепи; VHFR3 = каркас 3 переменной области тяжелой цепи

#### 10 **Пример 17. Эффективность соединения II *in vivo* у крыс с алиментарным ожирением в комбинации с другими соединениями инкретина**

Это исследование проводят для изучения влияния соединения II на диабет и/или ожирение у крыс с алиментарным ожирением при введении в комбинации с другими соединениями инкретина, включая агонист GLP-1 (соединение XVII), аналог оксинтомодулина (соединение XVIII) и тройной агонист глюкагона, GLP-1 и GIP (соединение XIX). В следующих исследованиях используют самцов крыс линии Лонг-Эванс (Envigo) с алиментарным ожирением, которых содержат на богатой калориями диете с момента прибытия в Lilly (TD95217; Teklad, Мэдисон, штат Висконсин, США).

Животных размещают отдельно в помещении с контролируемой температурой (24 °С) с 12-часовым циклом «свет/тьма» (свет зажигается в 22:00) и с свободным доступом к пище (TD95217) и воде.

Крыс рандомизировали в соответствии с их массой тела, так что каждая экспериментальная группа животных имела сходную массу тела. Масса тела колеблется от 529 до 823 г.

Каждая группа содержит по пять крыс. Носитель и соединение II (1 нмоль/кг) растворяют в носителе (20 мМ Трис-НСl, рН 8 + 0,02% PS80) и вводят путем подкожной инъекции (п/к) (1 мл/кг) крысам с алиментарным ожирением, которых кормят *ad libitum*, в период от 30 до 90 минут до наступления цикла тьмы каждые 3 дня в течение 14 дней. П/к инъекции осуществляли в День 1, 4, 7, 10 и 13. Массу тела и потребление пищи измеряют ежедневно на протяжении всего исследования. Абсолютные изменения массы тела рассчитывают путем вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией молекулы.

В конце исследования отбирали кровь для измерения уровня глюкозы и инсулина в плазме. Уровень глюкозы в крови измеряют глюкометрами AccuChek® (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана, США). Инсулин измеряют с помощью ИФА (MSD, г. Роквилл, штат Мэриленд, США).

Все данные представлены как среднее  $\pm$  SEM для 5 животных на группу. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественного сравнения Тьюки для сравнения групп лечения с группой носителя или друг с другом. Значимые различия выявляют при  $p < 0,05$ .

**Таблица 8. Влияние соединения II в комбинации с соединением XVII, соединением XVIII или соединением XIX и без них на массу тела и совокупное потребление пищи**

Средство для лечения*	Изменение массы тела (г)*	Совокупное потребление пищи (г)***
Носитель (10 мл/кг)	-3,42 $\pm$ 6,10	212,08 $\pm$ 16,84
Соединение II (1 нмоль/кг)	-35,90 $\pm$ 3,95*	149,94 $\pm$ 10,88*
Соединение XVII (10 нмоль/кг)	-54,20 $\pm$ 6,52*	150,04 $\pm$ 5,71*
Соединение XVIII (10 нмоль/кг)	-50,24 $\pm$ 6,36*	165,86 $\pm$ 7,45*
Соединение XIX (3 нмоль / кг)	-43,28 $\pm$ 2,54*	157,50 $\pm$ 10,63*
Соединение II + Соединение XVII	-80,68 $\pm$ 6,44* <sup>+</sup>	98,60 $\pm$ 16,46*
Соединение II +	-59,96 $\pm$ 6,87* <sup>#</sup>	137,78 $\pm$ 14,66*

Соединение XVIII		
Соединение II + Соединение XIX	-63,22 ± 10,11* <sup>#</sup>	118,84 ± 11,99*

\*Средство для лечения вводили подкожно каждые три дня в 1, 4, 7, 10 и 13 дни. \*\* Измерения массы тела проводили ежедневно. Изменение массы тела представляет собой разницу от дня 1 до дня 14, выраженную в граммах. \*\*\* Совокупное потребление пищи представляло собой общее количество пищи, потребленной в течение 14-дневного периода лечения. Статистический анализ был выполнен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим анализом Тьюки. \*p < 0.05 по сравнению с группой носителя; <sup>#</sup>p < 0,05 по сравнению с группой соединения XVII, соединения XVIII или соединения XIX; <sup>+</sup>p < 0,05 по сравнению с соединением II.

10 Существует более высокая потеря массы при комбинации соединения II с соединением XVII, соединением XVIII или соединением XIX по сравнению с использованием только соединения II.

**SEQ ID NO:1: Соединение I**

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

15 где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

**SEQ ID NO:2: Соединение II**

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

20 причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ .

**SEQ ID NO:3: Соединение III**

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

25 где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

**SEQ ID NO:4: Соединение IV**

$\gamma$ E-CNTATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

30 причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ .

**SEQ ID NO:5: Соединение V**

KCETATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

35 где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

**SEQ ID NO:6 Соединение VI**

KCETATCATG-Orn-LAE- $\alpha$ MeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

- 5 причем лизин в положении 1 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ .

