

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047788**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.10**

(51) Int. Cl. **C07K 14/605 (2006.01)**  
**A61K 38/26 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**202291521**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.12.11**

**(54) АНАЛОГИ ИНКРЕТИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/949,661**

(32) **2019.12.18**

(33) **US**

(43) **2022.09.13**

(86) **PCT/US2020/064512**

(87) **WO 2021/126695 2021.06.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Абрахам Милата Мэри, Алсина-  
Фернандез Джордж, Коскун Тамер,  
Цюй Хунчан, Уоллис Джеймс  
Линкольн (US)**

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

(56) **CA-A1-3084004**

**CA-A1-3084005**

**WO-A1-2016111971**

**BASTIN MARIE ET AL.:** "Dual GIP-GLP1-  
Receptor Agonists In The Treatment Of Type 2  
Diabetes: A Short Review On Emerging Data And  
Therapeutic Potential", **DIABETES, METABOLIC  
SYNDROME AND OBESITY: TARGETS AND  
THERAPY**, vol. Volume 12, 30 September 2019  
(2019-09-30), pages 1973-1985, XP055797753,  
DOI: 10.2147/DMSO.S191438 Retrieved from  
the Internet: URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/  
articles/PMC6777434/pdf/dms0-12-1973.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6777434/pdf/dms0-12-1973.pdf)> see the  
whole document and in particular, Figure 2

**US-A1-2016310575**

**PIOTR A. MROZ ET AL.:** "Optimized  
GIP analogs promote body weight lowering in  
mice through GIPR agonism not antagonism",  
**MOLECULAR METABOLISM**, vol. 20, 5  
December 2018 (2018-12-05), pages 51-62,  
XP055725248, ISSN: 2212-8778, DOI: 10.1016/  
j.molmet.2018.12.001, the whole document

(57) Предложены аналоги инкретина, обладающие активностью в отношении каждого из рецепторов глюкозозависимого инсулиноподобного полипептида (GIP), глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и глюкагона (GCG). Указанные аналоги инкретина имеют структурные признаки, обеспечивающие сбалансированную активность и увеличенную продолжительность действия в отношении каждого из перечисленных рецепторов. Также предложены способы лечения таких заболеваний как сахарный диабет 2 типа, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени, метаболический синдром, неалкогольный стеатогепатит и ожирение.

**B1****047788****047788****B1**

Настоящее изобретение относится к аналогам инкретина, обладающим активностью в отношении каждого из рецепторов глюкозозависимого инсулиноотропного полипептида (GIP), глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и глюкагона. Описанные в настоящем документе аналоги инкретина имеют структурные признаки, которые обеспечивают сбалансированную активность в отношении каждого из перечисленных рецепторов и обладают увеличенной продолжительностью действия. Такие аналоги инкретина могут быть полезны для лечения состояний, заболеваний и нарушений, в том числе сахарного диабета 2 типа (СД2), дислипидемии, метаболического синдрома, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и/или ожирения, а также сердечно-сосудистых заболеваний, которые не считаются метаболическими заболеваниями, и нейродегенеративных заболеваний. На протяжении нескольких последних десятилетий уровень распространения диабета продолжает расти. СД2 является наиболее распространенной формой диабета, составляющей около 90% всех форм диабета. СД2 характеризуется высокими уровнями глюкозы в крови, вызванными резистентностью к инсулину. Существующий стандарт лечения СД2 включает диету и физические упражнения, а также лечение пероральными лекарственными средствами и инъекционными препаратами, снижающими уровень глюкозы, в том числе препаратами на основе инкретина, такими как агонисты рецептора GLP-1.

GLP-1 представляет собой пептид, состоящий из 36 аминокислот, основной биологически активный фрагмент которого продуцируется в виде амидированного по С-концу пептида, состоящего из 30 аминокислот (GLP-1<sub>7-36</sub>; SEQ ID NO: 2), который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и предотвращает гипергликемию у диабетиков. В настоящее время доступны различные аналоги GLP-1 для лечения СД2, в том числе дулаглутид, экзенатид и лираглутид. Однако многие представленные в настоящее время на рынке аналоги GLP-1 имеют ограничение по дозе вследствие побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, таких как тошнота и рвота. Если лечение с помощью пероральных лекарственных средств и терапевтическими средствами на основе инкретина является недостаточным, рассматривается лечение инсулином. Несмотря на доступные варианты лечения, значительное число субъектов, получающих одобренные терапевтические средства, не достигают целей гликемического контроля (см., например, Casagrande et al. (2013) *Diabetes Care* 36: 2271-2279).

Неконтролируемый диабет может привести к одному или более состояний, которые влияют на заболеваемость и смертность таких субъектов. Одним из основных факторов риска в случае СД2 является ожирение, и большинство субъектов с СД2 (~90%) имеют избыточный вес или ожирение. Задokumentировано, что снижение степени содержания жира в организме приводит к уменьшению патологических проявлений, связанных с ожирением, включая гипергликемию и сердечно-сосудистые события. Таким образом, для лучшего управления течением заболевания необходимы терапевтические средства, эффективные с точки зрения контроля уровня глюкозы и снижения веса. В связи с этим новые изучаемые терапевтические средства включают соединения, обладающие не только активностью в отношении рецептора GLP-1, но также активностью в отношении одного или более других рецепторов, таких как рецепторы GIP и/или рецепторы GCG. Фактически, некоторые соединения уже были описаны как обладающие агонистической активностью в отношении трех рецепторов (то есть активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG). Например, в публикации Международной заявки на патент № WO 2015/067716 описаны аналоги GCG, обладающие агонистической активностью в отношении трех рецепторов. Аналогичным образом, в публикации Международной заявки на патент № WO 2016/198624 описаны аналоги эксендина-4, обладающие агонистической активностью в отношении трех рецепторов. Аналогично, в публикации Международных заявок на патент №№ WO 2014/049610 и WO 2017/116204 описаны различные соединения, обладающие агонистической активностью в отношении трех рецепторов. Более того, в публикации Международной заявки на патент № WO 2017/153575 описаны коагонисты GCG и GLP-1, которые, как установлено, также обладают агонистической активностью в отношении рецептора GIP.

Хотя их обычно используют для лечения СД2, инкретина и их аналоги, обладающие активностью в отношении одного или более из рецепторов GIP, GLP-1 и/или GCG, также были описаны как обладающие потенциальным терапевтическим значением при ряде других состояний, заболеваний или нарушений, в том числе, например, болезни Альцгеймера, нарушениях, связанных с костями, дислипидемии, метаболическом синдроме, НАЖБП и НАСГ, ожирении и болезни Паркинсона. См., например, Jall et al. (2017) *Mol. Metab.* 6:440-446; Carbone et al. (2016) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31:23-31; Finan et al. (2016) *Trends Mol. Med.* 22:359-376; Choi et al. (2017) Potent body weight loss and efficacy in a NASH animal model by a novel long-acting GLP-1/Glucagon/GIP triple-agonist (HM15211), ADA Poster 1139-P; Ding (2008) *J. Bone Miner. Res.* 23:536-543; Tai et al. (2018) *Brain Res.* 1678:64-74; Müller et al. (2017) *Physiol. Rev.* 97:721-766; Finan et al. (2013) *Sci. Transl. Med.* 5:209; Hölscher (2014) *Biochem. Soc. Trans.* 42:593-600.

Тем не менее, остается потребность в способах лечения таких состояний, заболеваний и нарушений, в частности, СД2, которые способны обеспечить эффективный контроль уровня глюкозы вместе с преимуществами, связанными с потерей массы тела, и/или благоприятным профилем побочных эффектов. Также существует потребность в доступных для применения терапевтических средствах с достаточной увеличенной продолжительностью действия, что позволяет вводить дозу не так часто, например, один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Описанные в настоящем доку-

менте аналоги инкретина направлены на удовлетворения перечисленных выше потребностей. Соответственно, в настоящем документе описаны аналоги инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG. Описанные в настоящем документе аналоги инкретина преимущественно обладают сбалансированной активностью в отношении указанных рецепторов, что, тем самым, позволяет вводить дозы, обеспечивающие достаточную активность в отношении каждого рецептора, что обеспечивает преимущества агонизма данного рецептора при одновременном избегании нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком высокой активностью. Кроме того, описанные в настоящем документе аналоги инкретина характеризуются увеличенной продолжительностью действия на каждый из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, что позволяет вводить дозу не так часто, например, один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Таким образом, аналоги инкретина приводят к улучшенному контролю уровня глюкозы, благоприятному влиянию на метаболизм, такому как снижение массы тела и/или улучшение состава тканей организма, благоприятному влиянию на липидный обмен, например, снижению уровня пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), и/или другим преимуществам, таким как увеличение костной массы или костеобразование или уменьшение резорбции кости. В настоящей заявке также описаны эффективные средства лечения состояний, заболеваний и нарушений, в том числе СД2, дислипидемии, метаболического синдрома, НАЖБП, НАСГ и/или ожирения.

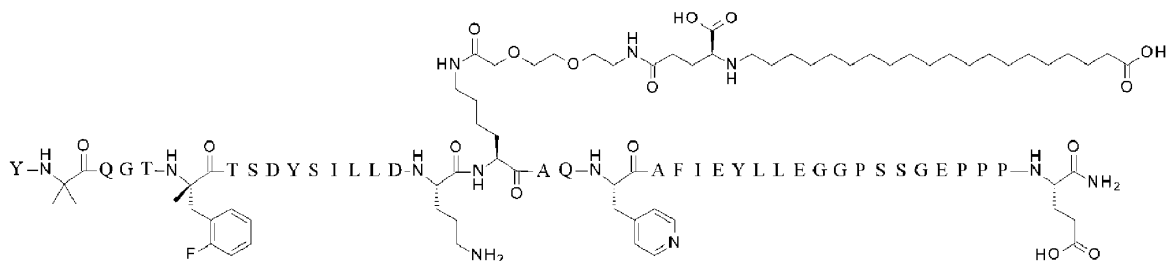
Описание сущности изобретения

В настоящей заявке описаны аналоги инкретина, содержащие последовательность основных аминокислот

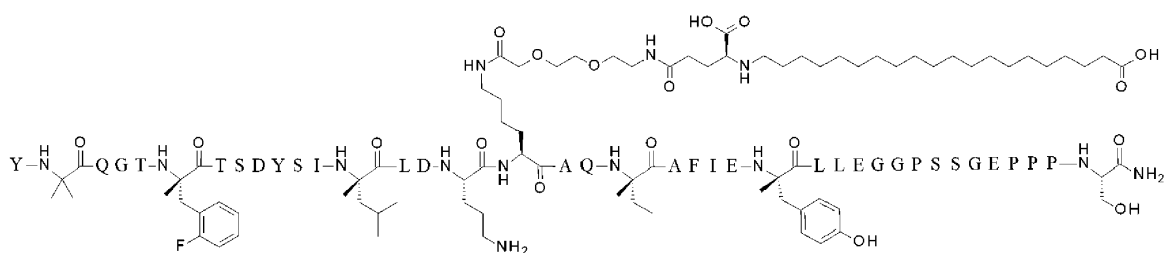


где  $X_2$  представляет собой Aib,  $X_6$  представляет собой  $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$ ,  $X_{10}$  представляет собой Y или 4Pal,  $X_{13}$  представляет собой L или  $\alpha\text{MeL}$ ,  $X_{16}$  представляет собой Orn,  $X_{17}$  представляет собой K, химически модифицированный путем конъюгации с эпсилон-аминогруппой боковой цепи K, со структурой: (2-[2-(2-аминоэтокси)-этокси]-ацетил)- $(\gamma\text{E})\text{b}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_c-\text{CO}_2\text{H}$ , где a представляет собой 0, 1 или 2; b представляет собой 1 или 2; и c представляет собой целое число от 16 до 20,  $X_{20}$  представляет собой 4Pal, Iva или  $\alpha\text{MeL}$ ,  $X_{21}$  представляет собой A или Aib,  $X_{24}$  представляет собой E или e,  $X_{25}$  представляет собой Y или  $\alpha\text{MeY}$ , и  $X_{39}$  представляет собой E или S (SEQ ID NO: 5), и при этом карбокси-концевая (C-концевая) аминокислота необязательно является амидированной, или их фармацевтически приемлемая соль.

