

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201892057** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2019.02.28

(51) Int. Cl. *C07K 14/575* (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.01.05

(54) **СОЕДИНЕНИЯ-КОАГОНИСТЫ ГИП И ГПП-1**

(31) **62/101,488**

(32) **2015.01.09**

(33) **US**

(62) **201791281; 2016.01.05**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Алсина-Фернандес Хорхе, Боквист
Бенгт Кристер, Коскан Тамер,
Камминс Роберт Чадвик (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О., Строкова О.В., Гизатуллина
Е.М., Христофоров А.А. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям-двойным миметикам пептида инкретина, которые выступают в роли агонистов рецепторов глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (ГИП) и глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) человека, и могут являться пригодными для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2Т).

201892057
A1

201892057

A1

СОЕДИНЕНИЯ-КОАГОНИСТЫ ГИП И ГПП-1

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, настоящее изобретение относится к соединениям-двойным миметикам пептида инкретина, которые
5 выступают в роли агонистов рецепторов глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП) и глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) человека и могут являться подходящими для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2Т).

СД2Т представляет собой наиболее распространенную форму диабета, на которую приходится приблизительно 90% всех случаев диабета. СД2Т характеризуется высокими
10 уровнями глюкозы в крови, вызванными резистентностью к инсулину. На сегодняшний день стандарт лечения СД2Т включает диету и физическую нагрузку в сочетании с доступными пероральными и инъекционными лекарственными средствами, снижающими уровень глюкозы. Тем не менее, в случае многих пациентов, страдающих от СД2Т, обеспечение адекватного контроля все еще не было достигнуто. Присутствующие на
15 сегодняшний день на рынке миметики инкретина или ингибиторы дипептидилпептидазы IV (ДПП-IV) обладают лишь единственным установленным механизмом действия для гликемического контроля. Необходимо соединение для лечения СД2Т, которое обладало бы двойным механизмом действия.

ГИП представляет собой желудочно-кишечный регуляторный пептид длиной 42
20 аминокислоты, который играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы посредством стимуляции секреции инсулина из бета-клеток поджелудочной железы в присутствии глюкозы и защиты бета-клеток поджелудочной железы. ГПП-1 представляет собой пептид длиной 37 аминокислот, который стимулирует секрецию инсулина, защищает бета-клетки поджелудочной железы и ингибирует секрецию глюкагона, эвакуацию содержимого из
25 желудка и потребление пищи, что приводит к снижению массы тела. ГИП и ГПП-1 известны как инкретины; передача сигналов рецепторами инкретинов оказывает решающее с физиологической точки зрения действие на гомеостаз глюкозы. При нормальной физиологии ГИП и ГПП-1 секретируются в кишечнике после приема пищи, и данные инкретины усиливают физиологический ответ на пищу, включая чувство сытости,
30 секрецию инсулина и утилизацию питательных веществ. У пациентов, страдающих от СД2Т, инкретиновые ответы нарушены.

Было установлено, что введение доз аналогов ГПП-1 ограничено побочными эффектами, такими как тошнота и рвота, и, как следствие, зачастую при введении доз не удается достичь полной эффективности гликемического контроля и снижения массы тела.
35 ГИП сам по себе обладает весьма умеренной способностью снижать уровень глюкозы у

людей, страдающих от диабета 2 типа. Нативные ГИП и ГПП-1 оба быстро инактивируются повсеместно распространенной протеазой, ДПП-IV, и вследствие этого могут быть использованы исключительно для краткосрочного метаболического контроля.

5 Глюкагон представляет собой пептид длиной 29 аминокислот, который образуется поджелудочной железой и при связывании с рецептором глюкагона передает в печень сигнал о высвобождении глюкозы, что приводит к увеличению уровня глюкозы в крови. ГПП-2, пептид, подобный ГПП-1, который образуется в результате процессинга проглюкагона, как известно, связан с пролиферацией клеток в кишечнике. Таким образом, стимуляция рецепторов глюкагона и ГПП-2 должна быть минимизирована в процессе
10 хронического лечения пациентов, страдающих СД2Т, с целью максимально увеличивать снижение уровня глюкозы и снизить потенциальные долгосрочные канцерогенные риски.

В международных публикациях WO 2013/164483, WO 2014/192284 и WO 2011/119657 сообщалось, что определенные аналоги ГИП демонстрируют активность как ГИП, так и ГПП-1.

15 ДПП-IV относится к классу протеолитических ферментов-экзопептидаз. Введение неприродных аминокислот в последовательность может увеличить протеолитическую стабильность любого конкретного пептида. В то время как применение неприродных аминокислот может улучшить стабильность пептидов в отношении протеолиза ДПП-IV и других форм деградации, авторами настоящего изобретения в качестве части настоящего
20 изобретения было установлено, что неприродные аминокислоты могут оказывать неожиданные эффекты на баланс агонистической активности в отношении ГИП и ГПП-1. Неприродные аминокислоты также увеличивают вероятность того, что пептид может быть воспринят как чужеродный и может вызвать нежелательные иммунные реакции, такие как иммуногенность и реакции в месте инъекции у человека.

25 Жирные кислоты благодаря мотивам, связывающимся с альбумином, могут улучшить фармакокинетику пептида, например, посредством увеличения периода полужизни. В то время как использование жирных кислот может улучшить период полужизни пептида, авторами настоящего изобретения в качестве части настоящего изобретения было установлено, что длина, состав и расположение цепи жирной кислоты и
30 линкера между пептидом и цепью жирной кислоты может оказывать неожиданные эффекты на баланс агонистической активности ГИП и ГПП-1.

Было обнаружено, что переносимость определенных аналогов ГПП-1 не позволяет использовать дозу аналога ГПП-1, обеспечивающую лучшую эффективность гликемического контроля и снижения массы тела. Наиболее распространенными
35 побочными эффектами, приписываемыми аналогам ГПП-1, являются тошнота и рвота, но

некоторые соединения могут также влиять на частоту сердечных сокращений. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система является частью ответа на физиологический стресс, и было обнаружено, что ГПП-1 стимулирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему у крыс, что приводит к увеличению уровней кортикостерона. Данный факт
5 обеспечивает потенциальную связь введения ГПП-1 с побочными явлениями, такими как увеличение частоты сердечных сокращений. В качестве части настоящего изобретения авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что соединение согласно настоящему изобретению на модели на крысах не приводит к увеличению уровней кортикостерона, которое наблюдается в случае семаглутида, и, следовательно, вероятно,
10 может вводиться до более высоких уровней эффективности, чем средства, селективные в отношении ГПП-1R (рецептора ГПП-1).

Сохраняется потребность в получении соединения, которое представляет собой сбалансированный коагонист рецепторов ГИП и ГПП-1, но является селективным против родственных рецепторов глюкагона и ГПП-2. Также сохраняется потребность в получении
15 соединения со сбалансированной коагонистической активностью в отношении рецепторов ГИП и ГПП-1, которое может обеспечить снижение массы тела, учитывая активность, обнаруженную на моделях на животных. Дополнительно, сохраняется потребность в получении соединения со сбалансированной коагонистической активностью в отношении рецепторов ГИП и ГПП-1, которое характеризуется надлежащей стабильностью в
20 отношении ДПП-IV и других форм деградации, и при этом сохраняет низкий потенциал иммуногенности. Также сохраняется потребность в получении соединения со сбалансированной коагонистической активностью в отношении рецепторов ГИП и ГПП-1, которое потенциально обеспечивает возможность введения доз человеку один раз в неделю.

Соответственно, определенные соединения согласно настоящему изобретению
25 обладают более низким потенциалом иммуногенности и реакций в месте инъекции, чем определенные соединения-коагонисты ГИП-ГПП-1 в данной области техники. Определенные соединения согласно настоящему изобретению обладают способностью вызывать снижение массы тела у пациентов на основании данных о расходе энергии у животных. Более того, определенные соединения согласно настоящему изобретению
30 обладают сбалансированной коагонистической активностью в отношении рецепторов ГИП и ГПП-1 и селективностью против рецепторов глюкагона и ГПП-2, низким потенциалом иммуногенности и фармакокинетическими (ФК) характеристиками, которые обеспечивают возможность введения доз человеку один раз в неделю.

Соответственно, в варианте реализации настоящего изобретения предложено
35 соединение формулы I:

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS;

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; K в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи K с ([2-(2-амино-этоксид)-этоксид]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равен от 1 до 2, и b равен от 10 до 20; X₃ представляет собой Phe или 1-Nal; и C-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 11), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I, где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; K в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи K с ([2-(2-амино-этоксид)-этоксид]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равен от 1 до 2, и b равен от 10 до 18; X₃ представляет собой Phe; и C-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме C-концевого первичного амида, или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I, где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; K в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи K с ([2-(2-амино-этоксид)-этоксид]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равен от 1 до 2, и b равен от 10 до 18; X₃ представляет собой 1-Nal; и C-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме C-концевого первичного амида, или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I, где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; K в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи K с ([2-(2-амино-этоксид)-этоксид]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равен от 1 до 2, и b равен от 14 до 18; X₃ представляет собой Phe или 1-Nal; и C-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме C-концевого первичного амида, или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения. Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение, где b равен от 16 до 18. Дополнительно, в настоящем изобретении предложено соединение, где b равен 18.

Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I, где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; K в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи K с ([2-(2-амино-этоксид)-этоксид]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-

CO₂H, где a равен 1, и b равен от 10 до 18; X₃ представляет собой Phe или 1-Nal; и С-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме С-концевого первичного амида, или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено
5 соединение формулы I, где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в
положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-
аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-
CO₂H, где a равен 2, и b равен от 10 до 18; X₃ представляет собой Phe или 1-Nal; и С-
концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме С-концевого
10 первичного амида, или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено
соединение формулы I, где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в
положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-
аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-
15 CO₂H, где a равен от 1 до 2, и b равен от 10 до 18; X₃ представляет собой Phe или 1-Nal; и
С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного
амида, или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение
формулы:

20 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS;

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20
является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы
боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; и С-
концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида
25 (SEQ ID NO: 3), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение
формулы:

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS;

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20
является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы
30 боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃
представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-
концевого первичного амида (SEQ ID NO: 4), или фармацевтически приемлемая соль
указанного соединения.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы:



5 где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 5), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

10 Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы:



15 где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 6), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы:



20 где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 7), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

25 Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы:



30 где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X_3 представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 8), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

35 Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы:

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 9), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы:

10 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 10), или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая соединение согласно настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом.