**SEQ ID NO:7: Соединение VII**

KCETATCATG-Orn- $\alpha$ MeL-AEFLVRSSHNFPGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

- 10 где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

**SEQ ID NO:8: Соединение VIII**

KCETATCATG-Orn- $\alpha$ MeL-AEFLVRSSHNFPGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

- 15 причем лизин в положении 1 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ .

**SEQ ID NO:9: Соединение IX**

$\gamma E$ -CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

- 20 где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,  
причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой AEEA<sub>2</sub>- $\gamma E$ -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

**SEQ ID NO:10: Соединение X**

- 25  $\gamma E$ -CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой  $\gamma E$ - AEEA<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

- 30 **SEQ ID NO:11: Соединение XI**

$\gamma E$ -CNTATCATGKLAEFLVRSSNFGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой  $(\gamma E)_2$ -AEEA-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

**SEQ ID NO:12: Соединение XII**

$\gamma$ E-CNTATCATQ-Orn-LAEFLVRSSNFGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в

5 соответствии с формулой AEEA<sub>2</sub>- $\gamma$ E-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

**SEQ ID NO:13: Соединение XIII**

$\gamma$ E-CGTATCATG-Orn-LAEFLVRSSNFGPKLPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7,

10 причем лизин в положении 26 присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в

соответствии с формулой  $\gamma$ E<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

**SEQ ID NO:14: Соединение XIV**

Хаа<sub>1</sub>-С-Хаа<sub>3</sub>-ТАТСАТ- Хаа<sub>10</sub>- Хаа<sub>11</sub>-Хаа<sub>12</sub>-АЕ-Хаа<sub>15</sub>-LVRSS-Хаа<sub>21</sub>-Хаа<sub>22</sub>-FGP-Хаа<sub>26</sub>-  
15 LPPTTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>, где

Хаа<sub>1</sub> представляет собой К или  $\gamma$ E

Хаа<sub>3</sub> представляет собой E, N или G

Хаа<sub>10</sub> представляет собой G или Q

Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn или K

20 Хаа<sub>12</sub> представляет собой L или  $\alpha$ MeL

Хаа<sub>15</sub> представляет собой  $\alpha$ MeF или F

Хаа<sub>21</sub> представляет собой N или H

Хаа<sub>22</sub> представляет собой NMeD, NMeN или N

Хаа<sub>26</sub> представляет собой I или K

25

**SEQ ID NO:15: Соединение XV; Прамлинтид**

KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует дисульфидный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

30 **SEQ ID NO:16: Соединение XVI; hCT**

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH<sub>2</sub>,

где существует дисульфидный мостик между цистеинами в положениях 1 и 7.

**SEQ ID NO:17: hAMY**

35 KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

где существует дисульфидный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.

**SEQ ID NO:18: Соединение XVII**

5 H-Aib-EGTFTSDVSSYLEGQAAK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CO<sub>2</sub>H)EFIAWLVRGRG

**SEQ ID NO:19: Соединение XVIII**

10 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDEKKA((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)EFVEWLLEGGPSSG-NH<sub>2</sub>

**SEQ ID NO:20: Соединение XIX**

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>

15 **SEQ ID NO: 21**

YX<sub>1</sub>EGTFTSDYSIX<sub>2</sub>LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X<sub>1</sub> представляет собой Aib; X<sub>2</sub> представляет собой Aib; К в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с 2-([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)<sub>1</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H; и С-концевая аминокислота амидирована в виде С-концевого первичного амида.

20

**SEQ ID NO:22: Остов соединения I**

γE-CNTATCATG-Orn-LAE-αMeF-LVRSSN-NMeN-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>

25 **SEQ ID NO:23: Остов соединения III**

γE-CNTATCATG-Orn-LAE-αMeF-LVRSSN-NMeD-FGPKLPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

**SEQ ID NO:24: Остов соединения V**

KCETATCATG-Orn-LAE-αMeF-LVRSSN-NMeD-FGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

30

**SEQ ID NO:25: Остов соединения VII**

KCETATCATG-Orn-αMeL-AEFLVRSSHNFGPILPPTEVGSNTY-NH<sub>2</sub>,

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее:

Хаа<sub>1</sub>-С-Хаа<sub>3</sub>-ТАТСАТ- Хаа<sub>10</sub>- Хаа<sub>11</sub>-Хаа<sub>12</sub>-АЕ-Хаа<sub>15</sub>-LVRSS-Хаа<sub>21</sub>-Хаа<sub>22</sub>-FGP-Хаа<sub>26</sub>-

5 LPPTEVGSNTY (SEQ ID NO:14), где

Хаа<sub>1</sub> представляет собой К или γЕ;

Хаа<sub>3</sub> представляет собой Е, N или G;

Хаа<sub>10</sub> представляет собой G или Q;

Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn или K;

10 Хаа<sub>12</sub> представляет собой L или αMeL;

