

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047589**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.09

(21) Номер заявки
202391524

(22) Дата подачи заявки
2021.12.17

(51) Int. Cl. *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
C07K 14/585 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) **ДВОЙНЫЕ АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ АМИЛИНА И КАЛЬЦИТОНИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **63/127,186**

(32) **2020.12.18**

(33) **US**

(43) **2023.08.03**

(86) **PCT/US2021/063990**

(87) **WO 2022/133187 2022.06.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US);
КИБАЙОСАЙНС СА (CH)

(72) Изобретатель:
Коскун Тамер, Цюй Хунчан (US),
Карсдал Мортен Ассер, Андреассен
Ким Витц, Хенриксен Ким (CH)

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

(56) **WO-A1-2020039051**

(57) Изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к лечению диабета, ожирения и/или дислипидемии. Настоящее изобретение относится к соединениям, которые вызывают агонию как рецепторов кальцитонина, так и амилиновых рецепторов, и могут снижать потребление пищи, массу тела, уровень глюкозы и/или триглицеридов, поэтому их можно использовать для лечения диабета, ожирения и/или дислипидемии, в частности к соединениям, содержащим и/или состоящим из ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2). Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, и терапевтическое применение таких соединений и композиций.

047589
B1

047589
B1

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области лечения диабета, ожирения, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и/или дислипидемии. Настоящее изобретение относится к соединениям, которые вызывают агонию как амилиновых, так и кальцитониновых рецепторов и, следовательно, могут снижать потребление пищи, массу тела, уровень глюкозы и/или триглицеридов и могут применяться для лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии. Настоящее раскрытие также включает фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, и терапевтическое применение таких соединений и фармацевтических композиций.

Амилин представляет собой пептидный гормон, который совместно с инсулином секретируется β -клетками поджелудочной железы и является дефицитным у людей с диабетом. Он ингибирует секрецию глюкагона, задерживает опорожнение желудка и действует как агент, вызывающий чувство сытости. Аналог амилина, прамлинтид, доступен для лечения пациентов с диабетом, которые используют инсулин, потому что он снижает уровень сахара в крови. Период полувыведения этого лекарственного средства составляет менее часа, и его применяют во время еды, поэтому пациенту необходимо принимать несколько доз в один день, чтобы использовать это лекарственное средство в терапии.

Кальцитонин - это гормон, вырабатываемый щитовидной железой, который играет роль в регулировании уровня кальция и фосфата в крови. Кальцитонин лосося доступен для лечения состояний с высоким уровнем кальция в крови, таких как гиперкальциемия. Кальцитонин лосося имеет короткий период полувыведения, менее двух часов, поэтому пациенту необходимо принимать дозу один раз в день или несколько раз в день, чтобы использовать этот пептид в терапии.

Было показано, что соединения, которые вызывают агонию как амилиновых, так и кальцитониновых рецепторов, оказывают положительное воздействие, например снижают уровень глюкозы в крови и вызывают потерю массы тела. См. WO 2016/034604, WO 2015/071229 и WO 2010/085700. Естественный период полувыведения известных агонистов амилиновых и кальцитониновых рецепторов является коротким, поэтому желательное длительное действие. Однако химические модификации, предназначенные для увеличения времени действия, также показали снижение эффективности. Кроме того, агонисты рецепторов амилина и кальцитонина имеют проблемы со стабильностью из-за их склонности к фибрилляции и наличия лабильной дисульфидной связи при нейтральном pH.

Существует потребность в альтернативных соединениях, которые вызывают агонию как амилиновых, так и кальцитониновых рецепторов. Кроме того, существует потребность в двойных агонистах амилиновых и кальцитониновых рецепторов с пролонгированным временем действия и сохраненной эффективностью. Терапевтически желательные соединения будут вызывать агонию как амилиновых, так и кальцитониновых рецепторов и обеспечивать одно или более преимущественных свойств, таких как снижение потребления пищи, снижение массы тела, снижение уровня глюкозы в крови, снижение уровня триглицеридов и/или снижение уровня инсулина. Кроме того, терапевтически желательные соединения могут обладать одним или более дополнительными полезными свойствами, такими как пролонгированное время действия с сохраненной или улучшенной активностью в отношении агонизирующего действия как на амилиновые, так и на кальцитониновые рецепторы, низкий риск иммуногенного ответа, химическая стабильность при нейтральном pH и/или низкий риск фибрилляции.

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

Описание сущности изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, содержащему ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2), или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах выполнения соединение согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемая соль состоит из Ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2).

В другом аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение согласно изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В другом аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для лечения диабета типа 2.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для лечения ожирения.

В другом аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для лечения дислипидемии.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению или его фармацевтически приемлемой соли для лечения НАСГ. В другом аспекте изобретения предложено применение фармацевтической композиции согласно изобретению для лечения диабета типа 2.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение фармацевтической композиции согласно изобретению для лечения ожирения.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение фармацевтической композиции согласно изобретению для лечения дислипидемии.

В другом аспекте изобретения предложено применение фармацевтической композиции согласно изобретению для лечения НАСГ.

В другом аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения диабета типа 2.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения ожирения.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения дислипидемии.

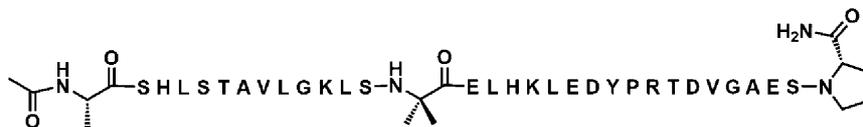
В еще одном аспекте изобретения предложено применение соединения согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения НАСГ.

Подробное описание изобретения

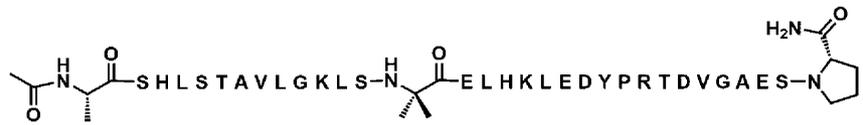
В настоящем изобретении предложен способ лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина с эффективным количеством инкретина или аналога инкретина. В настоящем изобретении также предложен способ лечения клинической или доклинической стадии диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина в комбинации с эффективным количеством инкретина или аналога инкретина.

Некоторые раскрытые в настоящем документе соединения, которые вызывают агонию амилиновых и кальцитониновых рецепторов, демонстрируют эффективное снижение потребления пищи и массы тела, а также снижение уровня глюкозы и инсулина. Кроме того, некоторые раскрытые в настоящем документе соединения демонстрируют пониженный риск иммуногенности и низкий уровень фибрилляции. Фармакокинетические свойства некоторых раскрытых в настоящем документе соединений демонстрируют значительно увеличенный период полувыведения, что позволяет принимать эти соединения один раз в неделю для применения в терапии. Другие варианты реализации настоящего изобретения применимы для получения таких соединений для применения в терапии. Также раскрыты способы комбинирования раскрытых в настоящем документе соединений с инкретинами или аналогами инкретина.

