

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038720**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.11

(21) Номер заявки
201792562

(22) Дата подачи заявки
2016.06.16

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(54) **КОАГОНИСТ РЕЦЕПТОРА GLP-1 И РЕЦЕПТОРА ГЛЮКАГОНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТА ТИПА 2, ОЖИРЕНИЯ, БЕЗАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ И БЕЗАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА**

(31) **62/182,847**

(32) **2015.06.22**

(33) **US**

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/US2016/037818**

(87) **WO 2016/209707 2016.12.29**

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

(72) Изобретатель:
**Чэнь Яньюнь, Мезо Адам Роберт,
Цюй Хунчан, Валенсуэла Франсиско
Альсидес (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)**

(56) **WO-A1-2011094337
CA-A1-2852177
WO-A1-2013074910
WO-A1-2013004983
WO-A2-2014152460**

(57) Изобретение относится к соединению, представляющему собой агонист рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкагона (Gcg), фармацевтической композиции, его содержащей, способам лечения, предусматривающим его использование, его применению для лечения диабета типа 2, ожирения, неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD) и безалкогольного стеатогепатита (NASH), а также к его промежуточному соединению и способу его производства.

B1**038720****038720****B1**

Данное изобретение относится к области техники медицины. Более конкретно данное изобретение относится к области лечения диабета и ожирения и относится к соединениям, которые как представляют собой агонисты рецептора глюкагона (Gcg), так и рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1). В частности, предложены аналоги оксинтомодулина/глюкагона с модификациями аминокислот, введенными для модуляции активности как для рецептора Gcg, так и для рецептора GLP-1.

За последние несколько десятилетий распространенность диабета продолжала расти. Сахарный диабет 2 типа (T2D) является наиболее распространенной формой диабета, составляющей примерно 90% всего диабета. T2D характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, вызванным резистентностью к инсулину. Нынешний стандарт ухода за T2D включает в себя диету и физические упражнения, а также доступные пероральные и инъекционные препараты для снижения уровня глюкозы. Тем не менее, состояние многих пациентов с T2D все еще остается недостаточно контролируемым. Неконтролируемый диабет приводит к нескольким условиям, которые влияют на заболеваемость и смертность пациентов. Главной причиной смерти пациентов с диабетом являются сердечно-сосудистые осложнения. Одним из основных факторов риска развития диабета типа 2 является ожирение. Большинство пациентов с T2D (~90%) имеют избыточный вес или ожирение. Задокументировано, что снижение ожирения тела приведет к улучшению связанных с ожирением сопутствующих заболеваний, включая гипергликемию и осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы. Таким образом, терапия, эффективная при контроле глюкозы и уменьшении веса, необходима для лучшего оказания помощи при болезни.

Ряд пептидов, полученных из предпроглюкагона и его аналогов, были предложены в качестве терапевтических средств для лечения T2D и ожирения, в частности Gcg, GLP-1 и оксинтомодулин (ОХМ). Предпроглюкагон представляет собой предшественник 158-аминокислотного полипептида, который дифференциально обрабатывается в тканях с образованием ряда структурно связанных проглюкагон-пептидов, включая Gcg, GLP-1, глюкагонподобный пептид-2 (GLP-2) и оксинтомодулин (ОХМ). Эти молекулы участвуют в широком спектре физиологических функций, включая гомеостаз глюкозы, секрецию инсулина, опорожнение желудка и рост кишечника, а также регулирование приема пищи.

Gcg представляет собой 29-аминокислотный пептид, который соответствует от 53 до 81 аминокислотам препроглюкагона. ОХМ представляет собой 37-аминокислотный пептид и состоит из полной 29-аминокислотной последовательности Gcg с октапептидным карбоксильным терминальным расширением (аминокислоты с 82 по 89 препроглюкагон и называется "промежуточным пептидом 1" или IP-1). Основной биологически активный фрагмент GLP-1 (GLP-1₇₋₃₆) вырабатывается в виде 30-аминокислотного C-концевого амидированного пептида, который соответствует от 98 до 127 аминокислотам препроглюкагона.

Gcg помогает поддерживать уровень глюкозы в крови путем связывания с рецепторами Gcg на гепатоцитах, вызывая выделение печенью глюкозы, хранящейся в виде гликогена, посредством гликогенолиза. По мере того как эти запасы истощаются, Gcg стимулирует печень синтезировать дополнительную глюкозу глюконеогенезом. Эта глюкоза высвобождается в кровоток, предотвращая развитие гипогликемии.

GLP-1 имеет различные биологические активности по сравнению с Gcg. Его действия включают стимуляцию синтеза и секреции инсулина, ингибирование секреции Gcg и ингибирование приема пищи. Было показано, что GLP-1 снижает гипергликемию у диабетиков. Несколько агонистов GLP-1 были одобрены для применения при лечении T2D у людей, включая эксенатид, лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид и дулаглутид. Такие агонисты GLP-1 эффективны при гликемическом контроле с благоприятным воздействием на вес без риска гипогликемии. Однако потеря веса является умеренной из-за зависящих от дозы побочных эффектов желудочно-кишечного тракта.

