

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038330**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.10

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

(21) Номер заявки
201890634

(22) Дата подачи заявки
2016.10.14

(54) **АГОНИСТЫ ГЛЮКАГОНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЖИРОВОЙ ДИСТРОФИИ ПЕЧЕНИ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

(31) **62/246,199**

(56) WO-A1-2015094878
WO-A1-2015094876
WO-A1-2015094875
WO-A1-2015086731
WO-A1-2015155141
WO-A1-2010070252

(32) **2015.10.26**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/056969**

(87) **WO 2017/074715 2017.05.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛАНКО ЮЭС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Коскун Тамер, Альсина-Фернандес
Хорхе (US)**

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

(57) Изобретение относится к соединениям агониста глюкагонового рецептора или их фармацевтически приемлемым солям, способу лечения жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота, применению указанных соединений для лечения жировой дистрофии печени у дойной коровы, а также фармацевтической композиции, содержащей указанные соединения. Предложенные агонисты глюкагонового рецептора характеризуются модификациями структуры нативного глюкагона, осуществлёнными для избирательного агонистического влияния на глюкагоновый рецептор в течение более продолжительного периода времени.

B1

038330

038330

B1

Изобретение относится к соединениям с увеличенной продолжительностью действия на глюкагоновый рецептор по сравнению с нативным глюкагоном. В частности, представлены агонисты глюкагонового рецептора с модификациями структуры нативного глюкагона, осуществлёнными для избирательного агонистического влияния на глюкагоновый рецептор в течение более продолжительного периода времени. Агонисты глюкагонового рецептора могут быть полезны либо в сочетании с другими терапевтическими агентами для лечения таких расстройств, как сахарный диабет 2-го типа (СД2Т) и/или ожирение, либо в виде монотерапии для лечения различных расстройств, таких как ожирение, неалкогольная жировая дистрофия печени (НАЖДП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), дислипидемия, метаболический синдром, гиперинсулинемия и/или ночная гипогликемия, а также синдром жировой дистрофии печени у дойных коров.

За последние несколько десятилетий наблюдается тенденция роста распространенности диабета. СД2Т является наиболее распространенной формой диабета, составляющей приблизительно 90% всех случаев диабета. СД2Т характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, вызванным резистентностью к инсулину. Нынешний стандарт ухода за СД2Т включает диету и физические упражнения, а также лечение пероральными лекарственными средствами и инъекционными препаратами для снижения уровня глюкозы, включая терапии на основе инкретина, такие как агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и ингибиторы дипептидилпептидазы IV (ДПП-IV). Когда лечение пероральными лекарственными средствами и терапией на основе инкретина является недостаточным, рассматривается лечение инсулином. Лечение пациентов, заболевание которых прогрессировало до такой степени, что возникает нужда в инсулиновой терапии, обычно начинается с однократной ежедневной инъекции базального инсулина длительного действия, хотя в некоторых случаях могут быть включены инъекции инсулинов короткого действия, если это необходимо.

Несмотря на доступность этих методов лечения уровень глюкозы в крови у многих пациентов с СД2Т по-прежнему остается недостаточно контролируемым. Неконтролируемый диабет приводит к нескольким состояниям, которые влияют на заболеваемость и смертность пациентов. Одним из основных факторов риска для СД2Т является ожирение. Большинство пациентов с СД2Т (~ 90%) имеют избыточный вес или страдают ожирением. Задokumentировано, что снижение ожирения тела приводит к улучшению связанных с ожирением сопутствующих заболеваний, включая гипергликемию и сердечно-сосудистые события. Таким образом, терапия, эффективная при контроле глюкозы и уменьшении веса, является необходимой для лучшего управления ходом заболевания.

Кроме того, также продолжали расти распространенность и осведомленность о неалкогольной жировой дистрофии печени (НАЖДП), которая относится к группе расстройств печени, связанных с накоплением жира в печени, и неалкогольном стеатогепатите (НАСГ), который является тяжелой формой НАЖБП, характеризующейся гистологическими данными, такими как воспаление, повреждение гепатоцитов и фиброз. НАСГ является наиболее распространенным заболеванием печени в западных странах и затрагивает 3-5% взрослых в Соединенных Штатах. Лечение обычно включает предписанные изменения в рационе питания и физических упражнениях и может включать в себя бариатрическую хирургию, пилоритазоны, статины, терапию омега 3 и витамин Е (в случае недиабетических пациентов НАСГ) с целью уменьшения жира в печени, но терапевтические средства, одобренные для лечения воспаления и/или фиброза, связанных с НАСГ, на данный момент отсутствуют. Поэтому необходимы дополнительные методы лечения.

Несколько пептидов, которые доступны и/или находятся в разработке в качестве терапевтических агентов, включая глюкагон, получают из предпроглюкагона, который представляет собой полипептид, процессирующий в ткани с образованием нескольких структурно связанных пептидов. Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, которые соответствуют аминокислотам предпроглюкагона с 53 до 81, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 1).

Глюкагон помогает поддерживать уровень глюкозы в крови путем связывания и активации глюкагоновых рецепторов на гепатоцитах, в результате чего печень выделяет глюкозу, хранящуюся в форме гликогена, посредством процесса, называемого гликогенолизом. Как только запасы гликогена истощаются, глюкагон стимулирует печень синтезировать дополнительную глюкозу путем глюконеогенеза. Эта глюкоза высвобождается в кровоток, предотвращая развитие гипогликемии. Введение глюкагона представляет собой установленную терапию для лечения острой гипогликемии, а экстренное введение глюкагона может восстановить нормальный уровень глюкозы в течение нескольких минут после введения. Некоторые аналоги глюкагона описаны как проявляющие улучшенную растворимость и стабильность. См., например, WO 2015094875; WO 2015094876; WO 2015094878.

Другие пептиды, полученные из предпроглюкагона, включают ГПП-1, глюкагоноподобный пептид-2 (ГПП-2) и оксинтомодулин (ОХМ). ГПП-1 представляет собой пептид из 36 аминокислот, основной биологически активный фрагмент которого (ГПП-1₇₋₃₆) продуцируется в виде 30-аминокислотного С-концевого амидированного пептида, который соответствует аминокислотам с 98 по 127 предпроглюкагона, имеющего следующую аминокислотную последовательность

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 2).

В то время как глюкагон стимулирует высвобождение глюкозы для предотвращения гипогликемии, ГПП-1 (SEQ ID NO: 2) стимулирует синтез и секрецию инсулина и, как было показано, предотвращает гипергликемию у диабетиков. В настоящее время доступны различные аналоги ГПП-1, включая эксенатид, лираглутид, альбиглутид и дулаглутид.

ОХМ представляет собой пептид из 37 аминокислот, состоящий из полной 29 аминокислотной последовательности глюкагона с октапептидным карбоксильным терминальным расширением (аминокислоты с 82 по 89 предпроглюкагона и называемые "промежуточным пептидом 1" или IP-1 (intervening peptide 1)), имеющим следующую аминокислотную последовательность:

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA (SEQ ID NO: 3).

ОХМ активирует как глюкагон, так и рецепторы ГПП-1 с несколько более высокой эффективностью для глюкагонового рецептора по сравнению с рецептором ГПП-1. Описаны аналоги ОХМ, имеющие двойную активность глюкагонового рецептора и рецептора ГПП-1. См., например, WO 2011087672; WO 2011087671.

Несмотря на то что глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид (ГИП) не является производным от предпроглюкагона, он представляет собой другой пептид, который играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы, стимулируя секрецию инсулина из β -клеток поджелудочной железы в присутствии глюкозы. ГИП представляет собой пептид из 42 аминокислот, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

YAEGTFISDYSIDKIQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ (SEQ ID NO:4).

Некоторые аналоги ГИП описаны как проявляющие рецепторную активность ГИП и ГПП-1. См., например, WO 2015067715; WO 2011119657; WO 2013164483.

Кроме того, аналогично двойной активности ОХМ, описанной выше, некоторые аналоги глюкагона описаны как имеющие коагонистическую активность как у глюкагонового рецептора, так и с одним или более рецепторами ГПП-1 или ГИП. Например, WO 2011075393 и WO 2012177444, предназначенные для описания аналогов глюкагона, активных в рецепторах как глюкагона, так и ГПП-1. Подобным образом, в WO 2013192130 описано, как аналоги глюкагона также являются активными в рецепторе ГИП. Дополнительно, в WO 2015067716 описаны аналоги, имеющие тройную агонистическую активность у каждого из рецепторов глюкагона, ГПП-1 и ГИП.

Несмотря на разнообразие пептидов и белков, предлагаемых в виде терапий СД2Т и/или ожирения, терапии, имеющиеся в настоящее время и/или находящиеся в разработке имеют ограничения. В частности, в то время как описанные выше двойные или тройные агонисты могут обеспечивать понижающие уровень глюкозы свойства рецептора ГПП-1 и/или агониста рецептора ГИП наряду с метаболическими преимуществами агониста глюкагонового рецептора, уровни активности таких пептидов на каждом из различных рецепторов, на которые они влияют в качестве агониста, являются фиксированными, что затрудняет достижение идеального баланса активации рецептора для получения, *in vivo*, высокой эффективности с минимальными побочными эффектами. А терапии, которые не задействуют агонизм глюкагонового рецептора, не обладают потенциальными метаболическими преимуществами такого механизма действия.

Хотя совместное введение глюкагона может теоретически способствовать ослаблению таких ограничений, имеющиеся в настоящее время продукты глюкагона нецелесообразны для применения. В частности, период полувыведения глюкагона в плазме крови составляет менее часа, что делает его нецелесообразным для длительного применения, особенно в вариантах реализации изобретения, включающих комбинации с другими методами лечения, которые являются доступными и/или развиваются, поскольку многие такие медикаменты вводятся раз в день, а некоторые рекомендуются для введения раз в неделю. Кроме того, глюкагон дикого типа также обладает некоторой активностью в рецепторе ГПП-1, что может усложнить попытку достижения соответствующего баланса глюкагона по сравнению с активностью рецептора ГПП-1 в комбинированной терапии, при этом другое соединение имеет свою рецепторную активность ГПП-1. Более того, свойства растворимости и химической и физической стабильности доступных в настоящее время продуктов глюкагона также являются неприемлемыми для длительного применения в таких заявках и не допускают совместного приготовления с другими терапевтическими агентами.

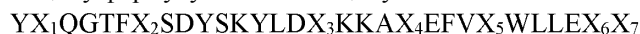
Таким образом, существует потребность в агонистах глюкагонового рецептора, которые имеют увеличенную продолжительность действия, позволяя вводить дозы раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Также существует потребность в агонистах глюкагонового рецептора, которые обладают сильной активностью на глюкагоновом рецепторе и высокой селективностью к активности на глюкагоновом рецепторе по сравнению с рецептором ГПП-1. Также существует потребность в агонистах глюкагонового рецептора с подходящими характеристиками для совместного приготовления с другими терапевтическими агентами. Также существует потребность в агонистах глюкагонового рецептора с характеристиками растворимости и стабильности, что делает возможным длительное хранение и применение.

Агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению стремятся удовлетворить эти потребности. Соответственно, данное изобретение предлагает агонисты глюкагонового рецептора с увеличен-

ной продолжительностью действия, позволяя вводить дозы раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. В данном изобретении предложены агонисты глюкагонового рецептора с оптимальной и избирательной активностью на глюкагоновом рецепторе по сравнению, например, с рецепторами ГПП-1 и/или ГИП. В данном изобретении предложены агонисты глюкагонового рецептора, которые обладают физическими и химическими характеристиками, подходящими для длительного применения и совместного приготовления с другими методами лечения. В данном изобретении предложены агонисты глюкагонового рецептора, которые при использовании в сочетании с другими методами лечения диабета приводят к усиленному контролю глюкозы, метаболическим преимуществам, таким как снижение массы тела и/или преимуществам в метаболизме липидов, таким как снижение PCSK9, при использовании в сочетании с другими методами лечения диабета. В частности, комбинации агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению с агонистами ГПП-1Р или коагонистами ГИП-ГПП-1 оказывают благоприятное синергическое воздействие на такие показатели, как потеря веса и состав тканей тела. Данное изобретение также направлено на обеспечение эффективного лечения других расстройств при использовании в качестве монотерапии и/или в сочетании с другими видами терапии, в том числе ожирения, НАЖБП, НАСГ, дислипидемии, нарушения обмена веществ, гиперинсулинемии и/или ночной гипогликемии.

Сущность изобретения

Согласно одному аспекту осуществления изобретение относится к соединению агониста глюкагонового рецептора, содержащему формулу или состоящему из нее



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой T;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H, где a равно 1 и b равно 18;

X_5 представляет собой A;

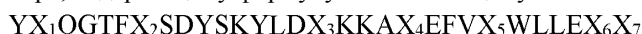
X_6 представляет собой E; и

X_7 отсутствует;

(SEQ ID NO: 12);

или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно другому аспекту осуществления настоящее изобретение относится к соединению агониста глюкагонового рецептора, содержащему формулу или состоящему из нее:



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой T;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H, где a равно 1 и b равно 16;

X_5 представляет собой A;

X_6 представляет собой E; и

X_7 отсутствует;

(SEQ ID NO: 11);

или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно одному варианту одного из вышеуказанных аспектов указанный агонист глюкагонового рецептора отличается тем, что активность агониста глюкагонового рецептора на глюкагоновом рецепторе по меньшей мере в 100 раз выше, чем эффективность агониста глюкагонового рецептора на рецепторе ГПП-1.

Согласно еще одному аспекту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота, включающему введение эффективного количества вышеуказанного агониста глюкагонового рецептора. В одном из вариантов крупный рогатый скот представляет собой дойную корову.

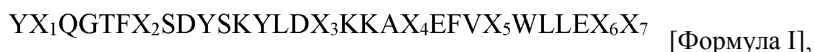
Согласно еще одному аспекту осуществления изобретение относится к применению вышеуказанного агониста глюкагонового рецептора для лечения жировой дистрофии печени у дойной коровы.

Согласно еще одному аспекту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота, содержащей вышеуказанный агонист глюкагонового рецептора и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Подробное описание

Соответственно, вариант реализации данного изобретения предлагает агонист глюкагонового ре-

цептора формулы I



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой T или L;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокси]этокси]ацетил)}_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где a равно 1 или 2 и b равно от 14 до 24;

X_5 представляет собой E или A;

X_6 представляет собой T или E;

X_7 либо отсутствует, либо представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из GPSSGAPPPS и GPSSG;

и С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 5);

или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается агонист глюкагонового рецептора формулы I



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой T или L;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокси]этокси]ацетил)}_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где a равно 1 или 2 и b равно от 14 до 24;

X_5 представляет собой E или A;

X_6 представляет собой T или E;

X_7 либо отсутствует, либо представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из GPSSGAPPPS и GPSSG;

и С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 5);

или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается агонист глюкагонового рецептора Формулы I



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой T или L;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокси]этокси]ацетил)}_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где a равно 1 или 2 и b равно от 14 до 24;

X_5 представляет собой E или A;

X_6 представляет собой T или E;

X_7 либо отсутствует, либо представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из GPSSGAPPPS и GPSSG;

и С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 5);

или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой L.

