

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046570**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.27
- (21) Номер заявки
202190923
- (22) Дата подачи заявки
2019.10.28
- (51) Int. Cl. **C07K 14/575 (2006.01)**
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)

(54) **АНАЛОГИ БЕЛКА ТИРОЗИН-ТИРОЗИН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

- (31) **62/754,244; 62/793,544**
- (32) **2018.11.01; 2019.01.17**
- (33) **US**
- (43) **2021.07.23**
- (86) **PCT/US2019/058259**
- (87) **WO 2020/092191 2020.05.07**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)
- (72) Изобретатель:
**Брайер Дэниэл Энтони, Лопес Дэниэл
Кристофер, Муппиди Авинаш (US)**
- (74) Представитель:
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Строкова О.В., Пармонова К.В. (RU)**
- (56) **WO-A1-2015071355**
WO-A1-2014178018
WO-A1-2011033068
WO-A1-2011058165

-
- (57) Описаны аналоги РYУ, которые включают модификации, увеличивающие период полувыведения по сравнению с нативным РYУ человека, а также дополнительные модификации, повышающие эффективность и селективность в отношении рецептора NPY2. Также описаны фармацевтические композиции, которые включают один или более аналогов РYУ, описанных в данном документе, в фармацевтически приемлемом носителе. Также описаны способы получения и применения аналогов РYУ, в особенности для лечения ожирения и связанных с ожирением заболеваний и расстройств, таких как сахарный диабет II типа.

B1

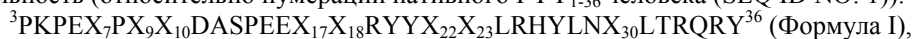
046570

046570

B1

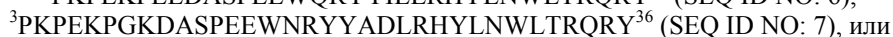
Данное раскрытие в целом относится к биологии и медицине и, в частности, относится к аналогам пептида тирозин-тирозин (PYY), которые могут связываться с рецептором нейропептида Y (NPY), таким как рецептор NPY2, а также к композициям, включающим их, и их терапевтическому применению в лечении ожирения и связанных с ожирением заболеваний и расстройств, таких как сахарный диабет II типа (СДТ2, T2DM). PYY представляет собой член семейства панкреатических полипептидов (ПП, PP) и участвует в модуляции потребления пищи и расхода энергии после приема пищи (см. Tatemoto (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. 79:2514-2518). PYY секретируется L-клетками желудочно-кишечного тракта и имеет две основные эндогенные формы - PYY₁₋₃₆ (SEQ ID NO: 1) и PYY₃₋₃₆ (SEQ ID NO: 2). PYY₁₋₃₆ преобладает над PYY₃₋₃₆ во время голодания, тогда как PYY₃₋₃₆ преобладает над PYY₁₋₃₆ после приема пищи. Дипептидилпептидаза-IV (ДПП-IV, DPP-IV) гидролизует PYY₁₋₃₆ по связи Pro²-Ile³ с образованием PYY₃₋₃₆, который является более селективным в отношении рецептора NPY2, чем PYY₁₋₃₆. Концентрация PYY₃₋₃₆ в плазме обычно увеличивается в течение 15 минут после приема пищи, достигает пика в течение 60-90 мин и остается повышенной до 6 ч, прежде чем вернуться к исходному уровню (см. Adrian et al. (1985) Gastroenterology 89:1070-1077; и De Silva & Bloom (2012) Gut Liver 6:10-20). Таким образом, PYY₃₋₃₆, как полагают, влияет на аппетит через его прямое центральное действие, а также через его влияние на моторику кишечника (т.е. его анорексигенное действие). Кроме того, считается, что PYY₃₋₃₆ опосредует чувствительность к инсулину, тем самым помогая снизить уровень глюкозы в крови (т.е. его сенсибилизирующее действие). PYY₃₋₃₆ был исследован в качестве потенциального терапевтического агента для регулирования массы тела с учетом его анорексигенного действия, в особенности для лечения ожирения и связанных с ним заболеваний и расстройств, включая СДТ2 и сердечно-сосудистые заболевания (см., например, Публикацию Международной Патентной Заявки № 2002/47712; и Schwartz & Morton (2002) Nature 418:595-597). К сожалению, экзогенно вводимый PYY₃₋₃₆ имеет короткий период полувыведения (например, около 10-15 минут) из-за протеаз и других механизмов клиренса (см. Lluís et al. (1989) Rev. Esp. Fisiol. 45:377-384; и Torang et al. (2016) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310:R866-R874), что создает сложности при использовании его в качестве терапевтического агента. При таком коротком периоде полувыведения PYY₃₋₃₆ следует вводить, по меньшей мере, один раз в день для оказания терапевтического эффекта, что неудобно для индивида, нуждающегося в этом. Поэтому были предприняты попытки увеличить период полувыведения PYY₃₋₃₆ и/или увеличить его селективность в отношении рецептора NPY2. Например, Rubinstein et al. описывают аналоги PYY, содержащие радикал 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc) или 2-сульфо-9-флуоренилметоксикарбонил (FMS) для увеличения периода полувыведения (см. Публикацию Международной Патентной Заявки № WO 2004/089279). Более того, DeCarr et al. описывают аналоги PYY, имеющие фрагменты ПЭГ, связанные с аминоконцом, для увеличения периода полувыведения (см. DeCarr et al. (2007) Bioorg. Med. Chem. Lett. 17:1916-1919; см. также Ortiz et al. (2007) J. Pharmacol. Exp. Ther. 323:692-700). Кроме того, Kofoed et al. описывают аналоги PYY, имеющие альбуминсвязывающие боковые цепи, по меньшей мере, один модифицированный остаток, близкий к сайту расщепления PYY (например, аналог N-метиলামинокислоты интересующего аминокислотного остатка), N-глицин и/или миметик аргинина для увеличения периода полувыведения (см. публикацию международной патентной заявки № WO 2011/033068).

Несмотря на значительное увеличение понимания роли PYY₃₋₃₆ в метаболизме, остается потребность в дополнительных аналогах PYY, в особенности в аналогах PYY, обладающих улучшенной активностью и селективностью в отношении рецептора NPY2. Как отмечалось выше, необходимы дополнительные аналоги PYY для терапевтического использования. Чтобы удовлетворить эту потребность, в данном раскрытии, во-первых, описаны аналоги PYY, которые включают основную аминокислотную последовательность (относительно нумерации нативного PYY₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1)):



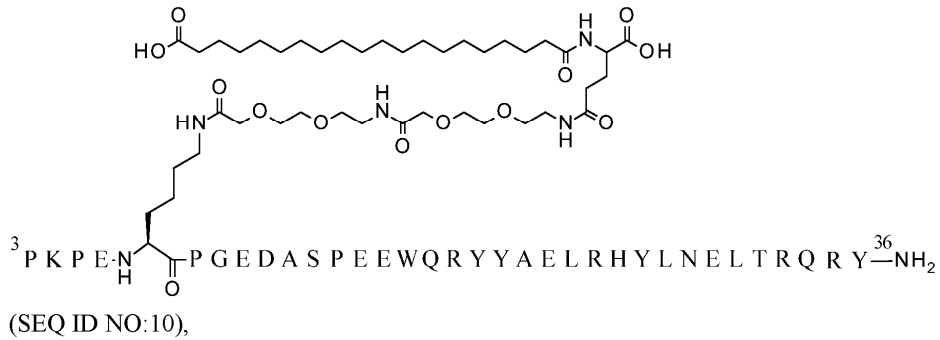
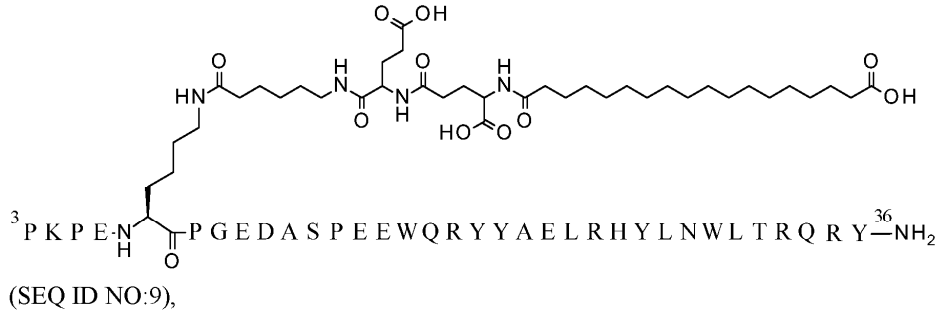
где X₇ представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, и функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C₁₆-C₂₂, X₉ представляет собой E или G, X₁₀ представляет собой E или K, X₁₇ представляет собой L или W, X₁₈ представляет собой N или Q, X₂₂ представляет собой A или I, X₂₃ представляет собой E, D или S, и X₃₀ представляет собой E или W (SEQ ID NO: 3), и при этом карбокси-концевая (C-концевая) аминокислота необязательно является амидированной.

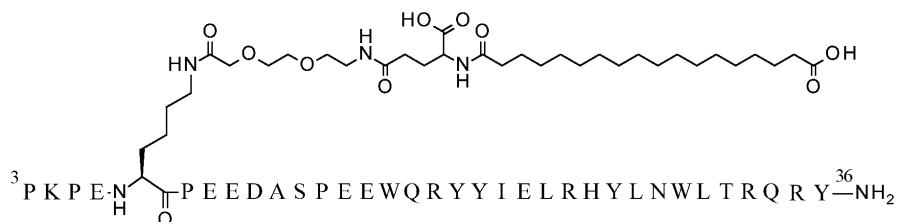
В некоторых случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X₇, может представлять собой C, D, E, K или Q. В конкретных случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X₇, представляет собой K, и аминокислотная последовательность может представлять собой одну из следующих последовательностей:



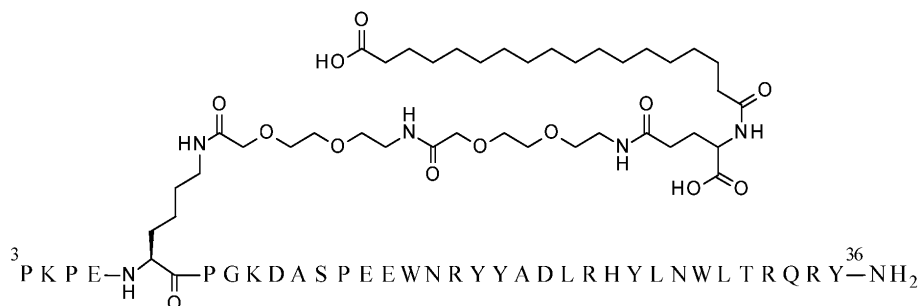
В некоторых случаях жирная кислота C₁₆-C₂₂ конъюгирована с аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации через линкер. В некоторых случаях жирная кислота C₁₆-C₂₂ имеет

структуру $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_a-\text{CO}_2\text{H}$, где a представляет собой целое число от 16 до 22. В конкретных случаях жирная кислота представляет собой двухосновную кислоту C_{18} или двухосновную кислоту C_{20} , такую как пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, арахиновая кислота или эйкозановая кислота, в особенности насыщенную двухосновную кислоту C_{18} или двухосновную кислоту C_{20} . Аналогичным образом и в некоторых случаях линкер может представлять собой одну или более звеньев [2-(2-амино-этокси)-этокси]-уксусной кислоты (АЕЕА), аминоксановой кислоты (Аhx), глутаминовой кислоты (E), γ -глутаминовой кислоты (γE) или их комбинации. В конкретных случаях аналог РYY может представлять собой одну из следующих последовательностей:

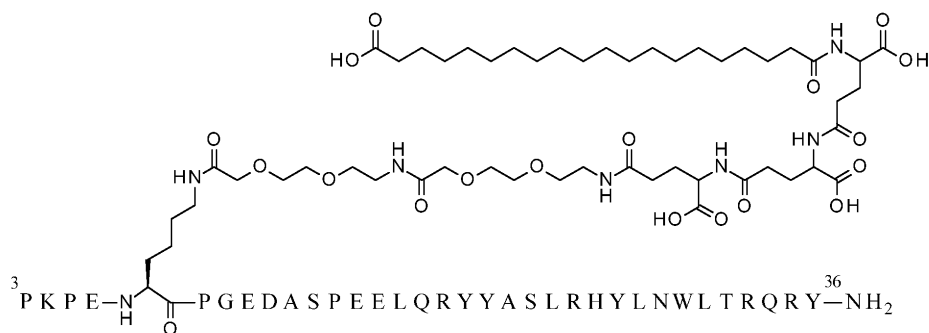




(SEQ ID NO:11),



(SEQ ID NO:12) или



(SEQ ID NO:13).

В некоторых случаях основная структура аналогов PYY, описанных в данном документе, дополнительно может включать две аминоконцевые (N-концевые) аминокислоты нативного PYY₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1), которые впоследствии могут быть преобразованы *in vivo* в аналог PYY₃₋₃₆ (т.е. N-концевые остатки "YP" последовательности SEQ ID NO: 1 могут быть отщеплены *in vivo* от любого одного из аналогов PYY).

В некоторых случаях аналоги PYY имеют заряд более, чем -2, в особенности -3 или -4.

В некоторых случаях аналоги PYY обладают аффинностью связывания с рецептором NPY2 человека выше, чем у PYY₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2), например, в от около 2 раз до около 10 раз, в особенности выше от около 2 раз до около 3 раз.

В некоторых случаях аналоги PYY имеют период полувыведения, дольше, чем у PYY₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2), например, от около 5 ч до около 24 ч, в особенности около 12 ч.

Во-вторых, описаны фармацевтические композиции, которые включают, по меньшей мере, один аналог PYY, описанный в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль (например, соли трифторацетата, соли ацетата или соли гидрохлорида) и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях фармацевтические композиции могут дополнительно включать носители, разбавители и/или эксципиенты. Более того, фармацевтические композиции могут включать дополнительный терапевтический агент, такой как, например, другие противодиабетические средства или средства для похудения, в особенности инкретин. В некоторых случаях инкретин может представлять собой глюкагон (GCG) или аналог GCG. В других случаях инкретин может представлять собой глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), GLP-1 (7-36)_{амид} или аналог GLP-1. В других случаях инкретин может представлять собой желудочный ингибиторный пептид (GIP) или аналог GIP. В других случаях инкретин может представлять собой двойной агонист рецептора, такой как оксинтомодулин (OXM) или аналог OXM, GLP-1/GCG или GIP/GLP-1. В других случаях инкретин может представлять собой аналог инкретина, обладающий тройной рецепторной активностью (т.е. аналоги инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG). В других случаях дополнительный терапевтический агент может представлять собой ингибитор ДПП-IV. В-третьих, в данном документе описаны способы применения аналогов PYY, в особенности для применения аналогов PYY для лечения ожирения и связанных с ожирением заболеваний и расстройств, таких как СДТ2. Способы включают, по меньшей мере, стадию введения ин-

дивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога РYУ, как описано в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых случаях аналог РYУ можно вводить индивиду подкожно (п/к). Аналогичным образом, и в некоторых случаях, аналог РYУ можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т.е. еженедельно), раз в две недели (т.е. каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях аналог РYУ может вводиться п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к каждые две недели или п/к один раз в месяц. В конкретных случаях аналог РYУ вводят п/к один раз в неделю (QW).

