

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034322**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.28

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

(21) Номер заявки
201690494

(22) Дата подачи заявки
2014.10.17

(54) **АЦИЛИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ ГЛЮКАГОНА**

(31) **61/892,256**

(56) **WO-A1-2014041195**
WO-A2-2013092703
WO-A1-2012098462
WO-A1-2011160633
WO-A2-2011160630

(32) **2013.10.17**

(33) **US**

(43) **2016.09.30**

(86) **PCT/EP2014/072293**

(87) **WO 2015/055801 2015.04.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗИЛЭНД ФАРМА А/С (DK);
БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Рибер Дитте, Толборг Якоб Линд
(DK), Хампрехт Дитер Вольфганг,
Рист Вольфганг (DE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении предложены материалы и способы для лечения ожирения и избыточного веса, диабета и других сопутствующих нарушений обмена веществ. В частности, в изобретении предложены новые ацилированные пептидные аналоги глюкагона, эффективные в таких способах. Указанные пептиды могут опосредовать свое действие благодаря более высокой селективности по отношению к рецептору GLP-1 по сравнению с глюкагоном человека.

B1

034322

034322

B1

Область техники

Изобретение относится к ацилированным аналогам глюкагона и их медицинскому применению, например, при лечении ожирения и избыточного веса, диабета и других нарушений обмена веществ.

Уровень техники

Препроглюкагон представляет собой полипептид-предшественник из 158 аминокислот, который в тканях избирательно подвергается процессингу с образованием ряда структурно родственных производных пептидов проглюкагона, включая глюкагон (Glu), глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1), глюкагон-подобный пептид-2 (GLP-2) и оксинтомодулин (ОХМ). Эти молекулы участвуют в широком спектре физиологических процессов организма, включая поддержание гомеостаза глюкозы, секрецию инсулина, опорожнение желудка и рост кишечника (intestinal growth), а также регуляцию потребления пищи.

Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, который соответствует 53-81 аминокислотам препроглюкагона. Оксинтомодулин (ОХМ) представляет собой пептид из 37 аминокислот, который включает в себя полную 29 аминокислотную последовательность глюкагона с удлиняющим сегментом из октапептида на карбоксиконце (с 82 по 89 аминокислоту препроглюкагона, и называется "промежуточный пептид 1" или IP-1. Основной биологически активный фрагмент GLP-1 образуется в виде пептида из 30 аминокислот, амидированного по С-концу, который соответствует с 98 по 127 аминокислоту препроглюкагона.

Глюкагон способствует поддержанию уровня глюкозы в крови путем связывания с рецепторами глюкагона на поверхности гепатоцитов, приводя к высвобождению глюкозы в печени посредством гликогенолиза, которая была запасена в форме гликогена. При истощении запасов гликогена глюкагон стимулирует дополнительный синтез глюкозы в печени посредством глюконеогенеза. Глюкоза поступает в кровотоки, предотвращая развитие гипогликемии.

GLP-1 снижает повышенный уровень глюкозы в крови за счет улучшения стимулированной глюкозой секреции инсулина и способствует снижению массы тела, главным образом за счет уменьшения потребления пищи.

ОХМ высвобождается в кровь в ответ на прием пищи и пропорционально содержанию калорий в пище. Было показано, что ОХМ подавляет аппетит и подавляет потребление пищи у людей (Cohen et al., *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 88, 4696-4701, 2003; WO 2003/022304). В дополнение к этим анорексигенным эффектам, которые подобны GLP-1, ОХМ должен также влиять на массу тела посредством других механизмов, так как крысы, обработанные оксинтомодулином, показывали меньший прирост массы тела, чем крысы, получавшие такое же кормление (Bloom, *Endocrinology* 2004, 145, 2687). Обработка грызунов с ожирением при помощи ОХМ также повышает их устойчивость к глюкозе (Parlevliet et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 294, E142-7, 2008) и подавляет увеличение массы тела (WO 2003/022304).

ОХМ активирует рецептор глюкагона и рецептор GLP-1, при этом является в 2 раза более эффективным по отношению к рецепторам глюкагона, чем к рецепторам GLP-1, но менее эффективным, чем нативный глюкагон и GLP-1 по отношению к их соответствующим рецепторам. Глюкагон человека также способен активировать оба рецептора, хотя и с большим предпочтением к рецептору глюкагона, чем к рецептору GLP-1. С другой стороны, GLP-1 не способен активировать рецепторы глюкагона. Механизм действия оксинтомодулина до конца не ясен. В частности, неизвестно, опосредуются ли некоторые из экстрагепатических эффектов этого гормона через рецептор GLP-1 и рецептор глюкагона, или же через один или более неидентифицированных рецепторов.

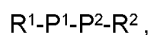
Как было показано, другие пептиды связываются и активируют как рецептор глюкагона, так и рецептор GLP-1 (Hjort et al., *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30121-30124, 1994), а также подавляют увеличение массы тела и уменьшают потребление пищи (см., например, WO 2006/134340, WO 2007/100535, WO 2008/10101, WO 2008/152403, WO 2009/155257, WO 2009/155258, WO 2010/070252, WO 2010/070253, WO 2010/070255, WO 2010/070251, WO 2011/006497, WO 2011/160630, WO 2011/160633, WO 2013/092703, WO 2014/041195).

Ожирение является глобально нарастающей проблемой здоровья человека, ассоциированной с различными заболеваниями, в частности с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), сахарным диабетом 2 типа, синдромом обструктивного апноэ во сне, некоторыми видами рака и остеоартритом. Как следствие, ожирение приводит к снижению продолжительности жизни. В соответствии с оценками Всемирной организации здравоохранения от 2005 г. во всем мире 400 миллионов взрослых (в возрасте > 15 лет) можно рассматривать как страдающих ожирением. В настоящее время в США ожирение считается второй после курения лидирующей причиной смерти, которую можно предотвратить.

Рост ожирения вызывает увеличение заболеваемости диабетом, и примерно 90% людей, страдающих сахарным диабетом 2 типа, можно рассматривать как страдающих ожирением. В мире 246 миллионов человек страдают диабетом, и по оценкам к 2025 г. число больных диабетом составит 380 миллионов. У многих людей имеются дополнительные факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, включая высокий/аберрантный уровень ЛПНП и триглицеридов и низкий уровень ЛПВП.

Краткое описание изобретения

В первом аспекте изобретения предложено соединение, имеющее формулу



где R^1 представляет собой H, C_{1-4} алкил, ацетил, формил, бензоил или трифторацетил;

R^2 представляет собой OH или NH_2 ;

P^1 представляет собой пептид, имеющий последовательность



где X_2 выбран из Aib, Ala, D-Ala, Ser, N-Me-Ser, Ac3c, Ac4c и Ac5c;

X_3 выбран из Gln и His;

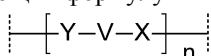
P^2 отсутствует или представляет собой последовательность из 1-20 аминокислотных единиц независимо выбранных из группы, состоящей из Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr и Orn; или ее фармацевтически приемлемая соль или сольват;

ψ представляет собой остаток Lys, Arg, Orn или Cys, в котором боковая цепь конъюгирована с заместителем, имеющим формулу $-Z^2-Z^1$;

$-Z^1$ представляет собой жирную цепь, имеющую полярную группу на одном конце цепи и связь с Z^2 , $-X$ - на конце цепи, отдаленном от полярной группы, при этом полярная группа включает карбоновую кислоту или биоизостер карбоновой кислоты, фосфоновую кислоту или группу сульфоновой кислоты;

и $-X$ - представляет собой связь, $-CO-$, $-SO-$ или $-SO_2-$;

$-Z^2$ - представляет собой спейсер, имеющий формулу



где каждый Y независимо представляет собой $-NH$, $-NR$, $-S$ или $-O$, при этом R представляет собой алкил, защитную группу или образует связь с другой частью спейсера Z^2 ;

каждый X независимо представляет собой связь, $CO-$, $SO-$ или SO_2- ;

при условии, что если Y представляет собой $-S$, X представляет собой связь;

каждый V независимо представляет собой двухвалентный органический остаток, связывающий Y и X; и n составляет 1-10;

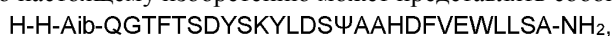
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

P^1 может иметь последовательность



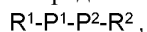
например H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([15-карбоксо-пентадеcanoил]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA.

Соединение согласно настоящему изобретению может представлять собой



например H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([15-карбоксо-пентадеcanoил]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH₂.

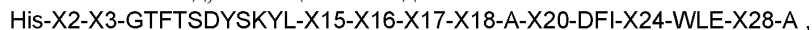
Во втором аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее формулу



где R^1 представляет собой H, C_{1-4} алкил, ацетил, формил, бензоил или трифторацетил;

R^2 представляет собой OH или NH_2 ;

P^1 представляет собой пептид, имеющий последовательность



где X_2 выбран из Aib, Ac3c, Ac4c и Ac5c;

X_3 выбран из Gln и His;

X_{15} выбран из Asp и Glu;

X_{16} выбран из Glu и ψ ;

X_{17} выбран из Arg и ψ ;

X_{18} выбран из Ala и Arg;

X_{20} выбран из Lys и His;

X_{24} выбран из Glu и ψ ;

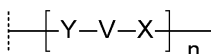
X_{28} выбран из Ser и ψ ;

и P^2 отсутствует или представляет собой последовательность из 1-20 аминокислотных единиц независимо выбранных из группы, состоящей из Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr и Orn;

при этом соединение содержит один и только один ψ и где указанный ψ представляет собой остаток Lys, Arg, Orn или Cys, в котором боковая цепь конъюгирована с заместителем, имеющим формулу $-Z^2-Z^1$;

$-Z^1$ представляет собой жирную цепь, имеющую полярную группу на одном конце цепи и связь с Z^2 , $-X$ - на конце цепи, отдаленном от полярной группы, при этом полярная группа включает карбоновую кислоту или биоизостер карбоновой кислоты, фосфоновую кислоту или группу сульфоновой кислоты;

и $-X$ - представляет собой связь, $-CO-$, $-SO-$ или $-SO_2-$; $-Z^2$ - представляет собой спейсер, имеющий формулу



где каждый Y независимо представляет собой $-NH$, $-NR$, $-S$ или $-O$, при этом R представляет собой алкил, защитную группу или образует связь с другой частью спейсера Z^2 ;

каждый X независимо представляет собой связь, $CO-$, $SO-$, или SO_2- ;

при условии, что если Y представляет собой $-S$, X представляет собой связь;

каждый V независимо представляет собой двухвалентный органический остаток, связывающий Y и X; и n составляет 1-10;

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

В некоторых вариантах реализации второго аспекта

X2 выбран из Aib и Ac4c;

X3 представляет собой Gln;

X15 выбран из Asp и Glu;

X16 представляет собой ψ ;

X17 представляет собой Arg;

X18 представляет собой Ala;

X20 выбран из Lys и His;

X24 представляет собой Glu;

X28 представляет собой Ser.

Подходящие для применения комбинации остатков включают в себя следующие:

X2 представляет собой Ac4c и X20 представляет собой Lys;

X2 представляет собой Aib и X20 представляет собой His.

Дополнительно или альтернативно может быть желательно, чтобы X2 представлял собой Aib, если X15 представляет собой E, или чтобы X15 представлял собой D, если X2 представляет собой Ac4c.

Особенно предпочтительные заместители Z^2Z^1 включают

[17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3 и [17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG.

R^1 может иметь последовательность, выбранную из

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA,

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA,

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAKDFIEWLESA,

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA и

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAHDFIEWLESA,

например, из

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA,

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA,

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA,

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA и

H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA .

Соединение согласно настоящему изобретению может быть выбрано из

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂ и

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAHDFIEWLESA-NH₂,

например, из

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂,

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂,

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂,

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂ и

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA-NH₂.

В альтернативных вариантах реализации второго аспекта

X2 выбран из Aib и Ac4c;

X3 выбран из Gln и His;
 X15 представляет собой Asp;
 X16 представляет собой Glu;
 X17 выбран из Arg и ψ ;
 X18 выбран из Ala и Arg;
 X20 представляет собой Lys;
 X24 выбран из Glu и ψ ;
 X28 выбран из Ser и ψ ;

В некоторых вариантах реализации, когда X28 представляет собой ψ , X2 представляет собой Ac4c.

В некоторых вариантах реализации, когда X3 представляет собой His, X2 представляет собой Ac4c и X17 представляет собой ψ .

В некоторых вариантах реализации, когда X17 представляет собой ψ , Z^2Z^1 представляет собой [17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-Peg3-Peg3 или [17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu.

В некоторых вариантах реализации, когда X24 или X28 представляет собой ψ , Z^2Z^1 представляет собой [17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-GSGSGG.

P^1 может иметь последовательность, выбранную из

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA,
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI Ψ WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI Ψ WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI Ψ WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE Ψ A и
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE Ψ A,

например, из

H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-Peg3-Peg3)-
 RAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-Peg3-Peg3)-
 RAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA,
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-GSGSGG)-
 WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-GSGSGG)-
 WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-GSGSGG)-
 WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-
 GSGSGG)-A и
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-
 GSGSGG)-A-NH₂.