Одно из соединений по настоящему изобретению, соединение I, имеет следующую последовательность: ацетил-ASHLSTAVLGKLS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 1) или его фармацевтически приемлемую соль. Ниже приведено изображение структуры соединения I с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков ацетил-A1, Aib14 и P32-NH₂, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены



Соответственно одно из соединений по настоящему изобретению представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

Соединение, содержащее SEQ ID NO: 1, или его фармацевтически приемлемая соль может дополнительно содержать один или более дополнительных элементов для продления периода полувыведения соединения. Элементы, которые могут быть добавлены для этой цели к соединению, содержащему SEQ ID NO: 1, с линкером или без него и в любом подходящем положении в последовательности, включают Fc-фрагмент иммуноглобулина, фрагменты Fc-фрагмента иммуноглобулина, человеческий сывороточный альбумин (HSA), VHH, вариант нанотела VHH (вариабельный домен антител тяжелой цепи), фрагменты сывороточного альбумина человека, основную кислоту C₁₆-C₂₀, двухосновную кислоту C₁₆-C₂₀ и фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ) или альтернативу ПЭГ (например, полисаркозин). Другие элементы, которые могут быть добавлены для этой цели к соединению, содержащему SEQ ID NO: 1, с линкером или без него и в любом подходящем положении в последовательности, также могут включать од-

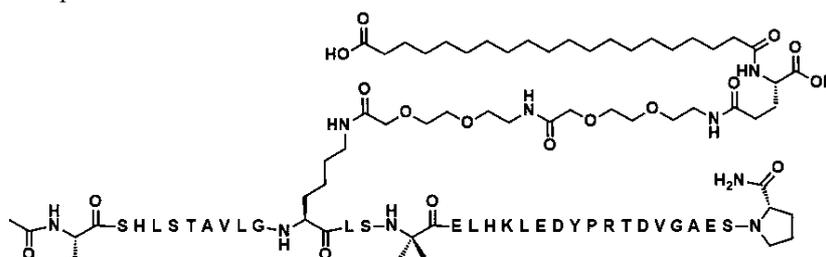
ноосновную кислоту C₁₆-C₂₂ или двухосновную кислоту C₁₆-C₂₂, одноосновную кислоту C₁₈-C₂₀ или двухосновную кислоту C₁₈-C₂₀.

В одном варианте реализации раскрытые в настоящем документе соединения представляют собой соединение, содержащее SEQ ID NO: 1, где соединение дополнительно содержит фрагмент жирной кислоты с линкером или без него.

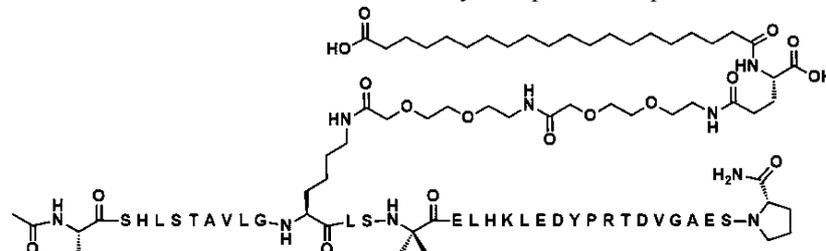
В другом варианте реализации раскрытые в настоящем документе соединения имеют ацетильную группу (CH₃CO) на аминокислотном остатке аланина на N-конце пептида. На это указывает фраза "ацетил" и тире перед N-концевым аминокислотным остатком в описании пептида. Описанные в настоящем документе соединения также имеют амидную группу (NH₂) на C-концевом аминокислотном остатке, пролине. Это обозначено в настоящем документе формулой "NH₂" и тире после C-концевого аминокислотного остатка в описании пептида.

В другом варианте реализации соединения, содержащее SEQ ID NO: 1, ацилировано по любой подходящей аминокислоте в последовательности и, следовательно, имеет увеличенный период полувыведения. В другом варианте реализации соединения, содержащее SEQ ID NO: 1, ацилировано по эpsilon-аминогруппе на боковой цепи лизина и, следовательно, имеет увеличенный период полураспада. В конкретном варианте реализации соединения, содержащее SEQ ID NO: 1, ацилировано по эpsilon-аминогруппе на боковой цепи лизина в соответствии с формулой 2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H. Соответственно, одно из соединений по настоящему изобретению представляет собой соединение II, содержащее следующую последовательность: ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2) или его фармацевтически приемлемую соль.

В конкретном варианте реализации соединения, состоящее из SEQ ID NO: 1, ацилировано по эpsilon-аминогруппе на боковой цепи лизина в соответствии с формулой 2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H. Соответственно, одно из соединений по настоящему изобретению представляет собой соединение II, состоящее из следующей последовательности: ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2) или его фармацевтически приемлемой соли. В конкретном варианте реализации соединения, состоящее по существу из SEQ ID NO: 1, ацилировано по эpsilon-аминогруппе на боковой цепи лизина в соответствии с формулой 2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H. Соответственно, одно из соединений по настоящему изобретению представляет собой соединение II, состоящее по существу из следующей последовательности: ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2) или его фармацевтически приемлемой соли. Ниже приведено изображение структуры соединения II с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков ацетил-A1, K11, Aib14 и P32-NH₂, где структуры этих аминокислотных остатков были расширены.



Соответственно одно из соединений по настоящему изобретению представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, содержащее SEQ ID NO: 1, или его фармацевтически приемлемую соль и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, содержащее SEQ ID NO: 2, или его фармацевтически приемлемую соль и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

чески приемлемой соли в комбинации с инкретином или аналогом инкретина, где соединение, содержащее SEQ ID NO: 2, или его фармацевтически приемлемую соль вводят до введения инкретина или аналога инкретина.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO: 1 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с инкретином или аналогом инкретина, где инкретин или аналог инкретина вводят до введения соединения, содержащего SEQ ID NO: 1, или его фармацевтически приемлемой соли. В другом варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения, содержащего SEQ ID NO: 2 или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с инкретином или аналогом инкретина, где инкретин или аналог инкретина вводят до введения соединения, содержащего SEQ ID NO: 2, или его фармацевтически приемлемой соли.

Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой соединение, содержащее SEQ ID NO: 1, для применения в комбинации для отдельного, одновременного или последовательного введения с инкретином или аналогом инкретина для лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии. Другой вариант реализации настоящего изобретения представляет собой соединение, содержащее SEQ ID NO: 2, для применения в комбинации для отдельного, одновременного или последовательного введения с инкретином или аналогом инкретина для лечения диабета, ожирения, НАСГ и/или дислипидемии.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 1, для получения лекарственного средства для лечения диабета. Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 2, для получения лекарственного средства для лечения диабета.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 1, для получения лекарственного средства для лечения диабета типа 2. Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 2, для получения лекарственного средства для лечения диабета типа 2.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 1, для получения лекарственного средства для лечения ожирения. Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 2, для получения лекарственного средства для лечения ожирения.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 1, для получения лекарственного средства для лечения дислипидемии. Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 2, для получения лекарственного средства для лечения дислипидемии.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 1, для получения лекарственного средства для лечения НАСГ. Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к применению соединения, содержащего SEQ ID NO: 2, для получения лекарственного средства для лечения диабета.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно использует специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем документе, можно применять на практике или при тестировании двойных агонистов рецепторов амилина и кальцитонина, фармацевтические композиции, фармацевтические комбинации, предпочтительные способы и материалы описаны в настоящем документе.

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

Термин "аналог" относится к соединению, такому как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает по меньшей мере один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый нативным агонистом этого рецептора.