20 Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения сахарного диабета 2 типа, причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения сахарного диабета 2 типа, причем указанный способ также

25 включает одновременное, раздельное или последовательное введение в комбинации с эффективным количеством одного или более средств, которые выбраны из метформина, тиазолидиндионов, сульфонилмочевин, ингибиторов дипептидилпептидазы-4 и натрий-глюкозных котранспортеров.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ

30 улучшения гликемического контроля у взрослых, страдающих от сахарного диабета 2 типа, причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в таком улучшении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению в качестве дополнения к диете и физической нагрузке. Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ хронического контроля массы тела у взрослых

35 с исходным индексом массы тела ≥ 27 и сахарным диабетом 2 типа, причем указанный

способ включает введение пациенту, который нуждается в таком контроле, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению в качестве дополнения к диете с уменьшенным содержанием калорий и увеличенной физической активности.

5 Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения метаболического синдрома, причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения дислипидемии, ожирения и/или стеатоза печени, связанного с резистентностью к инсулину и диабетом, причем указанный способ включает
10 введение пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению. Дополнительно, в настоящем изобретении предложен способ лечения хрупкости или увеличения прочности кости, причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

15 Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение согласно настоящему изобретению для применения в терапии. Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение согласно настоящему изобретению для применения при лечении сахарного диабета 2 типа. Согласно следующему варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение
20 согласно настоящему изобретению в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более средствами, которые выбраны из метформина, тиазолидиндионов, сульфонилмочевин, ингибиторов дипептидилпептидазы-4 и натрий-глюкозных котранспортеров, для применения при лечении сахарного диабета 2 типа.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение
25 согласно настоящему изобретению для применения при гликемическом контроле у взрослых, страдающих от сахарного диабета 2 типа, в качестве дополнения к диете и физической нагрузке. Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено соединение согласно настоящему изобретению для применения при хроническом контроле массы тела у взрослых с исходным индексом массы тела ≥ 27 и сахарным диабетом 2 типа
30 в качестве дополнения к диете с уменьшенным содержанием калорий и увеличенной физической активности.

Согласно варианту реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения согласно настоящему изобретению для производства лекарственного препарата для лечения сахарного диабета 2 типа. Согласно следующему варианту реализации в
35 настоящем изобретении предложено применение соединения согласно настоящему

изобретению в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более средствами, которые выбраны из метформина, тиазолидиндионов, сульфонилмочевин, ингибиторов дипептидилпептидазы-4 и натрий-глюкозных котранспортеров, для производства лекарственного препарата для лечения сахарного

5 диабета 2 типа.

В настоящем изобретении предложены соединения, которые демонстрируют сбалансированную активность ГИП и ГПП-1. Сбалансированная активность в отношении ГИП и ГПП-1 в настоящей заявке означает соединение, которое обладает аффинностью в отношении рецепторов ГИП и рецепторов ГПП-1 в анализе связывания *in vitro* в молярном

10 соотношении, которое близко к 1:1, таком как ГПП-1/ГИП 1:1, ГПП-1/ГИП 2:1, ГПП-1/ГИП 3:2, ГПП-1/ГИП 1:2 или ГПП-1/ГИП 2:3.

В настоящем изобретении предложены соединения, которые демонстрируют селективность в отношении рецепторов ГИП и ГПП-1 по сравнению с рецепторами глюкагона и ГПП-2. Термин «селективность» или «селективный в отношении» при

15 использовании в настоящей заявке для обозначения активности ГИП и ГПП-1 по сравнению с активностью глюкагона означает соединение, которое демонстрирует в 1000, 500 или приблизительно в 100 раз большую активность ГИП и ГПП-1 по сравнению с активностью глюкагона при нормировании данных соответствующих анализов связывания *in vitro*. Термин «селективность» или «селективный в отношении» в настоящей заявке в отношении

20 активности ГИП и ГПП-1 по сравнению с активностью ГПП-2 означает соединение, которое демонстрирует в 250, 200, 100 или приблизительно в 50 раз большую активность ГИП и ГПП-1 по сравнению с активностью ГПП-2 при нормировании данных соответствующих функциональных анализов *in vitro*.

В настоящем изобретении предложен способ лечения диабета 2 типа у пациента,

25 причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения. В настоящем изобретении также предложен способ лечения диабета 2 типа у пациента, причем указанный способ

30 включает введение пациенту, который нуждается в таком лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, причем указанное введение является подкожным. В настоящем изобретении также предложен способ лечения диабета 2 типа у пациента, причем указанный способ включает введение пациенту, который нуждается в таком

35 лечении, эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, и одновременное, отдельное

или последовательное введение эффективного количества одного или более других активных компонентов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения другой активный компонент или компоненты представляют собой доступные на сегодняшний день пероральные лекарственные препараты для снижения уровня глюкозы из класса лекарственных препаратов, которые перед введением считаются стандартом лечения, установленным отраслевыми руководствами, например, руководствами Американской ассоциации диабетологов.

В соединениях согласно настоящему изобретению применяется жирная кислота, конъюгированная химическим способом с эpsilon-аминогруппой боковой цепи лизина. Жирная кислота конъюгирована с эpsilon-аминогруппой боковой цепи лизина посредством линкера. Линкер содержит [2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)_a, где a представляет собой от 1 до 2. Жирная кислота и гамма-глутаминовая кислота в линкере выступают в качестве агентов, связывающих альбумин, и обеспечивают возможность получения соединения длительного действия. Соединения согласно настоящему изобретению содержат лизин в положении 20, который является модифицированным химическим способом посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a представляет собой от 1 до 2, и b представляет собой от 10 до 20. Как показано на химических структурах соединений согласно примерам 1 и 2, первая единица [2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетила соединена с эpsilon-аминогруппой боковой цепи лизина. Затем вторая единица [2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетила присоединена к аминогруппе первой единицы [2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетила. Затем первая единица γGlu присоединена к аминогруппе второй единицы [2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетила посредством γ-карбоксильной группы боковой цепи. Когда a = 2, вторая единица γGlu присоединена к α-аминогруппе первой единицы γGlu посредством γ-карбоксильной группы боковой цепи. Наконец, симметричная жирная кислота присоединена к α-аминогруппе первой (когда a = 1) или второй (когда a = 2) единицы γGlu.

Соединения согласно настоящему изобретению предпочтительно приготовлены в состав в виде фармацевтических композиций, вводимых парентеральными путями (например, подкожным, внутривенным, интраперитонеальным, внутримышечным или трансдермальным). Такие фармацевтические композиции и процессы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, руководство Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Предпочтительным путем введения является подкожный.

Соединения согласно настоящему изобретению могут вступать в реакцию с любой из множества неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты. Фармацевтически приемлемые соли и общепринятая методология их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, руководства P. Stahl, *et al.* Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977. Фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению включают трифторацетатные, гидроклоридные и ацетатные соли.

В настоящей заявке термин «эффективное количество» означает количество или дозу соединения согласно настоящему изобретению или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, которые после введения однократной или многократных доз пациенту обеспечивают желаемый эффект для пациента, диагностику или лечение которого проводят. Эффективное количество может легко определить лечащий специалист по установлению диагноза как специалист в данной области техники посредством применения известных методик и посредством изучения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента лечащий специалист по установлению диагноза учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь указанными: вид млекопитающего; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение; степень или поражение либо тяжесть заболевания или нарушения; ответ конкретного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранный режим введения доз; применение препаратов сопутствующей терапии; и другие соответствующие обстоятельства.

В настоящей заявке термин «лечение» или «лечить» включает ограничение, замедление, остановку или обратное развитие прогрессирующего или тяжести существующего симптома или нарушения.

В настоящей заявке «семаглутид» означает синтезированный химическим способом аналог ГПП-1, который содержит пептидный скелет и общую структуру соединения, представленного регистрационным номером CAS (Chemical Abstracts Service, Химической реферативной службы) 910463-68-2.

Определенные соединения согласно настоящему изобретению, как правило, являются эффективными в широком диапазоне доз. Например, дозы для введения один раз в неделю могут находиться в диапазоне от приблизительно 0,05 до приблизительно 30 мг на человека в неделю. Определенные соединения согласно настоящему изобретению можно

вводить ежедневно. Дополнительно, определенные соединения согласно настоящему изобретению можно вводить один раз в неделю.

Аминокислотные последовательности согласно настоящему изобретению содержат стандартный однобуквенный или трехбуквенный код для двадцати существующих в природе аминокислот. Дополнительно «Aib» представляет собой альфааминоизомаляную кислоту, и «1-Nal» представляет собой 1-нафтилаланин.

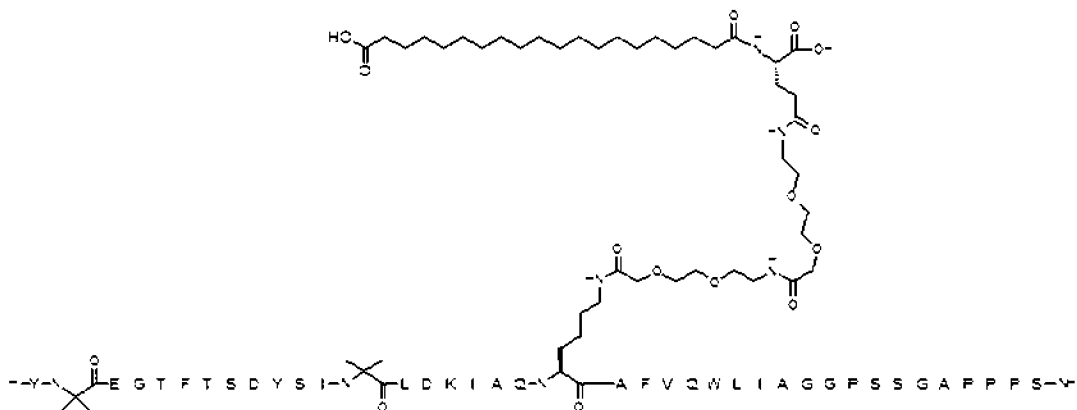
Настоящее изобретение также включает новые промежуточные соединения и процессы, пригодные для синтеза соединений согласно настоящему изобретению или фармацевтически приемлемых солей указанных соединений. Промежуточные соединения и соединения согласно настоящему изобретению можно получить с применением множества процедур, известных в данной области техники. В частности, процесс на основе синтеза проиллюстрирован в примерах ниже. Конкретные этапы синтеза для каждого из описанных путей можно сочетать различными способами для получения соединений согласно настоящему изобретению или солей указанных соединений. Реактивы и исходные материалы легкодоступны среднему специалисту в данной области техники. Следует понимать, что данные примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо способом.

ПРИМЕР 1

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 3)

трифторацетатная соль



Приведенная выше структура содержит стандартный однобуквенный код аминокислот за исключением остатков Aib₂, Aib₁₃ и K₂₀, в которых структуры данных остатков аминокислот были дополнены.