Альтернативно, аналог РYУ можно вводить индивиду перорально. Как указано выше, аналог РYУ можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т.е. еженедельно), раз в две недели (т.е. каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях аналог РYУ можно вводить перорально через день, перорально три раза в неделю, перорально два раза в неделю, перорально один раз в неделю, перорально раз в две недели или перорально один раз в месяц. В конкретных случаях аналог РYУ вводят перорально один раз в неделю.

Способы также могут включать введение, по меньшей мере, одного аналога РYУ в комбинации с эффективным количеством дополнительного терапевтического агента, такого как ингибитор ДПП-IV или инкретин (например, GCG или аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид} или аналог GLP-1, GIP или аналог GIP, OXM или аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью). Ингибитор ДПП-IV или инкретин можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с аналогом РYУ.

В некоторых случаях ингибитор ДПП-IV или инкретин можно вводить с такой же частотой, что и аналог РYУ (например, через день, два раза в неделю или даже еженедельно). В других случаях ингибитор ДПП-IV или инкретин вводят с частотой, отличной от частоты введения аналога РYУ. В других случаях ингибитор ДПП-IV или инкретин вводят QW. В других случаях аналог РYУ вводят п/к, а ингибитор ДПП-IV или инкретин можно вводить перорально.

В некоторых случаях индивид страдает ожирением или избыточным весом. В других случаях индивид представляет собой человека с диабетом (является инвалидом, PwD), в особенности с СДТ2. В некоторых случаях индивид страдает ожирением с СДТ2 или избыточным весом с СДТ2.

Способы также могут включать такие этапы, как измерение или получение данных о весе индивида и/или уровне глюкозы и/или гемоглобина Alc (HbAlc) в крови индивида и сравнение таких полученных значений с одним или более исходными значениями или ранее полученными значениями для оценки эффективности лечения.

Способы также можно комбинировать с диетой и физическими упражнениями и/или можно комбинировать с дополнительными терапевтическими агентами, отличными от тех, которые обсуждались выше.

В-четвертых, в данном документе описаны применения аналогов РYУ для лечения ожирения и связанных с ожирением заболеваний и расстройств, таких как СДТ2, которые можно вводить, необязательно, одновременно, отдельно или последовательно (т.е. в комбинации) с ингибитором ДПП-IV и/или инкретином, таким как GCG или аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид} или аналог GLP-1, GIP или аналог GIP, OXM или аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, или даже инкретином, обладающий тройной рецепторной активностью.

В-пятых, в данном документе описаны применения аналогов РYУ в производстве лекарственного средства для лечения ожирения и связанных с ожирением заболеваний и расстройств, таких как СДТ2, при этом лекарственное средство, необязательно, может дополнительно включать ингибитор ДПП-IV и/или инкретин, такой как GCG или аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид} или аналог GLP-1, GIP или аналог GIP, OXM или аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или даже инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью.

Одним из преимуществ описанных в данном документе аналогов РYУ является то, что они могут не только способствовать снижению веса, но также могут снижать уровень глюкозы. Таким образом, люди, в особенности предрасположенные к СДТ2 или страдающие СДТ2, могут отсрочить переход на экзогенный инсулин и поддерживать целевые уровни HbAlc. Более того, аналоги РYУ, описанные в данном документе, могут усиливать гликемический контроль за счет улучшения сенсibilизации к инсулину. Комбинация GIP/GLP-1 и аналога РYУ может использоваться как для контроля уровня глюкозы (инкретин + потенциальный сенсibilизатор инсулина), так и для снижения веса (синергический эффект). В частности, аналоги РYУ, описанные в данном документе, могут вызывать потерю веса до около 12% при введении индивиду, нуждающемуся в этом, и могут вызывать потерю веса до около 25% в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом, таким как инкретин, при введении индивиду, нуждающемуся в этом. Еще одним преимуществом аналогов РYУ, описанных в данном документе, является то, что они могут иметь период полувыведения до около 24 ч, что позволяет вводить их один раз в неделю.

Еще одним преимуществом аналогов РYУ, описанных в данном документе, является то, что они обладают повышенной физико-химической стабильностью и совместимостью по сравнению с нативным РYУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2) и повышенной совместимостью в приготовлении с инкретинами по сравнению с нативным РYУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2).

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе,

имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области техники, к которой относится данное раскрытие. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при исследовании аналогов РYУ, фармацевтических композиций и способов, в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы.

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

Определения

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, идентичность последовательности, временные рамки, температура, объем и т.д. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином "около", будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники. Используемый в контексте данного документа термин "аминокислота" означает 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. Как известно в данной области техники, существует набор из двадцати аминокислот, которые обозначены как стандартные аминокислоты и используются в качестве строительных блоков для большинства пептидов/белков, продуцируемых любым живым существом.

Используемый в контексте данного документа термин "аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации" означает любую природную или не встречающуюся в природе аминокислоту с функциональной группой, которая может быть конъюгирована с жирной кислотой посредством, например, линкера. Примеры таких функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, алкилнильную, алкенильную, амино-, азидо-, бром-, карбоксильную, хлорную, йодную и тиольную группы. Кроме того, примеры природных аминокислот, включающих такие функциональные группы, включают С (тиол), D (карбоксил), E (карбоксил), K (амино) и Q (амид).

Используемый в контексте данного документа термин "аналог" означает 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.

Используемый в контексте данного документа термин "анорексигенный эффект" означает способность аналогов РYУ подавлять аппетит, что приводит к снижению потребления пищи и, в конечном итоге, к потере веса. Анорексигенный эффект также может относиться к способности аналогов РYУ, описанных в данном документе, увеличивать моторику кишечника.

Используемый в контексте данного документа термин "жирная кислота C₁₆-C₂₂" означает карбоновую кислоту, имеющую от 16 до 22 атомов углерода. Жирная кислота C₁₆-C₂₂, пригодная для использования, описанного в данном документе, может представлять собой насыщенную одноосновную или насыщенную двухосновную кислоту ("двухосновные кислоты" имеют карбоксильные группы на каждом конце). Используемый в контексте данного документа термин "AUC" означает площадь под кривой.

Используемый в контексте данного документа термин "эффективное количество" означает количество, концентрацию или дозу одного или более аналогов РYУ, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли, которая при однократном или многократном введении дозы индивиду, нуждающемуся в этом, обеспечивает желаемый эффект у такого индивида, находящегося на диагностике или лечении (т.е. может вызывать клинически измеримые различия в состоянии индивида, такие как, например, снижение уровня глюкозы в крови, снижение HbA_{1c} и/или снижение веса или жировых отложений). Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники с помощью известных способов и путем наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для индивида рассматривается ряд факторов, включая, но не ограничиваясь этим, вид млекопитающего, его размер, возраст и общее состояние здоровья, специфическое заболевание или нарушение, степень или вовлечение, или тяжесть заболевания или нарушения, ответ индивида, определенный введенный аналог РYУ, способ введения, характеристики биодоступности вводимого приготовления, выбранную схему введения дозы, использование сопутствующих медикаментов и другие соответствующие обстоятельства.

Используемый в контексте данного документа термин "полумаксимальная эффективная концентрация" или "EC₅₀" означает концентрацию соединения, которая приводит к 50% активации/стимуляции конечной точки анализа, такой как кривая зависимости доза-ответ (например, цАМФ).

Используемый в контексте данного документа термин "в комбинации с" означает введение, по меньшей мере, одного из аналогов РYУ, описанных в данном документе, одновременно, последовательно или в виде единого комбинированного приготовления с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

Используемый в контексте данного документа термин "аналог инкретина" означает пептид или полипептид, имеющий структурное сходство с каждым из GIP, GLP-1, GCG и OXM, но с множеством отличий от них, в особенности нативного GIP человека, GLP-1, GCG и OXM. Некоторые аналоги инкретина также обладают аффинностью и активностью в отношении двух или даже каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG (т.е. агонистической активностью в отношении двух рецепторов, таких как OXM, GIP/GLP-1 или GLP-1/GCG, или даже агонистической активностью в отношении всех трех рецепторов).

В контексте данного документа термин "индивид, нуждающийся в этом" означает млекопитающее, например, человека, имеющего патологическое состояние, заболевание, нарушение или симптом, требующий лечения или терапии, включая, например, перечисленные в данном документе. В частности, предпочтительным индивидом для лечения является человек.

Используемый в контексте данного документа термин "продолженного действия" означает, что аффинность связывания и активность аналога PYY, описанного в данном документе, сохраняется в течение периода времени, превышающего период времени, характерного для нативного PYY₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1) и/или нативного PYY₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2), что позволяет вводить дозу реже, например, один раз в сутки или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю или ежемесячно. Профиль временного действия аналогов PYY, описанных в данном документе, можно измерить с помощью известных способов фармакокинетических анализов, таких как те, которые описаны в приведенных ниже примерах.

Используемый в контексте данного документа термин "нестандартная аминокислота" означает аминокислоту, которая может естественным образом встречаться в клетках, но не участвует в синтезе пептидов. Нестандартные аминокислоты могут быть составляющими пептида и часто образуются путем модификации стандартных аминокислот в пептиде (т.е. посредством посттрансляционной модификации). Нестандартные аминокислоты могут включать D-аминокислоты, которые имеют абсолютную хиральность, противоположную указанным выше стандартным аминокислотам.

Используемые в контексте данного документа термины "избыточная масса тела" или "ожирение" означают состояние, при котором индивид имеет индекс массы тела (ИМТ) $>30,0$ кг/м². См. в целом "Избыточный Вес и Ожирение" ("Overweight & Obesity") Центра по Контролю и Профилактике Заболеваний, доступный по адресу cdc.gov/obesity/adult/defining.html; и "Определения и Факты для Взрослых с Избыточным Весом и Ожирением" ("Definitions & Facts for Adult Overweight & Obesity") Национальных Институтов Здравоохранения по адресу iddk.nih.gov/health-information/weight-management/adult-overweight-obesity/definition-facts.

Используемый в контексте данного документа термин "заболевание или расстройство, связанное с ожирением" означает любые заболевания или расстройства, которые вызваны/усугубляются ожирением, включая, но не ограничиваясь ими, стенокардию, сердечно-сосудистые заболевания, холецистит, холелитиаз, застойную сердечную недостаточность, дислипидемию, жировую болезнь печени, осложнения фертильности, непереносимость глюкозы, подагру, гипертонию, гипотиреоз, гиперинсулинемия, инсулинорезистентность, остеоартрит, синдром поликистозных яичников (СПКЯ, PCOS), осложнения беременности, психологические расстройства, апноэ во время сна и другие респираторные проблемы, недержание мочи при напряжении, инсульт, СДТ2, нефролитиаз мочевой кислоты (камни в почках) и рак молочной железы, толстой кишки, эндометрия, пищевода, желчного пузыря, почки, простаты и прямой кишки. Используемый в контексте данного документа термин "избыточный вес" означает состояние, при котором индекс массы тела человека составляет от около 25,0 кг/м² до <30 кг/м². См., ссылки на документы, указанные выше.

Используемый в контексте данного документа термин "PYY" означает пептид YY, полученный из или разработанный на основе любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека. PYY включает как нативный PYY (т.е. полноразмерный), так и его варианты (т.е. добавления, делеции и/или замены нативного PYY). Конкретные PYY включают, но не ограничиваются ими, нативный PYY₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1) и нативный PYY₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2).

Используемый в контексте данного документа термин "аналог PYY" или "аналоги PYY" означает PYY-подобный пептид или полипептид, который оказывает одно или более воздействий нативного PYY на один или более рецепторов NPY, таких как рецептор NPY2. В некоторых случаях аналоги PYY, описанные в данном документе, могут связываться с рецептором NPY, в особенности с рецептором NPY2 человека, с более высокой или более низкой аффинностью, но демонстрируют более длительный период полувыведения *in vivo* или *in vitro* по сравнению с нативным PYY, в особенности с PYY человека, таким как нативный PYY₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1) и нативный PYY₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2). Таким образом, аналоги PYY, описанные в данном документе, представляют собой синтетические соединения, которые действуют как агонисты рецептора NPY2. Используемый в контексте данного документа термин "насыщенная" означает, что жирная кислота не содержит углерод-углеродных двойных или тройных связей.

Используемый в контексте данного документа термин "сенситизирующий эффект" означает способность аналогов PYY усиливать действие инсулина и тем самым способствовать снижению уровня глюкозы в крови.

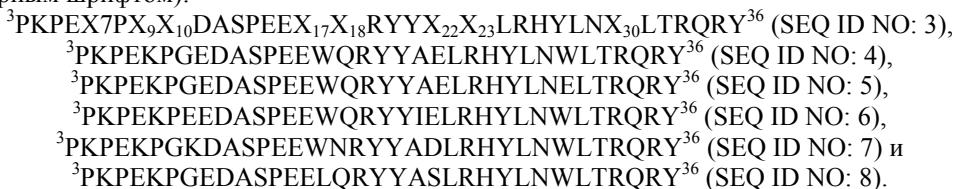
Используемый в контексте данного документа термин "лечение" или "лечить" означает уменьше-

ние, сдерживание, изменение, замедление или остановку прогрессирования или тяжести существующего нарушения, заболевания, расстройства или симптома.

Некоторые сокращения определены следующим образом: "ACR" относится к соотношению альбумин в моче/креатинин в моче; "а. ед. м." относится к атомной единице массы; "tBoc" относится к трет-бутоксикарбонилу; "цАМФ" относится к циклическому аденозинмонофосфату; "ДМФ" относится к диметилформамиду; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "ИФА/РИА" относится к иммуноферментному анализу/радиоиммуноанализу; "ч" относится к часу; "ГФВР" относится к гомогенной флуоресценции с временным разрешением; "в/в" относится к внутривенному введению; "кДа" относится к килодальтонам; "ЖХ-МС" относится к жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией; "МС" относится к масс-спектрометрии; "ОтBu" относится к О-трет-бутилу; "Pbf" относится к NG-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонилу; "ОФ-ВЭЖХ" относится к обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии; "п/к" относится к подкожному введению; "SEM" относится к стандартной ошибке среднего; "ТФУ" относится к трифторуксусной кислоте; и "Tgt" относится к Тритилу.

Аналоги РУУ

Описанные в данном документе аналоги РУУ имеют структурное сходство с нативными пептидами РУУ, но имеют и много структурных отличий. Например, при сравнении с нативным РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1) и/или нативным РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2), аналоги РУУ, описанные в данном документе, включают модификации в одном или более положениях 3, 7, 9, 10, 17, 18, 22, 23, 30 и 31 по отношению к нумерации нативного РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых случаях иллюстративные аминокислотные последовательности аналогов РУУ, описанных в данном документе, включают (конкретные изменения относительно соответствующего остатка нативного РУУ человека (SEQ ID NO: 1) выделены жирным шрифтом):



Аналоги РУУ, описанные в данном документе, приводят к достаточной активности в отношении рецептора NPY2 человека, но недостаточной активности в отношении рецепторов NPY1, NPY4 и NPY5. Аналогичным образом, аналоги РУУ, описанные в данном документе, обладают полезными свойствами, относящимися к возможности их применения в качестве терапевтических способов лечения, включая улучшенную растворимость в водных растворах, улучшенную химическую и физическую стабильность приготовления, расширенный фармакокинетический профиль и минимальный потенциал для иммуногенности.