Соединение согласно изобретению может быть выбрано из

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ AAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE Ψ RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI Ψ WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI Ψ WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI Ψ WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE Ψ A-NH₂ и
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE Ψ A-NH₂,

например, из

H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFI-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂ и
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLE-K([17-карбокси-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂.

Во избежание сомнений, во всех аспектах настоящего изобретения те положения, для которых явно не указано, что разрешена вариабельность, являются фиксированными, и, таким образом, могут включать в себя только указанные остатки.

Во всех аспектах соединения согласно настоящему изобретению содержит остаток ψ , т.е. остаток, выбранный из Lys, Arg, Orn и Cys, в котором боковая цепь конъюгирована с заместителем $-Z^2-Z^1-$, как более подробно описано ниже.

Заместитель конъюгирован с функциональной группой на конце боковой цепи, отдаленном от альфа-углерода. Нормальная способность боковых цепей Lys, Arg, Orn или Cys участвовать во взаимодействиях, опосредованных этой функциональной группой (например внутри- и межмолекулярные взаимодействия), таким образом может быть снижена или полностью устранена наличием заместителя. Таким образом, общие свойства соединения могут быть относительно нечувствительны к изменениям фактической аминокислоты, присутствующей в качестве остатка ψ . Следовательно, полагают, что любой из остатков Lys, Arg, Orn и Cys может присутствовать в любом положении, в котором разрешен ψ . Тем не менее, в некоторых вариантах реализации может быть выгодно, чтобы аминокислотный компонент ψ представлял собой Lys.

В некоторых вариантах реализации $-Z^1$ представляет собой ацильную группу формулы



или сульфонильную группу формулы



A представляет собой $-COOH$ или биоизомер карбоновой кислоты;

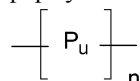
B представляет собой связь, C_6 арилен или C_6 арилен-O-;

Alk представляет собой насыщенную или ненасыщенную жирную цепь от 6 до 18 атомов углерода в длину, необязательно замещенную одним или более заместителями, выбранными из фтора, C_{1-4} алкила, трифторметила, гидроксиметила, amino, гидроксид-ла, C_{1-4} алкокси, оксо и карбоксила;

$-Z^2-$ представляет собой $-S_A-$, $-S_A-S_B-$ или $-S_B-S_A-$;

$-S_A-$ представляет собой одиночный аминокислотный остаток, выбранный из γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp, Ala, β -Ala (3-аминопропановой кислоты) и Gaba (4-аминобутановой кислоты);

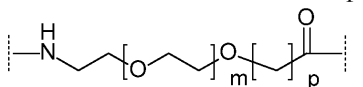
$-S_B-$ представляет собой линкер с общей формулой



где n составляет 1-10 и каждый P_U независимо выбран из P_U^i и P_U^{iii} ;

каждый P_U^i независимо представляет собой остаток природной или искусственной аминокислоты; и

каждый P_U^{iii} независимо представляет собой остаток с общей формулой



где m составляет 0-5 и p составляет 1, 3, 4 или 5.

В любом аспекте изобретения R^1 может быть выбран из H и C_{1-4} -алкила (например, метила).

Соединения согласно настоящему изобретению представляют собой пептидные аналоги глюкагона. Приведенные здесь ссылки на пептидный аналог глюкагона должны быть истолкованы как ссылки на соединение согласно изобретению или на пептид P^1 или P^1 - P^2 в зависимости от контекста. Ссылку на соединение согласно изобретению следует понимать как включающую в себя любую фармацевтически приемлемую соль (например, ацетатную или хлоридную соль) или его сольват, если не указано иное или исключено в контексте.

В изобретении предложена композиция, содержащая соединение согласно изобретению, как определено в настоящем документе (включая фармацевтически приемлемые соли или их сольваты, как описано ранее), в смеси с носителем. В предпочтительных вариантах реализации композиция представляет собой фармацевтическую композицию, и носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель. Пептидный аналог глюкагона может быть в форме фармацевтически приемлемой соли аналога глюкагона.

Соединения, описанные в настоящем документе, находят применение, *inter alia*, в предотвращении увеличения массы тела или в содействии снижению массы тела. Под термином "предотвращение" подразумевается ингибирование или уменьшение по сравнению с отсутствием лечения и не обязательно означает полное прекращение увеличения массы тела. Пептиды могут вызвать снижение потребления пищи и/или увеличение расхода энергии, что приводит к видимому влиянию на массу тела. Вне зависимости от их влияния на массу тела, соединения согласно настоящему изобретению могут иметь благотворный эффект на регуляцию уровня глюкозы и/или на уровни циркулирующего холестерина, способны понижать уровни циркулирующего ЛПНП и повышать отношение ЛПВП/ЛПНП. Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению можно использовать для прямой или косвенной терапии любого состояния, вызванного или характеризующегося избыточной массой тела, например, для лечения и/или предотвращения ожирения, патологического ожирения, воспаления, связанного с ожирением, заболевания желчного пузыря, связанного с ожирением, апноэ во сне, вызванного ожирением. Соединения так же можно использовать для предотвращения состояний, вызванных или характеризующихся ненадлежащей регуляцией уровня глюкозы или дислипидемией (например, повышенным уровнем ЛПНП или пониженным соотношением ЛПВП/ЛПНП), диабетом (особенно сахарным диабетом 2-го типа), метаболическим синдромом, гипертонией, атерогенной дислипидемией, атеросклерозом, артериосклерозом, коронарной болезнью сердца, заболеванием периферических артерий, инсультом или микрососудистым заболеванием. Их эффекты в данных условиях могут быть результатом или связаны с их воздействием на массу тела, или могут быть не зависимы от них.

В изобретении также предложено соединение согласно изобретению для применения в способе медицинского лечения, в частности для применения в способе лечения состояния, как описано выше.

В изобретении также предложено применение соединения согласно изобретению при получении лекарственного средства для лечения состояния, как описано выше.

Соединение согласно настоящему изобретению можно вводить как часть комбинированной терапии с агентом для лечения диабета, ожирения, дислипидемии или гипертонии.

В таких случаях два активных агента можно использовать вместе или по отдельности, и как часть одного и того же фармацевтического состава или в виде отдельных составов.

Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с антидиабетическим агентом, включая, но не ограничиваясь, бигуанид (например, метформин), сульфонилмочевину, меглитинид или глинид (например, натеглинид), ингибитор DPP-IV, ингибитор SGLT2, глитазон, инсулин или аналог инсулина. Примеры аналогов инсулина включают, но не ограничиваются перечисленными, Lantus™, Novorapid™, Humalog™, Novomix™, Actraphane HM™, Levemir™ и Apidra™.

Соединение можно дополнительно применять в комбинации с агентом против ожирения, включая, но не ограничиваясь, агонист рецептора глюкагон-подобного пептида 1, пептида YY или его аналога, антагонист каннабиноидного рецептора 1, ингибитор липазы, агонист меланокортинового рецептора 4, антагонист рецептора меланиноконцентрирующего гормона 1, фентермин (отдельно или в комбинации с топираматом), комбинацию ингибитора обратного захвата норэпинефрина/допамина и антагониста опиоидных рецепторов (например, комбинацию бупропиона и налтрексона) или серотонинергический агент (например, лоркасерин).

Соединение можно дополнительно применять в комбинации с антигипертоническим агентом, включая, но не ограничиваясь, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, блокатор рецептора ангиотензина II, мочегонное средство, бета-блокатор или блокатор кальциевых каналов.

Соединение можно применять в комбинации с антидислипидемическим агентом, включая, но не ограничиваясь, статины, фибрат, ниацин или ингибитор абсорбции холестерина.

Таким образом, в изобретении дополнительно предложена композиция или терапевтический набор, содержащий соединение согласно настоящему изобретению и, например, антидиабетический агент, агент против ожирения, антигипертонический агент или антидислипидемический агент, как описано выше. В изобретении также предложена композиция или терапевтический набор для применения в способе лече-

ния, особенно для лечения состояния, как описано выше.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены путем химического синтеза. Таким образом, изобретение относится к способу синтеза соединения согласно изобретению.

Изобретение также можно осуществлять при помощи комбинации рекомбинантных и синтетических методов. Способ может включать экспрессию последовательности пептида-предшественника, необязательно очистку полученного таким образом соединения, и добавление или модификацию одной или более аминокислот с получением соединения согласно настоящему изобретению или соединения, содержащего аминокислотную последовательность P^1 или P^1-P^2 . Стадия модификации может включать введение остатка Orn (например, путем модификации остатка предшественника) и/или введение заместителя Z^2Z^1 в положение остатка ψ .

Пептид-предшественник можно экспрессировать в клетке из нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид-предшественник, или в экспрессионной бесклеточной системе, содержащей такую нуклеиновую кислоту.

Подробное описание изобретения

В данном описании применяются общепринятые однобуквенные и трехбуквенные коды для обозначения аминокислот естественного происхождения, а также общепринятые сокращения для других аминокислот, такие как Aib (α -аминоизомасляная кислота), Orn (орнитин), Dbu (2,4-диаминомасляная кислота), Drg (2,3-диаминопропановая кислота), Ac3c (1-амино-циклопропанкарбоновая кислота), Ac4c (1-амино-циклобутанкарбоновая кислота) и Ac5c (1-амино-циклопентанкарбоновая кислота).

Ac3c, Ac4c и Ac5c имеют аналогичную структуру и в некоторой степени взаимозаменяемы, хотя Ac4c может быть предпочтительным.

Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, который соответствует 53-81 аминокислотам препроглюкагона и имеет последовательность His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr. Окситомодулин (ОХМ) представляет собой пептид из 37 аминокислот, который включает в себя полную 29 аминокислотную последовательность глюкагона с удлиняющим сегментом из октапептида на карбокси-конце (с 82 по 89 аминокислоту препроглюкагона, имеющей последовательность Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala, и и называется "промежуточный пептид 1" или IP-1; таким образом, полноразмерная последовательность окситомодулина человека представляет собой His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Ile-Ala). Основной биологически активный фрагмент GLP-1 образуется в виде пептида из 30 аминокислот, амидированного по С-концу, который соответствует с 98 по 127 аминокислоту препроглюкагона.

Таким образом, термин "нативный глюкагон" относится к природному глюкагону человека, имеющему последовательность N-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH.

В соединении согласно изобретению аминокислоты в последовательности P^1 можно рассматривать как последовательно пронумерованные от 1 до 29 в общепринятом направлении от N-конца к С-концу. Ссылку на "положение" в P^1 следует истолковывать соответствующим образом, как следует ссылаться на положения в пределах нативного глюкагона человека и других молекул.

Соединение согласно настоящему изобретению может содержать С-концевую пептидную последовательность P^2 из 1-20 аминокислот, например, для стабилизации конформации и/или вторичной структуры пептидного аналога глюкагона, и/или для придания этому пептидному аналогу глюкагона большей устойчивости к ферментативному гидролизу, например, как описано в WO 99/46283.

При наличии P^2 последовательность представляет собой пептидную последовательность из 1-20 аминокислотных остатков, например в диапазоне 1-15, более предпочтительно в диапазоне 1-10, в частности в диапазоне 1-7 аминокислотных остатков, например 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных остатков, как например, 6 аминокислотных остатков. Каждый из аминокислотных остатков в пептидной последовательности P^2 может независимо быть выбран из Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu (2,4-диаминомасляной кислоты), Drg (2,3-диаминопропановой кислоты) и Orn (орнитина). Предпочтительно, аминокислотные остатки выбраны из Ser, Thr, Tyr, Glu, Lys, Arg, Dbu, Drg и Orn, более предпочтительно выбраны исключительно из Glu, Lys и Cys. Упомянутые выше аминокислоты могут иметь D- или L-конфигурацию, которые в некоторых вариантах реализации имеют L-конфигурацию. Особенно предпочтительные последовательности P^2 представляют собой последовательности из четырех, пяти, шести или семи последовательных остатков лизина (т.е. Lys3, Lys4, Lys5, Lys6 или Lys7) и, в частности, пять или шесть последовательных остатков лизина. Другие примерные последовательности P^2 приведены в WO 01/04156. Альтернативно, С-концевой остаток последовательности P^2 может представлять собой остаток Cys. Это может оказывать содействие в модификации (например, при ПЭГилировании или конъюгации с альбумином) соединения. В таких вариантах реализации последовательность P^2 , например, может представлять собой только одну аминокислоту в длину (т.е. $P^2 = \text{Cys}$) или может представлять собой две, три, четыре, пять, шесть или даже более аминокислот в длину. Таким образом, другие аминокислоты служат в качестве спейсера между пептидом P^1 и концевым остатком Cys.

Пептидная последовательность P² имеет не более чем 25% идентичности последовательности с соответствующей последовательностью части IP-1 ОХМ человека (который имеет последовательность Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala).