Термин "комбинация" в настоящем документе обозначает соединения, описанные в настоящей документе, которые могут быть использованы в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или большим количеством дополнительных терапевтических агентов, которые полезны для стимулирования потери массы, лечения диабета, состояний, связанных с диабетом, ожирением, НАСГ и/или дислипидемией.

Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать с заявляемыми соединениями, включают инсулин или аналоги инсулина; соединения инкретина или аналоги инкретина, такие как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) или аналоги GLP-1, желудочный ингибирующий полипептид (GIP) или аналоги GIP, оксинтомодулин или аналоги оксинтомодулина;

двойные агонисты GIP/GLP-1; триагонисты Gcg/GIP/GLP-1 (триагонисты глюкагона, GIP и GLP-1); или комбинации любых из вышеуказанных агентов. Заявленные соединения и дополнительный терапевтический агент (агенты) могут быть либо введены вместе при помощи одного и того же способа и устройства доставки, например, одного драже, капсулы, таблетки или инъекционной лекарственной формы; либо введены по отдельности в одно и то же время при помощи отдельных устройств или способов доставки, или последовательно.

Термин "диабет" относится к заболеванию, при котором способность организма вырабатывать или реагировать на гормон инсулин нарушена, что приводит к аномальному метаболизму углеводов и повышенному уровню глюкозы в крови и моче. Используемый в настоящем документе термин "диабет" может относиться к хроническому состоянию, которое влияет на то, как организм перерабатывает сахар в крови или глюкозу, например, к сахарному диабету 2 типа (T2DM); хроническому состоянию, при котором поджелудочная железа вырабатывает мало инсулина или вообще не вырабатывает его, например, сахарному диабету 1 типа (T1DM); состоянию, при котором уровень сахара в крови высокий, но недостаточно, чтобы быть диабетом 2 типа, например, преддиабету; форме высокого уровня сахара в крови, поражающей беременных женщин, например, гестационному диабету.

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

Термин "инкретин", используемый в настоящем документе, относится к группе эндогенных метаболических гормонов, которые выделяют из энтероэндокринных клеток желудка и поджелудочной железы для стимуляции снижения уровня глюкозы в крови, как правило, путем регуляции количества инсулина, секретируемого после еды. Термин "аналог инкретина", используемый в настоящем документе, относится к группе синтетических миметиков инкретина, которые физиологически сходны с инкретинами.

Кроме того, "аналоги инкретинов" могут иметь благоприятные фармакологические свойства по сравнению с эндогенными инкретинами.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" или "лечить" относится к ведению и уходу за пациентом, имеющим состояние, при котором показано введение амилина и пептидного агониста рецептора кальцитонина с целью борьбы или облегчения симптомов и осложнений состояния. Лечение включает введение соединения или фармацевтической композиции, содержащей соединение из описанных в настоящем изобретении соединений, пациенту, нуждающемуся в этом, для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения заболевания, состояния или расстройства. Предпочтительно лечение включает введение соединения или фармацевтической композиции, содержащей соединение из описанных в настоящем документе соединений, пациенту, нуждающемуся в этом, для достижения чистой потери массы тела, уменьшения потребления пищи, снижения уровня глюкозы в крови и/или снижения уровня триглицеридов. Пациент, подлежащий лечению, является животным и предпочтительно человеком.

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения из раскрытых в настоящем документе соединений или фармацевтической композиции, содержащей раскрытые в настоящем документе соединения, при которой однократное или многократное введение дозы пациенту вызовет биологический или медицинский ответ или желаемый терапевтический эффект, которого добивается медицинский работник. Предпочтительно эффективное количество соединения или фармацевтической композиции, содержащей соединение из раскрытых в настоящем документе соединений, вводимое нуждающемуся в этом пациенту, должно приводить к чистой потере массы тела, уменьшению потребления пищи, снижению уровня глюкозы в крови и/или снижению уровня триглицеридов. Доза может включать в себя более высокую начальную нагрузочную дозу с последующей более низкой дозой.

Термин "пациент" относится к животному и предпочтительно к человеку. В некоторых вариантах реализации пациент, предпочтительно человек, дополнительно характеризуется заболеванием, расстройством или состоянием, при котором было бы благоприятным введение соединения, вызывающего агонию как рецепторов амилина, так и рецепторов кальцитонина. Фармацевтические композиции, содержащие раскрытые в настоящем документе соединения, можно вводить перорально или парентерально пациентам, нуждающимся в таком лечении. Парентеральное введение может осуществляться путем подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции с помощью шприца, необязательно шприца-ручки, или механического инжектора. В качестве альтернативы, парентеральное введение может быть осуществлено с помощью инфузионного насоса. В вариантах реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, подходящие для введения пациенту, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению и одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Такие фармацевтические композиции могут быть получены любым из множества способов с применением тради-

ционных вспомогательных веществ для фармацевтических продуктов, хорошо известных в данной области техники (Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Philadelphia, PA, USA (2006)).

Термин "НАСГ", используемый в настоящем документе, означает неалкогольный стеатогепатит, также известный как жировая болезнь печени. "НАСГ" также относится к воспалению печени и повреждению, вызванному накоплением жира в печени. "НАСГ" также относится к подтипу неалкогольной жировой болезни печени ("НАЖБП"). В некоторых вариантах реализации "НАСГ" может быть синонимом "НАЖБП".

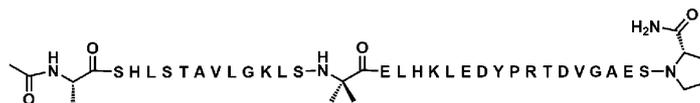
Термин "ожирение", используемый в настоящем документе, относится к расстройству, связанному с избытком жира в организме, которое увеличивает риск возникновения проблем со здоровьем. Термин "ожирение" также относится к массе тела, превышающей нормальную массу тела для данного роста. Термин "ожирение" также относится к ИМТ выше 30,0. Используемый в настоящем документе индекс массы тела (ИМТ) относится к массе тела человека в килограммах, деленному на квадрат роста в метрах.

Определенные сокращения определены следующим образом: "Aib" относится к 2-аминоизомаляновой кислоте; "AMU1" относится к амилиновому рецептору 1; "цАМФ" относится к циклическому аденозинмонофосфату; "СТ" относится к кальцитонину; "ДХМ" относится к дихлорметану; "DIEA" относится к диизопропилэтиламину; "DIO" относится к ожирению, вызванному диетой; "ДМФА" относится к диметилформамиду; "FBS" относится к фетальной бычьей сыворотке; "GPCR" относится к рецептору(ам), связанному с G-белком; "HEPES" относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте; "HTRF" относится к однородной флуоресценции с временным разрешением; "IBMX" относится к 1-метил-3-изобутилксантину; "Mtt" относится к 4-метилтритулу; "PBMC" относится к мононуклеарным клеткам периферической крови; "РуАОР" относится к гексафторфосфату (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония; "ОФ-ВЭЖХ" относится к обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления; и "ТФУ" относится к трифторуксусной кислоте.

