

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091284 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.08

(22) Дата подачи заявки
2018.12.14

(51) Int. Cl. *A61K 38/26* (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(54) АНАЛОГИ ИНКРЕТИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/608,644

(32) 2017.12.21

(33) US

(86) PCT/US2018/065605

(87) WO 2019/125929 2019.06.27

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

(72) Изобретатель:
Алсина-Фернандес Хорхе, Коскун
Тамер, Гуо Лили, Цюй Хунчан (US)

(74) Представитель:
Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)

(57) Предложены аналоги инкретина, которые обладают активностью в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона. Аналоги инкретина имеют структурные особенности, приводящие к сбалансированной активности и увеличенной продолжительности действия в отношении каждого из этих рецепторов. Также предложены способы лечения таких заболеваний, как сахарный диабет, дислипидемия, жировая болезнь печени, метаболический синдром, неалкогольный стеатогепатит и ожирение.

A1

202091284

202091284

A1

АНАЛОГИ ИНКРЕТИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Данное изобретение относится к аналогам инкретина, имеющим активность в отношении каждого из рецепторов глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП), глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и глюкагона. Аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут иметь структурные особенности, которые обеспечивают сбалансированную активность и могут иметь увеличенную продолжительность действия в отношении каждого из этих рецепторов. Такие аналоги инкретина могут быть полезны для лечения расстройств, таких как сахарный диабет 2 типа (СД2), дислипидемия, метаболический синдром, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) и / или ожирение.

В последние несколько десятилетий распространенность диабета продолжает расти. Сахарный диабет 2 типа (СД2) является наиболее распространенной формой диабета, составляющей примерно 90 % всех случаев диабета. СД2 характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, вызванным резистентностью к инсулину. Современный стандарт лечения СД2 включает диету и физические упражнения, а также лечение пероральными препаратами и инъекционными препаратами, снижающими уровень глюкозы, включая терапию на основе инкретина, такую как агонисты рецептора ГПП-1.

ГПП-1 представляет собой пептид из 36 аминокислот, основной биологически активный фрагмент которого продуцируется в виде С-концевого амидированного пептида из 30 аминокислот (ГПП-1₇₋₃₆; SEQ ID NO:2), который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и предотвращает гипергликемию у диабетиков. В настоящее время доступны различные аналоги ГПП-1 для лечения СД2, включая дулаглутид, экзенатид и лираглутид. Однако дозировка многих продаваемых в настоящее время агонистов рецептора ГПП-1 ограничена побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта, такими как тошнота и рвота. Если лечение пероральными препаратами и терапией на основе инкретина является недостаточным, рассматривается лечение инсулином. Несмотря на доступные варианты лечения, значительное количество людей, получающих одобренную терапию, не достигают целей гликемического контроля (см., например, Casagrande et al. (2013) *Diabetes Care* 36:2271-2279).

Неконтролируемый диабет может привести к одному или более нарушениям, которые влияют на заболеваемость и смертность таких людей. Одним из основных факторов риска развития СД2 является ожирение, и большинство людей с СД2 (~ 90 %) имеют избыточный вес или ожирение. Задokumentировано, что уменьшение ожирения тела приведет к улучшению связанных с ожирением сопутствующих заболеваний, включая гипергликемию и осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы. Таким образом, для лучшего управления ходом заболевания необходима терапия, эффективная в контроле глюкозы и уменьшении веса.

Ввиду этого новые изучаемые методы лечения включают соединения, обладающие не только активностью в отношении рецептора ГПП-1, но также активностью в отношении одного или более других рецепторов, таких как рецепторы ГИП и / или глюкагона. В самом деле, определенные соединения были описаны как имеющие тройную агонистическую активность (*то есть*, активность в отношении каждого из рецепторов глюкагона, ГПП-1 и ГИП). Например, в публикации международной заявки на патент № WO 2015/067716 описаны аналоги глюкагона, имеющие тройную агонистическую активность. Аналогично, в международной заявке на патент № WO 2016/198624 описаны аналоги эксендина-4, который сам является аналогом ГПП-1 и обладает тройной агонистической активностью. Аналогично, каждая международная заявка на патент № WO 2014/049610 и WO 2017/116204 описывает различные аналоги, обладающие тройной агонистической активностью. Кроме того, в международной заявке на патент № WO 2017/153375 описаны коагонисты глюкагона и ГПП-1, которые также обладают активностью в отношении ГИП.

Тем не менее, остается потребность в лечении, особенно СД2, которое способно обеспечить эффективный контроль глюкозы с преимуществами потери веса и благоприятным профилем побочных эффектов. Также существует потребность в доступных для применения терапевтических агентах с достаточно увеличенной продолжительностью действия, чтобы обеспечить введения доз так редко, как один раз в день, трижды в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, ориентированы на удовлетворение потребностей, указанных выше. Соответственно, это раскрытие описывает аналоги инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов

ГИП, ГПП-1 и глюкагона. Преимущественно, описанные в данном документе аналоги инкретина обладают сбалансированной активностью, позволяющей вводить дозы, которые обеспечивают достаточную активность в отношении каждого рецептора, чтобы обеспечить преимущества агонизма этого рецептора, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком большой активностью. Кроме того, описанные в данном документе аналоги инкретина имеют увеличенную продолжительность действия в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона, что позволяет дозировать их так редко, как один раз в день, трижды в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Таким образом, аналоги инкретина приводят к улучшенному контролю глюкозы, метаболическим эффектам, таким как снижение массы тела и / или улучшение состава тела, липидным эффектам, таким как снижение пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), и / или другим преимуществам, таким как увеличение костной массы или образование костной ткани, или уменьшение резорбции кости. В данном раскрытии также описаны эффективные способы лечения других расстройств или нарушений, включая ожирение, НАЖБП, НАСГ, дислипидемию и / или нарушение обмена веществ.

В одном варианте реализации изобретения предложен аналог инкретина, который имеет формулу:

$YX_2X_3GTX_6TSDYSIX_{13}LDKX_{17}AQX_{20}AFIEYLLEGPGSSGAPPPS$, где X_2 представляет собой Aib, X_3 представляет собой Q или H, X_6 представляет собой α MeF или α MeF(2F), X_{13} представляет собой L или α MeL, X_{17} представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, причем функциональная группа конъюгирована с C_{16} - C_{22} -жирной кислотой, X_{20} представляет собой Aib, Q или H (SEQ ID NO:5), и C-концевая аминокислота необязательно амидирована; или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ лечения заболевания, такого как дислипидемия, жировая болезнь печени, метаболический синдром, НАСГ, ожирение и СД2. Такие способы могут включать по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе. В некоторых случаях заболевание представляет собой жировую болезнь печени, ожирение, НАСГ или СД2.

В другом варианте реализации изобретения аналог инкретина, описанный в данном документе, предназначен для использования в терапии. Например, аналог инкретина, описанный в данном документе, предназначен для использования при лечении заболевания, такого как дислипидемия, жировая болезнь печени, 5 метаболический синдром, НАСГ, ожирение и СД2. В некоторых случаях заболевание представляет собой жировую болезнь печени, ожирение, НАСГ или СД2.

В другом варианте реализации изобретения аналог инкретина, описанный в данном документе, предназначен для использования в производстве лекарственного 10 средства для лечения дислипидемии, жировой болезни печени, метаболического синдрома, НАСГ, ожирения и СД2. В некоторых случаях заболевание представляет собой жировую болезнь печени, ожирение, НАСГ или СД2.

В другом варианте реализации изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая содержит аналог инкретина, описанный в данном документе, 15 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное раскрытие. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в 20 данном документе, могут быть использованы в практической реализации или испытании аналогов инкретина, фармацевтических композиций и способов, ниже описаны предпочтительные способы и материалы.