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_5 представляет собой E. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_5 представляет собой A.

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_6 представляет собой T. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_6 представляет собой E.

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_7 представляет собой GPSSGAPPPS. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_7 представляет

собой GPSSG. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где X_7 отсутствует.

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где b равно от 16 до 20. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где b равно от 16 до 18. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где b равно 16. В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру любого из вышеприведенных вариантов реализации изобретения, где b равно 18.

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 2; b равно 16; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSGAPPPS; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 6).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 2; b равно 18; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSGAPPPS; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 7).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой L; a равно 2; b равно 16; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSGAPPPS; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 2; b равно 16; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSG; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 9).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 2; b равно 18; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSG; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 10).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 1; b равно 16; X_5 представляет собой A; X_6 представляет собой E; а X_7 отсутствует (SEQ ID NO: 11).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 1; b равно 18; X_5 представляет собой A; X_6 представляет собой E; а X_7 отсутствует (SEQ ID NO: 12).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где a равно 2; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; X_7 представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из GPSSGAPPPS и GPSSG; а C-концевая аминокислота амидирована (SEQ ID NO: 16).

В определенных вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора имеет структуру формулы I, где X_2 представляет собой T; a равно 1; X_5 представляет собой A; X_6 представляет собой E; а X_7 отсутствует (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах реализации изобретения активность агониста глюкагонового рецептора на глюкагоновом рецепторе по меньшей мере в 100 раз выше, чем активность агониста глюкагонового рецептора на рецепторе ГПП-1.

Другой вариант реализации данного изобретения относится к способу лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из СД2Т, ожирения, жировой дистрофии печени, НАСГ, дислипидемии, метаболического синдрома, гиперинсулинемии и ночной гипогликемии, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по изобретению.

Другой вариант реализации данного изобретения относится к способу лечения жировой дистрофии печени, включающему введение крупному рогатому скоту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения крупный рогатый скот представляет собой дойную корову.

Другой вариант реализации данного изобретения относится к способу лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из СД2Т, ожирения, жировой дистрофии печени, НАСГ, дислипидемии, метаболического синдрома, гиперинсулинемии и ночной гипогликемии, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению в сочетании с эффективным количеством одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой СД2Т. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой ожирение. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой жировую дистрофию печени. В некото-

рых вариантах реализации изобретения один или более дополнительных терапевтических агентов выбраны из группы, состоящей из агонистов ГПП-1Р, коагонистов ГИП-ГПП-1, агонистов инсулинового рецептора, оксинтомодулинов, метформина, тиазолидиндионов, сульфонилмочевины, ингибиторов дипептидилпептидазы-4 ("ДПП-4") и ингибиторов натрийзависимого переносчика глюкозы 2 типа ("SGLT2"). В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист ГПП-1Р. В некоторых вариантах реализации изобретения агонист ГПП-1Р представляет собой дулаглутид. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой коагонист ГИП-ГПП-1. В некоторых вариантах реализации изобретения коагонист ГИП-ГПП-1 имеет структуру SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист инсулинового рецептора.

В некоторых вариантах реализации изобретения агонист глюкагонового рецептора оказывает синергетическое действие на потерю веса и состав тела при использовании в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, таким как агонист ГПП-1Р или коагонист ГИП-ГПП-1.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается применение агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению в терапии. В другом варианте реализации данного изобретения предлагается применение агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению при лечении заболевания, выбранного из группы, состоящей из СД2Т, ожирения, жировой дистрофии печени, НАСГ, дислипидемии, метаболического синдрома, гиперинсулинемии и ночной гипогликемии. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой СД2Т. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой ожирение. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой жировую дистрофию печени. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложен агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению для применения в лечении жировой дистрофии печени у дойной коровы.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению для применения в одновременном, раздельном или последовательном применении в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами для применения в терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более дополнительных терапевтических агентов выбраны из группы, состоящей из агонистов ГПП-1Р, коагонистов ГИП-ГПП-1, агонистов инсулинового рецептора, оксинтомодулинов, метформина, тиазолидиндионов, сульфонилмочевины, ингибиторов ДПП-4 и ингибиторов натрийзависимого переносчика глюкозы 2 типа ("SGLT2"). В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист ГПП-1Р. В некоторых вариантах реализации изобретения агонист ГПП-1Р представляет собой дулаглутид. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой коагонист ГИП-ГПП-1. В некоторых вариантах реализации изобретения коагонист ГИП-ГПП-1 имеет структуру SEQ ID NO: 15.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается применение агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения СД2Т, ожирения, жировой дистрофии печени, НАСГ, дислипидемии, метаболического синдрома, гиперинсулинемии и ночной гипогликемии.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно включает дополнительный терапевтический агент. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из агонистов ГПП-1Р, коагонистов ГИП-ГПП-1, агонистов инсулинового рецептора, оксинтомодулинов, метформина, тиазолидиндионов, сульфонилмочевины, ингибиторов ДПП-4 и ингибиторов SGLT2. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист ГПП-1Р. В некоторых вариантах реализации изобретения агонист ГПП-1Р представляет собой дулаглутид. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой коагонист ГИП-ГПП-1. В некоторых вариантах реализации изобретения коагонист ГИП-ГПП-1 имеет структуру SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист инсулинового рецептора.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается способ индуцирования нетерапевтической потери веса, включающий введение эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается способ лечения синдрома жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота, включающий введение крупному рогатому скоту, нуждающемуся в этом, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по изобретению.

В другом варианте реализации данного изобретения предлагается агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению для использования при лечении синдрома жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота.

При использовании в данном документе термин "агонисты глюкагонового рецептора" означает со-

единения, включающие аминокислотную последовательность нативного человеческого глюкагона (SEQ ID NO: 1), аналога глюкагона, производного глюкагона или слитого белка глюкагона, которые связываются с глюкагоновым рецептором и активируют его, и поддерживают избирательную активность глюкагонового рецептора относительно ГПП-1, что приводит к увеличению уровней глюкозы в сыворотке крови при введении в виде монотерапии. Такие характеристики связывания и фармакодинамические эффекты могут быть измерены с использованием известных способов *in vitro* и *in vivo*, таких как те, что описаны в нижеприведенных исследованиях. Аналог глюкагона представляет собой молекулу, имеющую модификацию, включающую одну или более аминокислотных замен, делеций, инверсий или вставок по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного глюкагона человека (SEQ ID NO: 1). Производное глюкагона представляет собой молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного глюкагона человека (SEQ ID NO: 1) или аналога глюкагона, но дополнительно имеющую по меньшей мере одну химическую модификацию одной или более ее боковых групп аминокислот, атомов α -углерода, концевой аминогруппы или концевой группы карбоновой кислоты. Слитый белок глюкагона представляет собой гетерологичный белок, содержащий глюкагон, аналог глюкагона или производное глюкагона и второй полипептид, такой как область Fc иммуноглобулина.

Активность агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению также является избирательной для глюкагонового рецептора относительно рецептора ГПП-1. Используемые в данном документе термины "избирательный ... относительно", "избирательность" и "избирательный против" относятся к соединению, которое отображает 50-, 100-, 200-, 250-, 500- или 1000-кратную активность для глюкагонового рецептора над рецептором ГПП-1. Такая избирательность может быть измерена с использованием известных способов *in vitro*, таких как те, что описаны в нижеприведенных исследованиях.

Агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению имеют увеличенную продолжительность профилей действия, позволяющих вводить дозы не чаще, чем раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Профиль действия агониста глюкагонового рецептора может быть измерен с использованием известных способов фармакокинетических тестов.

Профили с увеличенной продолжительностью действия агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению достигаются за счет использования фрагмента жирной кислоты, конъюгированного с ϵ -аминогруппой боковой цепи аминокислоты лизина в положении 20. Жирная кислота конъюгирована с ϵ -аминогруппой боковой цепи лизина через линкер, который включает [2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ Glu)_a, где a равно 1 или 2. Жирная кислота и γ -глутаминовая кислота в линкере действуют как связывающие вещества альбумина и обеспечивают потенциал для образования соединений длительного действия. Жирная кислота, конъюгированная с ϵ -аминогруппой боковой цепи аминокислоты лизина в положении 20 посредством линкера, содержит -CO-(CH₂)_b-CO₂H, где b равно от 14 до 24. Таким образом, полная структура линкер-жирная кислота включает ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равно 1 или 2, a b равно от 14 до 24. Как показано в химических структурах примеров 1-7 ниже, первая единица [2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетила связана с ϵ -аминогруппой боковой цепи лизина. Вторая единица [2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетила затем присоединяется к аминогруппе первой единицы [2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетила. Затем первая единица γ Glu присоединяется к аминогруппе второй единицы [2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетила через боковую цепь γ -карбоксылной группы. Когда a = 2, вторая единица γ Glu присоединяется к α -аминогруппе первой единицы γ Glu через боковую цепь γ -карбоксылной группы. Наконец, жирная кислота присоединяется к α -аминогруппе первой (когда a = 1) или второй (когда a = 2) единицы γ Glu.

Агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению предпочтительно приготовлены в виде фармацевтических композиций, вводимых парентеральными путями (например, подкожно, внутривенно, внутривнутрино, внутримышечно или трансдермально). Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, Remington: Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, редактор, 21-е издание, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006 год). Предпочтительным путем введения является подкожный путь введения.

Агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению могут вступать в реакцию с любой из ряда неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей. Фармацевтически приемлемые соли и общая методика их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, P. Stahl, и соавт. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2-е пересмотренное издание (Wiley-VCH, 2011 год)). Фармацевтически приемлемые соли по данному изобретению включают трифторацетат, гидрохлорид и ацетатные соли.

Одним из особых преимуществ, обеспечиваемых избирательностью агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению для глюкагонового рецептора над рецептором ГПП-1, является способность предоставлять гибкие варианты лечения, в случае если агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению вводят в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами, такие как соотношение активности глюкагонового рецептора к активности в другом рецепторе(ах) (например, ГПП-1, ГИП и/или рецептора инсулина). Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах реализации данное изобретение предлагает способ лечения СД2Т у пациента, включающий введение

пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с дополнительным терапевтическим средством. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный терапевтический агент выбирают из группы, состоящей из агониста ГПП-1Р, коагониста ГИП-ГПП-1 или агониста рецептора инсулина.

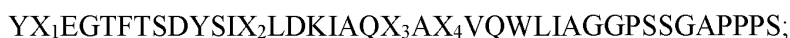
Использующийся в данном документе термин "дополнительный терапевтический агент(ы)" означает другое соединение(я), которое, как известно, обладает благоприятными терапевтическими эффектами, такими как лечение СД2Т и/или ожирения, которое в настоящее время доступно и/или разрабатывается, включая, например, агонисты ГПП-1Р, коагонисты ГИП-ГПП-1, агонисты рецептора инсулина, оксинто-модулины, метформин, тиазолидиндионы, сульфонилмочевины, ингибиторы ДПП-4 и ингибиторы SGLT2.

Использующийся в данном документе термин "в сочетании с" означает введение агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению как одновременно, последовательно, так и в одном комбинированном составе с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

Использующийся в данном документе термин "агонист ГПП-1Р" относится к соединению, включающему аминокислотную последовательность нативного человеческого ГПП-1 (SEQ ID NO: 2), аналога ГПП-1, производного ГПП-1 или слитого белка ГПП-1, который поддерживает активность в рецепторе ГПП-1. Активность рецептора ГПП-1 может быть измерена способами, известными в данной области техники, в том числе с использованием экспериментов *in vivo* и анализов *in vitro*, которые измеряют активность связывания рецептора ГПП-1 или активацию рецептора. Аналог ГПП-1 представляет собой молекулу, имеющую модификацию, включающую одну или более аминокислотных замен, делеций, инверсий или вставок по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного ГПП-1 человека (SEQ ID NO: 2). Производное ГПП-1 представляет собой молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного ГПП-1 человека (SEQ ID NO: 2) или аналога ГПП-1, но дополнительно имеющую по меньшей мере одну химическую модификацию одной или более ее боковых групп аминокислот, атомов α -углерода, концевой аминогруппы или концевой группы карбоновой кислоты. Слитый белок ГПП-1 представляет собой гетерологичный белок, содержащий ГПП-1, аналог ГПП-1 или производное ГПП-1 и второй полипептид, такой как область Fc иммуноглобулина. Агонисты ГПП-1Р, которые в настоящее время доступны и/или находятся в разработке, включают эксенатид, лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид, дулаглутид и семаглутид. В определенных предпочтительных вариантах реализации изобретения, в которых агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению вводят в сочетании с агонистом ГПП-1Р, агонист ГПП-1Р представляет собой дулаглутид. См., например, США 7452966.

Использующийся в данном документе термин "коагонист ГИП-ГПП-1" относится к соединению, которое обладает активностью как у рецепторов ГИП, так и ГПП-1. Активность рецептора ГИП и рецептора ГПП-1 может быть измерена способами, известными в данной области техники, в том числе с использованием экспериментов *in vivo* и анализов *in vitro*, которые измеряют активность связывания рецептора или активацию рецептора ГИП и/или рецептора ГПП-1. Хотя в настоящее время коагонисты ГИП-ГПП-1 не доступны для лечения СД2Т, множественные аналоги ГИП были описаны как проявляющие активность рецептора ГИП и ГПП-1, см., например, WO 2013164483; WO 2011119657.

В определенных предпочтительных вариантах реализации изобретения, в которых агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению вводится в сочетании с коагонистом ГИП-ГПП-1Р, коагонист ГИП-ГПП-1Р имеет следующую структуру:



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой Aib;

X_3 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокс})\text{этокс}]\text{ацетил})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где a равно 1 или 2 и b равно от 10 до 20;

X_4 представляет собой Phe или 1-нафтилаланином (1-Nal);

и С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 13),

или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных предпочтительных вариантах реализации изобретения a равно 2, b равно 18; X_4 1-Nal; и С-концевая аминокислота амидирована в качестве С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 14). В определенных предпочтительных вариантах реализации изобретения a равно 1, b равно 18; X_4 представляет собой Phe; и С-концевая аминокислота амидирована в качестве С-концевого первичного амида. (SEQ ID NO: 15). Такие коагонисты ГИП-ГПП-1 могут быть получены с использованием таких методов, как те, которые могут быть использованы для получения агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению, как описано ниже в примерах пептидного синтеза.