ОХМ выделяется вместе с GLP-1 из L-клеток тонкой кишки в пропорции к потреблению питательных веществ. ОХМ активирует как рецепторы Gcg, так и GLP-1 с несколько более высокой эффективностью для рецептора Gcg по отношению к рецептору GLP-1. Он менее эффективен, чем нативный Gcg и GLP-1 на их соответствующих рецепторах. Человеческий Gcg также способен активировать оба рецептора, хотя и с сильным предпочтением Gcg-рецептора по отношению к рецептору GLP-1. GLP-1 не способен активировать рецепторы Gcg. ОХМ участвует в регулировании потребления пищи и веса тела. Было показано, что подавляет аппетит и подавляет потребление пищи у людей. В 4-недельном исследовании с субъектами с избыточным весом и ожирением трехкратное ежедневное предварительное подкожное введение ОХМ приводило к потере веса в 2,3 кг по сравнению с 0,5 кг в группе плацебо. В этом испытании тошнота, наиболее распространенный побочный эффект, связанный с терапией на основе GLP-1 (такой как эксенатид и лираглутид), был менее частым. В другом более коротком исследовании ОХМ, как было показано, уменьшает потребление калорий и увеличивает затраты на энергию, связанные с избыточным весом и ожирением.

Эти данные свидетельствуют о том, что ОХМ имеет потенциал быть хорошо переносимым агентом по борьбе с диабетом/ожирением. Однако ОХМ представляет несколько проблем для развития в качестве коммерчески жизнеспособного терапевтического агента. Эндогенный ОХМ быстро деградирует *in vivo* дипептидилпептидазой IV и другими пептидазами, а также подвергается быстрому почечному клиренсу из-за его небольшого размера. Поэтому желательно идентифицировать пептиды, которые активируют

рецепторы Gcg и GLP-1 с улучшенной метаболической стабильностью и сниженной скоростью клиренса.

Пептиды ОХМ с аминокислотными замещениями для улучшения стабильности и с дополнительными модификациями для медленного клиренса, такими как ПЭГилирование или липидация, описаны в данной области техники. Было указано, что другие пептиды связывают с и активируют как рецептор Gcg, так и рецептор GLP-1 и подавляют увеличение массы тела (см. пример, WO 2011/075393 A2 и WO 2012/177444 A2).

Несмотря на наличие различных пептидов, которые агонизируют как рецепторы Gcg, так и GLP-1, остается потребность в более мощных, стабильных, длительно действующих и/или хорошо переносимых соединениях, имеющих отношение Gcg-рецептора (Gcg-R)/GLP-1 (GLP-1-R), которая была оптимизирована таким образом, что активность и инсулинотропная активность соединений обеспечивают эффективные методы лечения диабета, предпочтительно T2D и связанные с этим расстройства. В частности, остается потребность в соединениях со сбалансированным соотношением активности Gcg-R/GLP-1-R, которые уменьшают массу тела. Кроме того, остается потребность в соединениях с сбалансированным соотношением коагониста Gcg-R/GLP-1-R, которое поддерживает потенциальные ежедневные, раз в две недели, раз в неделю или ежемесячные дозы у людей. Соответственно данное изобретение направлено на обеспечение эффективного лечения диабета, ожирения, неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD) и/или безалкогольного стеатогепатита (NASH).

Сущность изобретения

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к соединению, представляющему собой агонист рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкагона (Gcg) и имеющему следующую формулу:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa2 представляет собой Aib; Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислотой через линкер, представляющий собой $[(2-(2\text{-аминоэтоксидокси)этоксид}]\text{ацетил}2-(\gamma\text{-Glu})_t$, где t равен 1 или 2; и

C-концевая аминокислота амидирована или не амидирована;

или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном предпочтительном варианте Xaa28 представляет собой Glu.

В другом предпочтительном варианте Xaa28 представляет собой Ser.

Еще в одном предпочтительном варианте t равен 1.

В другом предпочтительном варианте t равен 2.

C14-C24 жирная кислота может представлять собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту. Более конкретно C14-C24 жирная кислота может представлять собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту, выбранную из миристиновой кислоты (тетрадекановой кислоты) (C14 монокарбоновой кислоты), тетрадекандикарбоновой кислоты (C14-дикарбоновой кислоты), пальмитиновой кислоты (гексадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C16), гексадекандикарбоновой кислоты (C16-дикарбоновой кислоты), маргариновой кислоты (гептадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C17), гептадекандикарбоновой кислоты (дикарбоновой кислоты C17), стеариновой кислоты (октадекановой кислоты) (C18 монокарбоновой кислоты), октадекандикарбоновой кислоты (C18-дикарбоновой кислоты), нонадециловой кислоты (нонадекановой кислоты) (C19 монокарбоновой кислоты), нонадекандикарбоновой кислоты (C19-дикарбоновой кислоты), арахиновой кислоты (эйкозановой кислоты) (C20 монокарбоновой кислоты), эйкозандикарбоновой кислоты (C20-дикарбоновой кислоты), гнейкозиловой кислоты (гнейкозановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C21), гнейкозандикарбоновой кислоты (C21-дикарбоновой кислоты), бегеновой кислоты (докозановой кислоты) (C22), докозандикарбоновой кислоты (C22-дикарбоновой кислоты), лигноцериновой кислоты (тетракозановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C24) и тетракозандикарбоновой кислоты (C24-дикарбоновой кислоты).