В некоторых случаях аналоги РУУ, описанные в данном документе, амидированы по С-концевой аминокислоте для того, чтобы повлиять на стабильность. В дополнение к изменениям, описанным в данном документе, аналоги, описанные в данном документе, могут включать одну или более дополнительных модификаций аминокислот, при условии, что аналоги остаются способными связываться и активировать рецептор NPY2 человека. Аналоги РУУ, описанные в данном документе, дополнительно включают фрагмент жирной кислоты, конъюгированный, например, посредством линкера с природной или не встречающейся в природе аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации (т.е. "являются ацилированными"). В некоторых случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, может представлять собой С, D, E, K и Q. В конкретных случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, представляет собой K, при этом конъюгация осуществляется с s-аминогруппой боковой цепи K.

В данном случае ацилирование аналогов РУУ происходит в положении 7 относительно нативного РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1). Таким образом, жирная кислота может действовать как связывающаяся с альбумином молекула, обеспечивая аналоги пролонгированного действия.

Что касается жирной кислоты, она может быть химически конъюгирована с функциональной группой аминокислоты, доступной для конъюгации, либо посредством прямой связи, либо с помощью линкера. Длина и состав жирной кислоты влияют на период полувыведения аналогов РУУ, активность аналогов РУУ *in vivo*, а также растворимость и стабильность аналогов РУУ. Конъюгация с насыщенной жирной одноосновной кислотой или двухосновной кислотой C₁₆-C₂₂ приводит таким образом к получению аналогов РУУ, которые демонстрируют желательный период полувыведения, желательную активность *in vivo* и желательные характеристики растворимости и стабильности.

Иллюстративные насыщенные жирные кислоты C₁₆-C₂₂ для использования, описанного в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, гексадекановую кислоту (т.е. пальмитиновую кислоту, моноокислоту C₁₆), гексадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту C₁₆), гептадекановую кислоту (т.е. маргариновую кислоту, моноокислоту C₁₇), гептадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту C₁₇), стеариновую кислоту (одноосновную кислоту C₁₈), октадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту C₁₈), нонадециловую кислоту (т.е. нонадекановую кислоту, одноосновную кислоту C₁₉), нонадекандиовую

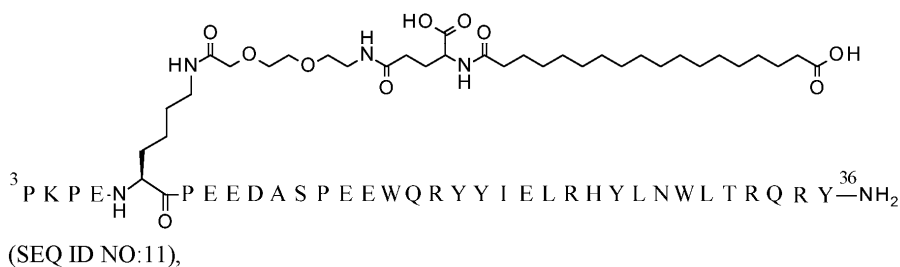
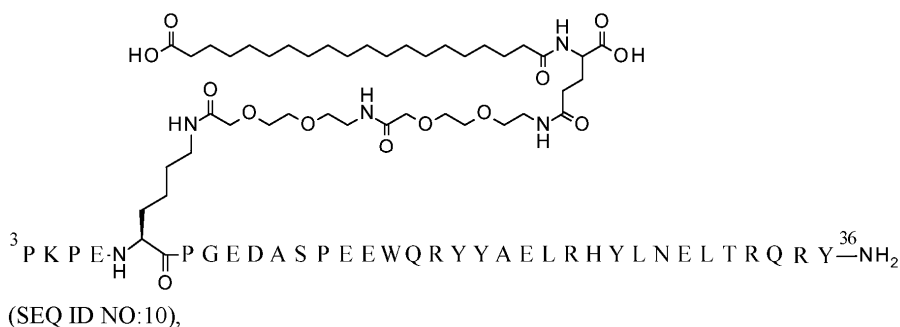
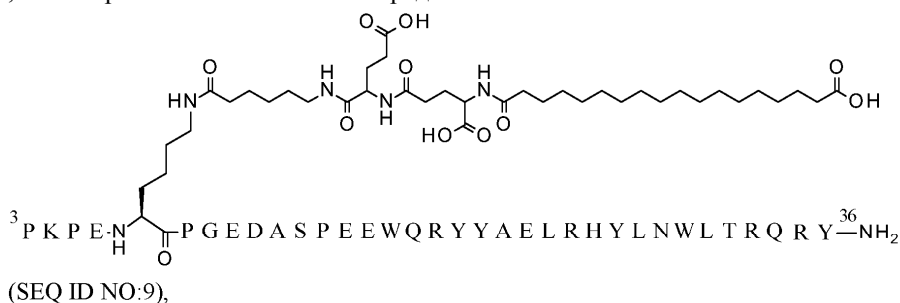
кислоту (двухосновную кислоту C₁₉), эйкозановую кислоту (т.е. арахидиновую кислоту, одноосновную кислоту C₂₀), эйкозандиовую кислоту (т.е. двухосновную кислоту C₂₀), генэйкозановую кислоту (т.е. генэйкозиловую кислоту, одноосновную кислоту C₂₁), генэйкозанодиевую кислоту (двухосновную кислоту C₂₁), докозановую кислоту (т.е. бегеновую кислоту, одноосновную кислоту C₂₂), докозанодиевую кислоту (двухосновную кислоту C₂₂) и их разветвленные и замещенные производные. В некоторых случаях жирная кислота C₁₆-C₂₂ может представлять собой насыщенную одноосновную кислоту C₁₈, насыщенную двухосновную кислоту C₁₈, насыщенную одноосновную кислоту C₁₉, насыщенную двухосновную кислоту C₁₉, насыщенную одноосновную кислоту C₂₀, насыщенную двухосновную кислоту C₂₀ и их разветвленные и замещенные производные. В конкретных случаях жирная кислота C₁₆-C₂₂ может представлять собой пальмитиновую кислоту или гексадекановую кислоту, стеариновую кислоту или октадекановую кислоту, или арахидиновую кислоту или эйкозановую кислоту.

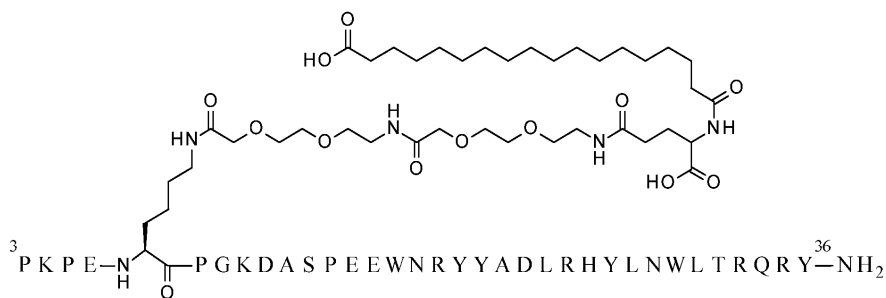
Чтобы способствовать конъюгации жирной кислоты с природной или не встречающейся в природе аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации, аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут включать линкер. В некоторых случаях линкер может представлять собой, по меньшей мере, одно из АЕЕА, Аhx, Е или γЕ, а также их комбинаций.

Когда линкер включает аминокислоты, он может иметь от одного до четырех аминокислотных остатков Е или γЕ. В некоторых случаях линкер может включать один или два аминокислотных остатка Е и/или γЕ. Например, линкер может включать один или два аминокислотных остатка Е и/или γЕ. В других случаях линкер может включать от одного до четырех аминокислотных остатков (таких как, например, аминокислоты Е или γЕ), используемых в комбинации с АЕЕА или Аhx. В частности, линкер может представлять собой комбинации аминокислотных остатков Е и γЕ с АЕЕА или Аhx. В других случаях линкер может представлять собой комбинацию одного или двух аминокислотных остатков γЕ и одного или двух АЕЕА или Аhx. В конкретных случаях линкер может представлять собой фрагмент (АЕЕА)₂•γЕ, фрагмент Аhx•Е•γЕ или фрагмент АЕЕА•γЕ.

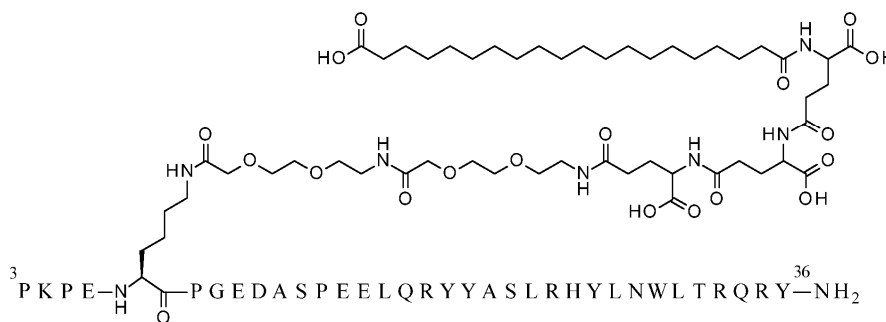
Иллюстративные фрагменты линкер-жирная кислота могут включать (АЕЕА)₂•γЕ-двухосновная кислота C₂₀, Аhx•Е•γЕ-двухосновная кислота C₁₈ или АЕЕА•γЕ•двухосновная кислота C₁₈. Структурные особенности этих фрагментов линкер-жирная кислота приводят к аналогам, имеющим улучшенный период полувыведения по сравнению с нативным РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1) или нативным РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2).

В целом, иллюстративные аналоги РУУ представляют собой:





(SEQ ID NO:12) или



(SEQ ID NO:13).

Хотя аналоги РУУ описаны как содержащие тридцать четыре аминокислоты, подобные аминокислотам нативного РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2), предполагается, что аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут иметь аминокислотную последовательность, основанную на последовательности нативного РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1). То есть аналоги РУУ могут включать две N-концевые аминокислоты (т.е. остатки "УР" в положениях 1 и 2 последовательности SEQ ID NO: 1) нативного РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1), которые впоследствии могут отщепляться *in vivo* при введении индивиду, как это могло бы происходить при эндогенном высвобождении нативного РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1).

Период полувыведения аналогов РУУ, описанных в данном документе, может быть измерен с использованием способов, известных в данной области техники, включая, например, описанные в приведенных ниже Примерах. Аналогичным образом, аффинность аналогов РУУ, описанных в данном документе, к каждому из различных рецепторов NPY человека (например, NPY2R, NPY5R) может быть измерена с помощью способов, известных в данной области техники, для измерения уровней связывания с рецептором, включая, например, способы, описанные в приведенных ниже Примерах, и обычно выражается в виде значения константы ингибирования (K_i). Более того, активность аналогов РУУ, описанных в данном документе, для каждого из рецепторов также может быть измерена с использованием способов, известных в данной области техники, включая, например, анализы активности *in vitro*, описанные ниже, и обычно выражается в виде значения ЕС₅₀.

В результате описанных выше модификаций аналоги РУУ, описанные в данном документе, имеют период полувыведения дольше, чем у нативного РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2). Например, аналоги РУУ могут иметь период полувыведения от около 5 ч до около 24 ч, от около 6 ч до около 23 ч, от около 7 ч до около 22 ч, от около 8 ч до около 21 ч, от около 9 ч до около 20 ч, от около 10 ч до около 19 ч, от около 11 ч до около 18 ч, от около 12 ч до около 17 ч, от около 13 ч до около 16 ч или даже от около 14 ч до около 15 ч. Альтернативно аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут иметь период полувыведения, который составляет около 5 ч, около 6 ч, около 7 ч, около 8 ч, около 9 ч, около 10 ч, около 11 ч, около 12 ч, около 13 ч, около 14 ч, около 15 ч, около 16 ч, около 17 ч, около 18 ч, около 19 ч, около 20 ч, около 21 ч, около 22 ч, около 23 ч или даже около 24 ч, в особенности около 12 ч.

Аналогичным образом, аналоги РУУ, описанные в данном документе, обладают аффинностью связывания с рецептором NPY2 выше, чем у нативного РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2), например, в от около 2 раз до около 10 раз. Альтернативно, аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут иметь аффинность связывания, которая выше в около 2 раз, выше в около 3 раз, выше в около 4 раз, выше в около 5 раз, выше в около 6 раз, выше в около 7 раз, выше в около 8 раз, выше в около 9 раз или даже выше в около 10 раз, в особенности выше в от около 2 раз до около 3 раз, чем у нативного РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2).

Фармацевтические композиции

Описанные в данном документе аналоги РУУ могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, которые можно вводить парентеральным путем (например, внутривенным, внутривенным, внутримышечным, подкожным или трансдермальным). Такие фармацевтические композиции и способы их приготовления хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington, "The

Science and Practice of Pharmacy" (D.B. Troy ed., 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В конкретных случаях аналоги РУУ вводят п/к. Альтернативно, однако, аналоги РУУ могут быть приготовлены в формах для других фармацевтически приемлемых путей, таких как, например, таблетки или другие твердые лекарственные формы для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением; и любые другие формы, используемые в данное время, включая кремы, лосьоны, лекарственная форма для ингаляции и т.п. Чтобы улучшить их переносимость и эффективность *in vivo*, аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут реагировать с любым веществом из ряда неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты/основания. Фармацевтически приемлемые соли и обычные способы их приготовления хорошо известны в данной области техники (см., например, Stahl et al., "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use," 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для использования, описанного в данном документе, включают соли натрия, трифторацетат, гидрохлорид и ацетат.

Описанные в данном документе аналоги РУУ могут вводиться врачом или вводиться самостоятельно с помощью инъекции. Понятно, что номер калибра иглы и величина объема инъекции могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Однако объем инъекции может составлять \leq около 2 мл или даже \leq примерно 1 мл, а калибр иглы может составлять \geq около 27 G или даже \geq около 29 G. В раскрытии также предложены и, следовательно, охвачены новые промежуточные соединения и способы, полезные для синтеза аналогов РУУ, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей. Промежуточные соединения и аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут быть получены различными способами, которые хорошо известны в данной области техники. Например, способ с использованием химического синтеза проиллюстрирован в приведенных ниже примерах. Конкретные этапы синтеза для каждого из описанных путей могут комбинироваться различными способами для получения аналогов РУУ, описанных в данном документе. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалисту в данной области техники.

Аналоги РУУ, описанные в данном документе, как правило, являются эффективными в широком диапазоне доз. Иллюстративные дозы аналогов РУУ, описанных в данном документе, или фармацевтических композиций, включающих их, могут быть в миллиграммах (мг), микрограммах (мкг), нанограммах (нг) или пикограммах (пг) на килограмм (кг) массы тела индивида. Таким образом, суточная доза может составлять от около 1 мкг до около 100 мг.

В данном случае, эффективное количество аналога РУУ в фармацевтической композиции может составлять от около 0,25 мг до около 5,0 мг. Однако специалисту в данной области техники понятно, что в некоторых случаях эффективное количество (т.е. доза/дозировка) может быть ниже нижнего предела указанного выше диапазона и быть более чем достаточным, в то время как в других случаях эффективное количество может представлять собой большие дозы и может применяться с приемлемыми побочными эффектами.