Более того, ссылка на элемент с помощью единственного числа не исключает возможности присутствия более одного элемента, если только контекст 25 явно не требует наличия одного и только одного элемента. Единственное число, как правило, означает «по меньшей мере один».

ГИП представляет собой пептид из 42 аминокислот (SEQ ID NO:4) и представляет собой инкретин, который играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы путем стимуляции секреции инсулина бета-клетками поджелудочной 30 железы в присутствии глюкозы.

ГПП-1 представляет собой пептид из 36 аминокислот (SEQ ID NO:2) и также является инкретином, который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и который, как было показано, предотвращает гипергликемию у диабетиков.

Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот (SEQ ID NO:1), который помогает поддерживать уровень глюкозы в крови путем связывания и активации рецепторов глюкагона на гепатоцитах, заставляя печень высвобождать глюкозу, хранящуюся в форме гликогена, посредством процесса, называемого гликогенолизом.

Оксинтомодулин (ОКСМ) представляет собой пептид из 37 аминокислот, включающий не только последовательность из 29 аминокислот глюкагона, но также удлинение карбоксиконцевого октапептида (SEQ ID NO:3), которое активирует рецепторы как глюкагона, так и ГПП-1, с незначительно более высокой активностью в отношении рецептора глюкагона по сравнению с рецептором ГПП-1.

В дополнение к СД2 инкретины и их аналоги, обладающие активностью в отношении одного или более рецепторов ГИП, ГПП-1 и / или глюкагона, были описаны как обладающие потенциальным терапевтическим значением при ряде других нарушений, заболеваний или расстройств, включая, например, ожирение, НАЖБП и НАСГ, дислипидемию, метаболический синдром, костные расстройства, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. См., например, Jall *et al.* (2017) *Mol. Metab.* 6:440-446; Carbone *et al.* (2016) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31:23-31; Finan *et al.* (2016) *Trends Mol. Med.* 22:359-376; Choi *et al.* (2017) *Potent body weight loss and efficacy in a NASH animal model by a novel long-acting GLP-1/Glucagon/GIP triple-agonist (HM15211)*, ADA Poster 1139-P; Ding (2008) *J. Bone Miner. Res.* 23:536-543; Tai *et al.* (2018) *Brain Res.* 1678:64-74; Müller *et al.* (2017) *Physiol. Rev.* 97:721-766; Finan *et al.* (2013) *Sci. Transl. Med.* 5:209; Hölscher (2014) *Biochem. Soc. Trans.* 42:593-600.

Используемый в данном документе термин «около» означает находящийся в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, заявленная концентрация, длина, молекулярная масса, pH, идентичность последовательности, временные рамки, температура или объем. Такое значение или диапазон может находиться в пределах порядка, как правило, в пределах 20 %, более типично в пределах 10 % и даже более типично в пределах 5 % от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое «около», будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области.

Используемый в данном документе и в отношении одного или более рецепторов ГИП, ГПП-1 или глюкагона термин «активность», «активировать»,

«активирование» и тому подобное означает способность соединений, таких как описанные в данном документе аналоги инкретина, связываться и вызывать ответ у рецептора (ов), измеренный с использованием анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

5 Используемый в данном документе термин «аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации» означает любую природную или синтетическую аминокислоту с функциональной группой, которая может быть конъюгирована с жирной кислотой, например, с помощью линкера. Примеры таких функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, алкинильные, алкенильные, амино, азидо, бром, карбоксильные, хлор, йод, и тиоловые группы. 10 Примеры природных аминокислот, содержащих такие функциональные группы, включают К (амино), С (тиол), Е (карбоксил) и D (карбоксил).

Используемый в данном документе термин «C₁₆-C₂₂-жирная кислота» означает карбоновую кислоту, имеющую от 16 до 22 атомов углерода. Подходящая 15 для применения в данном изобретении C₁₆-C₂₂-жирная кислота может представлять собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту. Используемый в данном документе термин «насыщенный» означает, что жирная кислота не содержит углерод-углеродных двойных или тройных связей.

Используемый в данном документе термин «эффективное количество» 20 означает количество, концентрацию или дозу одного или более аналогов инкретина, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей; введение одной или нескольких доз индивидууму, нуждающемуся в этом, обеспечивает целевой эффект у такого индивидуума с диагнозом или лечением. Эффективное количество может быть без труда установлено специалистом в 25 данной области техники с помощью известных технологий и наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для индивидуума, рассматривается множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: особь пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; 30 степень, вовлеченность или тяжесть заболевания или расстройства; реакция отдельного индивидуума; конкретный вводимый аналог инкретина; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранная схема введения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие имеющие значение обстоятельства.

Используемый в данном документе термин «увеличенная продолжительность действия» означает, что способность и активность связывания для аналога инкретина сохраняется в течение периода времени, превышающего врожденные человеческие пептиды ГИП, ГПП-1 и глюкагона, что позволяет вводить дозу по меньшей мере так редко, как один раз в день или даже трижды в неделю, дважды в неделю или раз в неделю. Профиль временного действия аналога инкретина может быть измерен с помощью известных методов фармакокинетических испытаний, таких как те, которые используются в приведенных ниже примерах.

Используемый в данном документе термин «аналог инкретина» означает соединение, имеющее структурное сходство с, но несколько отличий от каждого из ГИП, ГПП-1 и глюкагона, особенно человеческого ГИП (SEQ ID NO:4), ГПП-1 (SEQ ID NO:2) и глюкагона (SEQ ID NO:1). Описанные в данном документе аналоги инкретина включают аминокислотные последовательности, приводящие к соединениям, обладающим способностью и активностью в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона (*т.е.*, тройной агонистической активностью).

Используемый в данном документе термин «индивидуум, нуждающийся в этом» означает млекопитающее, такое как человек, с нарушением, заболеванием, расстройством или симптомом, требующим лечения или терапии, включая, например, перечисленные в данном документе.

Используемый в данном документе термин «лечение», «лечить» и тому подобное означает сдерживание, замедление, остановку или изменение прогрессирования или тяжести существующего нарушения, заболевания, расстройства или симптома.

Используемый в данном описании со ссылкой на аналог инкретина термин «тройная агонистическая активность» означает аналог инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона, особенно аналог, имеющий сбалансированную и достаточную активность в отношении каждого рецептора, чтобы обеспечить преимущества агонизма этого рецептора, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком большой активностью. Кроме того, аналоги инкретина, обладающие тройной агонистической активностью, имеют увеличенную продолжительность действия в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона, что успешно позволяет вводить

дозу так редко, как раз в день, трижды в неделю, дважды в неделю или один раз в неделю.

Используемый в данном документе термин «лечение» или «лечить» означает сдерживание, замедление, остановку или изменение прогрессирования или тяжести

5 существующего нарушения, заболевания, расстройства или симптома.

Используемый в данном описании со ссылкой на аналог инкретина термин «тройная агонистическая активность» означает аналог инкретина с активностью в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона, особенно аналог, имеющий сбалансированную и достаточную активность в отношении каждого

10 рецептора, чтобы обеспечить преимущества агонизма этого рецептора, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком большой активностью. Кроме того, аналоги инкретина, обладающие тройной агонистической активностью, имеют увеличенную продолжительность действия в отношении каждого из рецепторов глюкагона, ГИП и ГПП-1, что успешно позволяет вводить

15 дозу так редко, как раз в день, трижды в неделю, дважды в неделю или один раз в неделю.