Согласно некоторым предпочтительным вариантам C14-C24 жирная кислота представляет собой октадекандикарбоновую кислоту или эйкозандикарбоновую кислоту.

Согласно одному из вариантов C-концевая аминокислота амидирована.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения диабета типа 2, ожирения, безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и/или безалкогольного стеатогепатита (NASH), где композиция содержит соединение, как описано выше, или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Более того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения диабета типа 2 у субъекта, включающий введение эффективного количества вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, способ лечения ожирения у субъекта, включающий введение эффективного количества вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, способ лечения безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) у субъекта, включающий введение эффективного количества вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, способ лечения безалкогольного сте-

атогепатита (NASH) у субъекта, включающий введение эффективного количества вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, а также способ индуцирования нетерапевтической потери веса у субъекта, включающий введение эффективного количества вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли для лечения диабета типа 2, ожирения, неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD) и безалкогольного стеатогепатита (NASH).

Наконец, настоящее изобретение относится к промежуточному соединению для производства вышеуказанного соединения, описываемому формулой (SEQ ID NO: 9):

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser и

С-концевая аминокислота амидирована или неамидирована,

или его фармацевтически приемлемой соли, а также способ производства вышеуказанного соединения, где указанный способ включает стадию модифицирования промежуточного соединения путем конъюгации с эpsilon-аминогруппой боковой цепи Lys в положении 20 промежуточного соединения с C14-C24 жирной кислотой через линкер, представляющий собой ([2-(2-аминоэтокс)этокс]ацетил)2-(γ-Glu)_t, где t равен 1 или 2.

Подробное описание

В одном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 2) или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В другом аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 3) или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где

Xaa2 представляет собой Aib;

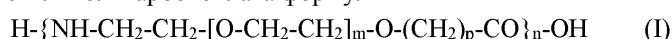
Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 4) или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации с C14-C24 жирной кислотой через линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой.

Более предпочтительно линкер выбран из группы, состоящей из:

(a) аминокполиэтиленгликолькарбоксилата формулы I



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

(b) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аргинина (Arg), аспарагина (Asn), аспара-

гиновой кислоты (Asp), глутамина (Gln), глутаминовой кислоты (Glu), гистидина (His), лизина (Lys), серина (Ser), треонина (Thr), цитруллина (Cit), орнитина (Orn), саркозина (Sar), глицина (Gly), γ -аминомасляной кислоты (γ -Abu) и γ -глутаминовой кислоты (γ -Glu);

(с) дипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

(d) трипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;

(е) полипептида, выбранного из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15; и

(f) линкера конъюгации, где аминополитиленгликолькарбоксилат формулы I, как указано в определении в (а), конъюгирован с:

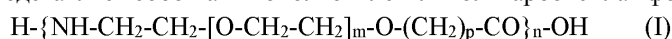
(i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu;

(ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

(iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; или

(iv) полипептида, выбранного из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15.

В предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей линкер представляет собой аминополитиленгликолькарбоксилат формулы I



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

Предпочтительно n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, m равен 1 и p равен 1 для аминополитиленгликолькарбоксилата формулы I.

Более предпочтительно n равен 2, m равен 1 и p равен 1 для аминополитиленгликолькарбоксилата формулы I.

В дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей линкер представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu.

Предпочтительно аминокислота представляет собой γ -Glu.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей линкер представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты.

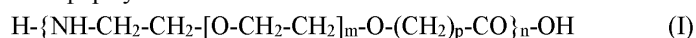
Предпочтительно дипептид представляет собой γ -Glu- γ -Glu.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей линкер представляет собой трипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей линкер представляет собой полипептид, выбранный из группы,

состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s, и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей линкер представляет собой линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I



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

(i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cys, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu;

(ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

(iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; или

(iv) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s, и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15. Предпочтительно n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, m равен 1 и p равен 1 для аминополиэтиленгликолькарбоксилата формулы I.

Более предпочтительно n равен 2, m равен 1 и p равен 1 для аминополиэтиленгликолькарбоксилата формулы I.

Еще более предпочтительно аминокислота представляет собой γ -Glu.

Еще более предпочтительно дипептид представляет собой γ -Glu- γ -Glu.

В предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению линкер представляет собой ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ -Glu)_t, где t равен 1 или 2. Предпочтительно t равен 1. Более предпочтительно t равен 2. В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей C14-C24 жирная кислота представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту.

Предпочтительно жирная кислота представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из миристиновой кислоты (тетрадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C14), тетрадекандикарбоновой кислоты (C14-дикарбоновой кислоты), пальмитиновой кислоты (гексадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C16), гексадекандикарбоновой кислоты (C16-дикарбоновой кислоты), маргариновой кислоты (гептадекановой кислоты) (C17-монокарбоновой кислоты), гептадекандикарбоновой кислоты (C17-дикарбоновой кислоты), стеариновой кислоты (октадекановой кислоты) (C18-монокарбоновой кислоты), октадекандикарбоновой кислоты (C18-дикарбоновой кислоты), нонадециловой кислоты (неодекановой кислоты) (C19-монокарбоновой кислоты), нонадекандикарбоновой кислоты (C19-дикарбоновой кислоты), арахиновой кислоты (эйкозановой кислоты) (C20-монокарбоновой кислоты), эйкозандикарбоновой кислоты (C20-дикарбоновой кислоты), гнейкозиловой кислоты (гнейкозановой кислоты) (C21-монокарбоновой кислоты), гнейкозандикарбоновой кислоты (C21-дикарбоновой кислоты), бегеновой кислоты (докозановой кислоты) (C22), докозандикарбоновой кислоты (C22-дикарбоновой кислоты), лигноцериновой кислоты (тетракозановой кислоты) (C24-монокарбоновой кислоты) и тетракозандикарбоновой кислоты (C24-дикарбоновой кислоты).