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" данного пептида или полипептидной последовательности по отношению к другой полипептидной последовательности (например, IP-1) рассчитывается как процент аминокислотных остатков в данной пептидной последовательности, которые идентичны соответствующим положениям аминокислотных остатков в соответствующей последовательности другого полипептида, при выравнивании двух последовательностей друг относительно друга и при необходимости введении пробелов для оптимального выравнивания. Значения идентичности в % можно определять с использованием WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, большинство из которых установлены значения по умолчанию. Регулируемые параметры устанавливаются со следующими значениями: длина перекрытия = 1, доля перекрытия = 0,125, пороговая длина слова (T) = 11. Значение идентичности в % для аминокислотной последовательности определяется числом совпадающих идентичных остатков, как определено при помощи WU-BLAST-2, разделенное на общее число остатков в эталонной последовательности (пробелы, введенные WU-BLAST-2 в эталонной последовательности для максимизации счета выравнивания, игнорируются), умноженное на 100.

Таким образом, когда P² оптимально выровнена с 8 аминокислотами IP-1, она имеет не более двух аминокислот, которые идентичны соответствующим аминокислотам IP-1.

В некоторых вариантах реализации P² отсутствует.

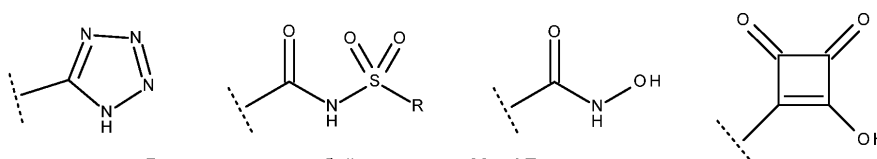
ψ представляет собой остаток Lys, Arg, Orn или Cys, чья боковая цепь конъюгирована с заместителем Z²-Z¹. Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы полагают, что заместитель связывается с белками плазмы (например, альбумином) в кровотоке, тем самым ограждая соединения согласно изобретению от ферментативного разрушения и тем самым повышая период полураспада соединений. Он также может модулировать активность соединения, например, в отношении рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1.

Группа Z¹.

Z¹ представляет собой жирную цепь, имеющую сочленение с Z², обозначенное в данном документе как -X-, а также полярную группу на конце цепи, отдаленном от сочленения с Z². -X- может представлять собой, например, связь, ацил (-CO-), сульфинил (-SO-) или сульфонил (-SO₂-), сочленение расположено в ω -положении по отношению к полярной группе, т.е. на конце цепи, отдаленном от полярной группы.

Предпочтительно, полярная группа представляет собой кислотную или слабокислотную группу, например, карбоновую кислоту или биоэстер карбоновой кислоты, фосфонат или сульфат. Полярная группа в воде может иметь рK_a от -2 до 12, более предпочтительно от 1 до 7, более предпочтительно от 3 до 6. Некоторые предпочтительные полярные группы имеют рK_a от 4 до 5.

Полярная группа предпочтительно включает карбоновую кислоту или биоэстер карбоновой кислоты. Подходящие биоэстеры карбоновых кислот известны в данной области техники. Предпочтительно биоэстер имеет протон, имеющий рK_a, аналогичный соответствующей карбоновой кислоте. Примеры подходящих биоэстеров могут включать, но не в качестве ограничения, тетразол, ацилсульфамиды, ацилгидроксиламин и производные сквариковой кислоты, как показано ниже (--- обозначает место присоединения):



R представляет собой, например, Me, CF₃

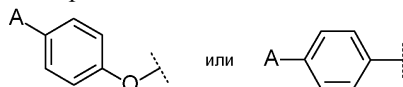
Полярная группа может представлять собой группу формулы A-B-, где A представляет собой группу карбоновой кислоты (-COOH) или биоэстера карбоновой кислоты, фосфоновой кислоты (-P(O)(OH)₂) или сульфоновой кислоты (-SO₂OH), и B представляет собой связь или линкер между A и жирной цепью. В некоторых вариантах реализации полярная группа представляет собой -COOH, т.е. A представляет собой -COOH и B представляет собой связь.

Когда B является линкером, он может представлять собой циклоалкилен, гетероциклоалкилен, C₆арилен или C_{5,6}гетероарилен или C₆арилен-O- или C_{5,6}гетероарилен-O-.

Когда B представляет собой фенилен, он может, например, быть выбран из 1,2-фенилена, 1,3-фенилена, 1,4-фенилена, предпочтительно 1,4-фенилена (так что A-B-представляет собой заместитель 4-бензойной кислоты или биоэстера 4-бензойной кислоты). Когда B представляет собой фенилен-O-, он может, например, быть выбран из 1,2-фенилен-O-, 1,3-фенилен-O-, 1,4-фенилен-O-, предпочтительно 1,4-фенилен-O-. Каждый фенилен B может быть необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из фтора, метила, трифторметила, amino, гидроксильной и C₁₋₄алкокси, предпочтительно метокси. Следует принять во внимание, что природу заместителя и положение можно выбрать таким обра-

зом, чтобы тонко изменять pK_a полярной группы. Подходящие индуктивные или мезомерные электроноакцепторные или донорные группы и их влияние в зависимости от положения известны в данной области техники. В некоторых вариантах реализации В может представлять собой C_{5-6} гетероарилен, например пиридинилен или тиофуранилен, и может быть необязательно замещен, как было описано.

Например, в некоторых вариантах реализации А-В- может быть выбран из



Предпочтительно А представляет собой -COOH. В некоторых предпочтительных полярных группах А представляет собой карбоновую кислоту и В представляет собой C_6 арилен-О-.

Термин жирная цепь, используемый в данном документе, относится к фрагменту, содержащему цепь углеродных атомов, атомы углерода преимущественно замещены водородом или водородоподобными атомами, примером является углеводородная цепь. Такие жирные цепи часто называют липофильными, хотя следует отметить, что замещение может привести к изменению липофильных свойств всей молекулы.

Жирная цепь может представлять собой алифатическую цепь. Цепь может быть полностью насыщенной или может включать в себя одну или более двойных или тройных связей. Каждая двойная связь, при ее наличии, может находиться в Е или Z конфигурации. Жирная цепь может также иметь один или более циклоалкиленовых или гетероциклоалкиленовых остатков по своей длине и, дополнительно или альтернативно, может иметь один или более ариленовых или гетероариленовых остатков по своей длине. Например, жирная цепь может содержать фениленовый или пиперазиниленовый остаток по своей длине, как, например, показано ниже (где --- обозначает место присоединения к цепи).



Жирная цепь может быть получена из жирной кислоты, например она может быть получена из среднецепочечной жирной кислоты (СЦЖК) с алифатическим хвостом из 6-12 атомов углерода, из длинноцепочечной жирной кислоты (ДЦЖК) с алифатическим хвостом из 13-21 атомов углерода, или из жирной кислоты с очень длинной цепью (ДЦЖК) с алифатическим хвостом из 22 атомов углерода или более. Примеры линейных насыщенных жирных кислот, из которых могут быть получены подходящие жирные цепи, включают тридециловую (тридекановую) кислоту, миристиновую (тетрадекановую) кислоту, пентадециловую (пентадекановую) кислоту, пальмитиновую (гексадекановую) кислоту и маргариновую (гептадекановую) кислоту. Примеры линейных ненасыщенных жирных кислот, из которых могут быть получены подходящие жирные цепи, включают миристолеиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, сапиеновую кислоту и олеиновую кислоту.

Жирная цепь может быть соединена с Z^2 при помощи амидной связи, сульфинамидной связи, сульффонамидной связи, или при помощи сложноэфирной связи, или при помощи простой эфирной связи, тиоэфирной или аминной связи. Соответственно, жирная цепь может иметь в ω положении, т.е. в положении, отдаленном от полярной группы, связь с Z^2 или ацильной (-CO-), сульфинильной (-SO-) или сульфонильной (-SO₂-) группой. Предпочтительно, жирная цепь имеет ацильную (-CO-) группу в положении, отдаленном от полярной группы, и связана с Z^2 при помощи амидной или сложноэфирной связи.

В некоторых вариантах реализации Z^1 представляет собой группу формулы



где А-В- представляет собой полярную группу, как определено выше, Х представляет собой связь, ацил (-CO-), сульфинил (-SO-) или сульфонил (-SO₂-) и Alk представляет собой жирную цепь, которая необязательно может быть замещена одним или более заместителями. Жирная цепь предпочтительно составляет от 6 до 18 атомов углерода в длину (например, C_{6-18} алкилен), более предпочтительно от 8 до 18 атомов углерода в длину (например, C_{8-18} алкилен), более предпочтительно от 12 до 16 атомов углерода в длину (например, C_{12-16} алкилен) и может быть насыщенной или ненасыщенной. Предпочтительно, Alk является насыщенным, т.е. предпочтительно Alk представляет собой алкилен.

В некоторых вариантах реализации Z^1 представляет собой ацильную группу формулы



или сульфонильную группу формулы



Необязательные заместители на алифатической цепи могут быть независимо выбраны из фтора, C_{1-4} алкила, предпочтительно метила; трифторметила, гидроксиметила, амина, гидроксила, C_{1-4} алкокси, предпочтительно метокси; оксо и карбоксила, и могут независимо располагаться в любой точке вдоль цепи. В некоторых вариантах реализации каждый необязательный заместитель выбран из фтора, метила и гидроксила. При наличии более одного заместителя заместители могут быть одинаковыми или разными. Предпочтительно, число заместителей составляет от 0 до 3; более предпочтительно жирная цепь является незамещенной.

Предпочтительно Z^1 представляет собой ацильную группу формулы

A–B–алкилен–(CO)– ,

где A и B являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах реализации Z^1 представляет собой 4-карбоксифеноксинаноил $\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2)_8\text{-(CO)-}$.

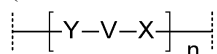
Конкретный предпочтительный Z^1 получают из длинноцепочечных насыщенных α , ω -дикарбоновых кислот формулы $\text{HOOC-(CH}_2)_{12-18}\text{-COOH}$, предпочтительно из длинноцепочечных насыщенных α , ω -дикарбоновых кислот с четным числом атомов углерода в алифатической цепи. В качестве примера, а не ограничения, Z^1 может представлять собой

13-карбокситридеcanoил $\text{HOOC-(CH}_2)_{12}\text{-(CO)-}$;
15-карбоксопентадеcanoил $\text{HOOC-(CH}_2)_{14}\text{-(CO)-}$; или
17-карбоксогептадеcanoил $\text{HOOC-(CH}_2)_{16}\text{-(CO)-}$.

Карбоксильная группа может быть заменена биоизостером, как подробно описано в настоящем документе.

Группа Z^2 .

Z^2 представляет собой спейсер, который соединяет Z^1 с боковой цепью аминокислотного компонента ψ . В наиболее общем случае Z^2 представляет собой спейсер, связанный с одного конца с Y, который может представлять собой атом азота, кислорода или серы, а на другом конце с X, который может представлять собой связь или ацил (-CO-), сульфинил (-SO-) или сульфонил (-SO₂-). Соответственно, Z^2 может представлять собой спейсер формулы (--- обозначает место присоединения):



где Y может представлять собой -NH-, -NR-, -S или -O, где R может представлять собой алкил, защитную группу или может образовывать связь с другой частью спейсера, а остальные валентности могут образовывать связь с Z^1 ;

X может представлять собой связь, CO-, SO- или SO₂-, а остальные валентности могут образовывать связь с боковой цепью аминокислотного компонента ψ ;

V представляет собой двухвалентный органический остаток, связывающий Y и X; и

n может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. При n равном 2 или более, каждый Y, V и X не зависит от любого другого Y, V и X.

Соответственно, Z^2 может быть связан с каждой стороны при помощи амидной, сульфинамидной, сульфонамидной или сложноэфирной связи или аминной, эфирной или тиоэфирной связи в зависимости от природы Y и X и соответствующих связующих групп на Z^1 и боковой цепи. Предпочтительно, когда Y представляет собой -S, X представляет собой связь. Когда n составляет 2 или более, каждый V также может быть связан с каждым смежным V посредством связей, как это было описано. Предпочтительно, связи представляют собой амины, сложные эфиры, сульфаниламиды, наиболее предпочтительно амины. Соответственно, в некоторых вариантах реализации каждый Y представляет собой -NH или -NR, и каждый X представляет собой CO- или SO₂-.

В некоторых вариантах реализации Z^2 представляет собой спейсер, имеющий формулу -S_A-, -S_B-, -S_A-S_B- или -S_B-S_A-, где S_A и S_B являются такими, как определено ниже.

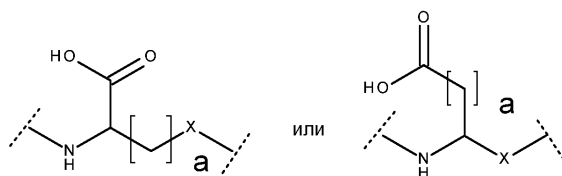
В некоторых вариантах реализации Z^2 выбран из -S_A- или -S_B-S_A-, т.е. [боковая цепь]- Z^2Z^1 представляет собой [боковая цепь]-S_A- Z^1 или [боковая цепь]-S_B-S_A- Z^1 .