5 Пептид согласно SEQ ID NO: 3 согласно настоящему изобретению получен посредством твердофазного пептидного синтеза с применением стратегии Fmoc/t-Bu, осуществленного на автоматическом синтезаторе пептидов Symphony (PTI Protein Technologies Inc.), с использованием в качестве основы амидной смолы RAPP AM-Rink и сочетаний с применением 6 эквивалентов аминокислоты, активированной диизопропилкарбодиимидом (DIC) и гидроксibenзотриазолом (HOBT) (молярное
10 соотношение 1:1:1), в диметилформамиде (DMF) в течение 90 мин. при температуре 25°C.

В случае Pro₃₁, Trp₂₅, Gln₂₄, Val₂₃, Phe₂₂, Lys₂₀, Gly₄, Glu₃ и Aib₂ необходимы длительные сочетания (по 4 ч каждое) для улучшения качества неочищенного пептида. Структурный элемент Fmoc-Lys(Alloc)-OH использовали для сочетания Lys₂₀ (ортогональная защитная группа), чтобы впоследствии в процессе синтеза обеспечить
15 возможность сайт-специфичного присоединения группы жирной кислоты. Для сочетания Fmoc-Phe-OH в положении 12 использовали следующие условия: Fmoc-Phe-OH (6 эквив.), PyBOP (6 эквив.) и DIEA (12 эквив.) в DMF в течение 24 ч при температуре 25°C. N-концевой остаток встраивали в виде Boc-Tyr(tBu)-OH с применением протоколов DIC-HOBT, как описано выше.

20 После окончания элонгации пептид-смола, описанной выше, защитную группу Alloc, присутствующую в Lys₂₀, удаляли с применением каталитических количеств Pd(PPh₃)₄ в присутствии PhSiH₃ в качестве поглотителя. Дополнительные циклы сочетания/снятия защиты с применением стратегии Fmoc/t-Bu для удлинения боковой цепи Lys₂₀ включали Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH (ChemPer, кат. № 280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu
25 (ChemPer, кат. № 100703) и HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu. Во всех сочетаниях 3 эквивалента структурного элемента использовали с PyBOP (3 эквив.) и DIEA (6 эквив.) в DMF в течение 4 ч при температуре 25°C.

Параллельное отщепление от смолы и удаление защитной группы боковой цепи проводили в растворе, содержащем трифторуксусную кислоту (TFA): триизопропилсилан:
30 1,2-этандитиол: воду: тиоанизол 90:4:2:2:2 (об./об., объем/объем) в течение 2 ч при температуре 25°C с последующей преципитацией холодным эфиром. Неочищенный пептид очищали до чистоты > 99% (выход очищенного продукта составил 15 – 20%) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с градиентом воды/ ацетонитрила (содержащего 0,05% об./об. TFA) на колонке C18, и целевые фракции объединяли и лиофилизировали.

В синтезе, который проводили по существу так же, как описано выше, чистоту соединения согласно примеру 1 оценивали методом аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, и подлинность соединения подтверждали с применением ЖХ/МС (жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии) (наблюдаемый: $M+3H^+/3 = 1605,2$; рассчитанный $M+3H^+/3 = 1605,5$; наблюдаемый: $M+4H^+/4 = 1204,3$; рассчитанный $M+4H^+/4 = 1204,4$).

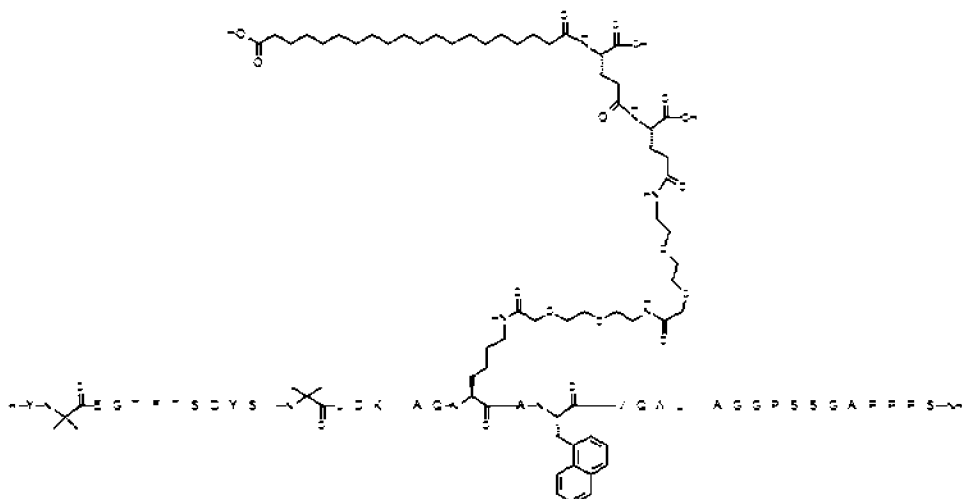
ПРИМЕР 2

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAX_3VQWLIAGGPSSGAPPPS$,

где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с $([2-(2\text{-амино-этокси})\text{-этокси}]\text{-ацетил})_2\text{-}(\gamma\text{Glu})_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-CO}_2\text{H}$; X_3 представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 4)

трифторацетатная соль

15



Приведенная выше структура содержит стандартный однобуквенный код аминокислот за исключением остатков Aib₂, Aib₁₃, K₂₀ и 1-Nal₂₂, в которых структуры данных остатков аминокислот были дополнены.

Пептид согласно SEQ ID NO: 4 согласно настоящему изобретению синтезировали аналогично способу, описанному выше в примере 1. Для сочетания Fmoc-1Nal-OH в положении 22 использовали следующие условия: Fmoc-1Nal-OH (6 эквив.), PyBOP (6 эквив.) и DIEA (12 эквив.) в DMF в течение 4 ч при температуре 25°C.

25

ПРИМЕР 3

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS$,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 5)

трифторацетатная соль

Соединение согласно SEQ ID NO: 5 согласно настоящему изобретению синтезировали аналогично способу, описанному выше для соединения согласно примеру 1.

10

ПРИМЕР 4

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 6)

15

трифторацетатная соль

Соединение согласно SEQ ID NO: 6 согласно настоящему изобретению синтезируют аналогично способу, описанному выше для соединения согласно примеру 1.

20

ПРИМЕР 5

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 7)

25

30

трифторацетатная соль

Соединение согласно SEQ ID NO: 7 согласно настоящему изобретению синтезируют аналогично способу, описанному выше для соединения согласно примеру 1.

35

ПРИМЕР 6

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 8)

трифторацетатная соль

Соединение согласно SEQ ID NO: 8 согласно настоящему изобретению синтезируют аналогично способу, описанному выше для соединения согласно примеру 1.

ПРИМЕР 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 9)

трифторацетатная соль

Соединение согласно SEQ ID NO: 9 согласно настоящему изобретению синтезируют аналогично способу, описанному выше для соединения согласно примеру 1.

ПРИМЕР 8

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 10)

трифторацетатная соль

Соединение согласно SEQ ID NO: 10 согласно настоящему изобретению синтезируют аналогично способу, описанному выше для соединения согласно примеру 1.

АНАЛИЗЫ

Ниже приведены условия и результаты изучения соединений согласно примерам в нескольких анализах: в анализе активности и селективности *in vitro*, составлении профиля иммуногенности, фармакокинетики и в анализах на моделях диабета 2 типа *in vivo*.

5

Активность и селективность *in vitro*

Активность связывания с рецепторами ГПП-1 и ГИП человека *in vitro*

Активность связывания соединений согласно настоящему изобретению с рецепторами ГИП и ГПП-1 человека *in vitro* оценивали посредством определения аффинностей связывания в форме K_i с применением неочищенных клеточных мембран, полученных от клональных линий клеток, сверхэкспрессирующих кДНК ГПП1-Р человека или кДНК ГИП-Р (рецептора ГИП) человека.

В анализе связывания рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида человека использовали чГИП-Р (Usdin, T.B., Gruber, C., Modi, W. and Bonner, T.I., GenBank: AAA84418.1), клонированный в плазмиду pcDNA3.1 (Promega)-NeoR. Клетки яичников китайского хомячка, CHO-S, для суспензионных культур трансфицировали плазмидой чГИП-Р-pcDNA3.1/Neo и проводили селекцию в присутствии 500 мкг/мл генетицина (Invitrogen).

Неочищенные плазматические мембраны получали из клеток суспензионной культуры. Клетки лизировали на льду в гипотоническом буфере, содержащем 25 mM Tris HCl, pH 7,5, 1 mM MgCl₂, ДНКазу 1, 20 мк/мл, и ингибиторы Roche Complete™ без EDTA. Суспензию клеток гомогенизировали с применением гомогенизатора Даунса со стеклянными стенками и пестика Teflon® (25 движений). Гомогенат центрифугировали при температуре 4°C при 1800 x g в течение 15 минут. Супернатант собирали, осадок ресуспендировали в гипотоническом буфере и повторно гомогенизировали. Смесь центрифугировали при 1800 x g в течение 15 минут. Второй супернатант объединяли с первым супернатантом. Объединенные супернатанты повторно центрифугировали при 1800 x g в течение 15 минут до прозрачности. Прозрачный супернатант переносили в пробирки для высокоскоростного центрифугирования и центрифугировали при 25000 x g в течение 30 минут при температуре 4°C. Осадок мембран ресуспендировали в буфере для гомогенизации и хранили в виде замороженных аликвот при температуре -80 °C в морозильной камере до использования.

ГИП метили радиоактивным иодом с применением процедуры на основе I-125-лактопероксидазы (Markalonis, J.J., *Biochem. J.* 113:299 (1969)) и очищали методом

35

обращенно-фазовой ВЭЖХ (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences NEX-402). Специфическая активность составила 2200 Ки/моль. Определение K_D проводили методом гомологичной конкуренции с применением холодного чГИП вместо насыщающего связывания. Анализ связывания с рецепторами проводили с применением сцинтилляционного анализа сближения (scintillation proximity assay, SPA) с использованием бусин с агглютинином зародышей пшеницы (wheat germ agglutinin, WGA) (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences), предварительно заблокированных 1% БСА (бычьим сывороточным альбумином), не содержащим жирных кислот (Gibco, 7,5% БСА). Буфер для связывания содержал 25 мМ HEPES, pH 7,4, 2,5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1% БСА, не содержащий жирных кислот, 0,003% Tween20 и ингибиторы Roche Complete™ без EDTA. чГИП и соединения согласно настоящему изобретению растворяли в 100% DMSO и хранили при температуре $-20^\circ C$. Готовили серийные разведения соединений в буфере для связывания. Затем 10 мкл разведенного соединения или 100% DMSO переносили в планшет для анализа с прозрачным дном Corning® 3632, содержащий 40 мкл буфера для анализа связывания или холодный ГИП (NSB, конечная концентрация 0,1 мкМ). После этого добавляли 90 мкл мембран (3 мкг/лунку), 50 мкл [^{125}I] ГИП (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, конечная концентрация в реакции 0,15 нМ) и 50 мкл бусин WGA (150 мкг/лунку), закрывали и перемешивали на шейкере для планшетов в течение 1 минуты. Планшеты анализировали через 12 часов (время стабилизации) при комнатной температуре с помощью сцинтилляционного счетчика MicroBeta®.