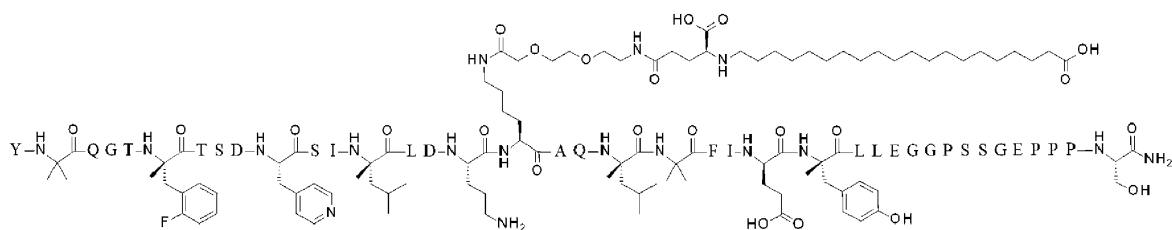
В конкретных случаях аналог инкретина, описанный в настоящем документе, содержащий линкер и фрагмент жирной кислоты, может представлять собой одно из следующих веществ:



(SEQ ID NO: 9),



(SEQ ID NO: 10), или



(SEQ ID NO: 11).

Во-вторых, описаны фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере один аналог ин-

кретина, описанный в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль (например, трифторацетатные соли, ацетатные соли или гидрохлоридные соли) и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях фармацевтические композиции могут дополнительно включать носители, разбавители и/или вспомогательные вещества.

В третьих, описаны способы лечения заболевания, такого как СД<sub>2</sub>, дислипидемия, метаболический синдром, НАЖБП, НАСГ и ожирение. Указанные способы могут включать по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе. В некоторых случаях заболевание представляет собой СД<sub>2</sub>, НАЖБП, НАСГ или ожирение.

В-четвертых, описаны аналоги инкретина для применения в терапии, например, для применения при лечении заболевания, такого как СД<sub>2</sub>, дислипидемия, метаболический синдром, НАЖБП, НАСГ и ожирение. В некоторых случаях заболевание представляет собой СД<sub>2</sub>, НАЖБП, НАСГ или ожирение.

В-пятых, описано применение аналогов инкретина, предложенных в настоящем документе, при получении лекарственного средства для лечения СД<sub>2</sub>, дислипидемии, метаболического синдрома, НАЖБП, НАСГ и ожирения. В некоторых случаях заболевание представляет собой СД<sub>2</sub>, НАЖБП, НАСГ или ожирение.

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 аналогов инкретина, фармацевтических композиций и способов, предпочтительные способы и материалы описаны в настоящем документе.

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

#### Определения

В контексте настоящего документа "около" означает в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, заявленная концентрация, длина, молекулярная масса, рН, идентичность последовательностей, временные рамки, температура или объем. Такое значение или диапазон может лежать в пределах одного порядка величины, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, включенное в термин "около", будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

В контексте настоящего документа и в отношении одного или более из рецепторов GIP, GLP-1 или GCG "активность", "активировать", "активирующий" и тому подобное означают способность соединения, такого как описанные в настоящем документе аналоги инкретина, связываться с рецептором(ами) и индуцировать ответ на рецептор(ы), измеряемый с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

В контексте настоящего документа "аминокислота" означает молекулу, которая с химической точки зрения характеризуется содержанием одной или более аминогрупп и одной или более карбоксильно-кислотных групп и может содержать другие функциональные группы. Как известно в данной области техники, существует набор из двадцати аминокислот, которые называют стандартными аминокислотами и которые используют в качестве строительных блоков для большинства пептидов/полипептидов/белков, продуцируемых любым живым существом.

В контексте настоящего документа "аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации" означает любую стандартную или нестандартную аминокислоту с функциональной группой, которая может быть конъюгирована с фрагментом жирной кислоты посредством, например, линкера. Примеры таких функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, алкильную, алкенильную, амино-, азидо-, бром-, карбоксильную, хлор-, йод- и тиольную группы. Кроме того, примеры природных аминокислот, содержащих такие функциональные группы, включают С (тиол), D (карбоксил), E (карбоксил), К (амино) и Q (амид).

В контексте настоящего документа "аналог" означает соединение, такое как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает по меньшей мере один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый агонистом нативного рецептора.

В контексте настоящего документа "сердечно-сосудистое заболевание, которое не считается метаболическим заболеванием" и тому подобное означает заболевание, такое как, например, атеросклероз или сердечная недостаточность.

В контексте настоящего документа "жирная кислота C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>" означает карбоновую кислоту, содержащую от 16 до 22 атомов углерода. Жирная кислота C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, подходящая для применения в настоящем изобретении, может представлять собой насыщенную одноосновную или насыщенную двухосновную кислоту ("двухосновные кислоты" содержат карбоксильную группу на каждом конце).

В контексте настоящего документа "эффективное количество" означает количество, концентрацию или дозу одного или более из описанных в настоящем документе аналогов инкретина или их фармацевтически приемлемой соли, которое, при введении однократной или многократной дозы субъекту, нуж-

дающемуся в этом, обеспечивает требуемый эффект у такого субъекта, подвергаемого диагностике или лечению (т.е. может вызывать клинически измеримые различия в состоянии субъекта, такие как, например, снижение уровня глюкозы в крови, снижение уровня HbA1c в крови, снижение массы тела или жировых отложений и/или изменение состава тканей организма). Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники путем применения известных способов и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для данного субъекта учитывается ряд факторов, в том числе, но не ограничиваясь ими, вид млекопитающего, его размер, возраст и общее состояние здоровья, конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение, степень или поражение или тяжесть заболевания или нарушения, реакция субъекта, конкретный введенный аналог инкретина, способ введения, характеристики биодоступности вводимого препарата, выбранную схему введения дозы, применение сопутствующих лекарственных препаратов и другие соответствующие обстоятельства.

В контексте настоящего документа "увеличенная продолжительность действия" означает, что аффинность связывания и активность аналога инкретина сохраняется в течение периода времени, превышающего период времени для нативного человеческого GIP, GLP-1 и GCG, что позволяет вводить дозу по меньшей мере не так часто, например, один раз в день или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Временной профиль действия аналога инкретина можно измерить с помощью известных способов фармакокинетического анализа, таких как способы, применяемые в приведенных ниже примерах.

В контексте настоящего документа "глюкозозависимый инсулинотропный полипептид" или "GIP" означает пептид из 42 аминокислот (SEQ ID NO: 1), представляющий собой инкретин, который играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы за счет стимулирования секреции инсулина из бета-клеток поджелудочной железы в присутствии глюкозы.

В контексте настоящего документа "глюкагоноподобный пептид-1" или "GLP-1" означает пептид из 36 аминокислот (SEQ ID NO: 2), также представляющий собой инкретин, который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и который, как было показано, предотвращает гипергликемию у диабетиков.

В контексте настоящего документа "глюкагон" или "GCG" означает пептид из 29 аминокислот (SEQ ID NO: 3), который помогает поддерживать уровень глюкозы в крови путем связывания и активации рецепторов GCG в гепатоцитах, что заставляет печень высвобождать глюкозу - хранящуюся в форме гликогена - посредством процесса, называемого гликогенолизом.

В контексте настоящего документа "оксинтомодулин" или "ОХМ" означает пептид из 37 аминокислот (SEQ ID NO: 4), который содержит не только последовательность GCG из 29 аминокислот, но также карбокси-концевой удлиняющий сегмент октапептида, который активирует рецепторы как GCG, так и GLP-1, с несколько более высокой эффективностью в случае рецептора GCG по сравнению с рецептором GLP-1. В контексте настоящего документа "полуМаксимальная эффективная концентрация" или "EC<sub>50</sub>" означает концентрацию соединения, которая приводит к 50% активации/стимуляции конечной точки анализа, такой как кривая зависимости дозы-ответ (например, сAMP).

В контексте настоящего документа "аналог инкретина" означает соединение, имеющее структурные сходства, но и некоторые отличия, с каждым из GIP, GLP-1 и GCG, в частности, с человеческим GIP (SEQ ID NO: 1), человеческим GLP-1 (SEQ ID NO: 2) и человеческим GCG (SEQ ID NO: 3). Описанные в настоящем документе аналоги инкретина содержат аминокислотные последовательности, приводящие к соединениям, обладающим аффинностью и активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG (то есть обладающие агонистической активностью в отношении трех рецепторов). В контексте настоящего документа "субъект, нуждающийся в этом" означает млекопитающее, например, человека, имеющего состояние, заболевание, нарушение или симптом, требующий лечения или терапии, в том числе, например, перечисленные в настоящем документе. В частности, предпочтительным субъектом, подвергаемым лечению, является человек.

В контексте настоящего документа термин "длительного действия" означает, что аффинность связывания и активность аналога инкретина, описанного в настоящем документе, сохраняются в течение периода времени, превышающего период времени для эталонного пептида, такого как нативный человеческий GIP (SEQ ID NO: 1), человеческий GLP-1 (SEQ ID NO: 2) и/или человеческий GCG (SEQ ID NO: 3), что позволяет вводить дозу по меньшей мере не так часто, например, один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю или даже ежемесячно. Временной профиль действия описанных в настоящем документе аналогов инкретина можно измерить с помощью известных фармакокинетических способов, таких как способы, описанные в приведенных ниже примерах.

В контексте настоящего документа "нестандартная аминокислота" означает аминокислоту, которая может естественным образом встречаться в клетках, но не участвует в синтезе пептидов. Нестандартные аминокислоты могут входить в состав пептида и могут продуцироваться путем модификации стандартных аминокислот в пептиде (т.е. посредством посттрансляционной модификации). Нестандартные аминокислоты могут включать D-аминокислоты, которые имеют противоположную абсолютную хиральность относительно описанных выше стандартных L-аминокислот.

В контексте настоящего документа "насыщенный" означает фрагмент жирной кислоты, который не

содержит углерод-углеродных двойных или тройных связей. В контексте настоящего документа "лечение", "лечащий", "лечить" и тому подобное означает сдерживание, замедление, остановку или изменение вспять прогрессирования или тяжести существующего состояния, заболевания, нарушения или симптома.