Использующийся в данном документе термин "агонист инсулинового рецептора" относится к человеческому инсулину или его аналогам, или его производным, или любому другому белку, который способен связываться с инсулиновым рецептором и активировать его. Активность инсулинового рецептора

может быть измерена способами, известными в данной области техники, в том числе с использованием экспериментов *in vivo* и анализов *in vitro*, которые измеряют активность связывания инсулинового рецептора или активацию рецептора. Аналог инсулина представляет собой молекулу, имеющую модификацию, включающую одну или более аминокислотных замен, делеций, инверсий или вставок по сравнению с нативным человеческим инсулином, структура которого хорошо известна. Производное инсулина представляет собой молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного человеческого инсулина или его аналога, но дополнительно имеющую по меньшей мере одну химическую модификацию одной или более ее боковых групп аминокислот, атомов α -углерода, концевой аминогруппы или концевой группы карбоновой кислоты. Слитый белок инсулина представляет собой гетерологичный белок, содержащий инсулин, аналог инсулина или часть производного инсулина и второй полипептид. Хотя любой агонист инсулинового рецептора может рассматриваться для применения в вариантах реализации изобретения, в которых агонист глюкагонового рецептора по данному изобретению вводят в сочетании с агонистом инсулинового рецептора, предпочтительными агонистами инсулинового рецептора являются те, которые имеют базальную или увеличенную продолжительность действия. Доступные настоящее время агонисты инсулинового рецептора с базальной активностью включают инсулин гларгин, инсулин детемир и инсулин деглудек, каждый из которых указан для приема один раз в день.

В определенных вариантах реализации данное изобретение предлагает способ лечения СД2Т у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах реализации данное изобретение предлагает способ лечения ожирения у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах реализации данное изобретение предлагает способ лечения жировой дистрофии печени у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В определенных вариантах реализации данное изобретение предлагает способ лечения НАСГ у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В других вариантах реализации данное изобретение также предлагает способ лечения СД2Т у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как агонисты ГПП-1Р, коагонисты ГИП-ГПП-1, агонисты инсулинового рецептора, оксинтомодулины, метформин, тиазолидиндионы, сульфонилмочевины, ингибиторы ДПП-4 и ингибиторы SGLT2.

Использующийся в данном документе термин "пациент, нуждающийся в этом" относится к млекопитающему, предпочтительно человеку или крупному рогатому скоту, с заболеванием или состоянием, требующим лечения, включая, например, СД2Т, ожирение, жировую дистрофию печени, НАСГ и/или метаболический синдром.

Использующийся в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе агониста глюкагонового рецептора по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, которая при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает желаемый эффект у пациента, который диагностируется или лечится. Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники с использованием известных методов и путем наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента рассматривается ряд факторов, включая, но без ограничения: вид млекопитающего; его размер, возраст и общее состояние здоровья; специфическое заболевание или расстройство; степень или вовлечение, или тяжесть заболевания или расстройства; реакция отдельного пациента; определенный введенный агонист глюкагонового рецептора; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранный режим дозирования; применение сопутствующих медикаментов; и другие соответствующие обстоятельства.

Определенные агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению обычно эффективны в широком диапазоне доз. Например, дозы для введения раз в неделю могут находиться в пределах от 0,01 до 30 мг на человека в неделю. Агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению могут вводиться ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю или раз в неделю. Предпочтительным является введение раз в неделю.

Используемый в документе термин "лечение" или "лечить" включает в себя сдерживание, остановку, обратное развитие прогрессирования или тяжести существующего симптома или расстройства.

Аминокислотные последовательности по данному изобретению содержат стандартные однобуквенные или трибуквенные коды для 20 встречающихся в природе аминокислот. Кроме того, "Aib" представляет собой α -аминоизомасляную кислоту. Данное изобретение также охватывает новые промежуточные

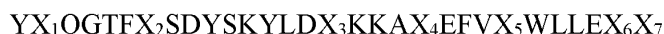
продукты и процессы, используемые для синтеза агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению, или их фармацевтически приемлемую соль. Промежуточные продукты и агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. В частности, процесс, использующий химический синтез, проиллюстрирован в примерах ниже. Конкретные этапы синтеза для каждого из описанных способов могут быть объединены различными путями с целью получения агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалисту в данной области техники.

Изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие.

Синтез пептидов.

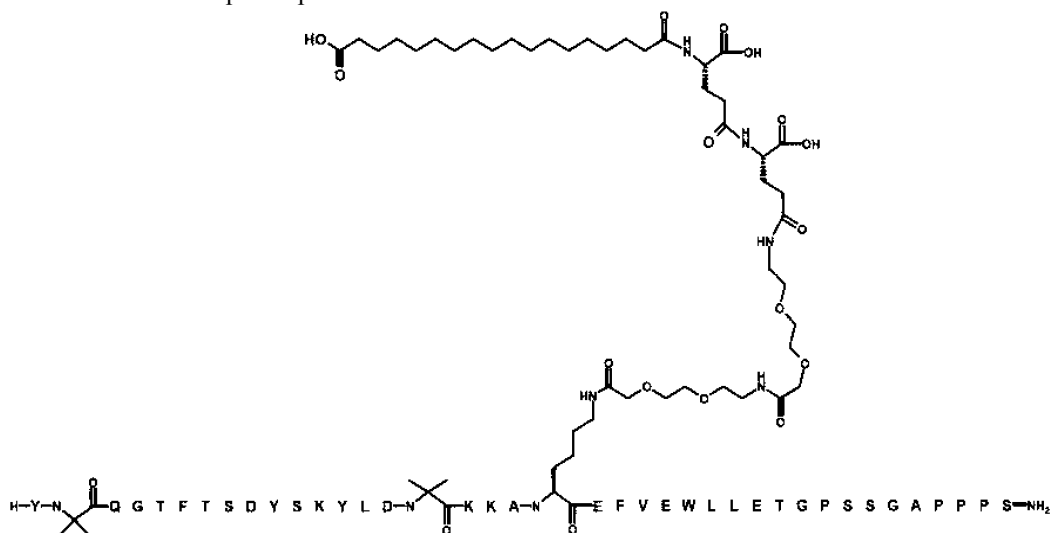
Пример 1.

Пример 1 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой T; X_3 представляет собой Aib; X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокси})этокси]ацетил_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где a равно 2 и b представляет собой 16; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; X_7 представляет собой GPSSGAPPPS; и C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 6).

Ниже приведено описание структуры примера 1 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены



Пептид примера 1 генерируется с помощью твердофазного пептидного синтеза с использованием стратегии Fmoc/t-Bu, выполненной на автоматизированном синтезаторе пептидов Symphony (PTI Protein Technologies Inc.), начиная с RAPP AM-Rink амидной смолы и с соединениями с использованием 6 эквивалентов аминокислоты, активированной диизопропилкарбодимидом (ДИК) и гидроксibenзотриазолом (HOBT) (молярное соотношение 1:1:1) в диметилформамиде (DMФА) в течение 90 мин при 25°C.

Расширенные соединения для Pro31 (4 ч), Trp25 (4 ч), Glu24 (4 ч), Val23 (10 ч), Glu21 (4 ч), Aib16 (4 ч), Asp 15 (4 ч), Thr7 (4 ч), Thr5 (4 ч), Gly4 (4 ч), Gln3 (4 ч) и Aib2 (24 ч) необходимы для улучшения качества неочищенного пептида. Структурный блок Fmoc-Lys(Alloc)-OH используется для соединения Lys20 (ортогональная защитная группа), чтобы позволить сайт-специфичное связывание фрагмента жирной кислоты позже в процессе синтеза. N-концевой остаток вводили в виде Boc-Tyr(tBu)-OH с использованием протоколов DIC-HOBT, как описано выше (24-часовое соединение).

После окончания элонгации описанной выше пептидной смолы защитную группу Alloc, присутствующую в Lys20, удаляют с использованием каталитических количеств $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ в присутствии PhSiH_3 в роли акцептора. Дополнительные циклы соединения/снятия защитных групп с использованием стратегии Fmoc/t-Bu для расширения боковой цепи Lys20 включают Fmoc-NH-ПЕГ₂-CH₂COOH (каталог ChemPer #280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (каталог ChemPer #100703) и HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. Во всех соединениях 3 эквивалента структурного блока используются с PyBOP (3 экв.) и DIEA (6 экв.) в DMФА в течение 4 ч при 25°C.

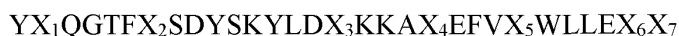
Сопутствующее отщепление из смолы и удаление защитной группы боковой цепи проводят в растворе, содержащем трифторуксусную кислоту (ТФК): триизопропилсилан: 1,2-этандитиол:воду:тиоанизол 90:4:2:2:2 (об./об.) в течение 2 ч при 25°C с последующим осаждением холодным эфиром. Не-

очищенный пептид очищают до чистоты > 99% (количество очищенного продукта 15-20%) с помощью обращенно-фазовой хроматографии ВЭЖХ с градиентом воды/ацетонитрила (содержащего 0,05% об./об. ТФК) на колонке С18, где подходящие фракции объединяют и лиофилизируют, в результате получая соль ТФК.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше, чистоту примера 1 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: $M+3H^+/3=1713,6$; вычислено $M+3H^+/3=1714,3$; наблюдается: $M+4H^+/4=1285,7$; вычислено $M+4H^+/4=1285,9$).

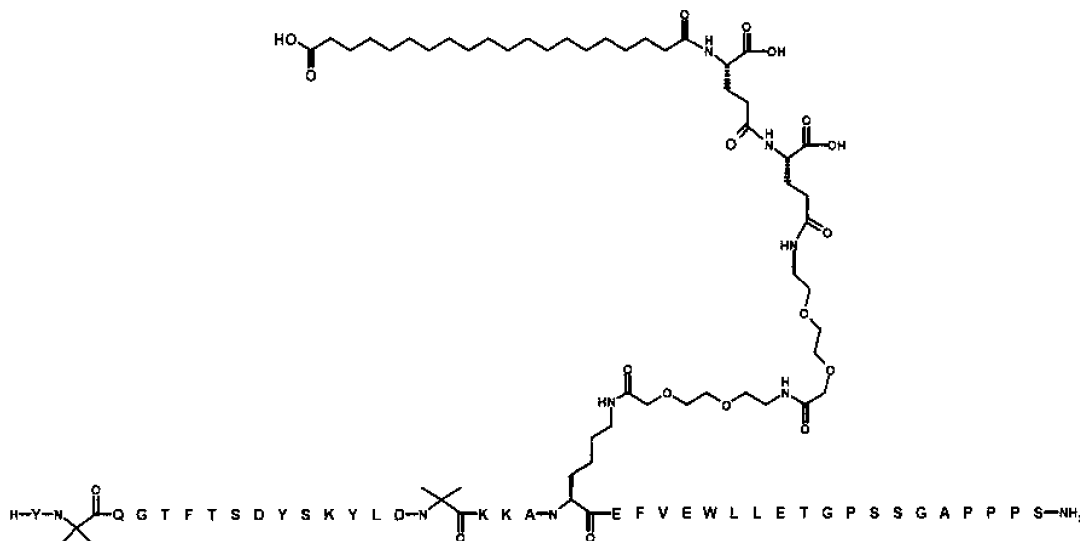
Пример 2.

Пример 2 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X_1 представляет собой Aib, X_2 представляет собой T; X_3 представляет собой Aib; X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; а представляет собой 2; b представляет собой 18; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; X_7 представляет собой GPSSGAPPPS; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 7).

Ниже приведено описание структуры примера 2 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены



Пептид согласно примеру 2 синтезируется аналогично описанному выше в примере 1. HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu встраивается с использованием 3 эквивалентов структурного блока с PyBOP (3 экв.) и DIEA (6 экв.) в ДМФА в течение 4 ч при 25°C.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше в примере 1, чистоту примера 2 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: $M+3H^+/3=1723,2$; вычислено $M+3H^+/3=1723,6$; наблюдается: $M+4H^+/4=1292,9$; вычислено $M+4H^+/4=1293,0$).

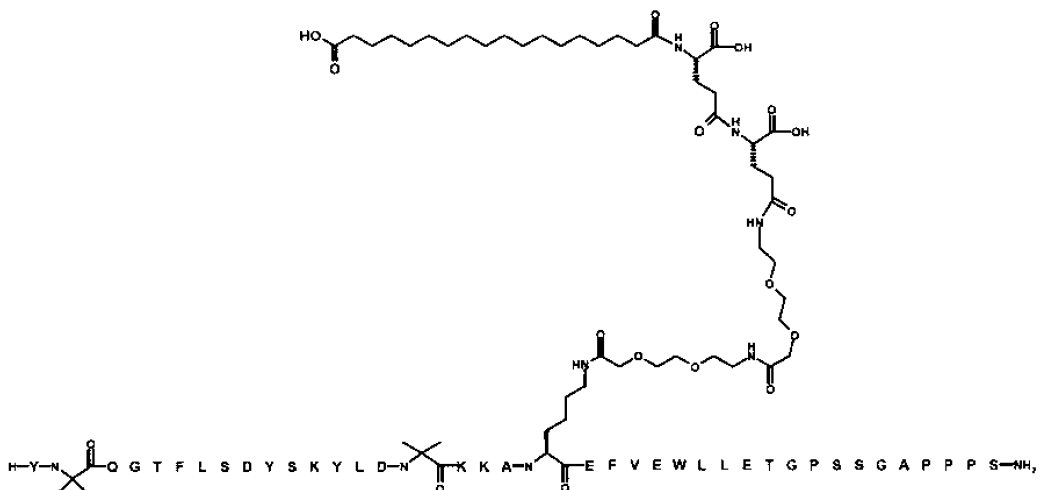
Пример 3.

Пример 3 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой L; X_3 представляет собой Aib; X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; а равно 2; b равно 16; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSGAPPPS; и где C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 8).

Ниже приведено описание структуры примера 3 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib 16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены

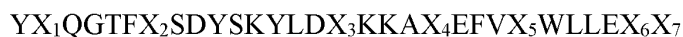


Пептид согласно примеру 3 синтезируется аналогично описанному выше для примера 1.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше в примере 1, чистоту примера 3 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: $M+3H^+/3=1717,4$; вычислено $M+3H^+/3=1718,3$; наблюдается: $M+4H^+/4=1288,3$; вычислено $M+4H^+/4=1289,0$).

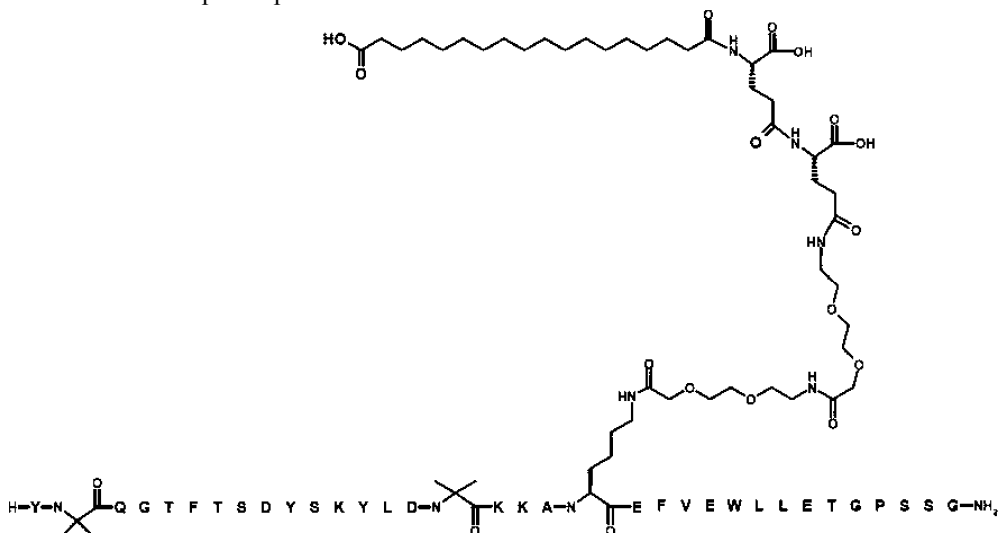
Пример 4.