Результаты рассчитывали в виде процента специфического связывания I-125-ГИП в присутствии соединения. Абсолютную концентрацию IC_{50} получали с применением нелинейной регрессии процента специфического связывания I-125-ГИП по сравнению с добавленной концентрацией соединения. Концентрацию IC_{50} преобразовывали в K_i с применением уравнения Ченга-Пруссоффа.

В анализе связывания рецептора ГПП-1 использовали клонированный рецептор глюкагоноподобного пептида 1 человека (чГПП-1Р) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, *Biochem Biophys Res Commun.* 196(1): 141-6, 1993), выделенный из мембран 293НЕК. кДНК чГПП-1Р субклонировали в плазмиду экспрессии pH D (Trans-activated 15 expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. *Bio/Technology* 5: 1189-1192, 1987). Клетки 293НЕК трансфицировали ДНК плазмиды и проводили селекцию с применением 200 мкг/мл гигромицина.

Неочищенные плазматические мембраны получали из клеток суспензионной культуры. Клетки лизировали на льду в гипотоническом буфере, содержащем 25 мМ Tris

НСl, рН 7,5, 1 мМ MgCl₂, ДНКазу 1, 20 мк/мл, и ингибиторы Roche Complete™ без EDTA. Суспензию клеток гомогенизировали с применением гомогенизатора Даунса со стеклянными стенками и пестика Teflon® (25 движений). Гомогенат центрифугировали при температуре 4°C при 1800 x g в течение 15 минут. Супернатант собирали, осадок ресуспендировали в гипотоническом буфере и повторно гомогенизировали. Смесь центрифугировали при 1800 x g в течение 15 минут. Второй супернатант объединяли с первым супернатантом. Объединенные супернатанты повторно центрифугировали при 1800 x g в течение 15 минут до прозрачности. Прозрачный супернатант переносили в пробирки для высокоскоростного центрифугирования и центрифугировали при 25000 x g в течение 30 минут при температуре 4°C. Осадок мембран ресуспендировали в буфере для гомогенизации и хранили в виде замороженных аликвот при температуре -80 °C в морозильной камере до использования.

Глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП-1) метили радиоактивным иодом с применением процедуры на основе I-125-лактопероксидазы и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на приборе Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (NEX308). Специфическая активность составила 2200 Ки/моль. Определение K_D осуществляли методом гомологичной конкуренции вместо насыщающего связывания в связи с высоким содержанием пропанола в материале I-125 ГПП-1. Расчетная K_D составила 0,329 нМ, и данное значение использовали для расчета значений K_i для всех исследованных соединений.

Анализ связывания с рецепторами проводили с применением сцинтилляционного анализа сближения (SPA) и бусин с агглютинином зародышей пшеницы (WGA), предварительно заблокированных 1% БСА, не содержащим жирных кислот (Gibco). Буфер для связывания содержал 25 мМ HEPES, рН 7,4, 2,5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,1% БСА, не содержащий жирных кислот, 0,003% Tween20 и ингибиторы Roche Complete™ без EDTA. Глюкагоноподобный пептид 1 растворяли в 100% DMSO в концентрации 1 мг/мл и хранили в замороженном состоянии при температуре -20 °C в виде аликвот объемом 30 мкл. Аликвоту глюкагоноподобного пептида 1 разводили и использовали в анализах связывания в течение часа. Аналог пептида растворяли в 100% DMSO и готовили серийные разведения в 100% DMSO. Затем 10 мкл разведенных соединений согласно настоящему изобретению или 100% DMSO переносили в планшет для анализа с прозрачным дном Corning® 3632, содержащий 40 мкл буфера для анализа связывания или холодный глюкагон (NSB, конечная концентрация 1 мкМ). После этого добавляли 90 мкл мембран (0,5 мкг/лунку), 50 мкл I-125 глюкагоноподобного пептида 1 (конечная концентрация в реакции 0,15 нМ) и 50 мкл бусин WGA (150 мкг/лунку), закрывали и перемешивали на шейкере для планшетов в

течение 1 минуты. Планшеты анализировали через 12 часов (время стабилизации) при комнатной температуре с помощью сцинтилляционного счетчика Trilux MicroBeta® PerkinElmer Life and Analytical Sciences.

Результаты рассчитывали в виде процента специфического связывания I-125-глюкагоноподобного пептида 1 в присутствии соединений. Абсолютную концентрацию IC₅₀ соединения получали с применением нелинейной регрессии процента специфического связывания I-125-глюкагоноподобного пептида 1 по сравнению с добавленной концентрацией соединения. Концентрацию IC₅₀ преобразовывали в Ki с применением уравнения Ченга-Пруссоффа.

В экспериментах, которые проводили по существу так же, как описано в данном анализе, определенные соединения согласно настоящему изобретению продемонстрировали соотношение чГПП-1P/чГИП-Р, составляющее приблизительно 0,5 – 4,0 (таблица 1). Молярное соотношение связывания нормировали к соответствующему молярному соотношению смеси нативных ГИП и ГПП-1. Данный фактор нормирования составил 4,53 на основании данных связывания для ГИП (Ki=0,175 нМ) и ГПП-1 (Ki=0,793 нМ). Значение 1,48 демонстрирует сбалансированную коагонистическую активность соединения согласно примеру 1.

Таблица 1: Аффинность связывания с рецепторами, Ki, нМ (СОС, n)

Соединение	ГИП-Р человека	ГПП-1P человека	Абсолютное соотношение чГПП-1P/чГИП-Р	Молярное соотношение чГПП-1P/чГИП-Р
Пример 1	34,4 (5,0, n=8)	232 (40, n=8)	6,7	1,48
ГИП, 1-42	0,175 (0,022, n=8)	>175 (n=14)	>1000	
ГПП-1, 7-36-NH ₂	>100 (n=15)	0,793 (0,099, n=8)	<0,008	
Пример 3	26,7 (2,3, n=17)	427 (33, n=17)	16	3,53
Пример 6	44,2 (3,6, n=14)	365 (28, n=14)	8,3	1,83
Пример 7	46,1 (5,9, n=11)	352 (39, n=11)	7,6	1,68
Пример 8	67,5 (9,9, n=6)	307 (35, n=6)	4,5	0,99
Пример 4	40,7 (5,1, n=7)	714 (76, n=7)	17,5	3,86
Пример 2	63,9 (11,8, n=8)	344 (60, n=8)	5,4	1,19
Пример 5	17,8 (3,0, n=5)	158 (32, n=5)	8,9	1,96

Средние значения выражены в виде геометрического среднего со стандартной ошибкой среднего (СОС), количество повторов (n) указано в скобках. Спецификатор (>) отмечает данные, для которых не было достигнуто 50% ингибирование, и K_i рассчитывали с применением наивысшей концентрации, исследованной в анализе.

5

Функциональные анализы чГИП-Р, чГПП-1Р и чГКГР (рецептора глюкагона человека).

Функциональную активность соединений согласно настоящему изобретению в отношении рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона человека *in vitro* определяли на клональных линиях клеток НЕК-293, экспрессирующих данные рецепторы. Каждую линию клеток, сверхэкспрессирующую рецептор, обрабатывали соединениями согласно настоящему изобретению в DMEM (Gibco, кат. № 31053) с добавлением 1X GlutaMAX™ (Gibco, кат. № 35050), 0,25% ЭБС (эмбриональной бычьей сыворотки), 0,05% фракции V БСА, 250 мкМ IBMX и 20 мМ NEPES в объеме анализа 40 мкл. После инкубации в течение 15 60 минут при комнатной температуре полученное в результате увеличение внутриклеточного цАМФ количественно определяли с применением набора CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF Assay Kit (Бедфорд, Массачусетс). Вкратце, уровни цАМФ в клетке определяли посредством добавления конъюгата цАМФ-d2 в буфер для лизиса клеток (20 мкл) с последующим добавлением антитела против цАМФ-Eu³⁺-криптит также в буфер для лизиса клеток (20 мкл). Полученную в результате смесь для конкурентного анализа инкубировали в течение по меньшей мере 60 минут при комнатной температуре, а затем определяли с применением инструмента PerkinElmer Envision® с возбуждением при длине волны 320 нм и испусканием при длине волны 665 нм и 620 нм. Единицы Envision (испускание при 665 нм/620 нм *10000), которые являются обратно пропорциональными присутствующему количеству цАМФ, преобразовывали в нМ цАМФ на лунку с применением стандартной кривой цАМФ. Количество образованного цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразовывали в процент от максимального ответа, наблюдаемого при контролях ГИП(1-42)NH₂ человека, ГПП-1(7-36)NH₂ человека или глюкагона человека. Относительное значение EC₅₀ и максимальный процент (E_{max}) получали посредством анализа нелинейной регрессии с применением процента максимального ответа по сравнению с концентрацией соединения согласно настоящему изобретению, аппроксимированных в четырехпараметровое логистическое уравнение.

В экспериментах, которые проводили по существу так же, как описано в данном анализе, определенные соединения согласно настоящему изобретению продемонстрировали активность в отношении рецепторов ГИП и ГПП-1 человека, при этом

35

также демонстрируя селективность против рецептора глюкагона. В таблице 2 показана функциональная активность контролей – нативных чГИП(1-42)NH₂, чГПП-1(7-36)NH₂ и чГлюкагона, а также определенных соединений согласно настоящему изобретению в отношении рецепторов.

5

Таблица 2. Функциональная активность (EC₅₀) в отношении рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона человека.