В контексте настоящего документа и применительно к аналогу инкретина "агонистическая активность в отношении трех рецепторов" означает аналог инкретина, обладающий активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, в частности, аналог, обладающий сбалансированной и достаточной активностью в отношении каждого рецептора, что обеспечивает преимущества агонизма такого рецептора при одновременном избегании нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком высокой активностью данного рецептора. Кроме того, аналоги инкретина, обладающие агонистической активностью в отношении трех рецепторов, характеризуются увеличенной продолжительностью действия на каждый из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, что позволяет предпочтительно вводить дозу не так часто, например, один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

Некоторые сокращения имеют следующие определения: "4Pal" относится к 3-(4-пиридил)-L-аланину; "ACR" относится к отношению альбумин/креатинин в моче; "Aib" относится к  $\alpha$ -аминоизомасляной кислоте; " $\alpha$ MeL" относится к  $\alpha$ -метиллейцину; " $\alpha$ MeK" относится к  $\alpha$ -метиллизину; " $\alpha$ MeF" относится к  $\alpha$ -метилфенилаланину; " $\alpha$ MeF(2F)" относится к  $\alpha$ -метил-2-фторфенилаланину; " $\alpha$ MeY" относится к  $\alpha$ -метилтирозину; "amu" относится к атомной единице массы; "AUC" относится к площади под кривой; "Woc" относится к трет-бутоксикарбонилу; "сАМР" относится к циклическому аденозинмонофосфату; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "EIA/RIA" относится к иммуноферментному анализу/радиоиммунному анализу; "Fmoc" относится к флуоренилметилоксикарбонилу; "час" относится к часу или часам; "HTRF" относится к гомогенной флуоресценции с временным разрешением; "в/в" относится к внутривенному введению; "Iva" относится к изовалину; "кДа" относится к килодальтонам; "ЖХ-МС" относится к жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии; "мин" относится к минуте или минутам; "МС" относится к масс-спектрометрии; "Ogn" или "O" относится к орнитину; "OtBu" относится к O-трет-бутилу; "Pbf" относится к NG-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонилю; "ОФ-ВЭЖХ" относится к обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии; "сек" относится к секунде или секундам; "SEM" относится к стандартной ошибке среднего; "SPA" относится к сцинтилляционному анализу сближения; "п/к" относится к подкожному введению; "ТФУ" относится к трифторуксусной кислоте; "tBu" относится к трет-бутилу; и "Trt" относится к тритилу.

#### Подробное описание изобретения

Аналоги инкретина.

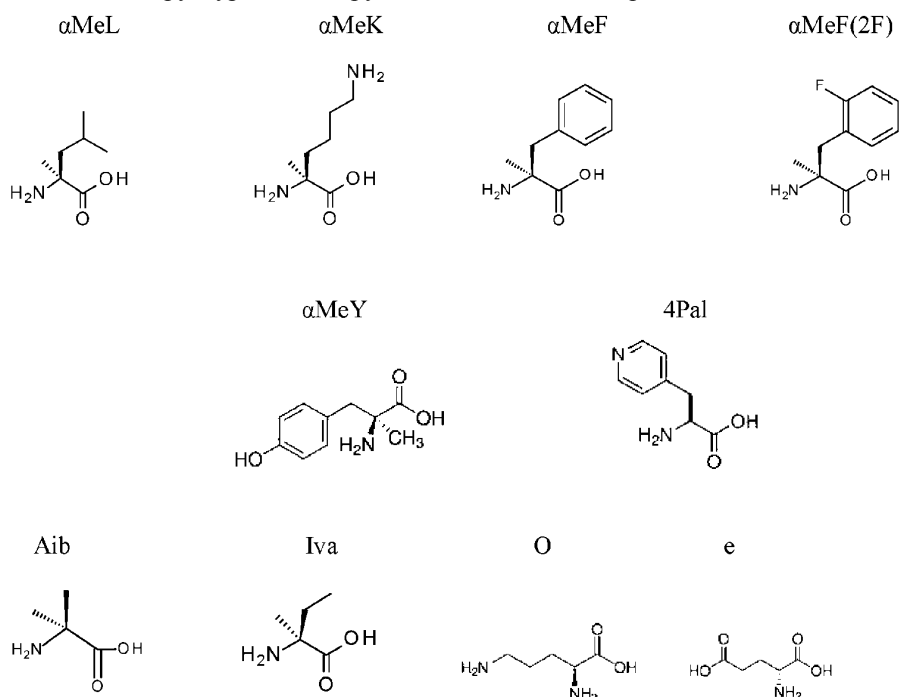
Структурные особенности аналогов инкретина, описанных в настоящем документе, позволяют получать соединения, обладающие достаточной активностью в отношении каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, при обеспечении благоприятных эффектов активности в отношении каждого рецептора (т.е., агонистической активностью в отношении трех рецепторов), но не настолько большой активностью в отношении любого одного рецептора, чтобы либо подавить активность в отношении любого из двух других рецепторов, либо вызвать нежелательные побочные эффекты при введении в дозе, достаточной для появления активности в отношении всех трех рецепторов. Неограничивающие примеры таких структурных особенностей в некоторых вариантах реализации и со ссылкой на SEQ ID NO: 5 включают  $\alpha$ MeF(2F) в положении 6, что способствует оптимальной активности GCG, GIP и GLP-1; Y или 4Pal в положении 10, что способствует сбалансированной активности; L или  $\alpha$ MeL в положении 13, что способствует оптимальной активности GCG и GIP; O в положении 16, что способствует сбалансированной активности; ацилирование в положении 17, что способствует сбалансированной активности; 4Pal, Iva или  $\alpha$ MeL в положении 20, что способствует оптимальной активности GCG; A или Aib в положении 21, что способствует оптимальной активности GCG; Y или  $\alpha$ MeY в положении 25, что способствует сбалансированной активности. Другие примеры таких структурных особенностей включают описанные в настоящем документе аминокислоты в положениях 28-39, которые способствуют оптимальному связыванию и активности в отношении всех трех рецепторов.

Структурные особенности описанных в настоящем документе аналогов инкретина также позволяют получать аналоги, обладающие многими другими полезными свойствами, относящимися к их способности к разработке в качестве терапевтических средств, включая улучшение растворимости аналогов в водных растворах, улучшение химической и физической стабильности препарата, расширение фармакокинетического профиля и минимизацию иммуногенного потенциала. Неограничивающие примеры конкретных структурных особенностей, которые приводят к таким свойствам, включают ацилирование в положении 17 посредством жирной кислоты C<sub>20</sub>, что способствует оптимальным фармакокинетическим (ФК) профилям и возможности разработки; 4Pal в положении 10 или 20, что способствует оптимальной растворимости и химической стабильности; O в положении 16, что способствует оптимальной растворимости и фармакокинетике; E или e в положении 24, что способствует оптимальной растворимости и стабильности; Y или  $\alpha$ MeY в положении 25, что способствует оптимальной химической стабильности; и E или S в положении 39, что способствует оптимальной растворимости; и описанные в настоящем документе аминокислоты в положениях 6, 13, 16 и 28-39, которые способствуют оптимальной фармакокине-

тике, иммуногенности, способности к разработке и стабильности.

Следует отметить, что приведенные выше перечни структурных особенностей являются иллюстративными, а не исчерпывающими, и что комбинация полезных характеристик иллюстративных аналогов, описанных в настоящем документе, не является результатом какой-либо модификации при выделении, а наоборот достигается за счет новых комбинаций структурных особенностей, описанных в настоящем документе. Кроме того, описанные выше эффекты приведенных выше перечней модификаций не являются исчерпывающими, так как многие из указанных модификаций также имеют другие эффекты, важные для характеристик предложенных в настоящем документе соединений, как описано ниже.

Аминокислотные последовательности описанных в настоящем документе аналогов инкретина включают природные (стандартные) аминокислоты, обычно обозначаемые в настоящем документе с помощью однобуквенных кодов (например, L = лейцин; K = лизин), а также нестандартные и/или α-метилзамещенные остатки стандартных аминокислот (например, αMeL, αMeK, αMeF, αMeF(2F) и αMeY и некоторые другие нестандартные аминокислоты, такие как 4Pal, Aib, Iva, O и D-глутаминовая кислота (e)). Для ясности структуры таких других аминокислот изображены ниже:



Как отмечено выше, описанные в настоящем документе аналоги инкретина имеют структурные сходства с любым из нативных человеческих пептидов, но имеют и много структурных отличий от них. Например, при сравнении с нативным человеческим GIP (SEQ ID NO: 1) аналоги инкретина включают модификации в одном или более из положений 2-3, 6-7, 13-14, 16-18, 20-21, 23-25 и 28-42. В некоторых случаях аналоги инкретина включают модификации в аминокислотах нативного человеческого GIP (SEQ ID NO: 1) в каждом из положений 2-3, 6-7, 13-14, 16-18, 20-21, 23-25 и 28-42. В определенных случаях аналоги инкретина включают следующие модификации аминокислот: Aib в положении 2; Q в положении 3; αMeF(2F) в положении 6; T в положении 7; Y или 4Pal в позиции 10; L или αMeL в положении 13; L в положении 14; модифицированный остаток K в положении 17, который модифицирован путем конъюгации с ε-аминогруппой боковой цепи K посредством жирной кислоты C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, необязательно путем применения линкера; A в положении 18; 4Pal, Iva или αMeL в положении 20; A или Aib в положении 21; I в положении 23; E или e в положении 24; Y или αMeY в положении 25; E в позиции 28; G в положении 29; и замену аминокислот в положениях 30-42 на следующую аминокислотную последовательность: GPSSGAPPPE (SEQ ID NO: 12) или GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 13) (и на укороченные аналоги любого из указанных хвостов). В других случаях аналоги инкретина являются амидированными. В дополнение к описанным в настоящем документе модификациям аналоги инкретина могут включать одну или более дополнительных модификаций аминокислот, таких как добавление, делеция, вставка и/или замена, но сохраняют способность связываться с каждым из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG и активировать их.

Как отмечено выше, описанные в настоящем документе аналоги инкретина содержат фрагмент жирной кислоты, конъюгированный, например, посредством линкера со стандартной или нестандартной аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации. Такую конъюгацию иногда называют ацилированием. В определенных случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, может представлять собой K, C, E и D. В конкретных случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, представляет собой K, при этом конъюгация относится

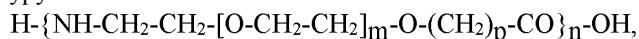
к ε-аминогруппе боковой цепи К.

Ацилирование описанных в настоящем документе аналогов инкретина происходит в положении 17 в SEQ ID NO: 5, которое, как было определено, является оптимальным местом для включения такой структуры. Фрагмент жирной кислоты, а в определенных случаях и линкер, действует как связующее вещество для альбумина и обеспечивает возможность получения соединений длительного действия.

В описанных в настоящем документе аналогах инкретина использовали фрагмент жирной кислоты C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, химически конъюгированный с функциональной группой аминокислоты либо посредством прямой связи, либо с помощью линкера. Длина и состав фрагмента жирной кислоты влияют на период полувыведения аналогов инкретина, активность аналогов инкретина в животных моделях *in vivo*, а также на растворимость и стабильность аналогов инкретина. Конъюгация с насыщенной жирной одноосновной кислотой или двухосновной кислотой C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> приводит к получению аналогов инкретина, которые демонстрируют требуемый период полувыведения, требуемую активность в животных моделях *in vivo* и требуемые характеристики растворимости и стабильности. Примеры насыщенных жирных кислот C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> для применения в настоящем изобретении включают, но не ограничиваются ими, пальмитиновую кислоту (гексадекановую кислоту) (одноосновную кислоту (C<sub>16</sub>), гексадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту (C<sub>16</sub>), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту) (одноосновную кислоту C<sub>17</sub>), гептадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту C<sub>17</sub>), стеариновую кислоту (одноосновную кислоту C<sub>18</sub>), октадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту C<sub>18</sub>), нонадециловую кислоту (нонадекановую кислоту) (одноосновную кислоту C<sub>19</sub>), нонадекандиовую кислоту (двухосновную кислоту C<sub>19</sub>), арахидоновую кислоту (эйкозановую кислоту) (одноосновную кислоту C<sub>20</sub>), эйкозандиовую кислоту (двухосновную кислоту C<sub>20</sub>), генэйкозиловую кислоту (генэйкозановую кислоту) (одноосновную кислоту C<sub>21</sub>), генэйкозандиовую кислоту (двухосновную кислоту C<sub>21</sub>), бегеновую кислоту (докозановую кислоту) (одноосновную кислоту C<sub>22</sub>), докозандиовую кислоту (двухосновную кислоту C<sub>22</sub>), в том числе их разветвленные и замещенные производные.

В определенных случаях жирная кислота C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> может представлять собой насыщенную одноосновную кислоту C<sub>20</sub>, насыщенную двухосновную кислоту C<sub>20</sub> и их разветвленные и замещенные производные. В более конкретных случаях жирная кислота C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> может представлять собой эйкозандиовую кислоту.