Структурные особенности аналогов инкретина, описанные в данном документе, дают аналоги, имеющие достаточную активность в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона, чтобы получить благоприятное влияние

20 активности в отношении каждого рецептора (*m.e.*, тройную агонистическую активность), но не такую большую активность в отношении любого одного рецептора, чтобы либо подавить активность в отношении любого из двух рецепторов, либо привести к нежелательным побочным эффектам при введении в дозе, достаточной для того, чтобы привести к активности в отношении всех трех

25 рецепторах. Неограничивающие примеры таких структурных особенностей в определенных вариантах реализации изобретения со ссылкой на SEQ ID NO:5 включают αMeF или $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$ в положении 6, который, как было обнаружено, способствует оптимальной активности глюкагона, L или αMeL в положении 13, который, как было обнаружено, способствует оптимальной активности глюкагона и

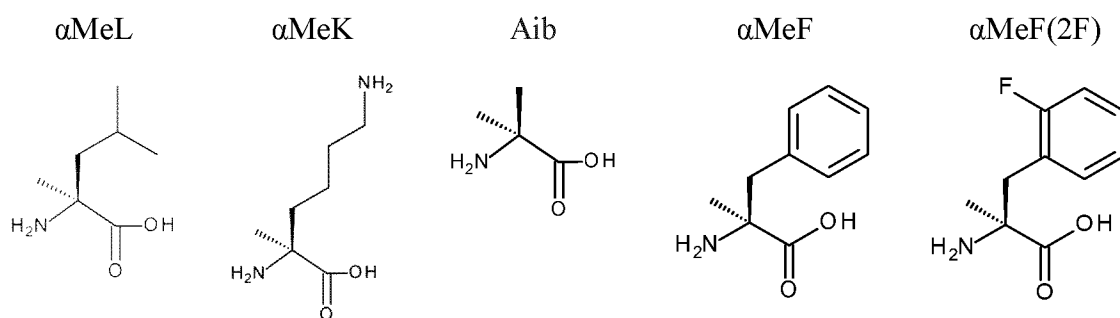
30 ГИП; Aib в положении 20, который, как было установлено, способствует оптимальной активности ГИП; ацилирование в положении 17, которое, как было установлено, способствует оптимальной активности глюкагона; и Y в положении 25, которое, как было установлено, способствует оптимальной активности глюкагона и / или ГИП. Другие примеры таких структурных особенностей

включают аминокислоты, описанные в данном документе, в позициях 22, 24 и 28-39, которые, как было обнаружено, способствуют оптимальному связыванию и активности в отношении всех трех рецепторов.

Структурные особенности аналогов инкретина, описанных в данном документе, также дают аналоги, имеющие многие другие полезные свойства, относящиеся к их способности иметь терапевтические воздействия, в том числе повышение растворимости аналогов в водных растворах, улучшение химической и физической стабильности препарата, расширение фармакокинетического профиля и минимизация потенциала в отношении иммуногенности. Неограничивающие примеры конкретных структурных особенностей, которые приводят к таким свойствам, включают ацилирование в положении 17 C₂₀-жирной кислотой, которое способствует оптимальному фармакокинетическому (РК) профилю и способности к доработке; Aib или H в положении 20, что способствует оптимальному профилю РК и способности к доработке; и аминокислоты, описанные в данном документе, в положениях 22, 24 и 28-39, которые способствуют оптимальному РК, иммуногенности, способности к доработке и стабильности.

Следует отметить, что вышеприведенные перечни структурных особенностей являются примерными, а не исчерпывающими, и что комбинация полезных характеристик примерных аналогов, описанных в данном документе, не является результатом какой-либо модификации в отдельности, а вместо этого достигается с помощью новых комбинаций структурных особенностей, описанных в данном документе. Кроме того, вышеописанные эффекты вышеприведенных перечней модификаций не являются уникальными, так как многие из этих модификаций также имеют другие эффекты, важные для характеристик описанных в данном документе соединений, как это описано ниже.

Аминокислотные последовательности аналогов инкретина, описанных в данном документе, включают встречающиеся в природе аминокислоты, как правило, изображаемые в данном документе с использованием стандартных однобуквенных кодов (*например*, L = лейцин), а также альфа-метилзамещенные остатки природных аминокислот (*например*, α-метил-лейцин (αMeL), α-метил-лизин (αMeK), α-метил-фенилаланин (αMeF) и α-метил-2-фторфенилаланин (αMeF(2F)) и некоторые другие синтетические аминокислоты, такие как альфа-аминоизомасляная кислота (Aib). Структуры этих аминокислот изображены ниже:



Как было отмечено выше, аналоги инкретина, описанные в данном документе, имеют структурное сходство, но также многие структурные отличия от любого из природных пептидов человека. Например, при сравнении с врожденным человеческим ГИП (SEQ ID NO:4) аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают модификации в одном или нескольких положениях 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 18-21, 23-25, 28-29 и 30-42. В некоторых случаях описанные в данном документе аналоги инкретина включают модификации аминокислот врожденного человеческого ГИП (SEQ ID NO:4) в каждом из положений 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 18, 21, 23-25, 29 и 30-42. В определенных случаях, аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают следующие аминокислотные модификации: Aib в положении 2; Q или H в положении 3; α MeF или α MeF(2F) в положении 6; T в положении 7; L или α MeL в положении 13; L в положении 14; модифицированный остаток K в положении 17, который модифицирован путем конъюгирования с эпсилон-аминогруппой боковой K-цепи с C₁₆-C₂₂-жирной кислотой, необязательно, с помощью линкера; A в положении 18; Q в положении 19; Aib, Q или H в положении 20; A в положении 21; I в положении 23; E в положении 24; Y в положении 25; E в положении 28; G в положении 29; и замену аминокислот в положениях 30-42 следующей аминокислотной последовательностью: GPSSGAPPPS (SEQ ID NO:12) (и укороченные аналоги хвоста). В других случаях, аналоги инкретина, описанные в данном документе, являются амидированными. В дополнение к описанным в данном документе модификациям аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут включать одну или более дополнительных модификаций аминокислот, однако, при условии, что аналоги остаются способными связываться и активировать каждый из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона.

Как было отмечено выше, аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают фрагмент молекулы жирной кислоты, конъюгированный,

например, посредством линкера с природной или синтетической аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации. Такая конъюгация иногда именуется ацилированием. В определенных случаях, аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, может представлять собой

5 К, С, Е и D. В особых случаях, аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, представляет собой К, причем конъюгация происходит с эпсилон-аминогруппой боковой К-цепи.

Ацилирование аналогов инкретина, описанных в данном документе, происходит в положении 17 в SEQ ID NO:5, которое, как было определено,

10 является оптимальным местом для присоединения этой структуры. Жирная кислота и, в некоторых вариантах реализации изобретения, линкер действуют как связующее для альбумина и обеспечивают потенциал для образования соединений длительного действия.

В описанных в данном документе аналогах инкретина используется C₁₆-C₂₂-

15 жирная кислота, химически конъюгированная с функциональной группой аминокислоты либо прямым соединением, либо линкером. Длина и состав жирных кислот влияет на период полувыведения аналогов инкретина, их активность в моделях на животных *in vivo*, а также их растворимость и стабильность. Конъюгирование с насыщенной жирной монокарбоновой или дикарбоновой C₁₆-

20 C₂₂-кислотой приводит к получению аналогов инкретина, которые демонстрируют целевой период полувыведения, целевую активность в моделях на животных *in vivo* и целевые характеристики растворимости и стабильности.