Соединение	ГИП-Р человека		ГПП-1Р человека		ГКР человека	
	EC ₅₀ , нМ±СОС (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ±СОС (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ±СОС, (n)	E _{max} , %
Пример 1	11,0±0,9 (17)	97,9±3,0	71,2±7,2 (17)	85,2±4,4	>1000 (13)	НО
Пример 3	3,15±0,34 (14)	106±3	33,9±3,2 (14)	96,2±6,2	>1000 (10)	НО
Пример 6	4,40±0,71 (13)	106±3	28,4±4,2 (13)	104±4	>1000 (9)	НО
Пример 7	8,07±0,70 (17)	106±3	35,5±2,6 (17)	97,2±3,4	>1000 (13)	НО
Пример 8	21,1±2,7 (14)	108±4	57,9±6,8 (13)	88,4±2,3	>1000 (10)	НО
Пример 4	3,76±0,83 (6)	102±3	66,9±14,9 (6)	100±5	>1000 (2)	НО
Пример 2	17,5±2,0 (13)	94,7±2,0	75,7±6,0 (13)	98,2±5,5	>1000 (9)	НО
Пример 5	8,76±0,86 (10)	105±2	70,9±9,7 (10)	105±4	>1000 (10)	НО
чГПП-1(7-36)NH ₂			0,176 ±0,015 (17)	102±2		
чГИП(1-42)NH ₂	0,135 ±0,010 (17)	100±1				

чГлюкагон					0,0208 ±0,0024 (13)	115±2
-----------	--	--	--	--	---------------------------	-------

Средние значения EC_{50} выражены в виде геометрического среднего +/- стандартная ошибка среднего (СОС), количество повторов (n) указано в скобках. Средние значения E_{max} выражены в виде среднего арифметического +/- стандартная ошибка. НО означает, что агонистическая активность не была обнаружена. Спецификатор (>) означает, что EC_{50} невозможно было определить. Все значения приведены с точностью до трех значимых цифр.

Функциональная активация чГИП-Р клеток для образования внутриклеточного цАМФ на линиях клеток, секретирующих инкретин

10 Функциональную активность соединений согласно настоящему изобретению в отношении чГИП-Р демонстрировали посредством способности соединений образовывать внутриклеточный цАМФ в клетках GLUTag, стабильной иммортализованной относительно дифференцированной линии энтероэндокринных клеток мышей, которая экспрессирует ген проглюкагона и контролируемым образом секретирует глюкагоноподобные пептиды.

15 Клетки поддерживали при температуре 37°C, содержании CO_2 5%, влажности 95% в среде DMEM с добавлением 5,5 мМ глюкозы, 10% ЭБС и 2 мМ глутамин. Перед проведением анализа клетки трипсинизировали, осаждали и высевали на 96-луночные аналитические планшеты для культивирования тканей при плотности 20000 клеток/лунку. Клеткам давали возможность присоединиться и инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C и

20 содержании CO_2 5%. В день анализа от клеток отбирали среду, и к клеткам добавляли 50 мкл буфера EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, сбалансированный солевой раствор Эрла, 0,1% БСА, 2 мМ глюкозы и 0,25 мМ IBMX), содержащего диапазон концентраций соединения (0,001 – 3 мМ). Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение одного часа, и уровни цАМФ определяли с применением набора Cisbio Dynamic 2 cAMP HTRF

25 (Бедфорд, Массачусетс). В каждую лунку добавляли 25 мкл антитела против цАМФ-криптан и 25 мкл цАМФ d2, и планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты анализировали при длине волны 620 нм и 665 нм на приборе Tecan Genios Pro. Результаты рассчитывали на основании соотношения 665 нм / 620 нм, умноженного на 10000, и преобразовывали в нМ цАМФ на лунку с применением

30 стандартной кривой цАМФ. Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad с применением 4-параметрового нелинейного логистического алгоритма.

В экспериментах, которые проводили по существу так же, как описано в данном анализе, определенные соединения согласно настоящему изобретению продемонстрировали дозозависимое увеличение накопления цАМФ в клетках GLUTag (таблица 3). Контроль, нативный ГПП-1, не был способен вызвать какие-либо изменения уровня цАМФ во всех исследованных концентрациях. Полученный результат означает, что данная система клеток экспрессирует исключительно рецептор ГИП; следовательно, можно продемонстрировать, что определенные соединения согласно настоящему изобретению оказывают влияние посредством рецептора ГИП.

10 **Таблица 3: EC50 на клетках GLUTag.**

Соединение	Среднее EC50, нМ (n)
Пример 3	1610 (1)
Пример 7	2746 (1)
Пример 4	2186 (1)
Пример 2	2918 (1)
Пример 1	1494 (2)
Нативный ГИП	11,62 (3)

Измерение внутриклеточного цАМФ в клетках НЕК293, временно экспрессирующих рецептор ГПП-2 человека

Функциональную активность чГПП-2Р (рецептора ГПП-2 человека) в присутствии соединений согласно настоящему изобретению демонстрировали посредством определения внутриклеточного цАМФ в клетках НЕК293. Данные клетки перевивали в полной среде, трансфицировали в суспензии с применением реактива Promega Fugene6 и кДНК полноразмерного ГПП-2Р человека в векторе экспрессии pcDNA3.1, и клеткам давали возможность прикрепиться к флаконам для культивирования тканей в увлажненной окружающей среде при температуре 37°C и содержании CO₂ 5%. После приблизительно 48 часов размножения клетки снимали, окрашивали и криоконсервировали при контролируемой скорости замораживания с использованием 10% DMSO в качестве криопротектора. В последующих анализах оттаивали готовую виалу для одного анализа из одного и того же образца замороженных клеток для минимизации вариаций в серии анализов. В день анализа клеток среду для замораживания заменяли на Invitrogen 31053 DMEM, содержащую 0,5% ЭБС.

Клетки подсчитывали для определения жизнеспособности и уравнивали в течение приблизительно одного – двух часов при температуре 37°C перед обработкой.

Соединения согласно настоящему изобретению солюбилизировали в DMSO и немедленно разводили в среде DMEM, содержащей 0,1% фракции V БСА и неспецифичный ингибитор фосфодиэстеразы, IBMX. Длительность обработки составляла 30 минут при температуре 37°C. Конечная концентрация DMSO не превышала 1,1%, и конечная концентрация IBMX составила 250 мкМ. Циклический АМФ измеряли посредством динамического анализа с применением технологии гомогенной флуоресценции с временным разрешением (Cisbio Bioassays, Бедфорд, Массачусетс). Соответствующие концентрации цАМФ выводили с помощью способа расчета на основе соотношения и внешних стандартов. Сигмовидные кривые доза-ответ исследуемых соединений изучали с применением четырехпараметрового логистического уравнения и сравнивали с нативным C₁₈-ацилированным лигандом.

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано в данном анализе, контроль, C₁₈-ацилированный ГПП-2 человека, характеризовался значением EC₅₀ в отношении активации рецептора, составляющим 1,71 нМ, тогда как определенные соединения согласно настоящему изобретению характеризовались значениями EC₅₀ в приблизительно 100 – 1000 раз выше. Значения EC₅₀ определенных соединений согласно настоящему изобретению продемонстрировали селективность против рецептора ГПП-2.

Таблица 4: Измерение функциональной активности ГПП-2Р на клетках НЕК293.

Соединение	Относ. EC ₅₀ (нМ)	n
ГПП2-C ₁₈ -дикислота	1,857	4
Пример 3	199,3	4
Пример 7	1,800	4
Пример 4	405	2
Пример 1	238	4
Пример 2	1612	2

20 Секреция инсулина островками грызунов

Для оценки действия соединений согласно настоящему изобретению в системе, представляющей физиологические уровни экспрессии ГПП-1Р и ГИП-Р и секреции инсулина, исследовали эффекты соединений на секрецию инсулина островками грызунов дикого типа.

25 После общепринятого канюлирования желчного протока самцов мышей C57Bl/6 (22 – 26 г) или самцов крыс Спрег-Доули (приблизительно 250 г) поджелудочную железу наполняли буфером Хэнкса (3 мл для мышей или 10 мл для крыс, содержащим 2% БСА и

0,75 мг/мл коллагеназы Clzyme (VitaCyte)). Затем ткани расщепляли в буфере Хэнкса при температуре 37°C в течение 11–13 минут (мышь) или 14 – 16 минут в случае поджелудочной железы крыс. Очищенные островки (градиент Histopaque-1100 [Sigma-Aldrich], 18 мин. при 750х ускорении силы тяжести) культивировали в течение ночи в среде RPMI-1640 (Invitrogen), содержащей 10% ЭБС, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и прекондиционировали посредством выращивания в минимальном сбалансированном солевом растворе Эрла (EBSS) с добавлением 0,1% БСА и 2,8 мМ глюкозы. Затем островки инкубировали в EBSS (Invitrogen) с добавлением 0,1% БСА, 2,8 – 11,2 мМ глюкозы и увеличивающихся уровней соединения (6 серий по 4 островка/условие).

В качестве положительного контроля использовали ГПП-1(7-36)амид (30 нМ). Инсулин измеряли в течение 90 минут в супернатанте с применением анализа инсулина MSD (Meso Scale, Гейтерсберг, Мериленд).

Определенные соединения согласно настоящему изобретению дозозависимым образом увеличивали секрецию инсулина как островками мышей, так и островками крыс, что отражено в таблице 5.

Таблица 5. Секреция инсулина островками грызунов

Секреция инсулина островками крыс		
Соединение	Средняя ED50 (нМ)	N
Пример 3	34,9	2
Пример 1	15,5	3
Секреция инсулина островками мышей		
Соединение	Средняя ED50 (нМ)	N
Пример 3	58,9	2
Пример 6	51,4	1
Пример 7	11,3	1
Пример 4	3,5	1
Пример 2	30,0	1
Пример 1	47,2	2

Составление профиля иммуногенности

Риск иммуногенности соединений согласно настоящему изобретению оценивали с применением программ прогнозирования *in silico*, в частности, анализа *in silico* EpiVax. Риск иммуногенности соединений согласно настоящему изобретению также оценивали посредством способа измерения ответов культивируемых Т клеток *ex vivo* (поглощение ³H-тимидина и секреция цитокина ИЛ-2) в присутствии соединений согласно настоящему изобретению.

С применением иммуноинформатических инструментов EpiVax проводили оценку соединений согласно настоящему изобретению *in silico* для прогнозирования иммунного ответа после введения. В анализе использовали вероятность того, что 9-мерная рамка свяжется с конкретным аллелем лейкоцитарного антигена человека (HLA), с последующим определением данных Epi-Var. Для соединения согласно примеру 1 показатель EpiMatrix, составляющий приблизительно +1,13, свидетельствует о значительно меньшей способности вызывать иммунный ответ по сравнению с нативным пептидным скелетом ГИП, показатель EpiMatrix которого составил + 15,4. Пример коагониста ГИП/ГПП-1 согласно международной публикации WO 2011/119657 характеризовался показателем + 29,5.