Пример 1. Получение и очистка соединения I и соединения II

Соединение I и соединение II получают в соответствии со следующими стадиями. Сначала синтезируют соединение I с использованием химии флуоренилметилоксикарбонила (Fmoc)/трет-бутила (t-Bu) на 12-канальном мультиплексном синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

Полистирольную смолу Rink Amide AM LL (Novabiochem, sub: 0,33 мэкв/г, 100-200 меш, № по каталогу 855045) используют для синтеза в масштабе 0,13 ммоль. Используют стандартные защитные группы боковой цепи. Fmoc-Lys(Mtt)-OH используют для лизина в положении 11. Удаляли группы Fmoc перед каждой стадией сочетания (2 × 7 мин) с использованием 20% пиперидина в ДМФА. Все сочетания аминокислот выполняют в течение 30 мин при 50°C с использованием равного молярного соотношения аминокислоты Fmoc (0,3 мМ), диизопропилкарбодиимида (0,9 мМ) и Охута (0,9 мМ) при 7,7-кратном молярном избытке по сравнению с теоретической загрузкой пептида. N-концы ацетилировали 5% уксусным ангидридом, 5% DIEA в ДМФА в течение 30 мин. Ниже представлена схема соединения I (SEQ ID NO: 1).



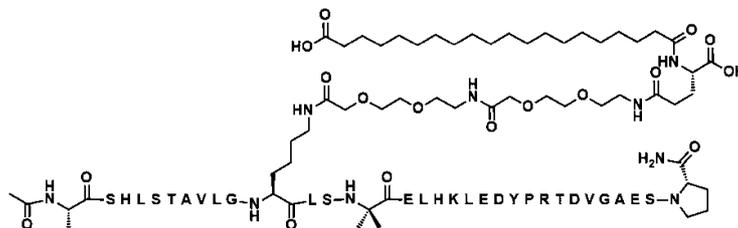
Затем смолу 6 раз тщательно промывали дихлорметаном (ДХМ) для удаления остаточного ДМФА. Защитную группу Mtt на лизине в положении 11 селективно удаляли из пептидной смолы с помощью двух обработок 30% гексафторизопропанолом (Oakwood Chemicals) в ДХМ (2×40-минутная обработка).

Синтез соединения II осуществляют по следующим стадиям. Последующее присоединение фрагмента линкер-жирная кислота осуществляли путем сочетания 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH, ChemPer, Inc.), α-трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), моно-OtBu-эйкозановой кислоты (WuXi AppTec, Шанхай, Китай). Для каждого сочетания, которое длится 1 ч, использовали 3-кратный избыток реагентов (AA: РуАОР: DIEA=1: 1:1 моль/моль).

После завершения синтеза пептидную смолу промывали ДЭМ и затем тщательно высушивали на воздухе. Обработывали сухую смолу 10 мл смеси для расщепления (ТФУ:вода:триизопропилсилан, 95:2,5:2,5 (об./об./об.)) в течение 2 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали, дважды промывали 2 мл чистой трифторуксусной кислотой (ТФУК) и объединенные фильтраты 4 раза обрабатывали холодным диэтиловым эфиром (-20°C) для осаждения неочищенного пептида. Затем центрифугировали суспензию пептид/диэтиловый эфир при 3500 об./мин в течение 2 мин с получением твердого осадка, декантировали надосадочную жидкость и еще два раза растирали твердый осадок с диэтиловым эфиром, и сушили в вакууме. Неочищенный пептид солибилизировали в 20% ацетонитриле/20% уксусной кислоте/60% воды и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ на препаративной колонке Waters Xselect Peptide CSH C18 130A, 5 мкм, 19×150 мм, PN 186007021 с линейным градиентом с использованием 100% ацетонитрила и буферной системы 0,1% ТФУ/вода (20-40% ацетонитрила за 60 мин). Оценивали чистоту пептида путем аналитической ОФ-ВЭЖХ, и критерием для объединения являлась чистота >95%. Было обнаруже-

но, что чистота основного пула соединения I составляет >99,0%. В результате последующей лиофилизации конечного основного пула продуктов получали лиофилизированную ТФУ соль пептида. Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС. Средняя ММ=3447,8 Да. Ожидаемая масса: (М+3Н): 1150,3, найдена 1150,0.

Было обнаружено, что чистота основного пула соединения II составляла >98,0%. В результате последующей лиофилизации конечного основного пула продуктов получали лиофилизированную ТФУ соль пептида. Молекулярную массу определяют с помощью ЖХ/МС. Средняя ММ=4191,8 Да. Ожидаемая масса: (М+3Н): 1398,2, обнаружено 1398,2. Ниже представлена схема соединения II (SEQ ID NO: 2).



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

Пример 2. Функциональная активность *in vitro*

Рецепторы AMY1 и СТ представляют собой GPCR, которые функционально связаны с белками Gas. Стимуляция этих рецепторов приводит к увеличению продукции внутриклеточного цАМФ, что можно обнаружить с помощью стандартных технологий *in vitro*. Рецепторы AMY1 или СТ человека стабильно экспрессируются в клетках мочевого пузыря человека (UM-UC-3) под контролем вектора экспрессии pCDNA (CALCR) или pCMV piggybac (RAMP1). Клетки AMY1 культивировали в среде MEM 1× (Corning) с добавлением 10% FBS, 1% раствора антибиотика/антимикотика, 1 мМ пирувата натрия, 1× MEM NEAA, 1× GlutaMAX-I, 200 мкг/мл гигромицина В и 0,4 мкг/мл пурамицина. СТ-клетки культивировали в той же среде, за исключением того, что в ней отсутствует пурамицин. Культивируемые клетки выращивали до 70% слияния, а затем инкубировали в течение ночи со свежей средой.

В день анализа 10 мкл буфера для анализа (MEM без фенолового красного (Corning, кат. № 17-305-CV), 0,1% казеина, 0,5 мМ IBMX, 5 мМ HEPES, pH 7,4) вносили в каждую лунку белого 384-луночного планшета, покрытого D-лизином (Corning, кат. № 354661). Пептиды, разведенные в ДМСО, добавляли (200 нл/лунку) в серии разведений 1:3 с использованием акустического жидкостного обработчика ЕСНО (Beckman). Культивируемые клетки отделяли с помощью TrypLE Express (Gibco), ресуспендировали в буфере для анализа, и в каждую лунку вносили 10 мкл, содержащих 1200 клеток/лунку (hCT) или 1500 клеток/лунку (hAMY1). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч.

Количество внутриклеточного цАМФ количественно определяли технологией HTRF (гомогенная флуоресценция с временным разрешением, Cisbio) по инструкциям поставщика. Вкратце, 10 мкл конъюгата цАМФ-d2 и 10 мкл конъюгата анти-цАМФ-криптит в лизирующем буфере инкубировали с обработанными клетками при комнатной температуре в течение 60 мин. Сигнал HTRF немедленно обнаруживали с использованием планшет-ридера Envision (Perkin-Elmer) для расчета отношения флуоресценции при 665 к 620 нм. Исходные данные преобразовывали в количество цАМФ (пмоль/лунка), используя стандартную кривую цАМФ, построенную для каждого эксперимента. Относительные значения EC₅₀ рассчитывали из верхнего и нижнего диапазона кривой концентрация-ответ, определенной с использованием 1 нМ СТ лосося (Bachem) в качестве максимума и только буфера в качестве минимума с помощью программы подбора логистической кривой с четырьмя параметрами (Genedata Screener® v12.0.4). Соединения по настоящей заявке проявляют активность в отношении рецепторов амилина и кальцитонина, как показано в табл. 1.