Примеры насыщенных жирных C₁₆-C₂₂-кислот для применения по данному документу включают, но не ограничиваются ими, пальмитиновую кислоту

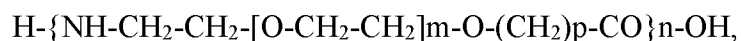
25 (гексадекановую кислоту) (монокарбоновую C₁₆-кислоту), гексадекандионовую кислоту (дикарбоновую C₁₆-кислоту), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту) (монокарбоновую C₁₇-кислоту), гептадекандионовую кислоту (дикарбоновую C₁₇-кислоту), стеариновую кислоту (монокарбоновую C₁₈-кислоту), октадекандионовую кислоту (дикарбоновую C₁₈-кислоту), нонадециловую кислоту

30 (нонадекановую кислоту) (монокарбоновую C₁₉-кислоту), нонадекандионовую кислоту (дикарбоновую C₁₉-кислоту), арахидоновую кислоту (эйкозановую кислоту) (монокарбоновую C₂₀-кислоту), эйкозандионовую кислоту (дикарбоновую C₂₀-кислоту), геникозиловую кислоту (генэйкозановую кислоту) (монокарбоновую C₂₁-кислоту), геникозационовую кислоту (дикарбоновую C₂₁-кислоту), бегеновую

кислоту (докозановую кислоту) (монокарбоновую C₂₂-кислоту), докозационовую кислоту (дикарбоновую C₂₂-кислоту), включая их разветвленные и замещенные производные.

В определенных случаях, жирная C₁₆-C₂₂-кислота может представлять собой насыщенную C₁₈-монокарбоновую кислоту, насыщенную C₁₈-дикарбоновую кислоту, насыщенную C₁₉-монокарбоновую кислоту, насыщенную C₁₉-дикарбоновую кислоту, насыщенную C₂₀-монокарбоновую кислоту, насыщенную C₂₀-дикарбоновую кислоты, и их разветвленные и замещенные производные. В более конкретных случаях, жирная C₁₆-C₂₂-кислота может представлять собой стеариновую кислоту, арахиновую кислоту или эйкозационовую кислоту, особенно арахиновую кислоту.

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



где m равен любому целому числу от 1 до 12, n равен любому целому числу от 1 до 12, и p равен 1 или 2.

В определенных случаях, линкер может содержать один или более (2-[2-(2-амино)этокси]ацетильных) фрагментов, необязательно в комбинации с от одной до четырех аминокислот.

В тех случаях, когда линкер содержит по меньшей мере одну аминокислоту, аминокислота может представлять собой от одного до четырех аминокислотных остатков Glu или γ Glu. В некоторых случаях линкер может содержать один или два аминокислотных остатка Glu или γ Glu, включая их D-формы. Например, линкер может содержать либо один, либо два аминокислотных остатка γ Glu. В альтернативном варианте, линкер может содержать от одного до четырех аминокислотных остатков (таких как, например, аминокислоты Glu или γ Glu), используемых в комбинации с вплоть до тридцати шести (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетильных) фрагментов. Конкретно, линкер может представлять собой комбинации от одной до четырех E или γ E-аминокислот и от одного до четырех (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетильных) фрагментов. В других случаях линкер может представлять собой комбинации одной или двух

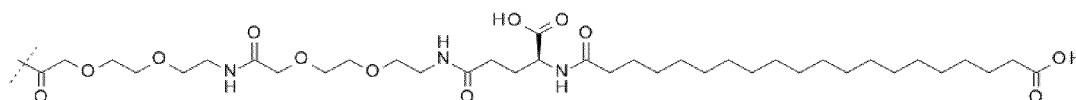
аминокислот γ Glu и одного или двух (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетильных) фрагментов.

В конкретном случае аналоги инкретина, описанные в данном документе, содержат такие компоненты, как линкер и жирную кислоту, и имеют структуру

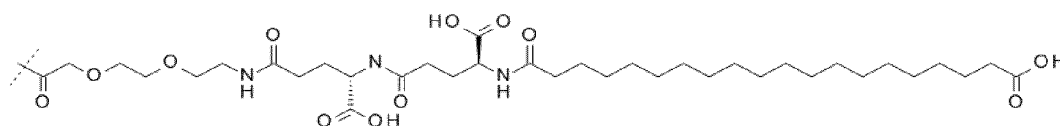
5 следующей формулы:



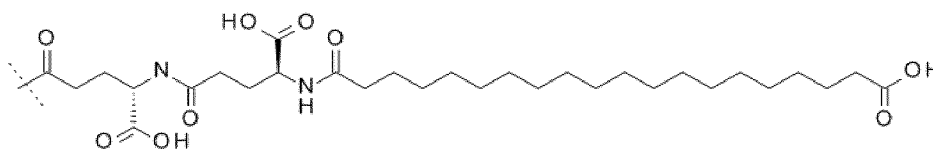
где, а равно 0, 1 или 2, b равно 1 или 2 и с равно 16 или 18. В конкретном случае а равно 2, b равно 1 и с равно 18, структура которого изображена ниже:



10 В другом конкретном случае а равно 1, b равно 2 и с равно 18, структура которого изображена ниже:

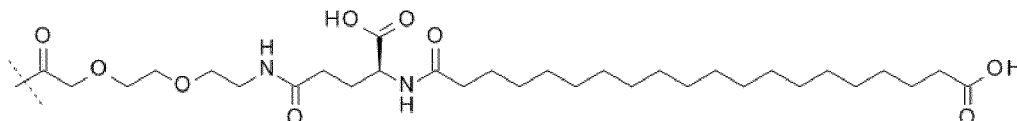


В другом конкретном случае а равно 0, b равно 2 и с равно 18, структура которого изображена ниже:



15

В другом конкретном случае а равно 1, b равно 1 и с равно 18, структура которого изображена ниже:



Как показано в химических структурах из примеров 1-6 ниже, фрагменты

20 линкер-жирная кислота, описанные выше, могут быть связаны с эпсилон(ϵ)-амино- группой боковой цепи лизина (K).

Сродство описанных в данном документе аналогов инкретина к каждому из рецепторов ГИП, ГПП-1 и глюкагона может быть измерено с помощью методик, известных в данной области техники, для измерения уровней связывания с

рецептором, включая, например, методики, описанные в приведенных ниже примерах, и его, как правило, выражают как величину константы ингибирования (K_i). Активность аналогов инкретина, описанных в данном документе, в отношении каждого из рецепторов также может быть измерена с использованием методик, известных в данной области техники, включая, например, анализы активности *in vitro*, описанные ниже, и ее, как правило, выражают в виде величины эффективной концентрации 50 (EC_{50}), которая представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальное симулирование на кривой доза-ответ.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, которые могут быть введены парентеральным путем (*например*, подкожным, внутривенным, внутривенным, внутримышечным или трансдермальным). Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. *См., например*, Remington: the Science and Practice of Pharmacy (Troy, Ed., 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В определенных случаях аналоги инкретина вводят подкожно.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут вступать в реакцию с любой из целого ряда неорганических и органических кислот / оснований для образования фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты / основания. Фармацевтически приемлемые соли и стандартные методики их получения известны в данной области техники (*см., например*, Stahl, *et al.* Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для применения по данному изобретению включают соли натрия, трифторацетат, гидрохлорид и ацетат.

В раскрытии также предложены и, следовательно, охвачены новые промежуточные соединения и способы синтеза аналогов инкретина, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли. Промежуточные соединения и аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. Например, способ с использованием химического синтеза проиллюстрирован в приведенных ниже примерах. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных путей можно объединять различным образом для получения

соединений, описанных в данном документе. Реагенты и исходные вещества легко доступны специалистам в данной области техники.