Пример 4 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой T; X_3 представляет собой Aib; X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокси})этокси]ацетил)_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; a равно 2; b равно 16; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSG; и C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 9).

Ниже приведено описание структуры примера 4 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib 16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены



Пептид согласно примеру 4 синтезируется аналогично описанному выше для примера 1.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше в примере 1, чистоту примера 4 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: $M+3H^+/3=1563,7$; вычислено $M+3H^+/3=1564,4$; наблюдается: $M+4H^+/4=1172,9$; вычислено $M+4H^+/4=1173,6$).

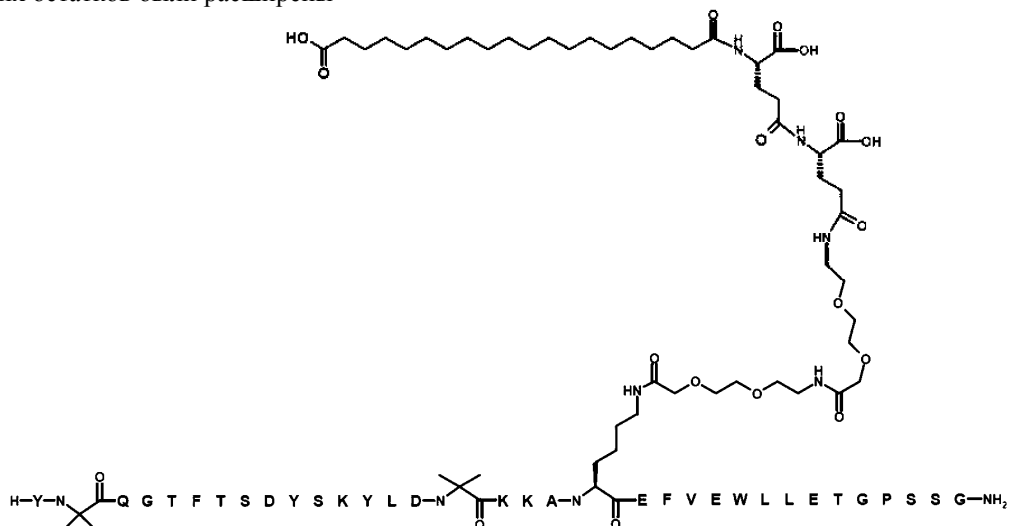
Пример 5.

Пример 5 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой T; X_3 представляет собой Aib; X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-амино-этокси})этокси]ацетил)_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; а равно 2; b равно 18; X_5 представляет собой E; X_6 представляет собой T; и X_7 представляет собой GPSSG; и C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 10).

Ниже приведено описание структуры примера 5 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены

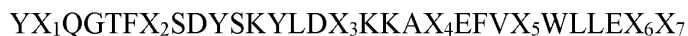


Пептид согласно примеру 5 синтезируется аналогично описанному выше для примера 1.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше в примерах 1 и 2, чистоту примера 5 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: $M+3H^+/3=1572,9$; вычислено $M+3H^+/3=1573,8$; наблюдается: $M+4H^+/4=1179,8$; вычислено $M+4H^+/4=1180,6$).

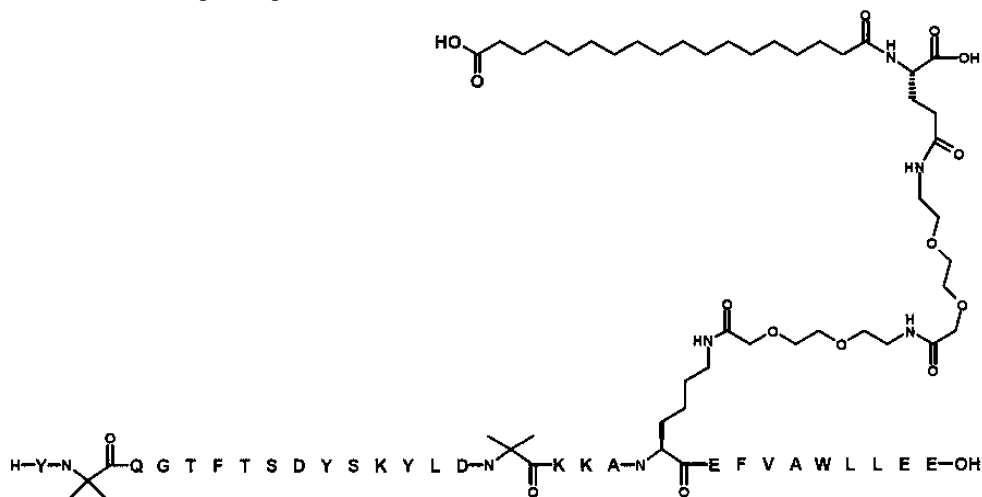
Пример 6.

Пример 6 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X_1 представляет собой Aib; X_2 представляет собой T; X_3 представляет собой Aib; X_4 представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой боковой цепи K с $([2-(2\text{-аминоэтокси})этокси]ацетил)_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; а равно 1; b равно 16; X_5 представляет собой A; X_6 представляет собой E; а X_7 отсутствует; и C-концевая аминокислота представляет собой C-концевую кислоту (SEQ ID NO: 11).

Ниже приведено описание структуры примера 6 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены



Пептид в соответствии с примером 6 генерируется с помощью твердофазного пептидного синтеза с использованием стратегии Fmoc/t-Bu, выполненной на автоматизированном синтезаторе пептидов Sym-

phony (PTI Protein Technologies Inc.), начиная со смолы Fmoc-L-Glu(OtBu)-Wang (элемент каталога NovaBiochem # 856008; начальная загрузка 0,51 ммоль/г) и с соединениями с использованием 6 эквивалентов аминокислоты, активированной диизопропилкарбодиимидом (ДИК) и гидроксibenзотриазолом (HOBT) (молярное соотношение 1:1:1) в диметилформамиде (ДМФА) в течение 90 мин при 25°C.

Расширенные соединения для Trp25 (4 ч), Ala24 (4 ч), Val23 (10 ч), Glu21 (4 ч), Aib 16 (4 ч), Asp 15 (4 ч), Thr7 (4 ч), Thr5 (4 ч), Gln3 (4 ч) и Aib2 (24 ч) необходимы для улучшения качества неочищенного пептида. Структурный блок Fmoc-Lys(Alloc)-ОН используется для соединения Lys20 (ортогональная защитная группа), чтобы позволить сайт-специфичное связывание фрагмента жирной кислоты позже в процессе синтеза (время соединения 4 ч). N-концевой остаток вводили в виде Boc-Tyr(tBu)-ОН с использованием протоколов DIC-HOBT, как описано выше (24-часовое соединение).

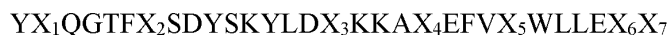
После окончания элонгации описанной выше пептидной смолы защитную группу Alloc, присутствующую в Lys20, удаляют с использованием каталитических количеств Pd(PPh₃)₄ в присутствии PhSiH₃ в роли акцептора. Дополнительные циклы соединения/снятия защитных групп с использованием стратегий Fmoc/t-Bu для расширения боковой цепи Lys20 включают Fmoc-NH-ПЕГ₂-CH₂COOH (каталог ChemPer #280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (каталог ChemPer #100703) и HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. Во всех соединениях 3 эквивалента структурного блока используются с PyBOP (3 экв.) и DIEA (6 экв.) в ДМФА в течение 4 часов при 25°C.

Сопутствующее отщепление из смолы и удаление защитной группы боковой цепи проводят в растворе, содержащем трифторуксуную кислоту (ТФК): триизопропилсилан: 1,2-этандитиол:воду:тиоанизол 90:4:2:2:2 (об./об.) в течение 2 ч при 25°C с последующим осаждением холодным эфиром. Неочищенный пептид очищают до чистоты > 99% (количество очищенного продукта 15-20%) с помощью обращенно-фазовой хроматографии ВЭЖХ с градиентом воды/ацетонитрила (содержащего 0,05% об./об. ТФК) на колонке C18, где подходящие фракции объединяют и лиофилизируют.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше, чистоту примера 6 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: M+3H⁺/3=1382,7; вычислено M+3H⁺/3=1383,3; наблюдается: M+4H⁺/4=1036,6; вычислено M+4H⁺/4=1037,7).

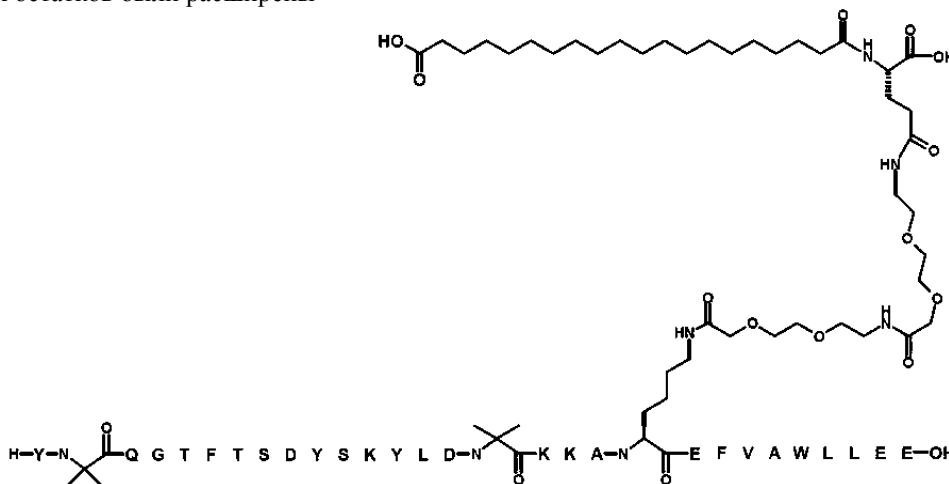
Пример 7.

Пример 7 представляет собой агонист глюкагонового рецептора, представленный следующим описанием:



где X₁ представляет собой Aib; X₂ представляет собой T; X₃ представляет собой Aib; X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтокс)этокс]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a равно 1; b равно 18; X₅ представляет собой A; X₆ представляет собой E; a X₇ отсутствует; и C-концевая аминокислота представляет собой C-концевую кислоту (SEQ ID NO: 12).

Ниже приведено описание структуры примера 7 с использованием стандартных однобуквенных аминокислотных кодов, за исключением остатков Aib2, Aib16 и K20, в которых структуры этих аминокислотных остатков были расширены



Пептид согласно примеру 7 синтезируется аналогично описанному выше в примере 6. HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu встраивается с использованием 3 эквивалентов структурного блока с PyBOP (3 экв.) и DIEA (6 экв.) в ДМФА в течение 4 ч при 25°C.

В синтезе, выполненном, по существу, как описано выше в примере 6, чистоту примера 7 анализируют с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ, а идентичность подтверждают с использованием ЖХ/МС (наблюдается: M+3H⁺/3=1391,8; вычислено M+3H⁺/3=1392,6; наблюдается:

$M+4H^+/4=1044,3$; вычислено $M+4H^+/4=1044,7$.

Функция *in vitro*.

Аффинность связывания.

Аффинность связывания пептидов примеров 1-7 определяется для рекомбинантного глюкагонового рецептора человека (hGcg-R), глюкагонового рецептора мыши (mGcg-R) и глюкагонового рецептора крысы (rGcg-R). Анализы конкурентного связывания радиолиганда с использованием сцинтилляционного анализа сближения (SPA) и мембран, полученных из стабильных трансфицированных клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих hGcg-R, mGcg-R или rGcg-R, проводят для определения равновесных констант диссоциации (K_i) для пептидов примеров 1-7. Ниже приведены экспериментальные протоколы и результаты.

В анализе связывания с рецептором человеческого Gcg использовали клонированный hGcg-R (Lok S. и соавт., *Gene* 140 (2), 203-209 (1994 год)), выделенный из клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hGcg-R. кДНК hGcg-R субклонировали в плазмиду экспрессии pHd (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell B.W. и соавт., *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987 год)). Эту плазмидную ДНК трансфицировали в клетки 293НЕК и проводили отбор с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

При анализе связывания с рецептором Gcg мыши использовали клонированный глюкагоновый рецептор мыши (mGcgR) (Burcelin R., Li J., Charron M.J. *Gene* 164 (2), 305-10 (1995 год) GenBank: L38613), выделенный из мембран 293НЕК. кДНК mGcgR субклонировали в плазмиду экспрессии pcDNA3.1 (Promega)-ZeoR. Эту плазмидную ДНК трансфицировали в клетки 293НЕК и проводили отбор клональной линии с использованием 100 мкг/мл зеоцина.

В анализе связывания рецептора Gcg крысы использовали клонированный глюкагоновый рецептор крысы (rGcg-R) (Svoboda M., Ciccarelli E., Tastenoy M., Robberecht P., Christophe J. A cDNA construct allowing the expression of rat hepatic glucagon receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192 (1), 135-142 (1993 год), GenBank: L04796) в мембранах, выделенных из клеток 293НЕК, транзистентно экспрессирующих rGcg-R. кДНК rGcg-R субклонировали в плазмиду экспрессии pcDNA3.1 (Promega)-ZeoR. Эту плазмидную ДНК трансфицировали в клетки 293НЕК и транзистентно экспрессировали в течение 48 ч.

Фракции плазмемных мембран получали с использованием клеток из адгезивной культуры. Клетки лизировали на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 мМ Трис HCl, pH 7,5 и ингибиторами протеазы Roche Complete™ с ЭДТК. Клеточная суспензия разрушалась с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оборудованного пестиком Teflon® для 25 ударов. Гомогенат центрифугировали при 4°C при 1100 g в течение 10 мин. Супернатант собирали и хранили на льду, в то время как осадок ресуспендировали в гипотоническом буфере и повторно гомогенизировали. Смесь центрифугировали при 1100 g в течение 10 мин. Второй супернатант объединяли с первым супернатантом и центрифугировали при 35000 g в течение 1 ч при 4° С. Осадок мембран ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеазы, быстро замораживали в жидком азоте и хранили в виде аликвот в морозильнике при -80°C до использования.

Gcg подвергали радиоiodированию процедурой I-125-лактопероксидазы и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в Perkin-Elmer (NEX207). Специфическая активность составляет 2200 Ки/ммоль. Определение K_D проводили путем гомологичной конкуренции или анализа насыщения соединения. K_D для Gcg-R человека оценивали как 3,92 нМ и использовали для вычисления значения K_i для всех соединений, протестированных в анализе hGcg-R. K_D для Gcg-R мыши оценивали как 3,52 нМ и использовали для вычисления значения K_i для всех соединений, протестированных в анализе mGcg-R. K_D для Gcg-R крысы оценивали, как 21,4 нМ и использовали для вычисления значения K_i для всех соединений, протестированных в анализе rGcg-R.