Группа S_A.

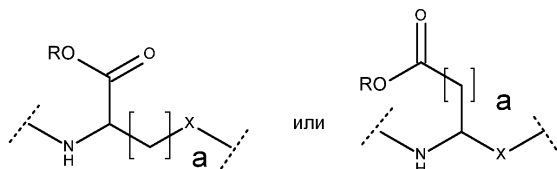
S_A может представлять собой единичный аминокислотный остаток или остаток производного аминокислоты, особенно остаток производного аминокислоты, имеющий сульфинил или сульфонил вместо карбоксильного фрагмента на C-конце. Дополнительно или альтернативно, единичный аминокислотный остаток может иметь атом кислорода или серы вместо атома азота на N-конце. Предпочтительно S_A представляет собой единичный аминокислотный остаток.

В некоторых вариантах реализации аминокислота может быть выбрана из γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp, Ala, β -Ala (3-аминопропановой кислоты) и Gaba (4-аминобутановой кислоты). Понятно, что аминокислоты могут быть D или L, или рацемической или энантиомерно обогащенной смесью. В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой L-аминокислоту. В некоторых вариантах реализации аминокислота представляет собой D-аминокислоту.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации SA имеет заместитель карбоновой кислоты у γ -Glu, α -Glu, α -Asp и β -Asp, и их сульфинил и сульфонил производные являются предпочтительными. Соответственно, в некоторых вариантах реализации остаток аминокислоты представляет собой



где -X- представляет собой -CO-, -SO-, -SO₂-, предпочтительно -CO-, и а составляет 1 или 2, предпочтительно 2. В некоторых вариантах реализации карбоновая кислота представляет собой сложный эфир, и остаток аминокислоты представляет собой

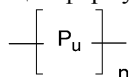


где -X- представляет собой -CO-, -SO-, -SO₂-, предпочтительно -CO-, и а составляет 1 или 2, предпочтительно 2, и R представляет собой C₁₋₄алкил или C₆арил. Предпочтительно R представляет собой C₁₋₄ алкил, предпочтительно метил или этил, более предпочтительно этил.

Предпочтительно S_A представляет собой γ-Glu.

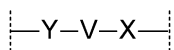
Группа S_B.

S_B может представлять собой линкер с общей формулой



где P_U представляет собой полимерную единицу и n составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Один конец линкера S_B представляет собой -NH-, -NR-, -S или -O, где R может представлять собой алкил, защитную группу или может образовывать связь с другой частью полимерной единицы; в то время как другой представляет собой связь или CO-, SO- или SO₂-. Соответственно, каждая полимерная единица P_U может быть связана с каждой стороны при помощи амидной, сульфинамидной, сульфонамидной или сложноэфирной связи или аминной, эфирной или тиоэфирной связи в зависимости от природы Y и X и соответствующих связующих групп на Z¹, S_A и Lys.

В некоторых вариантах реализации каждый P_U может независимо представлять собой единицу формулы



где Y может представлять собой -NH-, -NR-, -S или -O, где R может представлять собой алкил, защитную группу или может образовывать связь с другой частью спейсера, а остальные валентности могут образовывать связь с Z¹;

X может представлять собой связь, CO-, SO- или SO₂-, а остальные валентности могут образовывать связь с Lys;

и V представляет собой двухвалентный органический остаток, связывающий Y и X.

В некоторых вариантах реализации V представляет собой α-углерод природной или искусственной аминокислоты, т.е. V представляет собой -CHR^{AA}-, где R^{AA} представляет собой боковую цепь аминокислоты; или V представляет собой необязательно замещенный C₁₋₆алкилен, или V представляет собой цепь, содержащую одну или более последовательных единиц этиленгликоля, также известных как PEG-цепь, например, -CH₂CH₂-(OCH₂CH₂)_m-O-(CH₂)_p-, где m составляет 0, 1, 2, 3, 4 или 5, и p составляет 1, 2, 3, 4 или 5; когда X представляет собой CO-, p предпочтительно составляет 1, 3, 4 или 5. Необязательные заместители алкена включают фтор, метил, гидроксил, гидроксиметил и амино.

Предпочтительные единицы P_U включают:

(i) единичный аминокислотный остаток: P_Uⁱ;

(ii) дипептидные остатки: P_Uⁱⁱ; и

(iii) амино-(PEG)_m- карбоксильные остатки: P_Uⁱⁱⁱ,

и могут присутствовать в любой комбинации или порядке. Например, S_B может включать в себя один или более каждого из P_Uⁱ, P_Uⁱⁱ и P_Uⁱⁱⁱ в любом порядке, или может содержать одну или более единиц, выбранных из только P_Uⁱ, P_Uⁱⁱ и P_Uⁱⁱⁱ, или одну или более единиц, выбранных из P_Uⁱ и P_Uⁱⁱ, P_Uⁱ и P_Uⁱⁱⁱ, или P_Uⁱⁱ и P_Uⁱⁱⁱ.

(i) Единичные аминокислотные остатки P_Uⁱ.

Каждый P_Uⁱ может быть независимо выбран из любого остатка природной или искусственной аминокислоты и, например, может быть выбран из Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn, α-Glu, γ-Glu, Asp, Ser, Thr, Gaba, Aib, β-Ala, 5-аминопентанол, 6-аминогексаноил, 7-аминогептаноил, 8-аминооктаноил, 9-аминононаноил и 10-аминодеканоил. Предпочтительно, аминокис-

лотные остатки P_U^i выбраны из Gly, Ser, Ala, Thr и Cys, более предпочтительно из Gly и Ser.

В некоторых вариантах реализации S_B представляет собой $-(P_U^i)_n-$, где n составляет от 1 до 8, более предпочтительно от 5 до 7, наиболее предпочтительно 6. В некоторых предпочтительных вариантах реализации S_B представляет собой $-(P_U^i)_n-$, n составляет 6 и каждый P_U^i независимо выбран из Gly или Ser, с предпочтительной последовательностью-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly-.

(ii) Дипептидные остатки P_U^{ii} .

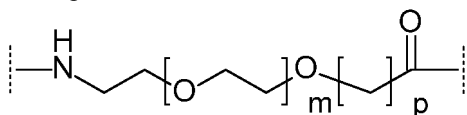
Каждый P_U^{ii} может быть независимо выбран из любого дипептидного остатка, содержащего два остатка природной или искусственной аминокислоты, связанных амидной связью. Предпочтительные P_U^{ii} дипептидные остатки включают Gly-Gly, Gly-Ser, Ser-Gly, Gly-Ala, Ala-Gly и Ala-Ala, более предпочтительно Gly-Ser и Gly-Gly.

В некоторых вариантах реализации S_B представляет собой $-(P_U^{ii})_n-$, где n составляет от 2 до 4, более предпочтительно 3, и каждый P_U^{ii} независимо выбран из Gly-Ser и Gly-Gly. В некоторых предпочтительных вариантах реализации S_B представляет собой $-(P_U^{ii})_n-$, n составляет 3 и каждый P_U^{ii} независимо выбран из Gly-Ser и Gly-Gly, с предпочтительной последовательностью-(Gly-Ser)-(Gly-Ser)-(Gly-Gly).

Аминокислоты, имеющие стереогенные центры в P_U^i и P_U^{ii} , могут быть рацемической, энантиомерно обогащенной или энантиомерно чистой смесью. В некоторых вариантах реализации указанная или каждая аминокислота независимо представляет собой L-аминокислоту. В некоторых вариантах реализации указанная или каждая аминокислота независимо представляет собой D-аминокислоту.

(iii). Амино-(PEG)_m-карбоксильные остатки P_U^{iii} .

Каждый P_U^{iii} может независимо представлять собой остаток с общей формулой



где m составляет 0, 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно 1 и 2, и p составляет 1, 3, 4 или 5, предпочтительно 1.

В некоторых вариантах реализации m составляет 1, и p составляет 1, т.е. P_U^{iii} представляет собой остаток 8-амино-3,6-диоксаоктановой кислоты (также известной как {2-[2-аминоэтокси]этокси}уксусная кислота и H_2N-PEG_3-COOH). Этот остаток упоминается в данном документе как $-PEG_3-$.

В некоторых вариантах реализации m составляет 2 и p составляет 1, т.е. P_U^{iii} представляет собой остаток 11-амино-3,6,9-триоксаундекановой кислоты (также известной как H_2N-PEG_4-COOH). Этот остаток упоминается в данном документе как $-PEG_4-$.

В некоторых вариантах реализации S_B представляет собой $-(P_U^{iii})_n-$, где n составляет от 1 до 3, более предпочтительно 2.

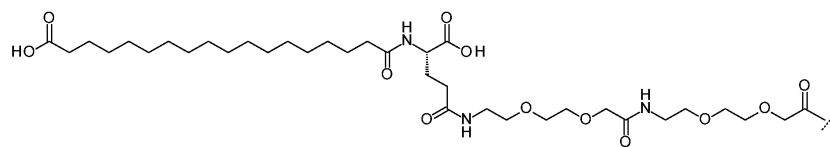
В некоторых предпочтительных вариантах реализации S_B выбран из $-PEG_3-PEG_3-$ и $-PEG_4-PEG_4-$.

Предпочтительные $-Z^2-Z^1$.

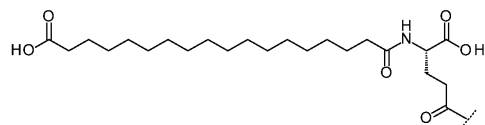
Понятно, что вышеуказанные предпочтения можно независимо комбинировать с получением предпочтительных комбинаций $-Z^2-Z^1$.

Некоторые предпочтительные комбинации $-Z^2-Z^1$ показаны ниже (в каждом случае --- обозначает место присоединения к боковой цепи аминокислотного компонента ψ

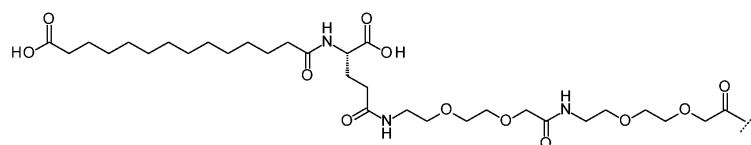
(i) [17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-Peg3-Peg3



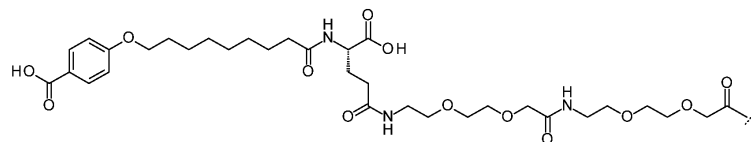
(ii) [17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu



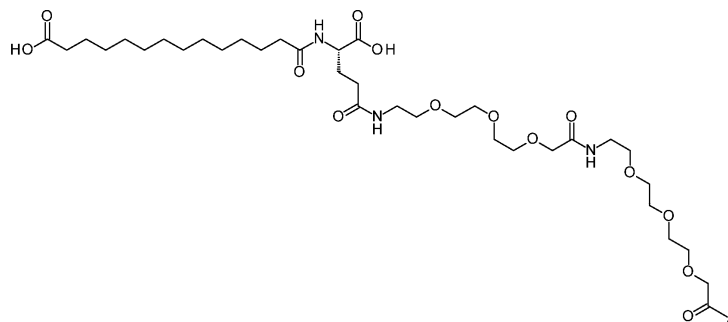
(iii) [13-карбокси-тридеканоил]-isoGlu-Peg3-Peg3



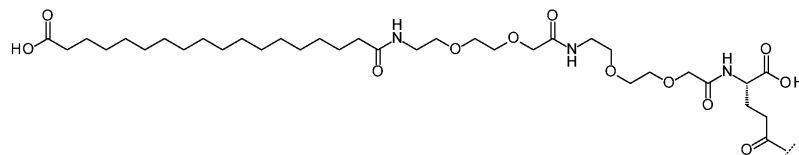
(iv) [карбоксифеноксинаноил]-isoGlu-Peg3-Peg3



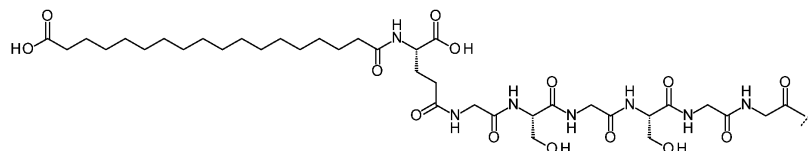
(v) [13-карбокси-тридеканоил]-isoGlu-Peg4-Peg4



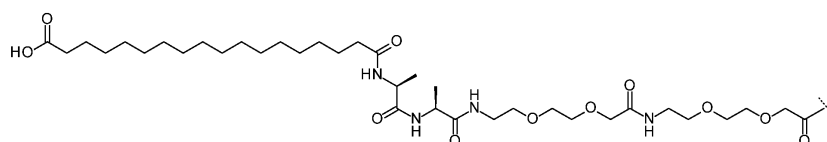
(vi) [17-карбокси-гептадеканоил]-Peg3-Peg3-isoGlu



(vii) [17-карбокси-гептадеканоил]-isoGlu-GSGSGG



(viii) [17-карбокси-гептадеканоил]-AA-Peg3-Peg3



Полагают, что присутствие полярной группы на конце Z^1 усиливает фармакокинетические свойства данного соединения, например, за счет увеличения периода полураспада и/или среднего времени удержания в организме и снижения клиренса. Линкер также может внести свой вклад в эти фармакокинетические свойства. Линкеры, содержащие более одной аминокислотной единицы (или фрагментов такого же размера), могут улучшить фармакокинетические свойства по сравнению с ликерами, состоящими только из одной аминокислотной единицы или тому подобным. Данные свойства могут позволить вводить соединение менее часто, чем эквивалентное соединение с такой же пептидной цепью, но без модификации или другой модификации (например, с заместителем с алифатической жирной цепью при отсутствии полярной группы и/или имеющим более короткую линкерную группу).

Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией авторы настоящего изобретения обнаружили, что особенно при включении больших линкеров полярная или заряженная группа на конце Z^1 может быть способна участвовать в нежелательном внутримолекулярном взаимодействии со свободным N-концом молекулы, что может негативно сказаться на благотворном влиянии полярной группы на фармакокинетику. Полагают, что пептидные скелеты соединений, описанные в данном документе, имеют относительно четко определенную вторичную спиральную структуру, поэтому возможность участия полярной группы в таких взаимодействиях может зависеть от ее местоположения в молекуле. Когда она расположена по направлению к C-концу, взаимодействие с N-концом может быть относительно маловероятным. Тем не менее, авторы были удивлены, обнаружив, что заместитель может находиться на 16 и 17 остатках молекулы без обязательного негативного влияния на полученные фармакокинетические преимущества.

Термин "конъюгированный" применяется в настоящем документе для описания физического присоединения одного идентифицируемого химического фрагмента к другому, а также для структурных взаимоотношений между такими фрагментами. Это не следует рассматривать, как означающее какой-либо конкретный способ синтеза.

Специалистам в данной области известны подходящие техники, которые можно применять для выполнения реакции сочетания с использованием общих способов синтеза, перечисленных, например, в "Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations", 2nd edition, Larock R.C.; Wiley-VCH: New York, 1999. Такие преобразования могут иметь место на любой подходящей стадии в процессе синтеза.

Пептидный синтез.

Соединения согласно настоящему изобретению можно получить стандартными методами синтеза, с применением рекомбинантных экспрессионных систем или любыми другими способами, известными в данной области техники. Таким образом, аналоги глюкагона можно синтезировать несколькими путями, включая, например, способ, который включает:

(а) синтез пептида с помощью твердофазного или жидкофазного способа, путем пошаговой сборки или сборки фрагментов и выделения и очистки конечного пептидного продукта; или

(b) путем экспрессии последовательности пептида-предшественника из сконструированной нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид-предшественник, выделения продукта экспрессии и модификации пептида-предшественника с получением соединения согласно настоящему изобретению.

Экспрессию обычно выполняют с применением нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид-предшественник, и которую можно осуществлять в клетке или в экспрессионной бесклеточной системе, содержащей такую нуклеиновую кислоту.

Предпочтительно синтезировать аналоги согласно изобретению при помощи твердофазного или жидкофазного пептидного синтеза. В связи с этим приведена ссылка на WO 98/11125 и, среди многих других, Fields G.B. et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". In: Synthetic Peptides (2nd Edition), а также на примеры настоящего документа.

Для рекомбинантной экспрессии фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид-предшественник, обычно встраивают в подходящие векторы для получения клонирующего или экспрессионного векторов. В зависимости от назначения и типа применения векторы могут быть в форме плазмид, бактериофагов, космид, мини-хромосом или вируса, а также важным вектором является "оголенная" ДНК, которая транзитивно экспрессируется только в определенных клетках. Предпочтительные клонирующие или экспрессионные векторы (плазмидные векторы) способны к автономной репликации, тем самым обеспечивая высокую копияность с целью экспрессии высокого уровня или репликации высокого уровня для последующего клонирования.

В общем виде экспрессионный вектор содержит следующие элементы в направлении 5'→3' и в функциональной связи: промотор для запуска экспрессии фрагмента нуклеиновой кислоты, необязательно последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерный пептид, позволяющий секрецию (во внеклеточную среду или, где это применимо, в периплазму), фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий пептид-предшественник, и необязательно последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую терминатор. Они могут включать в себя дополнительные функции, такие как селективные маркеры и точки начала репликации. При работе с экспрессионными векторами в штаммах-продуцентах или клеточных линиях может быть предпочтительно, чтобы вектор был способен интегрироваться в геном клет-

ки-хозяина.

Специалист в данной области хорошо знаком с подходящими векторами и имеет возможность спроектировать один из них в соответствии с их конкретными требованиями.

Векторы согласно изобретению используют для трансформации клеток-хозяев для получения пептида-предшественника. Такие трансформированные клетки могут представлять собой культуру клеток или клеточные линии и использоваться для размножения фрагментов нуклеиновых кислот и векторов и/или использоваться для рекомбинантного получения пептидов-предшественников.

Предпочтительными трансформированными клетками являются микроорганизмы, такие как бактерии [такие как виды *Escherichia* (например, *E.coli*), *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis*), *Salmonella* или *Mycobacterium* (предпочтительно не патогенные, например *M.bovis* BCG), дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*) и простейшие. Альтернативно, трансформированные клетки могут быть получены из многоклеточного организма, т.е. они могут представлять собой клетки грибов, клетки насекомого, клетки водорослей, клетки растений или клетки животных, такие как клетки млекопитающих. Для целей клонирования и/или оптимизированной экспрессии предпочтительно, чтобы трансформированная клетка была способна к репликации фрагмента нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Клетки, экспрессирующие фрагмент нуклеиновой кислоты, можно применять для мелкосерийного или крупномасштабного получения пептидов согласно изобретению.

При производстве пептида-предшественника с помощью трансформированных клеток удобно, хотя и далеко не обязательно, чтобы продукт экспрессии секретировался в культуральную среду.

Эффективность.

Связывание соответствующих соединений с рецепторами GLP-1 или глюкагона (Glu), можно использовать как показатель активности агониста, но в общем случае предпочтительно использовать биологический метод анализа, в котором происходит измерение внутриклеточного сигнала, вызванного связыванием соединения с соответствующим рецептором. Например, активация рецептора глюкагона при помощи агониста глюкагона будет стимулировать образование клеточного циклического АМФ (цАМФ). Аналогичным образом, активация рецептора GLP-1 с помощью агониста GLP-1 будет стимулировать образование клеточного цАМФ. Таким образом, образование цАМФ в подходящих клетках, экспрессирующих один из этих двух рецепторов, можно использовать для мониторинга соответствующей активности рецептора. Использование подходящей пары типов клеток, каждая из которых экспрессирует один из рецепторов, но не другой, следовательно, можно применять для определения активности агониста по отношению к обоим типам рецептора.

Специалисту в данной области известны подходящие схемы методов анализа и ниже приведены примеры. Рецептор GLP-1 и/или рецептор глюкагона может иметь последовательность рецепторов, как описано в примерах. Например, в методе анализа можно использовать рецептор глюкагона (Глюкагон-Р) человека, имеющий первичный учетный номер GI:4503947, и/или рецептор глюкагон-подобного пептида 1 (GLP-1R) человека, имеющий первичный учетный номер GI:166795283 (в случае, когда указана последовательность белков-предшественников, конечно, следует понимать, что в методе анализа может применяться зрелый белок без сигнальной последовательности).

Значения EC_{50} можно применять в качестве числового показателя удельной активности агониста для данного рецептора. Значение EC_{50} представляет собой величину концентрации соединения, необходимого для достижения половины максимальной активности соединения в конкретном анализе. Таким образом, например, соединение, имеющее EC_{50} [GLP-1] ниже, чем EC_{50} [Глюкагон] глюкагона в конкретном анализе, можно рассматривать как имеющее более высокую удельную активность агониста рецептора GLP-1, чем глюкагон.

Соединения, описанные в данном документе, как правило являются двойными агонистами GluGLP-1, как установлено посредством наблюдений, они способны стимулировать образование цАМФ в обоих рецепторах глюкагона и GLP-1. Стимуляцию каждого рецептора можно измерить в независимых анализах, а затем сравнить друг с другом.

Путем сравнения значения EC_{50} для рецептора GLP-1 (EC_{50} [GLP-1-R]) со значением EC_{50} для рецептора глюкагона (EC_{50} [Глюкагон-R]) для данного соединения относительную селективность GLP-1R можно рассчитать следующим образом:

$$\text{Относительная селективность GLP-1R [соединение]} = (EC_{50}[GLP-1R]) / (EC_{50}[Глюкагон-R])$$

Термин " EC_{50} " обозначает половину максимальной эффективной концентрации, как правило для конкретного рецептора, или для уровня конкретного маркера для функции рецептора, и может относиться к ингибирующей или антагонистической активности в зависимости от конкретного биохимического контекста.

Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, относительная селективность соединения может позволить прямо сравнивать его влияние на рецептор GLP-1 или рецептор глюкагона с его влиянием на другой рецептор. Например, чем выше относительная селективность GLP-1 соединения, тем более эффективным может быть соединение для рецептора GLP-1 по сравнению с рецептором глюкагона. Как правило, результаты сравниваются для рецепторов глюкагона и GLP-1 для одного и того же вида, например, для рецепторов глюкагона и GLP-1 человека, или рецепторов глюкагона и GLP-1 мыши.

Соединения согласно настоящему изобретению могут иметь более высокую относительную селективность GLP-1R, чем глюкагон человека, в том, что для определенного уровня активности агониста глюкагона-R соединение может отображать более высокий уровень активности агониста GLP-1 R (т.е. большую удельную активность для рецептора GLP-1), чем глюкагона. Понятно, что абсолютное значение удельной активности конкретного соединения для рецепторов глюкагона и GLP-1 может быть выше, ниже или примерно равна нативному глюкагону человека до тех пор, пока достигается соответствующая относительная селективность GLP-1R.

Тем не менее, соединения согласно настоящему изобретению могут иметь более низкое значение EC_{50} [GLP-1 R], чем глюкагон человека. Данные соединения могут иметь более низкое значение EC_{50} [GLP-1 -R], чем глюкагон, пока сохраняется EC_{50} [Глюкагон-R], т.е. менее чем в 10 раз выше, чем у глюкагона человека, менее чем в 5 раз выше, чем у глюкагона человека, или менее чем в 2 раза выше, чем у глюкагона человека.

Соединения согласно изобретению могут иметь EC_{50} [Глюкагон-R], которые меньше в два раза, чем у глюкагона человека. Соединения могут иметь EC_{50} [Глюкагон-R] которые меньше в два раза, чем у глюкагона человека и иметь EC_{50} [GLP-1 R], которые меньше половины значения для глюкагона человека, менее одной пятой для глюкагона человека или менее одной десятой для глюкагона человека.

Относительная селективность GLP-1R соединений может составлять от 0,05 до 20. Например, соединения могут иметь относительную селективность 0,05-0,20, 0,1-0,30, 0,2-0,5, 0,3-0,7 или 0,5-1,0; 1,0-2,0, 1,5-3,0, 2,0-4,0 или 2,5-5,0; или 0,05-20, 0,075-15, 0,1-10,0,15-5, 0,75-2,5 или 0,9-1,1.

В некоторых вариантах реализации может быть желательно, чтобы EC_{50} любого заданного соединения для обоих рецепторов Глюкагон-R и GLP-1 R, например, для рецептора глюкагона человека и рецептора GLP-1, была бы меньше чем 1 нМ.

Терапевтическое применение.

Соединения согласно настоящему изобретению могут обеспечивать перспективные возможности для лечения и/или предотвращения, среди прочего, ожирения и метаболических заболеваний, включая диабет, как описано ниже.

Диабет включает в себя группу метаболических заболеваний, характеризующихся гипергликемией в результате нарушений секреции инсулина, действия инсулина или обоих. Острые симптомы диабета включают чрезмерное образование мочи, приводящее к компенсаторной жажде и повышенному потреблению жидкости, затуманенное зрение, необъяснимую потерю массы, вялость и изменения в энергетическом обмене. Хроническая гипергликемия диабета ассоциирована с долгосрочным повреждением, дисфункцией и недостаточностью различных органов, особенно глаз, почек, нервов, сердца и кровеносных сосудов. На основании патогенетических характеристик диабет подразделяется на сахарный диабет 1-го типа, сахарный диабет 2-го и гестационный диабет.

На сахарный диабет 1-го типа приходится 5-10% всех случаев диабета, и он вызван аутоиммунным разрушением панкреатических β -клеток, секретирующих инсулин.

На сахарный диабет 2-го типа приходится 90-95% случаев диабета, и он является результатом сложного набора метаболических нарушений. Сахарный диабет 2-го типа является следствием эндогенной продукции инсулина, которая становится недостаточной для поддержания уровня глюкозы в плазме ниже диагностических порогов.