Определенные аналоги инкретина, описанные в данном документе, как правило, эффективны в широком диапазоне доз. Например, дозы для введения один
5 раз в неделю могут находиться в диапазоне от около 0,01 до около 30 мг/ человек / неделя, в диапазоне от около 0,1 до около 10 мг / человек / неделя или даже в диапазоне от около 0,1 до около 3 мг / человек / неделя. Таким образом, аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут вводиться один раз в день, три
10 раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю, особенно один раз в неделю.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения различных нарушений, расстройств, заболеваний или симптомов. В частности, предложены способы лечения СД2 у индивидуума, причем такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму,
15 нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения ожирения у индивидуума, причем такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина,
20 описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы стимулирования нетерапевтической потери веса у индивидуума, причем такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически
25 приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения метаболического синдрома у индивидуума, причем такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой
30 соли.

Кроме того, предложены способы лечения НАСГ у индивидуума, причем такие способы включают по меньшей мере этап введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, предложены способы лечения ЖБП у индивидуума, причем такие способы включают по меньшей мере этап введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

5 В этих способах эффективность аналогов инкретина можно оценить, например, наблюдая значительное снижение уровня глюкозы в крови, наблюдая значительное повышение инсулина, наблюдая значительное снижение HbA1c и / или наблюдая значительное снижение массы тела.

В альтернативном варианте, аналоги инкретина, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемые соли могут быть использованы для улучшения прочности костной ткани у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых случаях, человек, нуждающийся в этом, страдает от гипоостоза или гипоостеоидоза, или выздоравливает после перелома кости, ортопедической процедуры, протезирования, установки зубного имплантата и / или спондилодеза.

15 Описанные в данном документе аналоги инкретина также можно использовать для лечения других расстройств, таких как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера.

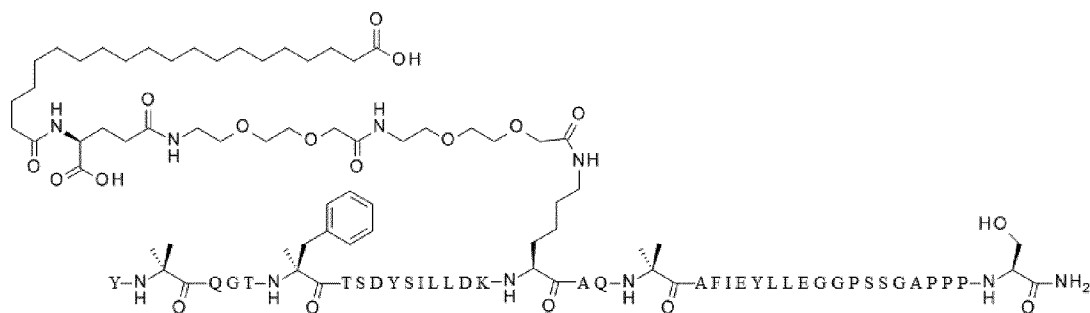
СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

20 Пример 1:

Пример 1 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокс)этокс]ацетил)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:6).

25 Ниже приведено изображение структуры примера 1 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib₂, α MeF₆, K₁₇ и Aib₂₀, для которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены:



Пептидный остов Примера 1 синтезируют с помощью такого химического состава, как флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)/трет-бутил (t-Bu), на установке для синтеза пептидов Symphony X (Protein Technologies, Inc., Тускон, Аризона).

- 5 Смола состоит из 1 % сшитого полистирола-ДВБ (смола Fmoc-Rink-MBHA, с низкой нагрузкой 100-200 меш, EMD Millipore) при замещении 0,3-0,4 мэкв/г. Используются стандартные защитные группы боковых цепей. Fmoc-Lys(Mtt)-OH) используется для лизина в положении 17, а Boc-Tyr(tBu)-OH) используется для тирозина в положении 1. Группы Fmoc удаляют перед каждым этапом сочетания (2
- 10 × 7 минут) с помощью 20 % пиперидина в ДМФ. Все стандартные аминокислотные сочетания проводят в течение 1 часа до получения первичного амина и в течение 3 часов до получения вторичного амина, используя равные молярные соотношения аминокислоты Fmoc (0,3 мМ), диизопропилкарбодиимида (0,9 мМ) и оксима (0,9 мМ) при 9-кратном молярном избытке по сравнению с теоретическим наполнением
- 15 пептидом. Исключением являются сочетания с C α -метилованными аминокислотами, для которых сочетание проходит в течение 3 часов. После завершения синтеза пептидного остова смолу 6 раз тщательно промывают ДХМ для удаления остаточного ДМФ. Защитная группа Mtt на лизине в положении 17 селективно удаляется из пептидной смолы с помощью двух обработок 30%-ным
- 20 гексафторизопропанолом (Oakwood Chemicals) в ДХМ (2 × 40-минутная обработка).

- Последующее присоединение фрагмента линкер-жирная кислота осуществляют путем сочетания 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH, ChemPer, Inc.), трет-бутилового эфира Fmoc-
- 25 глутаминовой кислоты α (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), моно-OtBu-эйкозандионовой кислоты (WuXi AppTec, Шанхай, Китай). Для каждого сочетания, которое длится 1 час, используют 3-кратный избыток реагентов (AA: PyAOP: ДИПЭА = 1: 1: 1 моль/моль).

После завершения синтеза пептидную смолу промывают ДХМ, и затем тщательно высушивают на воздухе. Сухую смолу обрабатывают 10 мл раствора для отщепления продукта (трифторуксусная кислота: вода: триизопропилсилан, 95:2,5:2,5 об./об.) в течение 2 часов при комнатной температуре. Смолу отфильтровывают, дважды промывают 2 мл чистой ТФУ, и объединенные фильтраты обрабатывают 5-кратным количеством холодного диэтилового эфира (-20°C) для осаждения неочищенного пептида. Затем суспензию пептида/эфира центрифугируют при 3500 об/мин в течение 2 мин с образованием твердого осадка, надосадочную жидкость сцеживают, и твердый осадок растирают с эфиром два дополнительных раза и сушат *в вакууме*. Неочищенный пептид растворяют в 20 % ацетонитрила / 20 % уксусной кислоты / 60 % воды и очищают с помощью ОФ-ВЭЖХ на препаративной колонке Luna 5 мкм с фенилгексилдом (21 x 250 мм, Phenomenex) с линейными градиентами 100 % ацетонитрила и 0,1 % буферной системы ТФУ / вода (30-50 % ацетонитрила за 60 минут). Чистота пептида оценивается с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ, а критерии объединения составляют > 95 %. Найдено, что чистота основного пика в Примере 1 составляет 99,2 %. Последующая лиофилизация пика конечного основного продукта дает соль ТФУ лиофилизированного пептида. Молекулярную массу определяют методом ЖХ-МС (наблюдаемая: $M+4H^{+}/4 = 1219,9$; расчетная $M+4H^{+}/4 = 1220,1$).

20

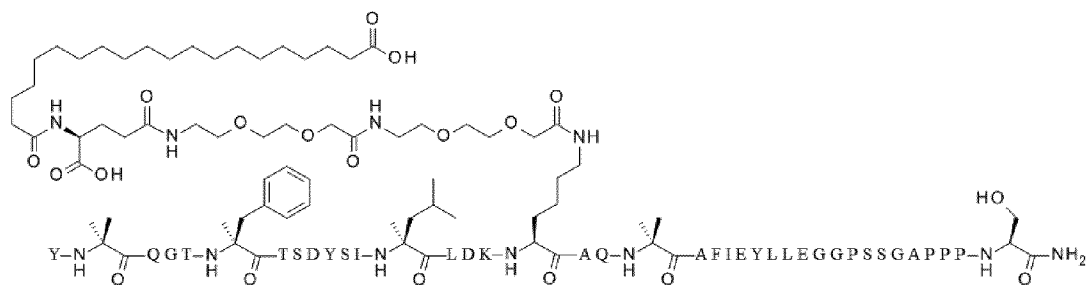
Пример 2:

Пример 2 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGPGSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:7).