Анализ связывания с рецептором проводили с использованием сцинтилляционного анализа сближения (SPA) с гранулами агглютинина зародыша пшеницы (АЗП) (Perkin Elmer). Буфер связывания содержит 25 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновую кислоту (ГЭПЭС), pH 7,4, 2,5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,1% (мас./об.) бацитрацин (Affymetrix), 0,003% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбитан монолаурат (TWEEN®-20) и ингибиторы протеазы Roche Complete™ без ЭДТК. Gcg (Eli Lilly and Company) растворяли в ДМСО при 3,48 мг/мл (1 мМ) и хранили в замороженном состоянии при -20°C в аликвотах по 100 мкл. Аликвоту Gcg разбавляли и использовали в анализах связывания в течение часа. Пептидные аналоги растворяли в ДМСО и 3-кратно серийно разводили в 100% ДМСО. Затем 5 мкл серийно разведенного соединения или ДМСО переносили на чистое дно аналитических планшетов Corning® 3632, содержащих 45 мкл анализирующего буфера связывания или немеченого контроля Gcg (NSB до 1 мкМ в конце). Затем добавляли 50 мкл hGcg-R (1,5 мкг/лунка), mGcg-R (6,47 мкг/лунка) или мембраны rGcg-R (1,5 мкг/лунка), 50 мкл I-125 Gcg (0,15 нМ окончательно в реакции) и добавляли 50 мкл гранул АЗП (150 мкг/лунка), планшеты герметично закрывали и перемешивали на планшетном шейкере (настройка 6) в течение 1 мин. Планшеты считывали с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после 12 ч отстаивания при комнатной температуре. Результаты вычисляли как процент специфического связывания I-125-Gcg в присутствии соединения. Абсолютную концентрацию ИК₅₀ соединения получали путем нелинейной регрессии процента специфического связывания I-125-Gcg про-

тив концентрации добавляемого соединения. Концентрацию ИК₅₀ конвертировали в K_i с использованием уравнения Ченга-Прусоффа (Cheng Y., Prusoff W.H., *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108, (1973 год)).

K_i пептидов из примеров 1-7 и Gcg человека в hGcg-R, mGcg-R и rGcg-R представлены ниже в табл. 1.

Таблица 1

	hGcg-R K _i , нМ ± СОС, (n)	mGcg-R K _i , нМ ± СОС, (n)	rGcg-R K _i , нМ ± СОС, (n)
Пример 1	2,04 ± 1,02 (n = 2)	1,92 ± 0,71 (n = 2)	9,78 ± 0,22 (n = 2)
Пример 2	1,07 ± 0,16 (n = 2)	0,991 ± 0,066 (n = 2)	5,59 ± 0,24 (n = 2)
Пример 3	0,287 ± 0,171 (n = 2)	0,174 (n = 1)	1,56 ± 0,13 (n = 2)
Пример 4	0,738 (n = 1)	0,744 (n = 1)	5,86 (n = 1)
Пример 5	1,59 (n = 1)	1,58 (n = 1)	4,36 (n = 1)
Пример 6	0,316 (n = 1)	0,123 (n = 1)	0,98 (n = 1)
Пример 7	0,673 (n = 1)	0,753 (n = 1)	1,38 (n = 1)
Человеческий глюкагон	3,64 ± 0,91 (n = 3)	2,41 ± 0,22 (n = 3)	23,3 ± 1,7 (n = 3)

Эти данные показывают, что агонисты глюкагонового рецептора по данному изобретению связываются с глюкагоновыми рецепторами с аффинностью, аналогичной или большей, чем глюкагон человека у трех разных видов (рецепторы человека, мыши и крысы).

Функциональная активность и избирательность.

Функциональную активность и избирательность определяли путем количественного определения внутриклеточного цАМФ в клетках НЕК293, экспрессирующих глюкагоновый рецептор человека (hGcg-R), рецептор глюкагоноподобного пептида-1 человека (чГПП-1Р) или желудочный ингибиторный полипептид человека (также известный как глюкозозависимый инсулиотропный полипептидный рецептор, чГИП-Р). Ниже приведены экспериментальные протоколы и результаты.

Функциональный анализ цАМФ hGcg-R использует клетки 293НЕК, экспрессирующие клонированные hGcg-R (Lok S. и соавт., *Gene* 140 (2), 203-209 (1994 год)). кДНК hGcg-R субклонировуют в плазмиду экспрессии pHd (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell B.W. и соавт., *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987 год)). Эту плазмидную ДНК трансфицировали в клетки 293НЕК и клетки отбирали с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

Функциональный анализ цАМФ чГПП-1-Р использует клетки 293НЕК, экспрессирующие клонированный чГПП-1-Р (Graziano M.P., Hey P.J., Borkowski D., Chicchi G.G., Strader C.D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196(1): 141-6, 1993 год). кДНК чГПП-1Р субклонировуют в плазмиду экспрессии pHd (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell B.W., Berg D.T., Walls J. и Yan S.B. *Bio/Technology* 5:1189-1192, 1987 год). Эту плазмидную ДНК трансфицировали в клетки 293НЕК и клетки отбирали с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

Функциональный анализ чГИП-Р использует чГИП-Р (Usdin T.V., Gruber C., Modi W. и Bonner T.L., GenBank: AAA84418.1), клонированный в плазмиду pcDNA3.1 (Promega)-NeoR. Плазмиду чГИП-Р-рcDNA3.1/Neo трансфицировали в клетки яичника китайского хомячка, CHO-S, для суспензионных культур и проводили отбор в присутствии 500 мкг/мл генетицина (Invitrogen).

Каждую клеточную линию, сверхэкспрессирующую рецептор, обрабатывают пептидом в DMEM (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко, Gibco Cat # 31053), дополненную 1X GlutaMAX™ (дипептид L-аланил-L-глутамин в 0,85% NaCl, Gibco Cat # 35050), 0,1% казеина (Sigma Cat # C4765), 250 мкМ ИБМК (3-изобутил-1-метилксантин) и 20 мМ ГЭПЭС [N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N-(2-этансульфоновая кислота), HyClone Cat # SH30237.01] в анализируемом объеме 40 мкл. После 60 мин инкубации при комнатной температуре полученное увеличение внутриклеточного цАМФ (3'-5'-циклический монофосфат аденозина) количественно определяли с использованием набора для анализа CISBio cAMP Dynamic 2 HTRF (CisBio 62AM4PEC). Уровни цАМФ внутри клетки детектировали с помощью добавления конъюгата цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (20 мкл) с последующим добавлением антитела к цАМФ-Eu³⁺-Cryptate, также в буфере для лизиса клеток (20 мкл). Полученный конкурентный анализ инкубировали в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре с последующим выявлением с использованием прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и эмиссией при 665 и 620 нм. Единицы измерения (эмиссия при 665 нм/620 нм*10000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием калибровочной кривой цАМФ. Количество произведенной цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразуется в процент от максимального ответа, наблюдаемого с 10 нМ человеческого ГПП-1(7-36)NH₂ (для анализа чГПП-1Р), 10 нМ человеческого Gcg (для анализа hGcg-R) или 10 нМ человеческого ГИП(1-42)NH₂ (для анализа чГИП-Р). Значение относительной ЭК₅₀ и верхний процент (E_{max}) получены с помощью анализа методом нелинейной регрессии с использованием процента максимального ответа по сравнению с концентрацией добавляемого пептида, адаптированного к четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Функциональные данные для примеров 1-7, человеческий ГИП(1-42) NH₂, человеческий ГПП-1(7-36) NH₂ и человеческий Gcg показаны в табл. 2 ниже. Средства для ЭК₅₀ выражаются как геометрические средние ± стандартная ошибка среднего (СОС) с числом повторений (n), указанным в скобках. Знак (>) указывает, что % эффективности не достигает 50%, а рассчитанную ЭК₅₀ получали с использованием самой высокой концентрации.

Таблица 2

	hGcg-R ЭК ₅₀ , нМ ± СОС, (n)	чГПП-1Р ЭК ₅₀ , нМ ± СОС, (n)	чГИП-Р ЭК ₅₀ , нМ ± СОС, (n)
Пример 1	0,00436 ± 0,00079 (n = 4)	73,9 ± 19,6 (n = 2)	> 500 (n = 3)
Пример 2	0,0112 ± 0,0025 (n = 3)	> 100 (n = 2)	> 500 (n = 3)
Пример 3	0,00340 ± 0,00010 (n = 2)	> 100 (n = 2)	> 500 (n = 3)
Пример 4	0,00278 ± 0,00010 (n = 2)	19,0 ± 8,2 (n = 2)	> 500 (n = 3)
Пример 5	0,0160 ± 0,0038 (n = 2)	27,0 ± 4,5 (n = 2)	> 500 (n = 3)
Пример 6	0,00413 ± 0,00026 (n = 2)	> 100 (n = 3)	> 500 (n = 3)
Пример 7	0,0166 ± 0,0004 (n = 2)	> 100 (n = 3)	> 500 (n = 3)
Человеческий глюкагон	0,00760 ± 0,00101 (n = 7)	7,70 ± 1,03 (n = 2)	> 500 (n = 3)
ГПП-1 человека	> 10 (n = 1)	0,076 ± 0,017 (n = 2)	> 500 (n = 3)
ГИП человека	> 10 (n = 1)	> 10 (n = 1)	0,145 ± 0,041 (n = 3)

Эти данные показывают, что агонисты глюкагонового рецептора по настоящему изобретению обладают сходной активностью в глюкагоновом рецепторе в качестве глюкагона человека с повышенной избирательностью относительно рецептора ГПП-1 и рецептора ГИП.

Фармакокинетика.

Фармакокинетика у крыс.

Самцам крыс Спрег-Доули вводили одну подкожную (100 нмоль/кг) дозу соединения примера в буфере Трис (рН 8,0) в объеме 1 мл/кг. Кровь из каждого животного собирали через 1,6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 и 240 ч после введения дозы.

Концентрации соединений в плазме определяли методами ЖХ/МС. Каждым способом измеряли интактный пептид (пептид плюс соответствующая продолжительность). Для каждого анализа соединение и аналог, используемые в качестве внутреннего стандарта (ВС), экстрагировали из 100% плазмы крысы или обезьяны (50 мкл) с использованием метанола и 0,1% муравьиной кислоты. Два разных слоя образуются при центрифугировании с соединением, а ВС находится в супернатанте. Аликвоту 275 мкл супернатанта переносили на планшет преципитации белков Thermo, где подавали вакуум для сбора фильтрата в 96-луночный планшет.

Образцы высушивали нагретым газообразным азотом для удаления супернатанта. В лунки добавляли 150 мкл 30% ацетонитрила и 5% муравьиной кислоты для ресуспендирования образцов. Инъекционные образцы (20 мкл) наносили на колонку Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 см X 0,1 мм, 3 мкм. Элюируемый компонент колонки направляли в масс-спектрометр Thermo Q-Exactive для выявления и количественного определения.

Средние фармакокинетические параметры после однократной подкожной дозы 100 нмоль/кг для самцов крыс Спрег-Доули приведены в табл. 3 ниже (n = 3 для примеров 1, 2 и 5 и T_{max} и C_{max} для примеров 3 и 4; n = 2 для T_{1/2}, AUC_{0-inf} и CL/F для примеров 3 и 4).

Таблица 3

Соединение	T _{1/2} (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{0-inf} (ч*нмоль/л)	CL/F (мл/ч/кг)
Пример 1	13	8	425	11692	8,8
Пример 2	22	24	346	21329	4,7
Пример 3	11	8	394	11133	9,2
Пример 4	16	6	257	5948	17,0
Пример 5	22	24	237	12948	7,8

Сокращения: AUC_{0-inf} - площадь под кривой от 0 до бесконечности; CL/F - клиренс/биодоступность; T_{max} - время достижения максимальной концентрации; C_{max} - максимальная концентрация в плазме; T_{1/2}

- период полураспада; НД - нет данных.

Эти данные показывают, что примеры 1-5 имеют увеличенную продолжительность действия относительно нативного человеческого глюкогона, $T_{1/2}$ которого составляет приблизительно 30 мин.

Фармакокинетика у яванских макак.

Самцам яванских макак вводили единичную внутривенную (50 нмоль/кг) или подкожную (50 нмоль/кг) дозу тестируемого соединения в буфере Трис (рН 8,0) в объеме 0,25 мл/кг. Кровь из каждого животного собирали через 0,5 (только в/в), 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576 и 672 ч после введения дозы. Концентрации соединений в плазме определяли методами ЖХ/МС, как правило, как описано выше в исследованиях крыс Спрег-Доули.

Средние ($n = 2$) фармакокинетические параметры приведены ниже в табл. 4.

Таблица 4

Соединение (Путь введения/доза)	ID животно го	$T_{1/2}$ (ч)	T_{max} (ч)	C_0 или C_{max} (нмоль/л)	AUC_{0-inf} (ч*нмоль/л)	CL или CL/F (мл/ч/кг)
Пример 1 (в/в 50 нмоль/кг)	Среднее значение	42	НП	1182	37278	1,36
Пример 1 (п/к 50 нмоль/кг)	Среднее значение	44	9	425	31821	1,57
Пример 2 (п/к 50 нмоль/кг)	Среднее значение	79	18	377	46292	1,08

Сокращения: AUC_{0-inf} - площадь под кривой от 0 до бесконечности; CL - клиренс; CL/F - клиренс/биодоступность; T_{max} - время достижения максимальной концентрации; C_0 - концентрация, экстраполированная на время 0 ч; C_{max} - максимальная концентрация в плазме; $T_{1/2}$ - период полураспада; НП - не применимо.

Эти данные показывают, что примеры 1 и 2 имеют увеличенную продолжительность действия относительно нативного человеческого глюкогона, $T_{1/2}$ которого составляет менее часа.

Исследования *in vivo*.

Постоянное наблюдение уровня глюкозы у крыс.

Обычных самцов крыс Спрег-Доули (HARLAN™, Индианаполис, штат Индиана) в возрасте 12-14 недель отдельно размещали в условиях с контролем температуры (24°C) с 12-часовым циклом света/темноты и свободным доступом к пище (TD2014 TEKLAD GLOBAL RODENT DIET®, HARLAN™ Labs, Индианаполис, штат Индиана) и воде. Через 2 недели акклиматизации к условиям крысам имплантировали передатчики HD-XG (Data Sciences International, Сент-Пол, штат Миннесота).

