

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046866**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.27

(21) Номер заявки
202190481

(22) Дата подачи заявки
2019.08.09

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)

(54) ТРИПЕПТИДЫ И ЛЕЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ, СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 62/717,546

(32) 2018.08.10

(33) US

(43) 2021.05.24

(86) PCT/US2019/046052

(87) WO 2020/033919 2020.02.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДИАПИН ТЕРАПЬЮТИКС,
ЭлЭлСи; ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИЧИГАН (US)**

(72) Изобретатель:
**Ром Орен, Чжан Цифэн, Чжао Ин,
Чэнь Юйцин Юджин (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20140148382
US-A1-20170320926

GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE et al.:
"Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation
and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in
Experimental Sepsis", PLoS ONE (14 April 2016),
vol. 11, № 4, article e0153607, p. 1-18, abstract, pg 2,
para 1

SU et al.: "The ABCG5/ABCG8 Sterol
Transporter Opposes the Development of Fatty Liver
Disease and Loss of Glycemic Control Independently
of Phytosterol Accumulation", J. Biol. Chem. (17
August 2012), vol. 287, № 34, p. 28564-28575,
abstract

PARDHE et al.: "Metabolic syndrome and
biochemical changes among non-alcoholic fatty liver
disease patients attending a tertiary care hospital of
Nepal", BMC Gastroenterol (06 July 2018), vol. 18, №
1, article number 109, especially abstract

(57) В изобретении предложен способ лечения НАЖБП, НАСГ и атеросклероза, включающий введение молекулы глицинсодержащего трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли субъекту.

B1

046866

046866

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет заявки США № 62/717546, поданной 10 августа 2018 г. Полное содержание вышеупомянутой заявки включено в данный документ.

Уровень техники

"Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)" становится все более распространенной во всем мире, особенно в западных странах. В Соединенных Штатах Америки это наиболее распространенная форма хронического заболевания печени, от которой страдают от 80 до 100 млн человек. Неалкогольная жировая болезнь печени представляет собой общий термин для обозначения ряда заболеваний печени, поражающих людей, которые мало пьют алкоголь или вообще не пьют его. Как следует из названия, основной характеристикой неалкогольной жировой болезни печени является накопление слишком большого количества жира в клетках печени. Это нормально, что печень содержит небольшое количество жира. Однако, если более 5-10% массы печени составляют жиры, это патологическое состояние называется жировым гепатозом (стеатозом).

Более тяжелая форма НАЖБП называется неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ). НАСГ вызывает увеличение и повреждение печени. НАСГ имеет тенденцию развиваться у людей с избыточным весом или ожирением, диабетом, высоким уровнем холестерина или триглицеридов или воспалительными состояниями. НАСГ, потенциально серьезная форма заболевания, характеризуется баллонированием гепатоцитов и воспалением печени, которое может прогрессировать до рубцевания и необратимого повреждения.

Сущность изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к способам лечения воспалительного заболевания, метаболического заболевания и/или сердечно-сосудистого заболевания, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества глицина или молекулы глицинсодержащего трипептида субъекту, имеющему одно или более из воспалительного заболевания, метаболического заболевания и/или сердечно-сосудистого заболевания. В различных вариантах осуществления молекула глицинсодержащего трипептида может включать один или более из DT-109 (Gly-Gly-Leu) и DT-110 (Gly-Gly-dLeu). В различных вариантах осуществления метаболическое заболевание относится к группе идентифицированных нарушений, при которых возникают ошибки метаболизма, дисбаланс метаболизма или неоптимальный метаболизм. Метаболические заболевания, описанные в данном изобретении, также включают заболевания, которые можно лечить посредством модуляции метаболизма, хотя само заболевание может быть вызвано или не быть вызвано конкретным метаболическим дефектом. Такие метаболические заболевания могут охватывать, например, пути окисления глюкозы и жирных кислот. В контексте данного изобретения "метаболическое нарушение" или "метаболическое заболевание" относится к патологическому состоянию, которое характеризуется изменением или нарушением метаболической функции. Термины "метаболический" и "метаболизм" хорошо известны в данной области техники и, как правило, включают весь спектр биохимических процессов, которые происходят в живом организме. Метаболические и сердечно-сосудистые заболевания включают, помимо прочего, ожирение, диабет, атеросклероз, метаболический синдром, дислипидемию, ишемическую болезнь сердца, коронарную болезнь, артериосклероз, атеротромботический инсульт, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), гиперлипоацидемию или метаболический синдром или их комбинацию. Дислипидемия может представлять собой гиперлипидемию. Гиперлипидемия может представлять собой гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию или одновременно гиперхолестеринемию и гипертриглицеридемию. НАЖБП может представлять собой стеатоз печени или стеатогепатит. Диабет может представлять собой диабет 2 типа или диабет 2 типа с дислипидемией. В различных вариантах осуществления в данном изобретении представлены способы, которые применимы к метаболическим заболеваниям, связанным с дисрегуляцией глюкозы и/или накоплением липидов в организме, системе кровообращения или различных органах, например, печени, и патологических последствиях, возникающих в результате этого, например, (неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), гипергликемии, предиабета, диабета (тип I и тип II), ожирения, инсулинорезистентности, метаболического синдрома и диабетической дислипидемии).

Метаболическое заболевание, нарушение или состояние может характеризоваться многочисленными соматическими симптомами. Любой симптом, известный специалисту в данной области техники как связанный с метаболическим заболеванием, нарушением или состоянием, можно предотвратить, лечить, ослабить или иным образом модулировать с помощью молекул глицинового трипептида и способов, описанных в данном изобретении. В определенных вариантах осуществления симптом может представлять собой любой из следующего, но не ограничиваются ими, чрезмерное выделение мочи (полиурию), чрезмерную жажду и повышенное потребление жидкости (полидипсию), нечеткость зрения, необъяснимую потерю массы и летаргию.

В определенных вариантах осуществления воспалительные заболевания, нарушения или состояния включают, но не ограничиваются ими, стеноз аорты, коронарную болезнь (CAD: англ. - coronary artery disease), болезнь Альцгеймера и тромбоэмболические заболевания, нарушения или состояния. Некоторые тромбоэмболические заболевания, нарушения или состояния включают, но не ограничиваются ими, ин-

сульт, тромбоз, инфаркт миокарда и заболевание периферических кровеносных сосудов.

В определенных вариантах осуществления применение глицина или молекулы глицинового трипептида, описанной в данном изобретении, модулирует физиологические маркеры или фенотипы воспалительного заболевания, нарушения или состояния. Например, введение соединений животным может снизить уровни воспалительных цитокинов или других воспалительных маркеров у этих животных по сравнению с нелечеными животными. В определенных вариантах осуществления модуляция физиологических маркеров или фенотипов может быть связана с ингибированием ДАГ печени, снижением уровня глюкозы и снижением уровней ЛПНП в плазме с помощью соединений.

В некоторых вариантах осуществления физиологические маркеры воспалительного заболевания, нарушения или состояния можно измерить количественно. Например, уровни цитокинов можно измерить и количественно оценить с помощью стандартных тестов, известных в данной области техники. Для таких маркеров в некоторых вариантах осуществления маркер может быть уменьшен на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99%, или диапазон, определяемый любыми двумя из этих значений.

Также в данном изобретении представлены способы предотвращения, лечения или снижения интенсивности симптома, связанного с воспалительным заболеванием, нарушением или состоянием, у субъекта, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления предложен способ угнетения степени появления симптома, связанного с воспалительным заболеванием, нарушением или состоянием. В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения тяжести симптома, связанного с воспалительным заболеванием, нарушением или состоянием. В таких вариантах осуществления способы включают введение терапевтически эффективного количества глицина или молекулы глицинового трипептида, или ее фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом.

В определенных вариантах осуществления предложены композиции и способы для предотвращения, лечения, отсрочки, замедления прогрессирования и/или облегчения метаболических, сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний, особенно тех нарушений, которые включают связанные с аномальным холестерином, триглицеридами и глюкозой заболевания, нарушения и состояния у субъекта, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления предложены композиции и способы для предотвращения, лечения, отсрочки, замедления прогрессирования и/или снижения интенсивности связанных с триглицеридами и общим холестерином заболеваний, нарушений и патологических состояний у субъекта, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления такие заболевания, нарушения и состояния включают воспалительные, сердечно-сосудистые и/или метаболические заболевания, нарушения и состояния. Некоторые такие сердечно-сосудистые заболевания, нарушения или состояния включают, но не ограничиваются ими, стеноз аорты, аневризму (например, аневризму брюшной аорты), стенокардию, аритмию, атеросклероз, цереброваскулярное заболевание, коронарную болезнь, ишемическую болезнь сердца, дислипидемию, гиперхолестеринемию, гипертонию, гипертриглицеридемию, инфаркт миокарда, заболевание периферических кровеносных сосудов (например, заболевание периферических артерий, окклюзионное заболевание периферических артерий), окклюзию сосудов сетчатки или инсульт. Некоторые такие метаболические заболевания, нарушения или состояния включают, но не ограничиваются ими, гипергликемию, предиабет, диабет (тип I и тип II), ожирение, инсулинорезистентность, метаболический синдром и диабетическую дислипидемию. Некоторые такие воспалительные заболевания, нарушения или состояния включают, но не ограничиваются ими, стеноз аорты, коронарную болезнь (CAD), болезнь Альцгеймера и тромбозомболические заболевания, нарушения или состояния. Некоторые тромбозомболические заболевания, нарушения или состояния включают, но не ограничиваются ими, инсульт, тромбоз (например, венозную тромбозомболию), инфаркт миокарда и заболевание периферических кровеносных сосудов. В определенных вариантах осуществления предложены композиции и способы для предотвращения, лечения, отсрочки, замедления прогрессирования и/или снижения интенсивности вызванной диетой гиперлипидемии и стеатогепатита с подавлением митохондриального/пероксисомального β -окисления жирных кислот (ОЖК), в дополнение к предотвращению, лечению, отсрочке, замедлению прогрессирования и/или улучшению чувствительности к глюкозе и системного воспаления и фиброза, в частности, когда они связаны с заболеванием печени.

Один вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения относится к способам лечения неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), включающим введение глицина или DT-109 (Gly-Gly-Leu). Другой вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения относится к способам лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), включающим введение глицина или DT-109 (Gly-Gly-Leu). Другой вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения относится к способам лечения неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), включающим введение DT-110 (Gly-Gly-dLeu). Один вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения относится к способам лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), включающим введение глицина или DT-110 (Gly-Gly-dLeu). Эти трипептиды необязательно можно вводить в комбинации со вторичным терапевтическим агентом, как описано в данном изобретении.

Второй аспект настоящего изобретения относится к способам уменьшения фиброза у пациента, включающим введение выбранного трипептида или его фармацевтически приемлемой соли. Один вари-

ант осуществления второго аспекта настоящего изобретения относится к способам уменьшения фиброза у пациента, включающим введение глицина или DT-109 (Gly-Gly-Leu). Другой вариант осуществления второго аспекта настоящего изобретения относится к способам уменьшения фиброза у пациента, включающим введение глицина или DT-110 (Gly-Gly-dLeu). Эти трипептиды необязательно можно вводить в комбинации со статинами.

Третий аспект настоящего изобретения относится к способам лечения стеатоза печени, включающим введение субъекту, нуждающегося в этом, одной или более молекул трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления третьего аспекта способ снизил уровень триглицеридов в липидах печени или снизил уровень общего холестерина в липидах печени.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к набору для лечения субъекта с НАЖБП или НАСГ, содержащему выбранный трипептид, необязательно статин, и инструкции по применению. В одном варианте осуществления набора набор содержит эффективное количество глицина или DT-109 (Gly-Gly-Leu), необязательно статин, и инструкции по применению. В другом варианте осуществления набора набор содержит глицин или (DT-110 (Gly-Gly-dLeu), необязательно статин, и инструкции по применению. В еще одном наборе набор содержит глицин или DT-109 (Gly-Gly-Leu) и/или (DT-110 (Gly-Gly-dLeu), необязательно статин, и инструкции по применению.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1F показаны план эксперимента (фиг. 1A), среднее потребление пищи на протяжении всего исследования (фиг. 2B), конечная масса тела (фиг. 1C), общий прирост массы тела от исходного уровня до конечной точки (фиг. 1D) (n=8-10 для B-D), макроскопическая морфология брюшной полости в конечной точке (фиг. 1E), уровни молекул глицинсодержащего трипептида в плазме (фиг. 1F) (n=6-8). * p<0,05; ** p<0,01 при сравнении с 3Д+H₂O.

На фиг. 2A-2E показаны кратковременный ПГТТ (мышей нагружали глюкозой со средствами для лечения или водой в качестве контроля) (фиг. 2A), долгосрочный ПГТТ (мышь получали только глюкозу) (фиг. 2B), уровни глюкозы в крови, измеренные натощак, перед введением через желудочный зонд воды или средств для лечения (перед введением через желудочный зонд) и через 30 мин (после введения через желудочный зонд) (фиг. 2C), конечные уровни глюкозы в крови (после 6-часового голодания) (фиг. 2D), анализ методом кПЦР экспрессии печеночных генов, регулирующих захват глюкозы и глюконеогенез (фиг. 2E) (n=8-10); * p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001 при сравнении с 3Д+H₂O; # p<0,05, #### p<0,001 и предварительного введения через желудочной зонд.

На фиг. 3A-3C показаны репрезентативные окрашенные гематоксилином и эозином препараты тканей печени (фиг. 3A), микровезикулярный и макровезикулярный стеатоз отмечены стрелками. Были экстрагированы липиды печени с последующим количественным определением содержания ТГ (фиг. 3B) и содержания ОХ (фиг. 3C); ** p<0,01, *** p<0,001 при сравнении с 3Д+H₂O.

На фиг. 4A-4E показаны анализ методом кПЦР экспрессии печеночных генов, регулирующих пути окисления липидов (фиг. 4A и 4B), анализ методом кПЦР экспрессии печеночных генов, регулирующих гомеостаз холестерина (фиг. 4C) (n=7-10), вестерн-блоттинг и количественная оценка содержания ABCG8, нормализованного по β-актину (фиг. 4D и 4E) (n=4-6); * p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001 при сравнении с 3Д+H₂O.

На фиг. 5A-5G показаны уровни ОХ в плазме на исходном уровне (1 неделя кормления 3Д без средств для лечения) и в конечной точке (после 12 недель кормления 3Д со средствами для лечения или контролем водой) (фиг. 5A), уровни в плазме на конечной точке ОХ (фиг. 5B), ЛПНП (фиг. 5C), ЛПВП (фиг. 5D) и ТГ (фиг. 5E). Сбор крови производили после 6-часового голодания. На фиг. 5F показан анализ атеросклеротической бляшки, визуализированный окрашиванием Oil Red O, и на фиг. 5G показаны репрезентативные изображения окрашенных аорт (n=6-10); * p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001 при сравнении с 3Д+H₂O.

На фиг. 6A-6E показаны конечные уровни ИЛ-6 в плазме (фиг. 6A), резистина (фиг. 6B) и MCP1 (фиг. 6C). Анализ методом кПЦР воспалительных цитокинов в (фиг. 6D) эпидидимальной жировой ткани (ЭЖТ) и в (фиг. 6E) подкожной жировой ткани (ПЖТ) (n=6-10); * p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001 при сравнении с 3Д+H₂O.

На фиг. 7A-7C показан анализ методом кПЦР воспалительных цитокинов в печени (фиг. 7A). Типичный иммуногистохимический анализ F4/80 в печени (фиг. 7B) и количественное определение (фиг. 7C), (n=7-10). * p<0,05 при сравнении с 3Д+H₂O.

На фиг. 8 показаны изменения в плазме у AGXT1^{-/-} мышей, получавших НАСГ-диету. Клетки HepG2 трансфицировали siCTL или siAGXT1: мРНК AGXT1 относительно GAPDH (n=12) (фиг. 8C), белка AGXT1 с GAPDH в качестве контроля нагрузки (n=4) (фиг. 8D) и клеточные ТГ, с нагрузкой ПК или без нее (200 мкМ, n=12) (фиг. 8E). На фиг. 8A целевой сайт направляющей РНК на экзоне 1 гена AGXT1 подчеркнут, а делеция трех оснований из РАМ была подтверждена при помощи секвенирования по Сэнгеру. На фиг. 8B отсутствие AGXT1 подтверждено при помощи вестерн-блоттинга (n=7). AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} мышей кормили НАСГ-диетой в течение 12 недель (n=12): плазменные ТГ (фиг. 8L), ОХ (фиг. 8M), АСТ (фиг. 8N), АЛТ (фиг. 8O) и соотношение глицин/оксалат (фиг. 8P). Данные

представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения. ПК - пальмитиновая кислота.

На фиг. 8F-8K AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} сопоставимы при кормлении СД. AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} мышей кормили стандартной СД в течение 12 недель (n=6): масса тела (фиг. 8F), макроскопическая картина полостей брюшины и гистология с окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) и ОRO (масштабная шкала: 50 мкм для H&E, 100 мкм для ОRO) (фиг. 8G), масса печени (фиг. 8H), отношение массы печени (МП) к массе тела (МТ) (фиг. 8I), АСТ в плазме (фиг. 8J) и АЛТ в плазме (фиг. 8K). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки.

На фиг. 9А-9К показаны соединения на основе глицина. Соединения, структурно подобные глицину, были выбраны для оценки структурных, конформационных, электронных и изостерических модификаций глицинового каркаса глицин (фиг. 9А), N-метилглицин (фиг. 9В), N,N-диметилглицин (фиг. 9С), N,N,N-триметилглицин (фиг. 9D), гликолевая кислота (фиг. 9Е), глицинамид (фиг. 9F), 2-амино-N-метилацетамид (фиг. 9G), этаноламин (фиг. 9H), 2-оксопиперазин (фиг. 9I), морфолин-2-он (фиг. 9J) и (1H-тетразол-5-ил) метанамин (фиг. 9K).

На фиг. 10А-10I, 10K-10N показано нарушение биосинтеза глицина при НАЖБП. Мышей C57BL/6J кормили СД или ЗД в течение 12 недель (n=4-5): ОХ в плазме (фиг. 10А), гистология печени (масштабная шкала: 50 мкм для H&E, 100 мкм для ОRO) (фиг. 10В), ТГ в печени (фиг. 10С), ОХ в печени (фиг. 10D), АК в плазме относительно СД (фиг. 10Е), экспрессия в печени генов биосинтеза глицина относительно GAPDH (фиг. 10F), экспрессия клеточных ТГ (фиг. 10G) и AGXT1 в клетках HepG2, нагруженных 200 мкМ ПК или этанолом в течение 24 ч (n=3-4) (фиг. 10H). Мышей C57BL/6J кормили НАСГ-диетой или СД в течение 24 недель (n=10): морфология печени (фиг. 10I), гистология с использованием гематоксилина и эозина (H&E) и Сириуса красного (масштабной шкала: 50 мкм) (фиг. 10K). Значительное снижение экспрессии генов/компонентов путей биосинтеза глицина путем РНК-секвенирования печени мышей с СД или НАСГ-диетой (n=3, log₂FC, log₂ кратности изменения) (фиг. 10L). Экспрессия AGXT1 относительно GAPDH у мышей с НАСГ, индуцированной диетой (n=8) (фиг. 10M). Значительное снижение экспрессии или повышение экспрессии генов метаболизма глицина с помощью мета-анализа данных микроматричного анализа печени от здоровых пациентов и пациентов с НАСГ (фиг. 10N). Корреляция между экспрессией AGXT1 и общим содержанием жира в печени от доноров после трансплантации (n=206). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 10J показаны анализ путей в печени мышей с НАСГ и анализ путей после РНК-секвенирования печени мышей, получавших СД или НАСГ-диету в течение 24 недель (n=3). Пути, обогащенные дифференциально экспрессируемыми генами (ДЭГ) с повышенной экспрессией, показаны выше, а пути, обогащенные ДЭГ с пониженной экспрессией, показаны ниже.

На фиг. 11А-11L показан ускоренный индуцированный диетой НАСГ у AGXT1^{-/-} мышей. AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} мышей кормили НАСГ-диетой в течение 12 недель (n=12): макроскопическая картина брюшных полостей и гистология печени (масштабная шкала: 50 мкм для гематоксилина и эозина (H&E) и Сириуса красного, 100 мкм для ОRO) (фиг. 11А), отношение массы печени к массе тела (МП/МТ) (фиг. 11В), ТГ печени (фиг. 11Е), ОХ печени (фиг. 11F), NAS (фиг. 11G) и шкала фиброза (фиг. 11H). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения (фиг. 11J). Анализ путей после РНК-секвенирования печени от AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} мышей (n=4). Пути, обогащенные ДЭГ с повышенной или пониженной экспрессией на фиг. 11К. Тепловая карта 25 ДЭГ, связанных с НАСГ, показана на фиг. 11L. Связанные с ОЖК ДЭГ подтверждены при помощи кПЦР (n=10) и вестерн-блоттинга (n=4) (фиг. 11M). ДЭГ, связанные с воспалением (фиг. 11N) и фиброзом (фиг. 11O), подтверждены при помощи кПЦР (n=10). Данные представляют собой средние значения \pm СКО. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с AGXT1^{+/+}.

На фиг. 11С, 11D, 11I показаны параметры, связанные с НАЖБП, у AGXT1^{-/-} мышей, получавших НАСГ-диету. AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} мышей кормили НАСГ-диетой в течение 12 недель (n=12): масса тела (фиг. 11С), масса печени (фиг. 11D) и оценка стеатоза, баллонирования гепатоцитов и лобулярного воспаления на основе гематоксилина и эозина H&E (фиг. 11I). Данные представляют собой средние значения \pm СО.

На фиг. 12А-12J дефицит глицина усугубляет ожирение, индуцированное ЗД. ApoE^{-/-} мышей кормили СД, ЗДАК+Gly или ЗДАК-Gly в течение 10 недель (n=6): уровень глицина в плазме (фиг. 12А). Анализ состава тела на основе ЯМР: масса тела (фиг. 12В), жировая масса тела (%) (фиг. 12С) и безжировая масса тела (%) (фиг. 12D). Анализ CLAMS: потребление пищи (фиг. 12Е), общая активность (фиг. 12F), частота респираторного обмена (RER) (фиг. 12G) и расход энергии (фиг. 12H), молекула глицинового трипептида в плазме (фиг. 12I) и гистология эпидидимальной и подкожной жировой ткани (ЭЖТ и ПЖТ, масштабная шкала: 100 мкм) с использованием окраски гематоксилином и эозином (H&E) (фиг. 12J). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 13А-13К дефицит глицина усугубляет индуцированную ЗД гиперлипидемию и СП. ApoE^{-/-} мышей кормили СД, ЗДАК+Gly или ЗДАК-Gly в течение 10 недель (n=6): ОХ в плазме (фиг. 13А), ТГ в плазме (фиг. 13В), ЛПНП в плазме (фиг. 13С), ЛПВП в плазме (фиг. 13D), глюкоза в плазме (фиг. 13Е),

гистология печени с использованием окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) и ORO (масштабная шкала: 50 мкм для H&E, 100 мкм для ORO) (фиг. 13F), ТГ печени (фиг. 13G) и ОХ печени (фиг. 13H). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения. Анализ корреляции Спирмена между глицином в плазме и ОХ плазмы (фиг. 13I), глюкоза в плазме (фиг. 13J) и ТГ в печени (фиг. 13K).

На фиг. 14А-14G показано влияние соединений на основе глицина на толерантность к глюкозе. ПГТТ проводили на мышах C57BL/6J после 12 ч голодания (n=6-8). Мыши получали перорально только глюкозу (2 мг/г массы тела), глюкозу с 0,5 мг/г массы тела глицина или с 0,5 мг/г массы тела соединений на основе глицина: N-метилглицина (фиг. 14А), N,N-диметилглицина (фиг. 14В), N,N,N-триметилглицина (фиг. 14С), гликолевой кислоты (фиг. 14D), DT-110 (фиг. 14E) и DT-109 (фиг. 14F). На фиг. 14G мыши получали перорально только глюкозу (2 мг/г массы тела), глюкозу с DT-109 (0,5 мг/г массы тела) или эквивалентные уровни свободного лейцина или глицина (0,17 или 0,33 мг/г массы тела соответственно). Данные представляют собой средние значения \pm СКО. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с глюкозой; # P<0,05 при сравнении с лейцином. ^ P<0,05 при сравнении с глицином.

На фиг. 15А-15L показан липидснижающий эффект DT-109. На фиг. 15А ApoE^{-/-} мышей кормили стандартной ДТ и они перорально получали DT-109 (1 мг/г массы тела/сутки), эквивалентные уровни свободного лейцина или глицина (0,33 или 0,67 мг/г массы тела) или H₂O в течение 12 недель (n=8-10) (фиг. 15В). На 10 неделе после 12 ч голодания выполняли ПГТТ. Мыши получали перорально только глюкозу (2 мг/г массы тела), глюкозу с 1 мг/г массы тела DT-109 или эквивалентные уровни свободного лейцина (0,33 мг/г массы тела) или глицина (0,67 мг/г массы тела). Данные представляют собой средние значения \pm СКО. ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с H₂O; # P<0,05, ## P<0,01, ### P<0,001 при сравнении с лейцином. На фиг. 15С уровень глюкозы в крови натощак измеряли до и через 30 мин ежедневного введения DT-109, лейцина, глицина или H₂O через желудочный зонд (фиг. 15D). На фиг. 15Е показана масса тела на конечной точке. На фиг. 15F показано среднее потребление пищи. ОХ в плазме на исходном уровне (до рандомизации в экспериментальные группы) и в конечной точке (данные представляют собой среднее значение \pm СКО). Показан анализ плазмы на конечной точке (n=6-8): ОХ (фиг. 15G), ЛПНП (фиг. 15H), ЛПВП (фиг. 15I), ТГ (фиг. 15J) и молекула глицинового трипептида (фиг. 15K). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения (фиг. 15L). Гистология эпидидимальной и подкожной жировой ткани (ЭЖТ и ПЖТ, масштабная шкала: 100 мкм) с использованием H&E.

На фиг. 16А-16D глицин или DT-109 предотвращают индуцированный ЗД СП. Анализ печени на конечной точке (n=8-10): макроскопическая картина брюшных полостей и гистология с использованием гематоксилина и эозина (H&E) и ORO (шкала: 50 мкм для H&E, 100 мкм для ORO) (фиг. 16А), ТГ печени (фиг. 16В) и ОХ печени (фиг. 16С). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения (фиг. 16D). Анализ методом кПЦР ключевых генов, регулирующих ОЖК и воспаление, относительно GAPDH. Данные представляют собой средние значения \pm СКО. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с ЗД+H₂O.

На фиг. 17В-17Н показано подтверждение НАСГ перед рандомизацией в экспериментальные группы. Мышей C57BL/6J кормили СД (n=11) или НАСГ-диетой (n=50) в течение 12 недель (фиг. 17В). Кровь натощак собирали из поднижнечелюстной вены для анализа глюкозы в плазме, ОХ, АСТ и АЛТ (данные представляют собой средние значения \pm СО). Подгруппу мышей (СД: n=3, НАСГ-диета n=5) умерщвляли для подтверждения патологии печени: (фиг. 17С) отношение массы тела к массе печени (МП/МТ) (фиг. 17D). Макроскопическая картина полостей брюшины и гистология с использованием H&E, ORO и Сириуса красного (масштабная шкала: 50 мкм для H&E и Сириуса красного, 100 мкм для ORO), NAS как сумма (фиг. 17Е) стеатоза, баллонирования гепатоцитов и лобулярного воспаления (фиг. 17F). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения (фиг. 17G). На 18 неделе после 12 ч голодания выполняли ПГТТ (n=8-9). Мыши получали перорально только глюкозу (2 мг/г массы тела), глюкозу с 0,5 мг/г массы тела DT-109 или эквивалентные уровни свободного лейцина (0,17 мг/г массы тела), глицина (0,33 мг/г массы тела) или H₂O. Данные представляют собой средние значения \pm СКО. Данные представляют собой средние значения \pm СКО. * P<0,05, ** P<0,01 при сравнении с СД+H₂O; ## P<0,01, ### P<0,001 и НАСГ+H₂O; ^^ P<0,01 и НАСГ+лейцина (фиг. 17H). Уровень глюкозы в крови натощак до и после 30 мин ежедневного введения через желудочный зонд DT-109, лейцина, глицина или H₂O. Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 17L-17R показаны метаболические эффекты DT-109 у мышей C57BL/6J с установленным НАСГ. Мышей C57BL/6J кормили СД или НАСГ-диетой в течение 12 недель. После подтверждения НАСГ мышей рандомизировали для получения 0,125 или 0,5 мг/г массы тела/сутки DT-109 или эквивалентных уровней лейцина или глицина (0,17 или 0,33 мг/г массы тела/сутки) или H₂O через желудочный зонд в течение дополнительных 12 недель при НАСГ-диете. Мыши, которым давали СД и H₂O, служили в качестве контроля (n=8-9) (фиг. 17L). Гистология эпидидимальной и подкожной жировой ткани (ЭЖТ и ПЖТ, масштабная шкала: 100 мкм) с использованием H&E. Анализ CLAMS на 22-23 неделях: потреб-

ление пищи (фиг. 17M), окисление жиров (фиг. 17N), окисление глюкозы (фиг. 17O), частота респираторного обмена (RER) (фиг. 17P), расход энергии (фиг. 17Q) и общая активность (фиг. 17R). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 17A, 17I, 17J, 17K и 18A-18G, 18I DT-109 защищает от НАСГ, индуцированного диетой (фиг. 17A). Мыши C57BL/6J, получавшие диету СД или НАСГ-диету в течение 12 недель. После подтверждения НАСГ мышей рандомизировали для получения 0,125 или 0,5 мг/г/сутки DT-109 или его эквивалентных уровней лейцина, глицина (0,17, 0,33 мг/г/сутки) или H₂O через желудочный зонд в течение дополнительных 12 недель при НАСГ-диете. Мыши, которым давали СД и вводили H₂O, служили в качестве контроля (n=8-9). Анализ состава тела на основе ЯМР на 22-23 неделе: масса тела (фиг. 17I), жировая масса тела (%) (фиг. 17J) и безжировая масса тела (%) (фиг. 17K). Анализ плазмы на конечной точке: АСТ (фиг. 18A), АЛТ (фиг. 18B), ЩФ (фиг. 18C), ТГ (фиг. 18D) и ОХ (фиг. 18E). Общая морфология и гистология с использованием Н&Е (масштабная шкала: 50 мкм) (фиг. 18F). Отношение МП/МТ (фиг. 18G). NAS (фиг. 18I). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 18H, 18J-18M и 20H-20J DT-109 защищает от НАСГ, индуцированного диетой. Мышей C57BL/6J кормили СД или НАСГ-диетой в течение 12 недель. После подтверждения НАСГ мышей рандомизировали для получения 0,125 или 0,5 мг/г массы тела/сутки DT-109 или эквивалентных уровней лейцина или глицина (0,17 или 0,33 мг/г массы тела/сутки) или H₂O через желудочный зонд в течение дополнительных 12 недель при НАСГ-диете. Мыши, которым давали СД и H₂O, служили в качестве контроля (n=8-9) (фиг. 18H). Масса печени и (фиг. 18J) оценка стеатоза, баллонирования гепатоцитов и лобулярного воспаления на основе Н&Е. Данные представляют собой средние значения \pm СО. Анализ корреляции Спирмена между NAS и АСТ в плазме (фиг. 18K), АЛТ в плазме (фиг. 18L) и ЩФ в плазме (фиг. 18M). Анализ корреляции Спирмена между шкалой фиброза печени и АСТ в плазме (фиг. 20H), АЛТ в плазме (фиг. 20I) и ЩФ в плазме (фиг. 20J).

На фиг. 19A, 19B, 19F-19I, 19K, 19L, 19N средство для лечения на основе глицина корректирует нарушение ОЖК, индуцированное НАСГ-диетой, и снижает СП. РНК-секвенирование печеней, взятых в конечной точке (n=4): PCA (фиг. 19A), вулканическая диаграмма ДЭГ (фиг. 19B) (со сниженной экспрессией и с повышенной экспрессией) в каждой группе по сравнению с СД. Анализ путей, сравнивающий НАСГ+H₂O и НАСГ+0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 19F). Пути, обогащенные ДЭГ с повышенной или сниженной экспрессией, показаны на фиг. 19G. Тепловая карта 50 ДЭГ, связанных с НАСГ, во всех экспериментальных группах (log₂ кратности изменения от группы СД) показана на фиг. 19H. Подтверждение связанных с ОЖК ДЭГ при помощи кПЦР (n=8-9), данные представляют собой средние значения \pm СКО, * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с СД; # P<0,05, ## P<0,01, ### P<0,001 и НАСГ+H₂O, и вестерн-блоттинг (n=4) (фиг. 19I). Гистология с использованием ОРО (масштабная шкала: 100 мкм) (фиг. 19K), ТГ печени (фиг. 19L), ДАГ печени (n=8-9) (фиг. 19N). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 19C DT-109 способствует устранению индуцированных НАСГ-диетой изменений транскриптома. Представление на основе тепловой карты 50 верхних ДЭГ во всех экспериментальных группах, как определено с помощью log₂ кратности изменения относительно группы СД. Каждая строка представляет один ген, а каждый столбец представляет одно сравнение с группой СД (n=4).

На фиг. 19D, 19E, 19J, 19M показан анализ путей в печени мышей, получавших СД и НАСГ-диету (фиг. 19D). Пути, обогащенные ДЭГ с повышенной экспрессией, показаны красным цветом, а пути, обогащенные ДЭГ с пониженной экспрессией, показаны зеленым (фиг. 19E). Изменения в генах/путях биосинтеза глицина проанализированы с помощью РНК-секвенирования печени мышей с СД или НАСГ-диетой и анализа путей (n=4). Гены/компоненты путей, экспрессия которых значительно снижена, выделены зеленым (log₂FC, log₂ кратности изменения) (фиг. 19J). Проверка методом кПЦР связанных с ОЖК ДЭГ (n=8-9). Данные представляют собой средние значения \pm СКО. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с СД; # P<0,05, ## P<0,01 и НАСГ+H₂O. ОХ печени (n=8-9) (фиг. 19M). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения.

На фиг. 20A-20F, 20K, 20L средство для лечения на основе глицина снижает индуцированные НАСГ-диетой воспаление и фиброз печени. Иммуногистохимия F4/80 и гистология Сириусом красным (масштабная шкала: 50 мкм) (фиг. 20A), F4/80-положительная область (фиг. 20B), МСР-1 плазмы (фиг. 20C) и резистин (фиг. 20D). Данные представляют собой средние значения \pm СО, демонстрирующие все точки и Р-значения (n=6-9) (фиг. 20E). Подтверждение связанных с воспалением ДЭГ при помощи количественной ПЦР (данные представляют собой среднее значение \pm СКО, n=8-9). * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 при сравнении с СД; # P<0,05, ## P<0,01, ### P<0,001 и НАСГ+H₂O. (фиг. 20F) Положительная по Сириусу красному область. Шкала фиброза (фиг. 20G). Вестерн-блоттинг фосфорилированного SMAD2 (Ser465/467) и общего SMAD2 (фиг. 20K). Проверка методом кПЦР связанных с фиброзом ДЭГ (фиг. 20L).

Подробное описание сущности изобретения

В контексте данного изобретения "стеатоз" взаимозаменяем с "жировым гепатозом", который пред-

ставляет собой накопление жира в печени.

Субъект может представлять собой млекопитающее, а млекопитающее может представлять собой, например, лабораторное животное или человека, а субъекты-люди включают взрослых, подростков и детей.

"Стеатоз" и "стеатоз печени" используются в данном изобретении взаимозаменяемо.

"Плазма крови" и "плазма" используются в данном изобретении взаимозаменяемо.

"Кровь" и "плазма" используются в данном изобретении взаимозаменяемо.

Западная диета в данном изобретении обозначается аббревиатурой "ЗД".

Лицевая вена в данном изобретении сокращенно обозначается как "ЛВ".

"ТГ" представляет собой аббревиатуру для триглицерида.

"ОХ" представляет собой аббревиатуру для общего холестерина.

"ПГТТ" представляет собой аббревиатуру для перорального теста на толерантность к глюкозе.

В контексте данного изобретения формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно следует иное.

"Или" в некоторых случаях может означать "в комбинации с", поэтому введение А или В может быть введением А, введением В или введением А и В.

За исключением глицина, все обычные аминокислоты содержат по меньшей мере один хиральный атом углерода. Таким образом, эти аминокислоты существуют в виде пар стереоизомеров, обозначенных как L-изомер и D-изомер. Большинство встречающихся в природе белков и пептидов состоят исключительно из L-изомерной формы. D-изомерные аминокислоты могут влиять на конформацию пептида или белка и могут приводить к повышению стабильности или изменению активности.

В контексте данного изобретения "фармацевтически приемлемая соль" относится к тем солям, которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями людей и низших животных без проявления излишней токсичности, раздражения, аллергических реакций и т.п. и соответствуют рациональному соотношению польза/риск. "Фармацевтически приемлемая соль" означает любую нетоксичную соль или соль сложного эфира соединения по данному изобретению, которая при введении реципиенту способна прямо или косвенно обеспечивать соединение по данному изобретению. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, Berge et al. подробно описывает фармацевтически приемлемые соли в *J. Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19 (1977).

Фармацевтические композиции, подходящие для доставки пептидов по настоящему изобретению, и способы их получения будут очевидны специалистам в данной области техники. Такие композиции и способы их получения можно найти, например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences, The Science and Practice of Pharmacy*, 20th edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (2000). Пептиды по настоящему изобретению могут быть составлены для немедленного и/или модифицированного высвобождения.

Термин "лечение" (или другие формы слова, такие как "лечение" или "лечить") используется в данном изобретении для обозначения того, что введение композиции по настоящему изобретению уменьшает проявление патологического состояния у пациента и/или снижает, ингибирует или устраняет конкретную характеристику или явление, связанное с патологическим состоянием. Таким образом, термин "лечение" включает предотвращение возникновения патологического состояния у пациента, особенно когда пациент предрасположен к возникновению патологического состояния; уменьшение или подавление патологического состояния; и/или снижение интенсивности или реверсию патологического состояния. Поскольку способы по настоящему изобретению направлены на предотвращение патологических состояний, понятно, что термин "предотвращать" не подразумевает полное предотвращение патологического состояния. Скорее, в контексте данного изобретения термин "предотвращение" относится к способности квалифицированного специалиста идентифицировать популяцию, которая восприимчива к патологическому состоянию, так что введение композиций по настоящему изобретению может происходить до манифестации патологического состояния. Этот термин не подразумевает, что это патологическое состояние должно быть полностью устранено.

В контексте данного изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству глицинсодержащего трипептида по изобретению, достаточному для проявления обнаруживаемого терапевтического эффекта. Эффект проявляется, например, в регрессе клинического состояния или в предотвращении, уменьшении или ослаблении осложнений. Точное эффективное количество для пациента будет зависеть от массы, размера и состояния здоровья пациента; характера и степени заболевания; и терапевтического средства или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения. Терапевтически эффективные количества для данной ситуации определяются с помощью рутинных экспериментов, которые находятся в пределах компетенции и общих соображений клинициста.

В контексте данного изобретения термин "идентификация" или "выбор субъекта с метаболическим и/или сердечно-сосудистым и/или воспалительным заболеванием" означает идентификацию или выбор субъекта, предрасположенного к или имеющего метаболическое заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, системное или локализованное воспалительное заболевание; или метаболический синдром; или идентификацию или выбор субъекта, имеющего какой-либо симптом метаболического заболевания, сердечно-сосудистого заболевания или метаболического синдрома, включая, но не ограничиваясь этим, ги-

перхолестеринемии, гипергликемии, гиперлипидемии, гипертриглицеридемии, гипертензии, повышенную резистентность к инсулину, пониженную чувствительность к инсулину, массу тела, превышающую нормальную, и/или содержание жира в организме выше нормы или любую их комбинацию. Такая идентификация может быть выполнена любым способом, включая, помимо прочего, стандартные клинические тесты или исследования, такие как измерение сывороточного или циркулирующего в крови (плазменного) холестерина, измерение сывороточной или циркулирующей в крови (плазменной) глюкозы, измерение сывороточных или циркулирующих в крови (плазменных) триглицеридов, измерение провоспалительных цитокинов или кортизола, измерение артериального давления, измерение содержания жира в организме, измерение массы тела и т.п.

В контексте данного изобретения термин "глюкоза" представляет собой моносахарид, используемый клетками в качестве источника энергии и промежуточного продукта воспаления. "Глюкоза плазмы" относится к глюкозе, которая присутствует в плазме.

В контексте данного изобретения термин "холестерин липопротеинов высокой плотности" или "ЛПВП-ХС" означает холестерин, связанный с частицами липопротеинов высокой плотности. Концентрация ЛПВП-ХС в сыворотке (или плазме) обычно определяется количественно в мг/дл или ммоль/л. "Сывороточный ЛПВП-ХС" и "ЛПВП-ХС плазмы" означают ЛПВП-ХС в сыворотке и плазме соответственно.

В контексте данного изобретения термин "ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы" относится к агенту, который действует посредством ингибирования фермента ГМГ-КоА-редуктазы, такого как аторвастатин, розувастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин и симвастатин.

В контексте данного изобретения термин "гиперхолестеринемия" означает патологическое состояние, которое характеризуется повышенным уровнем холестерина или циркулирующего в крови (плазменного) холестерина, холестерина ЛПНП и холестерина ЛПОНП, в соответствии с рекомендациями группы экспертов Национальной образовательной программы по холестерину в США (NCEP) по диагностике, оценке и лечению высокого холестерина крови у взрослых (см. Arch. Int. Med. (1988), 148, 36-39).

В контексте данного изобретения термин "гиперлипидемия" или "гиперлипемия" означает патологическое состояние, которое характеризуется повышенным уровнем сывороточных липидов или циркулирующих в крови (плазме) липидов. Это патологическое состояние проявляется аномально высокой концентрацией жиров. Липидные фракции в циркулирующей крови представляют собой холестерин, липопротеины низкой плотности, липопротеины очень низкой плотности, хиломикроны и триглицериды. Классификация гиперлипидемий по Фредриксону основана на профиле ТГ и частиц богатых холестерином липопротеинов, измеренных при помощи электрофореза или ультрацентрифугирования, и, как правило, используется для характеристики основных причин гиперлипидемий, таких как гипертриглицеридемия (Fredrickson and Lee, Circulation, 1965, 31:321-327; Fredrickson et al., NewEng J. Med., 1967, 276(1):34-42).

В контексте данного изобретения термин "гипертриглицеридемия" означает патологическое состояние, которое характеризуется повышенными уровнями триглицеридов. Его этиология включает первичные (т.е. генетические причины) и вторичные (другие основные причины, такие как диабет, метаболический синдром/инсулинорезистентность, ожирение, отсутствие физической активности, курение сигарет, избыток алкоголя и диета с очень высоким содержанием углеводов) факторы или, чаще всего, комбинацию и тех и других (Yuan et al., CMAJ, 2007, 176:1113-1120).

Перед описанием настоящих композиций и способов следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными процессами, композициями или методологиями, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в изобретении, предназначена только для описания конкретных версий или вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, которое будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения. Все публикации, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки в той степени, в которой они поддерживают настоящее изобретение.

Молекулы глицинового трипептида для лечения метаболических, сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний.

Авторы настоящего изобретения разработали молекулы глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемые соли, которые проявляют профилактическую или терапевтическую активность в отношении метаболических, сердечно-сосудистых и/или воспалительных заболеваний, включая, но не ограничиваются ими, ожирение, диабет, дислипидемию, жировой гепатоз и синдром инсулинорезистентности. В определенных вариантах осуществления метаболическое или сердечно-сосудистое заболевание включает, но не ограничивается ими, ожирение, диабет, атеросклероз, дислипидемию, ишемическую болезнь сердца, коронарную болезнь, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), гиперлипидемию или метаболический синдром, или их комбинацию. Дислипидемия может представлять собой гиперлипидемию. Гиперлипидемия может представлять собой гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию или одновременно гиперхолестеринемию и гипертриглицеридемию. НАЖБП может представлять собой стеатоз печени или стеатогепатит. Диабет может представлять собой диабет 2 типа или диабет 2 типа с дислипидемией.

В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность молекулы глицинсо-

держашего трипептида DT-109 представляет собой Gly-Gly-Leu - SEQ ID NO: 1. Аминокислотная последовательность молекулы глицинсодержащего трипептида DT-110 представляет собой Gly-Gly-dLeu - SEQ ID NO: 2. Молекулы глицинового трипептида по настоящему изобретению также включают фармацевтически приемлемые соли DT-109 и DT-110. Примеры таких солей включают соли металлов, соли аммония, соли с органическим основанием, соли с неорганической кислотой, соли с органической кислотой, соли с основной или кислой аминокислотой и т.п. Предпочтительные примеры соли металла включают соли щелочных металлов, такие как соль натрия, соль калия и т.п.; соли щелочноземельных металлов, такие как соль кальция, соль магния, соль бария и т.п.; соль алюминия и т.п. Предпочтительные примеры соли с органическим основанием включают соли с триметиламином, триэтиламином, пиридином, пиколином, 2,6-лутидином, этаноламином, диэтаноламином, триэтаноламином, циклогексиламином, дициклогексиламином, N,N-добензилэтилендиамином и т.п. Предпочтительные примеры соли с неорганической кислотой включают соли с соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, азотной кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой и т.п. Предпочтительные примеры соли с органической кислотой включают соли с муравьиной кислотой, уксусной кислотой, трифторуксусной кислотой, фталевой кислотой, фумаровой кислотой, щавелевой кислотой, винной кислотой, малеиновой кислотой, лимонной кислотой, янтарной кислотой, яблочной кислотой, метансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, *p*-толуолсульфоновой кислотой и т.п. Среди вышеупомянутых солей предпочтительна фармацевтически приемлемая соль. Например, когда соединение имеет кислотную функциональную группу, неорганическую соль, такую как соль щелочного металла (например, соль натрия, соль калия и т.д.), соль щелочноземельного металла (например, соль кальция, соль магния, соль бария и т.д.) и т.п., соль аммония и т.д., и когда соединение имеет основную функциональную группу, например, соль с неорганической кислотой, такой как соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, серная кислота, фосфорная кислота и т.п., или соль с органической кислотой, такой как уксусная кислота, фталевая кислота, фумаровая кислота, щавелевая кислота, винная кислота, малеиновая кислота, лимонная кислота, янтарная кислота, метансульфоновая кислота, *p*-толуолсульфоновая кислота и т.п.

В различных вариантах осуществления молекулы глицинового трипептида также могут быть синтезированы и/или введены в виде пролекарств их исходных синтетических форм. Например, молекула глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемая соль может быть в форме пролекарства. Пролекарство означает соединение, которое превращается в молекулу глицинсодержащего трипептида под действием фермента, желудочной кислоты и т.д. в физиологических условиях в живом организме, т.е. соединение, которое превращается в молекулу глицинсодержащего трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль, путем окисления, восстановления, гидролиза и т.д. ферментом; соединение, которое превращается в молекулу глицинсодержащего трипептида путем гидролиза и т.д. под действием желудочной кислоты и т.д.