25

Ниже приведено изображение структуры Примера 2 с помощью стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib₂, α MeF₆, α MeL₁₃, K₁₇ и Aib₂₀, для которых структуры аминокислотных остатков были расширены:



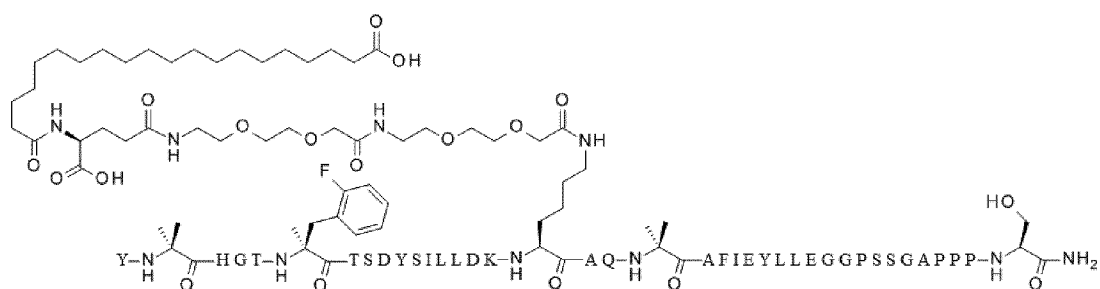
Процессы, аналогичные описанным выше для Примера 1, используются для синтеза пептидного остова, для конъюгирования фрагмента линкер-жирная кислота, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы Примера 2.

Пример 3:

Пример 3 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

10 Y-Aib-HGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:8).

Ниже приведено изображение структуры Примера 3 с помощью стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib₂, α MeF(2F)₆, K17 и Aib₂₀, для которых структуры аминокислотных остатков
15 были расширены:



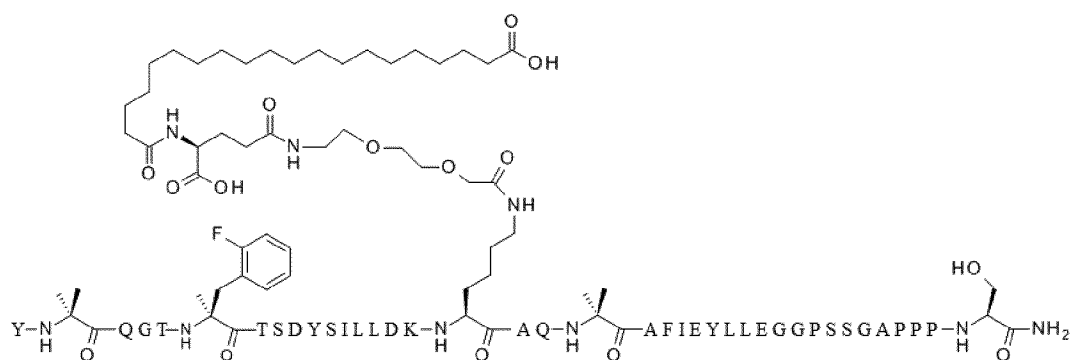
Процессы, аналогичные описанным выше для Примера 1, используются для синтеза пептидного остова, для конъюгирования фрагмента линкер-жирная кислота, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы Примера 3.

Пример 4:

Пример 4 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:9).

Ниже приведено изображение структуры Примера 4 с помощью стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков
 5 Aib2, α MeF(2F)6, K17 и Aib20, для которых структуры аминокислотных остатков были расширены:



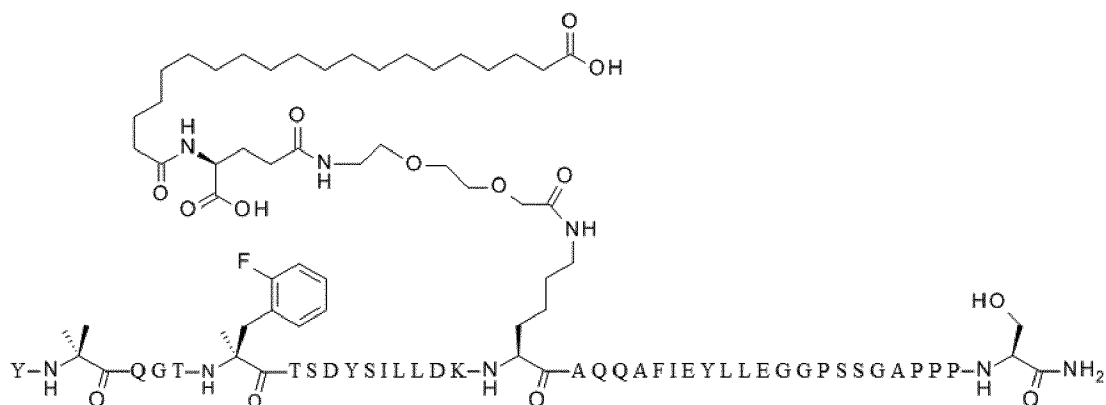
Процессы, аналогичные описанным выше для Примера 1, используются для синтеза пептидного остова, для конъюгирования фрагмента линкер-жирная
 10 кислота, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы Примера 4.

Пример 5:

Пример 5 представляет собой соединение, представленное следующим
 15 описанием:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:10).

Ниже приведено изображение структуры Примера 5 с помощью стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков
 20 Aib2, α MeF(2F)6 и K17, для которых структуры аминокислотных остатков были расширены:



Процессы, аналогичные описанным выше для Примера 1, используются для синтеза пептидного остова, для конъюгирования фрагмента линкер-жирная кислота, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы Примера

5 5.

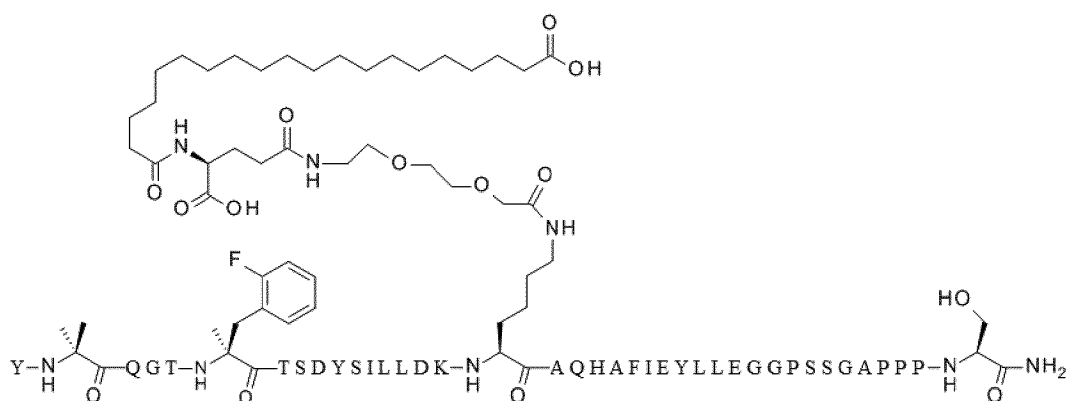
Пример 6:

Пример 6 представляет собой соединение, представленное следующим описанием:

10 Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:11).