В дополнение к аналогу РУУ фармацевтическая композиция также может включать дополнительный терапевтический агент, в особенности другие противодиабетические средства или средства для похудения. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент может представлять собой, по меньшей мере, одно из инкретина или ингибитора ДПП-IV. Иллюстративные инкретины включают, но не ограничиваются ими, GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид}, GIP, OXM, аналог GCG, аналог GLP-1, аналог GIP, аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или даже аналог инкретина, обладающий тройной рецепторной активностью.

Таким образом, фармацевтическая композиция может включать эффективное количество аналога РУУ, имеющего последовательность SEQ ID NO: 9, и инкретина или ингибитора ДПП-IV, эффективное количество аналога РУУ, имеющего последовательность SEQ ID NO: 10, и инкретина или ингибитора ДПП-IV, эффективное количество аналога РУУ, имеющего последовательность SEQ ID NO: 11, и инкретина или ингибитора ДПП-IV, эффективное количество аналога РУУ, имеющего последовательность SEQ ID NO: 12, и инкретина или ингибитора ДПП-IV или эффективное количество аналога РУУ, имеющего последовательность SEQ ID NO: 13, и инкретина или ингибитора ДПП-IV. В тех случаях, когда инкретин представляет собой GLP-1 или аналог GLP-1, это может быть GLP-1 или аналог GLP-1, такой как альбиглутид, дулаглутид, лираглутид, семаглутид или их комбинации, в особенности дулаглутид.

Способы получения и применения аналогов РУУ

Аналоги РУУ, описанные в данном документе, могут быть синтезированы с помощью любого количества способов пептидного синтеза, известных в данной области техники, с использованием стандартных процедур ручного или автоматизированного твердофазного синтеза. Автоматизированные синтезаторы пептидов коммерчески доступны от, например, Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния) и Protein Technologies Гпс. Тусон, штат Аризона). Реагенты для твердофазного синтеза легко доступны из коммерческих источников. Твердофазные синтезаторы можно использовать в соответствии с инструкциями производителя для блокирования мешающих групп, защиты аминокислот во время реакции, связывания, снятия защиты и эпирирования непрореагировавших аминокислот.

Обычно N- α -карбамоил-защищенная аминокислота и N-концевая аминокислота на растущей пеп-

тидной цепи, присоединенной к смоле, связываются при комнатной температуре в инертном растворителе, таком как ДМФА, N-метилпирролидон или метилхлорид, в присутствии связывающих агентов, таких как диизопропил-1-карбодиимид и 1-гидроксибензотриазол. N- α -карбамоильная защитная группа удаляется из полученной пептидной смолы с использованием реагента, такого как ТФУ или пиперидин, и реакция связывания повторяется со следующей желаемой N- α -защищенной аминокислотой, которая должна быть добавлена к пептидной цепи. Подходящие аминокислотные группы хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Green & Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis," (John Wiley and Sons, 1991). Наиболее часто используемые примеры таких групп включают tBoc и Fmoc. После завершения синтеза пептиды отщепляются от твердофазной подложки с одновременным снятием защиты с боковой цепи с использованием стандартных способов воздействия в кислых условиях.

Специалист в данной области техники поймет, что описанные в данном документе пептидные цепи синтезируются с C-концевым карбоксамидом. Для синтеза C-концевых амидных пептидов, смолы, содержащие линкеры Ринк амид MBHA или Ринк амид AM, обычно используются при синтезе с Fmoc, в то время как смола MBHA обычно используется с при синтезе с tBoc.

Неочищенные пептиды обычно очищают с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонках C8 или C18, используя градиенты вода-ацетонитрил в концентрации от 0,05% до 0,1% ТФУ. Чистоту можно проверить с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ. Идентичность пептидов можно проверить с помощью MS. Пептиды можно солиubilизировать в водных буферах в широком диапазоне pH.

Одно из применений аналогов РYУ, описанных в данном документе, представляет собой использование для снижения уровня глюкозы в крови и/или веса тела у индивидов, в особенности у индивидов с избыточной массой тела или ожирением и страдающих СДТ2. Введение аналога РYУ, как описано в данном документе, может привести к гликемическому контролю за счет улучшения сенсibilизации к инсулину и потери веса. По существу, аналоги РYУ, описанные в данном документе, демонстрируют эффективность снижения уровня глюкозы в крови с дополнительным преимуществом - снижением веса, так что индивиды могут отсрочить переход на инсулин и поддерживать целевые уровни HbA1c.

Способы могут включать этапы, описанные в данном документе, и они могут, но не обязательно, выполняться в описанной последовательности. Однако возможны и другие последовательности. Более того, отдельно взятые или многочисленные этапы могут выполняться либо параллельно и/или с перекрытием во времени, и/или независимо или в многократно повторяемых этапах. Кроме того, способы могут включать дополнительные неуказанные этапы.

Таким образом, такие способы могут включать выбор индивида, который страдает избыточным весом и СДТ2 или предрасположен к нему. Альтернативно, способы могут включать выбор индивида, который страдает ожирением и СДТ2 или предрасположен к нему.

Способы также могут включать введение индивиду эффективного количества, по меньшей мере, одного аналога РYУ, как описано в данном документе, который может быть в форме фармацевтической композиции, как также описано в данном документе. В некоторых случаях, по меньшей мере, один аналог РYУ/фармацевтическая композиция может включать дополнительные терапевтические агенты, такие как инкретин или ингибитор ДПП-IV.

Концентрация/доза/дозировка, по меньшей мере, одного аналога РYУ и, необязательно, инкретина или ингибитора ДПП-IV обсуждаются в другом месте данного документа.

Что касается пути введения то, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, можно вводить известными способами, такими как, например, перорально; с помощью инъекции (т.е. внутриаrтериально, внутривенно, внутривентриально, интрацеребрально, внутрицеребровентрикулярно, внутримышечно, внутриглазно, внутрипортально или внутриочагово); с помощью систем замедленного высвобождения или имплантируемых устройств. В некоторых случаях, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, можно вводить п/к путем болюсной инъекции или непрерывно.

Что касается частоты дозирования то, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т.е. еженедельно), раз в две недели (т.е. каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, вводят п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к каждые две недели или п/к ежемесячно. В конкретных случаях, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, вводят п/к один раз в неделю (QW).

Альтернативно по меньшей мере один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, можно вводить перорально. Как указано выше, касательно частоты дозирования то, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, включающую его, можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т.е. еженедельно), раз в две недели (т.е. каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях, по меньшей мере, один аналог РYУ или фармацевтическую композицию, содержащую его, вводят перорально через день, перорально три раза в неделю, перорально два раза в неделю, перорально один раз в неделю или перорально каждые две

недели. В конкретных случаях аналог РУУ вводят перорально один раз в неделю.

Что касается тех случаев, в которых, по меньшей мере, один аналог РУУ или фармацевтическая композиция, включающая его, вводятся в сочетании с эффективным количеством инкретина, инкретин может представлять собой GCG или аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид} или аналог GLP-1, GIP или аналог GIP, OXM или аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или даже инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью. GCG, аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид}, аналог GLP-1, GIP, аналог GIP, OXM, аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью, можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с, по меньшей мере, одним аналогом РУУ или фармацевтической композицией, включающей его. Кроме того, GCG, аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид}, аналог GLP-1, GIP, аналог GIP, OXM, аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью, можно вводить с частотой, такой же, как частота введения, по меньшей мере, одного аналога РУУ или фармацевтической композиции, включающей его (т.е. через день, два раза в неделю или даже еженедельно). Альтернативно, GCG, аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид}, аналог GLP-1, GIP, аналог GIP, OXM, аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью, можно вводить с частотой, отличной от частоты введения, по меньшей мере, одного аналога РУУ или фармацевтической композиции, включающей его. В других случаях GCG, аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид}, аналог GLP-1, GIP, аналог GIP, OXM, аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG, или инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью, вводят QW. В других случаях аналог РУУ вводят п/к, а GCG, аналог GCG, GLP-1, GLP-1 (7-36)_{амид}, аналог GLP-1, GIP, аналог GIP, OXM, аналог OXM, GIP/GLP-1, GLP-1/GCG или инкретин, обладающий тройной рецепторной активностью, можно вводить перорально.

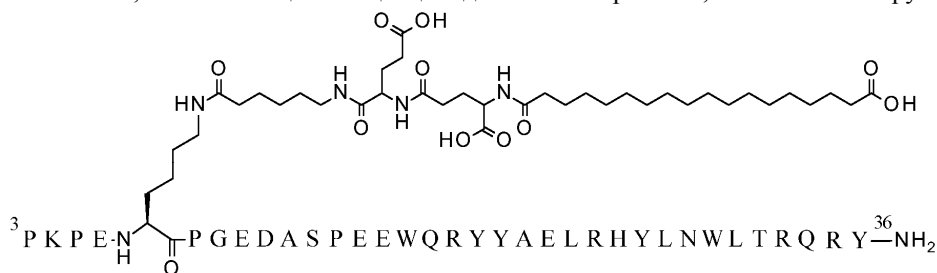
Также предполагается, что способы можно комбинировать с диетой и физическими упражнениями и/или можно комбинировать с дополнительными терапевтическими агентами, отличными от тех, которые обсуждались выше.

Примеры

Нижеследующие неограничивающие примеры предложены в целях иллюстрации, а не ограничения.

Пример 1. Аналог 1 РУУ.

Один аналог РУУ, охватывающий концепцию данного изобретения, может иметь структуру:



(SEQ ID NO:9).

В данном случае N-конец является свободным, а C-концевая аминокислота амидирована как C-концевой первичный амид. К в положении 7 химически модифицирован путем конъюгации s-аминогруппы боковой цепи К в положении 7 с (Ahx-E-(γE)-CO-(CH₂)₁₆-COOH).

Аналог РУУ, соответствующий последовательности SEQ ID NO: 9, получают путем твердофазного пептидного синтеза с использованием стратегии Fmoc/t-Bu на Автоматическом Синтезаторе Пептидов SymphonyX (PTI Protein Technologies Inc.), начиная с амидной смолы RAPP AM-Rink (H40023 Полистирол AM RAM, Rapp polymere GmbH). Соединения аминокислот выполняются с использованием 10 эквивалентов аминокислоты, 0,9 М диизопропилкарбодиимида (ДИК, DIC) и 0,9 М Оксима (молярное соотношение 1:1:1) в ДМФ в течение 3 ч при 25°C. Для снятия защиты используют 25% растворы пиперидина в ДМФ.

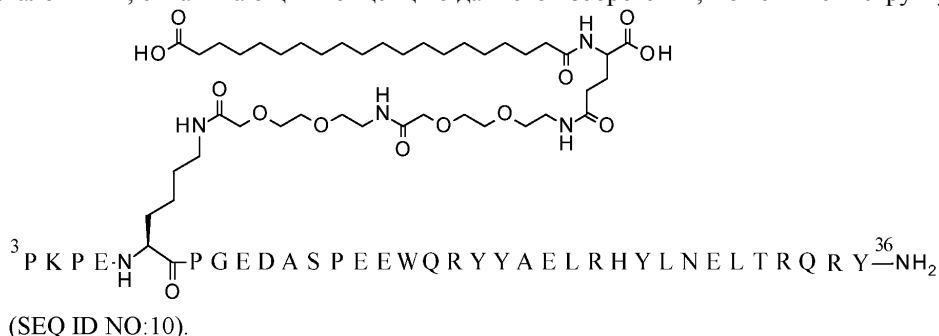
После удлинения пептида на смоле, как описано выше, защитную группу MTT, присутствующую в К в положении 7, удаляют с использованием 30% гексафторизопропанола (ГФИП, HFIP) в дихлорметане (ДХМ, DCM). Дополнительные циклы соединения/снятия защиты с использованием стратегии Fmoc/t-Bu для удлинения боковой цепи К в положении 7 включают Fmoc-6-аминогексановую кислоту (Chem-Imprex International, каталожный номер#02490), Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-OtBu (ChemPer, каталожный номер 100703) и HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. Во всех соединениях используются 3 эквивалента строительного блока с РубОР (3 эквивалента) и DIEA (6 эквивалентов) в ДМФА в течение 3 ч при 25°C.

Сопутствующее отщепление от смолы и удаление защитной группы боковой цепи проводят в растворе, содержащем ТФУ:триизопропилсилан:1,2-этандитиол:метанол:тиоанизол 80:5:5:5 (об./об.) в течение 2 ч при 25°C с последующим осаждением с помощью холодного эфира. Неочищенный пептид очищают до чистоты >99% (выход очищенного пептида 15-20%) с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке с фенилгексиллом (Phenomenex, Luna; 5 мкм, 100А), при этом подходящие фракции объединяют и лиофилизируют.

Чистоту аналога РУУ проверяют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, и идентичность подтверждают с помощью ЖХ/МС (наблюдаемое: $M+3H^+/3 = 1659,2 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+3H^+/3 = 1659,2$; наблюдаемое: $M+4H^+/4 = 1244,6 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+4H^+/4 = 1244,6$; наблюдаемое: $M+5H^+/5 = 995,9 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+5H^+/5 = 995,9$).

Пример 2. Аналог 2 РУУ.

Один аналог РУУ, охватывающий концепцию данного изобретения, может иметь структуру:

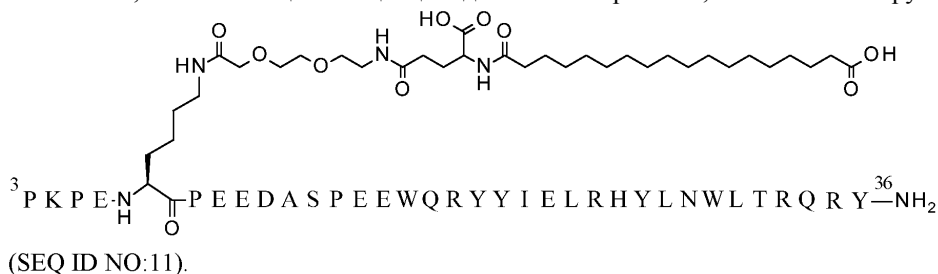


Как и в примере 1, N-конец является свободным, а C-концевая аминокислота амидирована как C-концевой первичный амид. Однако, в тоже время К в положении 7 химически модифицирован путем конъюгации s-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)этокси]ацетил)2-(γE)-CO-(CH₂)₁₈-COOH.

Аналог РУУ, соответствующий последовательности SEQ ID NO: 10, получают путем твердофазного пептидного синтеза, аналогичного тому как описано выше в примере 1. Таким образом, FMOC-NHPEG₂-CH₂COOH и HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu присоединяются к боковой цепи после отщепления МТТ с использованием 3 эквивалентов строительного блока с РубОР (3 эквивалента) и DIEA (6 эквивалентов) в ДМФ в течение 3 ч при 25°C. Чистоту аналога РУУ проверяют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, и идентичность подтверждают с помощью ЖХ/МС (наблюдаемое: $M+3H^+/3 = 1665,4 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+3H^+/3 = 1665,5$; наблюдаемое: $M+4H^+/4 = 1249,3 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+4H^+/4 = 1249,4$; наблюдаемое: $M+5H^+/5 = 999,7 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+5H^+/5 = 999,7$).

Пример 3. Аналог 3 РУУ.