Примеры пролекарства молекулы глицинсодержащего трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли включают соединения, где аминогруппа молекулы глицинсодержащего трипептида ацилирована, алкилирована или фосфорилирована (например, соединение, где аминогруппа глицинсодержащего трипептида молекула эйкозаноилирована, аланилирована, пентиламинокарбонилирована, (5-метил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил) метоксикарбонилирована, тетрагидрофуранилирована, пирролидилметилована, пивалоилоксиметилована или трет-бутилирована и т.п.); соединение, где гидроксигруппа молекулы глицинсодержащего трипептида ацилирована, алкилирована, фосфорилирована или борирована (например, соединение, где гидроксигруппа молекулы глицинсодержащего трипептида ацетилована, пальмитоилирована, пропаноилирована, пивалоилирована, сукцинилирована, фумарилирована, аланилирована или диметиламинометилкарбонилирована); соединение, где карбоксигруппа молекулы глицинсодержащего трипептида этерифицирована или амидирована (например, соединение, где карбоксигруппа молекулы глицинсодержащего трипептида этерифицирована C₁₋₆ алкилом, этерифицирована фенилом, этерифицирована карбоксиметилом, этерифицирована диметиламинометилом, этерифицирована пивалоилоксиметилом, этерифицирована этоксикарбонилоксиэтилом, этерифицирована фталидом, этерифицирована (5-метил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)метилом, этерифицирована циклогексикарбонилэтилом или метиламидирована) и т.п. Среди прочего, предпочтительно используется соединение, в котором карбоксигруппа молекулы глицинсодержащего трипептида этерифицирована C₁₋₆ алкилом, таким как метил, этил, трет-бутил или т.п. Эти соединения могут быть получены из молекулы глицинсодержащего трипептида известным способом.

Пролекарство молекулы глицинсодержащего трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли также может быть пролекарством, которое превращается в молекулу глицинсодержащего трипептида в физиологических условиях, таких как те, что описаны в IYAKUHIN no KAHATSU (Development of Pharmaceuticals), vol.7, Design of Molecules, p. 163-198, Published by HIROKAWA SHOTEN (1990).

Иллюстративные молекулы глицинового трипептида представляют собой полимеры из трех аминокислот, которые можно получить в соответствии со способом пептидного синтеза, описанным в данном изобретении, и которые известны специалистам в данной области техники. В способе пептидного синтеза могут использоваться известные в настоящее время способы, например, процесс твердофазного синтеза и процесс жидкофазного синтеза. Т.е. целевой пептид, например молекула глицинового трипептида

или ее фармацевтически приемлемая соль, может быть получен путем повторяющейся конденсации частичного пептида или аминокислоты, способной образовывать молекулу глицинового трипептида, пептида, который должен быть синтезирован, и оставшейся части (которая может состоять из двух или более аминокислот) в соответствии с желаемой последовательностью. Когда продукт, имеющий желаемую последовательность, имеет защитную группу, целевой пептид может быть получен путем удаления защитной группы. Примеры способа конденсации и способа удаления защитной группы, которые должны быть известны, включают способы, описанные в нижеследующих публикациях (1)-(5).

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder and Luebke: The Peptide, Academic Press, New York (1965)

(3) Nobuo Izumiya, et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), published by Maruzen Co. (1975)

(4) Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

(5) Haruaki Yajima, ed.: Zoku Iyakuhin no Kaihatsu (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, published by Hirokawa Shoten.

Лечение и профилактика метаболических, сердечно-сосудистых и/или системных воспалительных заболеваний с использованием молекулы глицинового трипептида.

Глицин или молекулы глицинсодержащего трипептида, или их фармацевтически приемлемые соли, как описано и проиллюстрировано в данном изобретении, можно использовать для предотвращения и/или лечения одного или более метаболических, сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний у субъекта, нуждающегося в этом. Для целей этого изобретения "метаболическое заболевание" относится к широкому кругу заболеваний и нарушений эндокринной системы, включая, например, резистентность к инсулину, диабет, ожирение, нарушение толерантности к глюкозе, высокий уровень холестерина в крови, гипергликемию, дислипидемию и гиперлипидемию, и заболевания печени, например, НАЖБП и НАСГ. Метаболические заболевания, описанные в данном изобретении, также включают заболевания, которые можно лечить посредством модуляции метаболизма, хотя само заболевание может быть вызвано или не быть вызвано конкретным метаболическим дефектом. Такие метаболические заболевания могут охватывать, например, пути окисления глюкозы и жирных кислот.

Субъект, нуждающийся в этом, представляет собой млекопитающее, предпочтительно человек, или домашнее млекопитающее, или лабораторное млекопитающее, которое может иметь метаболическое заболевание, и/или сердечно-сосудистое заболевание, и/или системное воспалительное заболевание, или один или более симптомов, связанных с этими заболеваниями.

В определенных вариантах осуществления, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, считается, что введение глицина или молекул глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемых солей по изобретению субъекту, имеющему метаболическое заболевание, сердечно-сосудистое заболевание и хроническое системное воспалительное заболевание, или связанные или ассоциированные с любым из этих общих патологических состояний симптомы, приводят к снижению уровней липидов, включая уровни триглицеридов, уровни холестерина, инсулинорезистентность, уровни глюкозы или их комбинацию. Один или более уровней могут быть независимо снижены на 5, 10, 20, 30, 35 или 40%, или более. Введение молекул глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемых солей по изобретению может привести к повышенной чувствительности к инсулину или чувствительности печени к инсулину. Введение молекул глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемых солей по изобретению может привести к уменьшению атеросклеротических бляшек, ожирения, глюкозы, липидов, резистентности к глюкозе, холестерина или улучшению чувствительности к инсулину, или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления предложено применение глицина или молекулы глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемых солей, как описано в данном изобретении, при производстве лекарственного препарата для лечения, снижения интенсивности, отсрочки или предотвращения одного или более из метаболических заболеваний или сердечно-сосудистых заболеваний.

В определенных вариантах осуществления предложен набор для лечения, предотвращения или снижения интенсивности одного или более из метаболических заболеваний или сердечно-сосудистых заболеваний, как описано в данном изобретении, причем набор содержит

a) молекулу глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль, как описано в данном изобретении; и необязательно

b) дополнительный второй терапевтический агент или препарат, как описано в данном изобретении.

Набор может дополнительно содержать инструкции или этикетку для применения набора для лечения, предотвращения или снижения интенсивности одного или более метаболических заболеваний или сердечно-сосудистых заболеваний с применением молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения глицин или молекулы глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемые соли имеют сильные глюкозоснижающие/липидснижающие эффекты. У мышей с установленным НАСГ молекулы глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемые соли, например, DT-109 способны уменьшать стеатогепатит, улучшать состав тканей организма, снижать уровни циркулирующих в крови липидов и нормализовать или корректировать уровни ферментов печени и стеатогепатит путем стимуляции путей ОЖК. Неожиданно было показано, что молекулы глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемые соли снижают или уменьшают лобулярное/системное воспаление и фиброз печени путем ингибирования подавления путей NF-κB и TGFα/SMAD.

В контексте данного изобретения термин "дислипидемия" относится к нарушению липидного обмена, включая гиперлипидемию, вызванную aberrантным метаболизмом липопротеинов, а также гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию и гипохолестеринемию ЛПВП из-за повышенных уровней жира в крови. В контексте данного изобретения термин "жировой гепатоз" относится к патологическому состоянию, при котором жир чрезмерно накапливается в клетках печени из-за нарушения липидного обмена. Это может вызвать различные заболевания, такие как стенокардия, инфаркт миокарда, инсульт, артериосклероз и панкреатит. В контексте данного изобретения термин "диабет" относится к хроническому заболеванию, которое характеризуется относительной или абсолютной нехваткой инсулина, что приводит к нарушению толерантности к глюкозе. Термин диабет включает все виды диабета, такие как диабет 1 типа, диабет 2 типа и наследственный диабет. Диабет 1 типа, который является инсулинозависимым диабетом, в основном возникает в результате разрушения бета-клеток. Диабет 2 типа, который не является инсулинозависимым диабетом, вызывается недостаточной секрецией инсулина после еды или инсулинорезистентностью. В контексте данного изобретения термин "инсулинорезистентность" относится к физиологическому состоянию, при котором инсулин становится менее эффективным для снижения уровня сахара в крови, а глюкоза не эффективно сжигается клетками. При высокой инсулинорезистентности организм может вырабатывать слишком много инсулина, что приводит к гипертонии или дислипидемии, а также к сердечным заболеваниям, диабету и т.п. Особенно при диабете 2 типа мышцы и жировая ткань не реагируют на повышение инсулина. В контексте данного изобретения термин "синдром инсулинорезистентности" относится к комбинации нарушений, вызванных инсулинорезистентностью, которая характеризуется резистентностью клеток к действию инсулина, гиперинсулинемией, увеличением липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и триглицеридов, снижением липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), гипертонией и т.п. Он признан фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и диабета 2 типа (Reaven G.M., *Diabetes*, 37:1595-607 (1988)). Кроме того, известно, что инсулинорезистентность увеличивает окислительный стресс и изменяет систему сигнальной трансдукции в клетках наряду с другими факторами риска, такими как гипертония, диабет, курение и т.д., что вызывает воспалительные реакции и приводит к атеросклерозу (Freeman B.A. et al., *Lab. Invest.*, 47:412-26 (1982), Kawamura M. et al., *J. Clin. Invest.*, 94:771-8 (1994)).

В контексте данного изобретения термин "метаболическое заболевание" относится к группе заболеваний, включающих нарушения метаболизма, которые являются факторами риска различных сердечно-сосудистых заболеваний и диабета 2 типа. Он включает инсулинорезистентность и связанные с ней сложные и разнообразные метаболические нарушения. В 1988 г. Reaven предложил инсулинорезистентность как фактор, лежащий в основе этих нарушений, и назвал совокупность отклонений синдромом инсулинорезистентности. Однако в 1998 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) ввела термин метаболический синдром или метаболическое заболевание, поскольку все аспекты симптомов не могут быть объяснены инсулинорезистентностью.

Композиция по настоящему изобретению, содержащая молекулу глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль в качестве активного агента, способствует регрессу различных метаболических заболеваний и/или их симптомов, например, ожирения, диабета, гиперлипемии, неалкогольного жирового гепатоза, системного воспаления и/или синдрома инсулинорезистентности. Композиции по настоящему изобретению могут предотвращать или лечить метаболические заболевания с помощью различных активностей.

В контексте данного изобретения термин "гиперлипидемия" относится к заболеванию, вызванному более высоким уровнем липидов в крови из-за плохого метаболизма липидов, таких как триглицериды и холестерин. Более конкретно, гиперлипидемия характеризуется повышенными уровнями липидов, таких как триглицериды, холестерин ЛПНП, фосфолипиды и свободные жирные кислоты в крови, включая гиперхолестеринемию и гипертриглицеридемию.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления синдром инсулинорезистентности, который лечится при помощи настоящего изобретения, включает ожирение, гипертензию, атеросклероз, гиперлипидемию, гиперинсулинемию, неалкогольный жировой гепатоз и диабет 2 типа.

Согласно предпочтительному варианту осуществления композиция по настоящему изобретению снижает уровни жира в крови, жира печени или висцерального жира. Термин "печень" или "висцеральный" используется для обозначения органа, ткани и клетки.

Согласно настоящему изобретению у субъектов, получавших диету, содержащую глицин или моле-

кулу глицинового трипептида, или их фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению, значительно снижалась масса печени и улучшалась концентрация липидов, триглицеридов и общего холестерина, в крови и ткани печени, и значительно снижалась общая масса висцерального жира.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления жиры, сниженные при помощи настоящего изобретения, включают триглицерид, холестерин и свободную жирную кислоту.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления висцеральные жиры, сниженные при помощи настоящего изобретения, включают эпидидимальный жир, периренальный жир, мезентериальный жир и/или забрюшинный жир.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция по настоящему изобретению снижает активность АЛТ (аланинаминотрансферазы) или АСТ (аспартатаминотрансферазы). АЛТ и АСТ в качестве индикаторов функции печени представляют собой ферменты, уровень которых в крови повышается при повреждении печени.

"Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)" становится все более распространенной во всем мире, особенно в западных странах. В Соединенных Штатах Америки это наиболее распространенная форма хронического заболевания печени, от которой страдают от 80 до 100 млн человек. Неалкогольная жировая болезнь печени представляет собой общий термин для обозначения ряда заболеваний печени, поражающих людей, которые мало пьют алкоголь или вообще не пьют его. Как следует из названия, основной характеристикой неалкогольной жировой болезни печени является накопление слишком большого количества жира в клетках печени. Это нормально, что печень содержит небольшое количество жира. Однако, если более 5-10% массы печени составляют жиры, это патологическое состояние называется жировым гепатозом (стеатозом).

НАЖБП тесно связана с особенностями метаболического синдрома, включая ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа и дислипидемию; она считается печеночным проявлением этого синдрома.

Детская НАЖБП в настоящее время является первичной формой заболевания печени у детей. Исследования продемонстрировали, что абдоминальное ожирение и инсулинорезистентность считаются ключевыми факторами развития НАЖБП. Поскольку ожирение становится все более распространенной проблемой во всем мире, одновременно с этим растет и распространенность НАЖБП. Единственное лечение, действительно эффективное при НАЖБП у детей, представляет собой снижение массы.

Более тяжелая форма НАЖБП называется неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ). НАСГ вызывает увеличение и повреждение печени. НАСГ имеет тенденцию развиваться у людей с избыточным весом или ожирением, диабетом, высоким уровнем холестерина или триглицеридов или воспалительными состояниями. НАСГ, потенциально серьезная форма заболевания, характеризуется баллонированием гепатоцитов и воспалением печени, которое может прогрессировать до рубцевания и необратимого повреждения. Этот ущерб аналогичен ущербу, причиненному сильным употреблением алкоголя. Макро- и микроскопически НАСГ характеризуется лобулярным и/или портальным воспалением, различной степенью фиброза, гибелью гепатоцитов и патологическим ангиогенезом. В наиболее тяжелой форме НАСГ может прогрессировать до цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и печеночной недостаточности. В настоящее время НАЖБП и НАСГ лечат, например, с помощью диеты, лечения инсулинорезистентности или введения витаминов, таких как витамины E или D.

Шкала оценки активности НАЖБП (NAS) может быть рассчитана в соответствии с критериями Кляйнера (Kleiner D.E. et al., *Hepatology*, 2005, 41:1313). Баллы 0-2 по шкале NAS не считаются диагностическими для НАСГ, баллы 3-4 по шкале NAS считаются либо недиагностическими, пограничными или положительными для НАСГ, тогда как баллы 5-8 по шкале NAS в основном считаются диагностическими для НАСГ. Эффект лечения для НАСГ включает регресс, стабилизацию или снижение скорости прогрессирования заболевания. Последовательные биопсии печени пациента, у которого может быть НАСГ, могут использоваться для оценки изменения в баллах по шкале NAS и использоваться в качестве индикатора изменения болезненного состояния. Увеличенный балл указывает на прогрессирование, неизменный балл - на стабилизацию, а уменьшенный балл - на регресс НАСГ. В контролируемом клиническом исследовании разница в баллах по шкале NAS между группой, получавшей плацебо, и группой, получавшей исследуемое вещество, как правило, оцениваемая в течение периода от 6 месяцев до двух лет, может указывать на эффект лечения, даже если в обеих группах наблюдается прогрессирование. Регулирующий орган, как правило, требует определенного разброса точек, чтобы продемонстрировать значимое изменение в НАСГ.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения стеатоза печени, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более молекул трипептида или их фармацевтически приемлемой соли, при котором лечат стеатоз печени. В одном варианте осуществления молекула трипептида снижает уровень триглицеридов в липидах печени без каких-либо существенных эффектов в отношении лейцин отрицательного контроля. В другом варианте осуществления молекула трипептида снижает уровень общего холестерина в липидах печени без каких-либо существенных эффектов в отношении лейцин отрицательного контроля. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления молекула трипептида представляет собой Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu.

В настоящем изобретении также предложен способ увеличения или усиления окисления липидов в печени, снижения уровней триглицеридов или корригирования накопления холестерина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, глицина или одной или более молекул глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемой соли, и измерение его влияния на уровень мРНК, при этом осуществляя усиление или коррекцию окисления липидов печени, уровня триглицеридов, накопления холестерина или любой их комбинации.

Способ усиления окисления липидов в печени, снижения уровня триглицеридов или корригирования накопления холестерина, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, глицинового трипептида Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu или его фармацевтически приемлемой соли, и измерение его влияния на уровень мРНК, при этом осуществляя усиление или коррекцию окисления липидов в печени, уровня триглицеридов, накопления холестерина или любой их комбинации. Способ, в котором молекула глицинсодержащего трипептида Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu значительно индуцировала экспрессию регуляторов окисления липидов печени, АМФК α 1 или РАПП- α , без эффекта от лейцин отрицательного контроля. Способ, в котором молекула трипептида Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu регулирует гидролиз триглицеридов посредством значительного повышения экспрессии CPT1a, CACT или ACAD1 (митохондриальное β -окисление) или PNPLA2. Способ, в котором молекула трипептида Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu регулирует гидролиз триглицеридов путем значительного повышения экспрессии митохондриального переносчика анионов UCP2.

Способ, в котором молекула трипептида Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu регулирует гомеостаз холестерина в печени за счет значительного повышения экспрессии ABCG5 и ABCG8.

Способ коррекции липидного профиля плазмы у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более молекул трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли для снижения уровня триглицеридов в плазме, ЛПНП в плазме или атеросклеротических бляшек.

Способ коррекции липидного профиля плазмы субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулы трипептида, которые представляют собой Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu, или ее фармацевтически приемлемой соли для снижения уровня триглицеридов в плазме, ЛПНП в плазме или атеросклеротических бляшек. Способ, при котором Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu уменьшает атеросклеротические бляшки. Способ коррекции липидного профиля плазмы у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулы трипептида Gly-Gly-Leu, снижает общий холестерин в плазме, ЛПНП плазмы или их комбинацию.

В любом из вариантов осуществления способов по изобретению субъекту можно вводить дополнительный липидснижающий агент. Способ, в котором дополнительный липидснижающий агент представляет собой ингибитор абсорбции холестерина, ингибитор PCSK9, агонисты РАПП-альфа, фенофибрат, ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы, ингибитор АпоС-III (АпоСIII - аполипротеин СIII), ингибитор АТФ-цитратлиазы, рыбий жир, отпускаемый по рецепту, или ингибитор СЕТР. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение дополнительного агента, снижающего уровень холестерина, который представляет собой ингибитор абсорбции холестерина. Способ, в котором холестеринснижающий агент представляет собой ингибитор абсорбции холестерина, а ингибитор абсорбции холестерина представляет собой эзетимиб. В некоторых вариантах осуществления холестеринснижающий агент представляет собой ингибитор PCSK9.

Атеросклероз возникает, когда кровеносные сосуды, переносящие кислород и питательные вещества от сердца к остальным частям тела (артериям), становятся тонкими и жесткими (затвердевание артерий). Иногда это ограничивает приток крови к органам и тканям. Атеросклероз может привести к ряду осложнений, включая инфаркт миокарда, коронарную болезнь, заболевание сонных артерий, заболевание периферических артерий, аневризмы и хроническое заболевания почек.

Инфаркт миокарда (сердечный приступ) возникает, когда кровоток уменьшается или прекращается в части сердца, вызывая повреждение сердечной мышцы. Распространенными симптомами являются боль в центре или левой части грудной клетки, одышка, тошнота или это может вызвать сердечную недостаточность, сердечную аритмию, кардиогенный шок или остановку сердца.

Коронарная болезнь представляет собой заболевание, при котором атеросклероз сужает артерии, расположенные близко к сердцу, что может вызвать боль в груди (стенокардию), сердечный приступ или сердечную недостаточность.

Заболевание сонных артерий - это когда атеросклероз сужает артерии вблизи вашего мозга, что может вызвать транзиторную ишемическую атаку (ТИА) или инсульт. Симптомы включают внезапное онемение или слабость в руках или ногах, временную потерю зрения на один глаз или обвисание мышц лица.

Заболевание периферических артерий - это когда атеросклероз сужает артерии в руках или ногах, эти проблемы с системой кровообращением называются заболеванием периферических артерий. Это может сделать вас менее чувствительным к жаре и холоду, увеличивая риск ожогов или обморожений. В редких случаях нарушение кровообращения в руках и ногах может вызвать отмирание тканей (гангрену). Симптомы -боль в ногах при ходьбе (хромота).

Аневризмы могут возникать, когда атеросклероз вызывает серьезное осложнение, которое может возникнуть в любом месте вашего тела. Аневризма представляет собой выпуклость в стенке артерии, которая может потребовать неотложной медицинской помощи, а ее разрыв может быть жизнеугрожающим явлением.

Хроническое заболевание почек может быть вызвано атеросклерозом, когда оно приводит к сужению артерий, ведущих к почкам, которые препятствуют поступлению к ним насыщенной кислородом крови. Со временем это может повлиять на функцию почек, не давая продуктам обмена выводиться из организма. Симптомы - высокое кровяное давление или почечная недостаточность.

В настоящем изобретении предложен способ лечения атеросклероза путем введения субъекту, который в этом нуждается, одной или более молекул глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемой соли, при этом введение молекулы глицинсодержащего трипептида лечит атеросклероз. В одном варианте осуществления способ представляет собой способ лечения атеросклероза путем введения субъекту глицинсодержащей молекулы трипептида, которая представляет собой Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu. В настоящем изобретении также предложен способ лечения осложнения атеросклероза путем введения субъекту с осложнением молекулы глицинсодержащего трипептида для лечения инфаркта миокарда, коронарной болезни, заболевания сонных артерий, заболевания периферических артерий, аневризм или хронического заболевания почек. В одном варианте осуществления способ лечения осложнения атеросклероза путем введения субъекту с этим осложнением молекулы глицинсодержащего трипептида, которая представляет собой Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu, для лечения инфаркта миокарда, коронарной болезни, заболевания сонных артерий, заболевания периферических артерий, аневризма или хронического заболевания почек.

Способ лечения воспаления в жировой ткани и в системе кровообращения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более молекул глицинового трипептида или их фармацевтически приемлемой соли, при этом введение молекулы трипептида приводит к уменьшению воспаления.

Способ лечения воспаления в жировой ткани и системе кровообращения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu или фармацевтически приемлемой соли, при этом воспаление в системе кровообращения снижается за счет снижения уровня MCP1 в плазме. Способ лечения воспаления, при котором воспаление в жировой ткани происходит в эпидидимальной жировой ткани (ЭЖТ) или подкожной жировой ткани (ПЖТ), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu и уровень мРНК MCP1 снижается.

Способ лечения субъекта для снижения уровней молекулы глицинового трипептида в плазме, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более молекул трипептида или их фармацевтически приемлемой соли, при этом введение молекулы трипептида снижает уровень молекулы глицинового трипептида в плазме.

Способ лечения субъекта для снижения уровней молекулы глицинового трипептида в плазме, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, трипептида Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu.

Способ лечения субъекта с пониженным уровнем глюкозы после приема пищи, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более молекул трипептида или их фармацевтически приемлемой соли. Способ лечения субъекта с пониженным уровнем глюкозы после приема пищи, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, глицинового трипептида Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu.

Способ лечения субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu, при этом субъект страдает заболеванием печени.

Способ лечения субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu, причем субъект страдает заболеванием печени, при этом заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП) или неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) или алкогольный стеатоз печени.

Способ стабилизации или уменьшения шкалы оценки активности НАЖБП (NAS) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu, или их фармацевтически приемлемую соль.

Способ стабилизации или уменьшения шкалы оценки активности НАЖБП (NAS) у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu, или его фармацевтически приемлемую соль, причем способ включает замедление прогрессирования, стабилизацию или уменьшение стеатозного компонента в шкале NAS. Способ, который включает замедление прогрессирования, стабилизацию или уменьшение компонента лобулярного воспаления в шкале NAS. Способ, который включает замедление прогрессирования, стабилизацию или уменьшение компонента баллонирования гепатоцитов в шкале NAS.

Способ в соответствии с любым из способов стабилизации или уменьшения шкалы оценки активности НАЖБП, причем шкала NAS отличается не менее чем на 1,5 балла после 6 месяцев лечения терапевтически эффективным количеством композиции, содержащей Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu или его фармацевтически приемлемую соль.

Способ уменьшения фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-

dLeu, или его фармацевтически приемлемую соль.

Способ снижения уровней фибриногена в плазме у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu, или его фармацевтически приемлемую соль.

Способ снижения уровней фибриногена в плазме у субъекта, нуждающегося в этом, причем уровень фибриногена у субъекта превышает 300 мг/дл до введения субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей Gly-Gly-Leu и/или Gly-Gly-dLeu или его фармацевтически приемлемую соль.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору для лечения НАЖБП, содержащему DT-109, необязательно статин, и инструкции по применению. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору для лечения НАСГ, содержащему DT-109, необязательно статин, и инструкции по применению. Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору для лечения НАЖБП, содержащему DT-110, необязательно статин, и инструкции по применению. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к набору для лечения НАСГ, содержащему DT-110, необязательно статин, и инструкции по применению.

В настоящем изобретении предложены способы уменьшения фиброза печени у пациента, включающие введение DT-109 или DT-110 или их фармацевтически приемлемой соли. Один вариант осуществления относится к способу уменьшения фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту DT-109 или DT-110. В другом варианте осуществления представлен способ уменьшения фиброза печени у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту DT-109 или DT-110, причем субъект страдает НАСГ.

Фибриноген (фактор I) представляет собой гликопротеин млекопитающих, который играет роль в образовании тромбов. Фибриноген превращается в фибрин тромбином во время образования тромба. Фибриноген синтезируется в гепатоцитах печени. Следовательно, фибриноген может быть прогностическим индикатором или маркером крови для многих заболеваний, а также может влиять на манифестацию и прогрессирование болезненного состояния.

В различных вариантах осуществления способы лечения по меньшей мере одного из гиперлипидемии, жирового гепатоза, стеатогепатита, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, ожирения, гипергликемии, метаболического синдрома, сердечно-сосудистого заболевания и атеросклероза у субъекта-млекопитающего, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулу глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль.

В различных вариантах осуществления молекула глицинсодержащего трипептида значительно снижает уровень триглицеридов в липидах печени без каких-либо существенных эффектов в отношении лейцин отрицательного контроля.

В различных вариантах осуществления глицинсодержащая молекула трипептида значительно снижает уровень общего холестерина в липидах печени без каких-либо существенных эффектов в отношении лейцин отрицательного контроля.

В различных вариантах осуществления молекула глицинсодержащего трипептида представляет собой Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемую соль.

В настоящем изобретении предложен способ усиления окисления или утилизации липидов в печени, снижения уровня триглицеридов или лечения гиперхолестеринемии у субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли, причем в результате лечения улучшается окисление липидов в печени, уровень триглицеридов, гиперхолестеринемия или любая их комбинация. В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида представляет собой Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемую соль.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемая соль значительно индуцирует экспрессию регуляторов окисления липидов печени, АМФК α 1 или РАПП- α , без эффекта от лейцина отрицательного контроля.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемая соль регулирует гидролиз триглицеридов, значительно повышая экспрессию СРТ1а, СACT или АСАD1 (митохондриальное β -окисление) или PNPLA2.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемая соль регулирует гидролиз триглицеридов, значительно повышая экспрессию митохондриального переносчика анионов UCP2.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемая соль регулирует гомеостаз холестерина в печени путем значительного повышения экспрессии ABCG5 и ABCG8.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления липидный профиль плазмы субъекта, вклю-

чающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли для снижения триглицеридов в плазме, уровня ЛПНП в плазме или атеросклеротических бляшек. В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида представляет собой Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемую соль.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекулы глицинового трипептида, Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu, или ее фармацевтически приемлемая соль снижают атеросклеротические бляшки.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемая соль снижает общий холестерин в плазме, ЛПНП в плазме или их комбинацию.

В настоящем изобретении предложен способ лечения воспаления в жировой ткани и системе кровообращения у субъекта, нуждающегося в таком лечении. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулы глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой соли, причем введение молекулы глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой соли приводит к уменьшению воспаления в жировых тканях и в системе кровообращения субъекта. В связанном аспекте этих вариантов осуществления воспаление в системе кровообращения снижается за счет снижения уровня MCP1 в плазме путем введения субъекту Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или его фармацевтически приемлемой соли. В родственном аспекте этих вариантов осуществления воспаление в жировой ткани происходит в эпидидимальной жировой ткани (ЭЖТ) или подкожной жировой ткани (ПЖТ), а уровень мРНК MCP1 снижается.

В настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта с пониженным уровнем лептина в плазме у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, молекулы глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой соли, причем введение молекулы глицинсодержащего трипептида снижает уровень лептина в плазме. В родственном аспекте этих вариантов осуществления лечение проводят с помощью Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или их фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта с пониженным уровнем глюкозы после приема пищи у субъекта, который в этом нуждается. Способ включает введение субъекту, который в этом нуждается, молекулы глицинсодержащего трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления лечение субъекта включает введение терапевтически эффективного количества молекулы глицинового трипептида, например, Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu, или ее фармацевтически приемлемую соль.

В настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта, который страдает или у которого может развиваться заболевание печени, например, заболевание печени, которое характеризуется тем, что в печени имеется избыток холестерина, триглицеридов или других липидов, что является типичным для заболеваний печени, например, НАЖБП, НАСГ или связанного с алкоголем стеатоза печени, цирроза печени или воспаления печени. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или его фармацевтически приемлемой соли для лечения или профилактики заболевания печени.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) или алкогольный стеатоз печени.

В родственном аспекте этих вариантов осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ стабилизации или снижения шкалы оценки активности НАЖБП (NAS) у субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества глицинового трипептида, имеющего аминокислотную последовательность: Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu, или его фармацевтически приемлемой соли. В родственном аспекте этих вариантов осуществления способ включает замедление прогрессирования, стабилизацию или уменьшение стеатозного компонента в шкале NAS. В родственном аспекте этих вариантов осуществления способ включает замедление прогрессирования, стабилизацию или уменьшение компонента лобулярного воспаления в шкале NAS. В родственном аспекте этих вариантов осуществления способ включает замедление прогрессирования, стабилизацию или уменьшение компонента баллонирования гепатоцитов в шкале NAS. В родственном аспекте этих вариантов осуществления шкала NAS отличается не менее чем на 1,5 балла после 6 месяцев лечения Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или их фармацевтически приемлемой солью.

В настоящем изобретении предложен способ уменьшения фиброза печени у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества молекулы глицинового трипептида, Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu, или ее фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении предложен способ лечения атеросклероза, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества молекулы глицинсодержащего трипептида или его фармацевтически приемлемой соли. В родственном аспекте этих вариантов осуществления молекула глицинсодержащего трипептида представляет собой Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-dLeu или ее фармацевтически приемлемую соль.

В настоящем изобретении предложен способ лечения осложнения атеросклероза путем введения субъекту с осложнением терапевтически эффективного количества молекулы глицинсодержащего три-

пептида для лечения осложнения, выбранного из группы, состоящей из инфаркта миокарда, артериосклероза, коронарной болезни, заболевания сонных артерий, заболевания периферических артерий, атеротромботического инсульта, аневризм или хронического заболевания почек.

Настоящее изобретение также охватывает лечение таких иллюстративных метаболических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний и воспалительных заболеваний путем введения молекулы глицинсодержащего трипептида в комбинации со вторичным терапевтическим агентом для лечения метаболических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний и воспалительных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные выше, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, второго терапевтического агента, выбранного из: ингибитора абсорбции холестерина, ингибитора PCSK9, агониста РАПП-альфа, ингибитора АПФ (англ.: ACE, angiotensin-converting-enzyme - рус: ангиотензин-превращающий фермент), блокатор кальциевых каналов, БРА (англ.: ARB, angiotensin II receptor blockers - блокатор рецепторов ангиотензина-II), ренина, ГПП-1 или его синтетического варианта, инсулина или его синтетического варианта, метформина, соединения сульфонилмочевины, тиазолидиндиона (ТЗД), ингибитора PCSK9, ингибитора НЗПГ-2 (натрий-зависимого переносчика глюкозы-2), ингибитора ДПП-4, ингибитора ГМГ-КоА-редуктазы, ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексина типа 9 (PCSK9), эзетимиба, гемфиброзила, фенофибрата, клофибрата, безафибрата, пемафибрата, гемкабена (CI-1027), бемпедоевой кислоты (ЕТС-1002), ингибитора ацетил-КоА-карбоксилазы, ингибитора АпоС-III, ингибитора АТФ-цитратлиаза, рыбьего жира, отпускаемого по рецепту, ингибитора СЕТР, противофиброзного агента и их комбинации.

В определенных вариантах осуществления предложен набор для лечения, предотвращения или снижения интенсивности одного или более из метаболических заболеваний, и/или сердечно-сосудистых заболеваний, и/или воспалительных заболеваний, как описано в данном изобретении, причем набор содержит: а) молекулу глицинсодержащего трипептида, как описано в данном изобретении; и необязательно б) дополнительный агент или препарат, как описано в данном изобретении. Набор может дополнительно содержать инструкции или этикетку для применения набора для лечения, предотвращения или облегчения одного или более из метаболического заболевания, и/или сердечно-сосудистого заболевания, и/или воспалительного заболевания. В родственном аспекте этих вариантов осуществления набор предназначен для лечения субъекта с НАЖБП или НАСГ, содержащий выбранный трипептид, необязательно статин, и инструкции по применению. В родственном аспекте этих вариантов осуществления набор содержит DT-109 (Gly-Gly-Leu) и/или (DT-110 (Gly-Gly-dLeu), необязательно статин, и инструкции по применению. В родственном аспекте этих вариантов осуществления набор дополнительно необязательно содержит ингибитор абсорбции холестерина, ингибитор PCSK9, агонисты РАПП-альфа, ингибитор АПФ, блокатор кальциевых каналов, БРА, ренин, ГПП-1 или их синтетический вариант, инсулин или его синтетический вариант, метформин, соединение сульфонилмочевины, тиазолидиндион (ТЗД), ингибитор PCSK9, ингибитор НЗПГ-2, ингибитор ДПП-4, статин, ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы (пропротеинконвертаза субтилизин/кексин тип 9), эзетимиб, гемфиброзил, фенофибрат, клофибрат, безафибрат, пемафибрат, гемкабен, (CI-1027), бемпедоевая кислота (ЕТС-1002), ингибитор ацетил-КоА-карбоксилазы, ингибитор АпоС-III, ингибитор АТФ-цитратлиаза, рыбий жир, отпускаемый по рецепту, ингибитор СЕТР, противофиброзный агент и их комбинации. В родственном аспекте этих вариантов осуществления набор необязательно содержит эзетимиб.

Составы.

Используемый в данном изобретении термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительства штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, например, людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту, стабилизатору или носителю, с которым составлен агент для введения. Фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая нефтяные масла, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является типичным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, натрий стеарат, глицерин моностеарат, тальк, натрий хлорид, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, при необходимости, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульсифицирующих агентов или рН-буферных агентов. Фармацевтические композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композицию можно также готовить в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая молекулу глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль в смеси по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым эксципиентом, носителем или разбавителем. Фармацевтически приемлемая композиция

содержит один или более материалов композиции для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. Подходящие материалы для составов включают, но не ограничиваются ими, аминокислоты (такие как глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, натрий сульфит или натрий гидросульфит); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты, другие органические кислоты); объемобразующие агенты (такие как маннит или глицин), хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители; ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); полипептиды с низкой молекулярной массой; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбитол); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат-20, полисорбат-80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); агенты, повышающие стабильность (сахароза или сорбитол); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов (в одном аспекте, хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средство доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические адъюванты. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990).

В одном аспекте изобретения молекула глицинсодержащего трипептида поставляется в одноразовом стеклянном флаконе с лиофилизированной лепешкой, приготовленной в буфере для состава, состоящем из 10 мМ глутаминовой кислоты, 2% глицина, 1% сахарозы и 0,01% полисорбата-20 до pH 4,25. После восстановления объемом стерильного разбавителя, например, стерильного изотонического солевого раствора или воды, например, от 0,5 мл до около 10 мл, например, 2,2 мл стерильной воды, лепешка дает концентрацию молекулы глицинового трипептида от 1 г/мл до около 100 г/мл. Молекула глицинсодержащего трипептида хранится в безопасном месте в контролируемых условиях. После восстановления одноразового флакона лекарственное средство вводят немедленно (не более чем через 3 ч после восстановления). Перед инъекцией исследуемому препарату дают нагреться до комнатной температуры (от 15 до 30°C).

Дозировки и введение.

"Количество дозы", используемое в данном изобретении, как правило, равно дозе активного ингредиента, которую можно вводить один раз в сутки или можно вводить несколько раз в сутки (например, стандартная доза представляет собой часть желаемой суточной дозы). В различных вариантах осуществления различные дозы и режим дозирования применимы к глицину или молекулам глицинсодержащего трипептида, описанным в данном изобретении. Например, дозировки, которые применимы в настоящем изобретении, составляют от 5 до 2000 мг/кг, или от 30 до 1500 мг/кг, или от 40 до 1250 мг/кг, или от 50 до 1000 мг/кг, или от 60 до 5000 мг/кг в расчете на массу тела субъекта. Термин "стандартная доза", используемый в данном изобретении, может использоваться для обозначения дискретного количества терапевтической композиции, которая включает заранее определенное количество активного соединения. Количество активного ингредиента, как правило, равно дозировке активного ингредиента, которую можно вводить один раз в сутки или можно вводить несколько раз в сутки (например, стандартная доза составляет часть желаемой суточной дозы). Стандартная доза также может быть принята для обозначения общей суточной дозы, которую можно вводить один раз в сутки или можно вводить в виде удобной доли такой дозы (например, стандартная доза представляет собой общую суточную дозу, которую можно вводить дробными приращениями, такими как, например, половина или треть дозы).

В контексте данного изобретения термин "начальная суточная доза" относится к количеству молекулы глицинсодержащего трипептида в сутки, которое вводится или назначается пациенту, начинающему лечение молекулой глицинсодержащего трипептида, которому ранее не подбирали дозу молекулы глицинсодержащего трипептида. Это количество можно вводить в виде нескольких стандартных доз или в виде разовой стандартной дозы, за один раз в течение суток или несколько раз в течение суток.

В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 1 мг/кг/сутки до около 10000 мг/кг/сутки, от около 1 мг/кг/сутки до около 1000 мг/кг/сутки, от около 0,1 мг/кг/сутки до около 1000 мг/кг/сутки, от около 1 мг/кг/сутки до около 1000 мг/кг/сутки, от около 1000 мг/кг/сутки до около 10000 мг/кг/сутки, или от около 1 мг/кг/сутки до около 500 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 3 мг/кг/сутки до около 70 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 7 мг/кг/сутки до около 40 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 3 мг/кг/сутки до около 50 мг/кг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления доза может составлять от 1000 мг/сутки до 100 г/сутки, более предпочтительно от 1000 мг/сутки до 75 г/сутки. Количество молекулы глицинсодержащего трипептида в композициях может предпочтительно составлять от около 50 мг до около 100 г, от около 100 мг до около 90 г, от около 500 мг до около 75 г, от около 600 мг до около 80 г, от около 700 мг до около 75 г. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида в композициях может составлять от около 100 мг до около 1000 г, от около 200 мг до около 500 г, от около 300 мг до около 100 г, от около 400 мг до около 75 г, от около 500 мг до около 50 г, от около 750 мг до около 25 г, от около 1000 мг до около 50 г или от 1000 мг до около 25 г.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза молекулы глицинсодержащего трипептида для введения составляет от около 100 мг до около 200 г. Эту дозу можно вводить как разовую суточную дозу или можно разделить на несколько доз, вводимых в течение суток, например от 1 до 5 доз, предпочтительно от 2 или 3 доз в сутки. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 250 мг до около 100 г. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 500 мг до около 90 г. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 750 мг до около 75 г. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 1000 мг до около 50 г. В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой твердую дозированную форму для перорального введения.

Композиция может иметь хиральную чистоту для молекулы глицинсодержащего трипептида по меньшей мере 99,5%, предпочтительно по меньшей мере 99,6%, предпочтительно по меньшей мере 99,7%, предпочтительно по меньшей мере 99,8%, предпочтительно по меньшей мере 99,9%, предпочтительно по меньшей мере 99,95%, или более предпочтительно по меньшей мере 99,99%. В некоторых вариантах осуществления хиральная чистота молекулы глицинсодержащего трипептида составляет 100%. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет хиральную чистоту для молекулы глицинсодержащего трипептида 99,9% или выше. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет хиральную чистоту для молекулы глицинсодержащего трипептида 99,95% или выше. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет хиральную чистоту для молекулы глицинсодержащего трипептида 99,99% или выше.

В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой твердую дозированную форму для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой капсулу. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой таблетку. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в виде раствора для перорального или парентерального введения.

Варианты осуществления количества молекулы глицинсодержащего трипептида в композиции, хиральной чистоты и дозированной формы, которые описаны в данном изобретении по отдельности для краткости, могут быть объединены в любую подходящую комбинацию.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композициям, содержащим молекулу глицинсодержащего трипептида, которая является хирально чистой для молекулы глицинового трипептида. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 5 до 5000 мг/кг/сутки, или от 5 до около 2000 мг/кг/сутки, или от 30 до 1500 мг/кг/сутки, или от 40 до 1250 мг/кг/сутки, или от 50 до 1000 мг/кг/сутки, или от 60 до 500 мг/кг/сутки в расчете на массу тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 10 мг/кг/сутки до около 1000 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 7 мг/кг/сутки до около 900 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 5 мг/кг/сутки до около 800 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления дозировка может составлять от 10 до 5000 мг/сутки, более предпочтительно от 100 до 2000 мг/сутки. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят в дозах от около 500 мг до около 100 г, от около 1000 мг до около 75 г, от около 1500 мг до около 50 г или от около 2000 мг до около 25 г молекулы глицинового трипептида. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят в дозах от около 250 мг до около 500 г, от около 500 мг до около 250 г, от около 750 мг до около 200 г, от около 1000 мг до около 100 г, от около 1250 г до около 75 г, от около 1500 мг до около 50 г, от около 2000 мг до около 25 г или от 2500 мг до около 20 г. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида, вводимого субъекту, нуждающемуся в этом, для предотвращения или лечения метаболического заболевания, и/или сердечно-сосудистого заболевания, и/или воспалительного заболевания, может варьироваться от около 500 мг до около 200 г. Эта доза может вводиться в виде однократной суточной дозы или может быть разделена на несколько доз, вводимых в течение суток, например, на 1-5 доз в сутки, предпочтительно от двух до трех доз в сутки. Эти дозы молекулы глицинсодержащего трипептида предпочтительно находятся в препаратах, которые имеют химическую чистоту 97% или выше и хиральную чистоту для молекулы глицинового трипептида 99,6% или больше, 99,7% или больше, 99,8% или больше, 99,9% или больше, предпочтительно 99,95%

или больше и более предпочтительно 99,99% или больше. В предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие молекулу глицинсодержащего трипептида, могут иметь хиральную чистоту для молекулы глицинсодержащего трипептида 100%. Композиции могут дополнительно содержать носитель. Композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально, предпочтительно в виде дозы в твердой пероральной лекарственной форме и более предпочтительно в виде дозы в твердой пероральной лекарственной форме, которая может быть капсулой или таблеткой. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде таблеток для перорального введения.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей терапевтически эффективное количество молекулы глицинового трипептида. Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 1 мг/кг/сутки до около 10000 мг/кг/сутки, от около 5 мг/кг/сутки до около 5000 мг/кг/сутки, от около 20 мг/кг/сутки до около 1000 мг/кг/сутки, от около 30 мг/кг/сутки до около 1000 мг/кг/сутки, от около 50 мг/кг/сутки до около 10000 мг/кг/сутки или от около 100 мг/кг/сутки до около 5000 мг/кг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 5 мг/кг/сутки до около 5000 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 10 мг/кг/сутки до около 4000 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида может составлять от около 25 мг/кг/сутки до около 2000 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления доза может составлять от 10 мг/сутки до 1000 г/сутки, более предпочтительно от 500 мг/сутки до 100 г/сутки. Терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида в композициях может предпочтительно составлять от около 250 мг до около 500 г, от около 500 мг до около 400 г, от около 750 мг до около 200 г, от около 1000 мг до около 100 г. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида в композициях может составлять от около 300 мг до около 1000 г, от около 500 мг до около 500 г, от около 600 мг до около 400 г, от около 700 мг до около 300 г, от около 800 мг до около 200 г, от около 900 мг до около 150 г или от около 1000 мг до около 100 г. В некоторых вариантах осуществления количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 600 мг до около 300 г. Эта доза может вводиться в виде однократной суточной дозы или может быть разделена на несколько доз, вводимых в течение суток, например, на 1-5 доз в сутки, предпочтительно от двух до трех доз в сутки. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 500 мг до около 350 г. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 750 мг до около 250 г. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 1000 мг до около 150 г. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида составляет от около 1500 мг до около 100 г. В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой твердую дозированную форму для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой жидкую дозированную форму для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой жидкую дозированную форму для парентерального введения.

В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой твердую дозированную форму для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой капсулу. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой таблетку.

В другом аспекте положительный эффект молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли на функцию печени субъекта, в одном аспекте, проявляется в благоприятных изменениях в экспрессии матричной РНК или белка окисления липидов печени, АМФК α 1, глюкокиназы, α -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, коактиватора-1 РАПП- γ , пируваткиназы, белка-1с, связывающего стерол-регуляторный элемент, длинноцепочечной и очень длинноцепочечной ацил-КоА дегидрогеназы или стеароил-КоА-десатуразы. В дополнительном аспекте положительный эффект молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли на функцию печени субъекта проявляется в улучшении экспрессии информационной РНК или белка фосфоеноилпируваткиназы, митохондриального транспортного белка, арил-ацетаминдесетилазы, аполиipoproteина С2, карнитин пальмитоилтрансферазы II или фосфолипазы D1.

Молекула глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению может вводиться любым подходящим путем. Например, композиции по изобретению можно вводить пероральным, окулярным, внутрикожным, внутривенным, интраназальным, подкожным,

внутримышечным или внутривенным путем.

Составы, подходящие для перорального введения, включают, например, твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости или порошки; леденцы (в том числе заполненные жидкостью); жевательные таблетки; гели; быстро диспергируемые дозированные формы; пленки; капсулы; спреи. В некоторых вариантах осуществления пептиды по настоящему изобретению составлены для перорального введения с использованием носителей для доставки, известных в данной области, включая, помимо прочего, микросферы, липосомы, сухие эмульсии с энтеросолюбильным покрытием или наночастицы.

Жидкие дозированные формы для парентерального введения, включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным пептидам, жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в настоящем уровне техники, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей пероральные композиции могут также включать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки.

Твердые дозированные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых дозированных формах активный пептид смешан с по меньшей мере одним инертным фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, таким как натрий цитрат или дикальцийфосфат; и/или

- a) наполнителями или разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота;
- b) связывающими веществами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик;
- c) увлажнителями, такими как глицерин;
- d) разрыхлителями, такими как агар-агар, кальций карбонат, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и натрий карбонат;
- e) замедляющими растворение агентами, такими как парафин;
- f) ускорителями абсорбции, такими как четвертичные аммониевые соединения;
- g) смачивающими агентами, такими как, например, цетиловый спирт и глицерин моностеарат;
- h) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина; и
- i) смазывающими веществами, такими как тальк, кальций стеарат, магний стеарат, твердые полиэтиленгликоли, натрий лаурилсульфат и их смеси.