В некоторых случаях линкер может содержать от одной до четырех аминокислот, карбоксилат аминокислоты или их смеси. В определенных случаях карбоксилат аминокислоты имеет следующую структуру:

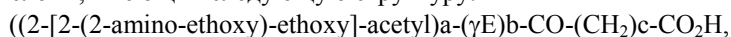


где m представляет собой любое целое число от 1 до 12, n представляет собой любое целое число от 1 до 12, а p равен 1 или 2.

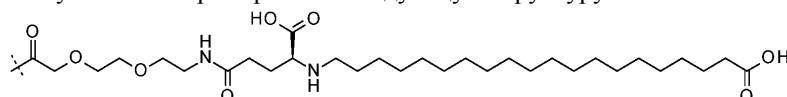
В определенных случаях линкер может содержать один или более фрагментов АЕЕА, необязательно в комбинации с от одной до четырех аминокислот.

В тех случаях, когда линкер содержит по меньшей мере одну аминокислоту, указанная аминокислота может представлять собой от одного до четырех аминокислотных остатков Е или γЕ. В некоторых случаях линкер может содержать один или два аминокислотных остатка Е или γЕ, в том числе их D-формы. Например, линкер может содержать один или два аминокислотных остатка γЕ. Альтернативно, линкер может содержать от одного до четырех аминокислотных остатков (таких как, например, аминокислоты Е или γЕ), применяемые в комбинации с не более чем тридцатью шестью фрагментами АЕЕА. Конкретно, линкер может представлять собой комбинации от одной до четырех аминокислот Е или γЕ- и от одного до четырех фрагментов АЕЕА. В других случаях линкер может представлять собой комбинации одной или двух аминокислот γЕ и одного или двух фрагментов АЕЕА.

В конкретном случае описанные в настоящем документе аналоги инкретина содержат линкер-фрагмент жирной кислоты, имеющий следующую структуру:



где a равен 0, 1 или 2, b равен 1 или 2, и c равен 16 или 18. В конкретном случае a равен 1, b равен 1 и c равен 20, при этом указанный пример имеет следующую структуру:



Как показано ниже в химических структурах примеров 1-3, линкер-фрагмент жирной кислоты, описанные выше, могут быть связаны с ε-аминогруппой боковой цепи К.

Аффинность описанных в настоящем документе аналогов инкретина для каждого из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG может быть измерена с помощью методик, известных в данной области техники, для измерения уровней связывания с рецептором, в том числе, например, методик, описанных в приведенных ниже примерах, и обычно выражается в виде величины константы ингибирования (K<sub>i</sub>). Активность аналогов инкретина в отношении каждого из рецепторов также может быть измерена с помощью методик,



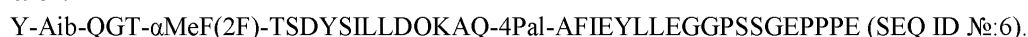
известных в данной области техники, в том числе, например, анализов активности *in vitro*, описанных ниже, и обычно выражается в виде величины эффективной концентрации 50 (EC<sub>50</sub>), которая представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальное моделирование на кривой доза-эффект.

Соответственно, в настоящей заявке сначала описаны аналоги инкретина, содержащие последовательность основных аминокислот:

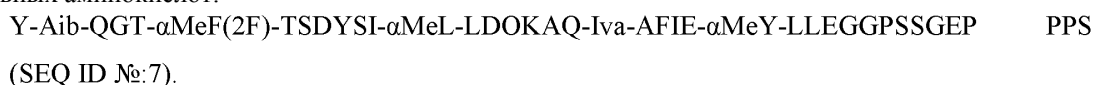


где X<sub>2</sub> представляет собой Aib, X<sub>6</sub> представляет собой αMeF(2F), X<sub>10</sub> представляет собой Y или 4Pal, X<sub>13</sub> представляет собой L или αMeL, X<sub>16</sub> представляет собой O, X<sub>17</sub> представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, при этом указанная функциональная группа конъюгирована с фрагментом жирной кислоты C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>, X<sub>20</sub> представляет собой 4Pal, Iva или αMeL, X<sub>21</sub> представляет собой A или Aib, X<sub>24</sub> представляет собой E или e, X<sub>25</sub> представляет собой Y или αMeY, и X<sub>39</sub> представляет собой E или S (SEQ ID NO: 5), и при этом карбокси-концевая (С-концевая) аминокислота необязательно является амидированной, или их фармацевтически приемлемая соль. В некоторых аспектах изобретения аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, в положении X<sub>17</sub>, может представлять собой C, D, E, K или Q. В определенных случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, в положении X<sub>17</sub>, представляет собой K.

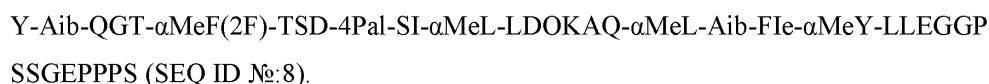
В некоторых аспектах изобретения X<sub>2</sub> представляет собой Aib, X<sub>6</sub> представляет собой αMeF(2F), X<sub>10</sub> представляет собой Y, X<sub>13</sub> представляет собой L, X<sub>16</sub> представляет собой O, X<sub>17</sub> представляет собой K, X<sub>20</sub> представляет собой 4Pal, X<sub>21</sub> представляет собой A, X<sub>24</sub> представляет собой E, X<sub>25</sub> представляет собой Y, и X<sub>39</sub> представляет собой E, так что аналог инкретина содержит последовательность основных аминокислот:



В некоторых аспектах изобретения X<sub>2</sub> представляет собой Aib, X<sub>6</sub> представляет собой αMeF(2F), X<sub>10</sub> представляет собой Y, X<sub>13</sub> представляет собой αMeL, X<sub>16</sub> представляет собой O, X<sub>17</sub> представляет собой K, X<sub>20</sub> представляет собой Iva, X<sub>21</sub> представляет собой A, X<sub>24</sub> представляет собой E, X<sub>25</sub> представляет собой αMeY, и X<sub>39</sub> представляет собой S, так что аналог инкретина содержит последовательность основных аминокислот:

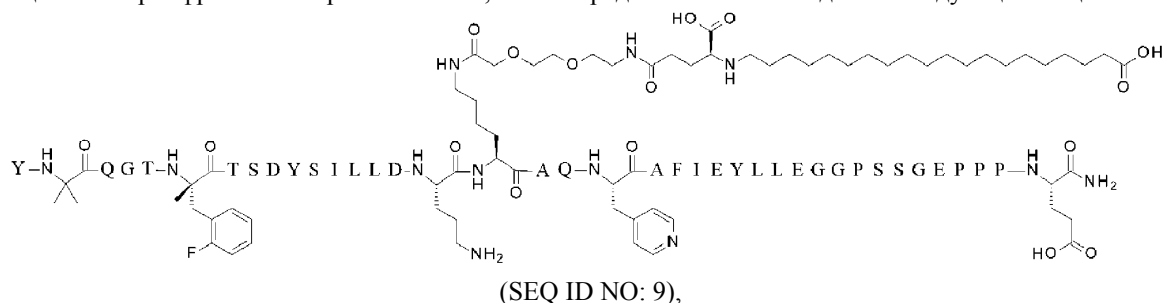


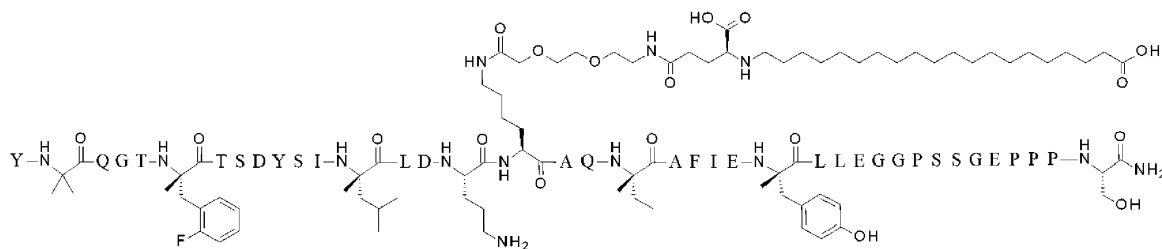
В некоторых аспектах изобретения X<sub>2</sub> представляет собой Aib, X<sub>6</sub> представляет собой αMeF(2F), X<sub>10</sub> представляет собой 4Pal, X<sub>13</sub> представляет собой αMeL, X<sub>16</sub> представляет собой O, X<sub>17</sub> представляет собой K, X<sub>20</sub> представляет собой αMeL, X<sub>21</sub> представляет собой Aib, X<sub>24</sub> представляет собой e, X<sub>25</sub> представляет собой αMeY, и X<sub>39</sub> представляет собой S, так что аналог инкретина содержит последовательность основных аминокислот:



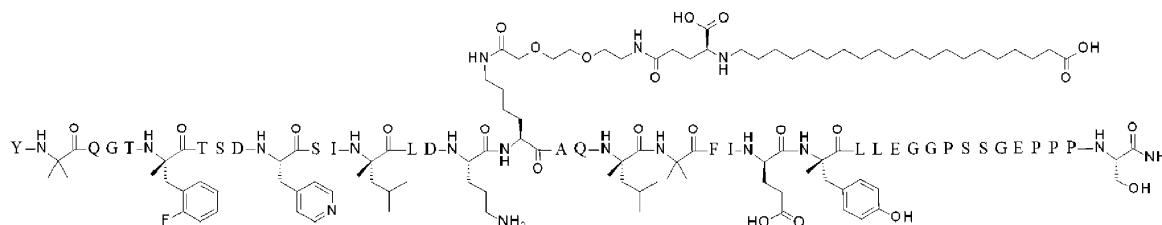
В некоторых аспектах изобретения фрагмент жирной кислоты C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> конъюгирован с аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации, через линкер. В определенных случаях фрагмент жирной кислоты C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> имеет структуру -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-CO<sub>2</sub>H, где a представляет собой целое число от 16 до 22. В определенных случаях фрагмент жирной кислоты представляет собой двухосновную кислоту C<sub>18</sub> или C<sub>20</sub>. Аналогичным образом, и в некоторых случаях линкер может представлять собой одно или более из звеньев [2-(2-амино-этокси)-этокси]-уксусной кислоты (AEEA), аминогексановой кислоты (Ahx), E,γ-глутаминовой кислоты (γE) или их комбинаций.

В некоторых аспектах изобретения аналог инкретина, описанный в настоящем документе, содержащий линкер и фрагмент жирной кислоты, может представлять собой одно из следующих веществ:





(SEQ ID NO: 10), или



(SEQ ID NO: 11).

Описанные в настоящем документе аналоги инкретина можно получить в виде фармацевтических композиций, которые можно вводить парентеральным путем (например, подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным или трансдермальным способом). Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Troy, Ed., 21<sup>st</sup> Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В конкретных случаях аналоги инкретина вводят подкожно.

Описанные в настоящем документе аналоги инкретина могут реагировать с любой из нескольких неорганических и органических кислот/оснований с получением фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты/основания. Фармацевтически приемлемые соли и общепринятые методики их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2<sup>nd</sup> Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для применения в настоящем изобретении включают, но не ограничиваются ими, соли натрия, трифторацетатную, гидрохлоридную и ацетатную соли.

В настоящем изобретении также предложены и, следовательно, включены в него, новые промежуточные соединения и способы синтеза описанных в настоящем документе аналогов инкретина или их фармацевтически приемлемой соли. Промежуточные соединения и описанные в настоящем документе аналоги инкретина можно получить различными способами, известными в данной области техники. Например, способ с применением химического синтеза проиллюстрирован в приведенных ниже примерах. Конкретные этапы синтеза для каждого из описанных путей синтеза можно комбинировать различными способами с получением аналогов инкретина, описанных в настоящем документе. Реагенты и исходные вещества являются легко доступными для специалиста в данной области техники.