Ниже приведено изображение структуры Примера 6 с помощью стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, α MeF(2F)6 и K17, для которых структуры аминокислотных остатков были расширены:

15



Процессы, аналогичные описанным выше для Примера 1, используются для синтеза пептидного остова, для конъюгирования фрагмента линкер-жирная

кислота, для проверки чистоты и для подтверждения молекулярной массы Примера 6.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ IN VITRO

5 Связывающая способность:

Испытания конкурентного связывания радиолиганда проводят для определения константы равновесной диссоциации для соединений из Примеров и сравнительных молекул. В таком анализе используют методы сцинтилляционного анализа сближения (САС) и мембраны, полученные из трансфицированных клеток 10 НЕК293 сверхэкспрессирующих рецептор ГИП человека (ГИПР), рецептор ГПП-1 (ГПП-1Р) или рецептор глюкагона человека (ГкгР).

Анализы проводят в присутствии бацитрацина в качестве неспецифического блокирующего агента для предотвращения связывания ацилированных фрагментов исследуемых аналогов с белковыми компонентами, используемыми в стандартных 15 аналитических буферах (*например*, альбумин).

Кривые конкуренции представлены в виде процента удельного ингибирования (ось Y) от логарифмической концентрации соединения (ось X) и проанализированы с помощью четырехпараметрической нелинейной регрессионной аппроксимации с переменным наклоном (ABase или Genedata). 20 Значения K_i рассчитывают в соответствии с уравнением $K_i = IC_{50}/(1+(D/K_d))$, где IC_{50} представляет собой концентрацию соединения, приводящую к 50%-ному ингибированию связывания, D представляет собой концентрацию радиолиганда, используемого в анализе, и K_d представляет собой константу равновесной диссоциации для рецептора и радиолиганда, определенную из анализа насыщения 25 соединения (приведено в Таблице 1 ниже).

Таблица 1. Константы равновесной диссоциации (K_d), определенные из анализа насыщения соединения.

K_d , нМ		
ГПП-1Р	ГкгР	ГИПР
1,2	3,9	0,14

Значения K_i аналогов из Примеров и сравнительных молекул приведены в Таблице 2.

30 Таблица 2. Связывающая способность *in vitro* (K_i) Примеров и Компараторов для человеческого ГИПР, ГПП-1Р и ГкгР.

Молекула	K _i , нМ (РЭМ, n)		
	ГкГР	ГИПР	ГПП-1Р
чГкГ	3,1 (0,5, 4)		
чГИП		0,12 (0,02, 4)	
чГПП-1			1,2 (0,2, 4)
Пример 1	0,955 (0,182, 3)	0,0278 (0,00297, 3)	2,51 (0,930, 3)
Пример 2	1,49 (0,201, 3)	0,0413 (0,0129, 3)	2,41 (se=0,720, 3)
Пример 3	0,469 (0,121, 5)	0,0684 (0,0193, 5)	1,66 (se=0.950, 5)
Пример 4	0,637 (0,0319, 3)	0,0832 (0,0273, 3)	1,21 (se=0.0737, 3)
Пример 5	0,419 (0,0430, 4)	0,0347 (0,0112, 4)	1,17 (se=0.674, 4)
Пример 6	0,382 (0,0587, 4)	0,0388 (0,00813, 4)	0,822 (se=0.379, 4)

ПРИМЕЧАНИЕ. Определитель (>) указывает, что данные не достигли 50%-ного ингибирования относительно максимального связывания, в результате чего K_i рассчитывали с использованием самой высокой концентрации, исследованной в анализе. n = 1/x означает, что только одно значение из общего числа повторов (x) используется для выражения среднего значения. РЭМ рассчитывается только при наличии n = 2 или более независимых результатов.

Как видно из Таблицы 2, аналоги из Примеров имеют связывающую способность в отношении каждого из рецепторов ГИП, ГПП-1 и ГкГ.

10 Функциональная активность:

Функциональную активность определяют в клональных клеточных линиях НЕК-293, экспрессирующих ГИП-Р-, ГПП-1Р- и ГкГР. Каждую сверхэкспрессирующую рецептор клеточную линию обрабатывают пептидом (20-точечная CRC, 2,75-кратное прямое разбавление Labcyte Echo) в DMEM (Gibco Cat # 31053) с добавлением 1X GlutaMAXTM (Gibco Cat # 35050), 0,25% ФБС (фетальной бычьей сыворотки, Gibco Cat # 26400), 0,05 % фракции V БСА (бычьего сывороточного альбумина, Gibco Cat # 15260), 250 мкМ ИБМК и 20 мМ ГЭПЭС (Gibco Cat # 15630) в анализируемом объеме 20 мкл.

После 60-минутной инкубации при комнатной температуре результирующее увеличение внутриклеточного цАМФ количественно определяют с помощью набора для анализа CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Вкратце, уровни цАМФ в клетке определяют путем добавления конъюгата цАМФ-d2 в буфер для лизиса клеток с последующим добавлением антитела анти-цАМФ-Eu³⁺-криптата, также в буфере для лизиса клеток. Полученный образец для анализа конкуренции инкубируют в течение по меньшей мере 60 минут при комнатной температуре и затем определяют с помощью прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и излучением при 665 нм и 620 нм. Единицы измерения Envision (излучение

при 665 нм/620 нм*10000) были обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразованы в нМ цАМФ в лунке с помощью стандартной кривой цАМФ.

Количество вырабатываемого цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразуют в процент от максимального ответа, наблюдаемого с человеческим ГПП-1(7-36)NH₂, человеческим Гкг или человеческим ГИП(1-42)NH₂. Относительное значение EC₅₀ получают путем нелинейного регрессионного анализа с помощью процентного максимального отклика от концентрации добавляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами.

Данные для аналогов из Примеров и чГИП(1-42)NH₂, чГПП-1(7-36)NH₂ и чГкг приведены в Таблице 3 ниже.

Таблица 3. Функциональная активность цАМФ (EC₅₀) для аналогов из Примеров и Компараторов в присутствии ФБС и БСА.

	цАМФ EC ₅₀ , нМ (РЭМ, n)		
	ГкгР	ГИПР	ГПП-1Р
чГкг	0,0114 (0,0014, 12)		
амид чГИП		0,0979 (0,0088, 12)	
амид чГПП-1			0,0424 (0,0043, 12)
Пример 1	6,33 (0,905, 3)	1,82 (0,332, 3)	12,6 (1,42, 3)
Пример 2	4,75 (0,827, 3)	1,34 (0,216, 3)	11,6 (2,26, 3)
Пример 3	3,46 (0,835, 7)	1,37 (0,518, 7)	13,1 (3,06, 7)
Пример 4	1,78 (0,400, 5)	1,37 (0,422, 5)	10,6 (3,29, 5)
Пример 5	1,87 (0,254, 5)	1,91 (0,618, 5)	13,0 (2,59, 5)
Пример 6	1,76 (0,218, 4)	1,41 (0,363, 4)	8,94 (2,76, 4)

ПРИМЕЧАНИЕ: определение EC₅₀ человеческого ГПП-1(7-36)NH₂ на человеческом ГПП-1Р, человеческого Гкг на человеческом ГкгР и человеческого ГИП(1-42)NH₂ на человеческом ГИП-Р: диапазоны концентрации пептидов составляли от 448 пМ до 99,5 нМ. Определение EC₅₀ для Примеров на человеческом ГПП-1Р, человеческом ГкгР и человеческом ГИП-Р: диапазоны концентраций пептида составляли от 51,5 фМ до 11,4 мкМ.

Как видно из Таблицы 3, в присутствии ФБС и БСА типичные аналоги обладают агонистической активностью, которая определяется с помощью анализов цАМФ человеческого ГИП-Р, ГПП-1Р и ГкгР, которые ниже, чем у нативных лигандов.