В случае капсул, таблеток и пилюль дозированная форма также может содержать буферные агенты. Активные соединения также могут быть в микрокапсулированной форме с одним или более эксципиентами, как указано выше. Твердые композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких эксципиентов как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли, полуксамеры и т.п. Твердые дозированные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтики. Препараты для инъекций, например, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций, могут быть составлены в соответствии с известными способами с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор для инъекций, суспензию или эмульсию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, вода, раствор Рингера, U.S.P. (Фармакопея США) и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, нелетучие масла обычно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды.

Для данной цели можно использовать любое нелетучее масло со слабовыраженным вкусом, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении инъекционных препаратов используются жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Инъекционные составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением.

Специалисты в данной области техники поймут, что количества полипептидов молекул глицинсодержащего трипептида, вводимых для терапевтического применения, варьируются. В одном аспекте композиция, содержащая молекулу глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль, по существу не содержит загрязняющих веществ, уровень загрязнения составляет менее 0,02% мас./мас. Композиции молекул глицинсодержащего трипептида, подходящие для инъекции пациенту, получают,

например, путем восстановления фармакологически приемлемым разбавителем лиофилизированного образца, содержащего очищенную молекулу глицинсодержащего трипептида и стабилизирующие соли. Введение композиции молекулы глицинсодержащего трипептида является альтернативно системным или местным, как подробно обсуждается в данном изобретении ниже, и включает введение терапевтически эффективного количества белковой композиции молекул глицинсодержащих трипептидов.

Комбинированные способы лечения и композиции.

В дополнение к способам лечения, основанным исключительно на доставке композиции, содержащей молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль, конкретно рассматривается комбинированная терапия. В контексте изобретения предполагается, что препарат на основе молекул глицинсодержащего трипептида аналогичным образом используется в комбинации с другими агентами, как правило, используемыми для лечения метаболического заболевания, например, жировой болезни печени.

В различных вариантах осуществления второй терапевтический агент(ы) можно комбинировать с молекулой глицинового трипептида, в частности, для синергического повышения активности. Введение комбинации активных ингредиентов может происходить или путем отдельного введения активных ингредиентов пациенту, или в форме комбинированных продуктов, в которых множество активных ингредиентов присутствует в одном фармацевтическом препарате. Ожидается, что вторичный терапевтический агент может быть введен в его утвержденной дозировке при использовании в качестве единственного агента, или первоначально вторичный терапевтический агент может быть введен в терапевтически эффективных концентрациях или в субтерапевтически эффективных концентрациях, так что комбинация вторичного терапевтического агента с молекулой глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой солью при введении в комбинации обеспечивает терапевтически эффективный результат у пациента, которого лечат.

Для достижения соответствующего терапевтического результата с использованием способов и композиций по настоящему изобретению можно получить композицию, содержащую молекулу глицинсодержащего трипептида и по меньшей мере один другой терапевтический агент или агенты (второй терапевтический агент(ы)). В изобретении предполагается, что второй терапевтический агент может быть выбран из прамлинотида, пептида YY (PYY), экзанотида или сенсibilизатора инсулина, включая, но не ограничиваясь ими, тиазолидиндион или метформин, или глимепирид, и аналоги любого из этих соединений. Другие вторичные терапевтические агенты, используемые для борьбы с дислипидемией, диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями, связанными с атеросклерозом, хорошо известны в данной области техники и могут использоваться в комбинации с молекулой глицинсодержащего трипептида по настоящему изобретению.

Комбинированные терапевтические композиции представлены в количестве в комбинации, эффективном для получения желаемого терапевтического результата при лечении метаболического заболевания, например, метаболического заболевания, связанного с одним или более из нарушенного метаболизма глюкозы, дислипидемии, например, дислипидемии, связанной с повышением холестерина (чистая или изолированная гипертриглицеридемия) и/или с повышением только триглицеридов (ТГ) (чистая или изолированная гипертриглицеридемия) и/или с повышением как холестерина, так и ТГ (смешанные или комбинированные гиперлипидемии), жировой болезни печени, включая НАЖБП, НАСГ, стеатоз, воспаление печени, заболевание периферических артерий, коронарную болезнь, атеросклероз, системное воспаление и ишемический инсульт, связанный с тромбозом, связанным с бляшками. Этот процесс включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества первого терапевтического агента по настоящему изобретению (т.е. композиции, содержащей терапевтически эффективное количество молекулы глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой соли), и, необязательно, второй терапевтический агент(ы) или фактор(ы) одновременно. Это достигается путем введения одной композиции или фармакологического состава, который содержит оба терапевтических агента, или путем введения двух отдельных композиций или составов, одновременно, где одна композиция включает терапевтическую композицию с молекулой глицинсодержащего трипептида, а другая композиция содержит второй терапевтический агент.

Противодиабетические средства, полезные в качестве вторичного терапевтического агента, применяемого в комбинации с молекулой глицинсодержащего трипептида могут включать инсулин и производные инсулина, такие как, например, Lantus® или HMR 1964 или Levemir® (инсулин детемир) или те, которые описаны в WO 2005005477 (Novo Nordisk), инсулины быстрого действия (см. патент США № 6221633), ингаляционные инсулины, такие как, например, Exubera®, или пероральные инсулины, например, IN-105 (Nobex) или Oral-lyn™ (Generex Biotechnology), производные ГПП-1 и агонисты ГПП-1, такие как, например, эксенатид, лираглутид или те, которые описаны в WO 98/08871, WO 2005027978, WO 2006037811 или WO 2006037810 от Novo Nordisk A/S, в WO 01/04156 от Zealand или в WO 00/34331 от Beaufour-Ipsen, прамлинотида ацетат (Symlin; Amylin Pharmaceuticals), BIM-51077, PC-DAC-эксендин-4 (аналог эксендина-4, ковалентно связанный с рекомбинантным человеческим альбумином), агонисты, подобные описанным, например, в D. Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 104 (2007) 943, те, которые

описаны в WO 2006124529, и эффективные для перорального приема сахароснижающие активные ингредиенты.

Противодиабетические средства также включают агонисты рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP), как описано, например, в WO 2006121860 и ГПП-1 и ГПП-2, а также их синтетические варианты и мутанты, используемые для контроля уровня глюкозы в крови и лечения диабета, включая сахарный диабет II типа.

Иллюстративные вторичные терапевтические агенты, полезные в комбинации с описанной в данном изобретении молекулой глицинсодержащего трипептида, могут включать перорально эффективные сахароснижающие активные ингредиенты, предпочтительно сульфонилмочевины, бигуанидины, меглитиниды, оксадиазолидиндионы, тиазолидиндионы, ингибиторы глюкозидазы, ингибиторы гликогенфосфорилазы, антагонисты глюкагона, активаторы глюкокиназы, ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы, модуляторы переносчика глюкозы 4 (GLUT4), ингибиторы глутамин-фруктозо-6-фосфатамидотрансферазы (GFAT), агонисты ГПП-1, вещества, открывающие калиевые каналы, такие как, например, пинацидил, кромакалим, диазоксид, или те, что описаны в R.D. Carr et al., *Diabetes*, 52, 2003, 2513.2518, J.B. Hansen et al., *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2004, 1595-1615, T.M. Tagmose et al., *J. Med. Chem.*, 47, 2004, 3202-3211; или в M.J. Coghlan et al., *J. Med. Chem.*, 44, 2001, 1627-1653, или те, что описаны в WO 97/26265 и WO 99/03861 от Novo Nordisk A/S, ингибиторы дипептидилпептидазы IV (ДПП-4), сенсibiliзаторы инсулина, ингибиторы ферментов печени, участвующих в стимуляции глюконеогенеза и/или гликогенолиза, модуляторы захвата глюкозы, транспорта глюкозы и реабсорбции глюкозы, ингибиторы 11β -HSD1, ингибиторы протеинтирозинфосфатазы 1B (PTP1B), модуляторы натрийзависимого переносчика глюкозы 1 или 2 (SGLT1, НЗПГ-2), соединения, которые изменяют метаболизм липидов, такие как антигиперлипидемические активные ингредиенты и антилипидемические активные ингредиенты, соединения, которые снижают потребление пищи, соединения, которые увеличивают термогенез, модуляторы PPAR α и RXR и активные ингредиенты, которые действуют на АТФ-зависимый калиевый канал бета-клеток.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы, таким как симвастатин, флувастатин, правастатин, ловастатин, аторвастатин, церивастатин, розувастатин или L-659699.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором абсорбции холестерина, таким как, например, эзетимиб, тикесид, памакезид, FM-VP4 (ситостанол/аскорбилфосфат кампестерола; Forbes Medi-Tech, WO 2005042692 WO 2005005453), MD-0727 (Microbia Inc., WO 2005021497, WO 2005021495) или с соединениями, описанными в WO 2002066464, WO 2005000353 (Kotobuki Pharmaceutical Co. Ltd.), или WO 2005044256, или WO 2005062824 (Merck & Co.), или WO 2005061451 и WO 2005061452 (AstraZeneca AB), и WO 2006017257 (Phenomix) или WO 2005033100 (Lipideon Biotechnology AG), или описанными в WO 2004097655, WO 2004000805, WO 2004000804, WO 2004000803, WO 2002050068, WO 2002050060, WO 2005047248, WO 2006086562, WO 2006102674, WO 2006116499, WO 2006121861, WO 2006122186, WO 2006122216, WO 2006127893, WO 2006137794, WO 2006137796, WO 2006137782, WO 2006137793, WO 2006137797, WO 2006137795, WO 2006137792, WO 2006138163.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с VytorinTM, фиксированной комбинацией эзетимиба и симвастатина.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с фиксированной комбинацией эзетимиба и аторвастатина.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с фиксированной комбинацией эзетимиба и фенофибрата.

В дополнительном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с фиксированной комбинацией фенофибрата и розувастатина.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с Synordia®, фиксированной комбинацией фенофибрата и метформина.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ISIS-301012, бессмысловым олигонуклеотидом, способным регулировать ген аполипопротеина В.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с агонистом PPAR γ -гамма, таким как, например, розиглитазон, пиоглитазон, JTТ-501, GI 262570, R-483, CS-011 (ривоглитазон).

В одном варианте изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ComretactTM, фиксированной комбинацией пиоглитазона гидрохлорида и метформина гидрохлорида.

В одном варианте изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с TandemactTM, фиксированной комбинацией пиоглитазона с глимепиридом.

В одном варианте изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с фиксированной комбинацией гидрохлорида пиоглитазона с антагонистом рецептора ангиотензина II, таким как, например, ТАК-536.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с агонистом РАПП-альфа, таким как, например, GW9578, GW-590735, K-111, LY-674, KRP-101, DRF-10945, LY-518674 или теми, которые описаны в WO 2001040207, WO 2002096894, WO 2005097076.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации со смешанным агонистом РАПП-альфа/гамма, таким как, например, навеглитазар, LY-510929, ONO-5129, E-3030, AVE 8042, AVE 8134, AVE 0847, СКD-501 (сульфат лобеглитазона) или как описано в WO 00/64888, WO 00/64876, WO 03/020269; или в J.P. Berger et al., *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 28(5), 244-251, 2005.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с агонистом РАПП-дельта, таким как, например, GW-501516 или как описано в WO 2006059744, WO 2006084176, WO 2006029699, WO 2007039172-WO 2007039178.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с метаглитасеном или с MBX-2044 или другими частичными агонистами/антагонистами РАПП-гамма.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с фибратом, таким как, например, фенофибрат, клофибрат или безафибрат.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором МТР, таким как, например, имплитапид, BMS-201038, R-103757, AS-1552133 или теми, которые описаны в WO 2005085226, WO 2005121091, WO 2006010423.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором СЕТР, таким как, например, торцетрапид или JTT-705, или теми, которые описаны в WO 2006002342, WO 2006010422, WO 2006012093, WO 2006073973, WO 2006072362, WO 2006097169, WO 2007041494.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором абсорбции желчных кислот (см., например, патент США № 6245744, патент США № 6221897 или WO 00/61568), таким как, например, HMR 1741 или теми, которые описаны в DE 102005033099.1 и DE 102005033100.9, WO 2007009655-56.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с полимерным сорбентом желчных кислот, таким как, например, холестирамин или колесевелам.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с индуктором рецептора ЛПНП (см. патент США № 6342512), таким как, например, HMR1171, HMR1586 или теми, которые описаны в WO 2005097738.

В одном варианте изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с усилителем экспрессии ABCA1, как описано, например, в WO 2006072393.

В дополнительном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором PCSK9 (пропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 9), например, Evolocumab, инклизиром или терапевтическим РНКи-агентом, направленным против PCSK9. В дополнительном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с антителом, направленным против PCSK9, например, алирокумабом (Praluent), дозировка которого может составлять 75-150 мг каждые две недели; и эволокумабом (Repatha) в дозе 140 мг каждые две недели или 420 мг ежемесячно.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с Отасог® (омега-3 жирные кислоты; высококонцентрированные этиловые эфиры эйкозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты).

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором АСАТ, таким как, например, авазимиб или SMP-797.

В одном варианте изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с антиоксидантом, таким как, например, OPC-14117, пробукол, токоферол, аскорбиновую кислоту, Р-каротин или селен.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с витамином, таким как, например, витамин В6 или витамин В12.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модулятором липопротеинлипазы, таким как, например, ибролипим (NO-1886).

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором АТФ-цитратлиазы, таким как, например, SB-204990.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором скваленсинтазы, таким как, например, BMS-188494, ТАК-475 или как описано в WO 2005077907, JP 2007022943.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с антагонистом липопротеина(а), таким как, например, гемкабен (С1-1027).

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в

комбинации с агонистом GPR109A (агонистом рецептора NM74A; агонистом NAR (агонистом рецептора никотиновой кислоты), например, никотиновой кислоты или ниацином с пролонгированным высвобождением, в комбинации с МК-0524A или теми соединениями, которые описаны в WO 2006045565, WO 2006045564, WO 2006069242, WO 2006124490, WO 2006113150, WO 2007017261, WO 2007017262, WO 2007017265, WO 2007015744, WO 2007027532.

В другом варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с агонистом GPR116, как описано, например, в WO 2006067531, WO 2006067532.

В одном варианте осуществления изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором липазы, таким как, например, орлистат или цетилистат (ATL-962).

В одном варианте изобретения молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с инсулином.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с сульфонилмочевинной, такой как, например, толбутамид, глибенкламид, глипизид, гликлазид или глимепирид.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с веществом, которое усиливает секрецию инсулина, таким как, например, КСР-265 (WO 2003097064) или веществами, которые описаны в WO 2007026761.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с агонистами глюкозозависимого инсулинотропного рецептора (GDIR), такими как, например, APD-668.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с бигуанидом, таким как, например, метформин.

В еще одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с меглитинидом, таким как, например, репаглинид, натеглинид или митиглинид.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят с комбинацией митиглинида с глитазоном, например гидрохлорид пиоглитазона, или малеат розиглитазона, или комбинации глитазона с глимепиридом или метформинном, или их комбинации.

В другом варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят с комбинацией митиглинида с ингибитором альфа-глюкозидазы.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с тиазолидиндионом, таким как, например, троглитазон, циглитазон, пиоглитазон, розиглитазон или соединениями, раскрытыми в WO 97/41097, Исследовательского фонда доктора Редди, в частности 5-[[4-[(3,4-дигидро-3-метил-4-оксо-2-хиназолинилметокси)фенил]метил]-2,4-тиазолидиндион.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором α -глюкозидазы, таким как, например, миглитол или акарбоза.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с активным ингредиентом, который действует на АТФ-зависимый калиевый канал бета-клеток, таким как, например, толбутамид, глибенкламид, глипизид, глимепирид или репаглинид.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с более чем одним из вышеупомянутых соединений, например, в комбинации с сульфонилмочевинной и метформинном, сульфонилмочевинной и акарбозой, репаглинидом и метформинном, инсулином и сульфонилмочевинной, инсулином и метформинном, инсулином и троглитазоном, инсулином и ловастатином и т.д.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором гликогенфосфорилазы, таким как, например, PSN-357 или FR-258900, или теми, которые описаны в WO 2003084922, WO 2004007455, WO 2005073229-31 или WO 2005067932.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с антагонистами рецептора глюкагона, такими как, например, А-770077, NNC-25-2504 или как описано в WO 2004100875 или WO 2005065680.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с активаторами глюкокиназы, такими как, например, LY-2121260 (WO2004063179), PSN-105, PSN-110, GKA-50 или теми, которые описаны, например в

WO2004072031, WO2004072066, WO2005080360, WO2005044801, WO2006016194,
WO2006058923, WO2006112549, WO2006125972, WO2007017549, WO2007017649,
WO2007007910, WO2007007040-42, WO2007006760-61, WO2007006814, WO2007007886,
WO2007028135, WO2007031739, WO2007041365, WO2007041366, WO2007037534,
WO2007043638, WO2007053345, WO2007051846, WO2007051845, WO2007053765,
WO2007051847.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором глюконеогенеза, таким как, например, FR-225654.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами фруктозо-1,6-бисфосфатазы (ФБФазы), такими как, например, CS-917 (MB-06322) или

MB-07803, или теми, которые описаны в WO 2006023515, WO 2006104030, WO 2007014619.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами переносчика глюкозы 4 (GLUT4), такими как, например, KST-48 (D.-O. Lee et al.: *Arzneim.-Forsch, Drug Res.*, 54 (12), 835 (2004)).

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами глутамин-фруктозо-6-фосфатамидотрансферазы (GFAT), как описано, например, в WO 2004101528.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами дипептидилпептидазы IV (ДПП-4), такими как, например, вилдаглиптин (LAF-237), ситаглиптин (МК-0431), ситаглиптин фосфат, саксаглиптин ((BMS-477118), GSK-823093, PSN-9301, SYR-322, SYR-619, TA-6666, TS-021, GRC-8200, GW-825964X, KRP-104, DP-893, ABT-341, ABT-279 или его другая соль, или с теми соединениями, которые описаны в

WO2003074500, WO2003106456, WO2004037169,
 WO200450658, WO2005058901, WO2005012312, WO2005/012308, WO2006039325,
 WO2006058064, WO2006015691, WO2006015701, WO2006015699, WO2006015700,
 WO2006018117, WO2006099943, WO2006099941, JP2006160733, WO2006071752,
 WO2006065826, WO2006078676, WO2006073167, WO2006068163, WO2006090915,
 WO2006104356, WO2006127530, WO2006111261, WO2007015767, WO2007024993,
 WO2007029086.

В одном из вариантов осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с Janumet™, фиксированной комбинацией ситаглиптина фосфата и метформина гидрохлорида.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 1 (11 β -HSD1), такими как, например, BVT-2733, JNJ-25918646, INCB-13739, или с теми, которые описаны

WO200190090-94, WO200343999, WO2004112782, WO200344000, WO200344009,
 WO2004112779, WO2004113310, WO2004103980, WO2004112784, WO2003065983,
 WO2003104207, WO2003104208, WO2004106294, WO2004011410, WO2004033427,
 WO2004041264, WO2004037251, WO2004056744, WO2004058730, WO2004065351,
 WO2004089367, WO2004089380, WO2004089470-71, WO2004089896, WO2005016877,
 WO2005097759, WO2006010546, WO2006012227, WO2006012173, WO2006017542,
 WO2006034804, WO2006040329, WO2006051662, WO2006048750, WO2006049952,
 WO2006048331, WO2006050908, WO2006024627, WO2006040329, WO2006066109,
 WO2006074244, WO2006078006, WO2006106423, WO2006132436, WO2006134481,
 WO2006134467, WO2006135795, WO2006136502, WO2006138695, WO2006133926,
 WO2007003521, WO2007007688, US2007066584, WO2007047625, WO2007051811,
 WO2007051810.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами протеинтирозинфосфатазы 1B (PTP1B), как описано, например, в WO 200119830-31, WO 200117516, WO 2004506446, WO 2005012295, WO 2005116003, WO 2005116003, WO 2006007959, DE 102004060542.4, WO 2007009911, WO 2007028145, WO 2007081755.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами натрийзависимого переносчика глюкозы 1 или 2 (SGLT1, НЗПГ-2), такими как, например, KGA-2727, T-1095, SGL-0010, AVE 2268, SAR, 7226 и серглифлозин или, как описано, например, в WO2004007517, WO200452903,

WO200452902, PCT/EP2005/005959, WO2005085237, JP2004359630, WO2005121161,
 WO2006018150, WO2006035796, WO2006062224, WO2006058597, WO2006073197,
 WO2006080577, WO2006087997, WO2006108842, WO2007000445, WO2007014895,
 WO2007080170

или A. L. Handlon in *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15(11), 1531-1540.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами GPR40, как описано, например, в WO 2007013689, WO2007033002.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами GPR119b, как описано, например, в WO 2004041274.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащую трипептида вводят в комбинации с модуляторами GPR119, как описано, например, в WO 2005061489 (PSN-632408), WO 2004065380, WO 2007003960-62 и WO 2007003964.

В дополнительном варианте осуществления молекула глицинсодержащего трипептида вводят в

комбинации с модуляторами GPR120.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами гормоночувствительной липазы (HSL) и/или фосфолипаз, как описано, например, в WO 2005073199, WO 2006074957, WO 2006087309, WO 2006111321, WO 2007042178.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC), например, такими как те, которые описаны в WO 199946262, WO 200372197, WO 2003072197, WO 2005044814, WO 2005108370, JP 2006131559, WO 2007011809, WO 2007011811, WO 2007013691.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами ксантиноксидоредуктазы (XOR).

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK), например, такими как те, которые описаны в WO 2004074288.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором киназы гликогенсинтазы 3 бета (GSK-3 бета), как описано, например, в

US2005222220, WO2005085230, WO2005111018, WO2003078403,
WO2004022544, WO2003106410, WO2005058908, US2005038023, WO2005009997,
US2005026984, WO2005000836, WO2004106343, EP1460075, WO2004014910,
WO2003076442, WO2005087727 или WO2004046117.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором сывороточной/глюкокортикоид-регулируемой киназы (SGK), как описано, например, в WO 2006072354.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с агонистом рецептора RUP3, как описано, например, в WO 2007035355.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибитором протеинкиназы С бета (PKC-бета), таким как, например, рубоксистаурин.

В другом варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводится в комбинации с активатором гена, который кодирует мутированную при атаксии-телеангиоэктазии (АТМ) протеинкиназу, такую как, например, хлорохин.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с антагонистом рецептора эндотелина типа А, таким как, например, авозентан (SPP-301).

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с ингибиторами "IкВ-киназы" (ингибиторами ИКК), как описано, например, в WO 2001000610, WO 2001030774, WO 2004022553 или WO 2005097129.

В одном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами глюкокортикоидного рецептора (GR), как описано, например, в WO 2005090336, WO 2006071609, WO 2006135826.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модуляторами CART (см. "Cocaine-amphetamine-regulated transcript influences energy metabolism, anxiety and gastric emptying in mice", Asakawa, A. et al.: *Hormone and Metabolic Research* (2001), 33(9), 554-558);

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с антагонистом NPY, таким как, например, {4-[(4-аминохиназолин-2-иламино)метил]циклогексилметил}амид гидрохлорид нафталин-1-сульфоновой кислоты (CGP 71683A); антагонисты рецептора NPY-5, такие как L-152804 или описанные, например, в WO 2006001318; антагонисты рецептора NPY-4, например, описанные в WO 2007038942; антагонисты рецептора NPY-2, например, описанные в WO 2007038943; пептид YY 3-36 (PYY3-36) или аналогичные соединения, такие как, например, CJC-1682 (PYY3-36, конъюгированный с сывороточным альбумином человека через Cys34), CJC-1643 (производное PYY3-36, которое конъюгируется in vivo с сывороточным альбумином) или те, которые описаны в WO 2005080424, WO 2006095166; производные пептида обестатина, как описано в WO 2006096847; CB1R (каннабиноидный рецептор 1) антагонисты (такие как, например, римонабант, SR147778, SLV-319, AVE-1625, MK-0364 или их соли или те соединения, которые описаны, например, в

EP 0656354,
 WO00/15609, WO2001/64632-64634, WO 02/076949, WO2005080345, WO2005080328,
 WO2005080343, WO2005075450, WO2005080357, WO200170700, WO2003026647-48,
 WO200302776, WO2003040107, WO2003007887, WO2003027069, патент США № 6509367,
 WO200132663, WO2003086288, WO2003087037, WO2004048317, WO2004058145,
 WO2003084930, WO2003084943, WO2004058744, WO2004013120, WO2004029204,
 WO2004035566, WO2004058249, WO2004058255, WO2004058727, WO2004069838,
 US20040214837, US20040214855, US20040214856, WO2004096209, WO2004096763,
 WO2004096794, WO2005000809, WO2004099157, US20040266845, WO2004110453,
 WO2004108728, WO2004000817, WO2005000820, US20050009870, WO200500974,
 WO2004111033-34, WO200411038-39, WO2005016286, WO2005007111, WO2005007628,
 US20050054679, WO2005027837, WO2005028456, WO2005063761-62, WO2005061509,
 WO2005077897, WO2006047516, WO2006060461, WO2006067428, WO2006067443,
 WO2006087480, WO2006087476, WO2006100208, WO2006106054, WO2006111849,
 WO2006113704, WO2007009705, WO2007017124, WO2007017126, WO2007018459,
 WO2007016460, WO2007020502, WO2007026215, WO2007028849, WO2007031720,
 WO2007031721, WO2007036945, WO2007038045, WO2007039740, US20070015810,
 WO2007046548, WO2007047737, WO2007084319, WO2007084450);

Каннабиноидный рецептор 1/каннабиноидный рецептор 2 (CB1/CB2) модулирующие соединения, как описано, например, в WO 2007001939, WO 2007044215, WO 2007047737; агонисты MC4 (например, [2-(3а-бензил-2-метил-3-оксо-2,3,3а,4,6,7-гексагидропиразоло[4,3-с]пиридин-5-ил)-1-(4-хлорфенил)-2-оксоэтил]амид 1-амино-1,2,3,4-тетрагидронафталин-2-карбоновой кислоты; (WO 01/91752)) или LB53280, LB53279, LB53278 или THIQ, MB243, RY764, CHIR-785, PT-141 или те, которые описаны в WO2005060985, WO2005009950,

WO2004087159, WO2004078717, WO2004078716, WO2004024720, US20050124652,
 WO2005051391, WO2004112793, WOUS20050222014, US20050176728, US20050164914,
 US20050124636, US20050130988, US20040167201, WO2004005324, WO2004037797,
 WO2005042516, WO2005040109, WO2005030797, US20040224901, WO200501921,
 WO200509184, WO2005000339, EP1460069, WO2005047253, WO2005047251,
 WO2005118573, EP1538159, WO2004072076, WO2004072077, WO2006021655-57,
 WO2007009894, WO2007015162, WO2007041061, WO2007041052;

антагонисты рецепторов орексина (например, гидрохлорид 1-(2-метилбензоксазол-6-ил)-3-[1,5]нафтиридин-4-илмочевины (SB-334867-A) или те, которые описаны, например, в WO 200196302, WO 200185693, WO 2004085403, WO 2005075458 или WO 2006067224); агонисты гистаминовых H3-рецепторов (например, соль шавелевой кислоты 3-циклогексил-1-(4,4-диметил-1,4,6,7-тетрагидроимидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)-пропан-1-она (WO 00/63208) или те, которые описаны в WO 200064884, WO 2005082893, WO 2006107661, WO 2007003804, WO 2007016496, WO 2007020213); модуляторы гистамина H1/гистамина H3, такие как, например, бетагистин и его дигидрохлорид; антагонисты CRF (например, [2-метил-9-(2,4,6-триметилфенил)-9H-1,3,9-триазафлуорен-4-ил]дипропиламин (WO 00/66585)); антагонисты CRF ВР (например, урокортин); агонисты урокортина; агонисты бета-3-адренорецепторов, такие как, например, 1-(4-хлор-3-метансульфонилметилфенил)-2-[2-(2,3-диметил-1Н-индол-6-илокси)этиламино]этанол гидрохлорид (WO 01/83451); или Solabegron (GW-427353), или N-5984 (KRP-204), или те, которые описаны в JP 2006111553, WO 2002038543, WO 2007048840-843; агонисты MSH (меланоцит-концентрирующего гормона); антагонисты рецептора MCH (меланин-концентрирующего гормона) (такие как, например, NBI-845, A-761, A-665798, A-798, ATC-0175, T-226296, T-71, GW-803430 или соединения, такие как те, которые описаны в

WO2005085200, WO2005019240,
 WO2004011438, WO2004012648, WO2003015769, WO2004072025, WO2005070898,
 WO2005070925, WO2004039780, WO2004092181, WO2003033476, WO2002006245,
 WO2002089729, WO2002002744, WO2003004027, FR2868780, WO2006010446,
 WO2006038680, WO2006044293, WO2006044174, JP2006176443, WO2006018280,
 WO2006018279, WO2006118320, WO2006130075, WO2007018248, WO2007012661,
 WO2007029847, WO2007024004, WO2007039462, WO2007042660, WO2007042668,
 WO2007042669, US2007093508, US2007093509, WO2007048802, JP2007091649);

агонисты ССК-А (такие как, например, трифторацетат {2-[4-(4-хлор-2,5-диметоксифенил)-5-(2-

циклогексилэтил]тиазол-2-илкарбамоил]-5,7-диметилиндол-1-ил}уксусной кислоты (WO 99/15525), SR-146131 (WO 0244150) или SSR-125180, или те, которые описаны в WO2005116034); смешанные сертонинергические и норадренергические соединения (например, WO 00/71549); агонисты 5-HT-рецепторов, например, 1-(3-этилбензофуран-7-ил)пиперазин оксалат (WO 01/09111); смешанные ингибиторы обратного захвата дофамина/норэпинефрина/ацетилхолина (например, тезофенсин); агонисты 5-HT_{2C}-рецептора (такие как, например, лорказерин гидрохлорид (APD-356), BVT-933 или те, которые описаны в WO 200077010, WO 20077001-02, WO 2005019180, WO 2003064423, WO 200242304, WO 2005035533, WO 2005082859, WO 2006077025, WO 2006103511); антагонисты 5-HT₆-рецептора, такие как, например, E-6837 или BVT-74316, или те, которые описаны, например, в WO 2005058858, WO 2007054257; агонисты рецептора бомбезина (агонисты BRS-3); антагонисты рецепторов галанина; гормон роста (например, гормон роста человека или AOD-9604); соединения, высвобождающие гормон роста (трет-бутил 6-бензилокси-1-2-диизопропиламиноэтилкарбамоил)-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-карбоксилат (WO 01/85695)); антагонисты рецепторов, усиливающие секрецию гормона роста (антагонисты грелина), такие как, например, A-778193, или те, которые описаны в WO 2005030734; агонисты TRH (см., например, EP 0462884); модуляторы разобщающих белков 2 или 3; агонисты лептина (см., например, Lee, Daniel W.; Leinung, Matthew C; Rozhayskaya-Arena, Marina; Grasso, Patricia. Агонисты лептина как потенциальный подход к лечению ожирения. *Drugs of the Future* (2001), 26(9), 873-881); агонисты дофаминовых рецепторов (бромокриптин или допрексин); ингибиторы липазы/амилазы (например, WO 00/40569); ингибиторы диацилглицерин-О-ацилтрансфераз (DGAT), такие как, например, BAY-74-4113 или описанные, например, в US 2004/0224997, WO 2004094618, WO 200058491, WO 2005044250, WO 2005072740, JP 2005206492, WO 2005013907, WO 2006004200, WO 2006019020, WO 2006064189, WO 2006082952, WO 2006120125, WO 2006113919, WO 2006134317, WO 2007016538; ингибиторы синтазы жирных кислот (FAS), такие как, например, C75 или ингибиторы, описанные в WO 2004005277; ингибиторы стеароил-КоА дельта-9-десатуразы (SCD1), описанные, например, в WO 2007009236, WO 2007044085, WO 2007046867, WO 2007046868, WO 20070501124; оксинтомодулин; агонисты или частичные агонисты рецепторов олеонилэстрола или гормона щитовидной железы, такие как, например: KB-2115 или те, которые описаны в WO 20058279, WO 200172692, WO 200194293, WO 2003084915, WO 2004018421, WO 2005092316, WO 2007003419, WO 2007009913, WO 2007039125.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с варениклином тартрата, частичным агонистом альфа-4-бета 2-никотинового ацетилхолинового рецептора.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с тродусквеминном.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с модулятором фермента SIRT1.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с дексамфетаминном или амфетаминном.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с фенфлураминном или дексфенфлураминном.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с сибутраминном.

В дополнительном варианте осуществления молекулу глицинсодержащего трипептида вводят в комбинации с мазиндолом или фентермином.

Альтернативно лечение полипептидом молекулы глицинсодержащей трипептида предшествует или следует за лечением вторичным агентом с интервалами от минут до недель. В вариантах осуществления, где второй терапевтический агент и молекулу глицинсодержащего трипептида вводят по отдельности, как правило, можно было бы гарантировать, что между моментами каждой доставки не проходит значительный период времени, так что второй агент и глицинсодержащая молекула трипептида все еще будут способны оказывать предпочтительный комбинированный эффект. В таких случаях предполагается, что применение обоих способов лечения в пределах около 12-24 ч друг от друга и, в одном аспекте, в пределах около 6-12 ч друг от друга, причем наиболее предпочтительным является время задержки всего около 12 ч. В некоторых ситуациях желательно значительно продлить период лечения, однако, когда промежуток между соответствующими введениями составляет от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

В некоторых вариантах осуществления способы лечения метаболического заболевания, например, жировой болезни печени, могут включать введение молекулы глицинсодержащего трипептида и второго терапевтического агента, например, ингибитора ацетил-КоА-карбоксилазы, ингибитора АпоС-III, ингибитора АТФ-цитратлиазы, рыбьего жира, отпускаемого по рецепту, или ингибитора СЕТР.

Системная доставка конструкций или пептидов для экспрессии молекул глицинсодержащего трипептида пациентам является очень эффективным способом доставки терапевтически эффективной композиции для противодействия непосредственным клиническим проявлениям заболевания. Альтернативно при определенных обстоятельствах подходит местная доставка молекулы глицинсодержащего три-

пептида и/или второго терапевтического агента.

Изобретение также относится к способам введения композиций по изобретению млекопитающему. В одном аспекте млекопитающее представляет собой человека. Эффективное количество композиции, применяемое в терапевтических целях, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалист в данной области техники поймет, что подходящие уровни доз для лечения, таким образом, будут варьироваться в зависимости, частично, от доставляемой молекулы, показания, для которого композиция используется, способа введения и размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. Соответственно клиницист может титровать дозу и изменять способ введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

В одном аспекте схема доставки композиции, содержащей глицинсодержащую молекулу трипептида или ее фармацевтически приемлемую соль, млекопитающему будет содержать введение от 5 до 2000 мг/кг, или от 30 до 1500 мг/кг, или от 40 до 1250 мг/кг, или от 50 до 1000 мг/кг, или от 60 до 5000 мг/кг, вводимых в суточных дозах или в эквивалентных дозах или в эквивалентных дозах с более длинными или более короткими интервалами, например, через сутки, два раза в неделю, еженедельно, ежемесячно, раз в полгода или даже два или три раза в сутки. Введение может быть пероральным, внутривенным, подкожным, интраназальным, ингаляционным, трансдермальным, трансмукозальным или любым другим путем, обсуждаемым в данном изобретении.

В дополнительном аспекте молекулу глицинсодержащего трипептида вводят при помощи подкожной инъекции в дозах, указанных в данном документе. Однако молекулу глицинсодержащего трипептида можно вводить любым из способов, обсуждаемых в данном изобретении и известных в данной области, техники В дополнительном аспекте инъекции в одно место имеют максимально допустимый объем 2,0 мл. Предполагается, что молекула глицинсодержащего трипептида может быть введена в несколько участков или в большей дозе, если требуется более высокая концентрация молекулы глицинсодержащего трипептида. В другом аспекте молекулу глицинсодержащего трипептида вводят приблизительно в одно и то же время каждый день. Однако в изобретение включены альтернативные сроки доставки.

Фармацевтические композиции также можно выбирать для парентеральной доставки. Альтернативно композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для ингаляции. Например, композиция молекулы глицинсодержащего трипептида может быть составлена в виде сухого порошка для ингаляции. Растворы фармацевтических композиций для ингаляции также могут быть составлены с пропеллентом для доставки аэрозоля. В еще одном варианте осуществления растворы можно распылять. Легочное введение дополнительно описано в заявке РСТ № РСТ/US94/001875, которая описывает легочную доставку химически модифицированных белков.

Также предполагается, что определенные составы можно вводить перорально. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции молекул глицинсодержащего трипептида, которые вводят таким образом, могут быть составлены с носителями или без них, обычно используемыми при приготовлении твердых дозированных форм, таких как таблетки и капсулы. Например, капсула может быть разработана для высвобождения активной части состава в той точке желудочно-кишечного тракта, когда биодоступность максимальна, а предсистемная деградация сведена к минимуму. Для облегчения абсорбции композиции могут быть включены дополнительные агенты. Также могут быть использованы разбавители, ароматизаторы, воски с низкой температурой плавления, растительные масла, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, разрыхлители таблеток и связывающие вещества.

Другая композиция молекул глицинсодержащего трипептида может содержать эффективное количество молекулы глицинсодержащего трипептида в смеси с нетоксичными эксципиентами, которые подходят для производства таблеток. Растворяя таблетки в стерильной воде или другом подходящем носителе, можно приготовить растворы в единичной лекарственной форме. Подходящие эксципиенты включают, но не ограничиваются ими, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактозу или фосфат кальция; или связывающие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик; или смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные композиции молекул глицинсодержащего трипептида будут очевидны специалистам в данной области техники, включая композиции, содержащие композиции в составах с замедленной или контролируемой доставкой. Специалистам в данной области техники также известны методики составления множества других средств для замедленной или контролируемой доставки, таких как липосомы или мицеллярные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции.

Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров композиции молекул глицинсодержащего трипептида в используемом составе. Как правило, клиницист будет вводить композицию до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, обеспечивающая желаемый эффект. Таким образом, композицию можно вводить в виде однократной дозы или двух или более доз (которые могут содержать или могут не содержать одинаковое количество желаемой молекулы) с течением времени или в виде непрерывной инфузии через устройство для имплантации или катетер. Дальнейшее уточнение под-

ходящей дозировки, как правило, осуществляется специалистами в данной области техники и находится в пределах задач, которые они обычно выполняют. Соответствующие дозировки могут быть установлены путем применения соответствующих данных о зависимости между дозой и эффектом.

В дополнение к способам введения, описанным в данном изобретении, композиции по изобретению можно вводить для лечения млекопитающему любым способом, таким как, но не ограничиваясь, внутривенный, внутрибрюшинный, интрацеребральный (внутрипаренхимальный), интрацеребровентрикулярный, внутримышечный, внутриглазный, внутриартериальный, интрапортальный, внутриочаговый, внутрисуставной, внутриопухолевый, цереброспинальный, интраректальный и в толстую кишку, местный, субконъюнктивальный, внутрипузырный, интравагинальный, эпидуральный, внутриреберный, внутрикожный, ингаляционный, трансдермальный, транссерозный, внутрибуккальный, пероральный, интраназальный, растворение во рту или других полостях тела закапывание в дыхательные пути, инсуффляция через дыхательные пути, инъекция в сосуды, опухоли, орган и т.п., а также инъекция или депонирование в полости тела млекопитающего.

Альтернативно или дополнительно композицию можно вводить местно посредством имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором желаемая молекула была абсорбирована или инкапсулирована. Если используется имплантационное устройство, оно может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, а доставка желаемой молекулы может осуществляться посредством диффузии, болюса, введенного с определенным временным интервалом, или непрерывного введения.

В некоторых случаях может быть желательно использовать композиции *ex vivo*. В таких случаях клетки, ткани или органы, которые были удалены у пациента, подвергаются воздействию композиций, после чего клетки, ткани и/или органы впоследствии имплантируются обратно пациенту.

Введение композиций по изобретению может осуществляться с использованием любого из нескольких стандартных способов, включая, например, непрерывную инфузию, болюсную инъекцию, прерывающуюся инфузию, ингаляцию или комбинации этих способов. Например, один из способов введения, который можно использовать, включает непрерывную внутривенную инфузию. При таком подходе скорость инфузии композиций по изобретению может составлять, например, 0,001-0,5 мг/кг массы тела/ч, более предпочтительно 0,01-0,2 мг/кг/ч и наиболее предпочтительно 0,03-0,1 мг/кг/ч, при этом лекарство вводят в течение, например, 1-100, 10-100 или около 12, 24, 48, 72, 84 или 96 ч. При желании инфузии композиций по изобретению может предшествовать болюсная инъекция. Такую болюсную инъекцию проводят в дозировке от около 0,001 до около 10 мг/кг. Возможны изменения в дозе и во времени инфузии композиций по изобретению, которые также включены в изобретение.

Однократная болюсная инъекция может быть сделана путем внутривенной инфузии, например, через центральную линию доступа или периферическую венозную линию, или путем прямой инъекции с использованием шприца. Такое введение может быть желательным, если пациент подвергается лишь краткосрочному риску воздействия эндотоксина и, следовательно, не нуждается в продолжительном применении лекарственного средства. Например, этот способ введения может быть желательным для пациентов, нуждающихся в хирургической помощи, если это целесообразно, таких как пациенты, которые перенесли операцию на сердце, например, операцию по шунтированию коронарной артерии и/или операцию по замене клапана. У таких пациентов инфузия однократного болюса лекарственного средства может быть введена в течение 4 ч до и/или во время операции. (Обратите внимание, что количество вводимого лекарственного средства зависит от массы и состояния пациента и определяется квалифицированным практикующим врачом.) Могут использоваться более короткие или более длительные периоды введения, как это определено специалистом в данной области техники.

В случаях когда желательна более длительная доставка молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли по изобретению, можно проводить периодическое введение. В этих способах вводят ударную дозу, за которой следует или

(i) вторая ударная доза и поддерживающая доза (или дозы); либо

(ii) поддерживающая доза или дозы без второй ударной дозы, как это определено специалистом в данной области техники.

Для достижения дополнительной доставки молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли пациенту можно вводить поддерживающую дозу (или дозы) соединения, так что уровни соединения поддерживаются в крови пациента. Поддерживающие дозы можно вводить на уровнях, которые меньше ударных(ой) доз(ы), например, на уровне, который составляет примерно 1/6 ударной дозы. Конкретные количества, которые следует вводить в поддерживающих дозах, может определить медицинский работник с целью, по меньшей мере, поддержания уровня соединения. Поддерживающие дозы можно вводить, например, в течение около 2 ч каждые 12 ч, начиная с 24 ч и продолжая, например, в 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 и 120 ч. Конечно, поддерживающие дозы можно прекратить в любой момент в течение этого периода времени, если это необходимо медицинским работником.

Описанные выше способы инфузии можно проводить с использованием катетеров (например, катетеров для периферических вен, центральных вен или легочных артерий) и связанных с ними изделий (например, инфузионных насосов и трубок), которые широко доступны в данной области техники. Од-

ним из критериев, который важно учитывать при выборе катетера и/или трубки для применения в этих способах, является влияние материала этих изделий (или покрытий на этих изделиях) на объем лекарственного средства.

Дополнительные связанные с катетером изделий, которые можно использовать в способах по изобретению, можно идентифицировать, определяя, изменяет ли материал изделий объем соединения в условиях, согласующихся с теми, которые используются при введении лекарственного средства. Кроме того, в случае, если у пациента уже установлен катетер, который не поддерживает оптимальный объем лекарственного средства, можно использовать катетер-вставку, которая изготовлена из совместимого материала (например, полиамидного полимера) или включает совместимое покрытие, чтобы раствор препарата не контактировал с поверхностью несовместимого катетера. Такая вставка, имеющая внешний диаметр, достаточно малый, чтобы ее можно было легко вставить в существующий катетер, при сохранении внутреннего диаметра, достаточно большого для размещения потока раствора соединения, помещается в существующий катетер и соединяется с трубкой или шприцем, через который доставляется лекарственное средство.

Соответствующая частота введения может быть определена специалистом в данной области техники, и его можно вводить от одного до нескольких раз в сутки. Композиции по изобретению также можно вводить один раз в сутки или один раз через сутки. В случае однократного введения, лечение, как правило, проводят в течение нескольких часов или суток, тогда как длительное лечение можно проводить в течение недель, месяцев или даже лет.

Как при длительном, так и при однократном применении можно использовать стандартные составы для введения в портальную систему печени, которые могут быть приготовлены из составов, описанных в другом месте в данном изобретении. Введение этим путем дает несколько преимуществ, например, быстрое начало действия путем введения молекулы глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемой соли в желаемый участок действия в более высоких локальных концентрациях. Чтобы терапевтический компонент оказывал желаемый эффект, он должен находиться в физическом контакте со своей физиологической мишенью, такой как рецептор, который присутствует на клетках печени. Сайт-специфическая доставка лекарственных средств гарантирует, что такие взаимодействия происходят только в желаемой анатомической области печени; следовательно, она должна соответствовать следующим критериям:

- (i) она должна быть способна преодолевать анатомические барьеры, такие как барьеры желудка и кишечника;
- (ii) должна избирательно распознаваться рецептором, присутствующим на клетке печени, таким как асиалогликопротеин;
- (iii) экзогенно доставляемый лиганд для нацеливания должен конкурировать с эндогенно продуцируемым лигандом;
- (iv) изготовленная система доставки должна быть нетоксичной, биосовместимой, биоразлагаемой и физико-химически стабильной в клетках печени *in vivo* или *in vitro*;
- (v) она должна иметь равномерное синусоидальное капиллярное распределение;
- (vi) должна иметь контролируемую и предсказуемую скорость высвобождения лекарственного средства, чтобы только терапевтическое количество молекулы глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой соли высвобождалось в клетки печени;
- (vii) высвобождение лекарственного средства не должно влиять на распространение лекарственного средства;
- (viii) она должна демонстрировать минимальную потерю лекарственного средства во время прохождения через желудок, кишечник и другие части тела;
- (ix) носитель, используемый для инкапсуляции молекул глицинового трипептида, должен быть выведен из организма без каких-либо признаков токсичности, и ни один носитель не должен вызывать модуляцию болезненного состояния; и наконец
- (x) получение системы доставки для молекулы глицинового трипептида или его фармацевтически приемлемой соли должно быть простой или достаточно простой, воспроизводимой и рентабельной.

Молекула глицинового трипептида или ее фармацевтически приемлемая соль может вводиться в виде части системы доставки лекарственного средства, нацеленной на доставку в ткани печени. Различные способы связывания молекулы глицинсодержащего трипептида с нацеливающим фрагментом, специфичным для печени, могут включать

- (a) сочетание нацеливающих фрагментов на предварительно составленных наноносителях;
- (b) сочетание нацеливающих фрагментов постинсерционным методом;
- (c) сочетание нацеливающих фрагментов комплексом авидин/биотин;
- (d) сочетание нацеливающих фрагментов перед составлением наноносителей.