В общем случае, некоторые аналоги инкретина, описанные в настоящем документе, являются эффективными в широком диапазоне доз. Например, дозы для введения один раз в неделю могут находиться в диапазоне от около 0,01 до около 30 мг/субъект/неделя, в диапазоне от около 0,1 до около 10 мг/субъект/неделя или даже в диапазоне от около 0,1 до около 3 мг/субъект/неделя. Таким образом, описанные в настоящем документе аналоги инкретина можно вводить ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю или раз в неделю, в частности, один раз в неделю.

Описанные в настоящем документе аналоги инкретина можно применять для лечения различных состояний, нарушений, заболеваний или симптомов. В частности, предложены способы лечения у субъекта СД2, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения у субъекта дислипидемии, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения у субъекта метаболического синдрома, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения у субъекта НАЖБП, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения у субъекта НАСГ, при этом такие способы включают по

меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения у субъекта ожирения, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы индуцирования у субъекта нетерапевтического снижения массы тела, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения сердечно-сосудистого заболевания, которое не считается метаболическим заболеванием, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения нейродегенеративного заболевания, при этом такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В указанных способах эффективность аналогов инкретина, описанных в настоящем документе, можно оценить, например, путем наблюдения значительного снижения уровня глюкозы в крови, наблюдения значительного увеличения уровня инсулина в крови, наблюдения значительного снижения уровня HbA1c в крови, наблюдения значительного снижения содержания липидов в крови, наблюдения значительного снижения массы тела или жировых отложений и/или наблюдения изменения состава тканей организма.

Альтернативно, описанные в настоящем документе аналоги инкретина или их фармацевтически приемлемые соли можно применять для улучшения прочности кости у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых случаях субъект, нуждающийся в этом, имеет гипоостоз или гипоостеозидоз или получает лечение в связи с переломом кости, ортопедической процедурой, протезированием, зубной имплантацией и/или спондилитом. Аналоги инкретина также можно применять для лечения других нарушений, таких как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях по меньшей мере один аналог инкретина, описанный в настоящем документе, можно вводить субъекту подкожно (п/к). Аналогичным образом и в некоторых случаях по меньшей мере один аналог инкретина можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (т.е. еженедельно), каждые две недели (т.е. один раз в две недели) или ежемесячно. В определенных случаях по меньшей мере один аналог инкретина можно вводить п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к один раз в две недели или п/к один раз в месяц. В конкретных случаях по меньшей мере один аналог инкретина вводят п/к один раз в неделю (1 раз/неделя).

Предложенные способы также могут включать такие этапы, как измерение или получение данных о массе субъекта или составе тканей организма, и/или уровне глюкозы в крови, и/или уровне инсулина в крови, и/или уровне гемоглобина A1c (HbA1c) в крови, и/или уровне липидов в крови, и затем сравнение таких полученных значений с одним или более исходными значениями или ранее полученными значениями для оценки эффективности лечения.

В некоторых случаях субъект страдает ожирением или избыточным весом. В других случаях субъект представляет собой человека с диабетом (СД), в частности, с СД2. В определенных случаях субъект страдает ожирением с СД2 или избыточным весом с СД2.

Предложенные способы также можно комбинировать с диетой и физическими упражнениями и/или можно комбинировать с дополнительными терапевтическими средствами.

В другом аспекте изобретения описаны аналоги инкретина для применения в терапии, например, для применения при лечении заболевания, такого как СД, дислипидемия, метаболический синдром, НАЖБП, НАСГ и ожирение. В некоторых случаях заболевание представляет собой СД, НАЖБП, НАСГ или ожирение. В других случаях заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, которое не считается метаболическим заболеванием, или нейродегенеративное заболевание. В другом аспекте изобретения описано применение аналогов инкретина, предложенных в настоящем документе, при получении лекарственного средства для лечения СД, дислипидемии, метаболического синдрома, НАЖБП, НАСГ и ожирения. В некоторых случаях заболевание представляет собой СД, НАЖБП, НАСГ или ожирение. В других случаях заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, которое не считается метаболическим заболеванием, или нейродегенеративное заболевание.

### **Примеры**

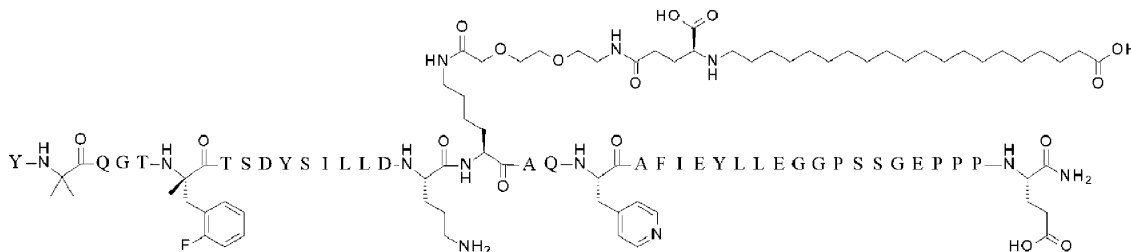
Следующие неограничивающие примеры приведены в целях иллюстрации, а не ограничения. Синтез пептидов.

Пример 1. Синтез аналога 1 инкретина.

Пример 1 представляет собой соединение, представленное посредством следующего описания:

Y AibQGT- $\alpha$ MeF(2F)-TSDYSILLDOK(2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил- $\gamma$ E-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)AQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID №:9).

Ниже приведено изображение структуры примера 1 с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот, за исключением остатков Aib2,  $\alpha$ MeF(2F)6, O16, K17, 4Pal20 и E39, при этом структуры указанных аминокислотных остатков были расширены:



Пептидный остов примера 1 синтезировали с применением химии Fmoc/t-Bu на синтезаторе пептидов Symphony X (Gyros Protein Technologies; Тусон, Аризона). Смола состояла из сшитого полистирола, содержащего 1% дивинилбензола (DVB) (смола с низкой нагрузкой Fmoc-Rink-MBHA, от 100 до 200 меш, EMD Millipore) при замещении от 0,3 до 0,4 мэкв/г. Применяли стандартные защитные группы для боковых цепей со следующими исключениями. Fmoc-Lys(Mtt)-OH применяли для K в положении 17, и Вос-Тур(tBu)-OH применяли для Y в положении 1. Группы Fmoc удаляли перед каждым этапом сочетания (2×7 мин), используя 20% пиперидин в ДМФА. Все реакции сочетания стандартных аминокислот с первичным амином осуществляли в течение 1 ч и со вторичным амином в течение 3 ч при применении равного молярного отношения аминокислоты Fmoc (0,3 мМ), диизопропилкарбодиимида (0,9 мМ) и Охута (0,9 мМ) при девятикратном молярном избытке по сравнению с теоретической нагрузкой пептида. Исключениями являлись реакции сочетания с  $\alpha$ -метилированными аминокислотами, которые связывались в течение 3 ч. После завершения синтеза пептидного остова смолу шесть раз тщательно промывали с помощью дихлорметана (ДХМ) для удаления остаточного ДМФА. Защитную группу Mtt в K в положении 17 селективно удаляли из пептидной смолы путем двух обработок с применением 30% гексафторизопропанола (Oakwood Chemicals) в ДХМ (2×40-минутная обработка).

Последующее присоединение фрагмента жирная кислота-линкер осуществляли путем сочетания 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH, ChemPer, Inc.),  $\alpha$ -трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), моно-OtBu-эйкозановой кислоты (WuXi AppTec, Шанхай, Китай). Для каждого сочетания в течение 1 ч использовали трехкратный избыток реагентов (AA: РуАОР:DIPEA (диизопропилэтиламин)=1:1:1 моль/моль).

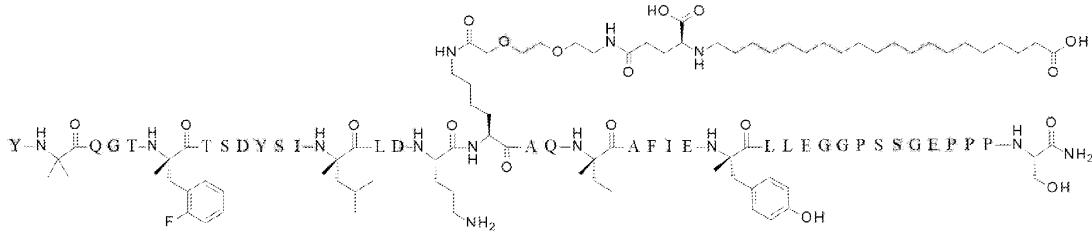
После завершения синтеза пептидную смолу промывали с помощью ДХМ и затем тщательно высушивали на воздухе. Сухую смолу обрабатывали с применением 10 мл раствора для отщепления (ТФУ:триизопропилсилан:вода, 92,5:2,5:5 по объему) в течение 30 мин при 40°C. Смолу отфильтровывали, дважды промывали, используя каждый раз по 2 мл неразбавленной ТФУ, и обрабатывали объединенные фильтраты пятикратным избытком по объему холодного диэтилового эфира (-20°C) для осаждения неочищенного пептида. Затем суспензию пептид/простой эфир центрифугировали со скоростью 3500 об/мин в течение 2 мин с получением твердого осадка, декантировали супернатант и дополнительно растирали твердый осадок с холодным простым эфиром два раза, после чего высушивали в вакууме. Неочищенный пептид солибилизировали в смеси из 20% ацетонитрила/20% уксусной кислоты/60% воды и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ на препаративной колонке Luna 5 мкм фенил-гексил (21×250 мм, Phenomenex) с применением линейных градиентов на основе 100% ацетонитрила и буферной системой 0,1% ТФУ/вода (от 30 до 50% ацетонитрила в течение 60 мин). Чистоту пептида оценивали с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, при этом критерий объединения (pooling criteria) составлял >95%. Было обнаружено, что чистота основного пула в примере 1 составляла >98,0%. В результате последующей лиофилизации конечного основного пула продуктов получали лиофилизованную ТФУ соль пептида. Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ-МС (эксперимент: M+3 = 1633,7; расчет M+3 = 1633,8).

Пример 2. Синтез аналога 2 инкретина.

Пример 2 представляет собой соединение, представленное посредством следующего описания:

Y AibQGT- $\alpha$ MeF(2F)-TSDYSI- $\alpha$ MeL-LDOK(2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил- $\gamma$ E-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)AQ-Iva-AFIE- $\alpha$ MeY-LLEGGPSSGEPPE-NH<sub>2</sub> (SEQ ID №:10).

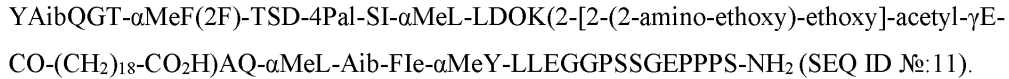
Ниже приведено изображение структуры примера 2 с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот, за исключением остатков Aib2,  $\alpha$ MeF(2F)6,  $\alpha$ MeL13, O16, K17, Iva20,  $\alpha$ MeY25 и S39, при этом структуры указанных аминокислотных остатков были расширены:



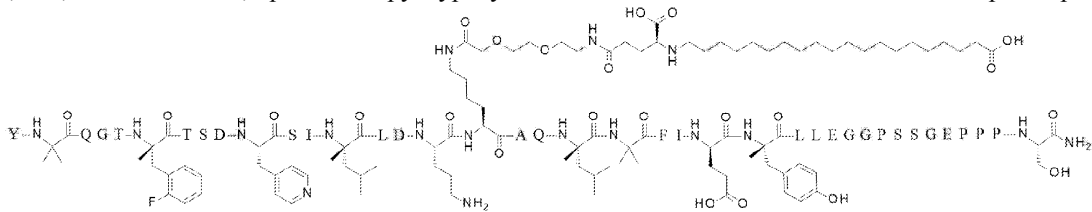
Процессы, аналогичные описанным выше для примера 1, использовали для синтеза пептидного остов и конъюгации фрагмента жирная кислота-линкер с целью проверки чистоты и подтверждения молекулярной массы примера 2.