Таблица 1. Активность соединений I и II в отношении рецепторов амилина и кальцитонина

Соединение	hAMY1 цАМФ EC ₅₀ (нМ)	hCT цАМФ EC ₅₀ (нМ)
Соединение I	49,3 ± 8,04 (n=4)	31,7 ± 5,8 (n=3)
Соединение II	49,4 ± 5,14 (n=7)	40,9 ± 14,7 (n=4)
Прамлинтид	44,0 ± 4,79 (n=22)	2320 ± 408 (n=18)
Кальцитонин человека	397 ± 63,5 (n=7)	106 ± 20,5 (n=6)

Пример 3. Эффективность *in vivo* в обычных крысиных моделях

Самцов крыс Sprague Dawley (SD) от Envigo Laboratories массой приблизительно 300 г использова-

ли для оценки эффектов соединения II на острое снижение потребления пищи и потерю массы тела *in vivo* во время 96-часового оценочного исследования. Крысы содержали в соответствии с утвержденными протоколами содержания и использования животных для Lilly Research Laboratories и помещали индивидуально на 12-часовой световой цикл с 22:00 до 10:00. Утром в день исследования измеряли исходную массу тела животного и массу корма, и носитель (20 мМ Трис, pH8, 50 мг/мл D-маннита, 0,02% PS80) или соединение II (SEQ ID NO: 2) отдельно в носителе (20 мМ Трис, pH8, 50 мг/мл D-маннита, 0,02% PS80) вводили подкожно в разных дозах.

Массу тела и корма животного измеряли через 24, 48, 72 и 96 ч после введения. Рассчитывали суточное потребление пищи и процент снижения массы тела. Результаты приведены ниже в табл. 2 и 3. Все данные представлены в виде среднего суточного потребления пищи и процентного снижения массы тела. Как показали результаты, соединение II оказывает эффект снижения потребления пищи и снижения массы тела остро и дозозависимым образом. Кроме того, даже очень низкие дозы показывают эффективность в снижении потребления пищи и массы тела.

Таблица 2. Влияние соединения II на ежедневное потребление пищи у крыс Sprague-Dawley

Доза (нмоль/кг)	Ежедневное потребление пищи (граммы)				
	0 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Контроль	0,00	18,58	20,42	19,88	20,12
0,1	0,00	16,12	19,65	19,93	21,60
0,3	0,00	15,55	18,65	20,47	21,32
1	0,00	13,72	16,92	19,77	21,03
3	0,00	5,32	10,22	14,88	18,78
10	0,00	2,77	0,87	9,62	15,45
30	0,00	3,75	0,30	5,67	14,85

Таблица 3. Влияние соединения II на % изменения массы тела у крыс Sprague-Dawley

Доза (нмоль/кг)	% Изменения массы тела (кг)				
	0 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Контроль	0,00	-0,38	0,54	1,27	1,61
0,1	0,00	-0,89	-0,16	0,61	2,06
0,3	0,00	-0,91	-0,64	0,39	1,50
1	0,00	-1,82	-1,44	-0,38	0,57
3	0,00	-3,63	-4,68	-4,66	-3,26
10	0,00	-5,67	-10,02	-9,88	-8,95
30	0,00	-6,24	-11,60	-12,43	-11,74

Пример 4. Эффективность *in vivo* у крыс с ожирением, вызванным диетой (DIO)

Это исследование проводят для изучения действия соединения II на диабет и/или ожирение у крыс DIO. В следующих исследованиях использовали самцов крыс Long Evans (Envigo) с ожирением, вызванным диетой (DIO), в возрасте от 24 до 30 недель, которых содержали на богатой калориями диете с момента прибытия в Lilly (TD95217; Teklad, Madison, WI). Животных размещали раздельно в помещении с контролируемой температурой (24°C) с 12-часовым циклом "свет/тьма" (свет загорается в 22:00) и с свободным доступом к пище (TD95217) и воде.

Крыс рандомизировали в соответствии с их массой тела, так что каждая экспериментальная группа животных имела сходную массу тела. Масса тела колебалась от 514 до 710 г.

Каждая группа содержала по пять крыс. Носитель и соединение II (0,1 и 100 нмоль/кг), растворенные в носителе (Трис, pH 8, (50 мг/мл D-маннита)+0,02%ps80), вводили путем подкожной (п/к) инъекции (1 мл/кг) крысам, которых кормили DIO без ограничений за 30-60 мин до наступления темного цикла каждые 3 дня в течение 15 дней. П/к инъекции осуществляли в день 1, 4, 7, 10 и 13. Массу тела и потребление пищи измеряли ежедневно на протяжении всего исследования. Абсолютные изменения массы тела рассчитывали путем вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией молекулы. Состав тела оценивали с помощью количественного ядерного магнитного резонанса (QMNR, EchoMRI LLC, Хьюстон, Техас) в дни -1 (за один день до лечения) и 15.

В конце исследования отбирали кровь для измерения уровня глюкозы и инсулина в плазме. Уровень глюкозы в крови измеряли глюкометрами AccuChek (Roche, Indianapolis, IN). Инсулин измеряют с помощью ИФА (MSD, Rockville, Мэриленд).

Все данные представлены как среднее \pm СОС 5 животных/группа. Статистический анализ выполня-

ли с применением повторных измерений ANOVA, с последующим применением метода Даннета для множественных сравнений. Значимые различия выявляли при $p < 0,05$.

Соединение II снижает массу тела и потребление пищи у самцов крыс линии DIO дозозависимым образом. Снижение массы тела, вероятно, в первую очередь связано с уменьшением жировой массы. В дополнение к существенной потере массы тела при лечении с применением соединения II наблюдается снижение уровня глюкозы в сыворотке и снижение уровня инсулина в зависимости от дозы, как показано в табл. 4 и 5.

Измерения состава тела проводили в день 0 и день 14. Изменение по сравнению с первоначальным измерением представлено как "Измерение в день 0" - "Измерение в день 14". Все данные представлены как среднее \pm СОС 5 животных/группа в день 13. Статистический анализ выполняли с применением повторных измерений ANOVA, с последующим применением метода Даннета для множественных сравнений. Значимые различия выявляли при $p < 0,05$.

Таблица 4. Влияние соединения II на массу тела, совокупное потребление пищи и жировую массу у крыс линии DIO на 15-й день

Соединение (доза)	Изменение массы тела (г)	Совокупное потребление пищи (г)	Изменение жировой массы (г)
Носитель (1 мл/кг, п/к)	8,36 \pm 3,69	236,38 \pm 6,08	3,58 \pm 1,0
Соединение II (0,1 нмоль/кг)	4,32 \pm 1,66	235,58 \pm 6,34	4,93 \pm 2,96
Соединение II (0,3 нмоль/кг)	-18,74 \pm 3,31*	197,14 \pm 14,35	-10,62 \pm 2,80*
Соединение II (1 нмоль/кг)	-38,30 \pm 5,67*	163,56 \pm 13,40*	-22,42 \pm 4,74*
Соединение II (3 нмоль/кг)	-59,84 \pm 5,32*	125,70 \pm 12,36*	-38,09 \pm 3,64*
Соединение II (10 нмоль/кг)	-73,06 \pm 4,27*	110,12 \pm 11,24*	-43,26 \pm 0,81*
Соединение II (30 нмоль/кг)	-77,24 \pm 3,41*	103,14 \pm 13,53*	-41,94 \pm 6,05*
Соединение II (100 нмоль/кг)	-85,84 \pm 3,78*	89,36 \pm 10,45*	-40,77 \pm 3,46*

Значимые различия идентифицировали при $p < 0,05$.