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой миристиновую кислоту

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой тетрадекандикарбоновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой пальмитиновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой гексадекандикарбоновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой стеариновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой октадекандикарбоновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой нонадекандикарбоновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой арахиновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой эйкозандикарбоновую кислоту.

Еще более предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой докозандикарбоновую кислоту.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей С-концевая аминокислота амидирована.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксипропан-2-ил})этоксикарбонил)-\gamma\text{-глютамил}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}]$ и

С-концевая аминокислота амидирована (SEQ ID NO: 5), или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксипропан-2-ил})этоксикарбонил)-\gamma\text{-глютамил}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}]$ и

С-концевая аминокислота амидирована (SEQ ID NO: 6);

или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксипропан-2-ил})этоксикарбонил)-\gamma\text{-глютамил}-(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}]$ и

С-концевая аминокислота амидирована (SEQ ID NO: 7);

или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксипропан-2-ил})этоксикарбонил)-\gamma\text{-глютамил}-(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}]$ и

С-концевая аминокислота амидирована (SEQ ID NO: 8);

или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по данному изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по данному изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом и другими терапевтическими компонентами.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении способ лечения предложен способ лечения диабета типа 2 соединением у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении способ лечения предложен способ лечения ожирения соединением у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении способ лечения предложен способ лечения неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD) соединением у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении способ лечения предложен способ лечения безалкогольного стеатогепатита (NASH) соединением у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложен способ индуцирования не-

терапевтической потери веса у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по данному изобретению соединение или его фармацевтически приемлемой соли.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению для применения при терапевтическом лечении.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению для применения при лечении диабета типа 2.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению для применения при лечении ожирения.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению для применения при лечении неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD).

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение по данному изобретению для применения при лечении безалкогольного стеатогепатита (NASH).

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено применение соединения по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения диабета типа 2.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено применение соединения по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения ожирения.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено применение соединения по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD).

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено применение соединения по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения безалкогольного стеатогепатита (NASH).

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено промежуточное соединение следующей формулы:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser (SEQ ID NO: 9) и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована, или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

Предпочтительно в данном изобретении предложено промежуточное соединение следующей формулы:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 10); или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

Более предпочтительно в данном изобретении предложено промежуточное соединение следующей формулы:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 11), или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложен способ производства соединения формулы

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa 2 представляет собой Aib и

Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 2) или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль, заявленный способ включает стадии:

(i) модифицирование промежуточного соединения следующей формулы:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser и

С-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 9), путем конъюгации с epsilon-аминогруппой боковой цепи Lys в положении 20 промежуточного соединения с C14-C24 жирной

кислотой, необязательно через линкер.

Предпочтительно Lys в положении 20 промежуточного соединения модифицирован путем конъюгации с C14-C24 жирной кислотой через линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой.

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение, полученное путем описанного выше процесса.

Соединения по данному изобретению способны связываться с и активировать оба рецептор GLP-1 и рецептор Gcg. Соединения по данному изобретению способны вызвать снижение потребления пищи у пациентов с избыточным весом и ожирением. Соединения по данному изобретению обладают потенциалом для обеспечения превосходного эффекта потери веса по сравнению с человеческим ОХМ дикого типа. Соединения по данному изобретению могут улучшить толерантность к глюкозе и профиль липидов у пациентов с T2D и/или связанными с ними метаболическими нарушениями и могут сделать это более эффективно, чем человеческий ОХМ дикого типа.

Конкретное преимущество соединений по данному изобретению заключается в том, что частота побочных эффектов, таких как тошнота, которая обычно связана с терапией GLP-1, такой как экзенатид и лираглутид, может быть уменьшена или устранена. Соединения по данному изобретению, таким образом, могут быть уменьшать побочные эффекты по сравнению с терапией GLP-1.

Соединения по данному изобретению содержат полипептид, конъюгированный с жирной кислотой. Жирные кислоты благодаря их моделям связывания с альбумином могут улучшить фармакокинетику пептида, увеличивая период полувыведения из плазмы и уменьшая скорость клиренса. Тогда как соединения по данному изобретению как ожидается, проявят улучшенный фармакокинетический профиль по сравнению с ОХМ дикого типа, величина улучшения не предсказуема. Авторы изобретения обнаружили, что длина, состав и положение жирной кислоты и, необязательно, линкер в соединениях по данному изобретению приводит к соединениям с желательным фармакокинетическим профилем, который поддерживает ежедневную, раз в две недели, раз в неделю или ежемесячную дозировку.