Гестационный диабет относится к любой степени интолерантности к глюкозе, выявленной во время беременности.

Преддиабет включает в себя нарушение уровня глюкозы натощак и нарушение толерантности к глюкозе и относится к тем состояниям, которые происходят, когда уровень глюкозы в крови повышается, но ниже уровней, которые установлены для клинической диагностики диабета.

Большая часть людей с сахарным диабетом 2-го типа и преддиабетом подвержены повышенному риску заболеваемости и смертности из-за высокой распространенности дополнительных метаболических факторов риска, включая абдоминальное ожирение (чрезмерное количество жировой ткани вокруг внутренних органов брюшной полости), атерогенную дислипидемию (нарушения содержания жиров в крови, включая высокий уровень триглицеридов, низкий уровень холестерина ЛПВП и/или высокий уровень холестерина ЛПНП, что способствует росту бляшек на стенках артерий), повышенное кровяное давление (гипертонию), протромботическое состояние (например, высокий уровень фибриногена или ингибитора активатора пламиногена-1 в крови) и провоспалительные состояния (например, повышенный уровень С-реактивного белка в крови).

И наоборот, ожирение повышает риск развития преддиабета, сахарного диабета 2-го типа, а также, например, некоторых видов рака, обструктивного апноэ во сне и заболевания желчного пузыря.

Дислипидемия связана с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. Липопротеин высокой плотности (ЛПВП) имеет клиническое значение, так как существует обратная корреляция между концентрацией ЛПВП в плазме и риском атеросклеротических заболеваний. Большинство холестерина, хранящегося в атеросклеротических бляшках, происходит из ЛПНП и, следовательно, повышенные концентрации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) тесно связаны с атеросклерозом. Соотношение ЛПВП/ЛПНП является клиническим показателем риска атеросклероза и коронарного ате-

росклероза в частности.

Метаболический синдром характеризуется группой метаболических факторов риска у отдельного субъекта. Они включают в себя абдоминальное ожирение (чрезмерное количество жировой ткани вокруг внутренних органов брюшной полости), атерогенную дислипидемию (нарушения содержания жиров в крови, включая высокий уровень триглицеридов, низкий уровень холестерина ЛПВП и/или высокий уровень холестерина ЛПНП, что способствует росту бляшек на стенках артерий), повышенное кровяное давление (гипертонию), резистентность к инсулину и интолерантность к глюкозе, протромботическое состояние (например, высокий уровень фибриногена или ингибитора активатора плазминогена-1 в крови) и провоспалительные состояния (например, повышенный уровень С-реактивного белка в крови).

Лица с метаболическим синдром подвержены повышенному риску коронарной болезни сердца и другим заболеваниям, связанным с другими проявлениями атеросклероза (например, инсультом и заболеваниями периферических сосудов). Доминирующими основополагающими факторами риска развития данного синдрома, по-видимому, является абдоминальное ожирение.

Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что соединения согласно настоящему изобретению действуют как двойные агонисты на рецептор глюкагона человека и рецептор GLP1 человека, сокращенно обозначенные в настоящем документе как двойные агонисты GluGLP-1. Двойной агонист может сочетать влияние глюкагона, например, на жировой обмен, с влиянием на GLP-1, например, на уровень глюкозы в крови и потребление пищи. Поэтому они могут действовать так, чтобы ускорить устранение избыточной жировой ткани, вызывать устойчивую потерю массы, а также улучшать гликемический контроль. Двойные агонисты GluGLP-1 могут также действовать для снижения сердечно-сосудистых факторов риска, таких как высокий уровень холестерина, высокий уровень холестерина ЛПНП или низкое соотношение холестерина ЛПВП/ЛПНП.

Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению можно применять у субъекта, нуждающегося в этом, в качестве фармацевтических агентов для предотвращения увеличения массы тела, для содействия снижению массы тела, для снижения избыточной массы или лечения ожирения (например, путем контроля аппетита, питания, потребления пищи, потребления калорий и/или расхода энергии), включая патологическое ожирение, а также сопутствующие заболевания и состояния здоровья, включая, но не ограничиваясь, воспаление, связанное с ожирением, заболевания желчного пузыря, связанные с ожирением, и апноэ во сне, вызванное ожирением. Соединения согласно настоящему изобретению также можно применять у субъекта, нуждающегося в этом, для лечения состояний, вызванных или связанных с нарушением контроля уровня глюкозы крови, включая метаболический синдром, резистентность к инсулину, интолерантность к глюкозе, преддиабет, повышенный уровень глюкозы натощак, сахарный диабет 2-го типа, гипертонию, атеросклероз, артериосклероз, коронарную болезнь сердца, заболевания периферических артерий и инсульт. Некоторые из этих состояний могут быть связаны с ожирением. Однако влияние соединений согласно настоящему изобретению на указанные состояния может быть опосредовано в целом или частично через влияние на массу тела, или может не зависеть от них.

Синергетический эффект двойных агонистов GluGLP-1 может также приводить к снижению сердечно-сосудистых факторов риска, таких как высокий уровень холестерина и ЛПНП, который может быть полностью независимым от их влияния на массу тела.

Таким образом, в изобретении предложено применение соединения согласно изобретению для лечения состояния, как описано выше, у индивидуума, нуждающегося в этом.

В изобретении также предложено соединение согласно изобретению для применения в способе лечения, в частности, для применения в способе лечения состояния, как описано выше.

В предпочтительном аспекте описанные соединения можно применять для лечения диабета, особенно сахарного диабета 2-го типа.

В конкретном варианте реализации настоящее изобретение включает применение соединения для лечения диабета, особенно сахарного диабета 2-го типа у индивидуума, нуждающегося в этом.

В не менее предпочтительном аспекте описанные соединения можно применять для предотвращения увеличения массы тела или содействия снижению массы тела.

В конкретном варианте реализации настоящее изобретение включает применение соединения для предотвращения увеличения массы тела или содействия снижению массы тела у индивидуума, нуждающегося в этом.

В конкретном варианте реализации настоящее изобретение включает применение соединения в способе лечения состояния, вызванного или характеризующегося избыточной массой тела, например для лечения и/или предотвращения ожирения, патологического ожирения, патологического ожирения перед хирургическим вмешательством, воспаления, связанного с ожирением, заболевания желчного пузыря, связанного с ожирением, апноэ во сне, вызванного ожирением, преддиабета, сахарного диабета, особенно сахарного диабета 2-го типа, гипертонии, атерогенной дислипидемии, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца, заболевания периферических артерий, инсульта или микрососудистого заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом.

В другом аспекте описанные соединения можно применять в способе уменьшения уровней циркулирующего ЛПНП и/или увеличения отношения ЛПВП/ЛПНП.

В конкретном варианте реализации настоящее изобретение включает применение соединения в способе уменьшения уровней циркулирующего ЛПНП и/или увеличения отношения ЛПВП/ЛПНП у индивидуума, нуждающегося в этом.

В другом аспекте описанные соединения можно применять в способе уменьшения уровней циркулирующих триглицеридов.

Фармацевтические композиции.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде фармацевтических композиций, приготовленных для хранения или введения. Такие композиции обычно содержат терапевтически эффективное количество соединения согласно изобретению в подходящей форме в фармацевтически приемлемом носителе.

Терапевтически эффективное количество соединения согласно настоящему изобретению будет зависеть от пути введения, типа млекопитающего, подлежащего лечению, и физических характеристик конкретного рассматриваемого млекопитающего. Данные факторы и их отношения для определения этого количества хорошо известны специалистам в области медицины. Это количество и способ введения могут быть подобраны для достижения оптимальной эффективности и могут зависеть от таких факторов, как масса тела, диета, сопутствующая лекарственная терапия и других факторов, хорошо известных специалистам в данной области медицины. Для размеров дозы и режима дозирования, наиболее подходящих для применения людьми, можно руководствоваться результатами, полученными в соответствии с настоящим изобретением, и их можно подтвердить в правильно спланированных клинических испытаниях. Соединения согласно настоящему изобретению могут особенно подходить для лечения людей.

Эффективную дозу и протокол лечения можно определить обычными способами, начиная с низкой дозы на лабораторных животных, а затем увеличивая дозу и контролируя эффекты, а также систематически варьируя режим дозирования. При определении оптимальной дозы для конкретного субъекта практический врач может принимать во внимание многочисленные факторы. Такие факторы известны специалисту в данной области техники.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любой из стандартных фармацевтических носителей. Фармацевтически приемлемые носители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области, и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). Например, можно применять стерильный физиологический раствор и слегка подкисленный забуференный фосфатом физиологический раствор или раствор с физиологическим pH. pH-буферные агенты могут представлять собой фосфат, цитрат, ацетат, трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS), N-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфонокислоту (TAPS), бикарбонат аммония, диэтаноламин, гистидин, который является предпочтительным буфером, аргинин, лизин или ацетат или их смеси. Термин также охватывает любые агенты, перечисленные в фармакопее США для применения на животных, включая людей.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли любого соединения согласно настоящему изобретению. Соли включают фармацевтически приемлемые соли, такие как кислотно-аддитивные соли и основные соли. Примеры кислотно-аддитивных солей включают гидрохлоридные соли, цитратные соли и ацетатные соли. Примеры основных солей включают соли, где катион выбран из щелочных металлов, таких как натрий и калий, щелочно-земельных металлов, таких как кальций, и ионы аммония $^+N(R^3)_3(R^4)$, где R^3 и R^4 независимо обозначают необязательно замещенный C_{1-6} -алкил, необязательно замещенный C_{2-6} -алкенил, необязательно замещенный арил, или необязательно замещенный гетероарил. Другие примеры фармацевтически приемлемых солей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 и более поздних изданиях, и в Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

"Лечение" представляет собой подход для получения благоприятных или желаемых клинических результатов. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают в себя, но не ограничиваются, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную), которые возможно обнаружить или невозможно обнаружить. "Лечение" может также означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью без лечения. "Лечение" представляет собой вмешательство, осуществляемое с целью предотвращения развития или изменения патологии расстройства. Соответственно, "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам в некоторых вариантах реализации. Лица, нуждающиеся в лечении, включают лиц уже с наличием расстройства, а также тех, у которых необходимо предотвратить расстройство. Лечение подразумевает ингибирование или снижение возросшей патологии или симптомов (например, увеличения массы тела, гипергликемии) по сравнению с отсутствием лечения, и не обязательно означает полное прекращение соответствующего состояния.

Фармацевтические композиции могут быть в виде лекарственной формы с однократной дозировкой. В такой форме композиция разделена на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Лекарственная форма с однократной дозировкой может представлять собой упа-

кованный препарат, причем упаковка содержит дискретные количества средства, например упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Лекарственная форма с однократной дозировкой также может представлять собой капсулу, облатку или собственно таблетку, или может представлять собой соответствующее количество любой из этих упакованных форм. Она может быть представлена в виде инъекционной формы с однократной дозировкой, например в виде шприца-ручки. В некоторых вариантах реализации упакованные формы содержат этикетку или вкладыш с инструкцией по применению. Композиции могут быть приготовлены для любого подходящего пути введения и средства введения. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители включают те, которые используются в составах, пригодных для перорального, ректального, назального, местного (включая трансбуккальное и сублингвальное), вагинального или парентерального (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутрикожное и трансдермальное) введения. Составы могут быть представлены в виде лекарственной формы с однократной дозировкой и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации.

Подкожные или трансдермальные способы введения могут особенно подходить для соединений, описанных в настоящем документе.

Композиции согласно изобретению можно дополнительно вводить в смесь или присоединять, например, через ковалентные, гидрофобные и электростатические взаимодействия, к носителю лекарственного средства, системе доставки лекарственного средства и усовершенствованной системе доставки лекарственного средства для дальнейшего повышения стабильности соединения, повышения биодоступности, повышения растворимости, уменьшения нежелательных эффектов, достижения хронотерапии, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, и для повышения соблюдения пациентом режима лечения или для любой их комбинации. Примеры носителей, систем доставки лекарственных средств и усовершенствованных систем доставки лекарственных средств включают, но не ограничиваются, полимеры, например целлюлозу и ее производные, полисахариды, например декстран и его производные, крахмал и его производные, поли(виниловый спирт), акрилатные и метакрилатные полимеры, полимолочную и полигликолевую кислоты и их блок-сополимеры, полиэтиленгликоли, белки-носители, например, альбумин, гели, например термогелевые системы, например блок-сополимерные системы хорошо известные специалистам в данной области, мицеллы, липосомы, микросферы, наночастицы, жидкости кристаллы и их дисперсии, фазу L2 и ее дисперсии, хорошо известные специалистам в области техники фазового поведения в липидно-водных системах, полимерные мицеллы, многофазные эмульсии, самопроизвольно образующие эмульсию, самопроизвольно образующие микроэмульсию, циклодекстрины и их производные, а также дендримеры.

Комбинированная терапия.

Соединение или композицию согласно настоящему изобретению можно вводить как часть комбинированной терапии с агентом для лечения ожирения, гипертонии, дислипидемии или диабета.