Таблица 5. Влияние лечения соединением II на уровень глюкозы в крови натощак, инсулин, индекс резистентности к инсулину (НОМА-IR=глюкоза натощак [ммоль/л] \times инсулин натощак [мкЕд/мл])/22,5) и площадь под кривой глюкозы для 60 мин (AUC 60 мин) во время перорального теста на толерантность к глюкозе (OGTT) у крыс DIO

Соединение (доза)	Глюкоза натощак [FG] (ммоль/л)	Инсулин натощак [FI] (мкЕд/мл)	НОМА-IR [(FG X FI)/22,5]	Глюкоза (мг/дл) AUC (60 мин) во время OGTT
Носитель (1 мл/кг, п/к)	7,10 \pm 0,40	39,08 \pm 4,77	12,52 \pm 1,95	14582,25 \pm 1299,63
Соединение II (0,1 нмоль/кг)	6,94 \pm 0,22	41,68 \pm 5,13	12,98 \pm 1,69	14638,50 \pm 607,28
Соединение II (0,3 нмоль/кг)	6,50 \pm 0,13	35,06 \pm 4,89	10,22 \pm 1,56	11367,75 \pm 486,94*
Соединение II (1 нмоль/кг)	6,94 \pm 0,43	18,38 \pm 3,53*	5,82 \pm 1,31*	11367,75 \pm 703,77*
Соединение II (3 нмоль/кг)	6,78 \pm 0,28	23,84 \pm 2,15*	7,26 \pm 0,93*	11189,25 \pm 657,87*
Соединение II (10 нмоль/кг)	7,04 \pm 0,20	28,08 \pm 2,51	8,72 \pm 0,62	10959,75 \pm 507,17*
Соединение II (30 нмоль/кг)	6,02 \pm 0,38	15,16 \pm 3,63*	4,02 \pm 0,91*	9936,00 \pm 752,37*
Соединение II (100 нмоль/кг)	5,86 \pm 0,32*	11,92 \pm 2,46*	3,20 \pm 0,76*	10014,00 \pm 538,58*

* Значимые различия идентифицировали при $p < 0,05$.

Пример 5. Фармакокинетическое поведение соединения II

Концентрацию Соединения II в плазме определяли с применением квалифицированного метода жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ/МС) в Q Squared Solutions BioSciences LLC, Итака, Нью-Йорк. Соединение II и аналог в качестве внутреннего стандарта экстрагировали из 100% видоспецифичной плазмы мышей путем осаждения белка с последующей твердофазной экстракцией. Исходную массу соединения II, содержащую пептид плюс ацильную цепь, определяли с помощью масс-спектрометра Q-Exactive Orbitrap™.

В исследовании фармакокинетики на обезьянах самцам и самкам обезьян *Cynomolgus* вводили однократно подкожно дозу 20 нмоль/кг (0,084 мг/кг) соединения II в трис-маннитоловом буфере (pH 8,0) в объеме 0,2 мл/кг. Кровь собирали до введения дозы и через 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 336, 408, 504 ч после введения дозы для фармакокинетической характеристики. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6. Индивидуальные и средние фармакокинетические параметры плазмы после однократной подкожной дозы соединения II 20 нмоль/кг для самцов и самок яванских макаков

Соединение	ID животного	T _{1/2} (час)	T _{max} (час)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{0-inf} (ч*нмоль/л)	CL/F (мл/час/кг)
Соединение II	P0001	185	12	198	50355	0,40
	P0101	170	72	138	44678	0,45
	Среднее значение	178	42	168	47516	0,42

Сокращения: T_{1/2}=период полувыведения, T_{max}=время до достижения максимальной концентрации, C_{max}=максимальная наблюдаемая концентрация в плазме, AUC_{0-inf}=площадь под кривой от момента времени 0 ч до бесконечности, CL/F=клиренс/биодоступность.

В фармакокинетическом исследовании на крысах самцам крыс Sprague Dawley вводили однократно подкожно дозу 20 нмоль/кг (0,084 мг/кг) соединения II в трис-маннитоловом буфере (pH 8,0) в объеме 0,2 мл/кг. Кровь собирали через 1-, 3-, 6-, 12-, 24-, 48-, 72-, 96-, 120- и 144- ч после введения дозы для фармакокинетической характеристики. Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7. Индивидуальные и средние фармакокинетические параметры плазмы после однократного подкожного введения дозы 20 нмоль/кг соединения II (SEQ ID NO: 2) самцам крыс Sprague Dawley

Соединение	Животное ID	T _{1/2} (час)	T _{max} (час)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{0-inf} (ч*нмоль/л)	CL/F (мл/час/кг)
Соединение II	R0001	47	48	88	8409	2,38
	R0002	60	12	81	8702	2,30
	R0003	67	12	99	8655	2,31
	Среднее значение	58	24	90	8588	2,33
	SD	10	21	9	157	0,04

Сокращения: T_{1/2}=период полувыведения, T_{max}=время до достижения максимальной концентрации, C_{max}=максимальная наблюдаемая концентрация в плазме, AUC_{0-inf}=площадь под кривой от момента времени 0 ч до бесконечности, CL/F=клиренс/биодоступность.

Увеличенный период полувыведения, продемонстрированный соединением II у яванских макаков, показывает, что терапия один раз в неделю дозой соединения II у пациентов является возможной.

Пример 6. Эффективность соединения II *in vivo* у крыс с ожирением, индуцированным диетой (DIO), в комбинации с другими соединениями инкретина

Это исследование проводили для изучения влияния соединения II на диабет и/или ожирение у крыс линии DIO при введении в комбинации с другими соединениями инкретина, включая агонист GLP-1 (Соединение III), аналог оксинтомодулина (соединение IV) и триагонист глюкагона, GLP-1 и GIP (соединение V). В следующих исследованиях использовали самцов крыс Long Evans (Envigo) с ожирением, вызванным диетой (DIO), которых содержали на богатой калориями диете с момента прибытия в Lilly (TD95217; Teklad, Madison, WI). Животных размещали раздельно в помещении с контролируемой температурой (24°C) с 12-часовым циклом "свет/тьма" (свет загорается в 22:00) и с свободным доступом к пище (TD95217) и воде.

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

Каждая группа содержит по пять крыс. Носитель и соединение II (1 нмоль/кг) растворяли в носителе (40 мМ Трис-HCl, pH 8+0,02% PS80) и вводили путем подкожной (п/к) инъекции (1 мл/кг) крысам DIO, которых кормили *ad libitum*, в период от 30 до 90 мин до наступления темного цикла каждые 3 дня в течение 14 дней. П/к инъекции осуществляли в день 1, 4, 7, 10 и 13. Массу тела и потребление пищи измеряют ежедневно на протяжении всего исследования. Абсолютные изменения массы тела рассчитывали путем вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией молекулы.

В конце исследования отбирали кровь для измерения уровня глюкозы и инсулина в плазме. Уровень глюкозы в крови измеряли глюкометрами AccuChek (Roche, Indianapolis, IN). Инсулин измеряют с помощью

ИФА (MSD, Rockville, Мэриленд).