Примеры нацеливающих фрагментов и носителей, применимых для доставки композиций по настоящему изобретению к конкретным клеткам печени, описаны в Nidhi Mishra et al. (2013), "Efficient Hepatic Delivery of Drugs: Novel Strategies and Their Significance", BioMed Research International, BioMed Research International, vol. 2013, описание которой полностью включено в данный документ посредством

ссылки.

Хотя определенные молекулы глициновых трипептидов и их фармацевтически приемлемые соли, композиции и способы, описанные в данном изобретении, были описаны со специфичностью в соответствии с определенными вариантами осуществления, следующие примеры служат только для иллюстрации описанных в данном изобретении соединений и не предназначены для их ограничения. Каждая из ссылок, приведенных в настоящей заявке, полностью включена в данное изобретение посредством ссылки.

Примеры

Способы.

Процедуры с животными.

Все процедуры с животными были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Мичиганского университета (PRO00008239) и выполнялись в соответствии с установленными правилами. Восеминедельные дефицитные по аполиipoproteину E самцы мышей (ApoE^{-/-}) (B6.129P2-Apoetm1Unc/J, кат. № 002052) были получены от Jackson Laboratories. Мышей кормили западной диетой (ЗД, 42% калорий из жира и 0,2% холестерина по массе, Envigo TD.88137). После одной недели кормления ЗД из лицевой вены тщательно собирали кровь для определения исходного уровня общего холестерина (ОХ) в плазме. Затем мышей держали на западной диете и случайным образом разделяли на 5 экспериментальных групп и вводили следующие средства для лечения через желудочный зонд, 6 раз в неделю в течение периода 12 недель:

- 1) ЗД+H₂O (получали воду в качестве контроля носителем);
- 2) ЗД+Gly (0,67 мг/г глицина);
- 3) ЗД+Leu (0,33 мг/г лейцина);
- 4) ЗД+DT-109 (1 мг/г DT-109=Gly-Gly-Leu);
- 5) ЗД+DT-110 (1 мг/г DT-110=Gly-Gly-dLeu).

Всех мышей содержали при 12-часовом цикле свет/темнота и неограниченный доступ к пище и воде. Массу тела и потребление пищи измеряли каждые одну и три недели соответственно, ПГТТ и уровень глюкозы в крови не натощак на 10-й неделе после ночного голодания проводили пероральные тесты на толерантность к глюкозе (ПГТТ) путем введения 2 мг/г глюкозы через желудочный зонд. Для оценки кратковременных эффектов лечения к раствору глюкозы добавляли глицин (0,67 мг/г), лейцин (0,33 мг/г), DT-109 или DT-110 (1 мг/г) и вводили через желудочный зонд. Чтобы оценить длительные эффекты лечения, мышам вводили только глюкозу. Исходные уровни глюкозы измеряли после сбора крови с кончика хвоста с помощью глюкометра и тест-полосок (NDC: 0193-7308-50, Contour Next). Затем мышам вводили глюкозу с (кратковременным) или без (длительного) лечения, и уровни глюкозы в крови измеряли каждые 30 мин в течение максимум 120 мин. Чтобы оценить влияние лечения на уровни глюкозы не натощак, кровь собирали с кончика хвоста перед рутинным введением средств для лечения через желудочный зонд (перед введением через желудочный зонд) и через 30 мин после него (после введения через желудочный зонд). Уровни глюкозы определяли с помощью глюкометра и тест-полосок (NDC: 0193-7308-50, Contour Next).

Плазменные липиды, адипокины и цитокины.

Уровни ОХ, триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в плазме измеряли с помощью химического анализатора Cobas Mira (Roche Diagnostics) в химической лаборатории Мичиганского исследовательского центра диабета (MDRC) с использованием предоставленных производителем реагентов и протоколов. Уровни в плазме молекул глицинового трипептида, резистина, интерлейкина-6 (ИЛ-6) и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP1) измеряли с помощью химического анализатора Luminex 200 (Luminex Corporation) в химической лаборатории MDRC с использованием предоставленных производителем реактивов и протоколов для анализа (Millipore Multiplex, MMHMAG-44K).

Гистологические анализы.

Гистологическую обработку проводили в лаборатории гистологии Центра животных *in vivo* (IVAC-англ.: *in vivo* Animal Core) в Отделении медицины лабораторных животных (ULAM) Мичиганского университета. Ткани, фиксированные формалином, обрабатывали спиртами и очищали ксилолом с последующей фильтрацией расплавленным парафином с использованием автоматического гистопроцессора VIP5 или VIP6 (TissueTek, Sakura-Americas). После заливки парафином с использованием станции Histostar Embedding Station (ThermoFisher Scientific) из тканей на ротационном микротоме M 355S (ThermoFisher Scientific) делали срезы толщиной 4 мкм и помещали на стеклянные предметные стекла. После депарафинизации и гидратации ксилолом и градуированными спиртами препараты окрашивали гематоксилином и эозином (H&E), используя гематоксилин Харриса (ThermoFisher Scientific, кат. № 842), дифференцированный с помощью осветлителя (ThermoFisher Scientific, кат. № 7401), окрашенного реагентом Bluing (ThermoFisher Scientific, кат. № 7301), окрашенные спиртовым раствором эозином Y (ThermoFisher Scientific, кат. № 832), затем обезвоженные и очищенные с помощью градуированных спиртов и ксилола и заключенные под покровное стекло MicroMount (Leica, кат. № 3801731) с использованием автоматической программируемой станции для заключения препаратов под покровное стекло Leica CV5030. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на приборе для автоматического иммуноги-

стохимического окрашивания IntelliPATH FLX (Biocare Medical, кат. № IPS0001US) и включали блокирование эндогенных пероксидаз и неспецифичное связывание, обнаружение с использованием коммерческой полимерной системы, которая не содержит биотин и пероксидазу хрена, для детекции, проявление хромогеном диаминобензидином, и контрокрашивание ядер осуществляли при помощи гематоксилина. Специфичное для F4/80 (Bio-Rad ABD Serotec, кат. № MCA497) крысиное моноклональное первичное антитело (клон С1: А3-1) разбавляли до 1:400 в разбавителе DaVinci Diluent (Biocare Medical, кат. № PD900) и инкубировали в течение 60 мин с последующим детектированием с использованием Rat-on-Mouse HRP-Polymer (Biocare Medical, кат. № RT517), 2-этапная инкубация зонд-полимер в течение 10 и 30 мин соответственно.

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР).

Общую РНК из образцов печени или жировой ткани экстрагировали с использованием наборов QIAGEN RNeasy (QIAGEN). РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью Superscript III и случайных праймеров (Invitrogen). Конкретные уровни транскриптов оценивали с помощью системы ПНР в реальном времени (Bio-Rad) с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) и метода расчета значений пороговых циклов $\Delta\Delta C_t$. Уровни экспрессии генов нормализовали по глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH). Пары праймеров, используемые для количественной ПЦР, были получены от Integrated DNA Technologies и перечислены ниже.

Ген	Прямой праймер	SEQ ID NO	Обратный праймер	SEQ ID NO
GLUT1	ACCTGCAGGAGATGAAAGA AGAG	3	CTCGAAGATGCTCGTTGAG TAGT	4
GLUT2	ATCCTACTTGGCCTATCTGC TGT	5	GGTGACATCCTCAGTTCCTC TTA	6
GLUT4	ACTAGCTGAGCTGAAGGAT GAGA	7	ACTCGAAGATGCTGGTTGA ATAG	8
G6pc	CCTCCGGAAGTATTGTCTCA TC	9	GTAGTGTCAAGGTGGACCC ATT	10
PCK1	ATATGGTGGGAACCTCACTAC TCG	11	AAGTTAGTCTCCACAGG CACT	12
FBP1	TGCCATCAATGAGTATCTCC AG	13	ACATAAGCTATGGGGTTGC ACT	14
АМФК $\alpha 1$	GTCAAAGCCGACCCAATGAT A	15	CGTACACGCAAATAATAGG GGTT	16
РАПП- γ	GGAAGACCACTCGCATTCCT T	17	GTAATCAGCAACCATTGGG TCA	18
РАПП- α	AACATCGAGTGTCTCGAATATG TGG	19	CCGAATAGTTCGCCGAAAG AA	20
PGC1 α	ATCACGTTCAAGGTCACCT AC	21	TTCTGCTTCTGCCTCTCTCT CT	22
PGC1 β	GTACAGCTCATTCGCTACAT GC	23	GGCCAGAAGTTCCTTAGG ATA	24
CD36	TGCTGGAGCTGTTATTGGTG	25	TGGGTTTTGCACATCAAAG A	26
PNPLA 2	TCCGTGGCTGTCTACTAAAG A	27	TGGGATATGATGACGTTCT CTCC	28

PNPLA 3	CCATTAAAGAAACCGGTAG CAG	29	TGCTAGGGAGAGAAAGAAG GAA	30
CPT1a	AGATCAATCGGACCCTAGAC AC	31	CAGCGAGTAGCGCATAGTC A	32
CPT2	CCTGCTCGCTCAGGATAAAC A	33	GTGTCTTCAGAAACCGCAC TG	34
CACT	CAACCACCAAGTTTGTCTGG A	35	CCCTCTCTCATAAGAGTCTT CCG	36
ACADs	AGTGGTGCAGGCTTGGATTA C	37	ACTGAGGGCAAAACAGCCG	38
ACAD m	AGGGTTTAGTTTGTGAGTTGA CGG	39	CCCCGCTTTTGTATATTCC G	40
ACADI	TGCCCTATATTGCGAATTAC GG	41	CTATGGCACCGATACACTT GC	42
ACOX1	CCGCCACCTTCAATCCAGAG	43	CAAGTTCTCGATTCTCGAC GG	44
UCP2	ATGGTTGGTTTCAAGGCCAC A	45	TTGGCGGTATCCAGAGGGA A	46
LXR α	TGCCATCAGCATCTTCTCTG	47	GGCTCACCAGCTTCATTAG C	48
LXR β	CGCTACAACCACGAGACAG A	49	TGTTGATGGCGATAAGCAA G	50
SREBP 2	TGGGAGAGTTCCTGATTG	51	GATAATGGGACCTGGCTGA A	52
HMGCS	TTTGATGCAGCTGTTTGAGG	53	CCACCTGTAGGTCTGGCATT	54
Рецептор ЛПНП	TCCTGGAGATGTGATGGACA	55	GAGCCATCTAGGCAATCTC G	56

CYP7a1	CTAAAAGCCCAGCTACAGG AAA	57	GCTCTTTGAAAGGTGGTAC AGG	58
ABCG5	CGTCCAGAACAACACGCTA A	59	GCAGCATCTGCCACTTATG A	60
ABCG8	AAGACGGGCTGTACACTGCT	61	AGGAGGACATGTGGAAGGT G	62
ФНО- α	CTGTGAAGGGAATGGGTGTT	63	GGTCACTGTCCCAGCATCTT	64
ИЛ-6	TAGTCCTTCTACCCCAATT TCC	65	TTGGTCCTTAGCCACTCCTT C	66
MCP1	TTAAAAACCTGGATCGGAAC CAA	67	GCATTAGCTTCAGATTTACG GGT	68
ИЛ-10	CCTGGGTGAGAAGCTGAAG A	69	ACTCTTCACCTGCTCCACTG	70
GAPDH	CTGCGACTTCAACAGCAACT	71	GAGTTGGGATAGGGCCTCT C	72

Экстракция липидов из печени.

У умерщвленных мышей быстро извлекали печень и хранили при -80°C . Замороженные образцы печени (приблизительно 100 мг) гомогенизировали в PBS и центрифугировали (14000 об/мин, 20 мин). Супернатанты собирали и анализировали на содержание белка с помощью анализа по Брэдфорду Bio-Rad. Для оценки липидного состава печени липиды экстрагировали из супернатантов с использованием гексана ($\geq 99\%$, 32293, Sigma-Aldrich) и изопропанола ($\geq 99,5\%$, A426-4, Fisher Scientific) в соотношении 3:2 (об:об), а гексановую фазу оставляли упариваться на 48 ч. Количество ТГ или ОХ в печени определяли спектрофотометрическим методом с использованием имеющихся в продаже наборов (Wako Chemicals). Данные были нормализованы по уровням белка и представлены как мкг ТГ или ОХ/мг белка.

Экстракция белка из печени и вестерн-блоттинг.

Тканевые экстракты получали с использованием буфера для лизиса для анализа методом радиоиммунопреципитации (буфер RIPA, Thermo Scientific) с добавлением коктейля ингибиторов протеазы (Roche Applied Science). Белки разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad). Мембраны блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в трис-буферном физиологическом растворе с Твин 20 (TBST), содержащем 5% обезжиренное молоко, и инкубировали с первичным антителом при 4°C в течение ночи. Использовали следующие первичные антитела: кроличьи поликлональные антитела к ABCG8 (Santa Cruz Biotechnology, sc-30111, рабочее разведение 1:1000) и кроличьи поликлональные антитела к β -актину (Cell signaling, 4967S, рабочее разведение 1:3000). После промывки TBST мембраны инкубировали со вторичными антителами (LI-COR Biotechnology, ослиное антикроличье IRDye 926-32213, 926-68073, рабочее разведение 1:10000) в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки TBST полосы визуализировали и количественно оценивали с использованием системы формирования инфракрасных изображений Odyssey (LI-COR Biosciences, версия 2.1).

Анализ атеросклеротических поражений.

После взятия крови мышам через сердце перфузировали 20 мл физиологического раствора, а затем 20 мл 37% формалина. Мышей фиксировали формалином, и все ветви аорты иссекали под хирургическим микроскопом. Затем ветви аорты окрашивали раствором Oil Red O (0,2% Oil Red O (масса/объем) в 3,5:1 метанола: 1 н. NaOH) в течение 50 мин, а затем 70% этанолом в течение 30 мин. Затем ветви аорты помещали на хранение в DDW. Затем ветви аорты очищали от прилипших жировых и соединительных тканей и продольно вскрывали ножницами Ваннаса, чтобы обнажить атеросклеротические поражения. Изображения целых ветвей аорты были получены с помощью цифровой камеры, и процент площади бляшки, окрашенной Oil Red O, по отношению к общей площади просветной поверхности был определен количественно с помощью программного обеспечения для анализа ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Статистический анализ.

Программное обеспечение SPSS 24.0 (SPSS Inc. IBM) использовали для анализа данных. Данные представлены в виде графиков в виде диаграммы размаха или в виде среднего значения \pm СОС. Количество животных, используемых для каждого исследования, является специфическим для каждой легенды фигур. Для анализа данных использовали односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с последую-

шим апостериорным тестом Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты.

Эксперимент 1. Влияние на массу тела и ожирение.

Дизайн эксперимента изображен на фиг. 1А. После одной недели кормления ApoE^{-/-} мышей западной диетой (ЗД) кровь собирали из лицевой вены (ЛВ) для определения исходных уровней ОХ в плазме. Затем мышей держали на западной диете и случайным образом разделяли на 5 экспериментальных групп, которым вводили следующие средства для лечения через желудочный зонд 6 раз в неделю в течение 12 недель:

- 1) ЗД+H₂O;
- 2) ЗД+Gly (0,67 мг/г глицина);
- 3) ЗД+Leu (0,33 мг/г лейцина);
- 4) ЗД+DT-109 (1 мг/г DT-109);
- 5) ЗД+DT-110 (1 мг/г DT-110).

Никаких существенных различий в потреблении пищи на протяжении всего исследования отмечено не было (фиг. 1В). Измерения конечных точек продемонстрировали значительно более низкую массу тела у мышей, которым вводили глицин (на 12%, $p < 0,05$, фиг. 1С), тогда как общий прирост массы тела от исходного уровня до конечной точки был значительно ниже у мышей, получавших глицин или DT-109 (на 51%, $p < 0,01$ или 28%, $p < 0,05$ соответственно; фиг. 1D). На макроскопической картине брюшных полостей в конечной точке обнаружена желтоватая окраска печени и увеличение висцеральных жировых прослоек у контрольных мышей и у мышей, которым вводили лейцин, которые были ослаблены лечением глицином, DT-109 или DT-110 (фиг. 1E). Соответственно уровни молекулы глицинсодержащего трипептида в плазме были значительно ниже у мышей, которым вводили глицин, DT-109 или DT-110 (на 53, 62 или 56%, $p < 0,05$, фиг. 1F). Взятые вместе, эти результаты указывают на защитные эффекты глицина, DT-109 и, в меньшей степени, DT-110 против ожирения, индуцированного ЗД.

Эксперимент 2. Влияние на гомеостаз глюкозы.

На 10 неделе кормления ЗД после ночного голодания выполняли ПГТТ. Для определения кратковременных эффектов лечения на уровень глюкозы в крови, к раствору глюкозы (2 мг/г) добавляли глицин (0,67 мг/г), лейцин (0,33 мг/г), DT-109 или DT-110 (1 мг/г) и вводили через желудочный зонд. Как показано на фиг. 2А, не было отмечено значительных различий в уровнях глюкозы в крови между группами на исходном уровне. Через 30 мин после введения глюкозы с лечением или без него уровни глюкозы в крови заметно снижались для всех средств для лечения с наиболее значительными эффектами для глицина или DT-109. В более поздние моменты времени (60-120 мин) уровни глюкозы в крови значительно снизились у мышей, получавших глицин, DT-109 и DT-110, но не лейцин. Для оценки длительных эффектов лечения, ПГТТ повторяли на 11-й неделе кормления ЗД, на этот раз без добавления средств для лечения в раствор глюкозы. Не было отмечено значительных различий между группами после нагрузки глюкозой без лечения (фиг. 2В). Чтобы оценить влияние лечения на уровень глюкозы не натощак, кровь собирали перед рутинным введением средств для лечения через желудочный зонд (перед введением через желудочный зонд) и через 30 мин после него (после введения через желудочный зонд). По сравнению с контрольными мышами уровни глюкозы перед введением через желудочный зонд были значительно ниже во всех группах. Однако, в то время как введение воды или лейцина через желудочный зонд приводило к тенденции к повышению уровня глюкозы в крови, введение глицина, DT-109 или DT-110, через желудочный зонд значительно снижало уровень глюкозы в крови (на 10%, $p < 0,05$, 21%, $p < 0,01$ или 13%, $p < 0,05$ соответственно; фиг. 2С). Наконец, уровни глюкозы на конечной точке (после 6-часового голодания) были значительно ниже у мышей, получавших глицин или DT-109 (на 41%, $p < 0,01$ или 30%, $p < 0,05$ соответственно; фиг. 2D). Анализ экспрессии генов в печени продемонстрировал, что экспрессия генов, регулирующих захват глюкозы (GLUT1, GLUT2 и GLUT4), повышалась лечением глицином без значительного изменения экспрессии генов, регулирующих глюконеогенез (G6pc, PCK1 и FBP1). Экспрессия GLUT1 также заметно индуцировалась в печени мышей, получавших DT-110 (фиг. 2E). Взятые вместе, эти результаты указывают на выраженные постпрандиальные глюкозоснижающие свойства глицина, DT-109 и DT-110.

Эксперимент 3. Влияние на метаболизм липидов в печени.

Окрашивание образцов печени гематоксилином и эозином выявило выраженный микровезикулярный и макровезикулярный стеатоз у контрольных мышей, а также у мышей, которым вводили лейцин. Примечательно, что лечение глицином, DT-109 или DT-110 устраняет индуцированный ЗД стеатоз печени (фиг. 3А). Соответственно экстракция липидов печени с последующей количественной оценкой содержания ТГ и ОХ показала, что лечение глицином, DT-109 или DT-110 значительно снижает уровень ТГ в печени (на 74, 73 или 68%, $p < 0,01$ соответственно; фиг. 3В) и ОХ (на 76, 71%, $p < 0,01$ или 63%, $p < 0,01$ соответственно; фиг. 3С) без значительных эффектов при введении лейцина.

Эксперимент 4.

Экспрессия генов, регулирующих накопление ТГ, жирных кислот и холестерина в печени, была затем оценена для объяснения наблюдаемых эффектов на стеатоз печени. Интересно, что лечение глицином, DT-109 или DT-110, но не лейцином, значительно индуцировала экспрессию главных регуляторов

окисления липидов печени - АМФК α 1 и РАПП- α (фиг. 4А). Соответственно экспрессия ключевых генов-мишени, регулирующих гидролиз ТГ (PNPLA2), митохондриальное β -окисление (CPT1a, SCA1, ACAD1), а также митохондриального переносчика анионов UCP2, была значительно повышена в печени мышей, получавших глицин, DT-109 или DT-110 (фиг. 4А, 4В). Что касается генов, регулирующих гомеостаз холестерина в печени, лечение глицином, DT-109 или DT-110 значительно увеличивало экспрессию ABCG5 и ABCG8, ключевых регуляторов экскреции холестерина в желчь. Значительное повышение экспрессии рецептора ЛПНП была обнаружена в печени мышей, получавших DT-110, с аналогичными тенденциями для лечения глицином и DT-109 (фиг. 4С). Сверхэкспрессия ABCG8 в печени мышей, получавших глицин, DT-109 или DT-110, была подтверждена при помощи вестерн-блоттинга (фиг. 4D и 4E). В целом эти результаты подчеркивают мощные защитные эффекты глицина, DT-109 и DT-110 против 3D-индуцированного стеатоза печени в связи со сверхэкспрессией генов, регулирующих окисление липидов и экскрецию холестерина в желчь.

Пример 1. Влияние на липидный профиль плазмы и атеросклероз.

Перед рандомизацией в экспериментальные группы у мышей брали кровь после одной недели кормления 3D для определения исходных уровней ОХ в плазме. ОХ в плазме снова измеряли на конечной точке после 12 недель кормления 3D со средствами для лечения или контролем водой. Как показано на фиг. 5А, зависимое от времени увеличение ОХ в плазме было значительно ослаблено лечением глицином или DT-109, с аналогичной тенденцией для лечения DT-110, но не для лечения лейцином. Соответственно конечные уровни ОХ и ЛПНП в плазме были значительно снижены у мышей, получавших глицин или DT-109 (ОХ: на 19%, $p < 0,05$ или 25%, $p < 0,01$ соответственно; ЛПНП: на 30%, $p < 0,01$, или 36%, $p < 0,01$ соответственно), с аналогичной тенденцией для лечения DT-110 (фиг. 5В, 5С). Интересно, что уровни ЛПВП в плазме были значительно ниже у мышей, получавших глицин (на 35%, $p < 0,05$), но сохранялись при лечении DT-109 (фиг. 5D). Не было отмечено значительных изменений уровней ТГ в плазме (фиг. 5E). Наконец, анализ анфасных изображений поражений аорты с помощью окрашивания Oil Red O продемонстрировал значительное уменьшение общего количества атеросклеротических бляшек у мышей, получавших глицин, DT-109 или DT-110 (на 48%, $p < 0,01$, 62%, $p < 0,001$ или 49%, $p < 0,01$ соответственно; фиг. 5F, 5G), но не у мышей, получавших лейцин.

Эксперимент 6. Влияние на системное воспаление, воспаление печени и жировой ткани.

Поскольку воспаление играет ключевую роль в патогенезе как НАЖБП, так и атеросклероза, затем были оценены уровни провоспалительных цитокинов и адипокинов в плазме. В то время как между группами не было отмечено значительных изменений уровней ИЛ-6 и резистина в плазме (фиг. 6А, 6В), уровни MCP1 были значительно снижены у мышей, получавших глицин, DT-109 или DT-110 (фиг. 6С). Анализ экспрессии генов в эпидидимальной жировой ткани (ЭЖТ) и в подкожной жировой ткани (ПЖТ) выявил значительное снижение количества ФНО- α в ЭЖТ всеми средствами для лечения с наиболее значительными эффектами для DT-110 (фиг. 6D). В соответствии с более низкими уровнями MCP1 в плазме, экспрессия MCP1 как в ЭЖТ, так и в ПЖТ была значительно подавлена лечением глицином, DT-109 или DT-110, но не лейцином (фиг. 6D, 6E). Наконец, хотя глицин подавлял экспрессию MCP1 в печени (с аналогичной тенденцией для DT-109, фиг. 7А), не было отмечено значительных изменений в ткани F4/80, как определено при помощи иммуногистохимического метода (фиг. 7B, 7C). В целом эти результаты предполагают некоторые противовоспалительные эффекты глицина, DT-109 и DT-110, связанные, главным образом, с подавлением MCP1 в жировой ткани и в системе кровообращения.

Пример 2. Средство для лечения на основе глицина для НАЖБП.

А. Введение.

НАЖБП, наиболее распространенное хроническое заболевание печени, поражает 25% населения мира. НАЖБП охватывает спектр патологий печени, начиная от стеатоза печени (СП), НАСГ, характеризующегося повреждением гепатоцитов и лобулярным воспалением в комбинации с прогрессированием фиброза, и циррозом, который может привести к печеночной недостаточности или гепатоцеллюлярной карциноме. Сопутствующие кардиометаболические патологии, включая ожирение, диабет 2 типа (СД2), метаболический синдром (МС) и дислипидемию, часто встречаются у пациентов с НАЖБП. Помимо смертности, связанной с печенью, сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти пациентов с НАЖБП, особенно с НАСГ. Несмотря на глобальное бремя НАЖБП и значительные усилия по разработке лекарственных средств, лечение до сих пор не одобрено.

Последние достижения, особенно в метаболомике и микробиоте кишечника, улучшили наше понимание патогенеза НАЖБП, предложив новые терапевтические мишени. Принимая во внимание, что аномальный липидный и углеводный метаболизм, как известно, причастен к НАЖБП, недавние исследования, основанные на метаболомике, демонстрируют, что дисрегулируемый метаболизм определенных аминокислот (АК) играет роль в патогенезе НАЖБП. В частности, в то время как у пациентов с НАЖБП увеличивается количество циркулирующих в крови АК, уровень глицина снижается. Уровни циркулирующего в крови глицина отрицательно коррелируют с уровнем СП, баллонированием гепатоцитов и лобулярным воспалением. Глицин плазмы вместе с известными биомаркерами (например, аспартатами-нотрансферазой (АСТ) и генотипом PNPLA3) недавно был включен в модель для прогнозирования

НАСГ. Более низкий уровень глицина в плазме связан с более высокой частотой ожирения, СД2, метаболического синдрома, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, в то время как более высокий уровень глицина в плазме связан с благоприятным липидным профилем (см. табл. S1).

Таблица S1

Предыдущие клинические данные, связывающие низкий уровень циркулирующего в крови глицина с НАЖБП и кардиометаболическими заболеваниями

Кардио-метаболическое заболевание	N субъектов-людей	Результаты для циркулирующего в крови глицина (ссылка в основном тексте)
НАЖБП	Наборы данных для обучения: 1535 Здоровых и 465 НАЖБП	У пациентов с НАЖБП уровень глицина был снижен, в то время
	Набор данных для проверки: 1661 Здоровых и 499 НАЖБП	как уровень большинство АК был повышен.
НАЖБП	86 (стеатоз печени различной степени)	Глицин отрицательно коррелировал с уровнем стеатоза печени.
НАЖБП	20 Здоровых и 44 НАЖБП	Глицин снижался у пациентов с НАЖБП и отрицательно коррелировал с баллонированием гепатоцитов и лобулярным воспалением.
Ожирение	67 Тощих и 74 с ожирением	У пациентов с ожирением уровень глицина был снижен, в то время как уровень различных АК был повышен.
СД2	Мета-анализ с участием 8000 субъектов (1940 с СД2)	Глицин обратно связан с предиабетом и СД2.
МС (ожирение и дислипидемия)	472 (демографическое исследование)	Глицин отрицательно коррелировал с окружностью талии, уровнем ТГ в плазме и МС, но при этом положительно коррелировал с ХС-ЛПВП.
ОИМ (ожирение, СД2 и дислипидемия)	4109 (с подозрением на стабильную стенокардию)	Глицин был обратно пропорционален риску ОИМ и положительно связан с более низкой распространенностью ожирения, СД2 и благоприятным липидным профилем (более высокий уровень ХС-ЛПВП и АпоА1, более низкий уровень ТГ).
ИБС	11,147 (2053 с ИБС)	Глицин был связан с более низким риском ИБС и ИМ.

В качестве незаменимых АК глицин синтезируется из нескольких предшественников, главным образом в печени. Эти реакции катализируются ключевыми ферментами, управляющими образованием глицина из серина (серингидрокси-метилтрансферазы, SHMT), треонина (треониндегидрогеназа, TDH), холина через саркозин (холиндегидрогеназа, CHDH; саркозиндегидрогеназа, SARDH) и из аланина в

глиоксилат (AGXTs). Глицин используется несколькими путями для образования основных молекул, включая нуклеиновые кислоты, гем и глутатион. При НАЖБП или СД2 синтез глутатиона снижается из-за ограниченной доступности глицина и восстанавливается после приема пищевых добавок. Помимо этой антиоксидантной роли, глицин имеет двойное преимущество в метаболизме липидов и глюкозы. Прием глицина снижает уровень глюкозы в крови, частично за счет стимуляции секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы. У мышей КК- A^y с наследственным ожирением/диабетом диетический глицин улучшал толерантность к глюкозе, снижал уровни циркулирующих в крови ТГ и аланинаминотрансферазы (АЛТ), одновременно уменьшая СП и воспалительную инфильтрацию. У крыс, получавших сахарозу, глицин снижал содержание внутрибрюшинного жира, уровень ТГ в плазме и повышал уровень маркеров ОЖК в митохондриях печени. Тем не менее, всестороннее исследование роли глицина в НАЖБП с применением моделей, полностью имитирующих человеческое заболевание и точных дозровок, не проводилось.

Принимая во внимание бремя НАЖБП, отсутствие доступных методов лечения и постоянные отчеты, связывающие низкий уровень циркулирующего в крови глицина со степенью тяжести НАЖБП, есть твердое основание для лучшего понимания метаболизма глицина при НАЖБП, что может привести к созданию новых терапевтических средств. Здесь мы идентифицировали супрессию генов биосинтеза глицина, преимущественно AGXT1, при НАЖБП человека и мыши. Применяя генетические (AGXT1^{-/-}) и диетические подходы для ограничения доступности глицина, мы обнаружили обострение гиперлипидемии и стеатогепатита. В поисках соединений на основе глицина с двойными липидснижающими/глюкозоснижающими свойствами мы идентифицировали DT-109, который эффективно защищал мышей от НАСГ, индуцированного диетой, путем модуляции ОЖК в печени.

В. Сокращения.

АК - аминокислоты;
 АСАА - ацетил-КоА-ацилтрансфераза;
 АСАД - ацил-КоА-дегидрогеназа;
 АСОТ - ацил-КоА-тиоэстераза;
 АСОХ - ацил-КоА-оксидаза;
 АСЛ - длинноцепочечная ацил-КоА-синтетаза;
 АСМ - среднецепочечная ацил-КоА-синтетаза;
 АГХТ - аланин-глиоксилат аминотрансфераза;
 ЩФ - щелочная фосфатаза;
 АЛТ - аланинаминотрансфераза;
 АпоЕ - аполипопротеин Е;
 АСТ - аспартатаминотрансфераза;
 САСТ - карнитин/ацилкарнитин транслоказа;
 Cas9 - CRISPR-ассоциированный белок 9;
 ССЛ - лиганд хемокина, содержащего С-С мотив;
 ССР - рецептор хемокина, содержащего С-С мотив;
 СД - сбалансированная диета для мышей;
 ИБС - ишемическая болезнь сердца;
 СЛМС - комплексная система мониторинга лабораторных животных;
 СРТ - карнитин пальмитоилтрансфераза;
 CRISPR - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами;
 ДАГ - диацилглицерины;
 ДАО - оксидаза D-аминокислот;
 ДЭГ - дифференциально экспрессируемые гены;
 ЕСИ - еноил-КоА дельта изомераза;
 ЖК - жирные кислоты;
 ОЖК - β -окисление жирных кислот;
 НАДН - гидроксацил-коэнзим А дегидрогеназа;
 СП - стеатоз печени;
 ЛДА - линейный дискриминантный анализ;
 LefSe - размер эффекта линейного дискриминантного анализа;
 МСР-1 - моноцитарный хемоаттрактантный белок-1;
 МС - метаболический синдром;
 НАЖБП - неалкогольная жировая болезнь печени;
 НАСГ - неалкогольный стеатогепатит;
 NF- κ B - ядерный фактор "каппа-би";
 ЯМР - ядерный магнитный резонанс;
 ПГТТ - пероральный тест на толерантность к глюкозе;
 ОРО - Oil Red O;

PGC1 α - РАПП-гамма-коактиватор-1 α (PPARGC1A);
 PNPLA - пататинподобный фосфолипазный домен-содержащий белок;
 РАПП - рецептор, активируемый пролифератором пероксисом;
 RER - частота респираторного обмена; SARDH, саркозиндегидрогеназа;
 SERPINE - ингибитор сериновой пептидазы клады E;
 SHMT - серингидроксиметилтрансфераза;
 СД2 - диабет 2 типа;
 ОХ - общий холестерин;
 TDH - треониндегидрогеназа;
 ТГ - триглицериды;
 рецептор ТФР-бета - рецептор трансформирующего фактора роста бета;
 ТФР-Р - трансформирующий фактор роста- β ;
 TIMP - тканевый ингибитор металлопротеиназ;
 TLR - Toll-подобный рецептор;
 ФНО - фактор некроза опухолей;
 TNFRSF - суперсемейство рецепторов ФНО;
 ЗД - западная диета.

С. Профилирование транскриптов.

Данные РНК-секвенирования были депонированы в NCBI SRA или GEO (номера доступа: PRJNA556537 или GSE126204). Данные метагеномного секвенирования были депонированы в SRA NCBI (номер доступа: PRJNA544728).

Д. Актуальность и цели.

Уровень распространения неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), включая стеатогепатит (НАСГ), растет во всем мире при отсутствии одобренной медикаментозной терапии. У пациентов с НАЖБП постоянно отмечается более низкий уровень циркулирующего в крови глицина, но причинная роль глицина и его терапевтический потенциал остаются неясными. Мы применили генетические и диетические стратегии для изучения метаболизма глицина при НАЖБП и оценили средства для лечения на основе глицина.

Е. Способы.

Мы выполнили транскриптомный анализ печени людей и мышей с НАЖБП, выявив подавление генов биосинтеза глицина, преимущественно аланин-глиоксилатаминотрансферазы-1 (AGXT1). Мы создали AGXT1^{-/-} мышей с использованием CRISPR/Cas9 и разработали модифицированные глицином диеты. Мы провели поиск соединений на основе глицина со снижающими уровень глюкозы/липидов свойствами и протестировали применение в терапевтических целях на мышинных моделях гиперлипидемии/НАЖБП. Проанализировали липиды плазмы, ферменты печени и цитокины. Печень изучали с помощью гистологического исследования, количественного определения липидов, РНК-секвенирования, количественной ПЦР и иммуноблоттинга. Состав тела определяли при помощи ЯМР, а энергетический обмен оценивали с помощью непрямого калориметрии. Микробиоту кишечника изучали с помощью метагеномного секвенирования 16S.

Ф. Результаты.

Генетические (AGXT1^{-/-}) и диетические подходы к ограничению доступности глицина усугубили индуцированную диетой гиперлипидемию и стеатогепатит с подавлением митохондриального/пероксисомального β -окисления жирных кислот (ОЖК) и усилением воспаления в качестве основных путей. Мы идентифицировали трипептид на основе глицина (gly-gly-L-leu/DT-109) с сильными глюкозо-снижающими/липидснижающими эффектами. У мышей с установленным НАСГ DT-109 улучшил состав тела, снизил уровень циркулирующих в крови липидов, ферментов печени и стеатогепатита за счет стимуляции путей ОЖК. DT-109 уменьшил лобулярное/системное воспаление и фиброз за счет подавления путей NF- κ B и TGF β /SMAD. Бактерии рода *Clostridium sensu stricto* положительно коррелировали со степенью тяжести НАЖБП и были уменьшены на DT-109, в то время как *Alistipes* демонстрировали обратные корреляции и их количество было при помощи DT-109.

Г. Способы.

(i) Процедуры с животными.

Процедуры для животных были одобрены (PRO00008239) Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Мичиганского университета (МУ) и выполнялись в соответствии с установленными правилами. Семинедельные мыши C57BL/6J или АпоЕ^{-/-} (B6.129P2-Apoetm1Unc/J, Stock: 002052) были из Jackson Laboratories. AGXT1^{-/-} мышей с фоном C57BL/6J получали с использованием CRISPR/Cas9 с направляющей РНК, нацеленной на экзон 1 AGXT1: 5'-GGGTCCGGGGCCCTCCAACC-3'. Использовали самцов мышей C57BL/6J, АпоЕ^{-/-} или AGXT1^{-/-} в возрасте восьми недель, и их кормили ad libitum: стандартная сбалансированная диета для мышей (СД, LabDiet 5L0D, 13% калорий из жира); западная диета с высоким содержанием жиров и холестерина (ЗД, Envigo TD.88137, 42% жира); ЗД с определенным аминокислотным составом с глицином или без него (разработано с помощью Envigo-Teklad

Custom Diets, табл. S2): 3D_{AK}+Gly (TD.170525) или 3D_{AK}-Gly (TD.170526); диета с высоким содержанием жиров, высоким содержанием холестерина и фруктозы (Research Diets D17010103, 40% жира), которая, как мы подтвердили, сильно индуцирует НАСГ у мышей. По показаниям мышам через желудочный зонд вводили (Sigma-Aldrich G5417), лейцин (Sigma-Aldrich L8912) или DT-109 (CSBio) в дозе 0,125-1 мг/г массы тела/сутки или H₂O в качестве контроля.

Таблица S2

Описание 3Д с определенным аминокислотным составом с глицином или без него (3D_{AK}±Gly)

Отдельная информация о питательных веществах	СД	3D _{AK} +Gly	3D _{AK} -Gly
Белки (% ккал)	28,2	22,4	22,5
Углеводы (% ккал)	59,1	35,4	35,2
Жиры (% ккал)	12,6	42,2	42,3
Калорийная плотность (ккал/г)	3,3	4,5	4,5
Сахароза (г/кг)	150,0	345,5	345,5
Мальтодекстрин (г/кг)	100,0	20,0	20,2
Безводный молочный жир (г/кг)	37,2	210,0	210,0
Холестерин (г/кг)	0	1,5	1,5
L-аланин (г/кг)	14,4	14,4	14,4
L-аргинин (г/кг)	15,7	15,7	15,7
L-аспарагин (г/кг)	5,3	5,3	8,1
L-аспартат (г/кг)	28,1	28,1	33,8
L-цистеин (г/кг)	3,9	3,9	3,9
L-глутамат (г/кг)	47,4	47,4	47,7
L-глутамин (г/кг)	28,7	28,7	31,8
Глицин (г/кг)	12,8	12,8	0
L-гистидин (г/кг)	8,4	8,4	8,4
L-изолейцин (г/кг)	10,6	10,6	10,6
L-лейцин (г/кг)	18,9	18,9	18,9
L-лизин (г/кг)	18,5	18,5	18,5
L-метионин (г/кг)	5,9	5,9	5,9
L-фенилаланин (г/кг)	11,1	11,1	11,1
L-пролин (г/кг)	14,7	14,7	19,6
L-серин (г/кг)	11,8	11,8	11,8
L-треонин (г/кг)	9,7	9,7	9,7
L-триптофан (г/кг)	2,8	2,8	2,8
L-тирозин (г/кг)	7,7	7,7	7,7
L-валин (г/кг)	11,6	11,6	11,6
Таурин (г/кг)	0,3	0,3	0,3
Целлюлоза (г/кг)	50,0	50,0	50,0
Минеральная смесь (79055) (г/кг)	13,4	13,4	13,4
Фосфат кальция (г/кг)	21,8	21,8	21,8
Карбонат кальция (г/кг)	8,3	8,3	8,3
Витаминная смесь (40060)	10,0	10,0	10,0

(ii) Клинические данные.

Дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ), управляющие биосинтезом глицина, были проанализированы с использованием двух общедоступных наборов данных микроматричного анализа печени:

1) GSE83452 от 104 пациентов с НАСГ и 44 контрольных больных;

2) GSE61260 от 24 пациентов с НАСГ и 24 здоровых людей из контрольной группы с ожирением.

Мы использовали модель линейной регрессии с возрастом, полом и ИМТ в качестве ковариат, чтобы идентифицировать важные гены биосинтеза глицина, которые связаны с НАСГ. Для повышения статистической мощности, мы дополнительно провели мета-анализ двух исследований с моделью постоянных эффектов. Наши ранее опубликованные данные микроматричного анализа (GSE26106, n=206 доноров трансплантации печени) были использованы для проверки корреляции между уровнями экспрессии генов и содержанием жира в печени.

(iii) Гистология и иммуногистохимия.

Все гистологические процедуры были выполнены в лаборатории гистологии Центра животных *in vivo* Мичиганского университета. Лаборанты были ослеплены в отношении экспериментальных групп. Окрашивание гематоксилином и эозином или Сириусом красным использовали для определения баллов по шкале оценки активности НАЖБП (NAS) или фиброза.

(iv) Идентификация соединений на основе глицина.

Соединения, структурно подобные глицину, были выбраны для оценки структурных, конформационных, электронных и изостерических модификаций глицинового каркаса. Поиск был проведен через SciFinder© для определения коммерческой доступности. Водорастворимые соединения с пероральной ЛД₅₀>1 мг/г были определены как подходящие для перорального введения мышам.

(v) РНК-секвенирование.

Получение библиотеки и секвенирование выполняли в Центре секвенирования ДНК в Мичиганском университете на системе секвенирования NovaSeq 6000 (Illumina). РНК-секвенирование и анализ путей выполняли, как описано.

(vi) Комплексная система лабораторного мониторинга лабораторных животных (CLAMS).

Состав тела оценивали с помощью анализатора на основе ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (Minispec LF90II; Bruker Optics) в Центре фенотипирования животных Мичиганского университета. Потребление кислорода (VO₂), выработку углекислого газа (VCO₂) и двигательную активность измеряли с помощью CLAMS (Columbus Instruments). Частота респираторного обмена (RER) равна VCO₂/VO₂.

(vii) Анализ фекального микробиома.

Выделение ДНК из фекалий, амплификация с использованием праймеров, специфичных для области V4 16S рРНК, характеристика микробиоты кишечника с помощью алгоритма размера эффекта линейного дискриминантного анализа (ЛДА) (LEfSe) и использованием анализа корреляций с параметрами заболевания были выполнены, как описано ранее.

(viii) Статистический анализ.

Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 7.0. Если не указано иное, значения представлены как средние значения±СО, демонстрирующие все точки. Все данные были проверены на нормальность и равенство дисперсий. В случае успешного прохождения t-критерий Стьюдента использовали для сравнения двух групп или однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Бонферрони для сравнения между >2 группами. В противном случае использовались непараметрические тесты (U-критерий Манна-Уитни или критерий Краскела-Уоллиса). Р-значения <0,05 считаются статистически значимыми.

(ix) Получение AGXT1^{-/-} мышей с использованием CRISPR/Cas9.

AGXT1^{-/-} мышей с фоном C57BL/6J получали с использованием CRISPR/Cas9. Сайт-мишень направляющей РНК на экзоне 1 гена AGXT1 представлял собой 5'-GGGTCCGGGGCCCTCCAACC-3'. Мы провели генотипирование с использованием следующих праймеров: прямой: 5'-ACACCTCCACTGTCCTGTCC-3', обратный: 5'-GGTCAGATCTGCCTGCTACC-3'. Секвенирование по Сэнгеру с использованием следующего праймера: 5'-GCAGAGCTAGCTGGGAAATG-3' подтвердило делецию 3 оснований А из мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM, фиг. 8А). Мутация со сдвигом рамки считывания после АК 53 ОРС вводила преждевременный стоп-кодон, а отсутствие AGXT1 было подтверждено при помощи вестерн-блоттинга (фиг. 8В). По оценке с помощью CRISPOR, нецелевые эффекты CRISPR обнаружены не были.

(x) Клинические данные.

Дифференциально экспрессируемые гены биосинтеза глицина у пациентов с НАСГ анализировали с использованием двух общедоступных наборов данных. Первое исследование состоит из данных микроматричного анализа печени, полученных от 104 пациентов с НАСГ и 44 здоровых людей из контрольной группы (GSE83452). Линейную регрессию использовали для проверки связи между уровнями экспрессии генов и НАСГ. Возраст и пол были скорректированы на ковариаты. Второй набор данных включает данные микроматричного анализа печени, собранные от 24 пациентов с НАСГ и 24 контрольных пациентов с ожирением (GSE61260). Точно так же мы использовали модель линейной регрессии с возрастом, полом и ИМТ в качестве ковариат для выявления значимых генов биосинтеза глицина, которые связаны с НАСГ. Для повышения статистической мощности и сравнения результатов, мы дополнительно провели мета-анализ двух исследований с моделью постоянных эффектов с использованием пакета metafor R. Гены со скорректированным по Беньямини-Хохбергу р-значением <0,05 и р-значением >0,05 для

Q-критерия Кокрана для оценки гетерогенности считались значимыми.

Корреляции между уровнями экспрессии генов и содержанием жира в печени были протестированы с использованием ранее опубликованных данных микроматричного анализа (GSE26106), собранных от доноров для трансплантации печени (n=206). Иссечение ткани, извлечение образцов и получение данных микроматричного анализа выполняли, как описано ранее. Содержание жира в печени донора определяли количественно с использованием органических растворителей (гексан/изопропанол 3:2), как описано ранее. Содержание экстрагированного общего жира нормализовали к концентрации общего белка и преобразовывали в шкалу log₁₀ для последующего анализа. Корреляцию Пирсона использовали для определения значимости печеночного жира, коррелируемого с экспрессией генов биосинтеза глицина.

(xi) Гистология, иммуногистохимия и оценка активности НАЖБП и фиброза.

Гистологические процедуры выполняли лаборантами, которые были ослеплены по отношению к экспериментальным группам, в лаборатории гистологии Центра животных *in vivo* (IVAC) Мичиганского университета. Ткани, фиксированные формалином, обрабатывали спиртами и очищали ксилолом с последующей фильтрацией расплавленным парафином с использованием автоматического гистопроцессора VIP5 или VIP6 (TissueTek, Sakura-Americas). Используя станцию Histostar Embedding Station (ThermoFisher Scientific), затем из ткани на ротационном микротоме M355S (ThermoFisher Scientific) делали срезы толщиной 4 мкм и помещали на предметные стекла. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E, ThermoFisher Scientific). Для окрашивания Сириусом красным препараты обрабатывали 0,2 фосфорномолибденовой кислоты в течение 3 мин и переносили в 0,1% Сириуса красного, насыщенный пикриновой кислотой (Rowley Biochemical Inc.), на 90 мин, затем переносили в 0,01 N соляную кислоту на 3 мин.

Окрашивание гематоксилином и эозином использовали для оценки активности НАЖБП. Стеатоз оценивали от 0 до 3 баллов (0: <5% стеатоз; 1: 5-33%; 2: 34-66%; 3: >67%). Баллонирование гепатоцитов оценивали от 0 до 2 баллов (0: нормальные гепатоциты, 1: нормальные размеры с бледной цитоплазмой, 2: бледные и увеличенные по меньшей мере в 2 раза гепатоциты). Лобулярное воспаление оценивали от 0 до 2 баллов на основании очагов воспаления, подсчитанных при 20× (0: нет, 1: <2 очагов; 2: ≥2 очагов). Шкалу оценки активности НАЖБП (NAS) рассчитывали в виде суммы баллов по отношению к стеатозу, баллонированию гепатоцитов и лобулярному воспалению. Окрашивание Сириусом красным использовали для оценки фиброза печени от 0 до 4 баллов (0: фиброз отсутствует; 1: перисинусоидальный или портальный фиброз; 2: перисинусоидальный и портальный фиброз; 3: мостовидный фиброз; 4: цирроз).