Дополнительный ряд анализов цАМФ проводят в клетках НЕК293, экспрессирующих рецепторы человеческого ГПП-1, ГИП и глюкагона. С помощью методов гомогенной флуорисценции с временным разрешением проводили анализы для определения присущей активности аналогов из Примеров и сравнительных

молекул в присутствии казеина (вместо сывороточного альбумина) в качестве неспецифического блокатора, который не взаимодействует с фрагментами жирной кислоты анализируемых молекул.

Внутриклеточные уровни цАМФ определяются путем экстраполяции с использованием стандартной кривой. Кривые доза-эффект соединений представлены в виде процентного соотношения стимуляции, нормализованной к минимальным (только буфер) и максимальным (максимальная концентрация каждого контрольного лиганда) значениям, и проанализированы с использованием четырехпараметрической нелинейной регрессионной аппроксимации с переменным наклоном (Genedata Screener 13). EC₅₀ представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальную стимуляцию на кривой доза-эффект.

Данные приведены ниже в Таблице 4.

Таблица 4. Функциональная активация чГПП-1Р, чГИПР, чГкГР в присутствии 0,1 % казеина.

	цАМФ EC ₅₀ , нМ (РЭМ, n)		
	ГкГР	ГИПР	ГПП-1Р
чГкГ	0,0119 (0,00356, 163)		
амид чГИП		0,154 (0,037, 118)	
амид чГПП-1			0,063 (0,022, 197)
Пример 1	0,158 (0,0464, 6)	0,0226 (0,00787, 5)	0,112 (0,0250, 5)
Пример 2	0,0960 (0,0295, 7)	0,0329 (0,0136, 7)	0,106 (0,0155, 7)
Пример 3	0,0301 (0,00811, 5)	0,0215 (0,00338, 4)	0,104 (0,0300, 4)
Пример 4	0,0296 (0,00628, 5)	0,0321 (0,0110, 4)	0,145 (0,0309, 4)
Пример 5	0,0343 (0,00555, 4)	0,0306 (0,00998, 5)	0,103 (0,0263, 4)
Пример 6	0,0293 (0,00562, 4)	0,0349 (0,00643, 4)	0,115 (0,0305, 4)

Как видно из Таблицы 4, типичные аналоги стимулируют цАМФ рецепторов человеческого ГИП, ГПП-1 и глюкагона в присутствии 0,1 % казеина.

SEQ ID NO:1 - человеческий глюкагон

20 HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO:2 - Амид ГПП-1 (7-36) человека

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG

25 SEQ ID NO:3 - ОКСМ человека

(HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNNIA)

SEQ ID NO:4 - ГИП для человека

Y AEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

5

SEQ ID NO:5 - Аналог инкретина

YX₂X₃GTX₆TSDYSIX₁₃LDKX₁₇AQX₂₀AFIEYLLEGGPSSGAPPPS

где

X₂ представляет собой Aib;

10

X₃ представляет собой Q или H;

X₆ представляет собой αMeF или αMeF(2F);

X₁₃ представляет собой L или αMeL;

X₁₇ представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, причем функциональная группа

15

конъюгирована с C₁₆-C₂₂-жирной кислотой;

X₂₀ представляет собой Aib, Q или H

SEQ ID NO:6 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)-
20 CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:7 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT-αMeF-TSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

25

SEQ ID NO:8 - Аналог инкретина

Y-Aib-HGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:9 - Аналог инкретина

30

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:10 - Аналог инкретина

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)-(γ Glu)-
CO-(CH₂)₁₈-CO₂H) AQQAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:11 - Аналог инкретина

- 5 Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)-(γ Glu)-
CO-(CH₂)₁₈-CO₂H) AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO:12 - Искусственная последовательность

GPSSGAPPPS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Аналог инкретина, содержащий:

$YX_2X_3GTX_6TSDYSIX_{13}LDKX_{17}AQX_{20}AFIEYLLEGGPSSGAPPPS$,

5 где:

X_2 представляет собой Aib,

X_3 представляет собой Q или H,

X_6 представляет собой α MeF или α MeF(2F),

X_{13} представляет собой L или α MeL,

10 X_{17} представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, и функциональную группу, конъюгированную с C_{16} - C_{22} -жирной кислотой,

X_{20} представляет собой Aib, Q или H,

(SEQ ID NO:5), и С-концевая аминокислота необязательно
15 амидирована;
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Аналог инкретина по п. 1, отличающийся тем, что аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X_{17} , выбирают
20 из группы, состоящей из K, C, E и D.

3. Аналог инкретина по п. 1, отличающийся тем, что аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X_{17} , представляет собой K.
25

4. Аналог инкретина по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации в положении X_{17} , и C_{16} - C_{22} -жирная кислота конъюгированы с помощью линкера между аминокислотой и жирной кислотой.
30

5. Аналог инкретина по п. 4, отличающийся тем, что линкер содержит от одной до четырех аминокислот.

6. Аналог инкретина по п. 5, отличающийся тем, что аминокислоты представляют собой Glu или γ Glu.
7. Аналог инкретина любому из пп. 4-6, отличающийся тем, что линкер дополнительно содержит следующую структуру:
- 5
$$\text{H}-\{\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_p-\text{CO}\}_n-\text{OH},$$
 где m равен любому целому числу от 1 до 12, n равен любому целому числу от 1 до 12, и p равен 1 или 2.
8. Аналог инкретина по любому из пп. 4-7, отличающийся тем, что линкер дополнительно содержит от одного до четырех (2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетильных) фрагментов.
- 10 9. Аналог инкретина по п. 1, отличающийся тем, что X_{17} представляет собой K, химически модифицированный путем конъюгации с эпсилон-аминогруппой боковой K-цепи со следующей структурой:
- 15
$$(2-[2-(2\text{-аминоэтоксид)этоксид]ацетил})_a-(\gamma\text{Glu})_b-\text{CO}-(\text{CH}_2)_c-\text{CO}_2\text{H},$$
 где a равен 0, 1 или 2; b равен 1 или 2; и c равен целому числу от 16 до 18.
10. Аналог инкретина по п. 9, отличающийся тем, что a равно 1.
- 20 11. Аналог инкретина по п. 9, отличающийся тем, что a равно 2.
12. Аналог инкретина по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что b равно 1.
13. Аналог инкретина по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что b равно 2.
- 25 14. Аналог инкретина по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что c равно 18.
15. Аналог инкретина по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что X_{13} представляет собой αMeL .
- 30 16. Аналог инкретина по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что X_{13} представляет собой L.

17. Аналог инкретина по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что X_3 представляет собой Q.
18. Аналог инкретина по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что X_3 представляет собой H.
19. Аналог инкретина по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что X_6 представляет собой αMeF .
20. Аналог инкретина по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что X_6 представляет собой $\alpha\text{MeF}(2F)$.
21. Аналог инкретина, имеющий формулу, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5-11.
22. Способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из СД2, ожирения, жировой болезни печени, НАСГ, дислипидемии и метаболического синдрома, причем способ включает в себя этап:
введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина по любому из пп. 1-21.
23. Способ лечения сахарного диабета II типа, включающий этап:
введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина по любому из пп. 1-21.
24. Фармацевтическая композиция, содержащая:
аналог инкретина по любому из пп. 1-21; и
фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.
25. Аналог инкретина по любому из пп. 1-21 для применения в лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, дислипидемии, жировой болезни печени, метаболического синдрома, неалкогольного стеатогепатита и ожирения.

26. Аналог инкретина по любому из пп. 1-21 для применения при лечении сахарного диабета типа II.

5 27. Использование аналога инкретина по любому из пп. 1-21 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, дислипидемии, жировой болезни печени, метаболического синдрома, неалкогольного стеатогепатита и ожирения.

10 28. Использование аналога инкретина по любому из пп. 1-21 в производстве лекарственного средства для лечения сахарного диабета II типа.