В дополнение к улучшенному фармакокинетическому профилю авторы данного изобретения также обнаружили, что длина, состав и положение жирной кислоты и, необязательно, линкер имеют решающее значение для оптимизации соотношения Gcg-R/GLP-1-R активность коагониста.

Дикий тип человеческого ОХМ обладает полной эффективностью и активностью в человеческом GLP-1-R и человеческом Gcg-R. Аминокислотная последовательность ОХМ дикого типа представлена ниже

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO: 1).

Некоторые соединения по данному изобретению имеют сбалансированное соотношение Gcg-R/GLP-1-R активность коагониста. Сбалансированная активность Gcg и GLP-1 в контексте данного документа относится к соединению, которое имеет родство к Gcg и GLP-1 рецепторам в *in vitro* анализ связывания, которое близко к 1:1, такому как 1:1 GLP-1/Gcg, 2:1 GLP-1/Gcg, 3:2 GLP-1/Gcg, 1:2 GLP-1/Gcg, или 2:3 GLP-1/Gcg. Исследование, проведенное авторами изобретения, показало, что длина, состав и положение жирной кислоты являются критическими для достижения сбалансированного соотношения Gcg-R/GLP-1-R активность коагониста, которая является характеристичной для соединений по данному изобретению, а также влияния периода полувыведения плазмы, физической стабильности, растворимости и *in vivo* стабильности соединений по данному изобретению.

Хотя конъюгация пептида с жирной кислотой имеет преимущества в отношении улучшенного фармакокинетического профиля и/или сбалансированного соотношения Gcg-R/GLP-1-R активность коагониста, также следует ожидать, что соединение может терять активность, поскольку существует вероятность вмешательства в интерфейс связывания либо рецептора Gcg, либо рецептора GLP-1. Однако было обнаружено, что сопряжение остатка лизина в положении 20 с жирной кислотой сохраняет активность *in vitro* и *in vivo* у обоих рецепторов в большей степени, чем в случае, когда аминокислоты в других положениях конъюгированы с жирной кислотой.

Кроме того, несколько аминокислотных замещений по сравнению с ОХМ дикого типа в заявленных соединениях способны повышать активность по отношению к Gcg-R и/или GLP-1-R, тем самым компенсируя потери активности из-за конъюгации с жирной кислотой, поддерживая при этом соответствующее соотношение Gcg-R/GLP-1-R активности коагониста. Важно отметить, что замещение одного аминокислотного остатка в конкретном белке может влиять на характеристики белков в целом и что общий эффект может быть полезным или вредным для фармакологической активности и/или фармацевтической стабильности. Некоторые аминокислотные замены могут повышать потенцию, но оказывают отрицательное влияние на стабильность молекулы и наоборот. Аминокислотные замены в соединениях по данному изобретению относительно человека дикого типа ОХМ (SEQ ID NO: 1) включают S2Aib, S16E, R17K, R18K, Q20K, D21E, Q24E, M27L, N28E или N28S и T29G. Дополнительно, С-концевая последовательность ОХМ, KRNRNNIA, была заменена GPSSG С-концевой последовательностью.

S2Aib замещение защищает пептид от деградации пептидазами, в частности дипептидилпептидазой IV. S16E, R17K, R18K и Q20K замещения способны улучшить активность соединений по данному изобретению в *in vitro* исследованиях и на *in vivo* моделях животных. Замещения D21E и Q24E способны

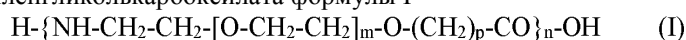
улучшать стабильность соединений по данному изобретению и модулировать активность *in vitro*. Замещение M27L способно защищать пептид от окисления остатка метионина. Замещение N28E способно улучшать растворимость соединений, содержащих это замещение. Замещение N28S также способно улучшить растворимость соединений, содержащих это замещение, но не в той же степени, что и замещение N28E. Однако растворимость соединений, включающих замещение N28S, может быть улучшена путем выбора подходящего линкера. Замещение аспарагинового остатка в положении 28 исключает возможность дезамидирования, происходящего в этом положении.

Удаление остатков С-концевой последовательности OXM, KRNRNIA, может улучшить растворимость, что связано с удалением остатков аргинина. Авторы изобретения оценивали соединения, имеющие (i) отсутствие С-концевой последовательности, (ii) соединения с С-концевой последовательностью GPSSG и (iii) соединения с С-концевой последовательностью GPSSGAPPPS. Неожиданно было обнаружено, что некоторые соединения с С-концевой последовательностью GPSSG проявляют улучшенную активность *in vivo* в моделях животных по сравнению с OXM дикого типа, соединения без С-концевой последовательности и соединения с С-концевой последовательностью GPSSGAPPPS. С-концевая последовательность GPSSG также улучшала стабильность и растворимость соединений по данному изобретению относительно соединений OXM и дикого типа человека без С-концевой последовательности.

Таким образом, соединения по данному изобретению содержат аминокислотные замещения, которые отдельно или вместе не только способны улучшать активность, но также способны обеспечивать улучшенную физическую стабильность и характеристики растворимости и повышенную стабильность *in vivo*.