Обработка замороженных срезов использовалась для окрашивания Oil Red O (ORO). Образцы печени, фиксированные формалином, подвергали криозащите в 20% сахарозе при 4°C в течение ночи, промокали, а затем мгновенно замораживали жидким азотом в O.C.T. Compound (Tissue-Tek, кат. № 4583) и хранили при -80°C до изготовления срезов из замороженных тканей. Перед разделением замороженные блоки были доведены до температуры около -20°C, а затем разрезаны на 5 мкм на замораживающем микротоме (Thermo-Shandon, кат. № 77200227). Препараты хранили при -80°C до окрашивания. Перед окрашиванием препараты печени оттаивали до комнатной температуры в течение 30 мин. После фиксации в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 20 мин препараты промывали DDW с последующим ополаскиванием 60% изопропанолом перед тем, как поместить их в рабочий краситель ORO-изопропанол (Rowley Biochemical Inc., H-503-1B) на 5 мин. Затем препараты ополаскивали 60% изопропанолом с тремя сменами DDW. Затем препараты подвергали контрокрашиванию ядер в гематоксилине по Харрису и помещали в водную монтирующую среду Aqua-Mount (Lerner Laboratories, кат. № 13800).

Иммуногистохимическое окрашивание проводили на приборе для автоматического иммуногистохимического окрашивания IntelliPATH FLX (Biocare Medical) с блокированием эндогенных пероксидаз и неспецифичным связыванием, с последующим обнаружением с использованием коммерческой полимерной системы, которая не содержит биотин и пероксидазу хрена, для детекции, проявлением хромогеном диаминобензидином, и контрокрашиванием ядер при помощи гематоксилина. Специфичное для F4/80 (Bio-Rad ABD Serotec, кат. № MCA497) крысиное моноклональное первичное антитело (клон CI: A3-1) разбавляли до 1:400 в разбавителе DaVinci Diluent (Biocare Medical, кат. № PD900) и инкубировали в течение 60 мин с последующим детектированием с использованием Rat-on-Mouse HRP-Polymer (Biocare Medical, кат. № RT517), 2-этапная инкубация зонд-полимер в течение 10 и 30 мин соответственно.

(xii) Анализ плазмы.

Полный липидный профиль плазмы (ОХ, ТГ, ЛПНП и ЛПВП) определяли с помощью химического анализатора Cobas Mira (Roche Diagnostics) в химической лаборатории Мичиганского исследовательского центра диабета (MDRC) с использованием реагентов и протоколов, предоставленных производителем, или в нашей лаборатории с использованием имеющихся в продаже наборов (Wako Chemicals 999-02601 и 994-02891). Молекулу глицинсодержащего трипептида и резистин в плазме измеряли на платформе Luminex 200 (Luminex) в MDRC с использованием мультиплексного анализа (MMHAG-44K, Millipore). MCP-1 в плазме измеряли с помощью набора для ИФА Mouse CCL2/JE/MCP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). Клинические химические анализы на АЛТ, АСТ и ЩФ были выполнены IVAC Мичиганского университета на химическом анализаторе Liasys 330 (AMS Diagnostics) с использованием предоставленных производителем реагентов и протоколов. Оксалат в плазме измеряли с помощью набора Oxalate Assay Kit (Abcam, ab196990). Уровень глюкозы в плазме измеряли с помощью глюкометра и тест-

полосок (NDC: 0193-7308-50, Contour Next). Анализ аминокислот в плазме был выполнен в Центре метаболизма Мичиганского университета. Двадцать мкл плазмы дериватизировали и готовили для анализа ГХ-МС в соответствии с инструкциями набора для анализа аминокислот EZ Faast (Phenomenex). Вкратце образцы подвергали очистке на колонке и переносили в пробирку автодозатора для ГХ. Затем образцы дериватизировали, сушили в слабом потоке азота при комнатной температуре и повторно суспендировали для анализа методом ГХ на детекторе Agilent 69890N GC-5975 MS со следующими параметрами: 1 мкл образца вводили с отношением деления потока 1:15 на колонке ZB-AAA 10 м (Phenomenex) со скоростью потока газа He 1,1 мл/мин. Начальная температура термостата ГХ составляла 110°C и повышалась на 30°C/мин до 320°C.

Температура на входе составляла 250°C, а температура МС-источника и квадруполя составляла 230 и 150°C соответственно. Данные обрабатывали с помощью программы MassHunter Quantitative analysis версии В.07.00. Метаболиты были нормализованы до ближайшего внутреннего стандарта, меченного изотопом, и количественно определены с использованием 2 повторных инъекций 5 стандартов для создания линейной калибровочной кривой с точностью более 80% для каждого стандарта. Площади пиков использовали для дифференциального анализа между группами.

(xiii) Анализ методом количественной ПЦР в реальном времени.

Общую РНК из образцов печени мышей экстрагировали с использованием наборов QIAGEN's RNeasy (QIAGEN). РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью Superscript III и случайных праймеров (Invitrogen). Конкретные уровни транскриптов оценивали с помощью системы ПНР в реальном времени (Bio-Rad) с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) и метода расчета значений пороговых циклов $\Delta\Delta Ct$. Уровни экспрессии генов нормализовали по глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH). Пары праймеров, используемые для кПЦР, были получены от Integrated DNA Technologies и перечислены в табл. S3.

Таблица S3

Праймеры, используемые для количественной ПЦР

Ген	Прямой праймер	SEQ ID NO	Обратный праймер	SEQ ID NO
Mus musculus				
Аланин-глиоксилатаминотрансфераза (AGXT1)	AAGGCATCCAGTATG TGTTCCA	73	TTCCGGTTAGAAAGG AGTCCC	74
Аланин-глиоксилатаминотрансфераза 2 (AGXT2)	TCACCTGAGAAATAC CAGTCCC	75	CAAAGAGCCACTCC ATGTGTC	76
Серингидроксиметилтрансфераза 1 (SHMT1)	GGATGATAATGGGGC GTATCTCA	77	GTCTTGTTGGGTTGTA GTGGTC	78
Серингидроксиметилтрансфераза 2 (SHMT2)	ATGCCCTATAAGCTC AATCCCC	79	TCTCATGCGTGCATA GTCAATG	80
Холиндегидрогеназа (CHDH)	TGAGCTGGGTGCCAA TATGTA	81	CGAAGCCCTCCTGTT GGAA	82
Саркозиндегидрогеназа (SARDH)	GAGAGCGACTGACCT CTGG	83	CCGTGTGTGAGCCAA AAGC	84
Треониндегидрогеназа	CTGGCTGTTTCACTAC	85	GGAGAGGTAGGTCC	86

(TDH)	AGTGC		AAAGGC	
Альфа-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, (РАПП-α)	AACATCGAGTGTCTGA ATATGTGG	87	CCGAATAGTTCGCCG AAAGAA	88
Ацил-КоА-оксидаза 1 (ACOX1)	CCGCCACCTTCAATCC AGAG	89	CAAGTTCTCGATTC TCGACGG	90
Гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа-альфа (НАДНА)	ACCTCGGTGTAAAGC ACAAAGT	91	GAGGTTTTGTCAGTG GTGATGA	92
Ацетил-КоА-ацилтрансфераза 2 (ACAA2)	AGTCCCCCTACTGTGT CAGAAA	93	CCATCTCCTCATTGA AGTAGCC	94
Эноил-КоА-дельта-изомераза 1 (EC11)	TGCTGTGACTACAGG GTATGG	95	GATCCTCAGGTACCA CCTCATC	96
Эноил-КоА-дельта-изомераза 2 (EC12)	ACTACTGCAGTGGGA ATGACCT	97	ATAGTCCCAGAAGG GTGACAGA	98
Длинноцепочечная ацил-КоА-синтетаза 1 (ACSL1)	GAGCAATGATCACTC ACCAAAA	99	TCTTAGCTCCATGAC ACAGCAT	100
Ацил-КоА-тиоэстераза 3 (ACOT3)	GCTCAGTCACCCTCA GGTAA	101	AAGTTTCCGCCGATG TTGGA	102
Ацил-КоА-тиоэстераза 4 (ACOT4)	ACATCCAAAGGTAAA AGGCCCA	103	TCCACTGAATGCAGA GCCATT	104
Мотив типа Nudix 19 (NUDT19)	GCACCACCACAGTTC TATGAAA	105	TAAGGACTTTGCCTT CCTCAC	106
Среднецепочечная ацил-КоА-синтетаза 5 (ACSM5)	TGACAGCGAAGGATC TCAAGTA	107	GAGTTCTCGGAAATT GATCCAG	108
Ядерный фактор «каппа-би» 1, p105	GGTATGGCTACTCGA	109	TTTCCTTCTCAGGGA GAGTCAG	110

(NFBK1)	ACTACGG			
Ядерный фактор «каппа-би» 2, р49/р100 (NFKB2)	GAGGTTCGGTCTAT GAGGATG	111	CTCTGCACTTCCTCC TTGTCTT	112
Гомолог В онкогена вируса ретикулоэндотелиоза птиц (v-rel) (RELB)	ATCCTCTCTGAGCCTG TCTACG	113	CACATCAGCTTGAGA GAAGTCG	114
Фактор некроза опухолей (ФНО-α)	CTGTGAAGGGAATGG GTGTT	115	GGTCACTGTCCCAGC ATCTT	116
Белок 9 суперсемейства рецепторов факторов некроза опухолей (TNFRSF9)	GTTTTGCTCCTCTACC CACAAC	117	CTTAAGCACAGACCT TCCGTCT	118
Лиганд 2 хемокина, содержащего С-С мотив, (CCL2)	TTAAAAACCTGGATC GGAACCAА	119	GCATTAGCTTCAGAT TTACGGGT	120
Лиганд 5 хемокина, содержащего С-С мотив, (CCL5)	ATATGGCTCGGACAC CACTC	121	CCACTTCTTCTCTGG GTTGG	122
Рецептор 2 хемокина, содержащего С-С мотив, (CCR2)	GATGATGGTGAGCCT TGTCATA	123	AGTGAGCCCAGAAT GGTAATGT	124
Рецептор 5 хемокина, содержащего С-С мотив, (CCR5)	ACCCTGTCATCTATGC CTTTGT	125	GTGGATCGGGTATA GACTGAGC	126
Toll-подобный рецептор 2 (TLR2)	CGGCTGCAAGAGCTC TATATTT	127	TGGCGTCTCCATAGT AAAGGAT	128
Toll-подобный рецептор 4 (TLR4)	CAGCACTCTTGATTGC AGTTTC	129	CATTCACCAAGAАCT GCTTCTG	130
Антиген CD86 (CD86)	TCTTGCTGATCTCAGA TGCTGT	131	CGTACAGAACCAAC TTTTGCTG	132
Трансформирующий	TGCGCTTGСAGAGAT	133	CTGCCGTACAАCTCC	134

фактор роста, бета 1 (TGFB1)	TAAAA		AGTGA	
Трансформирующий фактор роста, бета 2 (TGFB2)	СТААТГТТГТТGCCCT CCTACAG	135	GCACAGAAGTTAGC ATTGTACCC	136
Рецептор-1 трансформирующего фактора роста-бета (TGFB1)	GGACCATTGTGTTAC AAGAAAGC	137	CATGGCGTAACATTA CAGTCTGA	138
Рецептор-2 трансформирующего фактора роста-бета (TGFB2)	TCCTAGTGAAGAACG ACTTGACC	139	TACCAGAGCCATGG AGTAGACAT	140
Коллаген, тип I, альфа 1 (COL1A1)	TGAACGTGACCAAAA ACCAA	141	GCAGAAAAGGCAGC ATTAGG	142
Коллаген, тип I, альфа 2 (COL1A2)	AGGCAGGTCTGGGCT TTATT	143	CGTATCCACAAAGCT GAGCA	144
Коллаген, тип III, альфа 1 (COL3A1)	CTGTGAATCATGTCC AACTGGT	145	GATCCAGGATGTCCA GAAGAAC	146
Коллаген, тип IV, альфа 1 (COL4A1)	CAGGCATAGTCAGAC AACAGATG	147	TGGACAGCCAGTAA GAGTAGTCG	148
Коллаген, тип IV, альфа 2 (COL4A2)	CCCATCTGACATCAC ACTTGTT	149	CCTCTGCTTCCTTTCT GTCCTA	150
Тканевый ингибитор металлопротеиназ 1 (TIMP1)	ATTCAAGGCTGTGGG AAATG	151	CTCAGAGTACGCCA GGGAAC	152
Тканевый ингибитор металлопротеиназ 2 (TIMP2)	AGAAGAAGAGCCTGA ACCACAG	153	GGTCCTCGATGTCAA GAAACTC	154
Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, клада E, член 1 (SERPINE1)	GTAGCACAGGCACTG CAAAA	155	ATCACTTGGCCCATG AAGAG	156
Рецептор,	ATCACGTTCAAGGTC	157	TTCTGCTTCTGCCTC	158

активируемый пролифератором пероксисом, гамма, коактиватор-1 альфа (PGC1 α)	ACCCTAC		TCTCTCT	
Ацил-КоА-дегидрогеназа, средняя цепь (ACADM)	CTGTGATTCTTGCTGG AAATGA	159	GCCGTTGATAACATA CTCGTCA	160
Ацил-КоА-дегидрогеназа, длинная цепь (ACADL)	CTATATTGCGAATTAC GGCACA	161	ACACCTTGCTCCAT TGAGAAT	162
Ацил-КоА-дегидрогеназа, очень длинная цепь (ACADVL)	GCAGATGAGTGCATC CAAATAA	163	TGAGTTCCTTTCCTT TGTCCAT	164
Гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа (HADH)	AACACGTCTCTTTGC AGATCA	165	AATGAGGTATGGCA CCAAGAGT	166
Цитохром P450, семейство 4, подсемейство a, полипептид 14 (CYP4A14)	TATGTCCTCTGATGGA CGTTTG	167	CTGTTCCATCCTCC ATTCTGG	168
Митохондриальная карнитин/ацилкарнитин-трансфераза (CACT)	CAACCACCAAGTTTG TCTGGA	169	CCCTCTCTCATAAGA GTCTTCCG	170
Карнитин-пальмитоилтрансфераза 1a (CPT1a)	AGATCAATCGGACCC TAGACAC	171	CAGCGAGTAGCGCA TAGTCA	172
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH)	CTGCGACTTCAACAG CAACT	173	GAGTTGGGATAGGG CCTCTC	174
Homo sapiens				
Аланин-	AGAGACATCGTCAGC	175	CAGGTCACAGCTTCT	176
глиоксилатаминотрансфераза (AGXT1)	TACGTCA		TCTTGG	
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH)	ACAACCTTGGTATCGT GGAAGG	177	GCCATCACGCCACA GTTTC	178

(xiv) РНК-секвенирование и анализ данных.

Общую РНК из образцов печени мыши экстрагировали, как описано выше. Подготовка библиотеки и секвенирование были выполнены в Центре секвенирования ДНК Мичиганского университета. Качество РНК оценивали с помощью TapeStation (Agilent, Санта-Клара, Калифорния). Все образцы имели числа целостности РНК (RIN) >8,5. Образцы готовили с использованием набора для приготовления библиотек РНК NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina (NEB, E7760L) с модулем для изоляции мРНК Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB, E7490L) и мультиплексными олигонуклеотидами NEBNext для Illumina Unique dual (NEB, E6440L), где 10 нг-1 мкг общей РНК подвергали очистке поли(А) мРНК. Затем мРНК фрагментировали и копировали в кДНК первой цепи с использованием обратной транскриптазы и смеси dUTP. Образцы подверглись стадиям концевой репарации и достройки

концов dA-Tailing и последующего лигирования адаптеров NEBNext. Продукты очищали и обогащали с помощью ПЦР для создания конечной библиотеки кДНК. Конечные библиотеки были проверены на качество и количество с помощью TapeStation (Agilent) и количественной ПЦР с использованием набора для количественной оценки библиотек КАРА для платформ секвенирования Illumina (Кара Biosystems, KK4835). Библиотеки подвергали секвенированию спаренных концов на системе секвенирования NovaSeq 6000 (Illumina).

Качество необработанных файлов Fastq проверяли с помощью FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Trimmomatic v.0.35 был использован для обрезки низкокачественных прочтений с параметрами: SLIDINGWINDOW: 4:20 MINLEN: 25.12 Затем полученные высококачественные прочтения были сопоставлены с эталонным геномом мыши (GRCm38.90) с помощью HISAT2 v.2.1.0.13. Количественную оценку уровня генов выполняли с использованием HTSeq-counts v0.6.0 на основе аннотаций генома GRCm38.90.14 Затем R-пакет DESeq2 использовали для идентификации значимых дифференциально экспрессируемых генов. 15 Мы рассматривали гены со скорректированным Р-значением менее 0,05 и абсолютным кратным изменением более 2 как значимые дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ). Затем ДЭГ с повышенной и пониженной экспрессией анализировали соответственно для значительно обогащенных путей KEGG с использованием пакета clusterProfiler. 16 Значимость обогащения определяли с помощью одностороннего точного критерия Фишера с последующей поправкой Бенъямини-Хохберга для множественного тестирования.

(xv) Анализ липидов печени.

Печень умерщвленных мышей быстро удаляли, быстро замораживали жидким азотом и хранили при -80°C . Замороженные образцы печени (100 мг) гомогенизировали в PBS и центрифугировали (14000 об/мин, 20 мин). Супернатанты собирали и анализировали на содержание белка с помощью анализа по Брэдфорду Bio-Rad. Для оценки липидного состава печени липиды экстрагировали из супернатантов с использованием гексана ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich 32293) и изопропанола ($\geq 99,5\%$, Fisher Scientific A426-4) в соотношении 3:2 (об.:об.), а гексановую фазу оставляли упариваться на 48 ч. Количество ТГ или ОХ в печени определяли спектрофотометрическим методом с использованием имеющихся в продаже наборов (Wako Chemicals 999-02601 и 994-02891). Диацилглицерины печени (ДАГ) определяли с помощью набора ELISA Kit (Aviva Systems Biology, ОКЕН02607) в соответствии с инструкциями производителя. Данные о ТГ, ОХ и ДАГ в печени были нормализованы по уровням белка.

(xvi) Анализ методом вестерн-блоттинг.

Образцы печени лизировали в буфере для лизиса для анализа методом радиоиммунопреципитации (буфер RIPA, Thermo Scientific) с добавлением коктейля ингибиторов протеазы/фосфатазы (Roche Applied Science). Белки разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad). Мембраны блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в трис-буферном физиологическом растворе с Твин 20 (TBST), содержащем 5% обезжиренное молоко, и инкубировали с первичным антителом при 4°C в течение ночи. Были использованы следующие первичные антитела: AGXT1 (Santa Cruz Biotechnology sc-517388, 1:500), NADHA (Proteintech 10758-1-AP, 1:1000), ACAA2 (ABclonal A15778, 1:500), фосфо-SMAD2 (Ser465/467, Cell Signaling, № 3108S; 1:1000), SMAD2 (Cell Signaling Technology, № 5339S; 1:1000), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology sc-365062; 1:2000) или β -актин (Cell Signaling Technology, № 3700). Мембраны промывали TBST перед инкубированием со вторичными антителами, конъюгированными с IRDye (LI-COR Biosciences, 1:10000), при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки TBST полосы визуализировали и количественно оценивали с использованием системы формирования инфракрасных изображений Odyssey (LI-COR Biosciences, версия 2.1).

(xvii) Идентификация соединений на основе глицина.

Соединения, структурно подобные глицину, были выбраны с целью оценки структурных, конформационных, электронных и изостерических модификаций глицинового каркаса (фиг. 9А). Поиск был проведен через SciFinder© для определения коммерческой доступности. Для N-метилглицина (фиг. 9В), N,N-диметилглицина (фиг. 9С) и N,N,N-триметилглицина (фиг. 9D) были найдены различные степени метилирования остатка глицинамина, а для гликолевой кислоты (фиг. 9Е) было доказано замещение амина на спирт. Искали модификации кислотной области Wx глицинамидом (фиг. 9F), 2-амино-N-метилацетамидом (фиг. 9G) и этаноламином (фиг. 9H), а также были найдены конформационно затрудненные аналоги 2-оксопиперазина (фиг. 9I) и морфолин-2-она (фиг. 9J). Для (1H-тетразол-5-ил)метанамина (фиг. 9K) была найдена изостерическая замена кислоты.

(xviii) Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПГТТ).

ПГТТ проводили после 12 ч голодания. Образцы крови были взяты из кончика хвоста через 0, 15, 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы через желудочный зонд (2 мг/г массы тела) с лейцином, глицином, DT-109 или другими соединениями на основе глицина или без них в указанных дозировках (0,17-1 мг/г массы тела). Концентрации глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра крови и тест-полосок (Contour Next).

(xix) Состав тела и комплексная система мониторинга лабораторных животных (CLAMS).

Все измерения были выполнены в Центре фенотипирования животных Мичиганского университета. Жировую массу тела, безжировую массу тела и свободные жидкости измеряли с помощью анализатора на основе ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (Minispec LF90II; Bruker Optics). Анализатор ежедневно проверяли с использованием эталонного образца в соответствии с рекомендациями производителя. Мышей по отдельности помещали в измерительную трубку с минимальным ограничением. Потребление кислорода (VO₂), выработку углекислого газа (VCO₂) и двигательную активность измеряли с помощью CLAMS (Columbus Instruments), встроенного калориметра с разомкнутой цепью, оснащенного устройством оптического контроля активности. Перед измерениями мышей взвешивали и по отдельности помещали в герметичные камеры (7,9 дюйма на 4 дюйма на 5 дюймов) со свободным доступом к пище и воде. Исследование проводили в экспериментальном помещении с температурой 20-23°C с 12-12-часовыми циклами темнота-свет (18:00~6:00). Измерения проводили непрерывно в течение 48 ч. В это время животные получали пищу и воду через устройства для кормления и поения, расположенные внутри камеры. VO₂ и VCO₂ в каждой камере отбирали последовательно в течение 5 с с 10-минутными интервалами, а двигательную активность регистрировали каждую секунду в X- и Z-измерениях. Скорость воздушного потока через камеры регулировали таким образом, чтобы в состоянии покоя кислородный дифференциал составлял около 0,3%. Частоту респираторного обмена (RER) рассчитывали как VCO₂/VO₂. Общий расход энергии, окисление глюкозы и окисление жиров рассчитывали на основе значений VO₂, VCO₂ и расщепления белков.

(xx) Анализ фекального микробиома.

Общую геномную ДНК микробиоты кишечника экстрагировали из образцов фекалий с использованием набора QIAamp DNA Stool Mini Kit (51540, Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. ДНК была подготовлена для анализа сообщества, как описано ранее. 17 Вкратце баркодированные дважды индексирующие праймеры, специфичные для области V4 гена 16S рРНК, использовали для амплификации ДНК. 18 Реакционные смеси для ПЦР состояли из 5 мкл 4 мкМ набора эквимольных праймеров, 0,15 мкл ДНК-полимеразы высокой точности AccuPrime Taq, 2 мкл 10-кратного буфера II для ПЦР AccuPrime (Thermo Fisher Scientific 12346094), 11,85 мкл воды для ПЦР и 1 мкл ДНК-матрицы. Условия ПЦР: 2 мин при 95°C, затем 30 циклов при 95°C в течение 20 с, 55°C в течение 15 с и 72°C в течение 5 мин, а затем при 72°C в течение 10 мин. Каждую реакцию смесь для ПЦР нормализовали с использованием набора для нормализации SequalPrep (Thermo Fisher Scientific A1051001). Нормализованные реакционные смеси объединяли и количественно оценивали с использованием набора для количественной оценки библиотек Капа Biosystems qPCR MasterMix Quantification Kit (ROX Low) для платформ Illumina (KK4873). Agilent Bioanalyzer использовали для подтверждения размера библиотеки ампликонов (~399 п.н.) с помощью набора для высокочувствительного анализа ДНК (5067-4626). Затем объединенную библиотеку ампликонов секвенировали на платформе Illumina MiSeq NANO (Лаборатория молекулярной биологии микробных систем, Мичиганский университет) в соответствии со стандартными протоколами.

Данные ДНК-секвенирования были обработаны с использованием Mothur в соответствии с SOP и сосредоточены в первую очередь на анализе α - и β -разнообразия. Последовательности были обрезаны для удаления праймеров и баркодов, отфильтрованы по качеству, а химеры проверены, как описано ранее. Для дальнейшего статистического анализа использовали в общей сложности 3565 последовательностей в каждом образце. Обрезанные последовательности ДНК были сгруппированы с использованием подхода среднего соседа для формирования операционных таксономических единиц (ОТЕ) с отсечкой сходства последовательностей 97% (расхождение последовательностей 3%). Филогенетические деревья были построены с помощью программы Clearcut. Для определения бета-разнообразия использовали подход на основе ОТЕ. Тепловая карта относительной численности каждой ОТЕ во всех образцах была создана с использованием шкалы log₂ значений относительной численности 107 верхних ОТЕ (>1%). Молекулярный статистический дисперсионный анализ был выполнен для определения значимости структурного сходства среди сообществ в группах образцов. Анализ UniFrac использовали для оценки взвешенных (WUnF) и невзвешенных (UWUnF) показателей UniFrac. Была рассчитана ограниченная ординация RDA (анализ избыточности), а значимость переменных среды была проверена с помощью анализа методом прямого отбора. Характеристику признаков микроорганизмов, дифференцирующих микробиоту кишечника, выполняли с помощью алгоритма размера эффекта линейного дискриминантного анализа (ЛДА) (LEfSe) (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>) для обнаружения биомаркеров, что подчеркивает как статистическую значимость, так и биологическую значимость. Для результатов анализа главных компонент (PCA) был построен график соответственно с использованием пакета Phyloseq в R. Корреляции между изменениями в измененных родах бактерий и параметрами, связанными с НАЖБП, в печени или плазме рассчитывали с использованием непараметрического критерия Спирмена.

(xxi) Исследования *in vitro*.

Клеточную линию гепатомы человека HepG2 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, Gibco) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Sigma-Aldrich) и 1% пенициллина и

стрептомицина (Pen-Strep, Gibco). В некоторых экспериментах клетки загружали пальмитиновой кислотой (PA, 200 мкМ, Sigma-Aldrich P0500) в DMEM без FBS, но с добавлением 0,1% BSA. кРНК, нацеленную на AGXT1 (siAGXT1: GCAAGGAUAUGUACCAGAUtt, кРНК, ID s1190), и ненацеливающий контроль кРНК (siCTL, кРНК, ID AM4611) были получены от Ambion. Клетки HepG2 трансфицировали 20 нМ siAGXT1 или siCTL с использованием липофектамина RNAiMAX (Invitrogen) в среде Opti-MEM с пониженным содержанием сыворотки (Gibco) в соответствии с протоколом производителя. Выделение РНК, экстракцию белков или липидов проводили через 48 ч после трансфекции. Общую РНК очищали из клеток HepG2 с использованием набора QIAGEN's RNeasy (QIAGEN). Анализ методом кПЦР выполняли, как описано выше, с использованием пар человеческих праймеров, перечисленных в табл. S3. Клетки лизировали с использованием буфера RIPA (Thermo Scientific) с добавлением коктейля ингибиторов протеазы/фосфатазы (Roche Applied Science). Содержание белка AGXT1 оценивали с помощью вестерн-блоттинга, как описано выше. Экстракцию клеточных липидов из клеток проводили с использованием гексана: изопропанола в соотношении 3:2, а гексановую фазу оставляли для испарения в течение 48 ч. Оставшиеся клетки в планшетах разрушали в 0,1 М NaOH в течение 24 ч и отбирали аликвоту для измерения клеточного белка с помощью анализа белка по Брэдфорду (Bio-Rad). Содержание клеточных ТГ или ОХ определяли спектрофотометрическим методом с использованием имеющихся в продаже наборов (Wako Chemicals). Данные о клеточном ТГ и ОХ были нормализованы к уровням белка и представлены в мкг ТГ или ОХ/мг белка.

Н. Результаты.

(i) Нарушение биосинтеза глицина при НАЖБП у мышей и человека.

Чтобы проверить, влияет ли измененный метаболизм глицина на развитие НАЖБП, мы сначала изучили C57BL/6J с индуцированным 3Д СП. После 12 недель кормления 3Д были очевидны гиперхолестеринемия (фиг. 10А) и СП, подтвержденные окрашиванием гематоксилином и эозином и Oil Red O (ORO) и количественным определением печеночного ТГ и общего холестерина (ОХ) (фиг. 10В-10D). Направленный метаболомический анализ показал, что среди всех АК, глицин в плазме был наиболее значительно снижен, в то время как его предшественники серин, треонин и аланин были заметно повышены (фиг. 10Е), что указывает на нарушение биосинтеза глицина. Соответственно мы затем изучили экспрессию генов, управляющих образованием глицина. Мы обнаружили, что экспрессия ключевых генов биосинтеза глицина снижалась у мышей с СП, среди которых наиболее значительно подавлялась экспрессия AGXT1 (фиг. 10F). Кроме того, в клетках HepG2 с накоплением ТГ, индуцированным пальмитиновой кислотой (ПК), заметно снижалась экспрессия AGXT1 (фиг. 10G, 10H).

Чтобы проверить, проявляется ли подобная картина при более тяжелой НАЖБП, мы выполнили РНК-секвенирование печеней мышей с прогрессирующим НАСГ и фиброзом, индуцированным 24-недельным кормлением НАСГ-диетой (фиг. 10I). Анализ путей выявил изменения в известных путях, вовлеченных в НАСГ, включая активацию хемокина, NF-κB, Toll-подобного рецептора (TLR) и трансформирующего фактора роста-β (ТФР-β), а также подавление деградации ЖК и сигналинга рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, (РАПП) (фиг. 10J). Интересно, что пути, регулирующие биосинтез АК, включая метаболизм глицина, серина, треонина и глиоксилата, были значительно подавлены при НАСГ, включая подавление AGXT1 ($P=0,0009$, фиг. 10K). При использовании независимой когорты мышей с НАСГ, индуцированной диетой, подавление AGXT1 было подтверждено с помощью кПЦР (фиг. 10L).

Чтобы проверить, подавляются ли гены биосинтеза глицина аналогичным образом при НАЖБП человека, мы провели мета-анализ, основанный на транскриптомном анализе печени пациентов с НАСГ. Мы обнаружили, что экспрессия AGXT1 ($\beta=-0,141$, $P=0,0041$) и AGXT2 ($\beta=-0,134$, $P=0,0135$) значительно снижалась при НАСГ, тогда как экспрессия оксидазы D-аминокислот (DAO), которая катализирует деградацию глицина до глиоксилата, заметно повышается ($\beta=0,216$, $P=0,0025$, фиг. 10M). Среди 206 образцов, полученных от доноров после трансплантации печени, мы обнаружили, что экспрессия AGXT1 обратно коррелировала с содержанием жира в печени ($r=-0,199$, $P=0,0044$, фиг. 10N). Интересно, что аналогичная обратная корреляция была обнаружена между экспрессией PPAR-α (главный регулятор ОЖК печени) и содержанием жира в печени ($r=-0,154$, $P=0,0275$), тогда как экспрессия лиганда 5 хемокина, содержащего C-C мотив (CCL5) и ТФР-β, ключевых участников стеатогепатита и фиброза, положительно коррелировала с содержанием жира в печени ($r=0,185$, $P=0,0078$ и $r=0,284$, $P<0,0001$ соответственно; не показано). Эти результаты согласуются с недавними сообщениями о более низком уровне циркулирующего в крови глицина при НАЖБП в отношении супрессии генов биосинтеза глицина и указывают на роль AGXT1 в НАЖБП.

(ii) Утрата AGXT1 усугубляет индуцированную диетой гиперлипидемию и НАСГ.

Чтобы изучить потенциальную роль AGXT1, специфичного для печени гена, локализованного в пероксисоме или митохондриях гепатоцитов, в накоплении клеточных липидов, мы осуществили нокадаун AGXT1 в клетках HepG2, что увеличило ПК-индуцированное накопление ТГ (фиг. 8С-8Е). Чтобы изучить эффекты утраты AGXT1 *in vivo*, мы получали AGXT1^{-/-} мышей с использованием CRISPR/Cas9 (фиг. 8А, 8В). При кормлении СД гистология AGXT1^{-/-} печени была сопоставима с гистологией

AGXT1^{+/+}, как указано ранее, и мы дополнительно обнаружили, что ферменты печени в плазме также были сопоставимы (фиг. 8F-8K). Однако через 12 недель на НАСГ-диете у AGXT1^{-/-} мышей наблюдали повышение ТГ, ОХ, АСТ и АЛТ в плазме (фиг. 8L-8O), в то время как отношение глицина к оксалату значительно снизилось (фиг. 8P). На макроскопической картине брюшных полостей обнаружена более крупная печень с усиленной желтоватой окраской у AGXT1^{-/-} мышей (фиг. 11A). Хотя никаких значительных различий в массе тела отмечено не было, масса печени значительно увеличилась (фиг. 11B, 11C, 11D). Окрашивание гематоксилином и эозином и ОРО в комбинации с количественной оценкой липидов печени выявило повышенный СП у AGXT1^{-/-} мышей (фиг. 11A, 11E, 11F), а окрашивание Сириусом красным выявило усиление фиброза (фиг. 11A). Дальнейший гистологический анализ подтвердил более высокий балл для NAS и шкалы фиброза у AGXT1^{-/-} мышей (фиг. 11G, 11H, 11I).

Чтобы понять основные механизмы ускоренного индуцированного диетой НАСГ у AGXT1^{-/-} мышей, мы выполнили РНК-секвенирование печеней AGXT1^{+/+} и AGXT1^{-/-} мышей с последующей проверкой при помощи количественной ПЦР. Анализ путей выявил подавление энергетического метаболизма и путей ОЖК у AGXT1^{-/-} мышей, в то время как провоспалительные пути были активированы (фиг. 11J). Экспрессия генов, регулирующих пероксисомальную (ацил-КоА-тиоэстераза-3, ACOT3, среднепочечная ацил-КоА-синтаза 5, ACSM5, длиннопочечная ацил-КоА-синтаза 1, ACSL1,) и митохондриальное ОЖК (гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа-альфа, HADHA, и ацетил-КоА-ацилтрансфераза-2, ACSAA2) значительно снижалась у AGXT1^{-/-} мышей (фиг. 11K-11M, хотя и незначительно для PAPP-α, P=0,0557), тогда как экспрессия генов, кодирующих регуляторы провоспалительного сигналинга (NFKB1/2, RELB, CCR2/5 и TLR2/4), цитокинов (ФНО-α и CCL2), фиброгенеза (TGFB1/2 и TGFB2) и ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ) (COL1A2, COL4A2 и TIMP1), была значительна повышена (фиг. 11N, 11O). Таким образом, AGXT1, ген биосинтеза глицина, специфичный для печени, подавляется при НАЖБП, и его дефицит ускоряет индуцированный диетой НАСГ.

(iii) Дефицит глицина усугубляет индуцированную диетой гиперлипидемию и СП.

Более низкие уровни глицина в плазме связаны с НАЖБП и кардиометаболическими заболеваниями, а более высокие уровни связаны с благоприятным липидным профилем. Чтобы исследовать роль диетического глицина в дислипидемии, мы разработали АК-модифицированную ЗД с глицином или без него (ЗД_{АК}+Gly или ЗД_{АК}-Gly, табл. S2) и кормили гиперлипидемических ApoE^{-/-} мышей СД, ЗД_{АК}+Gly или ЗД_{АК}-Gly в течение 10 недель. Значительное снижение уровня глицина в плазме было обнаружено у мышей, получавших ЗД_{АК}-Gly (фиг. 12A). Анализ состава тела на основе ЯМР и CLAMS продемонстрировал увеличение массы тела и жира у мышей, получавших ЗД_{АК}-Gly, но не у мышей, получавших ЗД_{АК}+Gly (фиг. 12B-12D), без значительных изменений в потреблении пищи, активности или энергетическом метаболизме (фиг. 12E-12H). Соответственно уровень молекулы глицинсодержащего трипептида в плазме увеличивался у мышей, получавших ЗД_{АК} A-Gly (фиг. 12I), а повышенную гипертрофию адипоцитов наблюдали в эпидидимальной и подкожной жировой ткани (ЭЖТ и ПЖТ, фиг. 12J). По сравнению с ЗД_{АК}+Gly, мыши, получавшие ЗД_{АК}-Gly, имели повышенные ОХ и ТГ в плазме (фиг. 13A-13D). Повышенный уровень глюкозы в плазме был отмечен у мышей, получавших ЗД_{АК}-Gly, но не у мышей, получавших ЗД_{АК}+Gly (фиг. 13E). Гистология и количественный анализ липидов показали увеличение СП после кормления ЗД_{АК}-Gly (фиг. 13F-13H). Линейные регрессионные анализы продемонстрировали значительную обратную корреляцию между отдельными уровнями глицина в плазме и ОХ в плазме, глюкозы или ТГ в печени (фиг. 13I-K). Таким образом, дефицит глицина в пище усугубляет гиперлипидемию, гипергликемию и СП у гиперлипидемических мышей.

(iv) DT-109: трипептид на основе глицина с двойными глюкозоснижающими/липидснижающими свойствами.

Принимая во внимание вышеизложенные данные, мы пришли к выводу, что соединения на основе глицина могут иметь терапевтический потенциал благодаря двойному глюкозоснижающему/липидснижающему эффекту. Таким образом, мы искали соединения со структурным сходством с глицином, применяя различные химические модификации по аминокетильным группам. Было идентифицировано десять потенциальных соединений (фиг. 9A-9K), четыре из которых подходили для перорального введения. Было показано, что длительный прием глицина (1 мг/г/сутки) снижает циркулирующие в крови ТГ у ApoE^{-/-} мышей, восстанавливает толерантность к глюкозе и ускоряет потерю жира у мышей C57BL/6 с ожирением. У людей прием глицина вместе с глюкозой снижал повышение уровня глюкозы в плазме на >50%. Чтобы проверить глюкозоснижающие эффекты мы провели пероральные тесты на толерантность к глюкозе (ПГТТ) у мышей C57BL/6J, которым вводили глицин или соединения на основе глицина (0,5 мг/г). Ни одно из тестируемых соединений не ослабляло повышение уровня глюкозы в крови более эффективно, чем глицин (фиг. 14A-14D). Другой АК, по сообщениям, снижающей уровень глюкозы у людей и мышей, является лейцин. Предыдущие исследования, проведенные в нашей лаборатории, выявили сильные глюкозоснижающие эффекты DT-109, глицинового трипептида в комбинации с лейцином (gly-gly-L-leu). Мы протестировали DT-109 или его D-изомер (gly-gly-D-leu, DT-110) с использованием ПГТТ. В то время как глюкозоснижающие эффекты DT-110 были аналогичны глицину, DT-109 было единственным соединением, которое снижало глюкозу более эффективно, чем гли-

цин (фиг. 14E, 14F), особенно по сравнению с эквивалентными уровнями его отдельных АК (фиг. 14G).

Чтобы проверить липидснижающие эффекты, мы кормили гиперлипидемических ApoE^{-/-} мышей 3Д с пероральным введением DT-109 (1 мг/г/сутки), эквивалентными уровнями лейцина, глицина или H₂O (фиг. 15A). Через 10 недель DT-109 оказывал наиболее сильные глюкозоснижающие эффекты как для ПГТТ, так и для уровня глюкозы не натощак (фиг. 15B, 15C). Никаких существенных различий в потреблении пищи или массе тела не наблюдали (фиг. 15D, 15E). Анализы липидного профиля показали, что у мышей, получавших DT-109, были самые низкие ОХ и ЛПНП без снижения ЛПВП, отмеченного у мышей, получавших глицин (фиг. 15F-15I), и значительных различий в ТГ в плазме (фиг. 15J). Глицин или DT-109 снижали уровень молекул глицинсодержащего трипептида и снижали гипертрофию адипоцитов в ЭЖТ и ПЖТ (фиг. 15K, 15L). Гистология и количественный анализ липидов показали снижение СП в печени мышей, получавших глицин или DT-109, но не лейцин (фиг. 16A-16C). Анализ методом кПЦР выявил повышенную экспрессию ключевых генов, регулирующих ОЖК, в печени мышей, получавших глицин или DT-109 (РАПП-α, PNPLA2, карнитин/ацилкарнитинтранслоказа, САСТ, карнитинпальмитилтрансфераза Ia, СРТ1a и длинноцепочечная ацил-КоА-дегидрогеназа, АСАДL) и снижение экспрессии ССL2 без значительных изменений ФНО-α (фиг. 16D). Таким образом, DT-109 обладает двойными глюкозоснижающими/липидснижающими свойствами и предотвращает индуцированный 3Д СП у гиперлипидемических мышей.

(v) DT-109 улучшает состав тела и защищает от НАСГ, индуцированного диетой.

Для дальнейшего изучения терапевтического потенциала DT-109 против НАСГ мы разработали экспериментальный подход к моделированию прогрессирующей НАЖБП (фиг. 17A). У мышей C57BL/6J, получавших НАСГ-диету в течение 12 недель, наблюдались повышенные плазменные уровни глюкозы, ОХ, АСТ и АЛТ по сравнению с кормлением СД (фиг. 17B). Подгруппу мышей умерщвляли для подтверждения увеличения массы печени после кормления НАСГ-диетой (фиг. 17C). Гистология с использованием H&E и ОRO выявила СП, баллонирование гепатоцитов и инфильтрацию воспалительных клеток, в то время как окрашивание Сириусом красным подтвердило фиброз ранней стадии (фиг. 17D). После подтверждения НАСГ (фиг. 17D-17F) остальные мыши были рандомизированы для получения DT-109 в дозах 0,125 или 0,5 мг/г/сутки, эквивалентных уровней лейцина, глицина или H₂O через желудочный зонд в течение 12 дополнительных недель при НАСГ-диете. Мыши, которым давали СД и вводили H₂O, служили в качестве контроля.

На 18 неделе ПГТТ и измерения уровня глюкозы не натощак подтвердили наиболее сильный глюкозоснижающий эффект для 0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 17G, H). Анализ состава тела выявил повышенную массу тела у всех мышей, получавших НАСГ-диету (фиг. 17I), хотя мыши, получавшие 0,5 мг/г/сутки DT-109, показали уменьшение жировых отложений с сохраненной безжировой массой по сравнению с контролями H₂O (фиг. 17J, 17K) и снижение гипертрофии адипоцитов в ЭЖТ и ПЖТ (фиг. 17L) без значительных различий в потреблении пищи (фиг. 17M). Метаболическая реакция на ожирение, индуцированное диетой, включает сдвиг в сторону более высокого содержания жиров по сравнению с более низким использованием углеводов, что отражается в снижении RER. Анализ CLAMS показал снижение RER во всех группах, получавших НАСГ-диету, но не было отмечено значительных различий у мышей, получавших 0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 17N-17P). Никаких значительных различий в расходе энергии или активности замечено не было (фиг. 17Q, 17R).

В конечной точке увеличение в плазме АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы (ЩФ), наблюдаемое у мышей, получавших НАСГ-диету, ослаблялось лечением глицином или DT-109 (фиг. 18A-18C). Уровень ТГ в плазме снижался у мышей, получавших глицин или DT-109 (фиг. 18D), а ОХ снижался для 0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 18E). Соответственно гепатомегалия, индуцированная НАСГ-диетой, и желтоватое окрашивание были заметно ослаблены лечением глицином или DT-109, но не лейцином (фиг. 18F, 18G, 18H), при этом NAS значительно уменьшился при 0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 18I, 18J). Линейный регрессионный анализ показал очень значимые положительные корреляции между отдельными уровнями АСТ, АЛТ или ЩФ и NAS (фиг. 18K-18M).

(vi) DT-109 реверсируют изменения транскриптома, вызванные НАСГ-диетой: ключевая роль для ОЖК.

Чтобы изучить механизмы, с помощью которых средства для лечения на основе глицина защищает от НАСГ, индуцированного диетой, мы выполнили РНК-секвенирование печеней, взятых в конечной точке. Анализ главных компонент (РСА) показал, что профиль экспрессии генов мышей на НАСГ-диете, получавших лейцин, сгруппировался с контролями H₂O, с промежуточными паттернами для глицина и 0,125 мг/г/сутки, тогда как 0,5 мг/г/сутки DT-109 сгруппировался ближе к мышам с СД (фиг. 19A). Анализ вулканной диаграммы подтвердил основные изменения ДЭГ у мышей, получавших НАСГ-диету и H₂O или лейцин, по сравнению с СД (3606 или 3145 ДЭГ соответственно), которое заметно снижалось при лечении глицином или DT-109 в дозе 0,125 или 0,5 мг/г/сутки (1300, 1093 или 642 ДЭГ соответственно; фиг. 19B). Анализ верхних 50 ДЭГ дополнительно подчеркивает сходство DT-109 (0,5 мг/г/сутки) с группой СД (фиг. 19C). Анализ путей, сравнивающий контроль НАСГ-диеты с H₂O и СД, подтвердил подавление путей, регулирующих биосинтез глицина и метаболизм глиоксилата, со снижением синтеза

AGXT1, SHMT1 и SARDH, наряду с энергетическим метаболизмом и путями ОЖК. Напротив, известные провоспалительные/фиброзные пути, связанные с НАСГ, были активированы (фиг. 19D, E). Анализ путей, сравнивающий контроль НАСГ-диеты с H₂O с 0,5 мг/г/сутки DT-109, продемонстрировал аналогичный паттерн, что и СД, указывая на то, что DT-109 реверсирует индуцированные НАСГ-диетой изменения основных путей (фиг. 19F). Анализ 50 генов, участвующих в основных аспектах патогенеза НАСГ (фиг. 19G), продемонстрировал, что ключевые гены, регулирующие ОЖК (РАПП- α , РАПП-гамма-коактиватор-1 α (PPARGC1A/PGC1 α), ацил-КоА=оксидаза-1 (ACOX1), CPT2, ACADS/M/L, HADHA/B и ACOT3/4) были чрезмерно представлены у мышей СД и подавлены у мышей НАСГ, получавших H₂O или лейцин. Это было устранено лечением глицином или DT-109, в частности 0,5 мг/г/сутки, что подтверждено анализами при помощи кПЦР и вестерн-блоттинга (фиг. 19H, 19I, 19J). Соответственно ОРО и количественный анализ липидов подтвердили отмеченный СП в печени мышей с НАСГ, получавших H₂O или лейцин, который был значительно ослаблен глицином или DT-109 (фиг. 19K, 19L, 19M). В частности, диацилглицерина (ДАГ), которые, как известно, способствуют повреждению печени и НАСГ, были значительно снижены при помощи 0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 19N). Таким образом, средство для лечения на основе глицина корректирует нарушенное ОЖК, снижает СП, индуцированный НАСГ-диетой, и снижает уровни липотоксических липидов.

(vii) DT-109 снижает воспаление и фиброз печени, индуцированное НАСГ.