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

Таблица 8. Влияние соединения II в комбинации с соединением III, соединением IV или соединением V и без них на массу тела и общее потребление пищи

Обработка*	Масса тела Изменение (г)**	Общее потребление Пищи (г)***
Носитель (10 мл/кг)	-3,42 \pm 6,10	212,08 \pm 16,84
Соединение (1 нмоль/кг)	-53,84 \pm 2,85*	137,38 \pm 4,28*
Соединение III (10 нмоль/кг)	-54,20 \pm 6,52*	150,04 \pm 5,71*
Соединение IV (10 нмоль/кг)	-50,24 \pm 6,36*	165,86 \pm 7,45*
Соединение V (3 нмоль/кг)	-43,28 \pm 2,54*	157,50 \pm 10,63*
Соединение II + Соединение III	-85,64 \pm 5,08*#+	92,66 \pm 11,52*#+
Соединение II + Соединение IV	-85,43 \pm 8,66*#	113,58 \pm 9,19*#
Соединение II + Соединение V	-89,70 \pm 11,63*#+	97,16 \pm 6,45*#

*Средство для лечения вводили подкожно каждые три дня в 1, 4, 7, 10 и 13 дни.

** Измерения массы тела проводили ежедневно. Изменение массы тела представляет собой разницу от дня 1 до дня 14, выраженную в граммах.

*** Совокупное потребление пищи представляло собой общее количество пищи, потребленной в течение 14-дневного периода лечения.

Статистический анализ был выполнен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим анализом Тьюки. * $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель; # $p < 0,05$ по сравнению с группой соединения III, соединения IV или соединения V; + $p < 0,05$ по сравнению с соединением II

Пример 7. Аналог соединения II в комбинации с агонистом GIP-GLP.

Это исследование проводили для изучения действия аналога соединения II на состояния диабета и/или ожирения у крыс DIO при введении соединения VI (SEQ ID NO: 9), двойного агониста GIP и GLP-1. В следующих исследованиях использовали самцов крыс Long Evans (Envigo) с ожирением, вызванным диетой (DIO), которых содержали на богатой калориями диете с момента прибытия в Lilly (TD95217; Teklad, Madison, WI). Животных размещают раздельно в помещении с контролируемой температурой (24°C) с 12-часовым циклом "свет/тьма" (свет загорается в 22:00) и с свободным доступом к пище (TD95217) и воде.

Крыс рандомизировали в соответствии с их массой тела, так что каждая экспериментальная группа животных имела сходную массу тела. Масса тела колеблется от 549 до 683 г.

Каждая группа содержит по пять крыс. Носитель и соединение II (1 нмоль/кг) растворяли в носителе (10 mM Трис-НСI, pH 7,5, (50 мг/мл D-маннита)+0,02% PS80) и вводили путем подкожной (п/к) инъекции (1 мл/кг) крысам DIO, которых кормили ad libitum, в период от 30 до 90 мин до наступления темного цикла каждые 3 дня в течение 14 дней. П/к инъекции осуществляли в день 1, 4, 7, 10 и 13. Массу тела и потребление пищи измеряют ежедневно на протяжении всего исследования. Абсолютные изменения массы тела рассчитывали путем вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией молекулы.

В конце исследования отбирали кровь для измерения уровня глюкозы и инсулина в плазме. Уровень глюкозы в крови измеряли глюкометрами AccuChek (Roche, Indianapolis, IN). Инсулин измеряют с помощью ИФА (MSD, Rockville, Мэриленд).

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

Обработка*	Масса тела Изменение (г)**	Общее потребление Пищи (г)***
Носитель (10 мл/кг)	6,18±1,37	231,58±1032
Аналог Соединения II (0,1 нмоль/кг)	-24,82±3,24*	190,74±6,56
Соединение VI (3 нмоль/кг)	-18,10±6,67*	196,54±16,98
Аналог Соединения II + Соединение VI	-39,84±2,20*#	174±6,48*

*Средство для лечения вводили подкожно каждые три дня в 1, 4, 7, 10 и 13 дни.

** Измерения массы тела проводили ежедневно. Изменение массы тела представляет собой разницу от дня 1 до дня 16, выраженную в граммах.

*** Совокупное потребление пищи представляло собой общее количество пищи, потребленной в течение 16-дневного периода лечения.

Статистический анализ был выполнен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим анализом Тьюки. * $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель; # $p < 0,05$ по сравнению с GIP-706.

Аналог соединения II в комбинации с соединением VI вызывал большую потерю массы тела, чем индивидуальная обработка, что, вероятно, в основном связано со значительным снижением кумулятивного потребления пищи, вызванным комбинированной терапией.

Пример 8. Оценка риска иммуногенности

Анализ MAPPs (протеомика пептидов, ассоциированных с МНС):

Первичные дендритные клетки человека от десяти нормальных доноров получали из лейкоцитарной пленки путем выделения клеток CD14⁺ и дифференцировали в незрелые дендритные клетки путем инкубации с 20 нг/мл IL-4 и 40 нг/мл GM-CSF в полной среде RPMI, содержащей 5% замены сыворотки (Thermo Fisher Scientific, кат. № A2596101) в течение трех дней при 37°C и 5% CO₂, как описано (Knieman et al., "The Human Leukocyte Antigen Class II Immunopeptidome of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein", Cell Reports, 33, 108454 (2020)). Три микромоля испытуемого антитела добавляли примерно к 5×10^6 клеток на 4-й день, и после 5-часовой инкубации заменяли свежую среду, содержащую 5 мкг/мл LPS, для трансформации клеток в зрелые дендритные клетки. На следующий день созревшие клетки лизировали в 1 мл буфера RTPA с ингибиторами протеаз и ДНКазой. Лизаты хранили при температуре -80°C до анализа образцов.

Для выделения молекул HLA-II из размороженного лизата с использованием биотинилированных анти-рап HLA антител класса II (клон Tu39) использовали автоматизированную систему обработки жидкостей. Связанный комплекс рецептор-пептид элюировали 5% уксусной кислотой, 0,1% ТФУ. Элюированные пептиды МНС-II пропускают через предварительно промытый фильтр MWCO 10k для удаления белков с высокой молекулярной массой. Выделенные пептиды МНС-II анализировали с помощью нано-ЖХ/МС с использованием системы Thermo easy 1200 nLC-HPLC с масс-спектрометром Thermo LUMOS. Для разделения использовали колонку YMC-ODS C18 размером 75 мкм×7 см для 65-минутного градиента со скоростью потока 250 нл/мин и 0,1% муравьиной кислоты в воде в качестве растворителя А и 80% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислоты в качестве растворителя В. Масс-спектрометрию осуществляли в режиме полного сканирования с разрешением 240000, за которым следовал 3-секундный цикл МС/МС, зависящий от данных, состоящий из быстрых сканирований с ионной ловушкой с фрагментацией HCD и EThcD.