Пример 3. Синтез аналога 3 инкретина.

Пример 3 представляет собой соединение, представленное посредством следующего описания:



Ниже приведено изображение структуры примера 3 с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот, за исключением остатков Aib2,  $\alpha$ MeF(2F)6, 4Pal10,  $\alpha$ MeL13, O16, K17,  $\alpha$ MeL20, Aib21, e24,  $\alpha$ MeY25 и S39, при этом структуры указанных аминокислотных остатков были расширены:



Процессы, аналогичные описанным выше для примера 1, использовали для синтеза пептидного остов и конъюгации фрагмента жирная кислота-линкер с целью проверки чистоты и подтверждения молекулярной массы примера 3.

Функция *in vitro*.

Пример 4. Аффинность связывания.

Анализ конкурентного связывания радиолиганда использовали для определения равновесной константы диссоциации для иллюстративных соединений и компараторов. В таких анализах использовали методы SPA и мембраны, полученные из трансфицированных клеток HEK293, сверхэкспрессирующих человеческий рецептор GIP (hGIPR; SEQ ID NO: 14), человеческий рецептор GLP-1 (hGLP-1R; SEQ ID NO: 15) или человеческий рецептор GCG (hGCGR; SEQ ID NO: 16).

Анализ проводили в присутствии бацитрацина в качестве неспецифического блокирующего агента для предотвращения связывания ацилированных фрагментов исследуемых аналогов с белковыми компонентами, применяемыми в стандартных аналитических буферах (например, альбумином).

Кривые успешности конкурентирования наносили на график в виде процента специфического ингибирования (ось Y) в зависимости от логарифмической концентрации соединения (ось X) и анализировали путем подгонки четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменным наклоном (ABase или Genedata). Значения K<sub>i</sub> рассчитывали согласно уравнению  $K_i = IC_{50} / (1 + (D/K_d))$ , где IC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию соединения, приводящую к 50% ингибированию связывания, D представляет собой концентрацию радиолиганда, применяемого в анализе, и K<sub>d</sub> представляет собой равновесную константу диссоциации для рецептора и радиолиганда, определенную на основе анализа насыщения соединения (показано ниже в табл. 1).

Таблица 1

K<sub>d</sub>, определенное на основе анализа насыщения соединения

K <sub>d</sub> , нМ		
hGIPR	hGLP-1R	hGCGR
0,14	1,2	3,9

Значения K<sub>i</sub> иллюстративных соединений и компараторов приведены в табл. 2.

Таблица 2

K<sub>i</sub> in vitro иллюстративных соединений и компараторов для hGIPR, hGLP-1R и hGCGR

Соединение	K <sub>i</sub> , нМ (SEM, n)		
	hGIPR	hGLP-1R	hGCGR
hGIP	0,186 (0,001, 101)	--	--
hGLP-1	--	0,844 (0,023, 93)	--
hGCG	--	--	3,00 (0,12, 76)
Пример 1	0,111 (0,021, 7)	4,53 (0,855, 7)	0,629 (0,0415, 7)
Пример 2	0,158 (0,029, 7)	2,54 (0,501, 7)	0,950 (0,350, 7)
Пример 3	0,114 (0,007, 5)	3,63 (0,386, 5)	1,73 (0,296, 5)

Примечание: знак (>) указывает, что полученные данные не достигли 50% ингибирования относительно максимального связывания, вследствие чего K<sub>i</sub> рассчитывали с применением самой высокой концентрации, исследованной в данном анализе, n=1/x означает, что для выражения среднего значения применяли только одно значение из общего количества параллельных анализов (x). SEM рассчитывали только при наличии n=2 или более неквалифицированных результатов.

Как видно из табл. 2, иллюстративные соединения обладают аффинностью связывания в отношении каждого из hGIPR, hGLP-1R и hGCGR.

Пример 5. Функциональные анализы hGIPR, hGLP-1R и hGCGR.

Методы: Функциональную активность определяли по образованию cAMP в линиях клональных клеток HEK-293, экспрессирующих hGIPR, hGLP-1R или hGCGR. Клетки, экспрессирующие рецептор hGIPR, hGLP-1R или hGCGR, обрабатывали контрольным полипептидом или одним из примеров 1-3 (20-точечная кривая концентрация-эффект в ДМСО, 2,75-кратное прямое разведение Labcyte Echo, 384-луночный планшет Corning, кат. № 3570) в DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко) (Gibco, кат. № 31053) с добавками 1X GlutaMAX™ (Gibco, кат. № 35050), 0,1% бычьего казеина (Sigma C4765-10ML), 250 мкМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин, Acros, кат. № 228420010) и 20 мМ HEPES (Gibco, кат. № 15630) в аналитическом объеме 20 мкл (конечная концентрация ДМСО составляла 0,5%). Эксперименты также проводили в идентичных условиях анализа с добавлением 1,0% человеческого сывороточного альбумина, не содержащего жирных кислот и глобулина (Sigma, кат. № A3782).

После 30-минутной инкубации при 37°C достигнутое увеличение внутриклеточного cAMP количественно определяли с применением набора для анализа HTRF Dynamic 2 cAMP CisBio (62AM4PEJ). Вкратце, уровни cAMP в клетке определяли путем добавления конъюгата cAMP-d2 в буфере для лизиса клеток (10 мкл), с последующим добавлением антитела анти-cAMP-Eu3+-криптит, также в буфере для лизиса клеток (10 мкл). Полученный раствор для проведения конкурентного анализа инкубировали в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре и затем детектировали с применением прибора PerkinElmer Envision® при возбуждении при 320 нм и излучении при 665 нм и 620 нм. Единицы Envision (излучение при 665 нм/620 нм × 10000) были обратно пропорциональны количеству присутствующего cAMP и пересчитаны в нМ cAMP на лунку с применением стандартной кривой для cAMP. Количество cAMP, образованного (нМ) в каждой лунке, пересчитывали в процент от максимального ответа, наблюдаемого при применении человеческого GIP(1-42)NH<sub>2</sub>, hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> или hGCG. Относительное значение EC<sub>50</sub> и верхний уровень в процентах (E<sub>max</sub>) получали с применением анализа нелинейной регрессии, используя зависимость максимального ответа в процентах от концентрации добавленного пептида, соответствующей четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Результаты: функциональные данные для hGIP(1-42)NH<sub>2</sub>, hGLP-1(7-36)NH<sub>2</sub>, hGCG и иллюстративных соединений приведены ниже в табл. 3 (0,1% бычий казеин) и табл. 4 (0,1% бычий казеин, 1,0% человеческий сывороточный альбумин).

Таблица 3

Функциональная активность сАМР ( $EC_{50}$ ) и эффективность ( $E_{max}$ ) для пептидов, инкубированных при 37°C (в присутствии 0,1% бычьего казеина)

Соединение	hGLP-1R a		hGCGR a		hGIPR a	
	$EC_{50}$ , нМ, SEM (n) b	$E_{max}$ , % ± SEM c	$EC_{50}$ , нМ, SEM (n) b	$E_{max}$ , % ± SEM c	$EC_{50}$ , нМ, SEM (n) b	$E_{max}$ , % ± SEM c
hGLP-1 (7-36)NH <sub>2</sub>	0,395 0,032 (62)	103 ± 2	--	--	--	--
hGCG	--	--	2,17 0,17 (63)	103 ± 2	--	--
hGIP (1-42)NH <sub>2</sub>	--	--	--	--	1,08 0,14 (60)	98 ± 2
Пример 1	0,345 0,033 (10)	106 ± 4	1,20 0,12 (10)	101 ± 3	0,0513 0,0099 (10)	102 ± 2
Пример 2	0,383 0,089 (10)	103 ± 3	1,02 0,19 (10)	103 ± 2	0,0256 0,0052 (10)	101 ± 2
Пример 3	0,451 0,079 (11)	107 ± 2	2,49 0,37 (10)	99 ± 4	0,0306 0,0061 (10)	103 ± 2

Примечание: (a) плотность экспрессии определяли с применением гомологичного конкурентного связывания [<sup>125</sup>I]GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в hGLP-1R (112 фмоль/мг белка), [<sup>125</sup>I]GCG в hGCGR (98 фмоль/мг белка) и [<sup>125</sup>I]GIP(1-42) в hGIPR (124 фмоль/мг белка),

(b)  $EC_{50}$ , нМ = среднее геометрическое значение со стандартной ошибкой среднего, за которым следует количество экспериментов в скобках,

(c)  $E_{max}$ , % = среднее арифметическое значение ± стандартная ошибка среднего для процента максимального ответа на GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в hGLP-1R, GCG в hGCGR или GIP(1-42)NH<sub>2</sub> в hGIPR. Все приведенные значения указаны с точностью до трех (3) значащих цифр

Таблица 4

Функциональная активность сАМР ( $EC_{50}$ ) и эффективность ( $E_{max}$ ) для пептидов, инкубированных при 37°C (в присутствии 0,1% бычьего казеина и 1,0% человеческого сывороточного альбумина)

Соединение	hGLP-1R a		hGCGR a		hGIPR a	
	$EC_{50}$ , нМ, SEM (n) b	$E_{max}$ , % ± SEM c	$EC_{50}$ , нМ, SEM (n) b	$E_{max}$ , % ± SEM c	$EC_{50}$ , нМ, SEM (n) b	$E_{max}$ , % ± SEM c
hGLP-1 (7-36)NH <sub>2</sub>	0,368 0,030 (45)	104 ± 3	--	--	--	--
hGCG	--	--	2,54 0,30 (45)	102 ± 3	--	--
hGIP (1-42)NH <sub>2</sub>	--	--	--	--	0,756 0,090 (45)	96 ± 2
Пример 1	180 17 (7)	102 ± 4	899 118 (6)	103 ± 8	22,3 5,4 (7)	100 ± 3
Пример 2	119 15 (7)	116 ± 4	537 99 (8)	112 ± 10	2,91 0,46 (7)	99 ± 2
Пример 3	114 12 (6)	111 ± 5	480 178 (6)	97 ± 9	3,72 0,83 (7)	105 ± 5

Примечание: (a) плотность экспрессии определяли с применением гомологичного конкурентного связывания [<sup>125</sup>I]GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в hGLP-1R (112 фмоль/мг белка), [<sup>125</sup>I]GCG в hGCGR (98 фмоль/мг белка) и [<sup>125</sup>I]GIP(1-42) в hGIPR (124 фмоль/мг белка),

(b)  $EC_{50}$ , нМ = среднее геометрическое значение со стандартной ошибкой среднего, за которым следует количество экспериментов в скобках,

(c)  $E_{max}$ , % = среднее арифметическое значение ± стандартная ошибка среднего для процента максимального ответа на GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> в hGLP-1R, GCG в hGCGR или GIP(1-42)NH<sub>2</sub> в hGIPR.

Все приведенные значения указаны с точностью до трех (3) значащих цифр

Как видно из табл. 3, иллюстративные соединения стимулируют сАМР из hGLP-1R, hGCGR и

hGIPR в присутствии 0,1% казеина.

Как видно из табл. 4, иллюстративные соединения стимулируют сAMP из hGLP-1R, hGCGR и hGIPR в присутствии 0,1% бычьего казеина и 1% человеческого сывороточного альбумина.

Функция *in vivo*.

Пример 6. Фармакокинетика у самцов мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO).