Хаа<sub>15</sub> представляет собой αMeF или F;

Хаа<sub>21</sub> представляет собой N или H;

Хаа<sub>22</sub> представляет собой NMeD, nMeN или N; и

Хаа<sub>26</sub> представляет собой I или K,

15 или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, в котором

Хаа<sub>1</sub> представляет собой γЕ;

Хаа<sub>3</sub> представляет собой N;

20 Хаа<sub>10</sub> представляет собой G;

Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn;

Хаа<sub>12</sub> представляет собой L;

Хаа<sub>15</sub> представляет собой αMeF;

Хаа<sub>21</sub> представляет собой N;

25 Хаа<sub>22</sub> представляет собой NMeN; и

Хаа<sub>26</sub> представляет собой K (SEQ ID NO:22),

или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п. 1, в котором

30 Хаа<sub>1</sub> представляет собой γЕ;

Хаа<sub>3</sub> представляет собой N;

Хаа<sub>10</sub> представляет собой G;

Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn;

Хаа<sub>12</sub> представляет собой L;



Хаа<sub>15</sub> представляет собой αMeF;  
Хаа<sub>21</sub> представляет собой N;  
Хаа<sub>22</sub> представляет собой NMeD; и  
Хаа<sub>26</sub> представляет собой K (SEQ ID NO:23),  
или его фармацевтически приемлемую соль.

5

4. Соединение по п. 2 или 3, в котором лизин на Хаа<sub>26</sub> присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой: (γE)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H.

10

5. Соединение по п. 1, в котором  
Хаа<sub>1</sub> представляет собой K;  
Хаа<sub>3</sub> представляет собой E;  
Хаа<sub>10</sub> представляет собой G;  
Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn;  
Хаа<sub>12</sub> представляет собой L;  
Хаа<sub>15</sub> представляет собой αMeF;  
Хаа<sub>21</sub> представляет собой N;  
Хаа<sub>22</sub> представляет собой NMeD; и  
Хаа<sub>26</sub> I (SEQ ID NO:24),

15

20

или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Соединение по п. 1, в котором

Хаа<sub>1</sub> представляет собой K;  
Хаа<sub>3</sub> представляет собой E;  
Хаа<sub>10</sub> представляет собой G;  
Хаа<sub>11</sub> представляет собой Orn;  
Хаа<sub>12</sub> представляет собой αMeL;  
Хаа<sub>15</sub> представляет собой F;  
Хаа<sub>21</sub> представляет собой H;  
Хаа<sub>22</sub> представляет собой N; и  
Хаа<sub>26</sub> представляет собой I (SEQ ID NO:25),  
или его фармацевтически приемлемая соль.

25

30

7. Соединение по п. 5 или 6, в котором лизин на Хаа<sub>1</sub> присоединен к линкерному фрагменту жирной кислоты в соответствии с формулой:  $(\gamma E)_2-CO-(CH_2)_{18}-CO_2H$ .
8. Соединение по любому из предшествующих пунктов, в котором существует тиацетальный мостик между цистеинами в положениях 2 и 7.
9. Соединение по п. 1, которое выбрано из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13, или его фармацевтически приемлемая соль.
10. Соединение, состоящее из SEQ ID NO:2, или его фармацевтически приемлемая соль.
11. Соединение, состоящее из SEQ ID NO:4, или его фармацевтически приемлемая соль.
12. Соединение, состоящее из SEQ ID NO:6, или его фармацевтически приемлемая соль.
13. Соединение, состоящее из SEQ ID NO:8, или его фармацевтически приемлемая соль.
14. Способ лечения диабета 2 типа у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
15. Способ лечения ожирения у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.

16. Способ лечения дислипидемии у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
- 5 17. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
- 10 18. Способ снижения потребления пищи у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
- 15 19. Способ снижения массы тела у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
- 20 20. Способ снижения уровня глюкозы в крови у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
21. Способ снижения содержания триглицеридов у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемой соли.
- 25 22. Способ по любому из пп. 13–21, в котором соединение вводят один раз в неделю.
- 30 23. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемую соль и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.
- 35 24. Способ лечения состояния у пациента, нуждающегося в этом, выбранного из группы, состоящей из диабета в клинической или доклинической стадии, ожирения, НАСГ и дислипидемии, включающий введение пациенту эффективного количества соединения по п. 1 в комбинации с эффективным количеством инкретина или аналога инкретина.

25. Способ лечения по п. 24, в котором соединение выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8, или его фармацевтической соли, и при этом инкретин или аналог инкретина представляет собой SEQ ID NO:21.
- 5
26. Соединение по любому из пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.
- 10
27. Фармацевтическая композиция по п. 23 для применения в терапии.
28. Соединение по пп. 1–13 или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии и НАСГ.
- 15
29. Фармацевтическая композиция по п. 23 для применения для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии и НАСГ.
- 20
30. Применение соединения по любому из пп. 1–13 в производстве лекарственного средства для лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии и НАСГ.