Также определяли степень прогнозируемой клинической иммуногенности соединений согласно настоящему изобретению посредством характеристики пролиферации CD4+ Т-клеток и секреции цитокина ИЛ-2 на когорте из 50 здоровых доноров, репрезентативных для мировой популяции аллотипов HLA. Определенные соединения согласно настоящему изобретению продемонстрировали степень стимуляции Т-клеток и секреции ИЛ-2 после воздействия, которая не превышала порог, свойственный известным или положительным иммуногенным соединениям, что свидетельствует о низком риске вызова клинической иммуногенности.

20

Фармакокинетика

Фармакокинетика на яванских макаках.

Фармакокинетические свойства соединений согласно настоящему изобретению *in vivo* демонстрировали на яванских макаках. Соединения вводили в виде однократной внутривенной или подкожной дозы (0,2 мг/кг) в 20 мМ цитратном буфере (pH 7,0) в объеме 0,21 мл/кг. От каждого животного отбирали кровь в моменты времени 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 204, 240 и 312 часов после введения. Концентрации соединений согласно настоящему изобретению в плазме определяли методом ЖХ/МС. Вкратце, соединение согласно настоящему изобретению экстрагировали из 100% образца плазмы обезьяны (50 мкл), разведенного 1X ФБР, фосфатным буферным раствором (150 мкл) и смешивали с N-бутанолом (400 мкл). Образовывалось три различных слоя жидкости, причем соединение находилось в верхнем слое. Объем 200 мкл переносили в 96-луночный планшет с v-образным дном, лиофилизировали с применением нагретого газообразного азота и восстанавливали в 100 мкл 30% ацетонитрила/0,1% муравьиной кислоты. 20 мкл восстановленного образца инжесктировали в колонку Supelco Analytical Discovery bio wide

C5 3 мкм. Элюат колонки направляли на масс-спектрометр Thermo Q-Exactive для обнаружения и количественного определения.

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано в данном анализе, средняя максимальная концентрация соединения согласно примеру 1 в плазме была достигнута приблизительно через 8 часов после подкожного введения дозы. Средний период полужизни составлял 55 часов, и средний клиренс составлял 0,73 мл/ч/кг. Биодоступность составила приблизительно 83%. Полученные данные подтверждают возможность введения доз соединения согласно примеру 1 один раз в неделю. Данные для другого соединения согласно настоящему изобретению обобщены в таблице 6.

10

Таблица 6: Средние фармакокинетические параметры после введения однократной подкожной дозы 0,2 мг/кг самцам яванских макаков

Соединение	Средний $T_{1/2}$ (ч)	Среднее T_{max} (ч)	Средняя C_{max} (мкг/мл)	Средняя $AUC_{0-беск.}$ (ч*мкг/мл)	Среднее CL/F (мл/ч/кг)
Пример 3	34	8	3,0	153	1,3
Пример 7	31	6	2,9	136	1,5
Пример 6	23	4	2,2	72,3	2,8
Пример 8	23	10	1,0	42,8	4,7
Пример 2	43	24	2,1	173	1,2

$n = 2$, $AUC_{0-беск.}$ = площадь под кривой (area under the curve) от 0 до бесконечности, CL/F = клиренс / биодоступность, T_{max} = время до достижения максимальной концентрации, C_{max} = максимальная концентрация в плазме, $T_{1/2}$ = период полужизни.

15

Прогнозирование активности дозы

Внутривенный тест толерантности глюкозы (ВТТГ) на крысах использовали для определения относительной активности соединений согласно настоящему изобретению по сравнению с семаглутидом. Крысам вводили однократные подкожные (п.к.) дозы 0,1 – 10 нмоль/кг каждого соединения, и через 16 часов после введения каждой крысе вводили ВТТГ. Во время ВТТГ проводили измерение экспозиции, и для моделирования экспозиции-отклика в качестве первичной конечной точки использовали AUC инсулина в ответ на ВТТГ.

25

Для сравнения профилей экспозиции-отклика соединения согласно примеру 1 и семаглутида использовали модель E_{max} . В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано в данном анализе, экспозиция являлась по существу такой же для соединения согласно примеру 1 и семаглутида для уровней доз, которые характеризовались уровнями лекарственного препарата выше предела количественного определения анализа. Оба набора

данных аппроксимировали одновременно, и значения E_0 и E_{max} ограничивали, чтобы они являлись одинаковыми для обоих соединений. Лишь значения ED_{50} соединений аппроксимировали по отдельности. Значение ED_{50} семаглутида было оценено как 0,6 +/- 0,2 нмоль/кг. Активность соединения согласно примеру 1, которую оценивали как относительную активность по сравнению с семаглутидом, являлась в 1,7 +/- 0,6 раз выше активности семаглутида. При корректировке с учетом различий CL/F (кажущегося клиренса) двух молекул у обезьян, а также различий молекулярной массы, прогнозируемая средняя эквивалентная доза соединения согласно примеру 1 к 1 мг семаглутида у человека составляет приблизительно 1,3 мг/неделю.

10

Диабет 2 типа

Секреция инсулина после внутривенного введения глюкозы (ВТТГ) у крыс *in vivo*

Самцов крыс Вистар (Harlan Labs, Индианаполис, Индиана) рандомизировали в зависимости от массы тела и вводили дозы 1,5 мл/кг п.к. за 16 часов до введения глюкозы, после чего содержали натощак. Дозы представляли собой наполнитель, 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 нмоль/кг. Животных взвешивали, а затем проводили анестезию с применением фенобарбитала натрия (раствор нембутала натрия; Ovation Pharmaceuticals), который вводили и.п. (интраперитонеально, 65 мг/кг, 30 мг/мл). Образец крови в момент времени ноль отбирали в пробирки с EDTA, после чего вводили глюкозу (0,5 мг/кг, 5 мл/кг). Образцы крови отбирали в моменты времени 2, 4, 6, 10, 20 и 30 минут после введения глюкозы. Уровни глюкозы в плазме определяли с применением анализатора Hitachi (Roche), и инсулин в плазме измеряли посредством анализа инсулина MSD (Meso Scale, Гейтерсберг, Мериленд).

Как показано в таблице 7, определенные соединения согласно настоящему изобретению дозозависимым образом усиливали секрецию инсулина после в.в. (внутривенной) инъекции глюкозы. ED_{50} для инсулина и максимальное увеличение секреции инсулина (измеренное как площадь под кривой инсулина) приведены в таблице 7.

30 **Таблица 7. Увеличение секреции инсулина в анализе ВТТГ на крысах**

Соединение	ED_{50} (нмоль/кг)	% максимального увеличения AUC инсулина
Пример 3	1,00	314 +/- 38%
Пример 3	1,42	219 +/- 19%
Пример 6	2,58	289 +/- 4%
Пример 7	4,33	335 +/- 35%
Пример 7	1,10	278 +/- 26%

Пример 8	6,13	324 +/- 30%
Семаглутид	0,70	231 +/- 13%
Пример 2	1,62	233 +/- 19%
Пример 1	0,87	298 +/- 17%
Пример 5	1,02	349 +/- 39%

Эффект на снижение массы тела, композиционный состав тела и стеатоз печени на мышцах с алиментарным ожирением (DIO)

5 Эффекты соединений согласно настоящему изобретению на снижение массы тела, композиционный состав тела и стеатоз печени на мышцах DIO (diet-induced obese, с алиментарным ожирением) оценивали на мышцах C57/BL6 DIO. У данных животных, несмотря на то, что они не страдали от диабета, наблюдалась резистентность к инсулину, дислипидемия и стеатоз печени, которые являются характеристиками метаболического

10 синдрома, после перехода на рацион с высоким содержанием жиров (60% ккал от жиров) в течение 12 недель.

 В данном исследовании использовали самцов мышей C57/BL6 в возрасте 23 – 24 недель с алиментарным ожирением (DIO), масса тела каждого из которых составляла 41 – 49 г и исходная масса жира варьировала в диапазоне 10,5 – 17,5 г. Животных содержали по

15 отдельности в помещении с контролируемой температурой (24°C) и 12-часовым циклом света/темноты (включение света в 22:00); животные имели свободный доступ к пище и воде. Через 2 недели акклиматизации в помещении мышей рандомизировали на группы лечения (n=5/группу) на основании массы тела так, чтобы каждая группа характеризовалась подобной исходной средней массой тела.

20 Контроль (наполнитель), соединения согласно настоящему изобретению (в дозах, варьирующих от 10 до 100 нмоль/кг) или аналог ГПП-1 длительного действия семаглутид (30 нмоль/кг), растворенный в наполнителе (20 мМ цитратном буфере, pH 7,0) вводили мышам DIO, которые получали пищу без ограничений, посредством п.к. инъекции за 30 – 90 минут до начала цикла темноты один раз в три дня в течение 15 дней. Подкожные

25 инъекции вводили в дни 1, 4, 7, 10 и 13. Ежедневно в течение всего исследования измеряли массу тела и потребление пищи. Абсолютные изменения массы тела рассчитывали посредством вычитания массы тела того же животного перед первой инъекцией соединения. В дни 0 и 14 измеряли общую массу жира методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с применением инструмента Echo Medical System (Хьюстон, Техас).

30 В день 15 с применением глюкометра Accu-Chek (Roche) измеряли уровень глюкозы в крови из хвостовой вены, а затем животных умерщвляли, и печень отбирали и

замораживали. Триглицериды печени определяли в гомогенатах печени, отобранных после умерщвления, и уровень холестерина в плазме измеряли на клиническом анализаторе Hitachi Modular P. Статистические сравнения между группами проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением критерия множественного сравнения Даннета. ED₅₀ для снижения массы тела определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism с применением инструмента для нелинейной подгонки.

В экспериментах, которые проводили по существу так же, как описано в данном анализе, определенные соединения согласно настоящему изобретению дозозависимым образом уменьшали массу тела и массу жира (таблица 8 – 13); данные соединения могут являться в 3 – 5 раз более эффективными при снижении массы тела по сравнению с семаглутидом. ED₅₀ соединения согласно примеру 1 для процента снижения массы тела составляет 5,422 нмоль/кг (уровни 95% доверительного интервала [нмоль/кг] = 2,2 к 13,6). Было установлено, что уменьшение массы тела в первую очередь являлось следствием уменьшения массы жира.

Таблица 8. Процент изменения массы тела или массы жира у мышей DIO.

Лечение	Доза (нмоль/кг)	% изменения исходной массы тела	% изменения исходной массы жира
Контроль	0	-3,14 ± 0,88	-4,84 ± 1,79
Семаглутид	10	-12,36 ± 1,00****	-18,21 ± 2,24**
Семаглутид	30	-14,20 ± 1,01****	-21,90 ± 2,07****
Семаглутид	100	-19,30 ± 1,38****	-33,51 ± 3,30****
Пример 3	10	-13,38 ± 0,88****	-20,76 ± 2,42****
Пример 3	30	-18,13 ± 1,44****	-30,90 ± 2,06****
Пример 3	100	-25,84 ± 1,93****	-45,92 ± 2,15****
Пример 6	10	-15,31 ± 1,25****	-24,75 ± 1,89****
Пример 6	30	-21,62 ± 0,92****	-36,30 ± 2,47****
Пример 6	100	-33,95 ± 1,93****	-64,64 ± 4,04****

p<0,01, *p<0,001, ****p<0,0001 из контрольной группы (однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета). Результаты выражены в виде среднего \pm СОС для 5 мышей на группу.