Анализ методом РНК-секвенирования выявил подавление ключевых воспалительных путей/генов при помощи средства для лечения на основе глицина (фиг. 19F, 19G), что указывает на его противовоспалительную роль. Действительно иммуноокрашивание на F4/80, хорошо известного маркера печеночных макрофагов, было значительно увеличено в печени мышей, получавших H₂O или лейцин с НАСГ-диетой, но ослаблено глицином или DT-109 (фиг. 20A, 20B). В плазме хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (MCP-1/CCL2) и резистин, известные воспалительные маркеры у пациентов с НАСГ, были ниже у мышей, получавших глицин или DT-109 (фиг. 20C, 20D). Соответственно РНК-секвенирование выявило, что экспрессия генов, кодирующих регуляторы провоспалительного сигналинга (NFKB1/2, RELB, CCR1/2/5, TLR1/2/4 и TNFRSF1A/9/12) и цитокины (ФНО- α и CCL2/5) была повышена у мышей, получавших НАСГ-диету и H₂O или лейцин, и снижена глицином или DT-109 (фиг. 19G). Это было подтверждено анализами методом кПЦР, в которых экспрессия NFKB2, RELB и ФНО- α была значительно снижена или глицином, или DT-109, тогда как экспрессия CCL2, CCR2 и CCR5 снижалась только при помощи 0,5 мг/г/сутки DT-109 (фиг. 20E).

РНК-секвенирование также продемонстрировало, что экспрессия компонентов путей/генов, связанных с сигналингом ТФР- β (TGFB1/2 и TGFB2/2) и ремоделированием ВКМ (COL1A1/1A2/3A1/4A1/4A2, TIMP1/2 и SERPINE1), повышается НАСГ-диетой и ослабляются глицином или DT-109 (фиг. 19F, 19G). Действительно гистологический анализ с использованием Сириуса красного и с оценкой фиброза, выявил защитные эффекты глицина или DT-109, но не лейцина, против индуцированного НАСГ-диетой фиброза печени (фиг. 20A, 20F, 20G). Линейный регрессионный анализ продемонстрировал очень значимую положительную корреляцию между отдельными уровнями АСТ, АЛТ или ЩФ и баллом для шкалы фиброза, что указывает на то, что глицин или DT-109 ослабляют повреждение печени, индуцированное НАСГ-диетой (фиг. 20H, 20I, 20J). Чтобы проверить, ослабляет ли средство для лечения на основе глицина ТФР- β -опосредованный фиброз печени, мы затем проанализировали сигналинг SMAD и обнаружили снижение фосфорилирования SMAD2 Ser465/467, в основном с помощью DT-109 (фиг. 20K). Анализы методом кПЦР подтвердили, что экспрессия генов, связанных с ТФР- β , значительно повышалась в печени у мышей с НАСГ, которым вводили H₂O или лейцин, который ослаблялся при помощи DT-109 (фиг. 20L). Таким образом, в соответствии со снижением СП и липотоксичности, 2 средство для лечения на основе глицина снижает стеатогепатит и фиброз, индуцированные НАСГ-диетой.

I. Обсуждение.

В то время как аномальный метаболизм липидов и глюкозы является известным признаком НАЖБП, предполагается, что нарушения метаболизма АК могут быть связаны с НАСГ. В частности, у пациентов с НАЖБП постоянно сообщается о сниженном уровне циркулирующего в крови глицина, но причины сниженного содержания глицина и его терапевтический потенциал остаются неясными. В данном изобретении с использованием генетических и диетических подходов для ограничения доступности глицина, мы предоставляем доказательства причинной роли глицина в развитии НАЖБП.

В поисках потенциальных препаратов на основе глицина для лечения НАЖБП мы определили, что DT-109 обладает двойными глюкозоснижающими/липидснижающими эффектами и эффективно защищает мышей от НАСГ, индуцированного диетой.

Представленные в данном изобретении результаты указывают на то, что более низкие уровни глицина, обнаруженные у пациентов с НАЖБП, связаны с подавлением генов биосинтеза глицина в печени. В частности, как у мышей, так и у человека, мы обнаружили значительное подавление AGXT1, который катализирует превращение глиоксилата в глицин, и показали, что экспрессия AGXT1 обратно коррелирует с содержанием жира в печени у людей. В то время как другие сообщали, что AGXT1 подавляется у пациентов с НАСГ или на мышах, мы впервые сообщаем о причинной роли AGXT1 при НАЖБП. Мута-

ции в AGXT1 ответственны за первичную гипероксалурию 1 типа, индуцированную нарушением превращения гликоксилата в глицин и чрезмерной выработкой оксалата печенью, ведущей к почечной недостаточности. Интересно, что протеомика печени AGXT1^{-/-} мышей показала значительные изменения в метаболических путях глюкозы и липидов, но роль AGXT1 в НАСГ ранее не оценивалась. Используя CRISPR/Cas9, мы получили AGXT1^{-/-} мышей, у которых наблюдали обострение гиперлипидемии и НАСГ уже после 12 недель на НАСГ-диете. Мы определили подавление путей ОЖК, которые, в свою очередь, способствуют стеатогепатиту и фиброзу у AGXT1^{-/-} мышей.

Мы также применили диетические подходы для ограничения доступности глицина и сравнили липидный профиль и СП у гиперлипидемических мышей, получавших 3Д с глицином или без него. Повышенное ожирение, гиперлипидемия и СП, наблюдаемые у мышей, получавших 3Д с дефицитом глицина, соответствуют предыдущим сообщениям, в которых диетический глицин ускорял потерю жира, улучшал толерантность к глюкозе, снижал липиды плазмы или СП на различных моделях грызунов. Интересно, что у пациентов с НАЖБП было обнаружено снижение СП и ферментов печени в плазме крови после приема предшественника глицина серина, хотя и для небольшой выборки и короткого периода лечения. В ходе тщательного исследования с использованием модели прогрессирующей НАЖБП, характеризующейся одновременным стеатогепатитом и фиброзом, мы впервые сообщаем о защитных эффектах лечения глицином с относительно низкой дозой у мышей в 0,33 мг/г/сутки.

Во время поиска соединений на основе глицина ни одно из идентифицированных соединений не снижало уровень глюкозы в плазме более эффективно, чем глицин. Таким образом, мы протестировали комбинации глицина с лейцином, другой АК, которая, как сообщается, снижает уровень глюкозы у людей и снижает СП у мышей. В частности, используя различные модели СД2, наша лаборатория выявила сильные глюкозоснижающие эффекты трипептида gly-gly-L-leu, которые превосходили эффекты свободного глицина, лейцина или их дипептидных комбинаций. Мы впервые показали, что DT-109 также улучшает липидный профиль, СП и НАСГ, используя генетические и диетические модели. Хотя у мышей, получавших эквивалентные уровни лейцина, значительных эффектов не наблюдали, метаболические преимущества были очевидны после лечения глицином. Тем не менее, некоторые результаты, в том числе устойчивое снижение уровня глюкозы, сохранение уровней ЛПВП у гиперлипидемических мышей, предотвращение изменений состава тела, индуцированных НАСГ-диетой, снижение ДАГ в печени и значительное снижение в шкале NAS, были очевидны только при более высоких дозах DT-109. Следует отметить, что значительные преимущества были отмечены также при более низкой дозе DT-109 0,125 мг/г/сутки.

Перегрузка липидами занимает центральное место в патогенезе НАСГ. Когда свободные жирные кислоты поступают в печень в избытке и/или их удаление через ОЖК нарушается, они используются в качестве субстратов для липотоксичных видов, которые вызывают оксидантный стресс и провоспалительные/фиброгенные пути, способствующие стеатогепатиту и фиброзу. Применяя объективный транскриптомный анализ, мы определили ключевые пути ОЖК, подавленные в печени мышей с НАСГ, которые были восстановлены при помощи DT-109 с последующим снижением СП и липотоксических ДАГ. Это указывает на то, что средство для лечения на основе глицина нормализует нарушенное ОЖЖ печени и снижает СП и липотоксичность, что, в свою очередь, может ослабить прогрессирование НАСГ. Действительно используя нашу модель, описывающую стеатогепатит и фиброз, мы обнаружили, что глицин или DT-109 ослабляют индуцированное НАСГ-диетой печеночное/системное воспаление и фиброз, что подтверждается гистологическим анализом, транскриптомикой и анализом плазмы. В соответствии с предыдущими исследованиями сообщалось о противовоспалительном и гепатопротекторном эффектах глицина у мышей с эндотоксемией. У пациентов с СД2 лечение глицином (5 г/сутки) в течение 3 месяцев снижает уровень гемоглобина-A1c и TNFR1 в плазме.

Таким образом, идентификация нарушенного метаболизма глицина при НАЖБП привела к тому, что изобретатели идентифицировали средство для лечения на основе глицина, которое оказалось эффективным при экспериментальной НАЖБП путем модуляции ОЖЖ печени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один пептид, выбранный из Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu, или его фармацевтически приемлемую соль для лечения заболевания печени.
2. Применение по п.1, где заболевание печени выбрано из группы, состоящей из жирового гепатоза, стеатогепатита, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ).
3. Применение по п.2, где заболевание печени выбрано из неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и где Gly-Gly-Leu или Gly-Gly-dLeu значительно снижает уровни триглицеридов в печени или значительно снижает уровень общего холестерина в печени.
4. Применение по п.2, где заболевание печени выбрано из жирового гепатоза и где лечение предотвращает, уменьшает или улучшает стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, атеросклероз и панкреатит.
5. Применение по п.1 для усиления окисления или утилизации липидов в печени, для снижения уровня триглицеридов в крови субъекта, для снижения уровня холестерина в крови у субъекта с гипер-

холестеринемией.

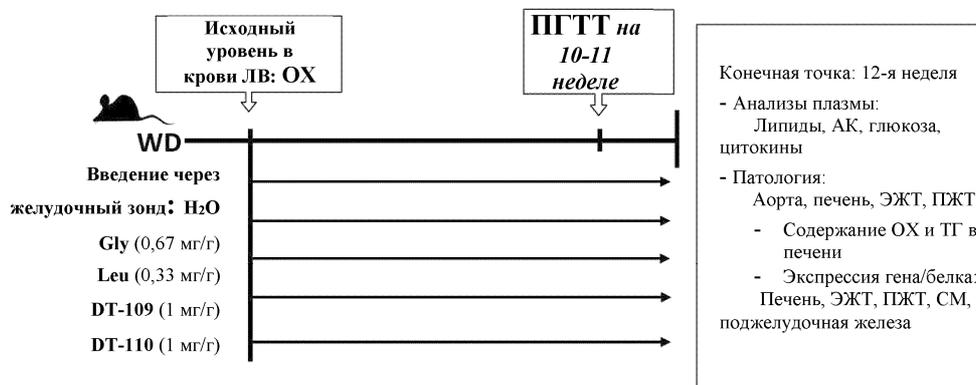
6. Применение по п.1, где лечение заболевания печени снижает фиброз печени.

7. Применение по п.1, где заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) или алкогольный стеатоз печени.

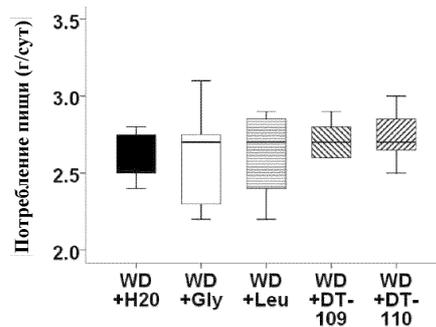
8. Применение по п.7, где лечение стабилизирует или снижает показатель активности НАЖБП (NAS).

9. Применение по п.8, где лечение замедляет прогрессирование, стабилизирует или снижает стеатозный компонент показателя активности НАЖБП (NAS); или замедляет прогрессирование, стабилизирует или уменьшает компонент лобулярного воспаления NAS; или замедляет прогрессирование, стабилизирует или уменьшает компонент набухания гепатоцитов NAS; или любую их комбинацию.

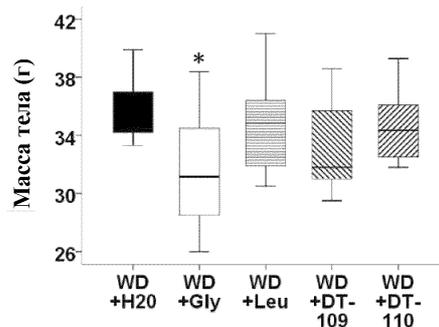
10. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-9, где лечение дополнительно включает введение второго терапевтического агента, выбранного из ингибитора абсорбции холестерина, агониста РАПП-альфа, ингибитора АПФ, блокатора кальциевых каналов, БРА, диуретика, ренина, ГПП-1 или его синтетического варианта, инсулина или его синтетического варианта, метформина, соединения сульфонилмочевины, тиазолидиндиона (ТЗД), ингибитора НЗПГ-2, ингибитора ДПП-4 ингибитора ГМГ-КоА-редуктазы, ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексина типа 9 (PCSK9), эзетимиба, гемфиброзила, фенофибрата, клофибрата, безафибрата, пемафибрата, гемкабена (CI-1027), бемпедоевой кислоты (ETC-1002), ингибитора ацетил-КоА-карбоксилазы, ингибитора АпоС-III, ингибитора АТФ-цитратлиазы, рыбьего жира, отпускаемого по рецепту, ингибитора СЕТР, противомышечного агента и их комбинации.



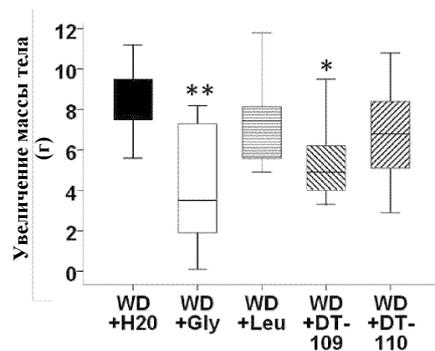
Фиг. 1А



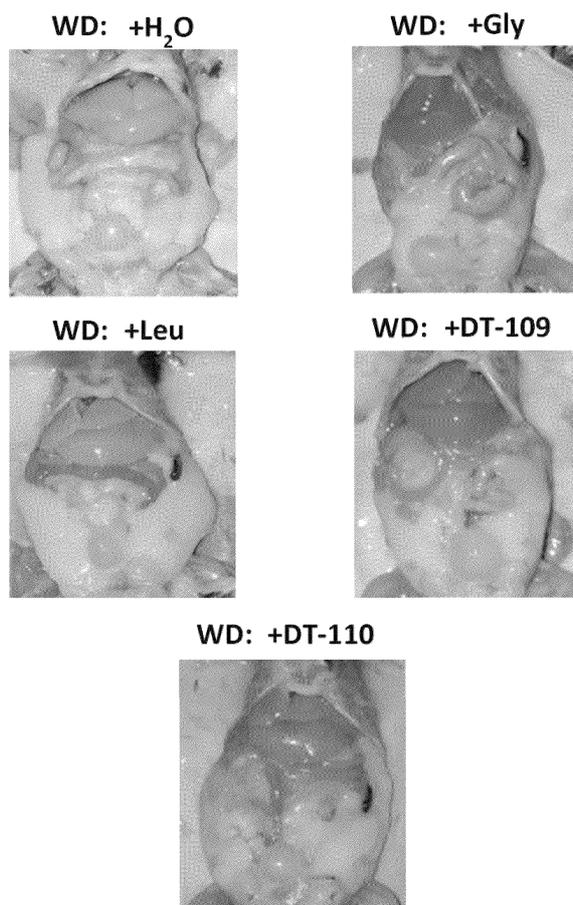
Фиг. 1В



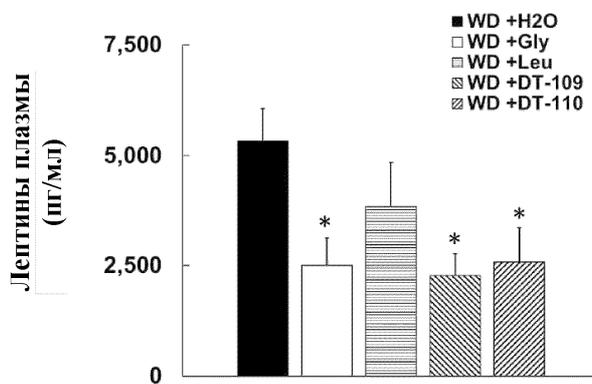
Фиг. 1С



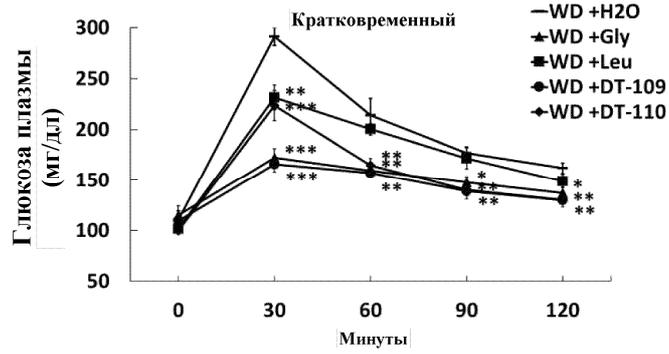
Фиг. 1D



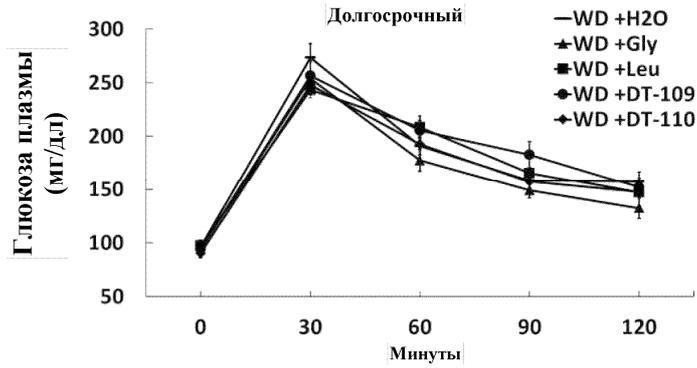
Фиг. 1E



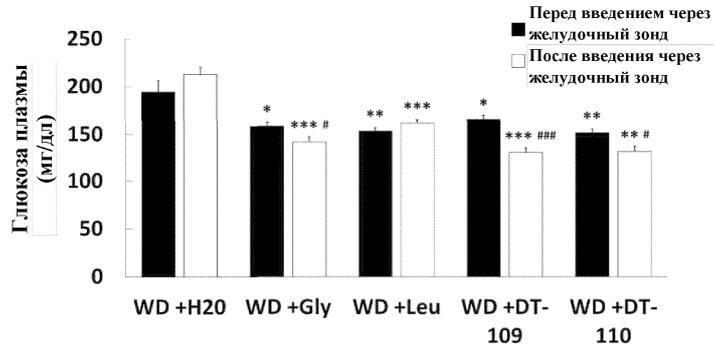
Фиг. 1F



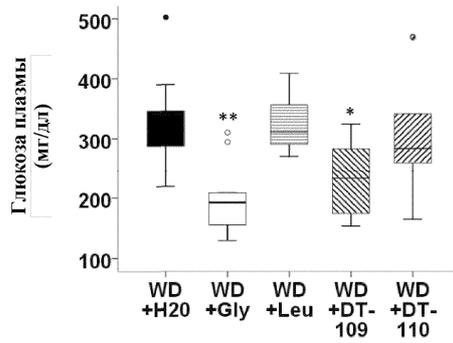
Фиг. 2А



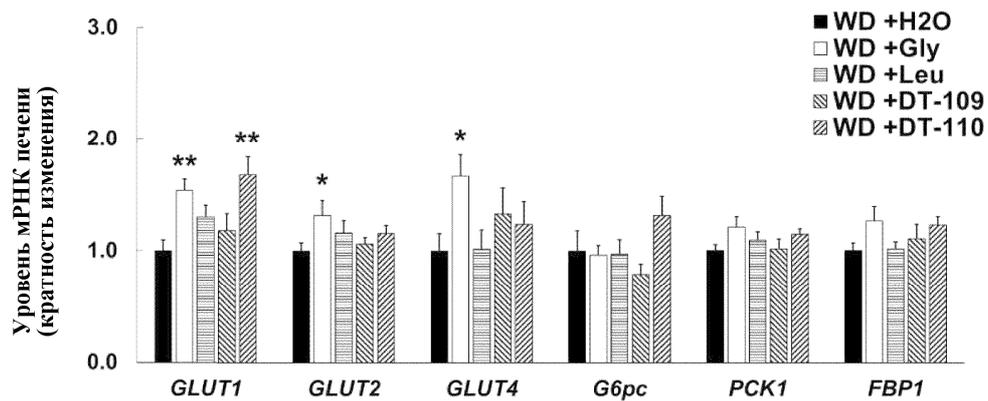
Фиг. 2В



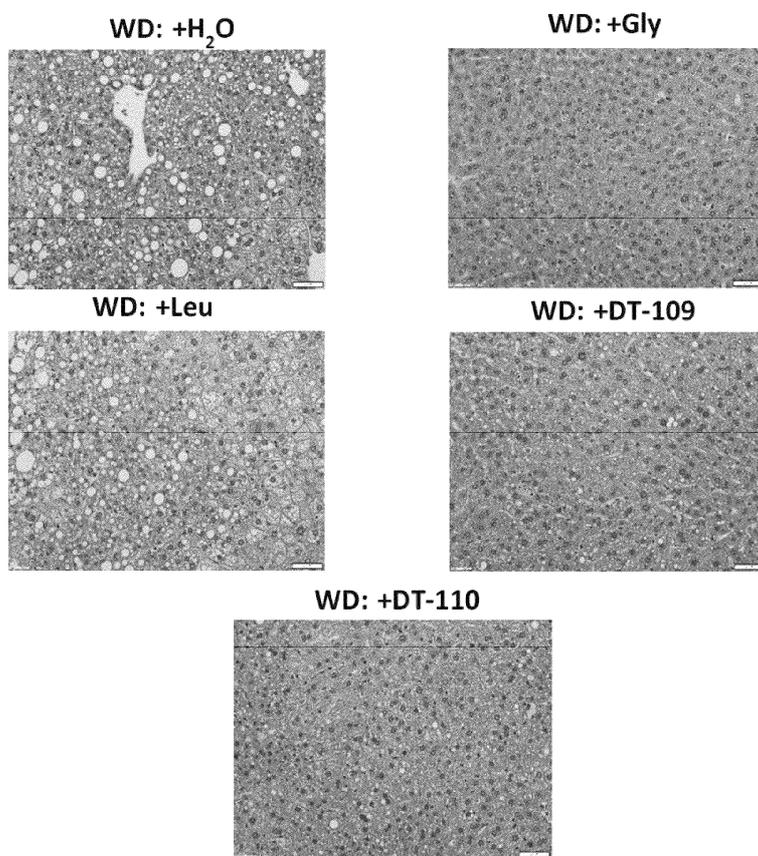
Фиг. 2С



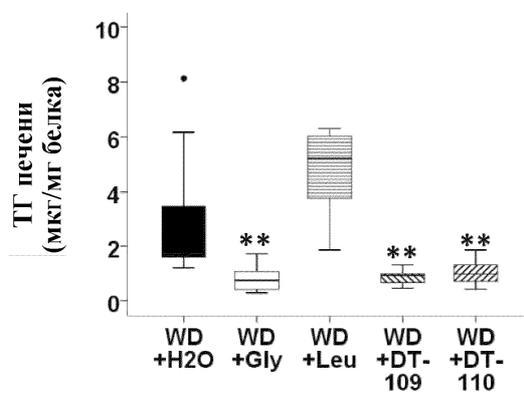
Фиг. 2D



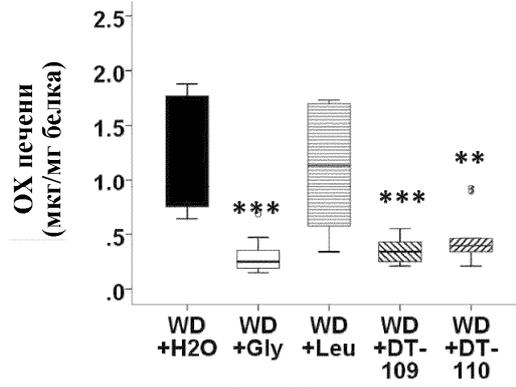
Фиг. 2Е



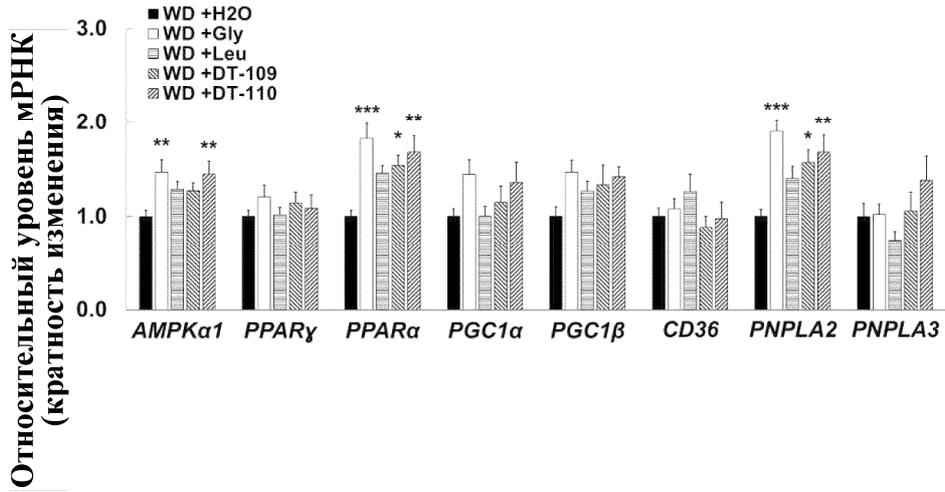
Фиг. 3А



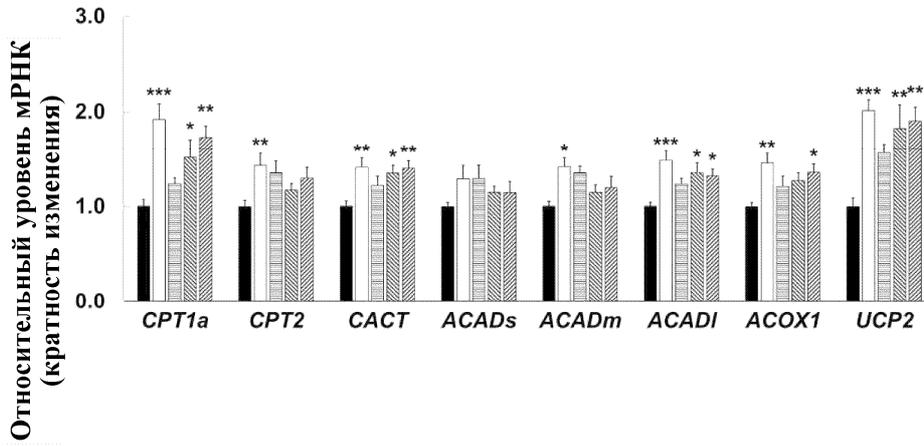
Фиг. 3В



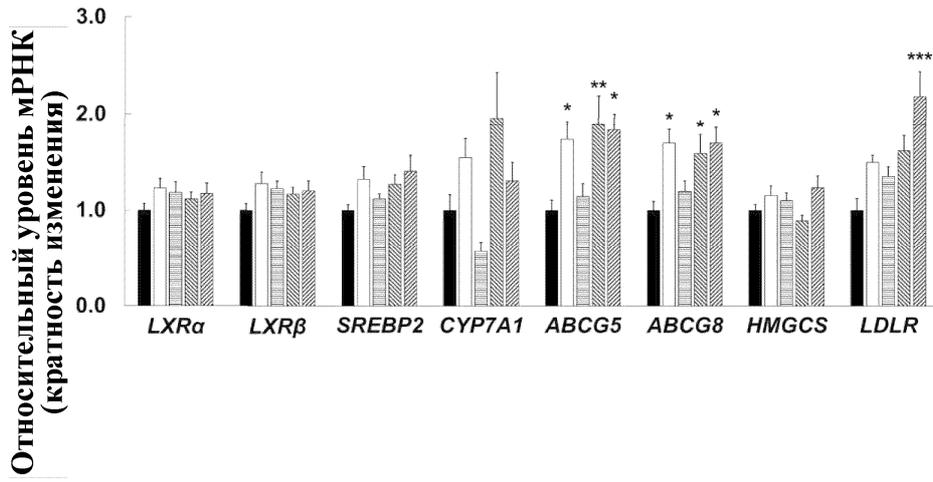
Фиг. 3С



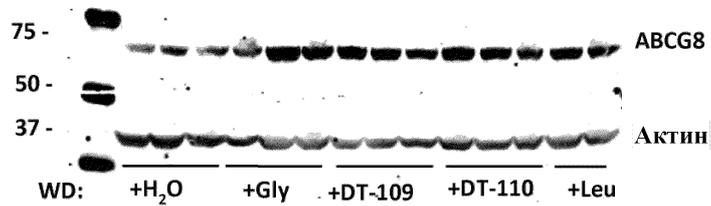
Фиг. 4А



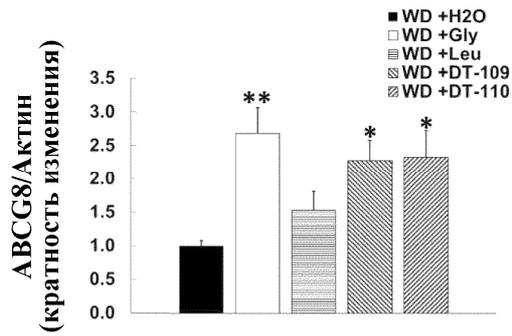
Фиг. 4В



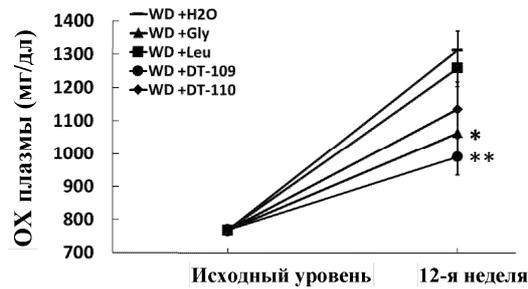
Фиг. 4С



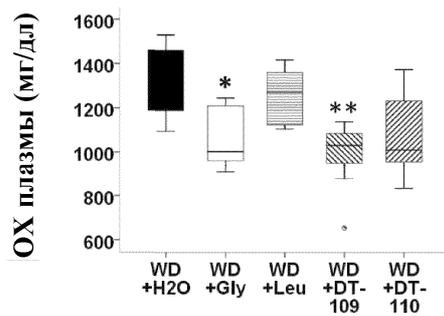
Фиг. 4D



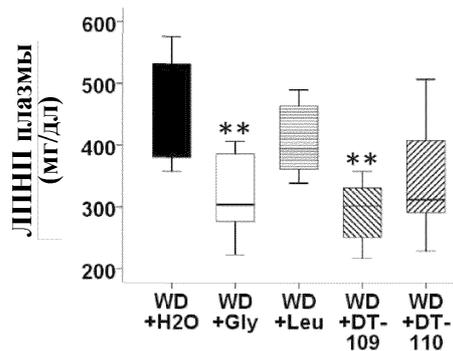
Фиг. 4Е



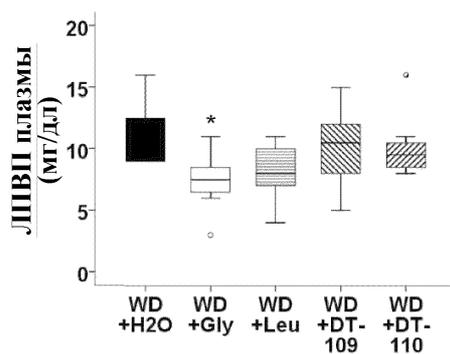
Фиг. 5А



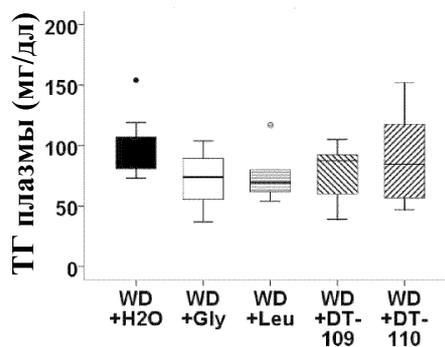
Фиг. 5B



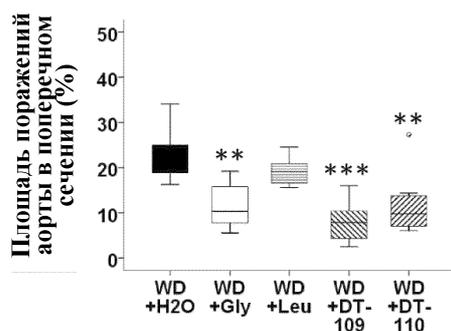
Фиг. 5C



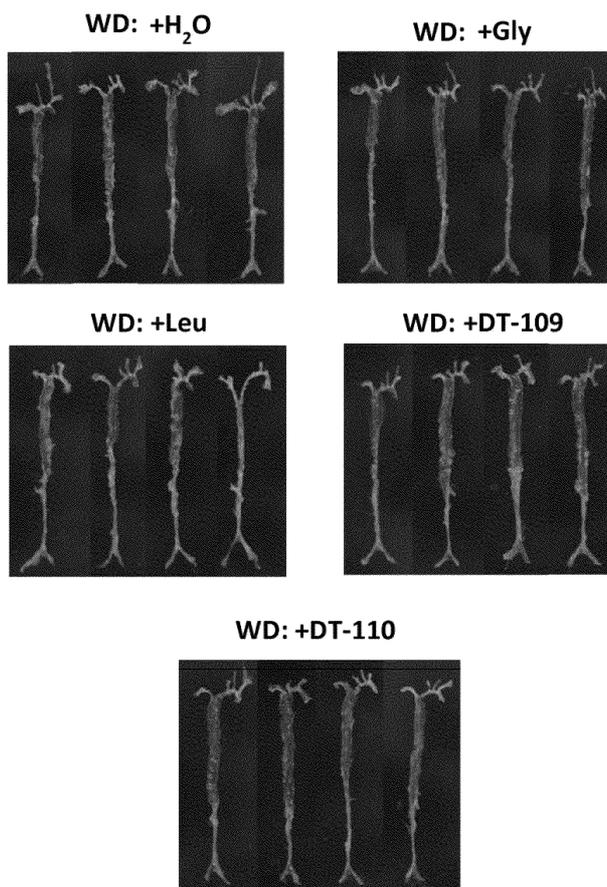
Фиг. 5D



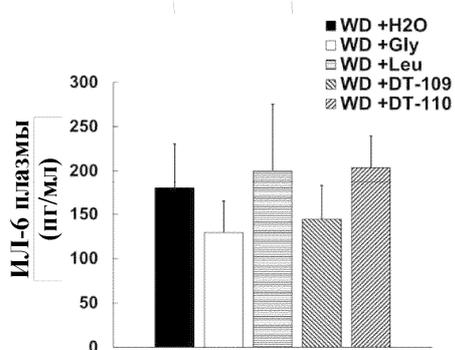
Фиг. 5E



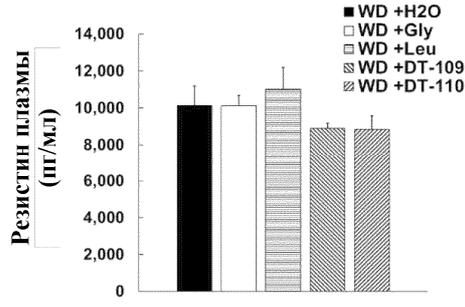
Фиг. 5F



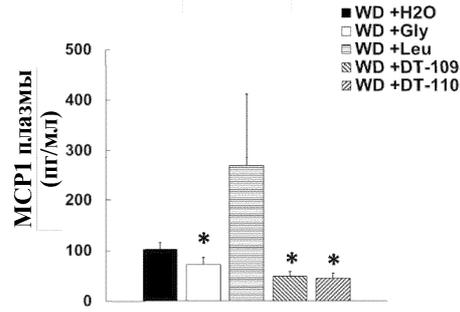
Фиг. 5G



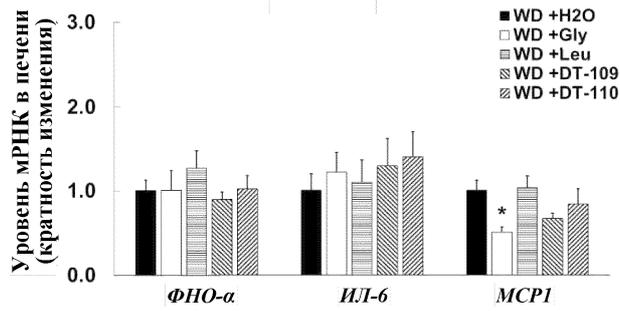
Фиг. 6A



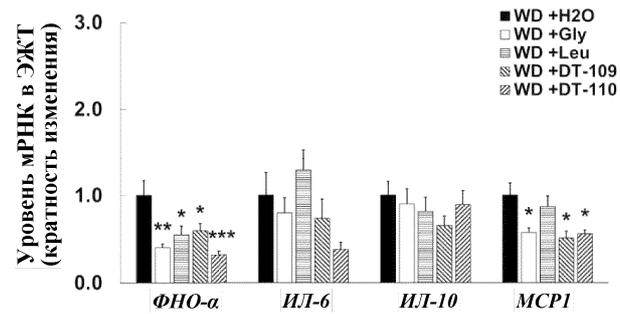
Фиг. 6B



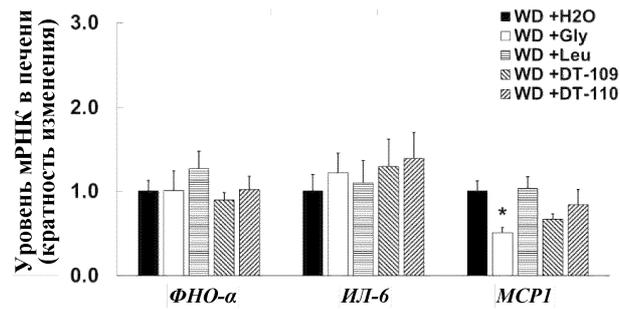
Фиг. 6C



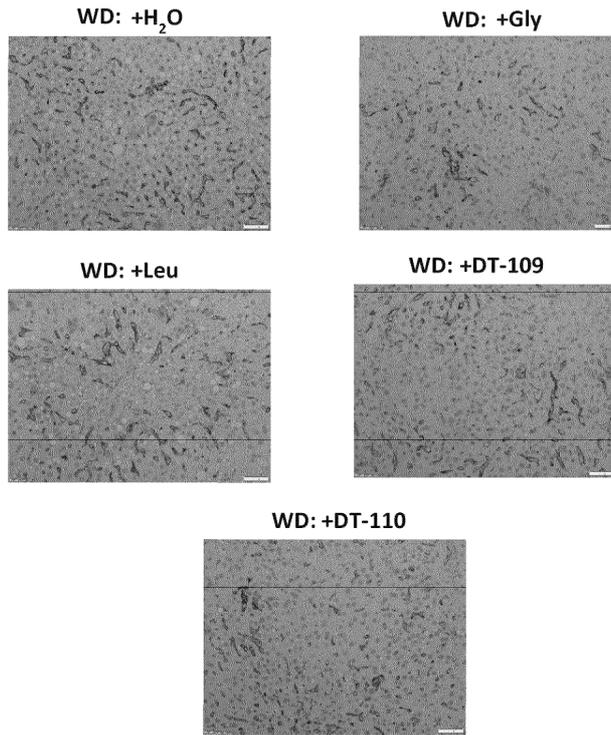
Фиг. 6D



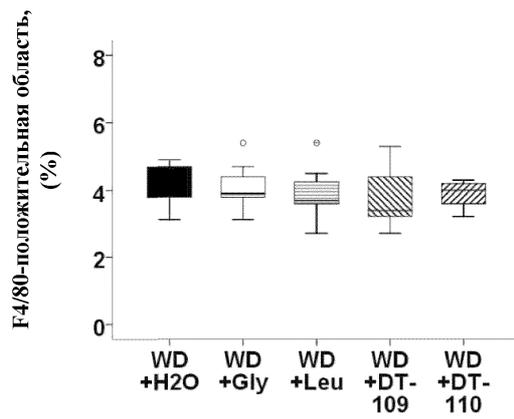
Фиг. 6E



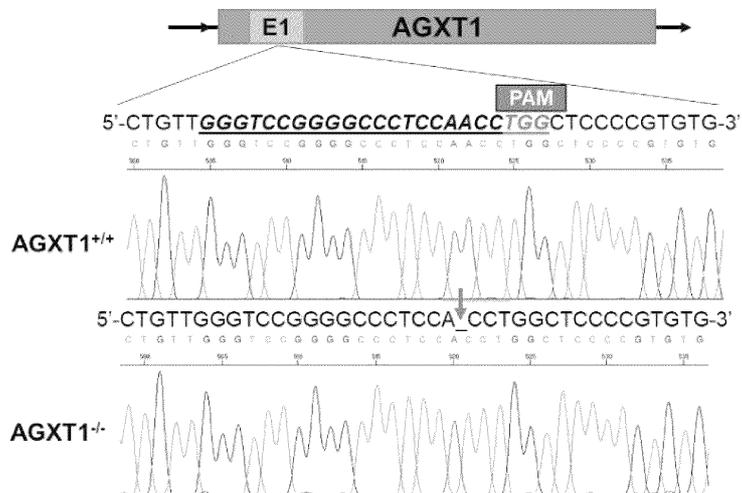
Фиг. 7A



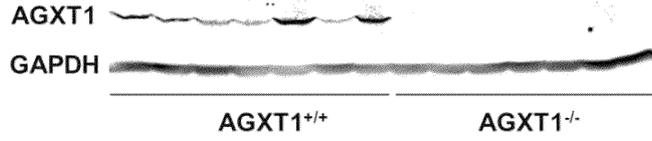
Фиг. 7B



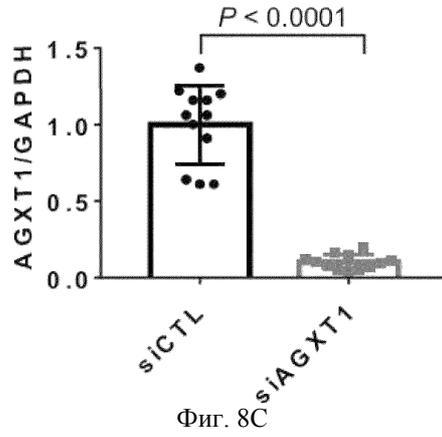
Фиг. 7C



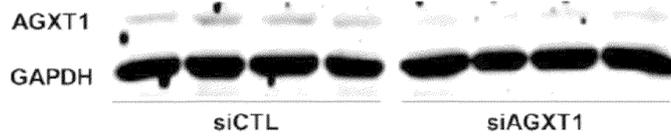
Фиг. 8A



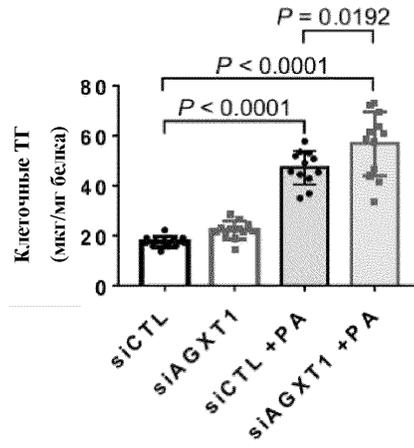
Фиг. 8В



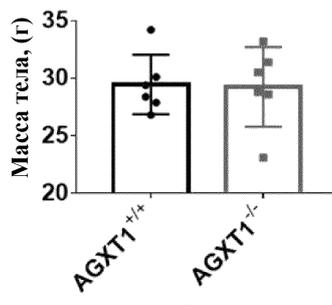
Фиг. 8С



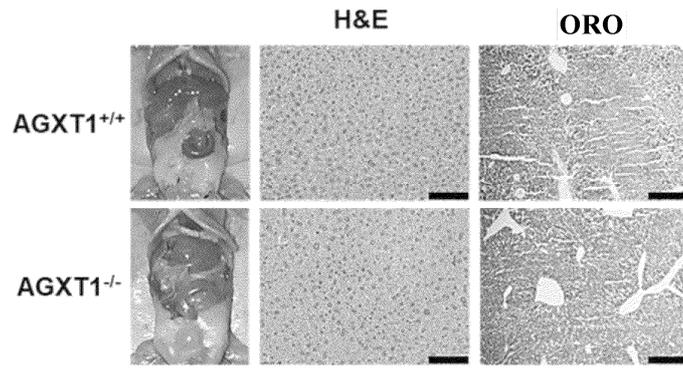
Фиг. 8D



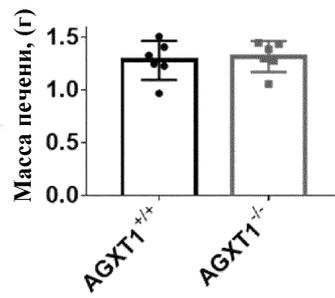
Фиг. 8Е



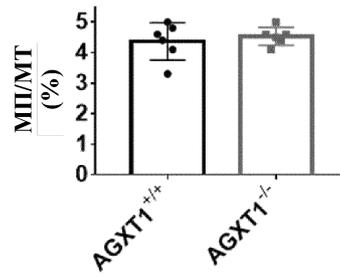
Фиг. 8F



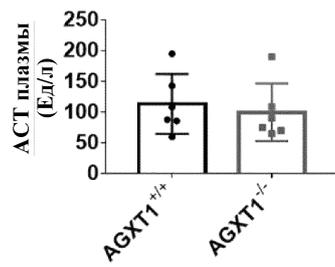
Фиг. 8G



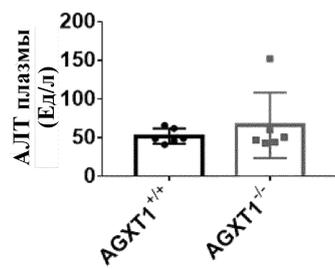
Фиг. 8H



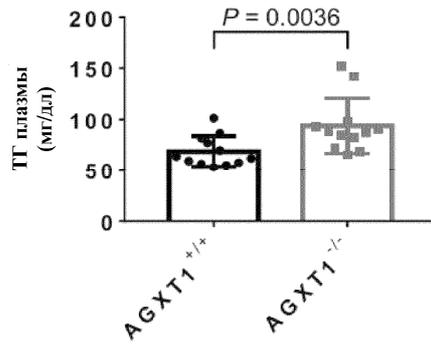
Фиг. 8I



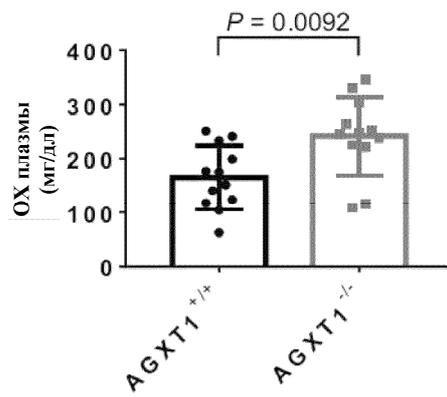
Фиг. 8J



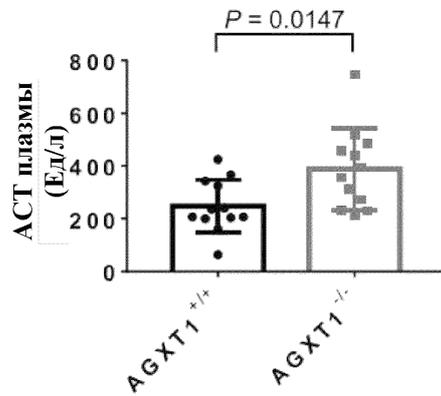
Фиг. 8K



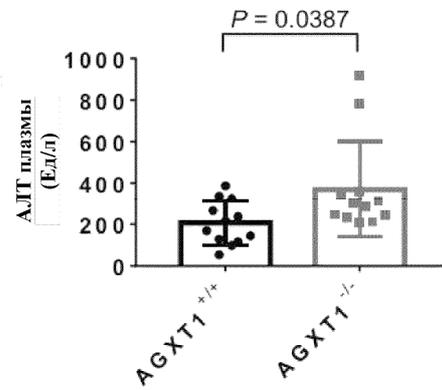
Фиг. 8L



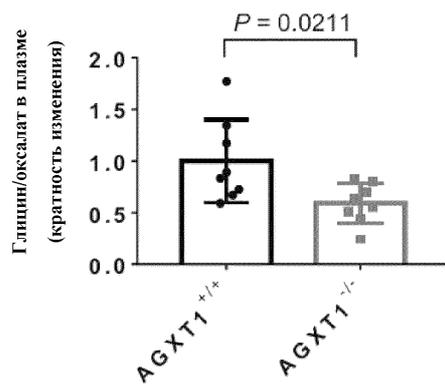
Фиг. 8M



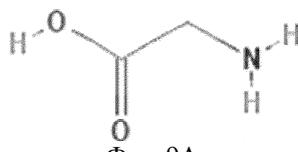
Фиг. 8N



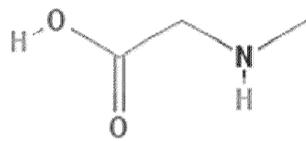
Фиг. 8O



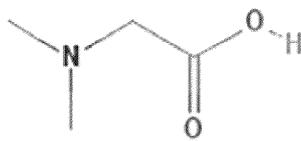
Фиг. 8Р



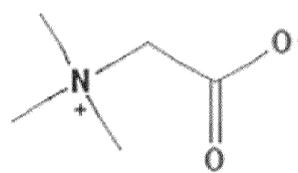
Фиг. 9А



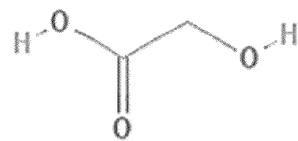
Фиг. 9В



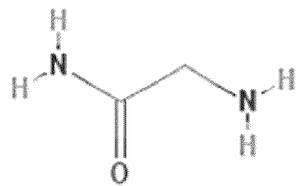
Фиг. 9С



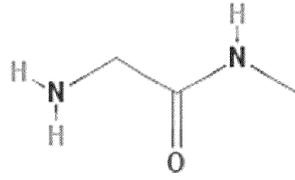
Фиг. 9D



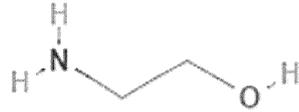
Фиг. 9Е



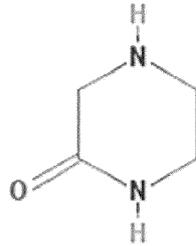
Фиг. 9F



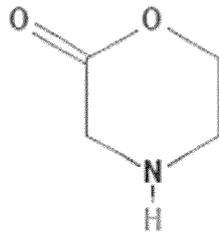
Фиг. 9G



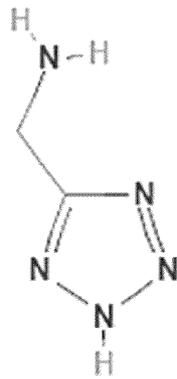
Фиг. 9H



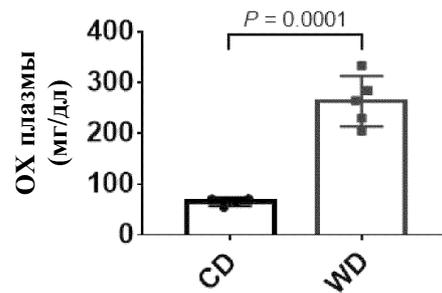
Фиг. 9I



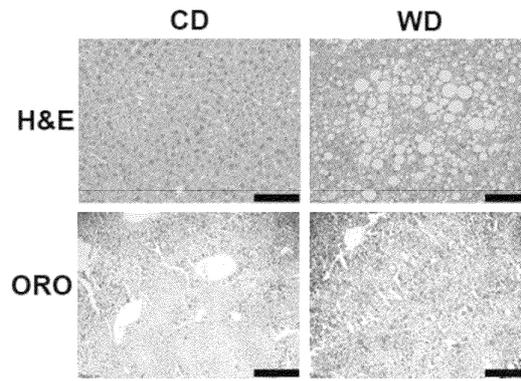
Фиг. 9J



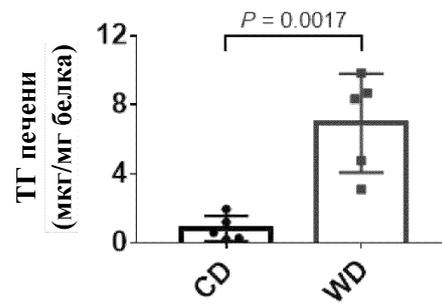
Фиг. 9K



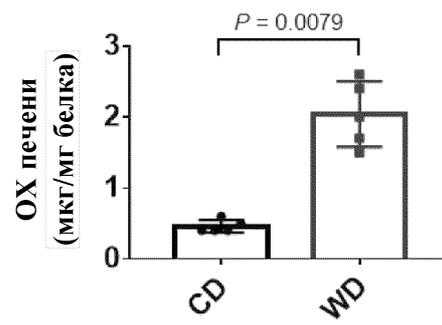
Фиг. 10A



Фиг. 10В



Фиг. 10С

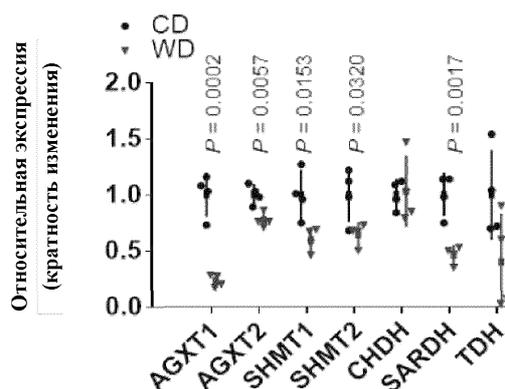


Фиг. 10D

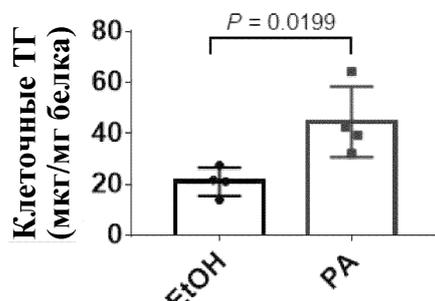
Глицин	P = 0.0111
Изолейцин	P = 0.0124
Тирозин	
Лейцин	
Валин	
Фенилаланин	
Триптофан	
Глутаминовая кислота	
Глутамин	
Пролин	
Аспарагиновая кислота	
Аспарагин	
Гистидин	
Метионин	P = 0.0026
Аланин	P = 0.0121
Треонин	P = 0.0002
Серин	P = 0.0028
Лизин	