Методы: самцам мышей с DIO подкожно вводили однократную дозу 200 нмоль/кг (0,98 мг/кг) иллюстративных соединений в буфере 40 мМ Tris-HCl, pH 8, с 0,02% PS80 (полисорбат 80) в объеме 10 мл/кг. Для фармакокинетического исследования кровь собирали через 1, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после введения дозы. Концентрацию иллюстративных соединений в плазме определяли с применением квалифицированного метода жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ/МС) в Q Squared Solutions BioSciences LLC (Итака, Нью-Йорк). Иллюстративные соединения и внутренний стандарт экстрагировали из 100% плазмы мышей путем осаждения белка с последующей твердофазной экстракцией. Исходную массу иллюстративных соединений, содержащую пептид плюс ацильную цепь, определяли с помощью масс-спектрометра Q-Exactive™ Orbitrap®.

Результаты: данные для иллюстративных соединений приведены ниже в табл. 5.

Таблица 5

Средние фармакокинетические параметры плазмы после подкожного введения однократной дозы 200 нмоль/кг самцам мышей с DIO

Соединение	$t_{1/2}$ (час)	$T_{max}$ (час)	$C_{max}$ (нмоль/л)	$AUC_{0-inf}$ (час×нмоль/л)	CL/F (мл/час/кг)
Пример 1	38	12	817	55550	3,6
Пример 2	18	12	1239	42479	4,7
Пример 3	13	12	1072	32800	6,1

Примечание: 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 часов до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность. N=3 животных/группа/момент времени

Как видно из табл. 5, иллюстративные соединения демонстрируют расширенный фармакокинетический профиль у мышей с DIO.

Пример 7. Влияние *in vivo* на секрецию инсулина у самцов крыс породы Вистар.

Методы: для оценки инсулинотропной активности иллюстративных соединений использовали внутривенный тест на толерантность к глюкозе (ivGTT) у крыс породы Вистар. Агонист GLP-1R, семаглутид, применяли в качестве положительного контроля. Крыс с хирургически имплантированными канолями в яремной вене и сонной артерии (Envigo, Индианаполис, Индиана) массой от 280 до 320 г содержали по одной на клетку в поликарбонатных клетках с фильтрующими крышками. Крысы содержались при 12-часовом цикле "свет-темнота" при 21°C и получали диету 2014 Teklad Global (Envigo) и деионизированную воду без ограничения. Крыс случайным образом распределяли по массе тела и подкожно вводили иллюстративные соединения в дозе 1,5 мл/кг за 16 ч до введения глюкозы, а затем не кормили. Исходные концентрации иллюстративных соединений, составляющие 211 нМ/мл, разбавляли в буфере 40 мМ Tris-HCl, pH 8,0, с 0,02% PS80 до достижения требуемых концентраций дозирования; исследуемые дозы соответствовали носителю, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 и 30 нМ/кг. Семаглутид использовали в качестве положительного контроля вместе с каждой серией иллюстративных соединений (доза 10 нМ/кг).

В момент времени 0 собирали образец крови в пробирки с ЭДТК, после чего вводили глюкозу (0,5 мг/кг, 5 мл/кг). Через 2, 4, 6, 10, 20 и 30 мин после внутривенного введения глюкозы собирали образцы крови для определения уровней глюкозы и инсулина.

Инсулин в плазме определяли с помощью электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale, Роквилл, Мэриленд). Исследовали AUC инсулина по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель, используя  $n = 6$  животных на группу.

Статистический анализ выполняли с помощью JMP путем применения однофакторного анализа ANOVA с последующим сравнением с контрольной группой, получавшей носитель, на основе критерия Даннета.

Результаты: Данные для иллюстративных соединений приведены ниже в табл. 6.



Таблица 6

Влияние носителя, семаглутида (Sema при 10 нмоль/кг) и иллюстративных соединений на секрецию инсулина во время ivGTT у крыс породы Вистар

Соединение	AUC <sub>30min</sub> инсулина после болюсного внутривенного введения глюкозы							
	Доза (нмоль/кг)							
	Носитель	0,1	0,3	1	3	10	30	Sema
Пример 1	27,8 ± 4,8	36,1 ± 5,0	45,5 ± 8,4	70,4 ± 8,4	115,7 ± 6,0	145,9 ± 14,9	134,5 ± 16,6	80,9 ± 8,2
Пример 2	28,9 ± 7,2	69,0 ± 7,4	62,6 ± 5,1	72,6 ± 4,7	101,5 ± 18,2	128,8 ± 11,7	159,0 ± 14,9	76,4 ± 5,6
Пример 3	37,3 ± 4,1	67,0 ± 10,2	77,6 ± 6,7	86,9 ± 9,1	97,2 ± 7,5	119,8 ± 10,2	174,8 ± 22,1	76,6 ± 7,1

Примечание: результаты выражены в виде среднего значения ± стандартная ошибка средних значений (SEM) для 6 крыс на группу. Статистический тест представлял собой однофакторный ANOVA с последующим сравнением с носителем на основе критерия Даннета \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,05$  при сравнении с семаглутидом

Как видно из табл. 6, иллюстративные соединения дозозависимо увеличивали секрецию инсулина.

Пример 8. Исследования in vivo потери массы тела, метаболизма и состава тканей организма у мышей C57/B16 с DIO.

Методы: для исследования влияния иллюстративных соединений на такие параметры, как потеря массы тела, метаболизм и состав тканей организма, иллюстративные соединения вводили мышам C57B16 с DIO. Указанные животные, хотя и не страдали диабетом, имели резистентность к инсулину и дислипидемию, все характеристики метаболического синдрома, после приема диеты с высоким содержанием жира в течение 20 недель.

В данном случае самцов мышей C57/B16 с DIO в возрасте 20 недель содержали на богатой калориями диете и использовали в следующих исследованиях. Животных содержали раздельно в помещении с контролируемой температурой (от 23 до 26°C) при 12-часовом цикле "свет/темнота" (свет зажегся в 21:00) и со свободным доступом к пище (TD95217) и воде. После 3-недельной акклиматизации к помещению, которая включала введение дозы носителя в течение 1 недели, мышам случайным образом распределяли в соответствии с их массой тела с тем, чтобы каждая экспериментальная группа животных имела похожую массу тела. Масса тела варьировала от 40 до 51 г.

Все группы содержали по 6 мышам. Иллюстративные соединения и семаглутид растворяли в носителе (40 mM Tris-HCl при pH 8,0 с 0,02% PS-80) и вводили путем подкожной инъекции (10 мл/кг) мышам с DIO, получавшим пищу без ограничений, за от 30 до 120 мин до наступления цикла "темнота" каждый день в течение 14 дней (дни с 1 по 14). Массу тела и потребление пищи измеряли ежедневно на протяжении всего исследования, включая 1 день после последней дозы (15-й день).

Абсолютные изменения массы тела рассчитывали путем вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией молекулы. В дни 0 и 15 измеряли общую массу жировой ткани с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с применением прибора Echo Medical System (Хьюстон, Техас). На 15-й день измеряли метаболические параметры с помощью глюкометров Accu-Chek® Aviva® (Roche; Индианаполис, Индиана) или клинического анализатора крови Hitachi (Roche, Индианаполис, Индиана). Инсулин в плазме определяли посредством электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд).

Данные представлены как среднее значение ± SEM для 6 животных на группу в табл. 7 и 8, приведенных ниже. Статистический анализ выполняли с применением повторных измерений ANOVA, с последующим применением метода Даннета для множественных сравнений. Значимые различия обозначали в виде \* при  $p < 0,05$ .

Результаты. Данные для иллюстративных соединений приведены ниже в табл. 7 и 8.

Изменение массы тела после лечения с помощью семаглутида и иллюстративных соединений через 15 дней

Соединение	Доза (нмоль/кг)	$\Delta$ массы тела (г)	$\Delta$ массы тела (%)	Масса жировой ткани (%)
Sema	10	$-9,23 \pm 0,58^*$	$-21,98 \pm 2,58^*$	$-15,14 \pm 1,93^*$
Пример 1	0,15625	$-1,20 \pm 0,15$	$-4,31 \pm 0,75$	$-2,44 \pm 0,63$
	0,625	$-4,37 \pm 0,08^*$	$-11,40 \pm 0,92^*$	$-7,38 \pm 1,05^*$
	2,5	$-10,42 \pm 1,40^*$	$-24,43 \pm 3,84^*$	$-17,05 \pm 2,47^*$
	10	$-18,97 \pm 0,81^*$	$-43,71 \pm 2,32^*$	$-30,07 \pm 1,69^*$
	20	$-21,30 \pm 0,94^*$	$-48,88 \pm 2,00^*$	$-32,15 \pm 1,93^*$
Пример 2	0,15625	$-1,72 \pm 0,04$	$-2,65 \pm 0,55$	$-1,91 \pm 0,84$
	0,625	$-4,48 \pm 0,26^*$	$-8,90 \pm 1,38^*$	$-5,87 \pm 0,94^*$
	2,5	$-8,62 \pm 0,21^*$	$-17,90 \pm 1,01^*$	$-11,96 \pm 0,88^*$
	10	$-20,10 \pm 0,54^*$	$-43,44 \pm 1,30^*$	$-28,53 \pm 1,24^*$
	20	$-21,77 \pm 0,50^*$	$-46,79 \pm 1,40^*$	$-28,80 \pm 0,81^*$
Пример 3	0,15625	$-1,95 \pm 0,13$	$-4,60 \pm 0,71$	$-3,34 \pm 0,60$
	0,625	$-5,18 \pm 0,25^*$	$-11,91 \pm 0,99^*$	$-8,03 \pm 0,84^*$
	2,5	$-11,65 \pm 1,68^*$	$-25,98 \pm 3,85^*$	$-18,55 \pm 2,41^*$
	10	$-18,43 \pm 0,68^*$	$-41,10 \pm 1,51^*$	$-28,50 \pm 1,55^*$
	20	$-19,92 \pm 0,34^*$	$-44,22 \pm 1,01^*$	$-29,23 \pm 1,29^*$

Примечание: " $\Delta$  массы тела (г)" относится к разнице между массой тела исследуемой группы и группы, получавшей носитель, на 15-й день. " $\Delta$  массы тела (%)" относится к снижению в процентах массы тела между 1 и 15 днями в исследуемых группах. "Масса жировой ткани (%)" относится к разнице между массой жира между 0 и 15 днями в исследуемых группах. "Sema" означает семаглутид. Все данные получены из одного репрезентативного исследования. Был зарегистрировано процентное изменение массы тела и жировой массы для животных, получавших носитель, составляющее менее 2% в каждом исследовании. " $\Delta$  массы тела (г)", " $\Delta$  массы тела (%)" и " $\Delta$  массы жировой ткани (%)" статистически значимо отличались (\*,  $p < 0,05$ ) от контроля в случае семаглутида и всех примеров при всех исследуемых дозах, за исключением иллюстративных пептидов при низкой дозе, 0,15625 нмоль/кг

Как видно из табл. 7, иллюстративные соединения дозозависимо снижали массу тела и массу жировой ткани.