5 **Таблица 9. Процент изменения массы тела или массы жира у мышей ДЮ.**

Лечение	Доза (нмоль/кг)	% изменения исходной массы тела	% изменения исходной массы жира
Контроль	0	-0,74 \pm 1,49	3,04 \pm 3,65
Семаглутид	30	-17,03 \pm 0,98****	-35,94 \pm 4,09****
Пример 2	10	-23,27 \pm 1,72****	-49,89 \pm 5,62****
Пример 2	30	33,07 \pm 1,65****	-72,80 \pm 4,04****
Пример 2	100	-34,66 \pm 1,80****	-76,20 \pm 3,78****
Пример 5	10	-23,42 \pm 1,43****	-51,28 \pm 1,89****
Пример 5	30	-26,84 \pm 3,14****	-62,77 \pm 5,49****
Пример 5	100	-37,86 \pm 2,25****	-81,08 \pm 1,68****
Пример 1	10	-25,18 \pm 1,82****	-50,98 \pm 2,87****
Пример 1	30	-26,58 \pm 2,49****	-59,98 \pm 6,60****
Пример 1	100	-38,14 \pm 1,67****	-79,79 \pm 3,10****

****p<0,0001 из контрольной группы (однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета). Результаты выражены в виде среднего \pm СОС для 5 мышей на группу.

10 **Таблица 10. Процент изменения массы тела или массы жира у мышей ДЮ.**

Лечение	Доза (нмоль/кг)	% изменения исходной массы тела	% изменения исходной массы жира
Контроль	0	-2,43 \pm 2,06	-1,49 \pm 3,69
Пример 6	10	-17,54 \pm 1,17****	-34,30 \pm 1,20****
Пример 6	30	-19,52 \pm 1,18****	-39,52 \pm 3,18****

Пример 6	100	-29,36 ± 2,62****	-56,66 ± 4,96****
Пример 7	10	-15,08 ± 1,22****	-26,46 ± 2,31***
Пример 7	30	-20,70 ± 1,95****	-43,49 ± 5,47****
Пример 7	100	-24,36 ± 2,06****	-49,92 ± 3,40****
Пример 8	10	-17,13 ± 0,81****	-34,20 ± 1,62****
Пример 8	30	-25,27 ± 0,70****	-54,24 ± 2,35****
Пример 8	100	-29,91 ± 2,03****	-65,23 ± 6,69****

****p<0,001 из контрольной группы (однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета).

Результаты выражены в виде среднего ± СОС для 5 мышей на группу.

Таблица 11. Уровень глюкозы в крови, холестерина в плазме и триглицеридов в плазме у мышей ДЮ.

5

Лечение	Доза (нмоль/кг)	Глюкоза в крови (мг/дл)	Холестерол в плазме (мг/дл)	Триглицериды в плазме (мг/дл)
Контроль	0	141,6 ± 5,59	303,2 ± 13,97	54,2 ± 11,14
Семаглутид	10	147,6 ± 6,13	226,8 ± 13,86**	27,36 ± 3,56*
Семаглутид	30	146,8 ± 8,43	229,8 ± 10,96**	27,9 ± 6,01*
Семаглутид	100	134,3 ± 9,22	218,4 ± 18,70**	36,46 ± 5,34
Пример 3	10	109,5 ± 2,35****	213,2 ± 15,54****	30,38 ± 8,23
Пример 3	30	107,6 ± 1,32****	177,4 ± 16,58****	21,32 ± 2,48**
Пример 3	100	102,00 ± 0,50****	194,00 ± 14,40****	20,55 ± 4,60**
Пример 6	10	105,8 ± 2,10****	198,4 ± 6,76****	20,78 ± 4,40**
Пример 6	30	100,1 ± 3,29****	186,4 ± 17,04****	26,12 ± 6,85*
Пример 6	100	103,6 ± 3,20****	151,4 ± 14,32****	17,26 ± 1,67****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 из контрольной группы (однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета). Результаты выражены в виде среднего ± СОС для 5 мышей на группу.

Таблица 12. Уровень глюкозы в крови, холестерина в плазме и триглицеридов в печени у мышей DIO.

Лечение	Доза (нмоль/кг)	Глюкоза в крови (мг/дл)	Холестерол в плазме (мг/дл)	Триглицериды в печени (мг/г ткани)
Контроль	0	144,30 ± 8,16	233,6 ± 12,99	206,65 ± 29,47
Семаглутид	30	136,3 ± 3,81	161,0 ± 13,92***	67,63 ± 23,40*****
Пример 2	10	110,8 ± 3,87**	121,8 ± 13,64*****	60,77 ± 13,24*****
Пример 2	30	110,8 ± 3,20**	114,00 ± 9,70*****	65,78 ± 17,07*****
Пример 2	100	113,2 ± 4,86**	109,4 ± 8,83*****	56,74 ± 17,76*****
Пример 5	10	111,00 ± 6,56**	126,6 ± 9,67*****	48,30 ± 8,14*****
Пример 5	30	104,5 ± 5,30***	108,2 ± 13,84*****	39,60 ± 4,71****
Пример 5	100	105,3 ± 6,16***	108,6 ± 4,83*****	67,96 ± 13,53*****
Пример 1	10	102,3 ± 5,59*****	120,6 ± 8,55*****	60,74 ± 5,33*****
Пример 1	30	110,7 ± 5,85**	118,2 ± 10,11*****	45,24 ± 5,87*****
Пример 1	100	106,7 ± 7,33***	107,6 ± 10,43*****	66,98 ± 17,29*****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 из контрольной группы (однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета). Результаты выражены в виде среднего ± СОС для 5 мышей на группу.

Таблица 13. Уровни глюкозы в крови и холестерина в плазме у мышей DIO.

Лечение	Доза (нмоль/кг)	Глюкоза в крови (мг/дл)	Холестерол в плазме (мг/дл)
Контроль	0	152,4 ± 3,63	243,6 ± 13,12
Пример 6	10	121,4 ± 2,74***	167,8 ± 15,59*****

Пример 6	30	121,9 ± 6,65**	159,8 ± 9,99*****
Пример 6	100	116,1 ± 4,67*****	144,2 ± 7,12*****
Пример 7	10	113,6 ± 4,16*****	161,8 ± 6,2*****
Пример 7	30	114,7 ± 4,70*****	153,6 ± 13,47*****
Пример 7	100	114 ± 2,36*****	145,4 ± 9,48*****
Пример 8	10	114,7 ± 4,61*****	158,8 ± 7,57*****
Пример 8	30	117,1 ± 8,26***	139,4 ± 6,83*****
Пример 8	100	125,4 ± 6,30**	127,8 ± 6,34*****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 из контрольной группы (однофакторный анализ ANOVA, критерий Даннета). Результаты выражены в виде среднего ± СОС для 5 мышей на группу.

5 Эффект на энергетический метаболизм у мышей DIO

Эффекты соединений согласно настоящему изобретению на энергетический метаболизм мышей DIO оценивали на самцах мышей C57/Bl6 DIO в возрасте 26 недель массой тела 43 – 50 г. Мышей содержали по отдельности в помещении с контролируемой температурой (24°C) и 12-часовым циклом света/темноты (включение света в 22:00); животные имели свободный доступ к пище TD95217 (Teklad) и воде. Через 2 недели акклиматизации в помещении мышей рандомизировали на группы лечения (n=6/группу) на основании массы тела так, чтобы каждая группа характеризовалась сравнимой исходной средней массой тела. Животных помещали в калориметр PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Честерфилд, Миссури) на 3 дня для акклиматизации. Контроль (наполнитель) (20 мМ цитратный буфер, рН 7,0, 10 мл/кг), соединения согласно настоящему изобретению или аналог ГПП-1 длительного действия семаглутид (30 нмоль/кг) вводили мышам DIO, которые получали пищу без ограничений, подкожно за 30 – 90 минут до начала цикла темноты один раз в три дня в течение 22 дней. Количество тепла и дыхательный коэффициент (RER) измеряли методом непрямой калориметрии, как описано, с применением калориметрической системы открытого цикла. RER представляет собой соотношение объема выделенного CO₂ (V_{CO2}) к объему потребленного O₂ (V_{O2}). Количество тепла рассчитывали на основании полной массы тела, учитывая:

$$VO_2 = \text{ПотокМЛ} * (V_1 + V_2) / N_2 \text{Номин.} * \text{Масса животного} * 100$$

$$VCO_2 = \text{ПотокМЛ} * dCO_2 / \text{Масса животного} * 100$$

$$\text{Количество тепла} = (CVO_2 * VO_2 + CVCO_2 * VCO_2) / 1000;$$

$$\text{где } CVO_2 = 3,941; CVCO_2 = 1,106$$

В экспериментах, которые проводили по существу так же, как описано в данном анализе, у мышей, которые получали соединение согласно примеру 1, значительно увеличивался уровень метаболизма – на 10 – 15 % по сравнению с контрольной группой, начиная с недели 2, и данный эффект сохранялся в течение периода лечения. Семаглутид, однако, не оказывал эффекта на уровень метаболизма. Увеличение уровня метаболизма в случае соединения согласно примеру 1 частично объясняется дополнительным снижением массы тела, которое наблюдалось при лечении соединением согласно примеру 1, по сравнению с лечением семаглутидом.

Эффект на эвакуацию содержимого из желудка у мышей DIO

Эффекты соединений согласно настоящему изобретению на эвакуацию содержимого из желудка у мышей DIO оценивали на самцах мышей с алиментарным ожирением (DIO) в возрасте 23 недель (Harlan). Мышей держали натошак в течение 16 – 17 часов. В начале периода натошак мышам подкожно вводили контроль – наполнитель (20 мМ цитратный буфер, pH 7,0); возрастающие дозы соединений согласно настоящему изобретению (3, 10, 30 и 100 нмоль/кг) или аналог ГПП-1 длительного действия семаглутид (30 нмоль/кг). На следующий день мышам с помощью перорального зонда вводили 0,5 мл (0,5 грамм) свежеприготовленного полужидкого корма (с интервалом в две минуты). В данное время воду убирали, чтобы предотвратить разбавление вводимого корма. Через два часа после введения корма мышей умерщвляли с интервалом в две минуты с применением газообразного CO₂. Желудок удаляли и зажимали со стороны кардиального и пилорического отверстия, после чего зажимы удаляли, и полный желудок взвешивали на блюде весов. Затем желудок надрезали, и содержимое удаляли. Желудок промывали, высушивали и повторно взвешивали, чтобы оценить содержание пищи в желудке. % эвакуации содержимого из желудка равен $100 \times (1 - (\text{пища, оставшаяся в желудке} / \text{пища, введенная пероральным путем}))$.