В некоторых аспектах соединений по данному изобретению C14-C24 жирная кислота представляет собой конъюгированную с эпсилон-аминогруппой боковой цепи лизина через линкер, где линкер выбран из группы, состоящей из:

(a) аминокполиэтиленгликолькарбоксилата формулы I



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

(b) аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu;

(c) дипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

(d) трипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu;

(e) полипептида, выбранного из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15; и

(f) линкера конъюгации, где аминокполиэтиленгликолькарбоксилат формулы I, как указано в определении в (a), конъюгирован с

(i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu;

(ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

(iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu; или

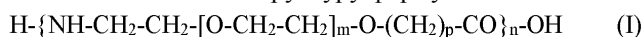
(iv) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15.

В предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению линкер представляет собой аминокполиэтиленгликолькарбоксилат формулы I или линкер конъюгации, где аминокполиэтиленгликоль-

карбоксилат формулы I конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, m равен 1 и p равен 1.

В более предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению линкер представляет собой аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I или линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше, где n равен 2, m равен 1 и p равен 1.

Линкер аминополиэтиленгликолькарбоксилата формулы I или линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше, содержит небольшой фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), содержащий структуру $[-O-CH_2-CH_2-]_m$, где m равен целому числу между 1 и 12 (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Такие небольшие ПЭГи в данном документе относятся к "мини-ПЭГ". В предпочтительных аспектах мини-ПЭГ имеет структуру формулы I



где m равен любому целому числу от 1 до 12, n равен любому целому числу от 1 до 12 и p равен 1 или 2. Предпочтительно мини-ПЭГ имеет структуру формулы I, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, m равен 1 и p равен 1. Более предпочтительно мини-ПЭГ имеет структуру формулы I, где n равен 1, m равен 1 и p равен 1. Пригодные реагенты для применения при ацилировании аминокислоты с помощью мини-ПЭГ являются коммерчески доступными от поставщиков, таких как Peptides International (Луисвилл, Кентукки) и ChemPer, Inc. (Веллингтон, Флорида). Также в данном документе описаны пригодные способы ацилирования аминокислоты с помощью мини-ПЭГ в (см. примеры 1-4).

Мини-ПЭГ формулы I представляет собой функционализированную мини-ПЭГ, содержащую функциональную аминогруппу и функциональную карбоксильную группу. Функциональная карбоксильная группа вступает в реакцию с эpsilon-аминогруппой боковой цепи лизина с образованием амидной связи. Функциональная аминогруппа вступает в реакцию с карбоксильной группой жирной кислоты. Лизин в положении 20 пептида SEQ ID NO: 2 конъюгирован таким образом с C14-C24 жирной кислотой через мини-ПЭГ формулы I.

В ином случае, когда мини-ПЭГ формулы I является частью линкера конъюгации (т.е. мини-ПЭГ формулы I, конъюгированного с аминокислотой, а не дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше), функциональная аминогруппа мини-ПЭГ формулы I вступает в реакцию с функциональной группой аминокислоты, дипептида, трипептида или полипептида. Дополнительная функциональная группа аминокислоты, дипептида, трипептида или полипептида вступает в реакцию с карбоксильной группой жирной кислоты. Лизин в положении 20 пептида SEQ ID NO: 2 таким образом конъюгирован с C14-C24 жирной кислотой через линкер конъюгации, как указано в определении выше.

Гидрофильная природа мини-ПЭГ формулы I служит для повышения растворимости соединений по данному изобретению, содержащих линкер, который содержит аминогруппу полиэтиленгликолькарбоксилат формулы I или линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении.

Предпочтительные линкеры, содержащие мини-ПЭГ формулы I, включают, но не ограничиваются ими, $[2-(2\text{-аминоэтоксипропан-2-ил})этоксипропан-2-ил]_2$ и 8-амино-3,6-диоксооктановую кислоту.

Линкер также может представлять собой одну аминокислоту, расположенную между epsilon-аминогруппой боковой цепи лизина и C14-C24 жирной кислотой. В некоторых предпочтительных аспектах аминокислота представляет собой гидрофильную аминокислоту. Пригодные аминокислоты включают Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cys, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu.

В более предпочтительных аспектах, аминокислота представляет собой γ -Glu.

В ином случае линкер представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu, γ -Glu-Glu, γ -Abu- γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты.

В еще одном альтернативном аспекте каждая аминокислота дипептида может быть такой же или отличной от другой аминокислоты дипептида и может быть независимо выбрана из группы, состоящей из Ala, β -Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ -Glu, γ -Abu, 6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты.

В более предпочтительных аспектах линкер представляет собой γ -Glu- γ -Glu.

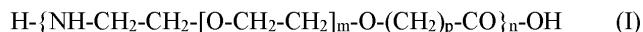
В некоторых аспектах линкер представляет собой трипептид, где аминокислоты трипептида независимо выбраны из группы, состоящей из Ala, β -Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ -аминомасляной кислоты (γ -Abu), γ -глутаминовой кислоты (γ -Glu), 6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты.