Один аналог РУУ, охватывающий концепцию данного изобретения, может иметь структуру:

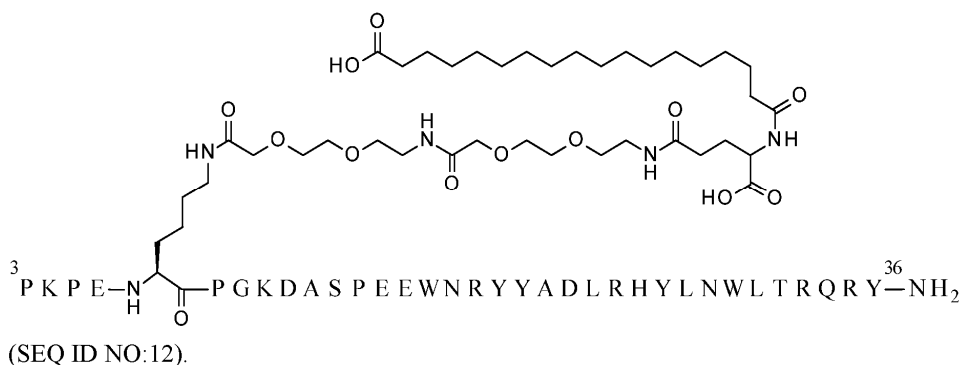


Как и в примере 1, N-конец является свободным, а C-концевая аминокислота амидирована как C-концевой первичный амид. Однако, в тоже время, К в положении 7 химически модифицирован путем конъюгации s-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γE)-CO-(CH₂)₁₆-COOH.

Аналог РУУ, соответствующий последовательности SEQ ID NO: 11, получают путем твердофазного пептидного синтеза, аналогично тому как описано выше в примере 1. Таким образом, FMOC-NHPEG₂-CH₂COOH и HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu присоединяются к боковой цепи после отщепления МТТ с использованием 3 эквивалентов строительного блока с РубОР (3 эквивалента) и DIEA (6 эквивалентов) в ДМФ в течение 3 ч при 25°C. Чистоту аналога РУУ проверяют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, и идентичность подтверждают с помощью ЖХ/МС (наблюдаемое: $M+3H^+/3 = 1664,7 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+3H^+/3 = 1664,9$; наблюдаемое: $M+4H^+/4 = 1248,9 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+4H^+/4 = 1248,9$; наблюдаемое: $M+5H^+/5 = 999,3 (+/-0,2)$; вычисляемое: $M+5H^+/5 = 999,3$).

Пример 4. Аналог 4 РУУ.

Один аналог РУУ, охватывающий концепцию данного изобретения, может иметь структуру:

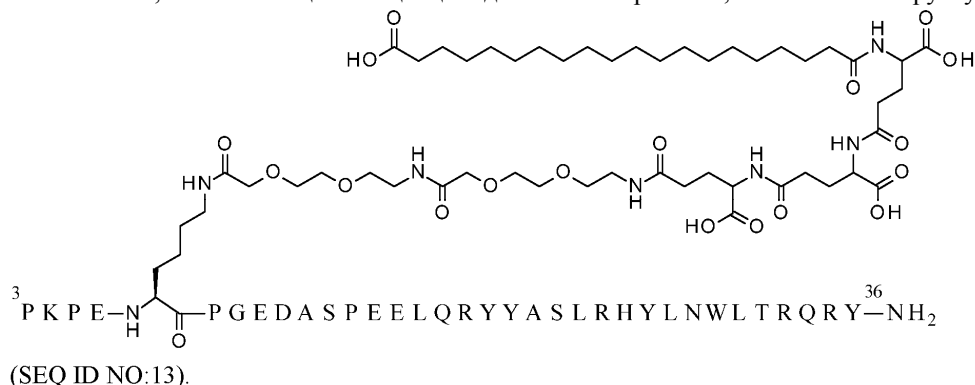


Как и в примере 1, N-конец является свободным, а С-концевая аминокислота амидирована как С-концевой первичный амид. Однако, в то же время, К в положении 7 химически модифицирован путем конъюгации s-аминогруппы боковой цепи К с [(2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)2-(γE)-CO-(CH₂)₁₆-COOH.

Аналог PYY, соответствующий последовательности SEQ ID NO: 12, получают путем твердофазного пептидного синтеза, аналогично тому как описано выше в примере 1. Таким образом, FMOC-NHPEG₂-CH₂COOH и HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu присоединяются к боковой цепи после отщепления MTT с использованием 3 эквивалентов строительного блока с РувОР (3 эквивалента) и DIEA (6 эквивалентов) в ДМФ в течение 3 ч при 25°C. Чистоту аналога PYY проверяют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, и идентичность подтверждают с помощью ЖХ/МС (наблюдаемое: М+3Н⁺/3 = 1664,8 (+/-0,2); вычисляемое: М+3Н⁺/3 = 1665,5; наблюдаемое: М+4Н⁺/4 = 1248,9 (+/-0,2); вычисляемое: М+4Н⁺/4 = 1249,4; наблюдаемое: М+5Н⁺/5 = 998,9 (+/-0,2); вычисляемое: М+5Н⁺/5 = 995,7).

Пример 5. Аналог 5 PYY.

Один аналог PYY, охватывающий концепцию данного изобретения, может иметь структуру:



Как и в примере 1, N-конец является свободным, а С-концевая аминокислота амидирована как С-концевой первичный амид. Однако, в то же время, К в положении 7 химически модифицирован путем конъюгации s-аминогруппы боковой цепи К с [(2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)2-(γE)₃-CO-(CH₂)₁₈-COOH.

Аналог PYY, соответствующий последовательности SEQ ID NO: 13, получают путем твердофазного пептидного синтеза, аналогично тому, как описано выше в примере 1. Таким образом, FMOC-NHPEG₂-CH₂COOH и HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu присоединяются к боковой цепи после отщепления MTT с использованием 3 эквивалентов строительного блока с РувОР (3 эквивалента) и DIEA (6 эквивалентов) в ДМФ в течение 3 ч при 25°C. Чистоту аналога PYY проверяют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, и идентичность подтверждают с помощью ЖХ/МС (наблюдаемое: М+3Н⁺/3 = 1732,2 (+/-0,2); вычисляемое: М+3Н⁺/3 = 1732,3; наблюдаемое: М+4Н⁺/4 = 1299,4 (+/-0,2); вычисляемое: М+4Н⁺/4 = 1299,5; наблюдаемое: М+5Н⁺/5 = 1039,7 (+/-0,2); вычисляемое: М+5Н⁺/5 = 1039,8).

Пример 6. Активность Аналогов PYY In Vitro.

(1) Связывание in vitro с рецепторами hNPY1, hNPY2, hNPY4 и hNPY5.

Цель:

оценить аффинность связывания in vitro (K_i) аналогов PYY из примеров 1-5 в отсутствие бычьего сывороточного альбумина (БСА) со следующими рецепторами человека (h): hNPY1R, hNPY2R, hNPY4R и hNPY5R. Анализы конкурентного радиолигандного связывания с мембранами, полученными из клеточных линий, сверхэкспрессирующих каждый из рекомбинантных рецепторов, и соответствующих [¹²⁵I]-меченных пептидов, используют в способе сквинтиляционного анализа сближения (SPA).

Аффинность связывания для связанных нативных пептидов, PYY₁₋₃₆ (SEQ ID NO: 1), PYY₃₋₃₆ (SEQ ID NO: 2) и Панкреатического Полипептида₁₋₃₆ (ПП₁₋₃₆; SEQ ID NO: 14), определяется в каждом анализе в качестве контроля.

Способы.

Аналоги РУУ, нативный РУУ₁₋₃₆ человека и контрольный РУУ₃₋₃₆ синтезированы в Lilly Research Laboratories (Индианаполис, Индиана, США) и охарактеризованы способами ЖХ/МС, ЯМР и ЖХ/УФ-анализа (чистота 99,5%). Содержание пептидов оценивается в 80% от массы порошка. Пептиды готовят в виде 10 мМ стокового раствора в 100% ДМСО и хранят замороженными при -20°C непосредственно до момента проведения исследования в анализах.

Для hNPY1R транзистентная сверхэкспрессия осуществляется с использованием клеток CHO. Стабильно трансфицированные клеточные линии получают для hNPY2R и hNPY4R путем субклонирования кДНК рецептора в плазмиду для экспрессии pcDNA3.1 и трансфекции в эмбриональные клетки почки человека (НЕК) 293 с последующей селекцией с помощью Генетина. Клонирование hNPY5R выполняется в Multispan, Inc. (Хейворд, Калифорния).

Для получения неочищенных клеточных мембран hNPY1R, hNPY2R, mNPY2R и hNPY4R используются два разных способа (описанных ниже). Мембраны hNPY5R приобретаются у Multispan, Inc. (#MCG1275).

Способ 1. Для мембран hNPY2R и hNPY4R, замороженные осадки клеток лизируют на льду в 10 мл гипотонического буфера для гомогенизации, содержащего 50 мМ Трис HCl, pH 7,5, и ингибиторы протеазы Roche Complete™ с ЭДТА (#1169749001), на один грамм влажной клеточной массы. Клеточную суспензию растирают с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пестиком Teflon®, в течение 25 движений. Гомогенат центрифугируют при 4°C при 1100×g в течение 10 мин. Супернатант собирают и хранят на льду, в то время как осадки ресуспендируют в буфере для гомогенизации и повторно гомогенизируют, как описано выше. Гомогенат центрифугируют при 1100×g в течение 10 мин. Второй супернатант объединяют с первым супернатантом и центрифугируют при 35000×g в течение 1 ч при 4°C. Полученный осадок мембран ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеаз в концентрации приблизительно от 1 до 3 мг/мл, быстро замораживают в жидком азоте и хранят в виде аликвот в морозильной камере с температурой -80°C до использования. Концентрация белка определяется с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, #23225) с BCA в качестве стандарта.

Способ 2. Для мембран hNPY1R, замороженные осадки клеток лизируют на льду в 5 мл гипотонического Буфера для гомогенизации, содержащего 25 мМ Трис HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 25 единиц/мл ДНКазы I (Invitrogen, #18047-019) и Ингибиторы Протеазы Roche Complete™ без EDTA (#11836170001), на один грамм влажной клеточной массы. Клеточную суспензию растирают с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пестиком Teflon®, в течение 25 движений. Гомогенат центрифугируют при 4°C при 1800×g в течение 15 минут в конической пробирке на 50 мл. Супернатант собирают и хранят на льду, в то время как осадки ресуспендируют в буфере для гомогенизации и повторно гомогенизируют, как описано выше, за исключением того, что ДНКазы I не используются в буфере для гомогенизации. Гомогенат центрифугируют при 1800×g в течение 15 минут. Второй супернатант объединяют с первым супернатантом и центрифугируют при 25000×g в течение 30 мин при 4°C. Полученный осадок мембраны ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеаз в концентрации приблизительно 2 мг/мл, разделяют на аликвоты и хранят в морозильной камере с температурой -80°C до использования. Концентрация белка определяется с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, #23225) с BCA в качестве стандарта. Общие способы анализа связывания - Равновесные константы диссоциации (K_d) 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 K_d , определенные для приготовлений рецепторов, используемых в данном исследовании, являются следующими: hNPY2R, 0,0047 нМ; hNPY1R, 0,07 нМ; hNPY4R, 0,084 нМ; и hNPY5R 0,896 нМ.

Протокол связывания рецептора hNPY1R - Рецепторсвязывающая аффинность (K_i) аналогов пептида РУУ и РУУ₁₋₃₆ для hNPY1R определяется с помощью анализа конкурентного радиолигандного связывания с recombinantным [¹²⁵I]-РУУ₁₋₃₆ человека (#NEX341, 2200 Ки/ммоль), полученным от Perkin Elmer (Уолтем, Массачусетс). Анализ проводят способом SPA с использованием поливинилтолуольных (PVT) SPA-гранул, связанных с агглютинином зародышей пшеницы (# RPNQ0001, Perkin Elmer). Буфер для анализа (25 мМ HEPES, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 2,5 мМ CaCl₂ и 0,2% мас./об. Бацитрацина (RPI, #32000)) используют для приготовления реагентов. Аналог РУУ и РУУ₁₋₃₆ размораживают и проводят 3-кратное последовательное разведение в 100% ДМСО (10-точечные кривые зависимости ответа от концентрации) с помощью устройство для манипуляций с жидкостями Tecan Evo. Выполняют 20-кратное понижающее разведение пептида в буфере для анализа для снижения уровня ДМСО и концентрации пептида перед добавлением в аналитический планшет. Затем 5 мкл серийно разведенного пептида или ДМСО переносят в аналитический планшет Corning® 3632 с прозрачным дном, содержащий 45 мкл буфера для анализа или немеченого контроля РУУ₁₋₃₆ (неспецифическое связывание или НСС, при конечной концентрации 10 нМ). Затем добавляют 50 мкл [¹²⁵I]-РУУ₁₋₃₆ (конечная концентрация 0,05 нМ) и 50 мкл мембран hNPY1R (1,0 мкг/лунку). В последнюю очередь добавляют 50 мкл WGA SPA гранул (50 мкг/лунку). Ко-

нечная концентрация ДМСО составляет 0,125%. Планшеты герметично закрывают и перемешивают на планшетном шейкере (настройка 6) в течение 1 мин и считывают с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer TRILUX MicroBeta® после 10 ч инкубации/времени отстаивания гранул при комнатной температуре. Конечные диапазоны концентраций в анализе для пептидов, исследуемых на кривых ответа, являются следующими: аналоги РУУ (от 2,5 мкМ до 0,13 нМ) и РУУ₁₋₃₆ (от 10 нМ до 0,5 пМ).

Протокол связывания рецептора hNPY2 - Рецепторсвязывающая аффинность (K_i) аналогов пептида РУУ и ПП₁₋₃₆ для hNPY2R определяют с помощью анализа конкурентного радиолигандного связывания, как описано выше для hNPY1R. Конечные диапазоны концентраций в анализе для пептидов, исследуемых на кривых ответа, являются следующими: аналоги РУУ (от 0,1 мкМ до 5 пМ) и РУУ₃₋₃₆ (от 10 нМ до 0,5 пМ). Протокол связывания рецептора hNPY4R - Рецепторсвязывающая аффинность (K_i) аналогов пептида РУУ и ПП₁₋₃₆ для hNPY4R определяют с помощью анализа конкурентного радиолигандного связывания, как описано выше для hNPY1R. Конечные диапазоны концентраций в анализе для пептидов, исследуемых на кривых ответа, являются следующими: аналоги РУУ (от 2,5 мкМ до 0,13 нМ) и РУУ₁₋₃₆ (от 10 нМ до 0,5 пМ). Протокол связывания рецептора hNPY5R - Рецепторсвязывающая аффинность (K_i) аналогов пептида РУУ и РУУ₁₋₃₆ для hNPY5R определяют с помощью анализа конкурентного радиолигандного связывания, как описано выше для hNPY1R. Конечные диапазоны концентраций в анализе для пептидов, исследуемых на кривых ответа, являются следующими: аналоги РУУ (от 1 мкМ до 10 пМ) и РУУ₁₋₃₆ (от 1 мкМ до 10 пМ). Анализ данных для анализов связывания рецептора NPY - Необработанные данные числа событий связывания в минуту (CPM - count per minute) для кривых концентрации аналогов РУУ, РУУ₁₋₃₆, РУУ₃₋₃₆ или ПП₁₋₃₆, преобразуют в процент ингибирования путем вычитания неспецифического связывания (НСС, связывание в присутствии избытка немеченого РУУ₁₋₃₆, РУУ₃₋₃₆ или ПП₁₋₃₆, соответственно) из отдельных значений CPM, и деления на общий сигнал связывания, также скорректированный путем вычитания неспецифического связывания, как представлено в уравнении ниже:

$$\% \text{ Специфического ингибирования} = 100 -$$

$$\left[\frac{\text{CPM для Аналога или Контроля} - \text{CPM для НСС}}{\text{CPM для Общего Связывания} - \text{CPM для НСС}} \times 100 \right].$$

Данные анализируют способом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели (максимум кривой, минимум кривой, IC_{50} , угловой коэффициент Хилла) (Genedata Screener, версия 13.0.5, Genedata AG, Базель, Швейцария). Константу аффинности (K_i) рассчитывают из относительного значения IC_{50} исходя из уравнения $K_i = IC_{50} / (1 + D/K_d)$, где D = концентрация радиолиганда, используемого в эксперименте, IC_{50} представляет собой концентрацию, вызывающую 50% ингибирования связывания, и K_d представляет собой равновесную константу диссоциации связывания радиолиганда, определенную в анализе связывания при насыщении (указанного выше).