Операция имплантации передатчика проводилась под анестезией от 2 до 3% изофлурана (2-хлор-2-(дифторметокси)-1,1,1-трифторэтан). Датчик глюкозы передатчика помещали в нисходящую аорту. Датчик температуры передатчика помещали в брюшной полости с телом передатчика. Через семь дней после операции имплантации передатчика все крысы помещались на приемники телеметрии для непрерывной регистрации измерений уровня глюкозы в крови и измерений центральной температуры тела с интервалами в 1 мин, в то время как крысы свободно перемещались в своих клетках. Сбор данных контролировали и анализировали с помощью системного программного обеспечения DATAQUEST ART™ (Data Sciences International, Сент-Пол, штат Миннесота). Первоначальная калибровка датчика глюкозы достигалась с помощью внутрибрюшинной пробы на толерантность к глюкозе (ipGTT) через 7 дней после операции и последующие калибровки проводили каждый следующий день путем измерения уровня глюкозы через кровь из хвоста. Начиная с 9-11 дня после операции тестируемые соединения при дозе 10 нмоль/кг вводили один раз с помощью подкожной инъекции в 20 мМ буфере Трис-HCl при рН 8,0, 1 мл/кг массы тела. Уровень глюкозы в крови контролировали до 7 дней.

Данные глюкозы крови показывают, что каждый пример 1-7 приводит к устойчивому увеличению уровней глюкозы в крови дозозависимым образом.

Влияние на концентрацию глюкозы в крови у дойных коров.

Пять нелактующих голштинских дойных коров, составляющих в среднем 595 кг и завершивших по крайней мере одну нормальную лактацию, обрабатывали эскалационными дозами из примера 6. Сначала коровам вводили подкожную инъекцию 1,5 мг/корова из примера 6. Концентрации глюкозы в крови измеряли с различными интервалами с помощью ручного глюкометра через 168 ч после введения дозы. В течение этого периода дозирования и всех последующих периодов дозирования концентрация глюкозы в крови, измеренная в нулевой момент времени, служила базой для этого периода. Через неделю после начальной дозы, коровам подкожно вводили 5,0 мг/корова из примера 6. Концентрации крови опять контролировали через 168 ч после введения. Наконец, через две недели после дозы 5,0 мг/корова из примера 6 всем коровам подкожно вводили 15 мг/корова из примера 6, а концентрации глюкозы в крови контро-

лировали через 336 ч после введения дозы.

Данные приведены в табл.5. Все протестированные дозы из примера 6 приводят к резкому увеличению концентрации глюкозы в крови выше исходных концентраций. Кроме того, введение 1,5, 5,0 и 15,0 мг/корова приводит к устойчивому увеличению уровня глюкозы в крови через 96, 144 и 312 ч соответственно.

Таблица 5

Глюкоза в крови (мг/дл) у нелактующих дойных коров после подкожной инъекции из примера 6			
Часов	1,5 мг/корова	5,0 мг/корова	15,0 мг/корова
После введения дозы	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)
0	61,0	57,6	59,2
2	70,2**	75,6**	88,4**
4	76,8**	76,2**	71,0*
8	74,8**	75,2**	65,2
24	66,6^	70,4**	68,2^
48	66,6^	75,6**	74,2**
72	72,6**	72,4**	78,0**
96	68,6**	68,6*	76,8**
120	64,4	67,0*	70,8*
144	58,8	67,8*	72,0*
168	57,6	63,6	73,6**
192			77,4**
216			79,2**
240			75,8**
264			76,6**
288			69,4
312			71,4*
336			66,6
SE	2,3	2,8	3,8
^ P <.10, *P <.05, ** P <.01 против времени 0 (исходный уровень)			

Физические и химические характеристики.

Растворимость и стабильность.

Образцы из примеров 1-6 получали при 5 мг/мл в H₂O и диализовали согласно описанию в буферах C6N (10 mM цитрата, 100 mM NaCl, pH 6), C7N (10 mM цитрата, 100 mM NaCl, pH 7), H6.5N (10 mM гистидина, 100 mM NaCl, pH 6,5) и H7.5N (10 mM гистидина, 100 mM NaCl, pH 7,5). Образцы концентрировали до 10 мг/мл пептида согласно описанию и выдерживали при 4°C в течение одной недели. Образцы оценивали визуально и с помощью эксклюзионной ВЭЖХ согласно описанию.

Примеры 1-6 во всех составах являлись прозрачными и бесцветными через одну неделю при 4°C. Данные эксклюзионной ВЭЖХ приведены в табл. 6. Не наблюдалось значительного роста полимера с высокой молекулярной массой (HMW) или потери основного пика. Восстановление методом эксклюзионной ВЭЖХ находилось в пределах 5% для примеров 1-6.

Таблица 6

буфер	Δ % пика HMW				
	Пример 1	Пример 2	Пример 3	Пример 4	Пример 6
C6N	0,13	-0,03	-0,01	0,64	-0,03
C7N	0	-0,06	0,16	0,26	-0,26
H6.5N	-0,02	0,06	-0,03	0,35	0,11
H7.5N	0,35	-0,15	-0,09	0,44	0,14
буфер	Δ % основного пика				
	Пример 1	Пример 2	Пример 3	Пример 4	Пример 6
C6N	-0,02	0,08	0,08	-3,42	-0,98
C7N	0,26	-0,26	-0,18	-1,19	0,36
H6.5N	-0,39	-1,28	-0,58	-2,88	-1,17
H7.5N	-1,43	-0,87	-1,21	-0,79	-1,68

Растворимость из примеров 1-2 также оценивали в трех дополнительных составах: T7 (10 mM Трис-HCl, pH 7), T7Tm (10 mM Трис-HCl, 0,02% полисорбат-20, 29 mM м-крезол, pH 7) и T7Nm (10 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, 29 mM м-крезол, pH 7). Соединения готовили в T7 путем диализа согласно описанию. Образцы составляли при 2 мг/мл в T7, T7Tm или T7Nm, затем концентрировали до 10 мг/мл пептида согласно описанию. Составы выдерживали в течение одной недели при 4°C и визуально оценивали с по-

мощью и эксклюзионной ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ согласно описанию.

Все составы оставались прозрачными и бесцветными. Данные эксклюзионной ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ приведены в табл.7. Рост полимера НМВ не превышал 0,2% для любых составов. Пиковое восстановление с помощью ОФ-ВЭЖХ находилось в пределах 5% для всех составов.

Таблица 7

Пептид	Состав	% Δ НМВ
Пример 1	T7m	0,1
	T7Nm	0,05
	T7Tm	0,18
Пример 2	T7m	0,1
	T7Nm	0,08
	T7Tm	0,07

Эти данные показывают, что примеры 1-6 имеют приемлемые свойства растворимости в условиях разных буферов.

Химическая стабильность.

Химическую стабильность для примера 1 определяли в разных буферах с различными значениями pH. Образцы приготавливали в H₂O до концентрации 5 мг/мл, диализовали с использованием кассет диализа Slide-A-Lyzer, 2000 MWCO (номер 66203) в течение ночи при 4°C в буфере интереса, фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Millex, SLGV013SL), затем разбавляли до 1 мг/мл в соответствующем буфере. Буферные составы представляют собой 10 мМ Трис-НСl в H₂O pH 8 (Т8), 10 мМ Трис-НСl в H₂O pH 7 (Т7), 10 мМ гистидина в H₂O pH 7 (Н7) или 10 мМ цитрата в H₂O pH 6 (С6). Каждый образец 1 мг/мл переносили в три флакона. Образцы поддерживали при 4, 25 и 40°C. Образцы оценивали каждые две недели в течение четырех недель. Образцы визуальнo оценивали на наличие мутности и разделения фаз. Стабильность соединения оценивали с помощью аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) на Waters Symmetry Shield RP18, 3,5 мкм, колонке 4,6×100 мм (номер 18600179), нагретой при 60°C, с градиентом АВ (А = 0,1% ТФК/H₂O, В = 0,085% ТФК/ацетонитрил) 10% В, изократическим в течение 3 мин, 30% В в течение 3 мин, 30-60% В в течение 30 мин и 95% В в течение 2 мин при скорости потока 0,9 мл/мин (длина волны 214 нм). Стабильность также оценивали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ на НМВП инсулина, колонке 7,8×300 мм (номер WAT2015549) с электродным буфером 20 мМ фосфата натрия, 20% ацетонитрила, pH 7,2, при скорости потока 0,5 мл/мин в течение 40 мин.

Внешний вид от прозрачного до бесцветного, без опалесценции или частиц при pH 7 и pH 8 для примера 1. Результаты ОФ-ВЭЖХ и эксклюзионной ВЭЖХ приведены в табл.8 ниже. Восстановление происходит в пределах 5% с помощью ОФ-ВЭЖХ и эксклюзионной ВЭЖХ, что является приемлемым.

Таблица 8

Темп	% Δ основного пика с помощью ОФ хроматографии через 4 недели			
	Т8	Т7	Н7	С6
4 ° С	3,13 %	2,52 %	1,73 %	2,01 %
25 ° С	4,84 %	2,92 %	0,12 %	3,05 %
40 ° С	1,41 %	1,74 %	8,69 %	3,61 %
Темп	% Δ основного пика с помощью эксклюзионной хроматографии через 4 недели			
	Т8	Т7	Н7	С6
4 ° С	0,21 %	0,6 %	1,77 %	0,31 %
25 ° С	0,17 %	0,1 %	3,1 %	8,72 %
40 ° С	0,65 %	0,97 %	1,22 %	1,17 %

Образцы в буфере Т8, хранящиеся при 4 и 40°C в течение четырех недель, также анализировали с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Для примера 1 при pH 8 не определены основные участки деградации. В целом, химическая стабильность для примера 1 указывает на отличную стабильность в протестированных условиях разных буферов.

Физическая стабильность.

Тестируемые образцы примера 1 получали путем диализа в буфере Т7, затем готовили в виде 2 мг/мл пептида в Т7m, Т7Nm и Т7Tm согласно описанию. Каждый состав переносили в чистые стеклянные флаконы и перемешивали при 400 об/мин с помощью магнитной мешалки с перемешивающим стержнем, покрытым тефлоном при комнатной температуре в течение 6 ч. Аликвоты по 100 мкл отбирали для оценки через 0, 1, 3 и 6 ч. Образцы оценивали визуальнo и с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, как и раньше.

Все составы оставались прозрачными и бесцветными без опалесценции или осаждения. Как показано в табл. 9, процентное содержание пептида в основном пике эксклюзионной ВЭЖХ остается в пределах 5% для всех составов. Данные показывают, что пример 1 имеет хорошие характеристики физической стабильности в протестированных условиях.

Таблица 9

Состав	% основного пика			
	Время 0	1 час	3 часа	6 часов
T7m	95,94	96,02	96,18	95,69
T7Nm	95,39	95,45	95,43	95,43
T7Tm	96,21	96,12	96,27	96,18

Исследования комбинаций соединений.

Активность сочетания составов с коагономистом ГИП-ГПП-1 или агонистом ГПП-1Р.

Сочетания составов из примеров 1 и 3 с коагономистом ГИП-ГПП-1 из SEQ ID NO: 15 или дулаглутидом получали, как описано ниже, в исследованиях стабильности, а активность отдельных соединений и сочетаний составов измеряли с использованием описанных выше способов. Данные приведены в табл. 10 и 11. Знак (>) указывает, что % эффективности не достигает 50%, а рассчитанную ЭК₅₀ получали с использованием самой высокой концентрации.

Таблица 10

Лечение	Условия отбора проб	ЭК ₅₀ (среднее значение N = 2 ± стандартное отклонение, *N = 1)		
		Анализ рецептора Gcg	Анализ рецептора ГПП-1	Анализ рецептора ГИП
Пример 3	T7-4C-4нед	14,3 ± 3,4 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	T7-40C-4нед	24,9 ± 2,9 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	T7m-4C-4нед	21,1 ± 4,0 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	T7m-40C-4нед	21,1 ± 5,1 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
Пример 3 + коагономист ГИП-ГПП-1	T7-4C-4нед	21,3 ± 2,5 пМ	1,47 нМ*	0,65 нМ*
	T7-40C-4нед	21,9 ± 0,4 пМ	2,66 нМ*	0,74 нМ*
	T7m-4C-4нед	16,0 ± 3,4 пМ	3,08 нМ*	0,71 нМ*
	T7m-40C-4нед	24,2 ± 0,5 пМ	2,61 нМ*	0,40 нМ*
Пример 1	T7-4C-4нед	20,3 ± 2,5 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	T7-40C-4нед	21,7 ± 3,4 пМ	57,53 нМ*	> 100 нМ
	T7m-4C-4нед	23,0 ± 0,3 пМ	43,83 нМ*	> 100 нМ
	T7m-40C-4нед	19,4 ± 5,0 пМ	49,66 нМ*	> 100 нМ
Пример 1 + коагономист ГИП-ГПП-1	T7-4C-4нед	23,7 ± 0,7 пМ	1,78 нМ*	0,49 ± 0,16 нМ
	T7-40C-4нед	19,2 ± 2,4 пМ	1,65 нМ*	0,60 ± 0,21 нМ
	T7m-4C-4нед	16,5 ± 1,8 пМ	1,41 нМ*	0,39 ± 0,06 нМ
	T7m-40C-4нед	18,7 ± 0,6 пМ	1,21 нМ*	0,36 ± 0,34 нМ
Коагономист ГИП-ГПП-1	T7-4C-4нед	> 100 нМ	2,56 нМ*	0,70 нМ*
	T7-40C-4нед	> 100 нМ	2,76 нМ*	0,41 нМ*
	T7m-4C-4нед	> 100 нМ	1,61 нМ*	0,30 ± 0,19 нМ
	T7m-40C-4нед	> 100 нМ	0,73 нМ*	0,15 ± 0,02 нМ

Таблица 11

Пептид	Условия отбора проб	ЭК ₅₀ (среднее значение N = 2 ± стандартное отклонение)		
		Анализ рецептора Gcg	Анализ рецептора ГПП-1	Анализ рецептора ГИП
Пример 1	С6.5-4С-4нед	17,8 ± 6,8 пМ	41,6 ± 5,0 нМ	> 100 нМ
	С6.5-40С-4нед	24,3 ± 11,1 пМ	54,6 ± 46,2 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-4С-4нед	18,8 ± 1,8 пМ	55,6 ± 9,2 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-40С-4нед	14,6 ± 5,0 пМ	47,9 ± 5,8 нМ	> 100 нМ
Пример 3	С6.5-4С-4нед	36,9 ± 29,6 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	С6.5-40С-4нед	25,7 ± 6,9 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-4С-4нед	19,3 ± 1,1 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-40С-4нед	21,4 ± 3,1 пМ	> 100 нМ	> 100 нМ
Пример 1 + Дулаглутид	С6.5МТ-4С-4нед	14,6 ± 0,8 пМ	0,36 ± 0,01 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-40С-4нед	15,2 ± 6,4 пМ	0,37 ± 0,00 нМ	> 100 нМ
Пример 3 + Дулаглутид	С6.5МТ-4С-4нед	22,7 ± 5,2 пМ	0,57 ± 0,25 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-40С-4нед	22,6 ± 2,1 пМ	0,30 ± 0,01 нМ	> 100 нМ
Дулаглутид	С6.5-4С-4нед	51,9 ± 68,1 нМ	0,37 ± 0,11 нМ	> 100 нМ
	С6.5-40С-4нед	> 100 нМ	0,31 ± 0,17 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-4С-4нед	54,0 ± 65,0 нМ	0,40 ± 0,14 нМ	> 100 нМ
	С6.5МТ-40С-4нед	> 100 нМ	0,29 ± 0,09 нМ	> 100 нМ

Эти данные показывают, что биологическая активность примеров 1 и 3 поддерживается в стрессовых и не стрессовых условиях и/или в сочетании с агонистом ГПП-1Р или коагонистом ГИП-ГПП-1.