Фиг. 10E

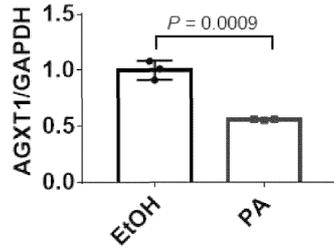


Фиг. 10F

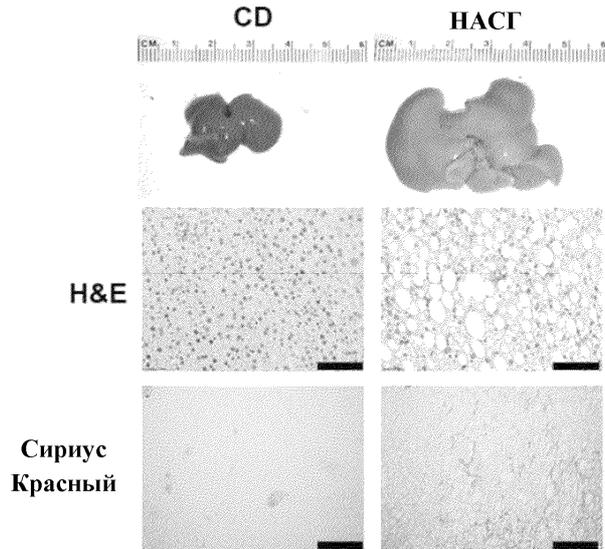


Фиг. 10G

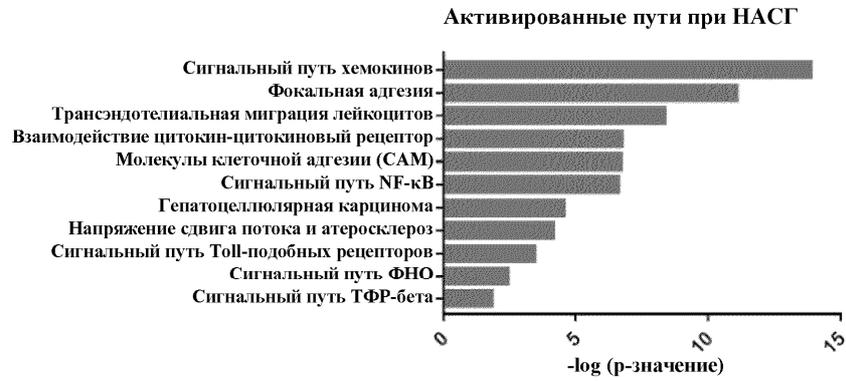
046866



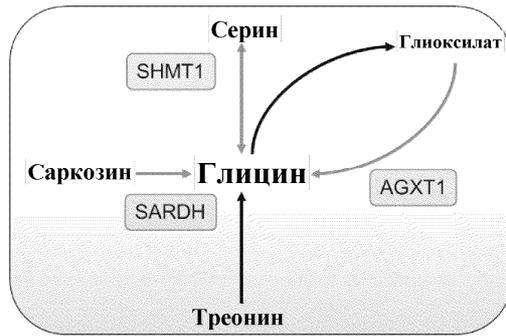
Фиг. 10H



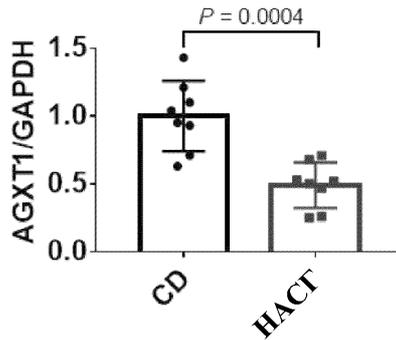
Фиг. 10I



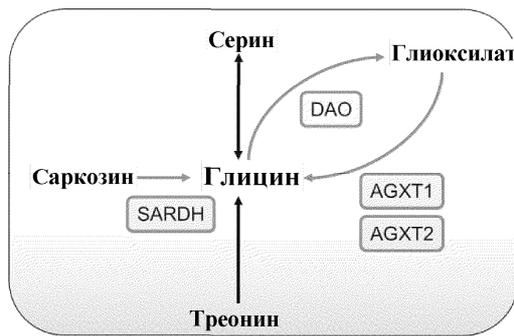
Фиг. 10J



Фиг. 10К



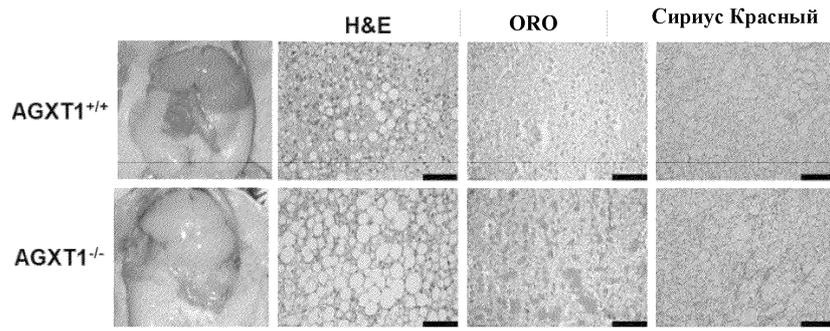
Фиг. 10L



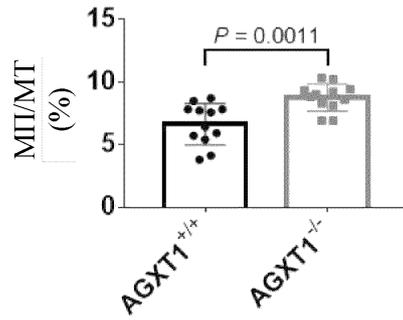
Фиг. 10М



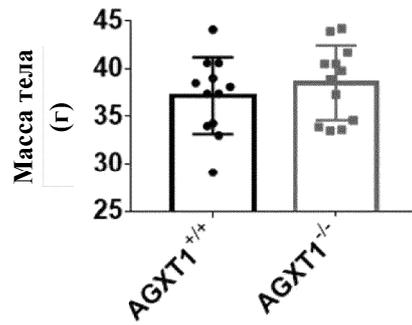
Фиг. 10N



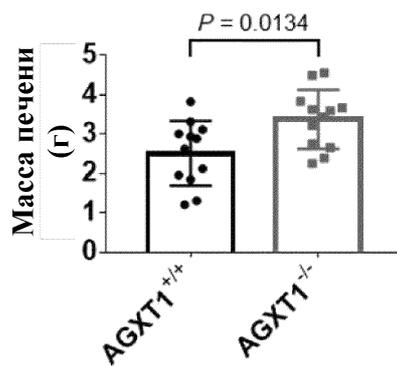
Фиг. 11А



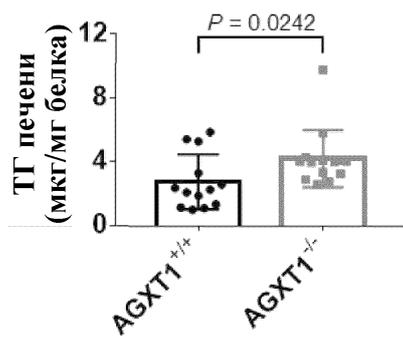
Фиг. 11В



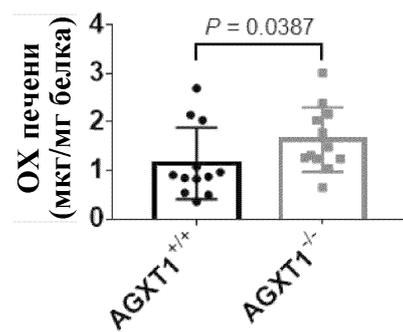
Фиг. 11С



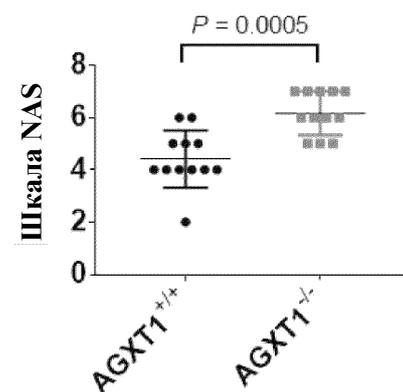
Фиг. 11D



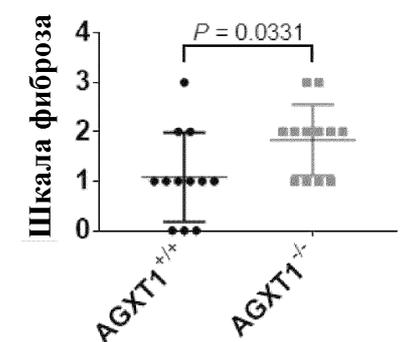
Фиг. 11Е



Фиг. 11F



Фиг. 11G

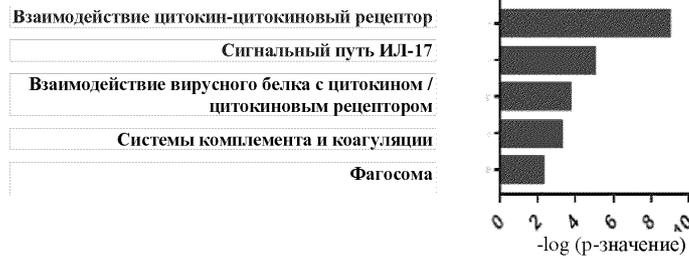


Фиг. 11H

	AGXT1 ^{+/+}	AGXT1 ^{-/-}
Стеатоз	2.0 ± 0.6	2.8 ± 0.5
Баллонирование гепатоцитов	1.8 ± 0.4	1.9 ± 0.3
Лобулярное воспаление	0.6 ± 0.7	1.6 ± 0.7

Фиг. 11I

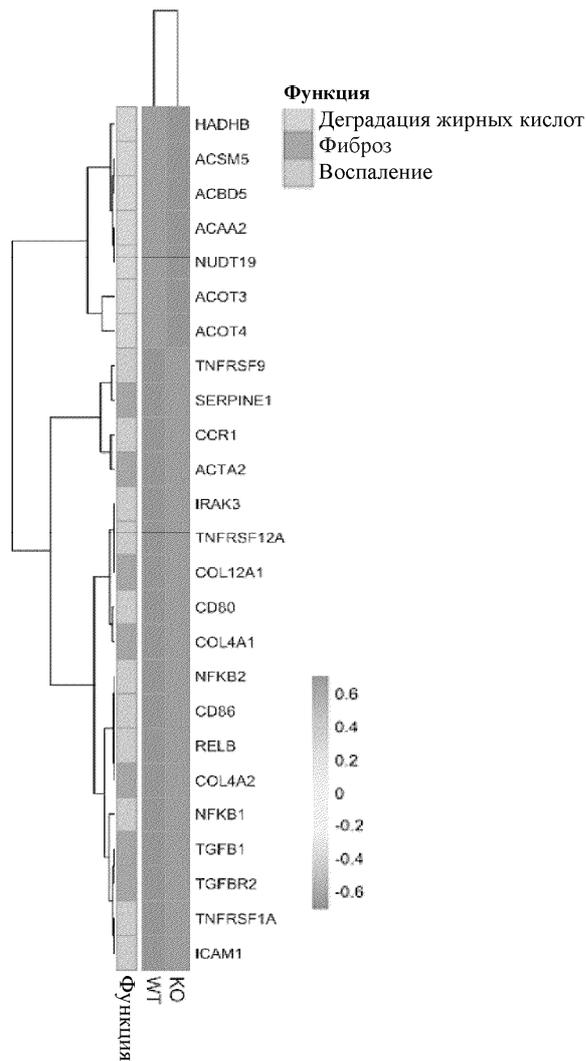
Активированные пути



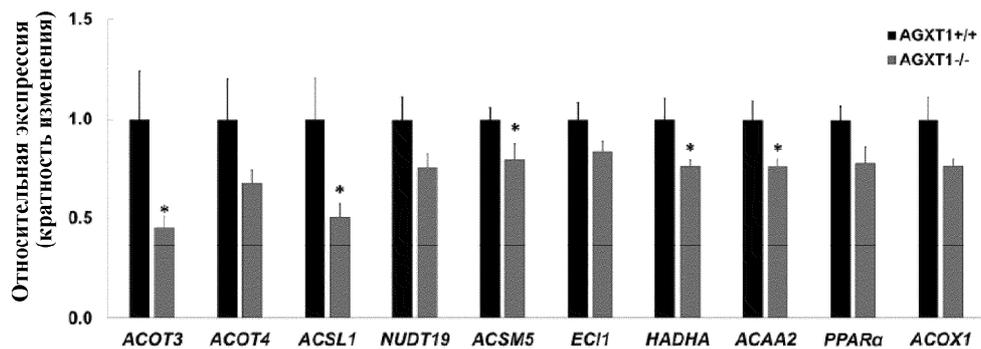
Подавленные пути



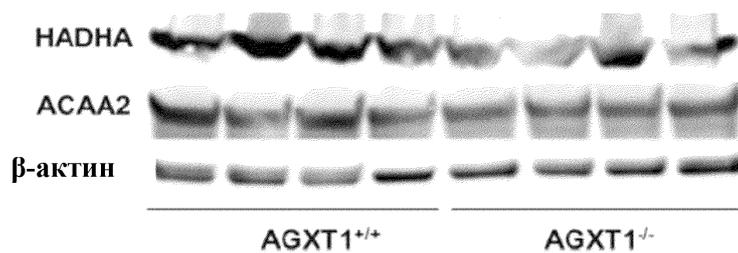
Фиг. 11J



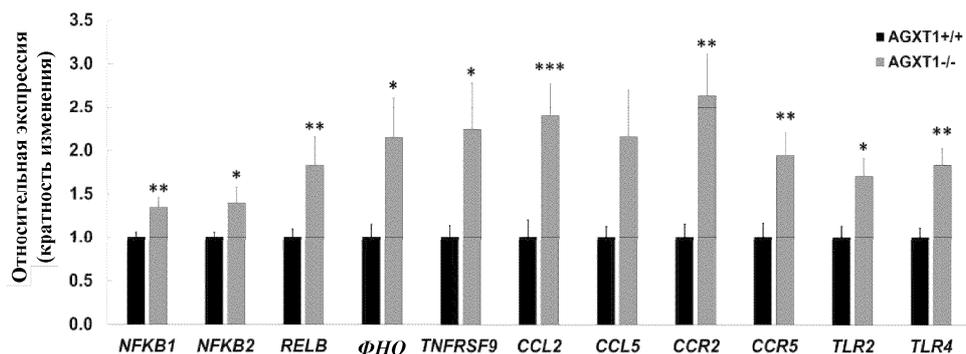
Фиг. 11K



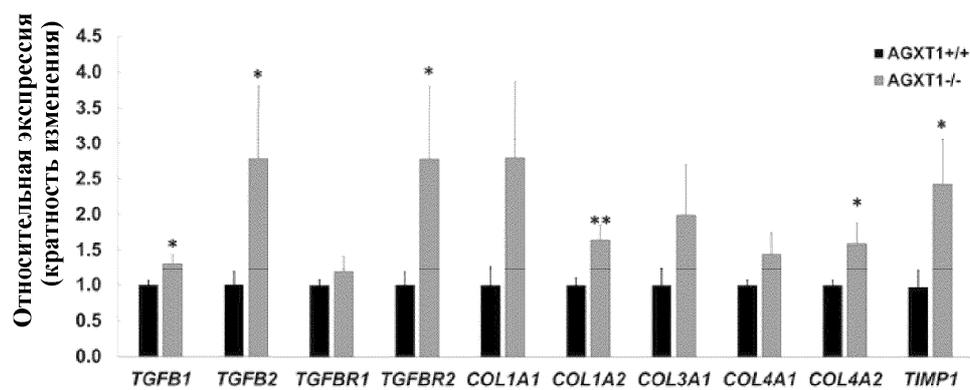
Фиг. 11L



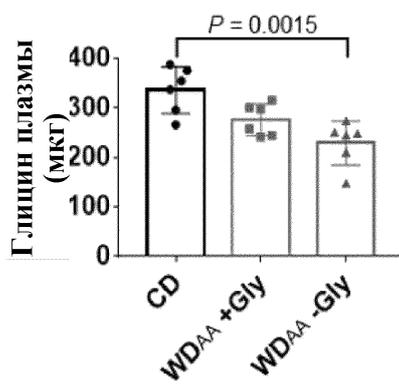
Фиг. 11M



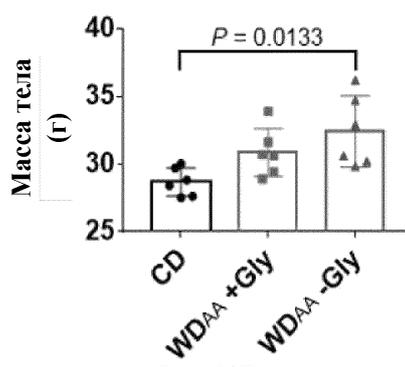
Фиг. 11N



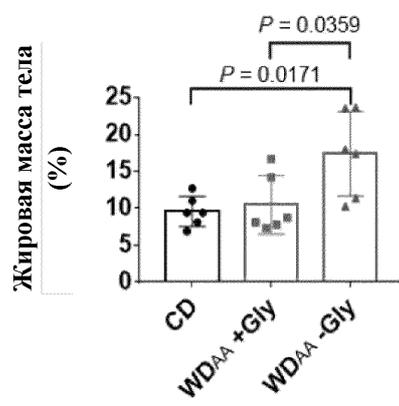
Фиг. 11O



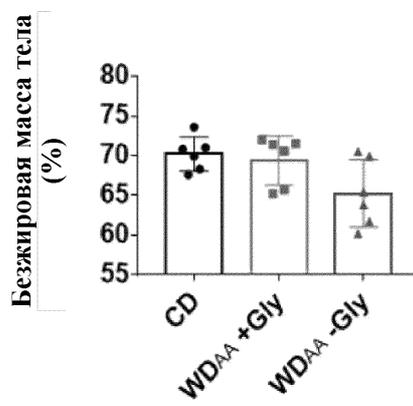
Фиг. 12А



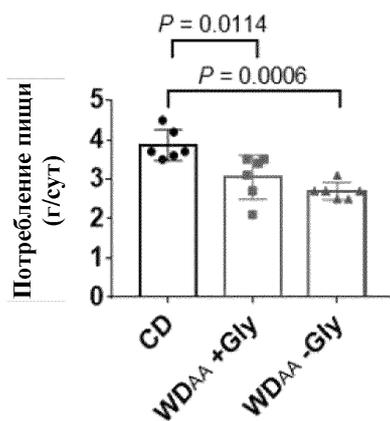
Фиг. 12В



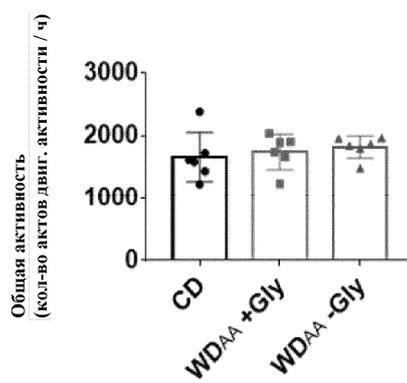
Фиг. 12С



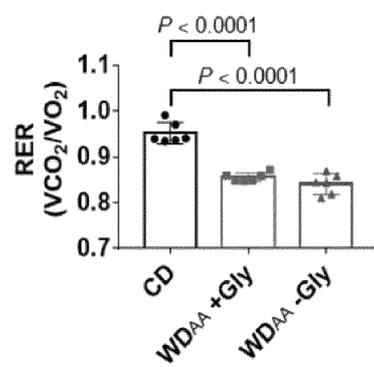
Фиг. 12D



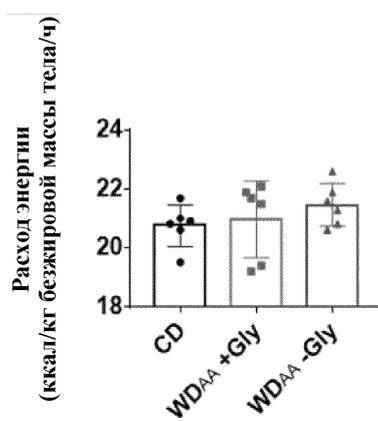
Фиг. 12E



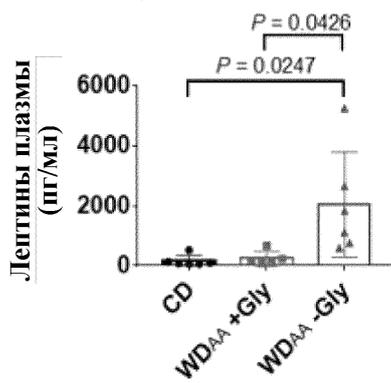
Фиг. 12F



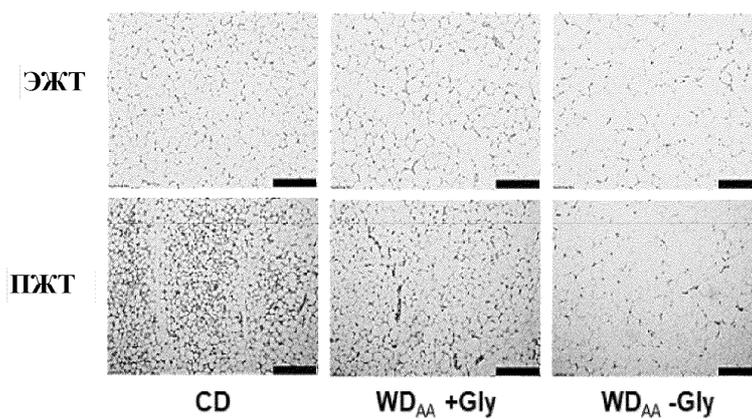
Фиг. 12G



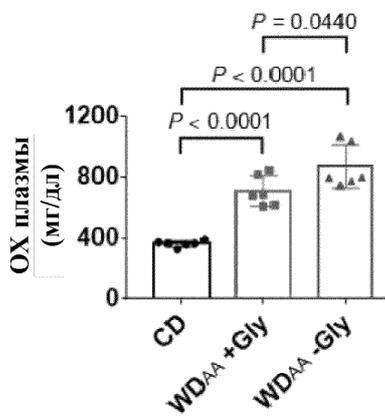
Фиг. 12H



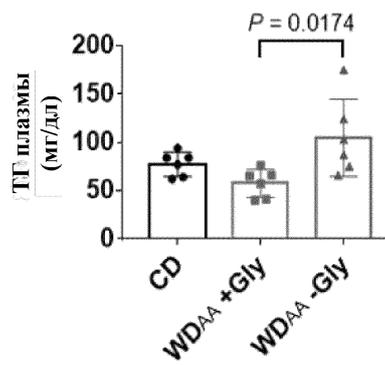
Фиг. 12I



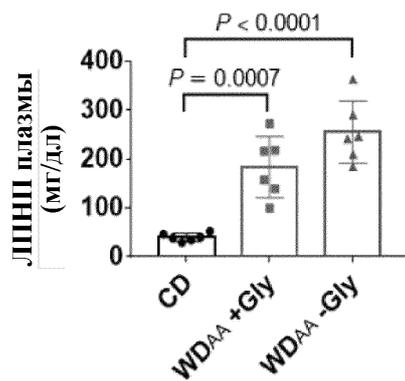
Фиг. 12J



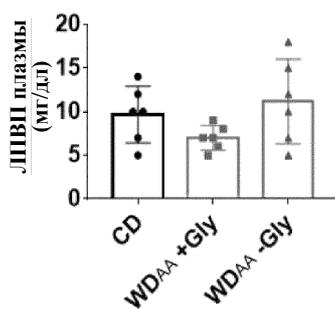
Фиг. 13А



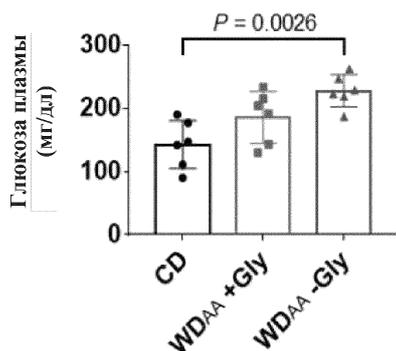
Фиг. 13В



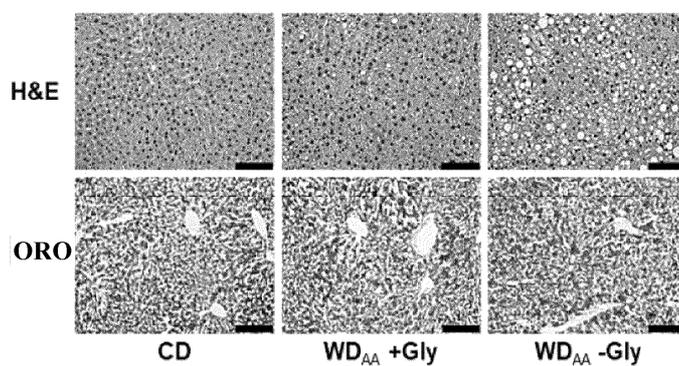
Фиг. 13С



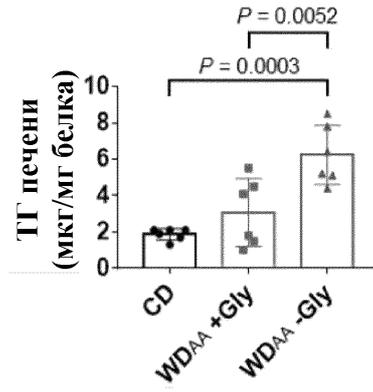
Фиг. 13D



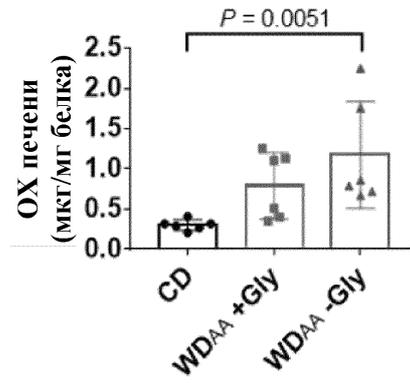
Фиг. 13Е



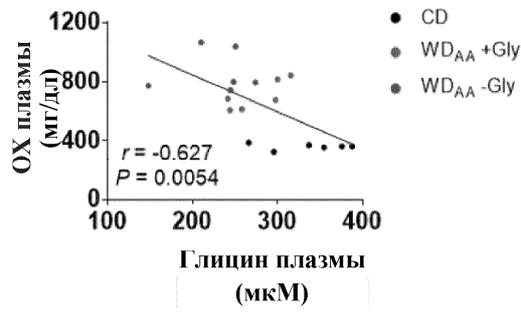
Фиг. 13F



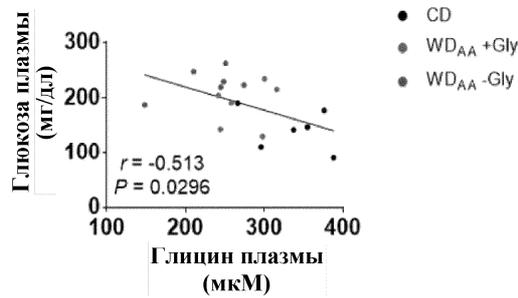
Фиг. 13G



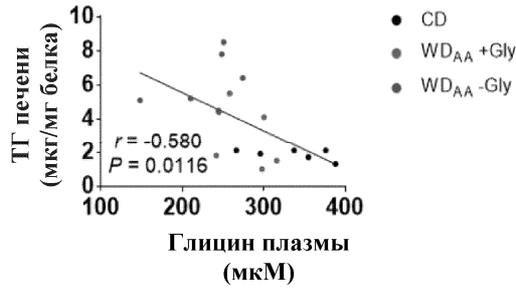
Фиг. 13H



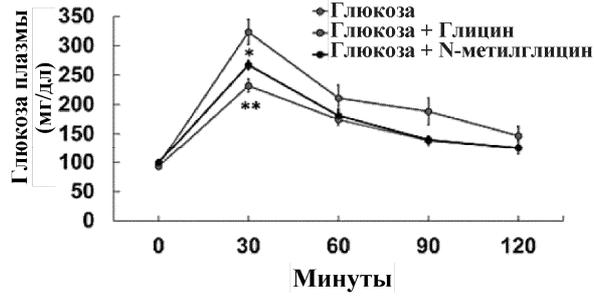
Фиг. 13I



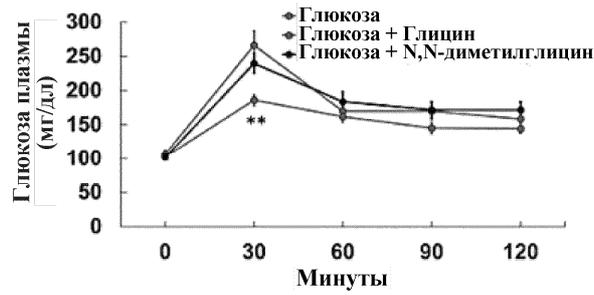
Фиг. 13J



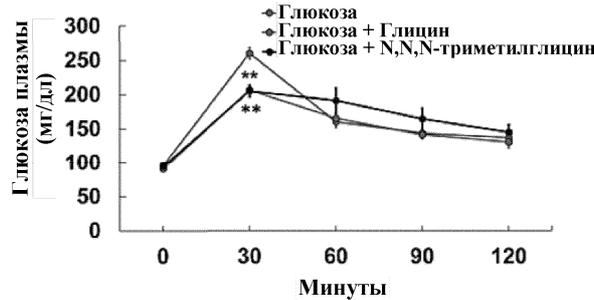
Фиг. 13К



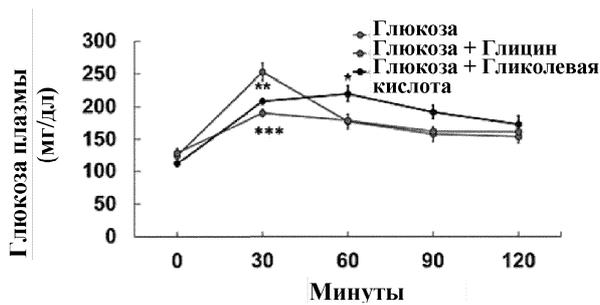
Фиг. 14А



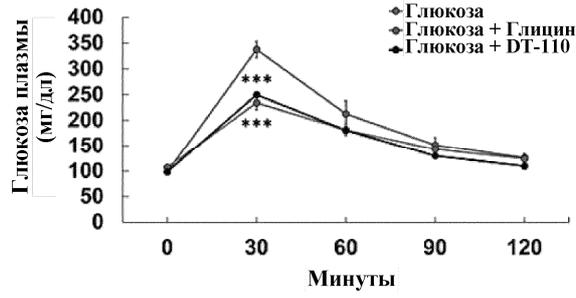
Фиг. 14В



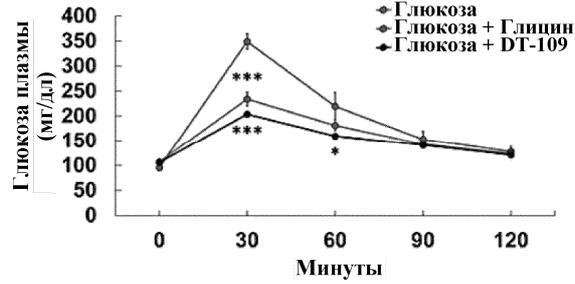
Фиг. 14С



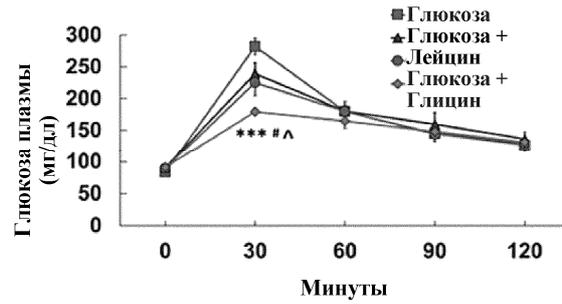
Фиг. 14D



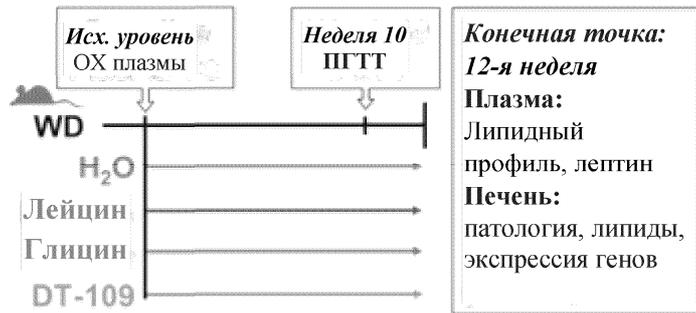
Фиг. 14Е



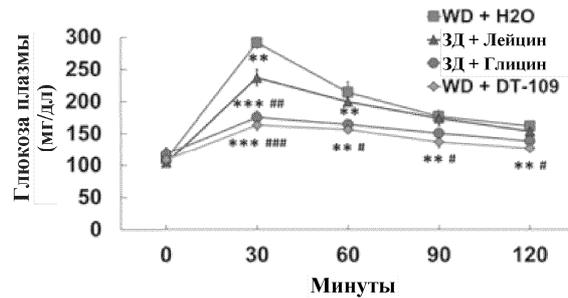
Фиг. 14F



Фиг. 14G



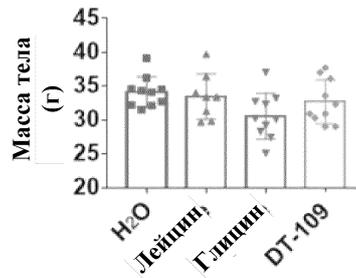
Фиг. 15A



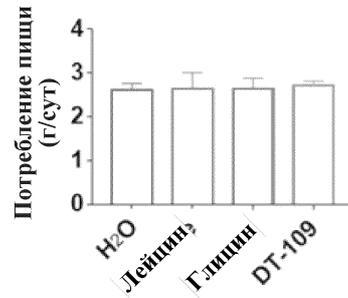
Фиг. 15B



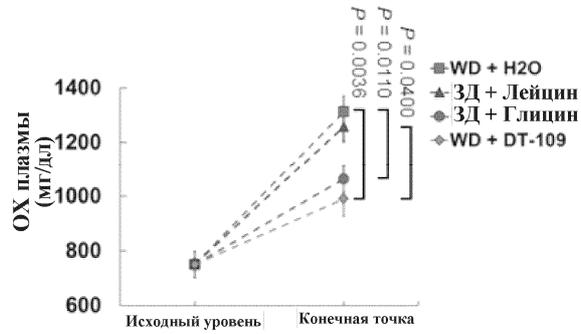
Фиг. 15С



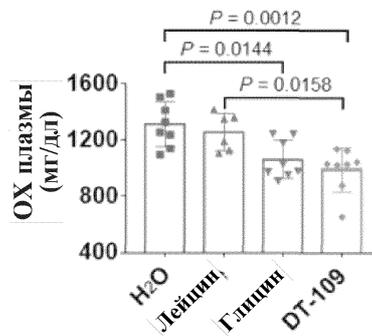
Фиг. 15D



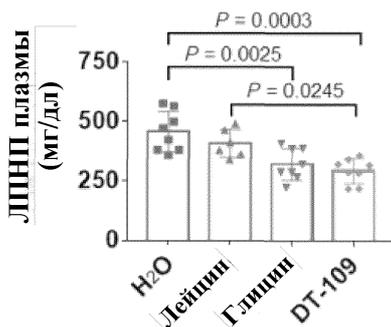
Фиг. 15E



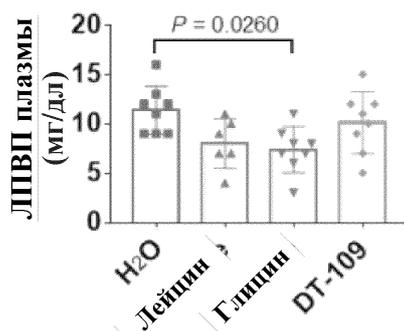
Фиг. 15F



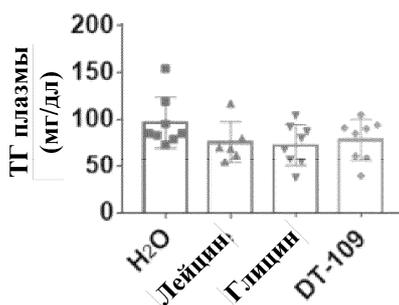
Фиг. 15G



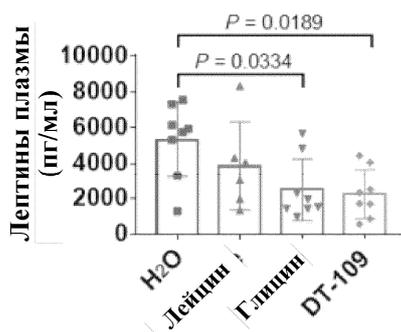
Фиг. 15H



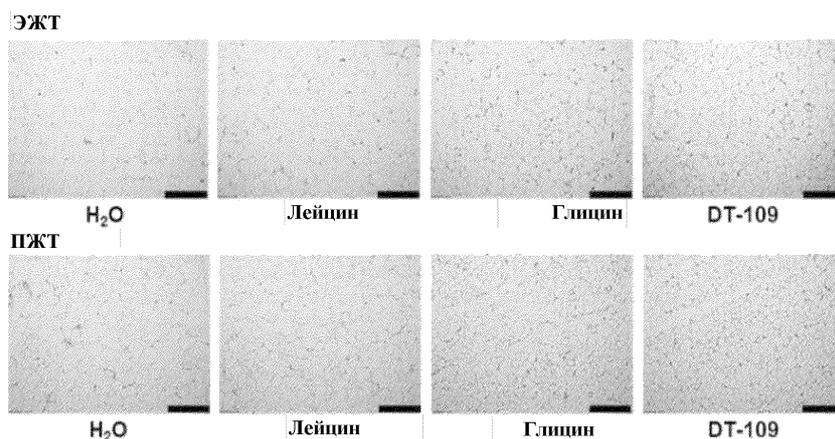
Фиг. 15I



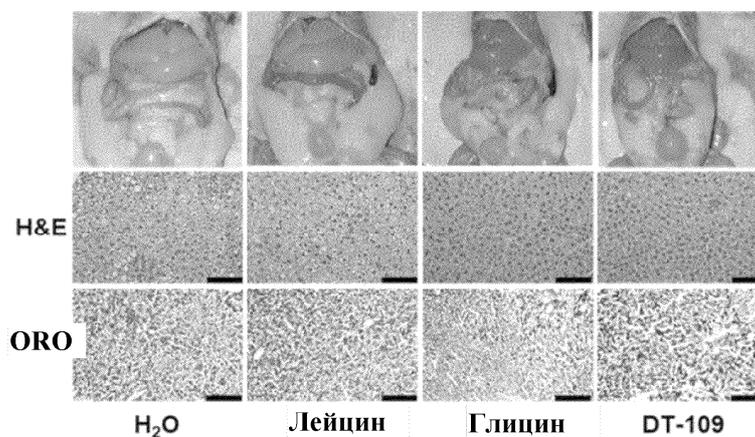
Фиг. 15J



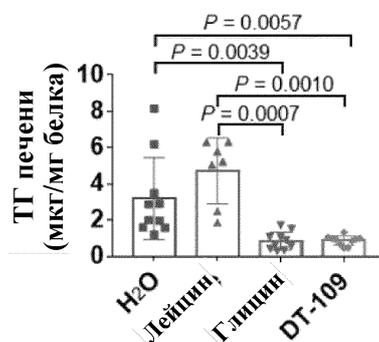
Фиг. 15K



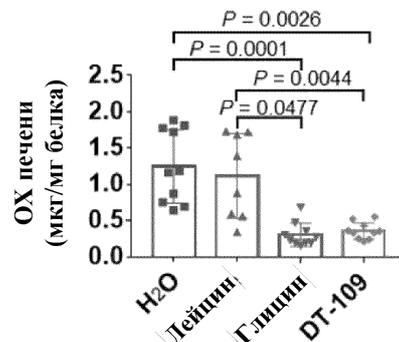
Фиг. 15L



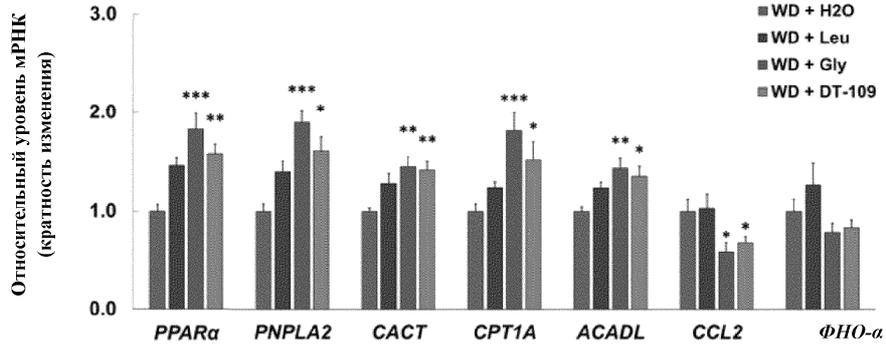
Фиг. 16А



Фиг. 16B



Фиг. 16C



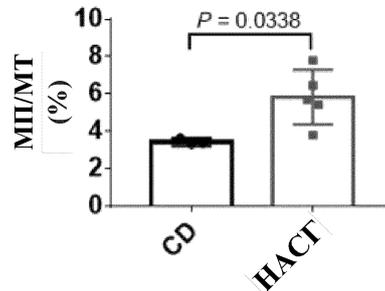
Фиг. 16D



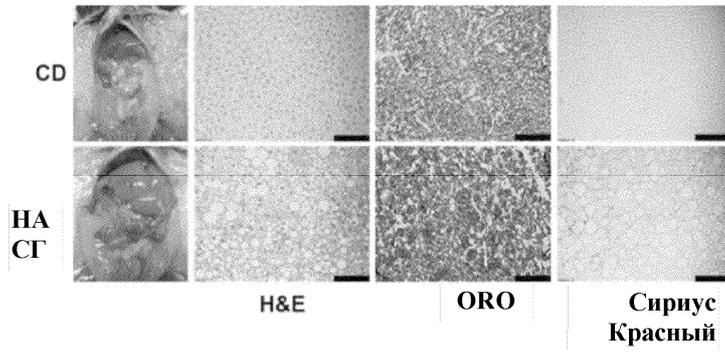
Фиг. 17А

	N (СД; НАСГ)	СД	НАСГ-диета	P-значение
Глюкоза плазмы (мг/дл)	11 ; 50	108.5 ± 25.1	140.6 ± 32.8	0.0069
ОХ плазмы (мг/дл)	11 ; 50	148.3 ± 24.2	186.1 ± 43.2	0.0035
АСТ плазмы (Ед/л)	9 ; 30	62.3 ± 21.5	221.0 ± 155.3	< 0.0001
АЛТ в плазме (Ед/л)	9 ; 30	46.8 ± 14.0	180.2 ± 116.7	< 0.0001