Квалификатор (>) указывает на то, что данные не достигли 50%-ного ингибирования относительно максимального связывания в отсутствие конкурента, в результате чего K_i рассчитывали с использованием самой высокой концентрации соединения, исследованной в анализе.

Полученные значения K_i рассчитываются как среднее геометрическое, как представлено ниже:

$$\text{Среднее Геометрическое Значение} = 10^{(\text{Среднее Арифметическое для Log}_{10} \text{ Значений } K_i)}$$

Стандартная ошибка среднего (SEM) рассчитывается с использованием способа дельты, как представлено ниже:

$$\text{SEM} = \text{Среднее Геометрическое} \times \frac{\text{SD log преобразованных данных}}{\text{Квадратный корень из n}} \times \ln(10),$$

где SD представляет собой стандартное отклонение, n представляет собой количество независимых проведенных экспериментов, а $\ln(10)$ представляет собой натуральный логарифм 10.

Селективность пептидов для hNPY2R (Y2) по сравнению с hNPY5R (Y5), hNPY4R (Y4) и/или hNPY1R (Y1) рассчитывают путем деления на значения, полученные для hNPY2R, в нМ.

Результаты.

Таблица 1

Связывание (K_i) In Vitro с hNPY1R, hNPY2R, hNPY4R и hNPY5R

Пептид	hNPY2R (нМ)	hNPY5R (нМ)	hNPY4R (нМ)	hNPY1R (нМ)	Кратность (Y5/Y2)	Кратность (Y4/Y2)	Кратность (Y1/Y2)
ПП ₁₋₃₆	--	--	0,07	--	--	--	--
РУУ ₁₋₃₆	0,007	0,37	5	0,06	52	714	8,6
РУУ ₃₋₃₆	0,008	3,6	27	7	450	3375	875
Пример 1	0,011	59	626	256	5363	56909	23272
Пример 2	0,070	>1000	>1840	>1460	>14285	>26286	>20857
Пример 3	0,009	36,4	112	>1550	4044	12444	>193750
Пример 4	0,005	Н/О	280	>148	Н/П	56000	>29600
Пример 5	0,030	Н/О	560	>1530	Н/П	18666	>51000
Реф. 1*	0,016	189	--	--	11812	--	--
Реф. 2*	0,021	112	--	--	5333	--	--
Реф. 3*	0,013	469	--	--	36076	--	--

* Известный аналог РУУ для сравнения; см. международную публикацию патентной заявки № WO 2016/198682, при этом Реф. (референт) 1 соответствует Соединению 4 согласно приведенной публикации, Реф. 2 соответствует Соединению 21 согласно приведенной публикации и Реф. 3 соответствует Соединению 32 согласно приведенной публикации

H/O - Не определено (ND)

H/П- Не применимо (NA)

Как представлено выше, аналоги РУУ из примеров 1-5 являются высокоселективными в отношении рецептора hNPY2, даже демонстрируя пониженную аффинность связывания с рецепторами hNPY5, hNPY4 и hNPY1 по сравнению с нативным РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2). (2) Активность цАМФ *in vitro* в отношении рецептора NPY2 человека.

Цель:

определить *in vitro* функциональную активности аналогов РУУ из примеров 1-5 относительно активности нативного РУУ₃₋₃₆ человека путем измерения ингибирования форсколин-индуцированного внутриклеточного продуцирования цАМФ в клетках НЕК 293, сверхэкспрессирующих рекомбинантный рецептор NPY2 человека.

Способы.

Аналоги РУУ и РУУ₃₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 2) синтезируют, характеризуют и хранят, как описано выше, в анализах связывания рецепторов.

Клонирование рецептора - стабильно трансфицированную клеточную линию получают путем субклонирования кДНК рецептора hNPY2 в плазмиду для экспрессии pcDNA3.1 и ее трансфекции в клетки НЕК 293 с последующей селекцией с помощью Geneticin. Аликвоты клеток (1×10^7 клеток/мл) при пассаже 9 отбирают и хранят замороженными в паровой фазе резервуара с жидким азотом. Эти замороженные аликвоты используются во время проведения анализа. Клетки сохраняют жизнеспособность более 95% в течение нескольких месяцев.

Анализ цАМФ hNPY2R - Ингибирование форсколин-индуцированного продуцирования цАМФ с помощью аналогов РУУ или РУУ₃₋₃₆ измеряется с использованием клеток НЕК 293, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hNPY2R. Замороженные аликвоты клеток размораживают на водяной бане при 37°C. Клетки переносят в пробирку на 50 мл с 10 мл культуральной среды (среда для культивирования клеток MEM от Life Tech 11090-081 с 10% FBS от Life Tech 10082-147, 1 mM L-Глутамином от Life Tech 25030-081, 1xNEAA от Life Tech 11140-050, 1 mM пируватом натрия от Life Tech 11360-070, 1x раствором антибиотиков-противогрибковые препараты от Life Tech 15240-062) и центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин в настольной центрифуге Beckman. Супернатант удаляют, а осадок клеток ресуспендируют в 10 мл среды для культивирования клеток с последующим пропусканием через фильтр 40 мкм. Точный подсчет количества клеток и их жизнеспособность определяется с помощью анализатора Vi-Cell Analyzer от Beckman-Coulter (Vi-Cell XR 2.03). 8000 клеток на лунку помещают в белый 384-луночный аналитический планшет (Corning, покрытый поли-D-лизином, белый/непрозрачный, каталожный номер #356661) с использованием дозатора Combi-Tip (Thermo Scientific). Планшеты центрифугируют 1 секунду при 1000 об/мин и инкубируют от 18 до 20 ч при 37°C в инкубаторе с контролем CO₂ на уровне 5%. Питательную среду удаляют из аналитических планшетов, осторожно постукивая по бумажному полотенцу. 10 мкл буфера для анализа [1X HBSS (Hyclone, #SH3026801), 20 mM HEPES, pH 7,5 (Hyclone #SH30237.01), 0,1% мас./об. Казеина (CTL Scientific Supply Corp., #440203H), 500 мкМ IBMX (Sigma-Aldrich #15876)] добавляется в лунки с помощью дозатора Combi-Tip с последующим центрифугированием в течение 10 с при 1500 об/мин. Кривую зависимости реакции от концентрации (20 точек) при 2-кратных разведениях получают в 100% ДМСО с использованием технологии акустического дозирования (Labcyte Echo 550). Клетки подвергают воздействию аналогов РУУ или РУУ₃₋₃₆ человека в течение 45 мин при 37°C (конечная концентрация ДМСО = 1%), затем стимулируют 1 мкМ форсколина (Sigma-Aldrich, #F6886) в течение 45 минут при 37°C. Внутриклеточный цАМФ определяют количественно с использованием набора CisBio cAMP-G_i Dynamic (#62AM9PEB). Вкратце, уровни цАМФ в клетке детектировали с использованием набора реагентов для ГФВР путем добавления конъюгата цАМФ-d2 в буфер для лизиса клеток (10 мкл) с последующим добавлением Eu³⁺-криплат-меченого антитела против цАМФ, также в буфер для лизиса клеток (10 мкл). Полученную реакцию конкурентного анализа инкубировали в течение, по меньшей мере, 60 мин при комнатной температуре и затем считывали с помощью прибора PerkinElmer Envision™ с возбуждением при 320 нм и излучением при 665 нм и 620 нм. Конечные диапазоны концентраций в анализе для пептидов, исследуемых на кривых ответа, являются следующими: аналоги РУУ (от 0,1 мкМ до 0,2 пМ) и РУУ₃₋₃₆ человека (от 10 нМ до 0,02 пМ). Стандартную кривую известных концентраций цАМФ (от 0,5 мкМ до 1 пМ) получают в буфере для анализа. Лунки, в которых отсутствует добавляемый конкурент, или в которых находится избыток добавляемого РУУ₃₋₃₆ человека, включаются в каждый планшет как Контроль Максимального Ответа и Контроль Ингибитора, соответственно.

Анализ данных для анализа цАМФ рецептора hNPY2 - Флуоресценция с временным разрешением используется для расчета коэффициента флуоресценции (665 нм/620 нм), который обратно пропорционален количеству присутствующего цАМФ. Сигналы, характерные для аналогов РУУ и РУУ₃₋₃₆ человека,

были преобразованы в нМ цАМФ на лунку с помощью стандартной кривой цАМФ, построенной в виде относительные единицы ответа (эмиссия при 665 нм/620 нм*10,000, по оси Y) в зависимости от концентрации цАМФ (по оси X).

Количество вырабатываемого цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразовывали в процент от максимального ответа, наблюдаемого только с форсколином, как представлено в уравнении ниже:

$$\% \text{ Специфического Ингибирования} = \frac{\text{Пептид-Контроль Ингибитора}}{\text{Максимальный Ответ-Контроль Ингибитора}}$$

где контроль ингибитора представляет собой цАМФ, продуцируемый в присутствии добавленного избытка РУУ₃₋₃₆ человека, максимальный ответ представляет собой цАМФ, продуцируемый в присутствии только форсколина, и пептид представляет собой цАМФ, продуцируемый в присутствии исследуемого пептида.

Процент специфического ингибирования (ось y) отложен в зависимости от концентрации конкурента (ось x) и проанализирован с помощью способа нелинейной регрессии (Genedata Screener, версия 13.0.5, Genedata AG, Базель, Швейцария) с использованием четырехпараметрической модели (максимум кривой, минимум кривой, IC₅₀, угловой коэффициент Хилла), как определено ниже:

$$y = \text{минимум кривой} + \frac{\text{максимум кривой} - \text{минимум кривой}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{\text{Угловой коэффициент Хилла}}}$$

Относительное значение IC₅₀ представляет собой концентрацию, вызывающую 50% ингибирования форсколин-индуцированного продуцирования цАМФ.

Полученные значения IC₅₀ рассчитываются как среднее геометрическое, как представлено ниже:

$$\text{Среднее Геометрическое Значение} = 10^{(\text{Среднее Арифметическое для Log}_{10} \text{ Значений IC}_{50})}$$

Стандартная ошибка среднего (SEM) рассчитывается с использованием способа дельты, как представлено ниже:

$$SEM = \text{Среднее Геометрическое} \times \frac{SD \log \text{ преобразованных данных}}{\text{Квадратный корень из } n} \times \ln(10),$$

где SD представляет собой стандартное отклонение, n представляет собой количество независимых проведенных экспериментов, а ln(10) представляет собой натуральный логарифм 10.

Результаты.

Таблица 2

Активность цАМФ in vitro в отношении рецептора hNPY2

Пептид	hNPY2R EC ₅₀ (нМ)
РУУ ₁₋₃₆	0,12
РУУ ₃₋₃₆	0,15
Пример 1	0,07
Пример 2	1,23
Пример 3	0,15
Пример 4	0,06
Пример 5	0,55
Реф. 1*	0,30
Реф. 2*	0,23
Реф. 3*	0,32

* Известный аналог РУУ для сравнения; см. международную публикацию патентной заявки № WO 2016/198682, при этом Реф. (референт) 1 соответствует Соединению 4 согласно приведенной публикации, Реф. 2 соответствует Соединению 21 согласно приведенной публикации, и Реф. 3 соответствует Соединению 32 согласно приведенной публикации

Как представлено выше, результаты анализа цАМФ демонстрируют функциональную активность аналогов РУУ из примеров 1-5 в отношении рецептора hNPY2, при этом пример 2 проявляет самую слабую специфическую активность, которая в 12 раз ниже относительно активности РУУ₃₋₃₆ человека. (3) Активность ГТФγS in vitro в отношении рецептора hNPR2.

Цель:

оценить рецептор-опосредованную активацию G-белков аналогами РУУ из примеров 1-5. Рецептор-опосредованную активацию можно измерить с помощью негидролизуемого аналога ГТФ, ГТФγ[³⁵S]. Агонист-опосредованная стимуляция рецепторов, связанных с G-белком, приводит к активации связанных с мембраной гетеротримерных комплексов Gαβγ-белок. Это представляет собой первый шаг в передаче внеклеточных сигналов для модификации внутриклеточных путей. В данном случае, функциональный анализ ГТФγ[³⁵S] используется для оценки активности различных аналогов РУУ в отношении рецептора hNPY2.

Способы.

Аналоги РУУ, РУУ₁₋₃₆ человека (SEQ ID NO: 1) и контрольный пептид РУУ₃₋₃₆ (SEQ ID NO: 2) синтезируют, характеризуют и хранят, как описано выше, в анализах связывания рецепторов.

Для каждого исследуемого пептида кривые зависимости ответа от концентрации (CRC) с 1/3 логарифмических разведений (логарифмические концентрации от -6,52 до -12,52) реализовываются с помощью устройства для манипуляций с жидкостями Hamilton NIMBUS в буфере для анализа (20 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM ЭДТА) с добавлением 0,2% Бацитрацина (US Biologicals #11805) и 0,5% ДМСО. Конечные концентрации Бацитрацина и ДМСО при анализе составляют 0,05% и 0,125%, соответственно. Мембраны hNPY2R (Multispan #HTS066M) предварительно подготавливают путем доведения их до концентрации 7,5 мкг/мл в буфере для анализа с добавлением 20 мкМ ГДФ (Sigma #G-7127) и 6 мкг/мл Сапонины (Sigma #S-4521), и мембраны hNPY2R инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин перед добавлением во время проведения анализа. ГТФγS [³⁵S] (PerkinElmer #NEG030H) предварительно разводят в буфере для анализа до концентрации 0,6 нМ. WGA SPA-гранулы (PerkinElmer # RPNQ0001) доводят до концентрации 12 мг/мл в буфере для анализа. Анализ проводят в 96-луночной планшете (Costar #3604), сначала добавляя 100 мкл мембран hNPY2R, затем 50 мкл раствора для построения CRC, затем 50 мкл раствора ГТФγS [³⁵S] до конечного объема 200 мкл. Планшет накрывают и помещают на орбитальный шейкер (175 об/мин на 45 минут) при комнатной температуре. Затем добавляют 25 мкл SPA-гранул, планшет снова герметизируют и встряхивают для перемешивания, затем снова помещают на орбитальный шейкер на 3 часа при комнатной температуре. Затем планшет центрифугируют в течение 5 минут при 500 об/мин и считывают на анализаторе PerkinElmer 2450 Microplate в течение 1 минуты на лунку. Исходное связывание (CPM) определяется в отсутствие аналога РУУ или РУУ₃₋₃₆ человека и используется для расчета процента выше исходного значения для каждой концентрации пептида по следующему уравнению: (аналог РУУ или РУУ₃₋₃₆ человека, CPM - Исходное CPM)/(Исходное CPM)*100. Значения EC₅₀ (нМ) определяются путем проведения нелинейного регрессионного анализа логарифма концентраций и процента от исходных значений (логарифм(агонист) относительно ответа - Переменный угловой коэффициент (четырепараметрическая модель)) в GraphPad Prism 7.0 с использованием уравнения: Y=Минимум кривой + (Максимум кривой-Минимум кривой)/(1+10^{-(LogEC₅₀-X)*Угловой Коэффициент Хилла)). Среднее геометрическое значение и стандартная ошибка среднего вычисляются из значений EC₅₀ (нМ) с использованием функции сбора статистики по столбцам в GraphPad Prism 7.0. Результаты: Таблица 3. Активность ГТФγS In Vitro в отношении Рецептора hNPY2.}

Пептид	hNPY2R EC ₅₀ (нМ)
РУУ ₁₋₃₆	0,42
РУУ ₃₋₃₆	0,43
Пример 1	0,08
Пример 2	1,83
Пример 3	0,06
Пример 4	0,04
Пример 5	0,16
Реф. 1*	0,22
Реф. 2*	0,13
Реф. 3*	0,11

* Известный аналог РУУ для сравнения; см. международную публикацию патентной заявки № WO 2016/198682, при этом Реф. (референт) 1 соответствует Соединению 4 согласно приведенной публикации, Реф. 2 соответствует Соединению 21 согласно приведенной публикации, и Реф. 3 соответствует Соединению 32 согласно приведенной публикации.