Исследования сочетаний *in vivo* с агонистами ГПП-1Р или коагонистами ГИП-ГПП-1

Эффекты сочетаний агонистов глюкагонового рецептора по данному изобретению с агонистами ГПП-1Р длительного действия или коагонистами ГИП-ГПП-1 тестировали на мышах C57/BL6, страдающих индуцированным диетой ожирением (DIO). Коагонист ГИП-ГПП-1 имеет структуру SEQ ID NO: 14, как описано выше. Агонист ГПП-1Р представляет собой слитую молекулу ГПП-1-Fc, описанную в WO 2005000892. Сочетания составов готовили в целом, как описано ниже, в исследованиях стабильности сочетаний состава.

Животные C57/BL6 DIO, хотя и не страдающие диабетом, демонстрируют устойчивость к инсулину, дислипидемии и стеатоз печени, все характеристики метаболического синдрома, после перевода на диету с высоким содержанием жира (60% ккал из жиров) в течение 12 недель. Таким образом, исследования этих животных могут быть использованы для изучения эффектов предлагаемого лекарственного средства(средств) на такие параметры, как потеря массы тела, состав тела и стеатоз печени.

Использовались самцы мышей DIO C57/B16 в возрасте 20-21 недель, весом 42-47 г и имеющие начальную массу жировой ткани в пределах от 11,9 г до 17,2 г. Животных размещали отдельно в условиях с контролем температуры (24°C) с 12-часовым циклом света/темноты (свет в 22:00) и предоставляли свободный доступ к пище и воде. Через 2 недели акклиматизации к условиям мышей случайным образом распределяли по группам лечения (n = 5/группа) в зависимости от массы тела, поэтому каждая группа имеет аналогичную начальную среднюю массу тела.

Носитель, тестируемые соединения (диапазон доз 3-10 нмоль/кг), агонист ГПП-1Р (10 нмоль/кг), коагонист ГИП-ГПП-1 (10 нмоль/кг) или их комбинации (диапазон доз от 3 до 10 нмоль/кг) растворенные в носителе (20 мМ буфера Трис-НСl, рН 8,0), вводили путем подкожной инъекции мышам с диетой *ad libitum* за 30-90 мин до начала темного цикла каждые три дня в течение 15 дней. Подкожные инъекции делали на 1, 4, 7, 10 и 13 день. Ежедневные показатели массы тела, потребления пищи и глюкозы измерялись на протяжении всего исследования. Абсолютные изменения массы тела рассчитывали путем вычитания массы тела одного и того же животного до первой инъекции молекулы. В дни 0 и 14 общую массу жировой ткани измеряли с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с использованием прибора Echo Medical System (Хьюстон, штат Техас).

Ежедневный уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра Accu-Chek (Roche) из крови хвостовой вены. В конце исследования животных умерщвляли, а печень удаляли и замораживали. Триглицериды печени, определенные из гомогенатов печени, собранных после умерщвления, и уровень холестерина в плазме измеряли на клиническом анализаторе Hitachi Modular P. Статистические сравнения между группами выполняли с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, с последующим критерием множественного сравнения Даннетта. Значения ЭД₅₀ для снижения потери веса определяли в GraphPad Prism с использованием инструмента нелинейной подгонки.

Данные о потере веса и проценте изменения массы жировой ткани для исследований, проведенных, как описано выше, приведены ниже в табл. 12 (пример 1) и 13 (примеры 1 и 2). Результаты в табл. 11 представлены как Среднее ± СОС 5 мышей на группу. Результаты в табл. 12 представлены как Среднее ±

СОС 6 мышей на группу.

Сочетания из примеров 1 и 2 с агонистом ГПП-1Р или коагонистом ГИП-ГПП-1 оказывают синергетические воздействия на массу тела и массу жировой ткани по сравнению с отдельными воздействиями агониста ГПП-1Р или коагониста ГИП-ГПП-1 из примеров 1 или 2 (табл. 12 и 13).

Таблица 12

Лечение	Доза (нмоль/кг)	% изменения от начальной массы тела	% изменения от начальной массы жировой ткани
Наполнитель	0	-3,72 ± 1,169	-4,39 ± 1,84
Пример 1	3	-6,07 ± 1,81	-9,60 ± 3,35
Пример 1	10	-10,56 ± 1,78	-18,12 ± 3,40*
Агонист ГПП1-Р	10	-15,54 ± 1,67**	-28,32 ± 2,94***
Агонист ГПП1-Р + Пример 1	10+3	-26,57 ± 2,05****	-49,88 ± 3,87****
Агонист ГПП1-Р + Пример 1	10+10	-30,78 ± 1,97****	-62,22 ± 4,10****
Коагонист ГИП-ГПП-1	10	-23,67 ± 1,83****	-48,21 ± 4,67****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 1	10+3	-34,83 ± 3,60****	-68,99 ± 4,05****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 1	10+10	-43,06 ± 2,49****	-82,06 ± 1,41****

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 и ****p < 0,0001 значимое от контрольной группы носителя (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, Даннетта).

Таблица 13

Лечение	Доза (нмоль/кг)	% изменения от начальной массы тела	% изменения от начальной массы жировой ткани
Наполнитель	0	1,14 ± 1,02	3,17 ± 1,61
Агонист ГПП1-Р	10	-10,74 ± 1,42*	-21,52 ± 3,51*
Коагонист ГИП-ГПП-1	10	-17,76 ± 4,52***	-33,30 ± 7,35****
Пример 1	3	-1,77 ± 2,08	-2,08 ± 3,59
Пример 1	10	-3,87 ± 1,41	-6,20 ± 2,90
Пример 2	3	-0,85 ± 2,71	0,11 ± 5,11
Пример 2	10	-5,29 ± 0,84	-6,03 ± 1,99
Агонист ГПП1-Р+ Пример 1	10+3	-17,49 ± 2,90***	-34,41 ± 7,38****
Агонист ГПП1-Р+ Пример 1	10+10	-23,49 ± 1,40****	-48,16 ± 4,14****
Агонист ГПП1-Р+ Пример 2	10+3	-14,83 ± 2,43**	-27,21 ± 6,34**
Агонист ГПП1-Р+ Пример 2	10+10	-30,60 ± 4,33****	-55,55 ± 7,93****
Агонист ГИП-ГПП+ Пример 1	10+3	-18,41 ± 1,23****	-39,06 ± 4,13****
Агонист ГИП-ГПП+ Пример 1	10+10	-32,01 ± 3,81****	-65,66 ± 5,92****
Агонист ГИП-ГПП+ Пример 2	10+3	-15,94 ± 1,20***	-33,54 ± 3,43****
Агонист ГИП-ГПП+ Пример 2	10+10	-40,37 ± 4,03****	-76,34 ± 3,11****

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 и ****p < 0,0001 значимое от контрольной группы носителя (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, Даннетта).

Данные о влиянии на уровень глюкозы в крови, уровень холестерина в плазме крови и триглицериды печени приведены ниже в табл.14 (среднее ± СОС, n = 5) и 15 (среднее ± СОС, n = 6). Принимая во внимание, что примеры 1 и 2, вводимые индивидуально, повышают уровень глюкозы в крови дозозависимым образом, сочетания таких типовых агонистов глюкагонового рецептора с агонистами ГПП-1Р или коагонистами ГИП-ГПП-1 снижают уровень глюкозы в крови, холестерин в плазме крови и триглицериды печени.

Таблица 14

Лечение	Доза (нмоль/кг)	AUC глюкозы в крови (мг/дл/15 дней)	Холестерин плазмы крови (мг/дл)	Триглицериды печени (мг/г ткани)
Наполнитель	0	2224 ± 78,55	228,00 ± 6,50	200,29 ± 33,67
Пример 1	3	2553 ± 112,5*	207,00 ± 6,43	68,83 ± 5,82****
Пример 1	10	2607 ± 109,4**	157,80 ± 15,44****	32,94 ± 11,23****
Агонист ГПП1-Р	10	1565 ± 26,39****	153,40 ± 11,64****	55,01 ± 12,62****
Агонист ГПП1-Р + Пример 1	10+3	1452 ± 25,48****	96,20 ± 7,86****	20,89 ± 4,39****
Агонист ГПП1-Р + Пример 1	10+10	1388 ± 80,92****	86,60 ± 3,47****	12,78 ± 1,57****
Коагонист ГИП-ГПП-1	10	1453 ± 27,96****	137,80 ± 9,05****	32,60 ± 6,70****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 1	10+3	1256 ± 111,5****	103,00 ± 3,56****	35,47 ± 15,78****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 1	10 + 10	1044 ± 63,37****	77,40 ± 10,10****	24,99 ± 13,43****

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 из контрольной группы (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, Даннетта).

Таблица 15

Лечение	Доза (нмоль/кг)	AUC глюкозы в крови (мг/дл/15 дней)	Холестерин плазмы крови (мг/дл)	Триглицериды печени (мг/г ткани)
Наполнитель	0	1806 ± 52,85	224,40 ± 5,12	174,72 ± 26,56
Агонист ГПП1-Р	10	1189 ± 28,83****	149,50 ± 12,02****	46,06 ± 12,31****
Коагонист ГИП-ГПП-1	10	1137 ± 63,27****	135,50 ± 7,11****	48,50 ± 7,18****
Пример 1	3	2080 ± 103,2	230,50 ± 6,61	111,87 ± 22,43**
Пример 1	10	2491 ± 110,9****	152,83 ± 8,82****	29,42 ± 3,54****
Пример 2	3	2433 ± 124,7****	201,83 ± 10,11	75,45 ± 12,82****
Пример 2	10	2641 ± 186,6****	117,67 ± 4,46****	16,33 ± 1,53****
Агонист ГПП1-Р + Пример 1	10 + 3	1081 ± 56,68****	132,50 ± 19,56****	34,34 ± 6,48****
Агонист ГПП1-Р + Пример 1	10 + 10	1031 ± 61,29****	83,33 ± 8,50****	25,57 ± 7,27****
Агонист ГПП1-Р + Пример 2	10 + 3	1098 ± 52,69****	152,00 ± 9,32****	38,99 ± 5,96****
Агонист ГПП1-Р + Пример 2	10 + 10	1008 ± 107,2****	78,50 ± 6,03****	34,42 ± 14,36****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 1	10 + 3	1142 ± 31,32****	131,83 ± 6,42****	22,48 ± 3,92****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 1	10 + 10	916,9 ± 97,73****	91,67 ± 4,75****	6,99 ± 1,29****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 2	10 + 3	1063 ± 20,89****	119,33 ± 5,79****	22,87 ± 5,94****
Коагонист ГИП-ГПП-1 + Пример 2	10 + 10	801,8 ± 48,21****	90,33 ± 7,89****	17,99 ± 9,65****

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ из контрольной группы (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, Даннетта).

Стабильность в сочетании составов с коагономистом ГИП-ГПП-1.

Образцы из примеров 1 и 3 готовили и диализовали против Т7 согласно описанию. Оба примера приготавливали отдельно при 1 мг/мл пептида в Т7, Т7m, Т7N и Т7Nm. Коагономист ГИП-ГПП-1 из SEQ ID NO: 15 также готовили и диализовали против Т7, как описано для типовых агонистов глюкоагонового рецептора. Коагономист ГИП-ГИП-1 приготавливали при 1 мг/мл пептида в Т7, Т7m и Т7Nm. Совместно приготавливаемые образцы, содержащие 1 мг/мл примера 1 и 1 мг/мл коагономиста ГИП-ГПП-1 или 1 мг/мл примера 3 и 1 мг/мл коагономиста ГИП-ГПП-1 также подготавливали и составляли в Т7, Т7m, Т7N и Т7Nm. Каждый приготавливаемый образец переносили в три флакона. Образцы поддерживали при 4, 25 и 40°C. Образцы оценивали каждые две недели в течение четырех недель. Образцы визуальнo оценивали на наличие мутности и разделения фаз. Стабильность оценивали с помощью ОФ-ВЭЖХ, как описано выше для состава отдельно взятого агента. Описанный способ ОФ-ВЭЖХ дает хорошее разделение соединений примера и основных пиков коагономиста ГИП-ГПП-1, а также всех пиков деградации, полученных путем помещения образца в стрессовые условия при pH 9 и 40°C в течение 3 дней.

По ОФ-ВЭЖХ общий пик восстановления для всех образцов находится в пределах 5%. Все составы оставались прозрачными и бесцветными без опалесценции или осаждения. Изменения в проценте пептидов в их соответствующих основных пиках, наблюдаемых с помощью ОФ-ВЭЖХ через 4 недели, подытожены в табл. 16. Потери в процентах основного пика существенно не изменялись для примера 1 при приготовлении в виде отдельного агента по сравнению с сочетанием составов с коагономистом ГИП-ГИП-1 во всех тестируемых составах. Коагономист ГИП-ГПП-1 демонстрирует постоянную потерю в процентах основного пика при приготовлении в виде отдельного агента по сравнению с сочетанием составов как с примером 1, так и с примером 3. Данные показывают, что примеры 1 и 3 имеют приемлемую стабильность при приготовлении в виде отдельного агента или сочетания составов с коагономистом ГИП-ГИП-1 и что примеры 1 и 3 не оказывают отрицательного влияния на стабильность коагономиста ГИП-ГПП-1 в сочетании составов.

Таблица 16

Соединение(ния)	Состав	Изменение в % основного пика аналога глюкоагона			Изменение в % основного пика коагономиста ГИП-ГПП-1		
		4 ° C	25 ° C	40 ° C	4 ° C	25 ° C	40 ° C
Пример 1	T7	-1,23	-2,91	-4,69	Н/П		
	T7m	-0,6	-0,15	-2,36			
	T7N	-0,29	-1,39	-4,19			
	T7Nm	-0,38	-1,71	-3,93			
Пример 1 + коагономист ГИП-ГПП-1	T7	-1,57	-0,26	-3,59	-0,37	-0,37	-3,35
	T7m	-1,19	-0,92	-2,67	0,54	0,35	-3,76
	T7N	-0,25	-0,89	-2,15	-0,21	-0,57	-4,42
	T7Nm	-1,22	-1,94	-3,78	-0,71	-1,07	-5,50
Пример 3	T7	-2,23	-7,00	-1,78	Н/П		
	T7m	0,92	1,23	-0,78			
	T7N	-1,78	-6,13	-2,15			
	T7Nm	0,11	-0,76	-2,02			
Пример 3 + коагономист ГИП-ГПП-1	T7	-0,07	-7,51	-0,80	-0,40	-0,40	-4,14
	T7m	-3,17	-4,12	-5,08	-1,23	-1,23	-5,40
	T7N	-3,26	-7,50	-6,37	-0,22	-1,90	-6,12
	T7Nm	-2,75	-3,24	-3,35	-0,92	-0,87	-4,73
Коагономист ГИП-ГПП-1	T7	Н/П			-0,59	-2,12	-5,25
	T7m				0,10	-0,50	-4,3
	T7Nm				-0,85	-1,14	-4,66

Образцы из примера 1, коагономист ГИП-ГПП-1 и его сочетания, приготавливаемые в Т7Nm, и сочетания из примера 1 и коагономист ГИП-ГПП-1, приготавливаемые в Т7, которые инкубируются при 4 и 40°C в течение четырех недель также оценивали с помощью ЖХ-МС. Никаких основных участков деградации не выявлено. Как для примера 1, так и для коагономиста ГИП-ГПП-1 химические модификации существенно не различаются для составов с отдельным агентом по сравнению с сочетанием составов.