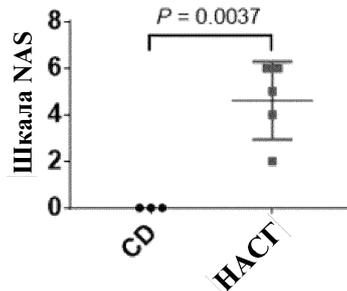
Фиг. 17В



Фиг. 17С



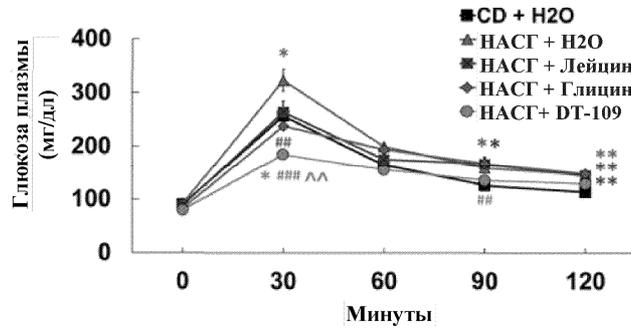
Фиг. 17D



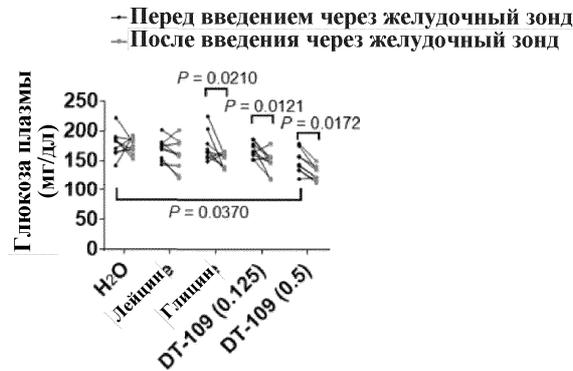
Фиг. 17E

	N (CD; НАСГ)	CD	НАСГ-диета
Стеатоз	3 ; 5	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8
Баллонирование гепатоцитов	3 ; 5	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4
Лобулярное воспаление	3 ; 5	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.5

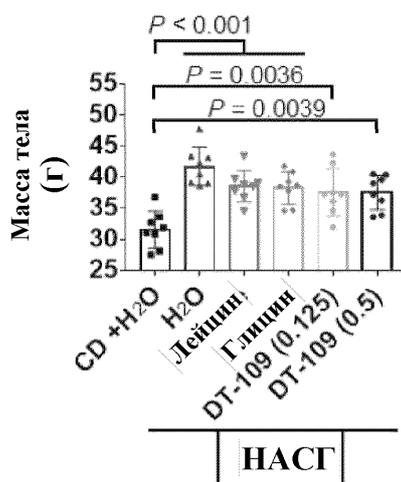
Фиг. 17F



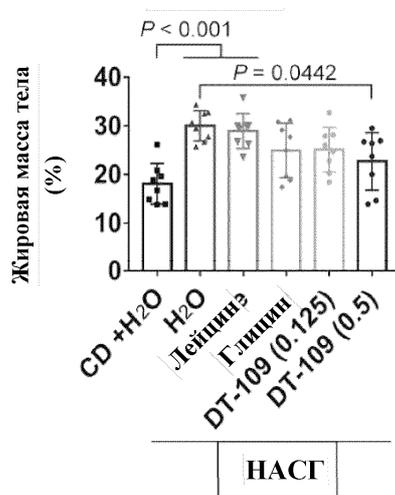
Фиг. 17G



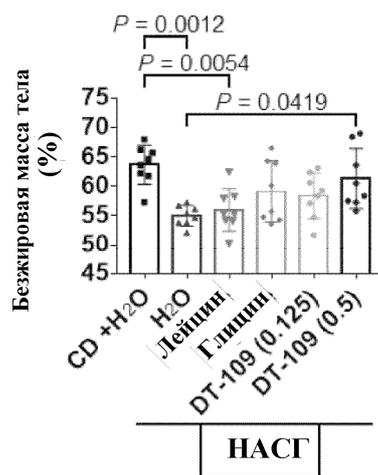
Фиг. 17H



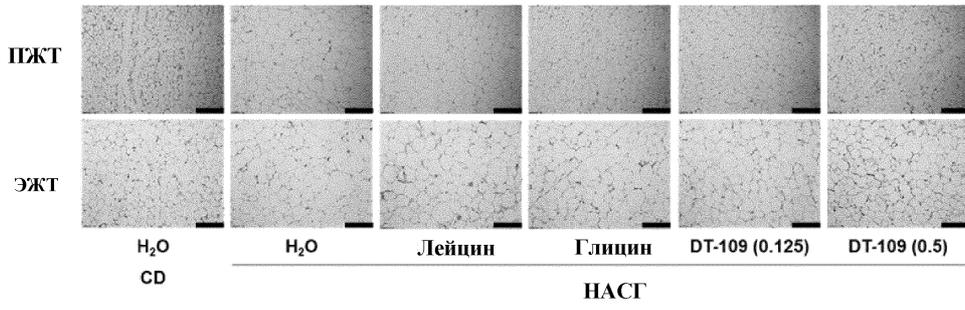
Фиг. 17I



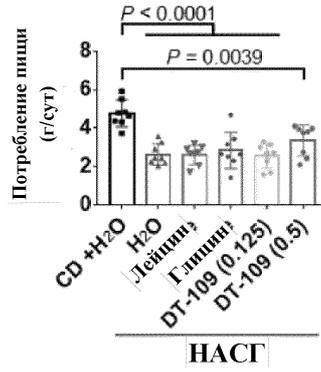
Фиг. 17J



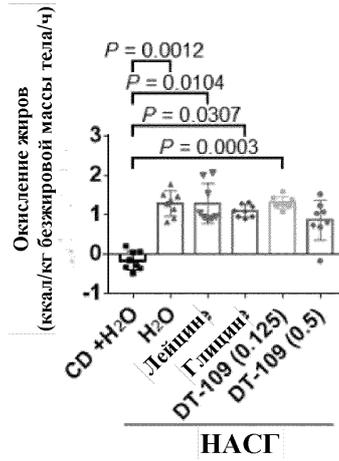
Фиг. 17K



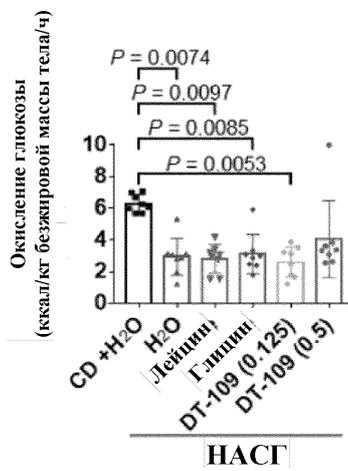
Фиг. 17L



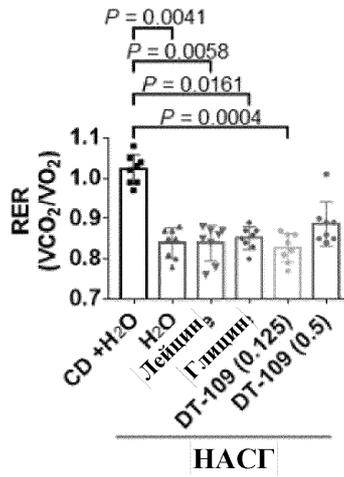
Фиг. 17M



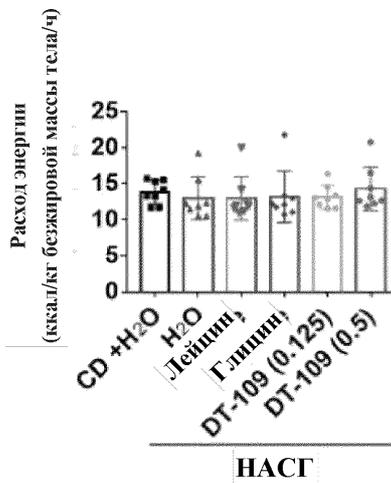
Фиг. 17N



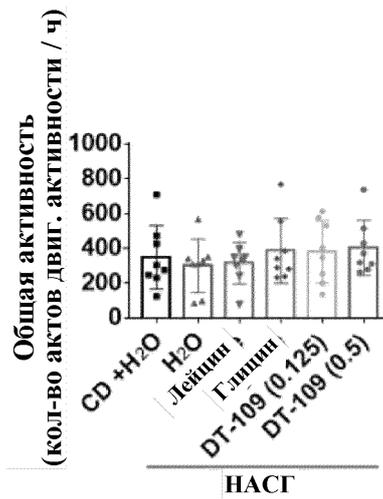
Фиг. 17O



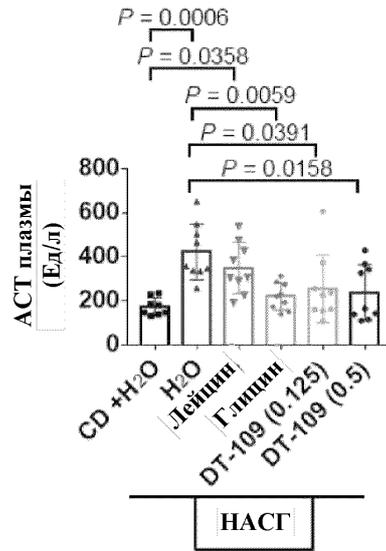
Фиг. 17P



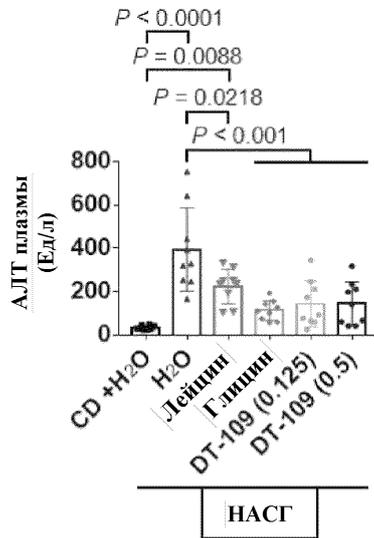
Фиг. 17Q



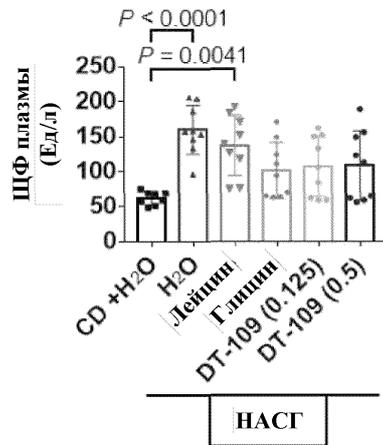
Фиг. 17R



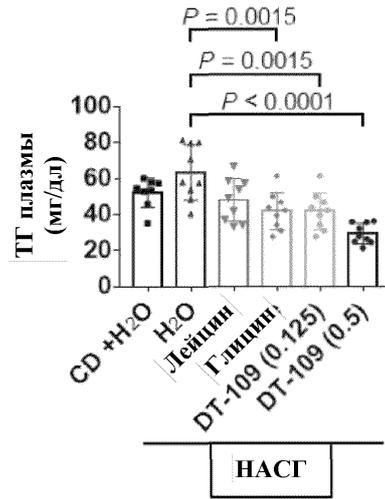
Фиг. 18А



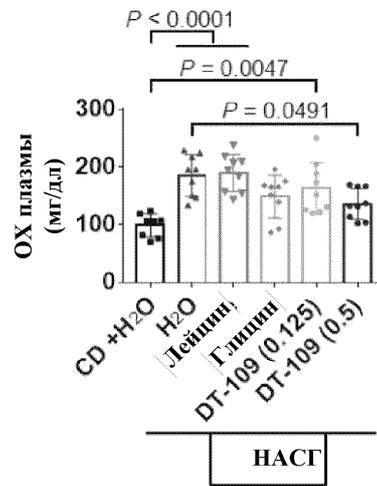
Фиг. 18В



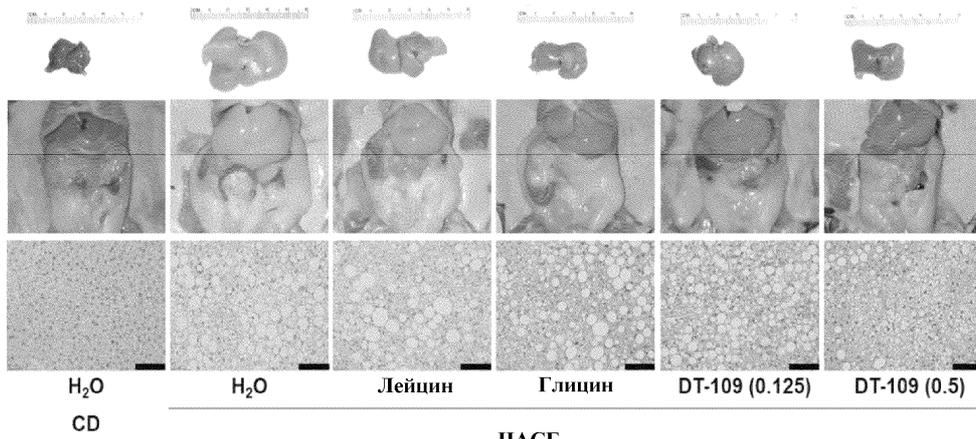
Фиг. 18С



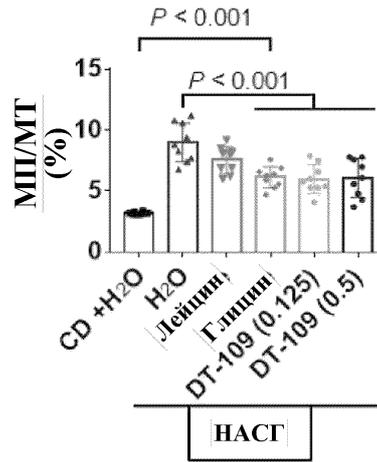
Фиг. 18D



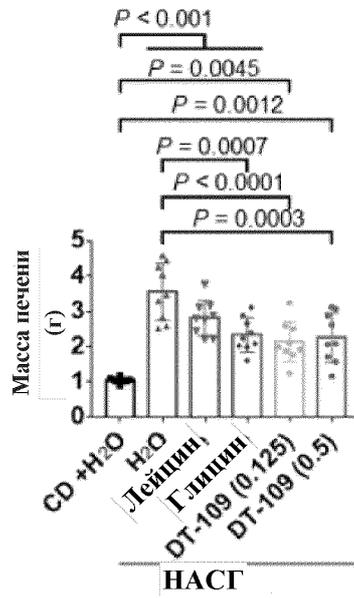
Фиг. 18E



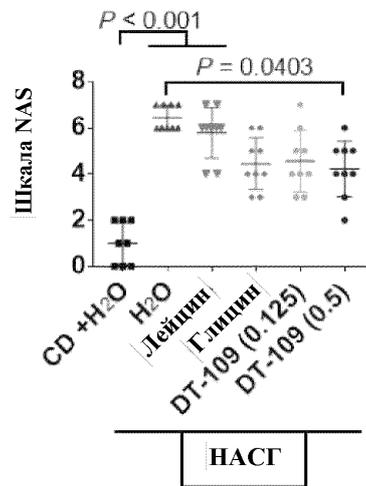
Фиг. 18F



Фиг. 18G



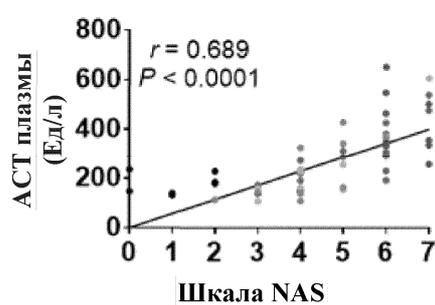
Фиг. 18H



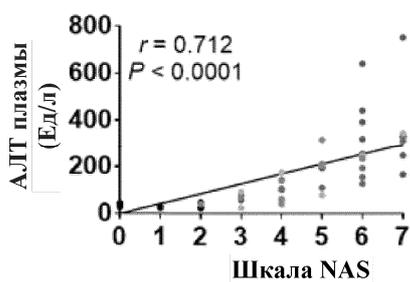
Фиг. 18I

	Стеатоз	Баллонирование гепатоцитов	Лобулярное воспаление	Шкала NAS
CD, H ₂ O	0.6 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.9
НАСГ, H ₂ O	2.9 ± 0.3	2.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5	6.5 ± 0.5
НАСГ, Лейцин	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.0	1.2 ± 0.8	5.8 ± 1.0
НАСГ, Глицин	2.2 ± 0.7	1.9 ± 0.3	0.3 ± 0.7	4.4 ± 1.1
НАСГ, DT-109 (0,125)	2.1 ± 0.6	1.8 ± 0.4	0.7 ± 0.9	4.6 ± 1.3
НАСГ, DT-109 (0,5)	2.2 ± 0.8	1.9 ± 0.3	0.1 ± 0.3	4.2 ± 1.2

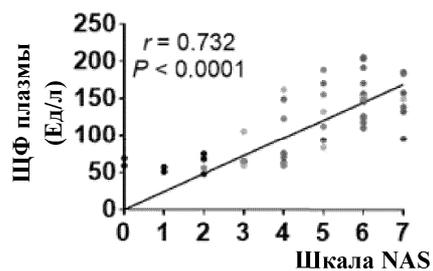
Фиг. 18J



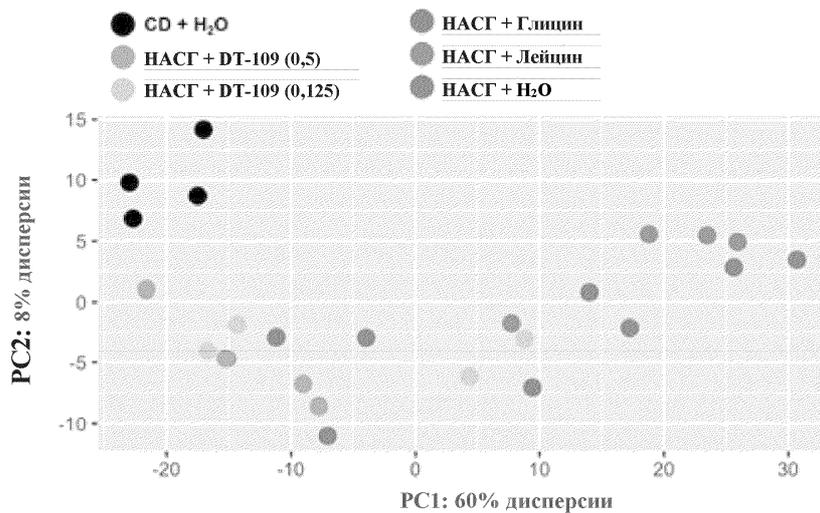
Фиг. 18К



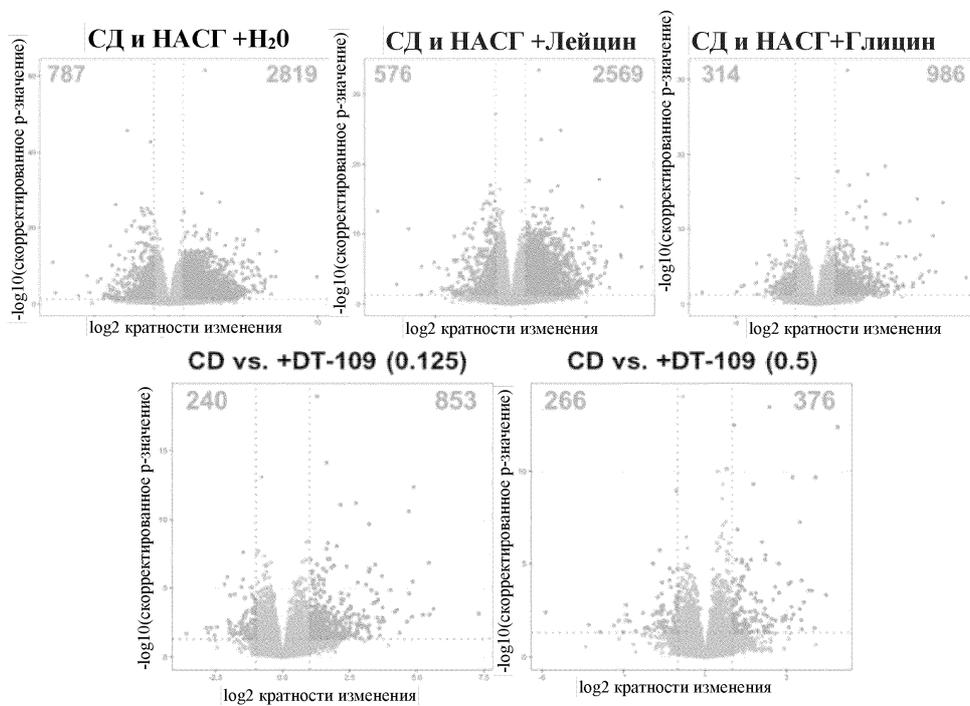
Фиг. 18L



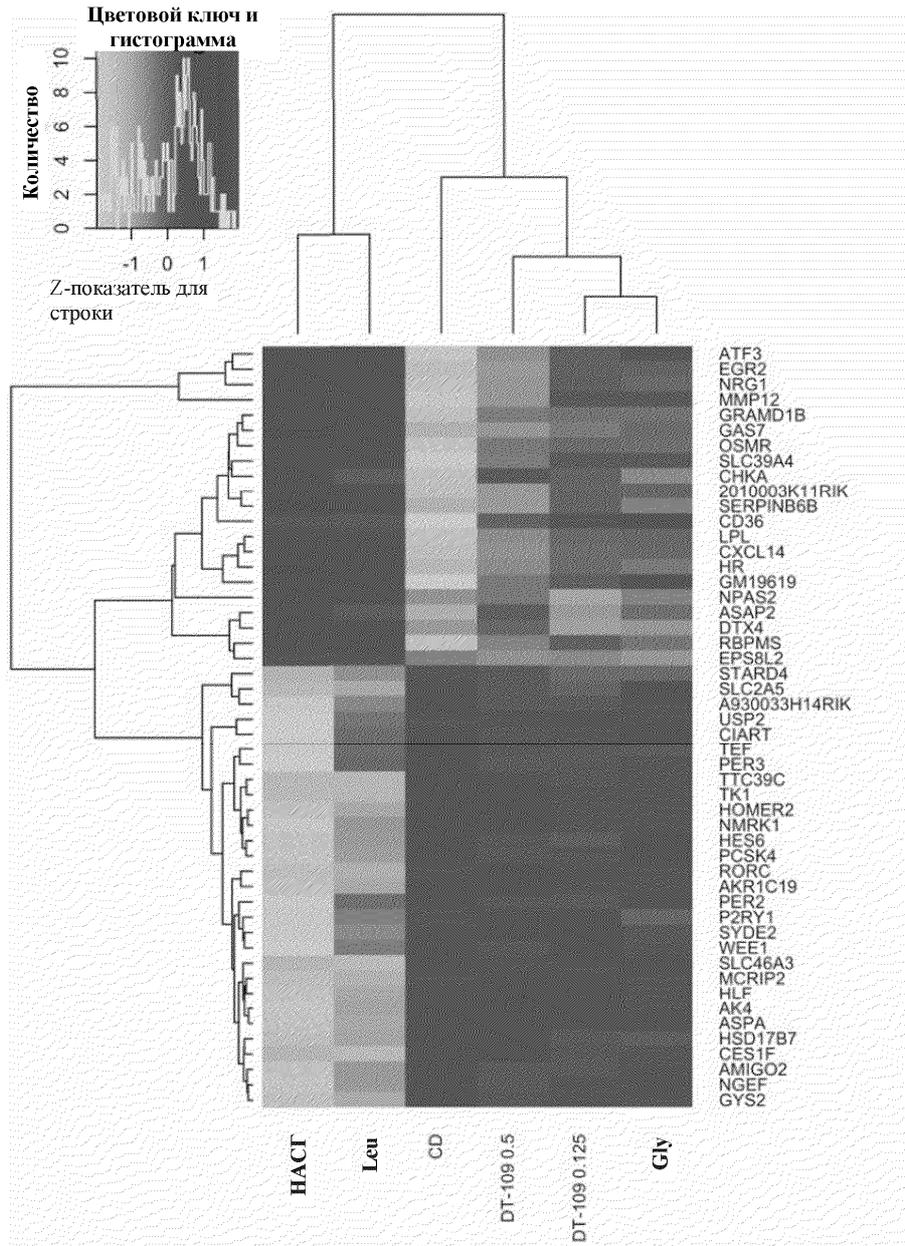
Фиг. 18М



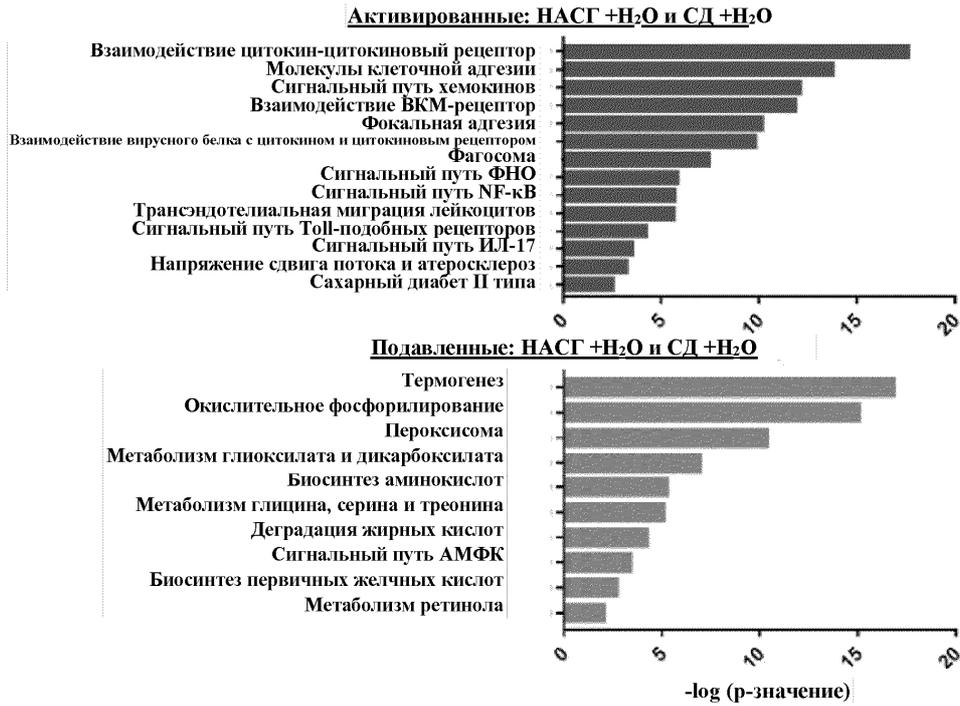
Фиг. 19А



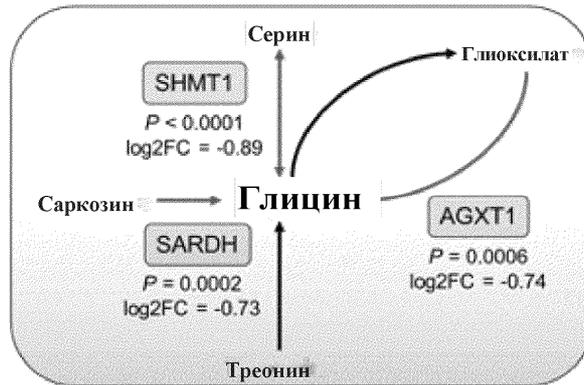
Фиг. 19В



Фиг. 19С



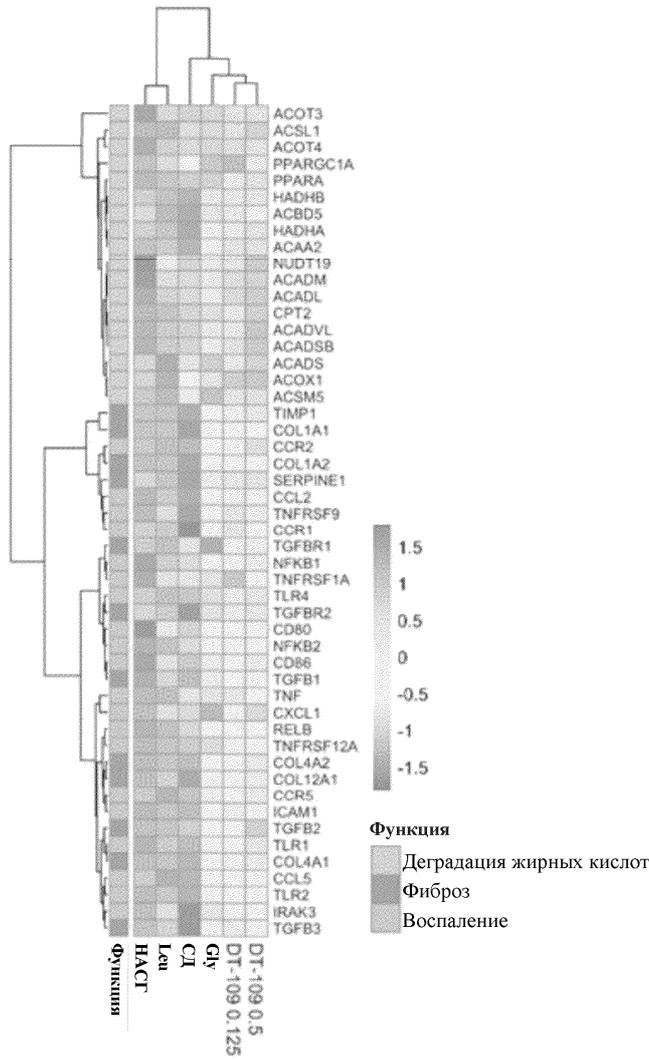
Фиг. 19D



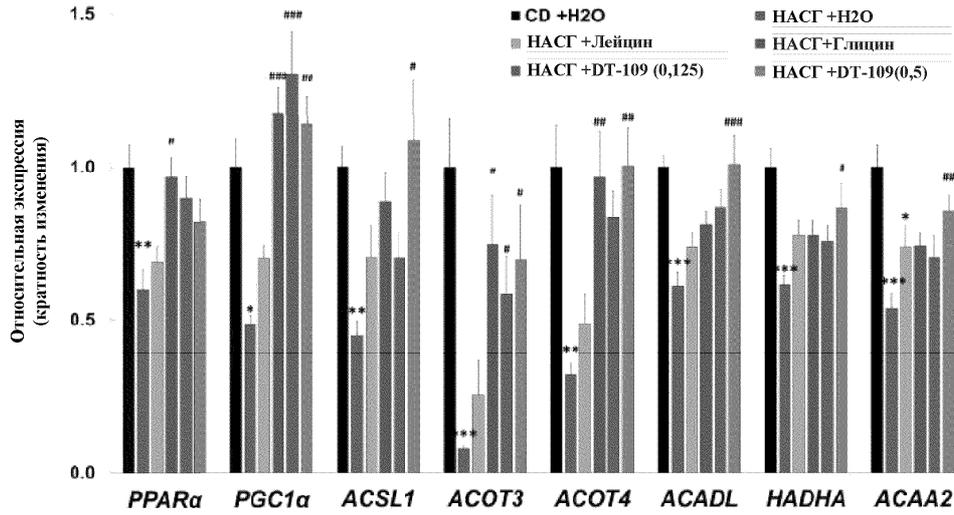
Фиг. 19E



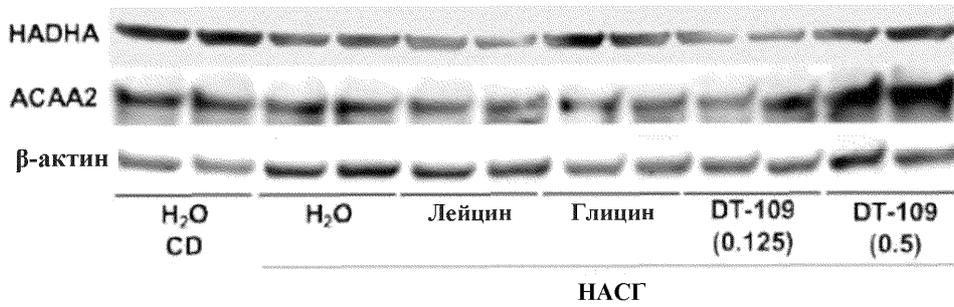
Фиг. 19F



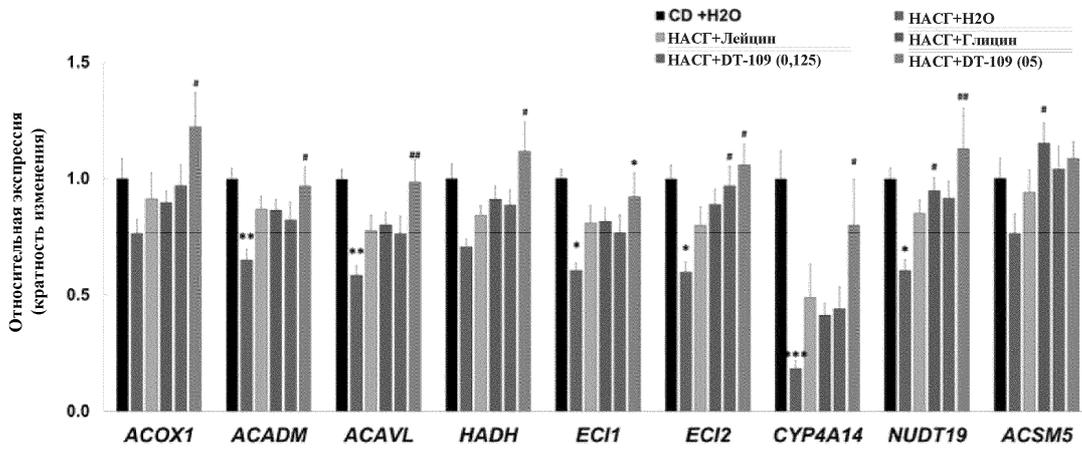
Фиг. 19G



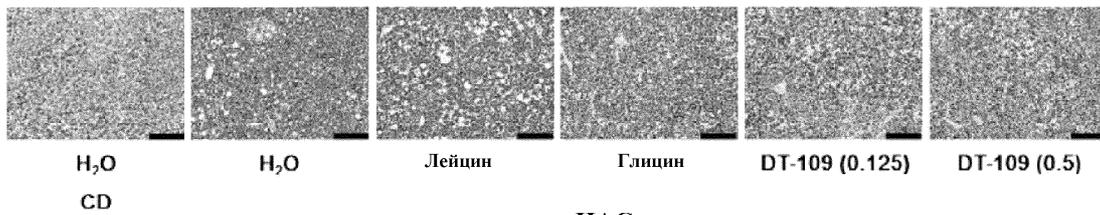
Фиг. 19Н



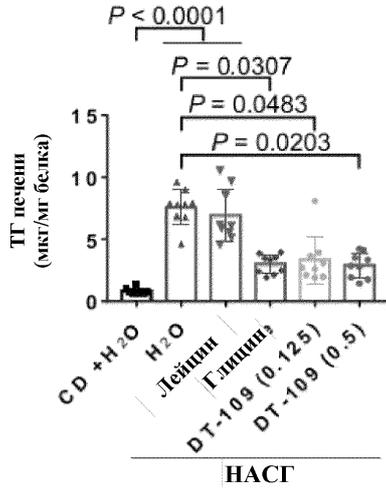
Фиг. 19И



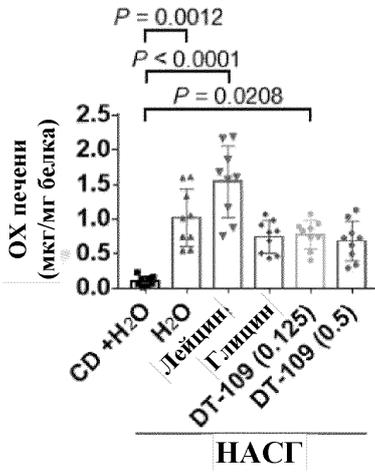
Фиг. 19J



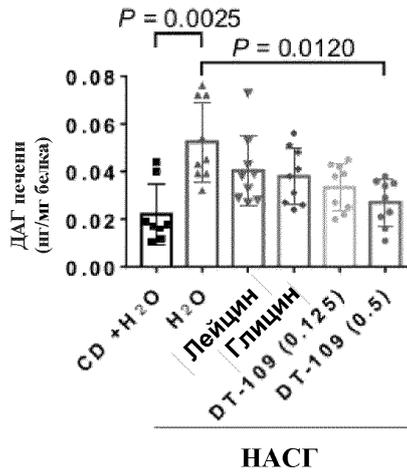
НАС
Фиг. 19К



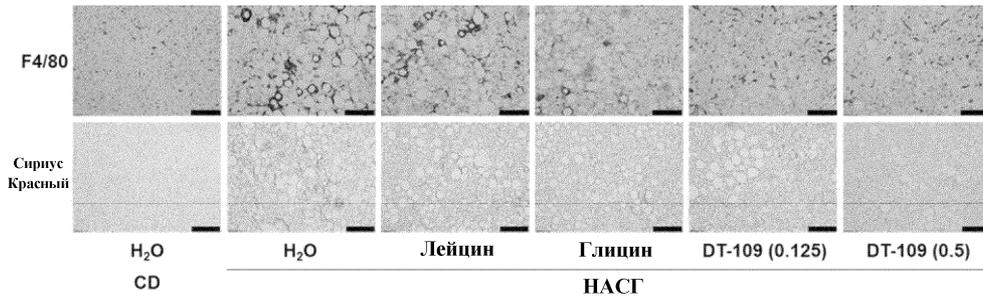
Фиг. 19L



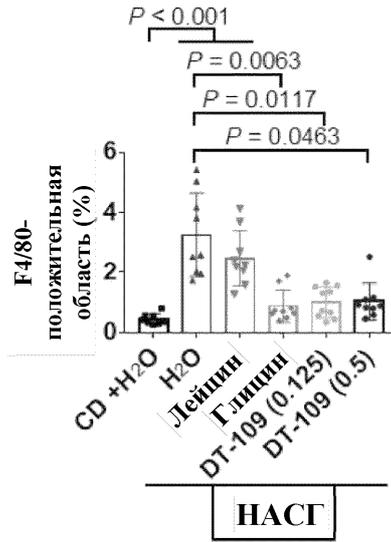
Фиг. 19M



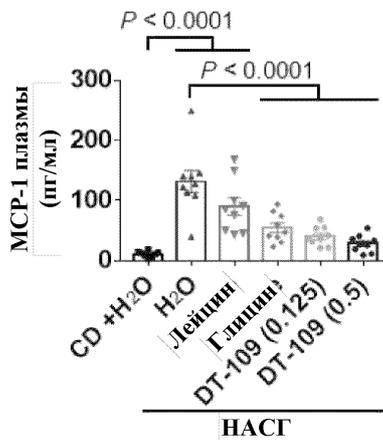
Фиг. 19N



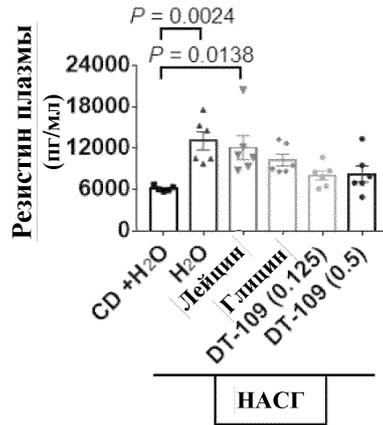
Фиг. 20А



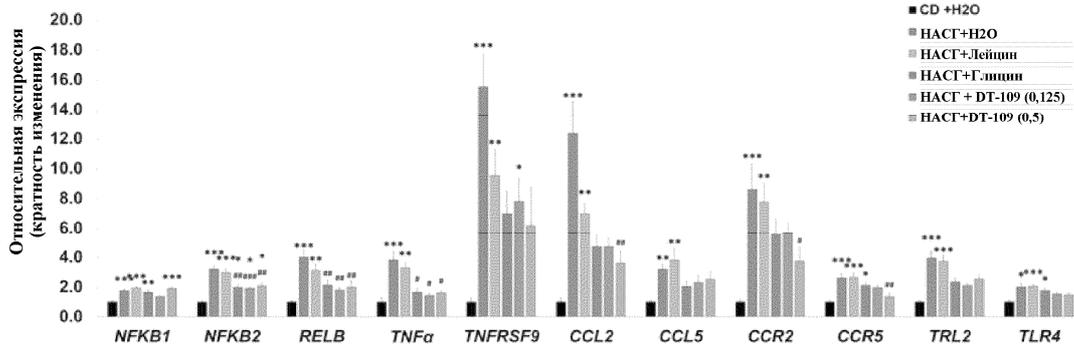
Фиг. 20В



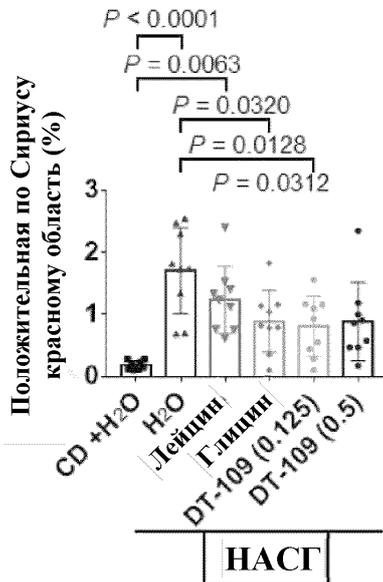
Фиг. 20С



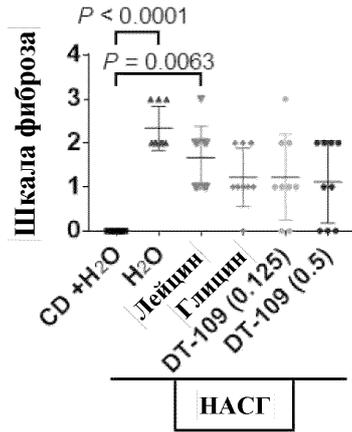
Фиг. 20D



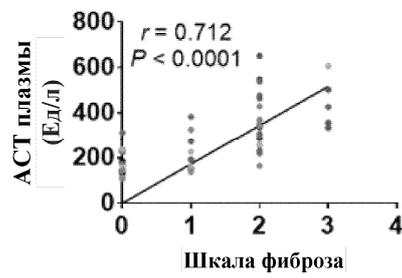
Фиг. 20E



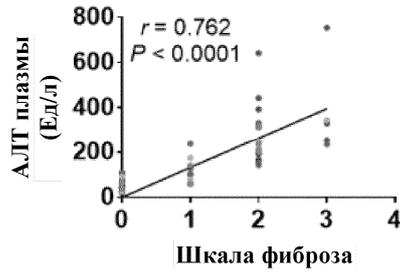
Фиг. 20F



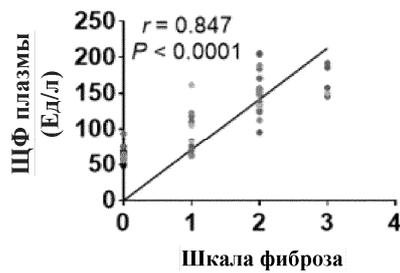
Фиг. 20G



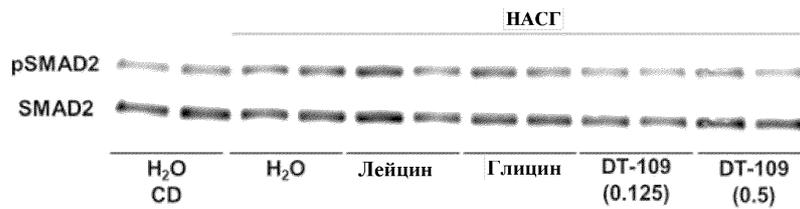
Фиг. 20H



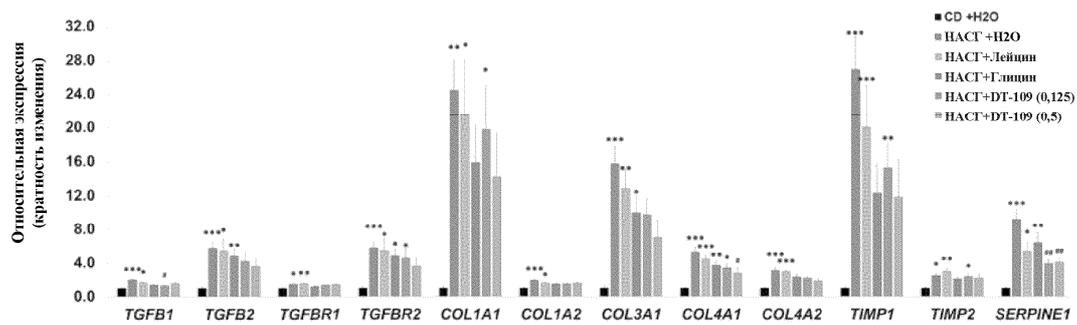
Фиг. 20I



Фиг. 20J



Фиг. 20K



Фиг. 20L