Таблица 8

Влияние лечения с помощью иллюстративных соединений на уровень глюкозы, инсулина, общего холестерина и триглицеридов в крови через 15 дней

Соединение	Доза (нмоль/кг)	Δ глюкозы (мг/дл)	Δ инсулина (нг/мл)	Δ холестерина (мг/дл)	Δ триглицеридов (мг/дл)
Sema	10	-18,33 ±2,81*	-4,15 ± 2,23	-73,33 ± 4,17*	16,00 ± 0,38
Пример 1	0,15625	-18,58 ± 1,04	-4,48 ± 1,70	-14,33 ± 4,37	-27,83 ± 0,44
	0,625	-24,42 ± 4,44*	-6,03 ± 0,94	-39,17 ± 0,08	15,33 ± 2,75
	2,5	-14,67 ± 0,77	-10,13 ± 4,21	-118,17 ± 1,57*	-2,83 ± 4,13
	10	-35,08 ± 1,47*	-11,14 ± 4,41*	-164,00 ± 1,85*	-43,00 ± 0,50
	20	-56,00 ± 2,12*	-11,40 ± 4,55*	-179,17 ± 7,73*	-52,50 ± 3,95*
Пример 2	0,15625	-9,50 ± 5,21	14,64 ± 3,28	-22,00 ± 4,71	9,67 ± 7,80
	0,625	-6,17 ± 7,12	-9,35 ± 5,61	-43,50 ± 3,47*	-3,50 ± 3,73
	2,5	-13,50 ± 3,92	-14,01 ± 7,49	-150,33 ± 1,70*	-2,33 ± 3,07
	10	-41,00 ± 4,18*	-14,52 ± 7,39	-199,33 ± 7,02*	-9,00 ± 5,09
	20	-46,08 ± 4,21*	-14,73 ± 7,52	-198,00 ± 5,46*	-15,83 ± 6,63
Пример 3	0,15625	-26,97 ± 6,52*	0,48 ± 1,80	-14,50 ± 5,03	40,67 ± 1,75
	0,625	-19,47 ± 6,65*	-4,49 ± 3,03	-37,83 ± 4,80*	40,33 ± 1,58
	2,5	-33,47 ± 1,69*	-7,25 ± 3,60*	-136,50 ± 5,42*	-7,17 ± 6,52
	10	-48,72 ± 6,41*	-7,61 ± 3,80*	-162,50 ± 4,09*	29,00 ± 21,71
	20	-55,97 ± 6,74*	-7,69 ± 3,79*	-186,83 ± 7,59*	-16,50 ± 1,60

Примечание: все данные относятся к разнице на 15-й день между исследуемой группой и группой, получавшей носитель, и получены из одного репрезентативного исследования. "Sema" означает семаглютид. \* $p < 0,05$  при сравнении с группой, получавшей носитель; однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета

Как видно из табл. 8, иллюстративные соединения также снижали уровень глюкозы, инсулина (как признак повышения чувствительности к инсулину), холестерина и триглицеридов в крови.

#### Перечень последовательностей

Следующие нуклеиновые и/или аминокислотные последовательности упоминаются в настоящей заявке выше и приведены ниже в качестве справочной информации.

SEQ ID №:1 – Человеческий GIP

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID №:2 – Амид человеческого GLP-1<sub>7-36</sub>

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH<sub>2</sub>

SEQ ID №:3 - Глюкоган человека

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID №:4 –ОХМ человека

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA

SEQ ID №: 5 - Аналог инкретина

YX<sub>2</sub>QGTX<sub>6</sub>TSDX<sub>10</sub>SIX<sub>13</sub>LDX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>AQX<sub>20</sub>X<sub>21</sub>FIX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>LLEGGPSSGEPPPX<sub>39</sub>,

где:

X<sub>2</sub> представляет собой Aib,

X<sub>6</sub> представляет собой αMeF(2F),

X<sub>10</sub> может представлять собой Y или 4Pal,

X<sub>13</sub> может представлять собой L или αMeL,

X<sub>16</sub> представляет собой Orn,

X<sub>17</sub> представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации,

X<sub>20</sub> может представлять собой 4Pal, Iva или αMeL,

X<sub>21</sub> может представлять собой A или Aib,

X<sub>24</sub> может представлять собой E или e,

X<sub>25</sub> может представлять собой Y или αMeY, и

X<sub>39</sub> может представлять собой E или S

SEQ ID №: 6 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDOKAQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPE

SEQ ID №: 7 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSI-αMeL-LDOKAQ-Iva-AFIE-αMeY-LLEGGPSSGEPSPS

SEQ ID №: 8 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSD-4Pal-SI-αMeL-LDOKAQ-αMeL-Aib-Fe-αMeY-LLEGGPSSGEPSPS

SEQ ID №: 9 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDOK(2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил-γE-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)AQ-4Pal-AFIEYLLEGGPSSGEPPE-NH<sub>2</sub>

SEQ ID №: 10 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSI-αMeL-LDOK(2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил-γE-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)AQ-Iva-AFIE-αMeY-LLEGGPSSGEPSPS-NH<sub>2</sub>

SEQ ID №: 11 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSD-4Pal-SI-αMeL-LDOK(2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил-γE-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H)AQ-αMeL-Aib-Fe-αMeY-LLEGGPSSGEPSPS-NH<sub>2</sub>

SEQ ID №: 12 - Искусственная последовательность

GPSSGEPPE

SEQ ID №: 13 – Искусственные последовательности

GPSSGEPSPS

SEQ ID №: 14 - рецептор человеческого GIP

MTTSPILQLLRLSLCGLLQRAETGSKGQTAGELYQRWERYRRECQETLAAAEPSSGL  
ACNGSFDMYVCWDYAAPNATARASCPWYLPWHHHVAAGFVLRQCGSDGQWGLWRD  
HTQCENPEKNEAFLDQRLILERLQVMYTVGYSLSLATLLLALLILSLFRRLHCTRNYIHIN  
LFTSFMLRAAAILSRDRLLPRPGPYLGDQALALWNQALAACRTAQIVTQYCVGANITW

LLVEGVYLHSLLVLVGGSEEGHFRYYLLLGWGPALFVIPWVIVRYLYENTQCWERNE  
 VKAIWWIIRTPILMTILINFLIFIRILGILLSKLRTRQMRCRDYRLRLARSTLTVPLLGVHE  
 VVFAPVTEEQARGALRFKLGFEIFLSSFQGFVSVLYCFINKEVQSEIRRGWHHCLRR  
 SLGEEQRQLPERAFRALPSGSGPGEVPTSRGLSSGTLPGPGNEASRELESYC

SEQ ID №:15 - рецептор человеческого GLP-1

MAGAPGPLRLALLLLGMVGRAGPRPQGATVSLWETVQKWREYRRQCQRSLTEDPPPA  
 TDLFCNRTFDEYACWPDGEPGSFVNVSCPWYLPWASSVPQGHVYRFCTAEGWLQKD  
 NSSLPWRDLSECEESKRGERSSPEEQLLFLYIITYTVGYALSFSALVIASAILLGFRLHCTR  
 NYIHLNLFASFILRALSVFIKDAALKWMYSTAAQQHQWDGLLSYQDSLSCRLVFLLMQ  
 YCVAANYYWLLVEGVYLYTLLAFSVLSEQWIFRLYVSIGWGVPLLFVVPWGIVKYLYE  
 DEGCWTRNSNMNYWLIIRLPILFAIGNFLIFVRVICIVVSKLKANLMCKTDIKRLAKST  
 LTLIPLLGTHEVIFAFVMDEHARGTLRFIKLFTELSFQGLMVAILYCFVNNEVQLEFR  
 KSWERWRLEHLHIQRDSSMKPLKCPTSSLSSGATAGSSMYTATCQASCS

SEQ ID №:16 - рецептор человеческого GCG

MPPCQQRPLLLLLLLACQPQVPSAQVMDFLFEKWKLYGDQCHHNL SLLPPPTLVCNR  
 TFDKYSCWPDTPANTTANISCPWYLPWHNKVQHRFVFKRCGPDGQWVRGPRGQPWRD  
 ASQCQMDGEEIEVQKEVAKMYSSFQVMYTVGYSLGALLLALAILGGLSKLHCTRNAI  
 HANLFAFVLKASSVLVIDGLLRTRYQKIGDDLSVSTWLSDGAVAGCRVAAVFMQYGI  
 VANYCWLLVEGLYLHNLLGLATLPERFFSLYLIGWGWAPMLFVVPWAVVKCLFENVQ  
 CWTSNDNMGFWWILRFPVFLAILINFFIVRIVQLLVAKLRARQMHTDYKFRLAKSTL  
 TLIPLLGVHEVVFAFVTDEHAQGTLSAKLFFDLFLSSFQGLLVAVLYCFLNKEVQSELR  
 RRWHRWRLGKVLWEERNTSNHRASSSPGHGPPSKELQFGRGGGSQDSSAETPLAGGLP  
 RLAESPF

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее



где  $X_2$  представляет собой Aib,

$X_6$  представляет собой  $\alpha$ MeF(2F),

$X_{10}$  может представлять собой Y или 4Pal,

$X_{13}$  может представлять собой L или  $\alpha$ MeL,

$X_{16}$  представляет собой Orn,

$X_{17}$  представляет собой K, химически модифицированный путем конъюгации с эпсилон-аминогруппой боковой цепи K, со структурой: (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)а-( $\gamma$ E)b-CO-(CH<sub>2</sub>)с-CO<sub>2</sub>H, где а представляет собой 0, 1 или 2; b представляет собой 1 или 2; и с представляет собой целое число от 16 до 20,

$X_{20}$  может представлять собой 4Pal, Iva или  $\alpha$ MeL,

$X_{21}$  может представлять собой A или Aib,

$X_{24}$  может представлять собой E или e,

$X_{25}$  может представлять собой Y или  $\alpha$ MeY, и

$X_{39}$  может представлять собой E или S

(SEQ ID NO: 5), и

при этом карбокси-концевая (С-концевая) аминокислота необязательно является амидированной; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, в котором а представляет собой 1.

3. Соединение по п.1, в котором а представляет собой 2.

4. Соединение по любому из пп.1-3, в котором b представляет собой 1.

5. Соединение по любому из пп.1-3, в котором b представляет собой 2.

6. Соединение по любому из пп.1-5, в котором с представляет собой 20.

7. Соединение по любому из пп.1-6, в котором  $X_{10}$  представляет собой Y.
8. Соединение по любому из пп.1-6, в котором  $X_{10}$  представляет собой 4Pal.
9. Соединение по любому из пп.1-8, в котором  $X_{13}$  представляет собой L.
10. Соединение по любому из пп.1-8, в котором  $X_{13}$  представляет собой  $\alpha$ MeL.
11. Соединение по любому из пп.1-10, в котором  $X_{20}$  представляет собой 4Pal.
12. Соединение по любому из пп.1-10, в котором  $X_{20}$  представляет собой Iva.
13. Соединение по любому из пп.1-10, в котором  $X_{20}$  представляет собой  $\alpha$ MeL.
14. Соединение по любому из пп.1-13, в котором  $X_{21}$  представляет собой A.
15. Соединение по любому из пп.1-13, в котором  $X_{21}$  представляет собой Aib.
16. Соединение по любому из пп.1-15, в котором  $X_{24}$  представляет собой E.
17. Соединение по любому из пп.1-15, в котором  $X_{24}$  представляет собой e.
18. Соединение по любому из пп.1-17, в котором  $X_{25}$  представляет собой Y.
19. Соединение по любому из пп.1-17, в котором  $X_{25}$  представляет собой  $\alpha$ MeY.
20. Соединение по любому из пп.1-19, в котором  $X_{39}$  представляет собой E.
21. Соединение по любому из пп.1-19, в котором  $X_{39}$  представляет собой S.
22. Соединение, имеющее формулу, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-11, или его фармацевтически приемлемая соль.
23. Способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета 2 типа, дислипидемии, метаболического синдрома, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита и ожирения, включающий этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по любому из пп.1-22.
24. Способ лечения по п.23, где заболевание представляет собой сахарный диабет 2 типа или ожирение.
25. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-22; фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.
26. Применение соединения по любому из пп.1-22 для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета 2 типа, дислипидемии, метаболического синдрома, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита и ожирения.
27. Применение по п.26, отличающееся тем, что указанное заболевание представляет собой сахарный диабет 2 типа или ожирение.
28. Применение соединения по любому из пп.1-22 для получения лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета 2 типа, дислипидемии, метаболического синдрома, неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита и ожирения.
29. Применение соединения по п.28, отличающееся тем, что указанное заболевание представляет собой сахарный диабет 2 типа или ожирение.