Как представлено выше, результаты функционального анализа ГТФγS [³⁵S] демонстрируют активность аналогов РУУ в отношении рецептора hNPY2, при этом пример 2 проявляет самую слабую специфическую активность, которая в 4 раза ниже относительно активности РУУ₃₋₃₆ человека.

(4) Фармакокинетика

Цель:

изучить фармакокинетические свойства аналогов РУУ.

Способы.

ЖХ/МС - концентрации в плазме различных аналогов РУУ определяются способами ЖХ/МС. Способы измеряют полное соединение; пептид плюс дополнение для увеличения периода полувыведения. Для анализа аналоги РУУ и внутренний стандарт экстрагируют из плазмы мыши, крысы или обезьяны (50 мкл) с использованием метанола с 0,1% муравьиной кислоты. Образцы центрифугируют, и супернатант переносят в планшет для осаждения Thermo Protein Precipitation Plate. Образцы загружают в планшет Ser-Pak tC18 SPE μElution Plate, который обрабатывают метанолом и 0,1% муравьиной кислотой в воде. Колонки для ТФЭ дважды промывают 0,1% муравьиной кислотой в воде. Затем соединения элюируют, используя муравьиную кислоту/воду/ацетонитил (0,1: 15: 85), затем соединения высушивают и восстанавливают перед инъекцией аликвоты (10 мкл) в предколону Thermo Acclaim PepMap100 C18, 300 мкм×5 мм, и колонку Thermo Easy Spray PepMap C18, 75 мкм×15 см, для анализа ЖХ/МС. Вытекаю-

щий из колонки поток направлен в масс-спектрометр Thermo Q-Exactive Plus для детектирования и количественного определения.

Фармакокинетика аналогов РУУ у мышей CD-1. Фармакокинетика аналогов РУУ в плазме крови оценивают на самцах мышей CD-1 после введения однократной подкожной дозы 200 нмоль/кг. Образцы крови отбирают у 2 животных на один контрольный момент времени в течение 168 ч. Поскольку для оценки кинетики аналогов РУУ у мышей используется не серийное взятие образцов, данные о средней концентрации в зависимости от времени используются для составления таблицы фармакокинетических параметров для аналогов РУУ после введения однократной подкожной дозы 200 нмоль/кг. Концентрации аналогов РУУ в плазме детектируется через 120 ч после введения однократной подкожной дозы 200 нмоль/кг.

Фармакокинетика аналогов РУУ у крыс SD - Фармакокинетика аналогов РУУ в плазме оценивают на самцах крыс линии Sprague Dawley после введения однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг. Образцы крови отбирают у 2 животных на один контрольный момент времени в течение 168 ч. Поскольку для оценки кинетики аналогов РУУ у крыс использовали серийное взятие образцов, данные о концентрации у отдельных животных в зависимости от времени использовали для составления таблицы фармакокинетических параметров для аналогов РУУ после введения однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг. Концентрации аналогов РУУ в плазме детектируется через 120 ч после введения однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг.

Фармакокинетика аналогов РУУ у яванских макак - фармакокинетика аналогов РУУ в плазме крови оценивают у самцов и самок яванских макак после введения однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг. Образцы крови отбираются в течение 504 ч. Поскольку для оценки кинетики аналогов РУУ у макак используется серийное взятие образцов, данные о концентрации у отдельных животных в зависимости от времени использовали для составления таблицы фармакокинетических параметров для аналогов РУУ после введения однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг. Концентрации аналогов РУУ в плазме детектируется через 504 часа после введения однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг.

Результаты.

Таблица 4

Средние фармакокинетические параметры после введения однократной подкожной дозы самцам мышей CD-1

Пептид	Доза (нмоль/кг)	T _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{inf} (ч*нмол/л)	CL/F (мл/ч/кг)
Пример 1	200	15	6	1140	29795	6,71
Пример 2	200	27	12	1014	56198	3,56
Пример 3	200	26	12	1360	52751	3,79
Пример 4	200	15	12	916	31257	6,40

Сокращения: AUC_{inf} = площадь под кривой зависимости ответа от дозы от 0 до бесконечности; CL/F = клиренс, деленный на биодоступность (F); C_{max} = максимальная концентрация; T_{max} = время максимальной концентрации; T_{1/2} = период полувыведения

Таблица 5

Средние фармакокинетические параметры после введения однократной подкожной дозы самцам крыс SD

Пептид	Доза (нмоль/кг)	T _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{inf} (ч*нмол/л)	CL/F (мл/ч/кг)
Пример 1	50	22	12	221	8621	5,83
Пример 3	50	38	12	399	21094	2,39
Пример 4	50	19	8	219	8289	6,41

Сокращения: AUC_{inf} = площадь под кривой зависимости ответа от дозы от 0 до бесконечности; CL/F = клиренс, деленный на биодоступность (F); C_{max} = максимальная концентрация; T_{max} = время максимальной концентрации; T_{1/2} = период полувыведения

Таблица 6

Средние фармакокинетические параметры после введения однократной подкожной дозы яванским макакам

Пептид	Доза (нмоль/кг)	T _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{inf} (ч*нмол/л)	CL/F (мл/ч/кг)
Пример 1	50	101	9	500	64552	0,775
Пример 2	50	131	18	583	123173	0,408
Пример 3	50	148	9	599	105839	0,509

Сокращения: AUC_{inf} = площадь под кривой зависимости ответа от дозы от 0 до бесконечности; CL/F = клиренс, деленный на биодоступность (F); C_{max} = максимальная концентрация; T_{max} = время максимальной концентрации; T_{1/2} = период полувыведения

Результаты.

Полученные данные демонстрируют, что указанные выше соединения имеют фармакокинетический профиль, подходящий для введения один раз в неделю.

(5) Растворимость и стабильность.

Цель:

определить диапазон pH для растворимости и стабильность аналогов РYУ.

Способы.

Визуальная оценка диапазона растворимости - порошки лиофилизированного аналога РYУ восстанавливают в воде до концентрации 4 мг/мл, и pH доводят с помощью лимонной кислоты/фосфатного буфера до pH 4. pH системы титруют с помощью 0,5 N NaCl с повышением pH до 8, а затем титруют с помощью 0,5 N HCl с понижением pH до 4. Оценка термостабильности - Подготавливают растворы аналогов РYУ в 10 mM или 20 mM фосфате натрия, pH 7,0, при концентрации 1 мг/мл или 2 мг/мл, и инкубируют при 4°C и 40°C в течение 4 недели. Образцы через 4 недели анализируют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) и ОФ-ВЭЖХ.

Способ SEC - выполняется с использованием колонки TOSOH TSKgelG2000SWx1, 7,8 мм ID×30 см, 5 мкм, с композицией подвижной фазы из 50 mM фосфата натрия, 300 mM NaCl, pH 7,0 с 20% ацетонитрилом в течение 30 мин при скорости потока 0,5 мл/мин, λ - 214 нм.

Способ ОФ-ВЭЖХ - Выполняется с использованием колонки Cortecs C18, 2,7 мкм, 4,6×50 мм, 20-45% ацетонитрил/вода с 0,085% ТФУ в течение 10 мин при скорости потока 1 мл/мин, λ - 214 нм.

Результаты.

Таблица 7

Растворимость и Термостабильность Аналогов РYУ

Пептид	Растворимость (диапазон pH)	Термостабильность (10 или 20 mM Фосфат, pH 7,0)			
		ОФ-ВЭЖХ % Пик Определяемого Компонента		SEC % Пик Определяемого Компонента	
		4°C	40°C	4°C	40°C
Пример 1	> 5,7	95,8	92,9	98,9	95,7
Пример 2	> 5,5	99,7	99,3	99,9	99,6
Пример 3	> 6,1	99,5	97,1	95,2	92,4
Пример 4	> 6,8	96,8	97,5	99,6	98,7
Пример 5	> 5,8	96,8	95,2	99,7	97,5

Как представлено выше, все пептиды растворимы при pH > 7,0. Стабильность, оцененная с помощью ОФ-ВЭЖХ и SEC, предполагает, что эти пептиды относительно стабильны при агрессивном термическом стрессе.

Пример 7. Влияние РYУ In Vivo.

(1) Влияние in vivo на потребление пищи и массу тела у нормальных мышей.

Цель:

сравнить действие аналогов РYУ из примеров 1-5 на снижение массы тела и уменьшение приема пищи у нормальных мышей после однократной инъекции.

Способы.

Самцов мышей C57B1/6 от Envigo RMS (Индианаполис, Индиана) содержат на кормовой диете (5008; LabDiet, Сент-Луис, Миссури) и размещают по одному в помещение с контролируемой температурой (74,0°F; 23,3°C) с нормальным 12:12-часовым световым циклом и свободным доступом к пище и воде. В возрасте 9-10 недель регистрируют массу тела при условии отсутствия голодания и начальную массу пищи, и животным вводят однократную подкожную инъекцию носителя или пептида с последующими ежедневными измерениями массы тела и потребления пищи в течение 3 дней после введения дозы. Площадь под анализируемой кривой зависимости (AUC) рассчитывается как для массы тела, так и для потребления пищи, в зависимости от носителя. Пример 4, в дозе 30 нмоль/кг, используется в качестве эталона 100% эффективности для массы тела и потребления пищи при каждом проведении анализа.

Результаты.

Таблица 8

Изменения массы тела и потребления пищи в течение 3 дней у мышей C57/B16 после введения однократной дозы аналога РYУ

Пептид	Доза (нмоль/кг, п/к)	Δ Массы Тела (%)**	Δ Потребления Пищи (%)**
Пример 1	30	89	103
	100	108	105
Пример 2	100	71	71
	300	117	78
Пример 3	30	98	93
	100	111	100
Пример 4	3	22	12
	10	41	48
	30	100	100
Пример 5	100	70	99
	300	129	118
Реф. 1*	100	87	79
	300	127	104
Реф. 2*	100	62	67
	300	110	85
Реф. 3*	100	50	78
	300	104	99

* Известный аналог РYУ для сравнения; см. международную публикацию патентной заявки № WO 2016/198682, при этом Реф. (референт) 1 соответствует Соединению 4 согласно приведенной публикации, Реф. 2 соответствует Соединению 21 согласно приведенной публикации, и Реф. 3 соответствует Соединению 32 согласно приведенной публикации

** Пример 4 в дозе 30 нмоль/кг (AUC) принят в качестве 100% эффективности

Как показано выше, снижение как массы тела, так и потребления пищи демонстрирует эффективность аналогов РYУ *in vivo*, при этом сравнение дозировок, необходимых для полной эффективности, демонстрирует улучшение эффективности.

(2) Влияние *in vivo* на потребление пищи и массу тела у мышей с алиментарным ожирением.

Цель:

изучить влияние ежедневного дозирования аналогов РYУ из примеров 1-5 на снижение массы тела, отдельно или в комбинации с агонистом рецептора GLP-1, в течение двухнедельного периода у мышей с алиментарным ожирением (АО, DIO).

Способы.

Самцов мышей с АО линии C57B1/6 (Taconic) в возрасте 20 недель по прибытии содержали используя корма с содержанием жира 60% (D12492; Research Diets, Нью-Брансуик, Нью-Джерси). Животных размещают по одному в помещении с контролируемой температурой (74,0 °C; 23,3°C) с 12-часовым циклом день/ночь (освещение до 22:00) и свободным доступом к пище и воде. После однонедельного периода акклиматизации к ежедневному дозированию носителя измеряют массу тела при условии отсутствия голодания, и животных рандомизируют по массе тела в экспериментальные группы (n=6) и вводят ежедневные подкожные инъекции носителя, агониста рецептора GLP-1 (AP GLP-1; SEQ ID NO: 15), аналогов РYУ или комбинаций аналогов РYУ плюс AP GLP-1. После 2 недель дозирования регистрируют массу тела при условии отсутствия голодания и рассчитывают изменения средней массы тела относительно данных, полученных при воздействии носителем. Для определения аддитивных или синергических эффектов аналогов РYУ в комбинации с AP GLP-1 рассчитывается эффективность, превышающая эффективность одного только AP GLP-1 (совокупный эффект).

Результаты.

Таблица 9

Изменения массы тела в 2-недельном исследовании на мышах с алиментарным ожирением с использованием только аналогов РYY или в комбинации с агонистом рецептора GLP-1

Пептид	Доза (нмоль/кг, п/к)	Δ Массы Тела (%)	
		Только РYY	РYY + РА GLP-1*
Пример 1	1	-4	-18
	3	-6	-26
	10	-15	-31
Пример 2	3	Н/О	-1
	10	Н/О	-6
	30	2	-11
Пример 3	1	-3	-16
	3	-6	-28
	10	-23	-30
Пример 4	0,3	0	-3
	1	-1	-12
	3	-4	-17
	10	-12	-21
Пример 5	1	-2	-2
	3	0	-11
	10	-2	-18
	30	-3	Н/О

* Эффективность выше, чем у агониста рецептора GLP-1 (АР GLP-1)

Как показано выше, снижение массы тела с помощью аналогов РYY, как по отдельности, так и в комбинации с АР GLP-1, демонстрирует эффективность аналогов РYY *in vivo*, при сравнении величины потери веса.

(3) Влияние *in vivo* на массу тела и уровень глюкозы у мышей с диабетом и ожирением (db/db).

Цель:

изучить влияние ежедневного дозирования аналогов РYY из примеров 1-5 на снижение массы тела и уровней глюкозы в крови в течение десятидневного периода у мышей с ожирением и диабетом (db/db).

Способы.