В предпочтительных аспектах линкер представляет собой трипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala, β -Ala- β -Ala- β -Ala, Glu-Glu-Glu, γ -Glu- γ -Glu- γ -Glu, Glu- γ -Glu- γ -Glu, γ -Glu- γ -Glu-Glu, γ -Glu-Glu- γ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-

Glu-Gly, Gly-Gly- γ -Glu, γ -Glu-Gly-Gly, Gly- γ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и γ -Abu- γ -Abu- γ -Abu.

В некоторых аспектах линкер представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)_q (Gly-Gly-Gly-Ser)_r и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_s, (6-аминогексановой кислоты)_s, (5-аминовалериановой кислоты)_s, (7-аминогептановой кислоты)_s и (8-аминооктановой кислоты)_s, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15.

В предпочтительном аспекте линкер представляет собой линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I



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

конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше.

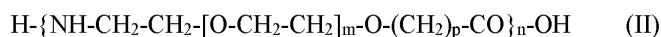
В предпочтительном аспекте аминополиэтиленгликолькарбоксилат линкера конъюгации представляет собой ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂ или 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту.

В более предпочтительном аспекте линкер содержит ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ -Glu)_t (также называемый, как (AEEA)₂-(γ -Glu)_t), где t равен 1 или 2. Жирная кислота и гама-глутаминовая кислота в линкере действуют как связывание альбумина и обеспечивают потенциал для генерации соединений длительно действующих *in vivo*. В наиболее предпочтительных аспектах соединения по данному изобретению содержат лизин в положении 20, который химически модифицирован путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи лизина с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ -Glu)_t-CO-(CH₂)_d-CO₂H, где t равен 1 или 2 и d равен 16 или 18.

Как показано в химических структурах примеров 1-4, первая [2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетильная группа связана с эпсилон-аминогруппой боковой цепи лизина. Вторая [2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетильная группа затем присоединена к аминогруппе первой [2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетильной группы. Затем первая γ -Glu группа присоединена к аминогруппе второй [2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетильной группы через γ -карбоксылную группу боковой цепи. При t=2 вторая γ -Glu группа присоединена к α -аминогруппе первой γ -Glu группы через γ -карбоксылную группу боковой цепи. Наконец, жирная кислота присоединена к α -аминогруппе первой (когда t=1) или второй (при t=2) γ -Glu группы.

Когда линкер представляет собой аминокислоту, дипептид, трипептид или полипептид, как указано в определении выше, предпочтительно, чтобы аминокислота или по меньшей мере одна аминокислота дипептида, трипептида или полипептида представляла собой гидрофильную аминокислоту.

Аналогично, когда линкер представляет собой линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат формулы I



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

конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше, предпочтительно, чтобы аминокислота/по меньшей мере одна аминокислота/дипептид/трипептид/полипептид представлял собой гидрофильную аминокислоту.

Пригодные аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ -Abu и γ -Glu.

Авторы данного изобретения обнаружили, что присутствие одной или более гидрофильных аминокислот в линкере компенсирует потерю растворимости, которая обычно может ожидаться в результате замещения аминокислоты в пептиде SEQ ID NO: 1. Например, в варианте реализации изобретения, где линкер содержит ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ -Glu)_t, где t равен 1 или 2, Xaa28 пептида SEQ ID NO: 1 может представлять собой серин или глутаминовую кислоту. Выбор глутаминовой кислоты в положении 28 пептида SEQ ID NO: 2 улучшает растворимость таких соединений. Может ожидаться, что выбор серина в положении 28 пептида SEQ ID NO: 2 уменьшит растворимость таких соединений относительно тех соединений, которые отличаются только наличием остатка глутаминовой кислоты в 28. Однако вторая γ -Glu-аминокислота в вышеописанном линкере (т.е. t равен 2) компенсирует это ожидаемое снижение растворимости.

В соединениях по данному изобретению применяют C14-C24 жирную кислоту, химически конъюгированную с эпсилон-аминогруппой боковой цепи лизина, либо путем непосредственной связи, либо линкером. Термин "C14-C24 жирная кислота" в данном документе означает карбоновую кислоту с 14 и 24 атомами углерода. Пригодная для применения в данном изобретении C14-C24 жирная кислота могут представлять собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту. Под "насыщенной" подразумевается, что жирная кислотой не содержит двойных или тройных углерод-углеродных связей.

Примеры специфических насыщенных жирных кислот C14-C24, которые являются пригодными для соединений и их применения, раскрытых здесь, включают, но не ограничиваются ими, миристиновую

кислоту (тетрадекановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C14), тетрадекандикарбоновую кислоту (C14-дикарбоновую кислоту), пальмитиновую кислоту (гексадекановую кислоту) (C16-монокарбоновую кислоту), гексадекандикарбоновую кислоту (C16-дикарбоновую кислоту), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C17), гептадекандикарбоновую кислоту (C17-дикарбоновую кислоту), стеариновую кислоту (октадекановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C18), октадекандикарбоновую кислоту (C18-дикарбоновую кислоту), нонадециловую (C19-монокарбоновую кислоту), арахионовую кислоту (эйкозеновую кислоту) (C20-монокарбоновую кислоту), эйкозандикарбоновую кислоту (C20-дикарбоновую кислоту), гнейкозилловую кислоту (гнейкозановую кислоту) (моно-кислота C21), гнейкозандикарбоновую кислоту (C21 дикислоту), бегеновую кислоту (докозановую кислоту) (C22), докозандикарбоновую кислоту (C22-дикислоту), лигноцериновую кислоту (тетракозановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C24), тетракозандикарбоновую кислоту (C24-дикарбоновую кислоту), включая их разветвленные и замещенные производные. В предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению C14-C24 жирная кислота выбрана из группы, состоящей из насыщенной C14-монокарбоновой кислоты, насыщенной C14-дикарбоновой кислоты, насыщенной C16-монокарбоновой кислоты, насыщенной C16-дикарбоновой кислоты, насыщенной C18-монокарбоновой кислоты, насыщенной C18-дикарбоновой кислоты, насыщенной C19-дикарбоновой кислоты, насыщенной C20-монокарбоновой кислоты, насыщенной C20-дикарбоновой кислоты, насыщенной C22-дикарбоновой кислоты и их разветвленных и замещенных производных.