В таких случаях два активных агентов могут вводиться вместе или по отдельности и как часть одного и того же фармацевтического состава или в виде отдельных составов.

Таким образом, соединение или композицию согласно настоящему изобретению можно дополнительно применять в комбинации с агентом против ожирения, включая, но не ограничиваясь, агонист рецептора глюкагон-подобного пептида 1, пептида YY или его аналога, антагонист каннабиноидного рецептора 1, ингибитор липазы, агонист меланокортинового рецептора 4, антагонист рецептора меланиноконцентрирующего гормона 1, фентермин (отдельно или в комбинации с топираматом), комбинацию ингибитора обратного захвата норэпинефрина/допамина и антагониста опиоидных рецепторов (например, комбинацию бупропиона и налтрексона) или серотонинергический агент (например, лоркасерин).

Соединение или композицию согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с антигипертоническим агентом, включая, но не ограничиваясь, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, блокатор рецептора ангиотензина II, мочегонные средства, бета-блокатор или блокатор кальциевых каналов.

Соединение или композицию согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с дислипидемическим агентом, включая, но не ограничиваясь, статины, фибрат, ниацин и/или ингибитор абсорбции холестерина.

Кроме того, соединение или композицию согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с антидиабетическим агентом, включая, но не ограничиваясь, бигуанид (например, метформин), сульфонилмочевину, меглитинид или глинид (например, натеглинид), ингибитор DPP-IV, ингибитор SGLT2, глитазон, различные агонисты GLP-1, инсулин или аналог инсулина. В предпочтительном варианте реализации соединение или его соль используют в комбинации с инсулином или аналогом инсулина, ингибитором DPP-IV, сульфонилмочевинной или метформином, в частности сульфонилмочевинной или метформином, для достижения требуемого гликемического контроля. Примеры аналогов инсулина включают, но не ограничиваются, Лантус, Новорапид, Хумалог, Новомикс и Актрафан НМ, Левемир и Апидра.

Примеры

Пример 1. Общий синтез аналогов глюкагона.

Твердофазный пептидный синтез (ТФПС) проводили на синтезаторе с СВЧ с применением стандартной стратегии Fmoc в НМП на полистирольной смоле (TentaGel S Ram). В качестве реагента сочетания применяли HATU вместе с ДИПЭА в качестве основания. Для снятия защиты применяли пиперидин (20% в НМП). Псевдопролины: Fmoc-Phe-Thr(psiMe,MeprO)-OH и Fmoc-Asp-Ser(psiMe,MeprO)-OH (приобретены у NovaBiochem) использовали там, где это было применимо.

Использованы следующие сокращения:

Woc:	трет-бутилоксикарбонил
ivDde:	1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексалиден)3-метил-бутил
Dde:	1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексалиден)-этил
ДХМ:	дихлорметан
ДМФА:	<i>N,N</i> -диметилформамид
ДИПЭА:	диизопропилэтиламин
ЭДТ:	1,2-этандитиол
EtOH:	этанол
Et ₂ O:	диэтиловый эфир
HATU:	<i>N</i> -[(диметиламино)-1 <i>H</i> -1,2,3-триазол[4,5- <i>b</i>]пиридин-1-ил-метилеи]- <i>N</i> -метилметанаминиум гексафторфосфат <i>N</i> -оксид
MeCN:	ацетонитрил
НМП:	<i>N</i> -метилпирролидон
ТФУ:	трифторуксусная кислота
ТИПС:	триизопропилсилан

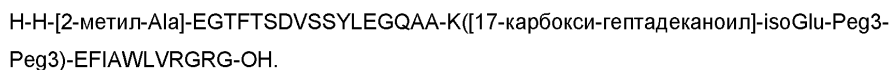
Расщепление.

Неочищенный пептид отщепляли от смолы путем обработки 95/2,5/2,5% (об./об.) ТФУ/ТИПС/вода при комнатной температуре (к.т.) в течение 2 ч. Большую часть ТФУ удаляли при пониженном давлении и неочищенный пептид осаждали и промывали диэтиловым эфиром и оставляли сушиться до постоянной массы при температуре окружающей среды.

Были синтезированы следующие соединения:

- 1 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDS-K([15-карбоксо-пентадеканойл]-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH₂.
- 2 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- 3 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
- 4 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- 5 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- 6 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- 7 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂
- 8 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-AAHDFIEWLESA-NH₂
- 9 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- 10 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
- 11 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂
- 12 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂
- 13 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
- 14 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂
- 15 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂
- 16 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-карбоксо-гептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂

Также синтезировали ацилированный аналог GLP-1 семаглутид (semaglutide), который имеет структуру



Пример 2. Анализ эффективности рецептора глюкагона и рецептора GLP-1.

кДНК, кодирующую либо рецептор глюкагона человека (Глюкагон-R) (первичный учетный номер P47871) или рецептор глюкагон-подобного пептида 1 человека (GLP-1R) (первичный учетный номер P43220) синтезировали и клонировали в экспрессионном векторе млекопитающих, содержащем маркер устойчивости к зеоцину.

Экспрессионные векторы млекопитающих, кодирующие Глюкагон-R или GLP-1-R, трансфицировали в клетки яичников китайского хомячка (CHO) при помощи метода трансфекции с реагентом Attrac-

тене. Стабильно экспрессирующие клоны получали путем селекции с зеоцином (250 мкг/мл) при ограниченном разбавлении клеток, устойчивых к давлению отбора. Отбирали клетки клонов, экспрессирующих Глюкагон-R и GLP-1-R, размножали и тестировали с применением анализа эффективности Глюкагон-R и GLP-1-R, как описано ниже. Один клон, экспрессирующий Глюкагон-R, и один клон, экспрессирующий GLP-1-R, выбрали для профилирования соединения.

Клетки CHO, экспрессирующие Глюкагон-R человека или GLP-1-R человека, высевали за 24 ч до проведения анализа в количестве 30000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты со 100 мкл питательной среды. В день анализа питательную среду удаляли и однократно промывали клетки при помощи 200 мкл буфера для анализа (буфер Кребса-Рингера - KRBH). Буфер удаляли и инкубировали клетки в течение 15 мин при комнатной температуре в 10 мкл KRBH (KRBH + 10 mM HEPES, 5 mM NaHCO₃, 0,1% (об./об) БСА) с 0,1 mM IBMX в деионизованной воде, содержащем возрастающие концентрации тестируемых пептидов. Реакцию останавливали добавлением лизирующего буфера (0,1 мас./об.% БСА, 5 mM HEPES, 0,3 об./об.% твина-20). После лизиса клеток в течение 10 мин при комнатной температуре лизаты переносили в 384-луночные планшеты и добавляли 10 мкл акцепторно/донорной смеси с шариками, входящей в состав набора AlphaScreen™ cAMP Functional Assay Kit. После одного часа инкубации при комнатной температуре в темноте определяли содержание цАМФ применением набора AlphaScreen™ cAMP Functional Assay Kit от Perkin-Elmer в соответствии с инструкциями производителя. EC₅₀ и относительные эффективности по сравнению с эталонными соединениями (глюкагон и GLP-1) рассчитывали с применением компьютеризованной аппроксимации кривой. Отношение GLP-1/глюкагон рассчитывали как указано ранее. См. табл. 1.

Таблица 1

Соединение	EC ₅₀ hGCGR CHO-K1 [нМ]	EC ₅₀ hGLP-1R CHO-K1 [нМ]	Отношение GLP-1/ Глюкагон
1	0,21 нМ	0,38 нМ	1,81
2	0,13 нМ	1,76 нМ	13,54
3	1,48 нМ	0,70 нМ	0,47
4	0,45 нМ	0,70 нМ	1,56
5	0,18 нМ	0,83 нМ	4,61
6	0,44 нМ	1,43 нМ	3,25
7	0,11 нМ	0,97 нМ	8,82
8	0,31 нМ	0,80 нМ	2,58
9	0,07 нМ	0,97 нМ	13,86
10	1,08 нМ	0,41 нМ	0,38
11	0,28 нМ	0,56 нМ	2,00
12	0,07 нМ	0,48 нМ	6,86
13	0,52 нМ	0,33 нМ	0,63
14	0,18 нМ	0,60 нМ	3,33
15	0,92 нМ	0,61 нМ	0,65
16	0,16 нМ	0,53 нМ	3,31

Пример 3. Агонистическая активность в отношении эндогенного рецептора GLP-1.

Агонистическую активность тестируемых соединений в отношении эндогенных рецепторов GLP-1 определяли с применением линии клеток инсулиномы мыши. Внутриклеточный цАМФ использовали как показатель активации рецептора.

Клетки культивировали в течение 24 ч при плотности 10000 клеток/на лунку в 384-луночном планшете. Питательную среду удаляли и в лунки добавляли 10 мкл буфера KRBH (130 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM MgSO₄, 1,5 mM CaCl₂), содержащего тестируемое соединение или GLP-1 (при увеличении концентраций от 0,1 пМ до 100 нМ) или контрольный растворитель (0,1% (об./об.) ДМСО, на 15 мин при температуре 26°C.

Содержание клеточного цАМФ измеряли с применением набора AlphaScreen cAMP Functional Assay Kit (Perkin Elmer). Измерение проводили с использованием Envision (Perkin Elmer) в соответствии с рекомендациями производителя.

Результаты преобразовывали в концентрацию цАМФ с использованием стандартной кривой, полученной цАМФ в KRBH буфере, содержащем 0,1% (об./об.) ДМСО. Полученные кривые цАМФ строили в координатах абсолютных концентраций цАМФ (нМ) от логарифма (концентрации тестируемого соединения) и анализировали с помощью программы для аппроксимации кривой XLfit.

Параметры, рассчитываемые для описания эффективности и агонистической активности каждого

тестируемого соединения в отношении эндогенных рецепторов GLP-1, представляли собой: pEC_{50} (отрицательное логарифмическое значение EC_{50} , т.е. концентрация, приводящая к полумаксимальному повышению уровня цАМФ, что отражает эффективность тестируемого соединения).

Процент контроля (% CTL) (% увеличения уровня цАМФ для каждой концентрации тестируемого соединения, нормализованный на основании GLP-1-индуцированного максимального ответа цАМФ (100% CTL)). См. табл. 2.

Таблица 2

Соединение	EC_{50} [нМ]
1	0,60 нМ
2	0,69 нМ
3	0,15 нМ
4	0,40 нМ
5	0,65 нМ
6	0,54 нМ
7	0,47 нМ
8	0,36 нМ
9	0,84 нМ
10	0,60 нМ
11	0,72 нМ
12	0,81 нМ
13	0,37 нМ
14	0,38 нМ
15	0,25 нМ
16	0,34 нМ

Пример 4. Агонистическая активность в отношении эндогенного рецептора глюкагона.

Агонистическую активность тестируемых соединений в отношении эндогенных рецепторов глюкагона определяли путем измерения их влияния на скорость синтеза гликогена в первичных гепатоцитах крыс. После активации рецептора глюкагона ожидалось ингибирование скорости синтеза гликогена. Скорость синтеза гликогена определяли путем подсчета количества радиоактивно меченой глюкозы, включенной в клеточные запасы гликогена за определенный период времени.

Первичные гепатоциты крысы культивировали при плотности 40000 клеток/на лунку в 24-луночном планшете в течение 24 ч при температуре 37°C и 5% CO₂.

Среду отбрасывали и клетки промывали ФСБ. Далее в лунки добавляли 180 мкл KRBH буфера, содержащего 0,1% БСА и глюкозы в концентрации 22,5 мМ, затем добавляли тестируемое соединение и 40 мКи/мл глюкозы D-[U14C] (20 мкл каждого). Инкубировали в течение 3 ч.

После периода инкубации буфер отбирали и однократно промывали клетки при помощи охлажденного на льду ФСБ, далее проводил лизис при помощи 100 мкл 1 моль/л NaOH при инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре.

Клеточные лизаты переносили в 96-луночные фильтр-планшеты и осаждали гликоген путем инкубации фильтр-планшетов в течение 120 мин при 4°C с последующей промывкой фильтр-планшетов 4 раза охлажденным на льду этанолом (70%). Полученный осадок фильтровали досуха и определяли количество включенной ¹⁴C-глюкозы с применением сцинтилляционного счетчика Topcount в соответствии с рекомендациями производителя.

Лунки с контрольными носителями (0,1% (об./об.) ДМСО в буфере KRBH) были включены в качестве эталонной величины для синтеза гликогена без ингибирования (100% CTL). Лунки без добавления глюкозы D-[U¹⁴C] были включены в качестве контроля для неспецифического фонового сигнала (вычитали из всех значений). Эндогенный пептид глюкагона использовали в качестве положительного контроля.

Все процедуры выполняли по меньшей мере в двух повторностях.

Параметры, рассчитываемые для описания эффективности и агонистической активности каждого тестируемого соединения в отношении эндогенных рецепторов глюкагона, представляли собой pEC_{50} и % CTL.