Стабильность в сочетании составов с агонистом ГПП-1Р.

Примеры 1 и 3 готовили и диализовали против С6.5 (10 мМ цитрата, pH 6,5), используя тот же способ, который описан выше для приготовления в буфере Т7. Соединения приготавливали отдельно при 1 мг/мл пептида в буфере С6.5, С6.5М (10 мМ цитрата, 46,4 мг/мл D-маннитола, pH 6,5), С6.5Т (10 мМ цитрата, 0,02% полисорбата-80, pH 6,5) и С6.5МТ (10 мМ цитрата, 46,4 мг/мл D-маннитола, 0,02% поли-

сорбата-80, рН 6,5). Базовую концентрацию 46,5 мг/мл дулаглутид в С6.5 использовали для приготовления дулаглутид при 3 мг/мл в С6.5 и С6.5МТ. Сочетания составов в С6.5МТ готовили с использованием 3 мг/мл дулаглутид и 1 мг/мл примера 1 или 3 мг/мл дулаглутид и 1 мг/мл примера 3. Каждый приготовленный образец переносили в три флакона и поддерживали при 4, 25 и 40°C. Образцы оценивали каждые две недели в течение четырех недель. Образцы визуальнo оценивали на наличие мутности и разделения фаз. Стабильность оценивали с помощью ОФ-ВЭЖХ и эксклюзионной ВЭЖХ, как описано выше. Оба описанных способа ВЭЖХ обеспечивают хорошее разделение соединений из примеров и основных пиков дулаглутид, а также всех пиков деградации, полученных путем помещения образца в стрессовые условия при рН 9 и 40°C в течение 3 дней.

Как по ОФ-ВЭЖХ, так и по эксклюзионной ВЭЖХ общий пик восстановления для всех образцов стабильности находится в пределах 5%. Все составы оставались прозрачными и бесцветными без опалесценции или осаждения. Изменения в проценте соединений в их соответствующих основных пиках, наблюдаемых с помощью эксклюзионной ВЭЖХ через 4 недели, подытожены в табл. 17. Примеры 1 и 3 обычно стабильны и не показывают значительную потерю основного пика. Пример 1 не обладает меньшей стабильностью, когда приготовлен в сочетании составов с дулаглутидом по сравнению с составами с отдельным агентом. Пример 3 показывает немного меньшую стабильность в сочетании составов с дулаглутидом по сравнению с составами с отдельным агентом. Агонист ГПП-1Р не обладает меньшей стабильностью, когда приготовлен в сочетании составов как с примером 1, так и с примером 3 по сравнению с составами с отдельным агентом.

Таблица 17

Соединение(ния)	Состав	Δ % основного пика аналога глюкагона			Δ % основного пика ГПП-1-Fc		
		4 ° C	25 ° C	40 ° C	4 ° C	25 ° C	40 ° C
Пример 1	С6.5	-1,32	-1,99	-2,35	Н/П		
	С6.5М	0,70	-1,26	-1,67			
	С6.5Т	-2,76	-3,97	-1,72			
	С6.5МТ	-1,04	-2,65	-1,40			
Пример 3	С6.5	1,03	-0,34	-0,37	Н/П		
	С6.5М	0,49	-0,24	1,08			
	С6.5Т	0,46	0,10	-0,02			
	С6.5МТ	1,02	-0,07	0,64			
дулаглутид	С6.5	Н/П			0,19	-0,54	> -10
	С6.5МТ	Н/П			0,29	-0,87	-0,83
Пример 1 + дулаглутид	С6.5МТ	-0,67	-0,75	-0,75	0,25	-0,16	-0,16
Пример 3 + дулаглутид	С6.5МТ	-1,04	-1,90	-1,90	0,21	-0,11	-0,11

Как показывает ОФ-ВЭЖХ, тенденции стабильности аналогичны тенденциям, наблюдаемым с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Изменения в проценте соединений в их соответствующих основных пиках, наблюдаемых с помощью ОФ-ВЭЖХ через 4 недели, подытожены в табл. 18. Примеры 1 и 3 обычно стабильны и не показывают значительную потерю основного пика. Пример 1 не обладает меньшей стабильностью, когда приготовлен в сочетании составов с агонистом ГПП-1Р по сравнению с составами с отдельным агентом. Пример 3 показывает немного меньшую стабильность в сочетании составов с агонистом ГПП-1Р по сравнению с составами с отдельным агентом. Агонист ГПП-1Р не обладает меньшей стабильностью, когда приготовлен в сочетании составов с любым примером по сравнению с составами с отдельным агентом.

Таблица 18

Соединение(ния)	Состав	Δ % основного пика аналога глюкагона			Δ % основного пика ГПП-1-Fc		
		4 ° C	25 ° C	40 ° C	4 ° C	25 ° C	40 ° C
Пример 1	C6.5	-0,06	-0,47	-3,73	Н/П		
	C6.5M	0,34	-2,61	-4,47			
	C6.5T	0,51	-0,35	-3,57			
	C6.5MT	-0,98	-0,69	-4,39			
Пример 3	C6.5	1,06	0,17	0,24	Н/П		
	C6.5M	2,43	0,64	1,86			
	C6.5T	-2,11	*	-3,18			
	C6.5MT	-1,22	*	-0,4			
Агонист ГПП-1P	C6.5	Н/П			-1,45	> -10	-9,96
	C6.5MT				-0,46	-0,8	-7,47
Пример 1 + Агонист ГПП-1P	C6.5MT	0,62	*	-2,55	1,90	*	-8,18
Пример 3 + Агонист ГПП-1P	C6.5MT	-0,82	-2,49	-1,39	0,27	-3,05	-9,64

*Данные отсутствуют из-за ошибки прибора.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 - глюкагон человека

HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO: 2 - ГПП-1 человека

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR

SEQ ID NO: 3 - OXM человека

HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA

SEQ ID NO: 4 - ГИП человека

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNWVKNITQ

SEQ ID NO: 5 - агонист глюкагонового рецептора

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

где X₁ представляет собой Aib;

X₂ представляет собой T или L;

X₃ представляет собой Aib;

X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равно 1 или 2 и b равно от 14 до 24;

X₅ представляет собой E или A;

X₆ представляет собой T или E;

X₇ либо отсутствует, либо представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из GPSSGAPPPS и GPSSG;

и C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

SEQ ID NO: 6 - агонист глюкагонового рецептора

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

где X₁ представляет собой Aib;

X₂ представляет собой T;

X₃ представляет собой Aib;

X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равно 2 и b равно 16;

X₅ представляет собой E;

X₆ представляет собой T;

X₇ представляет собой GPSSGAPPPS;

и C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида.

SEQ ID NO: 7 - агонист глюкагонового рецептора

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

где X₁ представляет собой Aib;

X₂ представляет собой T;

X₃ представляет собой Aib;

X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой

боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где а равно 2 и b равно 18;
 X₅ представляет собой E;
 X₆ представляет собой T;
 X₇ представляет собой GPSSGAPPPS;
 и где С-концевая аминокислота амидирована в качестве С-концевого первичного амида.
 SEQ ID NO: 8 - агонист глюкагонового рецептора

$$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$$

где X₁ представляет собой Aib;
 X₂ представляет собой L;
 X₃ представляет собой Aib;
 X₄ представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где а равно 2 и b равно 16;
 X₅ представляет собой E;
 X₆ представляет собой T; и
 X₇ представляет собой GPSSGAPPPS;
 и где С-концевая аминокислота амидирована в качестве С-концевого первичного амида.
 SEQ ID NO: 9 - агонист глюкагонового рецептора

$$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$$

где X₁ представляет собой Aib;
 X₂ представляет собой T;
 X₃ представляет собой Aib;
 X₄ представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где а равно 2 и b равно 16;
 X₅ представляет собой E;
 X₆ представляет собой T; и
 X₇ представляет собой GPSSG;
 и С-концевая аминокислота амидирована в качестве С-концевого первичного амида.
 SEQ ID NO: 10 - агонист глюкагонового рецептора

$$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$$

где X₁ представляет собой Aib;
 X₂ представляет собой T;
 X₃ представляет собой Aib;
 X₄ представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где а равно 2 и b равно 18;
 X₅ представляет собой E;
 X₆ представляет собой T; и
 X₇ представляет собой GPSSG;
 и С-концевая аминокислота амидирована в качестве С-концевого первичного амида.
 SEQ ID NO: 11 - агонист глюкагонового рецептора

$$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$$

где X₁ представляет собой Aib;
 X₂ представляет собой T;
 X₃ представляет собой Aib;
 X₄ представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где а равно 1 и b равно 16;
 X₅ представляет собой A;
 X₆ представляет собой E;
 X₇ отсутствует; и
 С-концевая аминокислота представляет собой С-концевую кислоту.
 SEQ ID NO: 12 - агонист глюкагонового рецептора

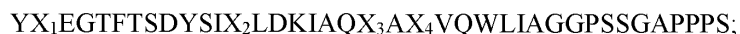
$$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$$

где X₁ представляет собой Aib;
 X₂ представляет собой T;
 X₃ представляет собой Aib;
 X₄ представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где а равно 1 и b равно 18;
 X₅ представляет собой A;
 X₆ представляет собой E;

X₇ отсутствует; и

C-концевая аминокислота представляет собой C-концевую кислоту.

SEO ID NO: 13 - коагонист ГИП-ГПП



где X₁ представляет собой Aib;

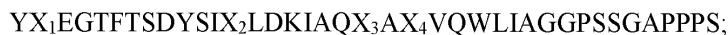
X₂ представляет собой Aib;

X₃ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO (CH₂)_b-CO₂H, где a равно 1 или 2 и b равно от 10 до 20;

X₄ представляет собой Phe или 1-нафтилаланином (1-Nal);

и C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

SEO ID NO: 14 - коагонист ГИП-ГПП



где X₁ представляет собой Aib;

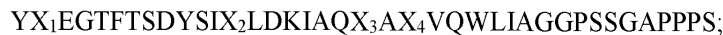
X₂ представляет собой Aib;

X₃ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO(CH₂)_b-CO₂H, где a равно 2 и b равно 18;

X₄ представляет собой 1-Nal;

и C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида.

SEO ID NO: 15 - коагонист ГИП-ГПП



где X₁ представляет собой Aib;

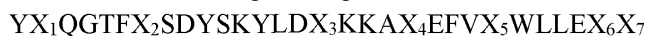
X₂ представляет собой Aib;

X₃ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO (CH₂)_b-CO₂H, где a равно 1 и b равно 18;

X₄ представляет собой Phe;

и C-концевая аминокислота амидирована в качестве C-концевого первичного амида.

SEQ ID NO: 16 - агонист глюконогового рецептора



где X₁ представляет собой Aib;

X₂ представляет собой T или L;

X₃ представляет собой Aib;

X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равно 2 и b равно от 14 до 24;

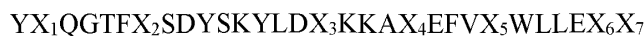
X₅ представляет собой E;

X₆ представляет собой T;

X₇ представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из GPSSGAPPPS и GPSSG;

и C-концевая аминокислота амидирована.

SEQ ID NO: 17 - агонист глюконогового рецептора



где X₁ представляет собой Aib;

X₂ представляет собой T;

X₃ представляет собой Aib;

X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой боковой цепи K с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, где a равно 1 и b равно от 14 до 24;

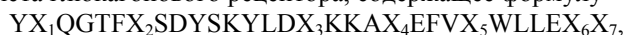
X₅ представляет собой A;

X₆ представляет собой E; и

X₇ отсутствует.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение агониста глюконогового рецептора, содержащее формулу



где X₁ представляет собой Aib;

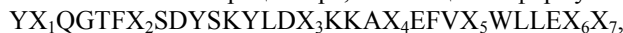
X₂ представляет собой T;

X₃ представляет собой Aib;

X₄ представляет собой K, который химически модифицирован путем сопряжения с ε-аминогруппой

боковой цепи К с $([2-(2\text{-аминоэтокси})\text{этокси}]\text{ацетил})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где а равно 1 и b равно 18;
 X_5 представляет собой А;
 X_6 представляет собой Е; и
 X_7 отсутствует;
 (SEQ ID NO: 12);
 или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение агониста глюкагонового рецептора, состоящее из формулы



где X_1 представляет собой Aib;

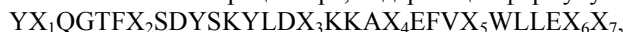
X_2 представляет собой Т;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой

боковой цепи К с $([2-(2\text{-аминоэтокси})\text{этокси}]\text{ацетил})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где а равно 1 и b равно 18;
 X_5 представляет собой А;
 X_6 представляет собой Е; и
 X_7 отсутствует;
 (SEQ ID NO: 12);
 или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение агониста глюкагонового рецептора, содержащее формулу



где X_1 представляет собой Aib;

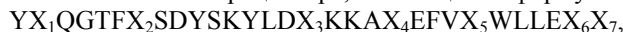
X_2 представляет собой Т;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой

боковой цепи К с $([2-(2\text{-аминоэтокси})\text{этокси}]\text{ацетил})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где а равно 1 и b равно 16;
 X_5 представляет собой А;
 X_6 представляет собой Е; и
 X_7 отсутствует;
 (SEQ ID NO: 11);
 или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение агониста глюкагонового рецептора, состоящее из формулы



где X_1 представляет собой Aib;

X_2 представляет собой Т;

X_3 представляет собой Aib;

X_4 представляет собой К, который химически модифицирован путем сопряжения с ϵ -аминогруппой

боковой цепи К с $([2-(2\text{-аминоэтокси})\text{этокси}]\text{ацетил})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$, где а равно 1 и b равно 16;
 X_5 представляет собой А;
 X_6 представляет собой Е; и
 X_7 отсутствует;
 (SEQ ID NO: 11);
 или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Способ лечения жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота, включающий введение эффективного количества агониста глюкагонового рецептора по любому из пп.1-4.

6. Способ по п.5, согласно которому крупный рогатый скот представляет собой дойную корову.

7. Применение агониста глюкагонового рецептора по любому из пп.1-4 для лечения жировой дистрофии печени у дойной коровы.

8. Фармацевтическая композиция для лечения жировой дистрофии печени у крупного рогатого скота, содержащая агонист глюкагонового рецептора по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

9. Агонист глюкагонового рецептора по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что активность агониста глюкагонового рецептора на глюкагоновом рецепторе по меньшей мере в 100 раз выше, чем эффективность агониста глюкагонового рецептора на рецепторе ГПП-1.