В экспериментах, которые проводили по существу так же, как описано в данном анализе, соединение согласно примеру 1 дозозависимым образом замедляло степень эвакуации полужидкого корма из желудка. Максимальное ингибирование эвакуации содержимого из желудка наблюдалось при дозе 10 нмоль/кг +/- доза (таблица 14).

Таблица 14. Эвакуация полужидкого корма из желудка мышей C57/BL6 DIO натошак.

<i>Лечение</i>	<i>Доза (нмоль/кг)</i>	<i>Процент эвакуации содержимого из желудка (среднее ± СОС)</i>
Наполнитель (n=5)	0	69,50 +/- 6,60
Семаглутид (n=5)	30	30,56 +/- 7,53**
Пример 1 (n=4)	3	49,11 +/- 8,52
Пример 1 (n=5)	10	9,76 +/- 7,69****
Пример 1 (n=5)	30	26,53 +/- 8,14**
Пример 1 (n=5)	100	18,45 +/- 6,87***

Статистические сравнения между группами проводили с применением однофакторного анализа ANOVA с последующим использованием критерия множественного сравнения Даннета. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 из контрольной группы. Результаты выражены в виде среднего +/- СОС для 4 – 5 мышей на 5 группу.

Измерение кортикостерона в плазме крыс Спрег-Доули

Как предполагают в определенных опубликованных исследованиях, увеличение уровней кортикостерона в плазме является свидетельством возможной пониженной 10 переносимости аналогов ГИП и ГПП-1. Уровни кортикостерона в плазме оценивали на крысах Спрег-Доули (Harlan, Indianapolis) массой тела приблизительно 220 г. Животных акклиматизировали в течение по меньшей мере 72 часов перед проведением манипуляций. Затем крысам вводили дозы наполнителя (20 мМ цитратный буфер, рН 7), семаглутида (10 15 нмоль/кг) или соединений согласно настоящему изобретению в концентрациях 3, 10 или 30 нмоль/кг п.к., по 8 крыс на группу дозы. Через 16 часов крысам проводили декаптацию. Кровь отбирали в пробирки с EDTA на льду, а затем центрифугировали в течение 5 минут при 8000 об./мин. на настольной центрифуге Eppendorf 5402. Плазму хранили при температуре -80°C до проведения анализа.

Для анализа кортикостерона получали стандарты кортикостерона (Sigma, 27840) 20 посредством серийного разведения в метаноле степени чистоты для ВЭЖХ, H₂O и добавления 5% очищенной на активированном угле сыворотки крысы (Bioreclamation, RATSRM-STRPD-HEV). Образцы плазмы крыс разводили ФБР, преципитировали холодным метанолом, инкубировали в течение 20 минут при температуре -20° С, а затем центрифугировали при 14000 об./мин. на центрифуге Eppendorf 5417R при температуре 25 4°C. Супернатанты экстрагировали, выпаривали в потоке газообразного N₂ и восстанавливали в растворе MeOH/H₂O (1:1). Образцы анализировали на приборе ЖХ/МС,

оснащенном колонкой для ВЭЖХ XSelect CSH C18, 3,5 мкм (2,1 мм x 30 мм) (Waters, №186005254).

В экспериментах, проведенных по существу так же, как описано в данном анализе, соединение согласно примеру 1 продемонстрировало отсутствие увеличения уровней кортикостерона в плазме при любых исследованных дозах, тогда как семаглутид характеризовался увеличением приблизительно в 4 раза по сравнению с контролем.

Таблица 15: Анализ кортикостерона в плазме крыс Спрег-Доули

Соединение	Кортикостерон (нг/мл)	
	Среднее	СОС
Наполнитель	60,78	8,41
10 нмоль/кг семаглутида	274,57	42,06
3 нмоль/кг соединения согласно примеру 1	52,21	19,39
10 нмоль/кг соединения согласно примеру 1	32,46	9,78
30 нмоль/кг соединения согласно примеру 1	31,35	5,86

Аминокислотные последовательности

SEQ ID NO: 1 (ГИП человека)

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKГKKNNDWKHNITQ

5 SEQ ID NO: 2 (ГПП-1 человека)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

SEQ ID NO: 3

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

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

15 SEQ ID NO: 4

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

SEQ ID NO: 5

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

25 где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

30 SEQ ID NO: 6

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

35 где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

SEQ ID NO: 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS,

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

SEQ ID NO: 8

10 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

15 где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

SEQ ID NO: 9

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

20 где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

25 SEQ ID NO: 10

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

30 где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ представляет собой 1-Nal; и С-концевая аминокислота является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

SEQ ID NO: 11

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS,

где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой Aib; К в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H где a равен от 1 до 2, и b равен от 10 до 20; X_3 представляет собой Phe или 1-Nal; и С-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме С-концевого первичного амида.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ

<120> СОЕДИНЕНИЯ-КОАГОНИСТЫ ГИП И ГПП-1

<130> X20448

<150> 62/101488

<151> 2015-01-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
1 5 10 15

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
35 40

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
the epsilon-amino group of the K side-chain with
([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2
H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 3

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 4
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
 the epsilon-amino group of the K side-chain with
 ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)18-CO2
 H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 4

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
the epsilon-amino group of the K side-chain with
([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)16-CO2
H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 5

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 6
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)16-CO2H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 6

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)18-CO2H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 7

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)16-CO2H

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 8

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
the epsilon-amino group of the K side-chain with
([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)16-CO2
H

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)
<223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 9

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
the epsilon-amino group of the K side-chain with
([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2
H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 10

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
the epsilon-amino group of the K side-chain with
([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H
wherein a is 1 to 2 and b is 10 to 20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is either Phe or 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is optionally amidated as a C-terminal primary amide

<400> 11

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, представляющего собой коагонист рецепторов глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП) и глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), формулы:

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAX_3VQWLIAGGPSSGAPPPS;$

где

X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой Aib;

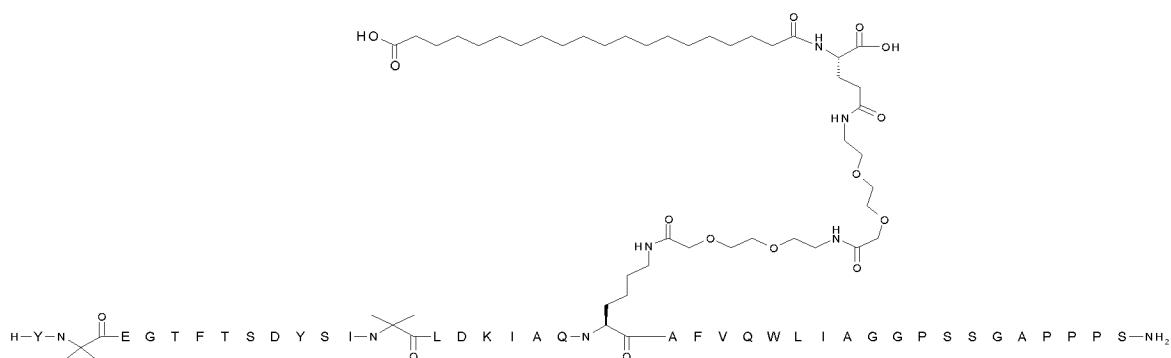
K в положении 20 является химически модифицированным посредством конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи K с ([2-(2-амино-этоксид)-этоксид]-ацетил) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H, где a равен от 1 до 2, и b равен от 10 до 20;

X_3 представляет собой Phe или 1-Nal;

и С-концевая аминокислота необязательно является амидированной в форме С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 11),

или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, для лечения ожирения.

2. Применение соединения, представляющего собой коагонист рецепторов глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП) и глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), формулы:



или фармацевтически приемлемой соли указанного соединения, для лечения ожирения.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X20448	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2016/012124	International filing date (<i>day/month/year</i>) 5 January 2016 (05-01-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 9 January 2015 (09-01-2015)	
Applicant ELI LILLY AND COMPANY			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
- a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
 - as suggested by the applicant
 - as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 - as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/012124

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/012124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/575 C07K14/605 A61K38/26
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/164483 A1 (ZEALAND PHARMA AS [DK]) 7 November 2013 (2013-11-07) abstract paragraphs [0005] - [0020], [0078] sequences 4, 30	1-19
A	WO 2012/088379 A2 (MARCADIA BIOTECH INC [US]; VIGNATI LOUIS [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]) 28 June 2012 (2012-06-28) abstract paragraphs [0008] - [0013] sequence 115	1-19
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 14 April 2016	Date of mailing of the international search report 25/04/2016
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Chavanne, Franz
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/012124

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GREEN B D ET AL: "STRUCTURALLY MODIFIED ANALOGUES OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1) AND GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC POLYPEPTIDE (GIP) AS FUTURE ANTIDIABETIC AGENTS", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 10, no. 29, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 3651-3662, XP009068381, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/1381612043382774 the whole document -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/012124

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2013164483	A1	07-11-2013	AR 090937 A1 17-12-2014		
			AU 2013255751 A1 18-12-2014		
			CA 2872314 A1 07-11-2013		
			CN 104470948 A 25-03-2015		
			EA 201491918 A1 30-07-2015		
			EP 2844669 A1 11-03-2015		
			HK 1208232 A1 26-02-2016		
			JP 2015517459 A 22-06-2015		
			KR 20150003910 A 09-01-2015		
			PH 12014502452 A1 02-02-2015		
			SG 11201407137P A 27-11-2014		
			TW 201348252 A 01-12-2013		
			US 2015299281 A1 22-10-2015		
			WO 2013164483 A1 07-11-2013		

WO 2012088379	A2	28-06-2012	AR 084558 A1 22-05-2013		
			AU 2011348202 A1 04-07-2013		
			CA 2822617 A1 28-06-2012		
			CN 103402536 A 20-11-2013		
			EP 2654774 A2 30-10-2013		
			JP 2014501762 A 23-01-2014		
			KR 20140020851 A 19-02-2014		
			NZ 611878 A 27-02-2015		
			RU 2013133803 A 27-01-2015		
			SG 191252 A1 31-07-2013		
			US 2014018291 A1 16-01-2014		
			WO 2012088379 A2 28-06-2012		