Идентификации пептидов генерируются внутренним конвейером протеомики (Higgs et al., "Label-free LC-MS method for the identification of biomarkers", Methods in Molecular Biology, 428, 209-230 (2008)) с использованием нескольких алгоритмов поиска без параметра поиска фермента в базе данных крупного рогатого скота/человека, содержащей тестовые последовательности антител. Рабочий процесс KNIME использовали для обработки идентификационных файлов для образцов. Пептиды, идентифицированные в тестовых образцах, выравнивали по исходной последовательности. Для всех доноров создавали сводные данные, в которых указывали процент доноров, у которых обнаруживаются остатки не зародышевой линии, количество различных областей, в которых проявляются пептиды с остатками не зародышевой линии, и глубина отображения пептидов в каждой области с остатками не зародышевой линии. Увеличение степени обнаружения пептидов не зародышевой линии связано с повышенным риском иммуногенности. Результаты для соединения II показаны в табл. 9 и свидетельствуют о низком уровне риска иммуногенности, связанного с соединением II

Таблица 9. Результаты MAPP

Тестируемое соединение	% Доноров	# кластеров	Общее количество не зародышевых остатков из всех кластеров	Общее количество пептидов не зародышевой линии из всех кластеров
Соединение II	0%	0	н/д*	н/д*

*н/д означает, что итоговые значения неприменимы, поскольку не было доноров с остатками, не относящимися к зародышевой линии.

Анализ Т-клеточной пролиферации

Этот анализ оценивает способность тестируемого кандидата активировать CD4⁺ Т-клетки, индуцируя клеточную пролиферацию, как описано в (Walsh et al., "Post-hoc assessment of the immunogenicity of three antibodies reveals distinct immune stimulatory mechanisms", mAbs, 12, 1764829 (2020)). Кривоконсервированные РВМС использовали от десяти здоровых доноров, а CD8⁺ Т-клетки удаляли из РВМС и метили 1 мкМ карбоксифлуоресцеиндиацетат-сукцинимидилового эфира (CFSE). РВМС высевали в количестве 4×10⁶ клеток/мл/лунку в среде AIM-V (Life Technologies, № по каталогу 12055-083), содержащей 5% CTS[™] Immune Cell SR (Gibco, № по каталогу A2596101), и тестировали в трех повторах в 2,0 мл, содержащих различные испытываемые образцы, контрольную среду, гемоцианин лимфы улитки (KLH; положительный контроль), ликсисенатид (положительный контроль анализа) или соединение II. Культуры инкубировали в течение 7 дней при 37°C с 5% CO₂. На 7-й день образцы окрашивали следующими маркерами клеточной поверхности: анти-CD3, анти-CD4, анти-CD14, анти-CD19 и DAPI для определения жизнеспособности с помощью проточной цитометрии с использованием BD LSRFortessa[™], оснащенного пробоотборником высокой пропускной способности (HTS). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo® (FlowJo, LLC, TreeStar) и рассчитывали индекс клеточного деления (CDI). Вкратце, CDI для каждого пептидного кластера, полученного из MAPPs-кандидата, рассчитывали путем деления процента пролиферирующих CFSE^{dim} CD4⁺ Т-клеток из лунок, стимулированных пептидом, на процент пролиферирующих CFSE^{dim} CD4⁺ Т-клеток в нестимулированных лунках. CDI≥2,5 считался положительным ответом. Оценивали процентную частоту доноров среди всех доноров. Все доноры давали положительный Т-клеточный ответ против KLH (100%). Клинический иммуногенный положительный контроль ликсисенатид индуцировал положительный Т-клеточный ответ у 50% когорты в этом исследовании. Это соответствует ожидаемому диапазону для этого анализа (частота положительных доноров 40-90%). Результаты для соединения II показаны в табл. 10 и свидетельствуют о низком уровне риска иммуногенности, связанного с соединением II.

Таблица 10. Частота ответов CD4⁺ Т-клеток

Протестированная молекула	% положительных доноров	Медиана CDI (положительные доноры)	Медиана CDI (все доноры)	Диапазон		Количество доноров
				Высокая	Низкая	
KLH	100,0	36,2	36,2	171,4	4,5	8/8
Ликсисенатид	50	3,0	2,5	5,7	1,2	4/8
Соединение II	12,5	19,7	1,0	19,7	0,7	1/8

Последовательности

Соединение I (SEQ ID NO: 1)

Ацетил-ASHLSTAVLGKLS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂

Соединение II (SEQ ID NO: 2)

Ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-

CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂

Прамлинтид (SEQ ID NO: 3)

KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGPILPPTNVGSNTY-NH₂

с дисульфидной связью между Cys 2 и Cys 7 Кальцитонин человека (SEQ ID NO: 4)

CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH₂

с дисульфидной связью между Cys 1 и Cys 7

Амилин человека (SEQ ID NO: 5)

KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY-NH₂

с дисульфидной связью между Cys 2 и Cys 7

Соединение III (SEQ ID NO: 6)

H-Aib-EGTFTSDVSSYLEGQAAK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-

(CH₂)₁₆-CO₂H)EFIAWLVVRGRG

Соединение IV (SEQ ID NO: 7)

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDEKKAK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)EFVWLLGGPSSG-NH₂

Соединение V (SEQ ID NO: 8)

Y-Aib-QGTFTSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLGGPSSGAPPPS-NH₂

Соединение VI (SEQ ID NO: 9)

Y-Aib-EGTFTSDYSI-Aib-LDKIAQK((2-[2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)A-(1Nal)-VQWLIAGGPSSGAPPPS-NH₂

Соединение VII (SEQ ID NO: 10)

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгирования ипсилон-аминогруппы боковой цепи К с (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H и С-концевая аминокислота амидирована в форме С-концевого первичного амида.

Регистрационный номер CAS: 2023788-19-2

Ликсисенатид (SEQ ID NO: 11)

HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-NH₂

Регистрационный номер CAS: 320367-13-3

Соединение VIII (SEQ ID NO: 12)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK(γGlu-CO-(CH₂)₁₄-CH₃)EFIAWLVRGRG

Регистрационный номер CAS: 204656-20-2

Соединение IX (SEQ ID NO: 13)

Дулаглутид представляет собой агонист человеческого рецептора GLP-1, содержащий димер аналога GLP-1, слитый на его С-конце посредством пептидного линкера с N-концом аналога Fc части иммуноглобулина, при этом дулаглутид идентифицируют с помощью регистрационного номера CAS 923950-08-7, который соответствует следующему химическому наименованию: 7-37-глюкагоноподобный пептид I [8-глицин, 22-глутаминовая кислота, 36-глицин] (синтетический человеческий) слитый белок с пептидом (синтетическим 16-аминокислотным линкером), слитый белок с иммуноглобулином G4 (синтетическим человеческим фрагментом Fc), димер. Каждый мономер дулаглутида имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13:

HGEGTFTSDVSSYLEEQAQAEFIKAWLVKGGGGGGSGGGGGGGSAESKYGPPCPPC
 PAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREP
 QVYVLTPLPSQEQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2), или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, где указанное соединение состоит из ацетил-ASHLSTAVLGK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LS-Aib-ELHKLEDYPRTDVGAESP-NH₂ (SEQ ID NO: 2), или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

4. Применение соединения по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения диабета типа 2.

5. Применение соединения по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения ожирения.

6. Применение соединения по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения дислипидемии.

7. Применение соединения по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения НАСГ.

8. Применение фармацевтической композиции по п.3 для лечения диабета типа 2.

9. Применение фармацевтической композиции по п.3 для лечения ожирения.

10. Применение фармацевтической композиции по п.3 для лечения дислипидемии.

11. Применение фармацевтической композиции по п.3 для лечения НАСГ.

12. Применение соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения диа-

бета типа 2.

13. Применение соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения ожирения.

14. Применение соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения дислипидемии.

15. Применение соединения по п.1 или 2 для получения лекарственного средства для лечения НАСГ.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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