Самцов мышей Lep^{db/db} (db/db) от Envigo RMS (Индианаполис, Индиана) содержат с использованием корма типа чау (chow-style diet) (5008; LabDiet, Сент-Луис, Миссури) и размещали по 5 животных на клетку в помещении с контролируемой температурой (74,0°F; 23,3°C), с нормальным 12:12-часовым световым циклом и свободным доступом к пище и воде. В возрасте 8-9 недель измеряют массу тела и уровни глюкозы в крови с помощью глюкометров Accu-Check® (Roche Diabetes Care, Inc., Индианаполис, Индиана) с последующими ежедневными подкожными инъекциями носителя или пептида. После 10 дней дозирования измеряют массу тела и уровни глюкозы в крови и рассчитывают изменения относительно данных полученных при воздействии носителем.

Результаты.

Таблица 10

Влияние на массу тела и уровень глюкозы в крови у мышей db/db,
подвергавшихся воздействию в течение 10 дней

Пептид	Доза (нмоль/кг, п/к)	Δ Массы Тела (%)	Δ Уровня Глюкозы (%)
Пример 1	1	-1	7
	3	-1	-10
	10	-10	-56
	30	-14	-59
Пример 2	30	-5	-40
	100	-9	-60
	300	-17	-67
Пример 3	1	0	0
	3	-5	-7
	10	-9	-50
	30	-15	-53
Пример 4	3	-2	-23
	10	-12	-61
	30	-17	-62
Пример 5	10	-4	-24
	30	-11	-59
	100	-17	-66

Как показано выше, снижение массы тела и уровней глюкозы в крови с помощью аналогов РУУ демонстрирует эффективность аналогов РУУ *in vivo*, при сравнении величины потери веса и снижения уровня глюкозы в крови.

В заключение, аналоги РУУ, описанные в данном документе, проявляют селективность в отношении NPY2R. Они также демонстрируют дозозависимое снижение массы тела, что отражено при исследовании нормальных мышей, мышей с алиментарным ожирением и мышей db/db, а также дозозависимое улучшение уровня глюкозы в крови у мышей db/db, которые подверглись воздействию аналогов РУУ из примеров 1, 3 и 4, являющихся наиболее эффективными в соответствии с профилем *in vitro*.

Последовательности.

SEQ ID NO: 1 – PYY₁₋₃₆ человека

YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

SEQ ID NO: 2 – PYY₃₋₃₆ человека

IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

SEQ ID NO: 3 – Аналог PYY

PKPEX₇PX₉X₁₀DASPEEX₁₇X₁₈RYYX₂₂X₂₃LRHYLN_{X₃₀}LTRQRY

SEQ ID NO: 4 – Аналог PYY

PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNWLTRQRY

SEQ ID NO: 5 – Аналог PYY

PKPEKPGEDASPEEWQRYYAELRHYLNELTRQRY

SEQ ID NO: 6 – Аналог PYY

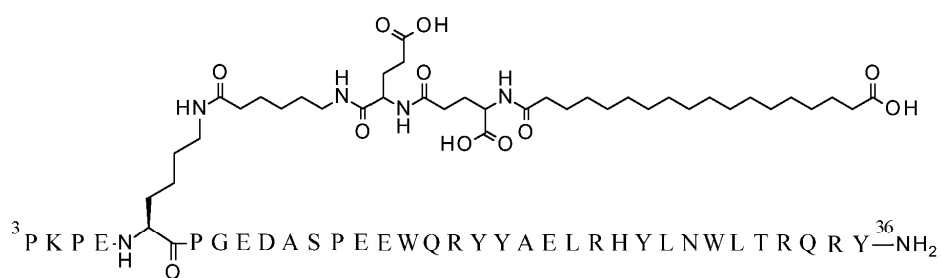
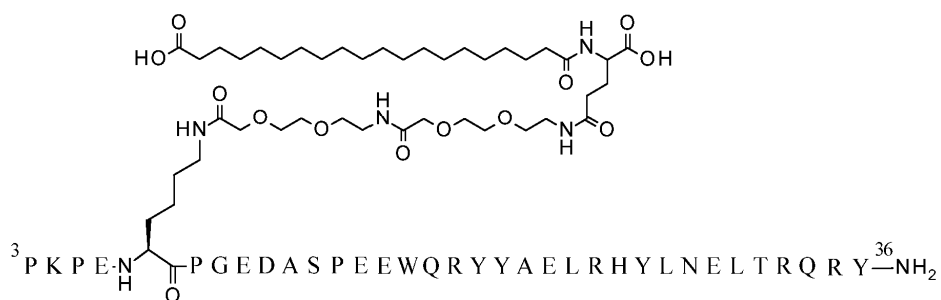
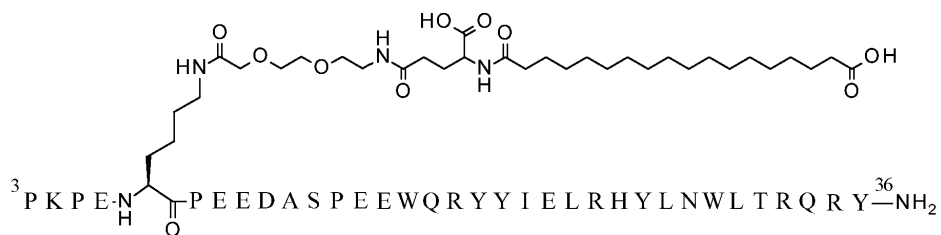
PKPEKPEEDASPEEWQRYYIELRHYLNWLTRQRY

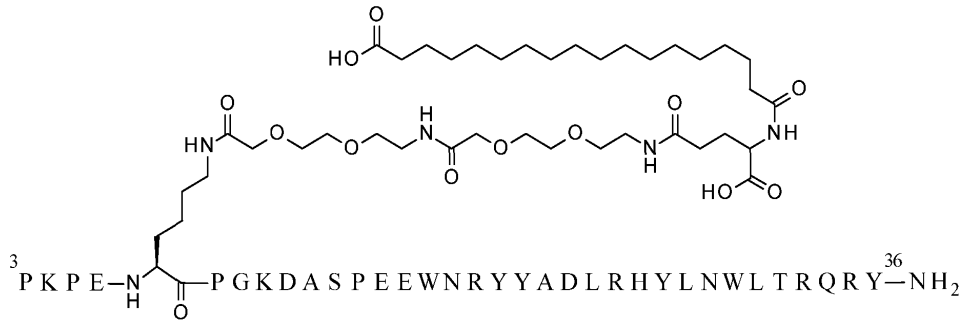
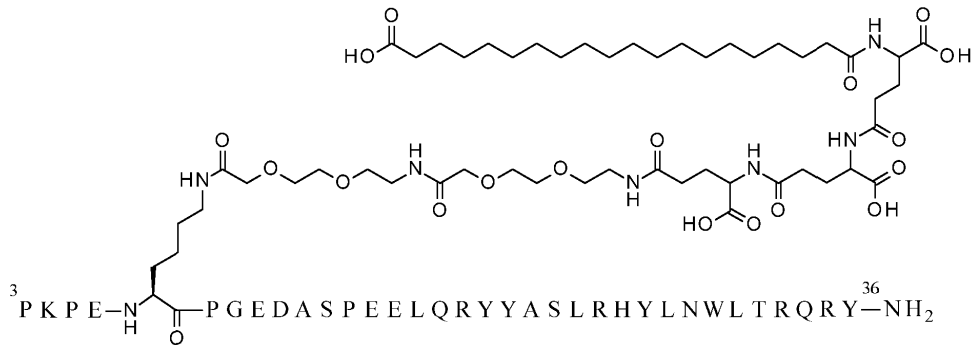
SEQ ID NO: 7 – Аналог PYY

PKPEKPGKDASPEEWNRYYADLRHYLNWLTRQRY

SEQ ID NO: 8 – Аналог PYY

PKPEKPGEDASPEELQRYYASLRHYLNWLTRQRY

SEQ ID NO: 9 – Аналог PYYSEQ ID NO: 10 – Аналог PYYSEQ ID NO: 11 – Аналог PYY

SEQ ID NO: 12 – Аналог PYYSEQ ID NO: 13 – Аналог PYYSEQ ID NO: 14 – III₁₋₃₆

APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY

SEQ ID NO: 15 – AP GLP-1

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGRGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPA
 PEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аналог Пептида Тирозин-Тирозин (PYY), содержащий аминокислотную последовательность:
 PKPEX₇PX₉X₁₀DASPEEX₁₇X₁₈RYYX₂₂X₂₃LRHYLNX₃₀LTRQRY (Формула I),

где X₇ представляет собой аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, выбранную из группы, состоящей из C, D, E, K и Q, где указанная функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C₁₆-C₂₂, где жирная кислота C₁₆-C₂₂ конъюгирована с аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации через линкер, и где линкер может представлять собой одно или более звеньев, выбранных из группы, состоящей из [2-(2-амино-этокси)этокси]уксусной кислоты (AEEA), аминоксептановой кислоты (Ahx), глутаминовой кислоты (E), гамма-глутаминовой кислоты (γE) и их комбинации,

где X₉ представляет собой E или G,

где X₁₀ представляет собой E или K,

где X₁₇ представляет собой L или W,

где X₁₈ представляет собой N или Q,

где X₂₂ представляет собой A или I,

где X₂₃ представляет собой E, D или S,

где X₃₀ представляет собой E или W (SEQ ID NO: 3), и

при этом C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

2. Аналог РУУ по п.1, отличающийся тем, что X_7 представляет собой К и конъюгация с жирной кислотой C_{16} - C_{22} осуществляется через эpsilon-аминогруппу боковой цепи К.

3. Аналог РУУ по п.1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из:

ПКРЕКРГЕДАСПЕЕВQRYYAELRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO: 4);
 ПКРЕКРГЕДАСПЕЕВQRYYAELRHYLNELTRQRY (SEQ ID NO: 5);
 ПКРЕКРЕЕДАСПЕЕВQRYYIELRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO: 6);
 ПКРЕКРГКДАСПЕЕВNRYYADLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO: 7); и
 ПКРЕКРГЕДАСПЕЕЛQRYYASLRHYLNWLTRQRY (SEQ ID NO: 8).

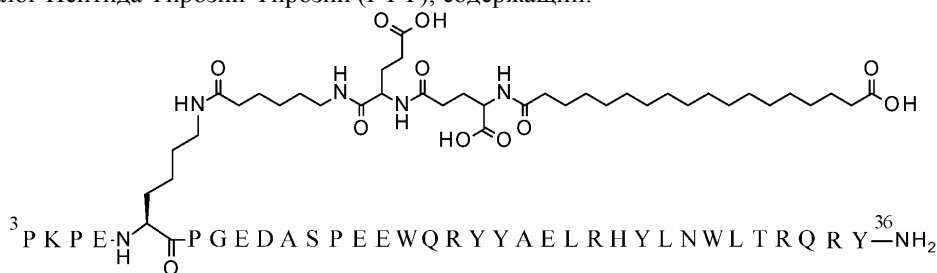
4. Аналог РУУ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что жирная кислота C_{16} - C_{22} выбрана из группы, состоящей из гексадекановой кислоты, гексадекандиовой кислоты, гептадекановой кислоты, гептадекандиовой кислоты, стеариновой кислоты, октадекандиовой кислоты, нонадециловой кислоты, нонадекандиовой кислоты, эйкозановой кислоты, эйкозандиовой кислоты, генэйкозановой кислоты, генэйкозандиовой кислоты, докозановой кислоты, докозандиовой кислоты и их разветвленных и замещенных производных.

5. Аналог РУУ по п.4, отличающийся тем, что жирная кислота C_{16} - C_{22} представляет собой жирную кислоту C_{18} - C_{20} .

6. Аналог РУУ по п.5, отличающийся тем, что жирная кислота C_{18} - C_{20} представляет собой жирную кислоту с прямой цепью, имеющую формулу $CO-(CH_2)_x-CO_2H$, и где x равен 16 или 18.

7. Аналог РУУ по п.1, отличающийся тем, что жирная кислота C_{16} - C_{22} выбрана из группы, состоящей из пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты и эйкозановой кислоты.

8. Аналог Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ), содержащий:



(SEQ ID NO:9).

9. Аналог РУУ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что аналог РУУ имеет аффинность связывания с рецептором нейропептида Y 2 (NPY2) выше, чем у РУУ₃₋₃₆ человека, который показан в SEQ ID NO: 2.

10. Аналог РУУ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что аналог РУУ имеет период полувыведения дольше, чем у РУУ₃₋₃₆ человека, который показан в SEQ ID NO: 2.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая

по меньшей мере один аналог Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемую соль; и

один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и эксципиентов.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой инкретин или аналог инкретина.

14. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор дипептидилпептидазы-IV (ДПП-IV).

15. Способ лечения ожирения или связанного с ожирением заболевания или расстройства, при этом указанный способ включает этап:

введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемой соли.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что аналог РУУ или его фармацевтически приемлемую соль вводят индивиду подкожно (п/к).

17. Способ по п.15, отличающийся тем, что аналог РУУ или его фармацевтически приемлемую соль вводят индивиду перорально.

18. Способ по п.16 или 17, отличающийся тем, что аналог РУУ или его фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю или раз в две недели.

19. Способ по п.15, отличающийся тем, что аналог РУУ или его фармацевтически приемлемую соль вводят п/к один раз в неделю (QW).

20. Способ по п.15, отличающийся тем, что аналог РУУ или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально один раз в неделю.

21. Способ по любому из пп.15-20, дополнительно включающий введение дополнительного терапевтического агента.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой инкретин, выбранный из группы, состоящей из глюкагона (GCG), аналога GCG, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), GLP-1₇₋₃₆-амида, аналога GLP-1, желудочного ингибиторного пептида (GIP), аналога GIP, оксинтомодулина (ОХМ), аналога ОХМ, агониста GIP/GLP-1, агониста GLP-1/GCG или аналога инкретина, обладающего активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG.

23. Способ по п.21, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор дипептидилпептидазы-IV (ДПП-IV).

24. Применение аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения ожирения.

25. Применение аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения заболевания или расстройства, связанного с ожирением.

26. Применение аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения сахарного диабета II типа.

27. Применение аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения ожирения.

28. Применение аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с ожирением.

29. Применение аналога Пептида Тирозин-Тирозин (РУУ) по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения сахарного диабета II типа.

30. Аналог РУУ по п.1, отличающийся тем, что линкер и жирная кислота вместе выбраны из группы, состоящей из (АЕЕА)₂•γЕ•двухосновной кислоты C₂₀, Аhх•Е•γЕ•двухосновной кислоты C₁₈ или АЕ-ЕА•γЕ•двухосновной кислоты C₁₈.

31. Аналог РУУ по п.30, отличающийся тем, что (АЕЕА)₂•γЕ•двухосновная кислота C₂₀ представляет собой (АЕЕА)₂-(γЕ)-СО-(СН₂)₁₈-СООН.

32. Аналог РУУ по п.30, отличающийся тем, что Аhх•Е•γЕ•двухосновная кислота C₁₈ представляет собой (Аhх-Е-(γЕ)-СО-(СН₂)₁₆-СООН.

33. Аналог РУУ по п.30, отличающийся тем, что АЕЕА•γЕ•двухосновная кислота C₁₈ представляет собой (АЕЕА)-(γЕ)-СО-(СН₂)₁₆-СООН.

34. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что аналог инкретина выбран из группы, состоящей из аналога GCG, аналога глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), аналога желудочного ингибиторного пептида (GIP), аналога оксинтомодулина (ОХМ), агониста GIP/GLP-1, агониста GLP-1/GCG, и аналога инкретина, обладающего активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