% CTL определяется путем вычисления процентного содержания CPM/на лунку в присутствии тестируемого соединения по сравнению с CPM/на лунку контрольного носителя после вычитания фона CPM/на лунку

$$[\text{CPM/на лунку(фон)} - \text{CPM/на лунку (образец)}] \times 100 / [\text{CPM/на лунку(фон)} - \text{CPM/на лунку(контроль)}]$$

Активатор рецептора глюкагона приводил к ингибированию скорости синтеза гликогена и давал значения % CTL от 0% CTL (полное ингибирование) до 100% CTL (ингибирование не наблюдалось).

Полученные кривые активности строили в координатах абсолютного импульсов (единица измере-

ния: число импульсов в минуту/образец) от логарифма (концентрации тестируемого соединения) и анализировали с помощью программы для аппроксимации кривой XLfit.

pEC_{50} (отрицательное логарифмическое значение EC_{50}) отражает эффективность тестируемого соединения.

Таблица 3

Соединение	EC_{50} [нМ]
1	0,85 нМ
2	0,11 нМ
3	0,94 нМ
4	1,79 нМ
5	0,21 нМ
6	0,80 нМ
7	0,34 нМ
8	0,29 нМ
9	0,11 нМ
10	1,53 нМ
11	0,95 нМ
12	0,45 нМ
13	0,43 нМ
14	0,19 нМ
15	3,63 нМ
16	0,19 нМ

Термины EC_{50} и pEC_{50} , приведенные в отношении активации GLP-1R, могут в равной степени рассматриваться как IC_{50} и pIC_{50} по отношению к синтезу гликогена.

Пример 5. Оценка фармакокинетических параметров.

Фармакокинетические параметры тестируемых соединений определяли после внутривенного введения крысам линии Хан/Вистар. В целях сравнения также тестировали ацилированный аналог GLP-1 семаглутид.

Самцов крыс Вистар получали от Charles River (Германия) массой приблизительно от 180 до 210 г в момент прибытия в испытательный центр. Крыс содержали в крысиных клетках европейского стандарта типа IV со световым циклом 12-часовой темноты и 12 ч света. В ходе исследования крыс содержали в стандартных крысиных клетках типа III. Диету Altromin 1324 (Altromin, Германия) и воду вводили в неограниченном количестве в течение всего периода эксперимента. Животных содержали в испытательном центре в течение не менее 4 дней для обеспечения правильной акклиматизации.

Первоначально соединения растворяли в 0,1% водном растворе аммиака до номинальной концентрации 2 мг/мл, а затем разводили до требуемой дозы (10 мкМ) в стерильном ФСБ, содержащем 25 мМ фосфатного буфера с pH 7,4. Внутривенные инъекции, соответствующие 20 нмоль/кг, вводили через латеральную хвостовую вену.

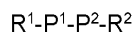
В моменты времени 0,08, 0,25, 0,5, 1,2,4, 8, 24, 32 и 48 ч после введения дозы из периорбитального сплетения отбирали образцы крови (200 мкл) в пробирки K_3 ЭДТА и центрифугировали в течение 5 мин при 4°C в течение 20 мин после отбора проб. Образцы плазмы (>100 мкл) переносили в 96-луночные ПЦР-планшеты, немедленно замораживали и хранили при -20°C до проведения анализа концентрации в плазме соединения, соответствующего GLP-1-глюкагону, с использованием ЖХ-МС/МС. Индивидуальные профили плазменных концентраций от времени анализировали с применением некомпартментного подхода с использованием ToxKin™ версии 3.2 (Unilog IT Services), а также определяли полученные фармакокинетические параметры. См. табл. 4.

Таблица 4

Соединение	Клиренс (мл/мин/кг)	Конечный период полувыведения (ч)	Среднее время удержания (ч)
2	0,11	9,1	13,6
3	0,056	23,4	28,7
4	0,11	13,7	17,6
Семаглутид	0,10	9,0	11,4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

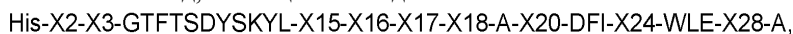
1. Соединение, представляющее собой аналог глюкагона, имеющее формулу



где R^1 представляет собой H, C_{1-4} алкил, ацетил, формил, бензоил или трифторацетил;

R^2 представляет собой OH или NH_2 ;

P^1 представляет собой пептид, имеющий последовательность



где X2 выбран из Aib, Ac3c, Ac4c и Ac5c;

X3 выбран из Gln и His;

X15 выбран из Asp и Glu;

X16 выбран из Glu и ψ ;

X17 выбран из Arg и ψ ;

X18 выбран из Ala и Arg;

X20 выбран из Lys и His;

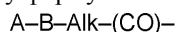
X24 выбран из Glu и ψ ;

X28 выбран из Ser и ψ ;

и P^2 отсутствует или представляет собой последовательность из 1-20 аминокислотных единиц, независимо выбранных из группы, состоящей из Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Drg и Orn,

при этом указанное соединение содержит ровно один ψ , и где указанный ψ представляет собой остаток Lys, Arg, Orn или Cys, в котором боковая цепь конъюгирована с заместителем, имеющим формулу $-Z^2Z^1$;

$-Z^1$ представляет собой ацильную группу формулы

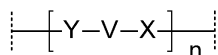


или сульфонильную группу формулы



где A представляет собой $-COOH$ или биоизомер карбоновой кислоты; B представляет собой связь, C_6 арилен или C_6 арилен-O-;

Alk представляет собой насыщенную или ненасыщенную жирную цепь от 6 до 18 атомов углерода в длину, необязательно замещенную одним или более заместителями, выбранными из фтора, C_{1-4} алкила, трифторметила, гидроксиметила, amino, гидроксила, C_{1-4} алкокси, оксо и карбоксила; $-Z^2$ - представляет собой спейсер, имеющий формулу



где каждый Y независимо представляет собой $-NH$, $-NR$, $-S$ или $-O$, при этом R представляет собой алкил, защитную группу или образует связь с другой частью спейсера Z^2 ; каждый X независимо представляет собой связь, $CO-$, $SO-$ или SO_2- ; при условии, что если Y представляет собой $-S$, X представляет собой связь; каждый V независимо представляет собой двухвалентный органический остаток, связывающий Y и X; и n составляет 1-10;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что

X2 представляет собой Ac4c и X20 представляет собой Lys;

X2 представляет собой Aib и X20 представляет собой His.

3. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что

X2 представляет собой Aib, если X15 представляет собой E; или

X15 представляет собой D, если X2 представляет собой Ac4c.

4. Соединение по п.1, отличающееся тем, что

X2 выбран из Aib и Ac4c;

X3 выбран из Gln и His;

X15 представляет собой Asp;

X16 представляет собой Glu;

X17 выбран из Arg и ψ ;

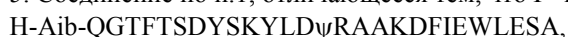
X18 выбран из Ala и Arg;

X20 представляет собой Lys;

X24 выбран из Glu и ψ ;

X28 выбран из Ser и ψ .

5. Соединение по п.1, отличающееся тем, что P^1 имеет последовательность, выбранную из



H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAHDFIEWLESA,
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE ψ AAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE ψ RAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE ψ RAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE ψ AAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE ψ RAKDFIEWLESA,
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI ψ WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI ψ WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI ψ WLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE ψ A и
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE ψ A.

6. Соединение по п.5, которое выбрано из

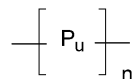
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD ψ RAAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE ψ RAAHDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE ψ AAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE ψ RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE ψ RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE ψ AAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE ψ RAKDFIEWLESA-NH₂,
 H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI ψ WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI ψ WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFI ψ WLESA-NH₂,
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE ψ A-NH₂ и
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLE ψ A-NH₂.

7. Соединение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что

-Z²- представляет собой -S_A⁻, -S_A-S_B⁻ или -S_B-S_A⁻;

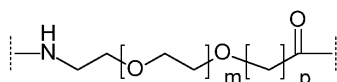
-S_A⁻ представляет собой одиночный аминокислотный остаток, выбранный из γ -Glu, α -Glu, α -Asp, β -Asp, Ala, β -Ala (3-аминопропановой кислоты) и Gaba (4-аминобутановой кислоты);

-S_B⁻ представляет собой линкер с общей формулой



где n составляет 1-10 и каждый P_U независимо выбран из P_Uⁱ и P_Uⁱⁱⁱ;

каждый P_Uⁱ независимо представляет собой остаток природной или искусственной аминокислоты; и
 каждый P_Uⁱⁱⁱ независимо представляет собой остаток с общей формулой



где m составляет 0-5 и p составляет 1, 3, 4 или 5.

8. Соединение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что Z¹-Z² выбран из

- (i) [17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3;
- (ii) [17-карбокситептадеканойл]-isoGlu;
- (iii) [13-карбокситридеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3;
- (iv) [карбокситефеноксинонанойл]-isoGlu-Peg3-Peg3;
- (v) [13-карбокситридеканойл]-isoGlu-Peg4-Peg4;
- (vi) [17-карбокситептадеканойл]-Peg3-Peg3-isoGlu;
- (vii) [17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG и
- (viii) [17-карбокситептадеканойл]-AA-Peg3-Peg3.

9. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что Z²-Z¹ представляет собой [17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3 или [17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG.

10. Соединение по п.4, отличающееся тем, что когда X24 или X28 представляет собой ψ , Z²Z¹ представляет собой [17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG.

11. Соединение по п.1, отличающееся тем, что P¹ имеет последовательность, выбранную из

H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA,
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA,
 H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA,
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA,

- H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA,
H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA,
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA,
H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA,
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA,
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA,
H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA,
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA,
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]isoGlu-GSGSGG)-WLESA,
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A и
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A.
12. Соединение по п.11, которое выбрано из
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAHDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu)-RAKDFIEWLESA-NH₂,
H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-
NH₂,
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-
A-NH₂ и
H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-
A-NH₂.
13. Соединение, представляющее собой H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLD-K([17-карбокситептадека-
нойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAAKDFIEWLESA-NH₂.
14. Соединение, представляющее собой H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLE-K([17-карбокситептадека-
нойл]-isoGlu-GSGSGG)-RAAKDFIEWLESA-NH₂.
15. Соединение, представляющее собой H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K([17-карбокситептадека-
нойл]-isoGlu-Peg3-Peg3)-RAKDFIEWLESA-NH₂.
16. Соединение, представляющее собой H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбок-
ситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂.
17. Соединение, представляющее собой H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFI-K([17-карбок-
ситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-WLESA-NH₂.
18. Соединение, представляющее собой H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLE-K([17-
карбокситептадеканойл]-isoGlu-GSGSGG)-A-NH₂.
19. Фармацевтически приемлемая соль соединения по любому из пп.2-18.
20. Фармацевтическая композиция для лечения нарушений обмена веществ, опосредованных ре-
цептором GLP-1, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по любому из
пп.1-19 и фармацевтически приемлемый носитель.
21. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-19:
(i) в способе предотвращения увеличения массы тела или содействия снижению массы тела;
(ii) в способе уменьшения уровней циркулирующих ЛПНП и/или увеличения отношения ЛПВП/
ЛПНП;
(iii) в способе лечения состояния, вызванного или характеризующегося избыточной массой тела;
или
(iv) в способе предотвращения или лечения ожирения, патологического ожирения, патологического

ожирения перед хирургическим вмешательством, воспаления, связанного с ожирением, заболевания желчного пузыря, связанного с ожирением, апноэ во сне, вызванного ожирением, диабета, метаболического синдрома, гипертонии, атерогенной дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца, заболевания периферических артерий, инсульта или микрососудистого заболевания.

22. Применение по п.21, отличающееся тем, что соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят как часть комбинированной терапии вместе с агентом для лечения диабета, ожирения, дислипидемии или гипертонии.

23. Применение по п.22, отличающееся тем, что:

(i) агент для лечения диабета представляет собой бигуанид, сульфонилмочевину, меглитинид или глинид, ингибитор DPP-IV, ингибитор SGLT2, глитазон, различные агонисты GLP-1, инсулин или аналог инсулина;

(ii) агент для лечения ожирения представляет собой агонист рецептора глюкагонподобного пептида 1, агонист рецептора пептида YY или его аналог, антагонист каннабиноидного рецептора 1, ингибитор липазы, агонист меланокортинового рецептора 4, антагонист рецептора меланиноконцентрирующего гормона 1, фентермин, комбинацию ингибитора обратного захвата норэпинефрина/допамина и антагониста опиоидных рецепторов, комбинацию бупропиона и налтрексона или серотонинергический агент;

(iii) агент для лечения гипертонии представляет собой ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, блокатор рецептора ангиотензина II, мочегонное средство, β -блокатор или блокатор кальциевых каналов;

(iv) агент для лечения дислипидемии представляет собой статин, фибрат, ниацин и/или ингибитор абсорбции холестерина.

24. Применение по п.23, отличающееся тем, что бигуанид представляет собой метформин, и/или глинид представляет собой натеглинид, и/или антагонист опиоидных рецепторов представляет собой комбинацию фентермина и топирамата.