В более предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению C14-C24 жирная кислота выбрана из группы, состоящей из миристиновой кислоты, тетрадекандикарбоновой кислоты, пальмитиновой кислоты, гексадекандикарбоновой кислоты, стеариновой кислоты, октадекандикарбоновой кислоты, неодадекандикарбоновой кислоты, арахионовой кислоты, эйкозандикарбоновой кислоты и докозановой кислоты.

Предпочтительно C14-C24 жирная кислота представляет собой октадекандикарбоновую кислоту или эйкозандикарбоновую кислоту.

Авторы данного изобретения обнаружили, что положение жирной кислоты является критически важным для получения соединений с желаемым отношением активности коагониста Gcg-R/GLP-1-R. Длина и состав жирной кислотой влияют на время полужизни соединения в плазме, активность соединения в *in vivo* моделях животных, а также влияет на растворимость и стабильность соединения. Конъюгация пептида, определенного в SEQ ID NO: 2 с C14-C24 насыщенной жирной монокарбоновой кислотой или дикарбоновой кислотой приводит к появлению соединений, которые проявляют желательный время полужизни в плазме, желательную активность в *in vivo* моделях животных, а также обладают требуемой растворимостью и характеристиками стабильности. Миристиновая кислота, тетрадекандикарбоновая кислота, пальмитиновая кислота, гексадекандикарбоновая кислота, стеариновая кислота, октадекандикарбоновая кислота, нонадекандикарбоновая кислота, арахионовая кислота, эйкозандикарбоновая кислота и докозандикарбоновая кислота являются особенно предпочтительными жирными кислотами.

В частности, конъюгация пептида, описанного в SEQ ID NO: 2 по остатку лизина г в положении 20 с октадекандикарбоновой кислотой или эйкозандикарбоновой кислотой, приводит к появлению соединений, которые (i) способны достигать желаемых соотношений активности коагониста Gcg-R/GLP-1-R, (ii) способны улучшать активность в *in vivo* моделях животных и/или (iii) способны улучшить характеристики физической стабильности и растворимости.

Соединения по данному изобретению предпочтительно включены в состав в виде фармацевтических композиций, вводимых парентеральными способами (например, подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным или трансдермальным).

Соединения по данному изобретению обычно будут вводить парентерально. Парентеральное введение включает, например, системное введение, такое как внутримышечная, внутривенная, подкожная, внутрикожная или внутрибрюшинная инъекция. Предпочтительный способ введения представляет собой подкожную инъекцию. Соединение по данному изобретению, вводимое субъекту в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом в составе фармацевтической композиции для лечения диабета 2 типа, ожирения, NAFLD и/или NASH. Фармацевтическая композиция может представлять собой раствор или суспензию, такую как соединение, в котором соединение по данному изобретению образует комплекс с катионом двухвалентного металла, таким как цинк. Соединение по данному изобретению также может быть включено в состав в твердом виде путем как лиофилизации или распылительной сушки, который затем перед введением перерастворяется в растворе пригодных разбавителей. Пригодные фармацевтические носители могут содержать инертные компоненты, которые не взаимодействуют с пептидом или производным пептида. Пригодные фармацевтические носители для парентерального введения включают, например, стерильную воду, физиологический раствор, бактериостатический солевой раствор (физиологический раствор, содержащий около 0,9% мг/мл бензилового спирта), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Хэнкса, пилинг-лактат и тому подобное. Некоторые примеры пригодных эксципиентов включают лактозу, декстрозу, сахарозу, трегалозу, сорбит и маннит и консерванты, такие как фенол и м-крезол.

Могут применяться стандартные методы приготовления фармацевтической композиции, такие как

описанные в Remington: The Science и Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Соединения по данному изобретению могут альтернативно быть приготовлены для введения буккальным, пероральным, трансдермальным, назальным или легочным путем.

Соединения по данному изобретению могут вступать в реакцию с любой из ряда неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых аддитивных солей кислот. Фармацевтически приемлемые соли и общая методика их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection и Use, 2e исправленное издание (Wiley-VCH, 2011). Фармацевтически активные соли по данному изобретению включают трифторацетатные, гидрохлоридные и ацетатные соли.

Соединения по данному изобретению могут применять для лечения диабета, особенно диабета типа 2. К другим субъектам, которые могут получить благоприятный эффект от лечения соединениями по данному изобретению, относятся те, у которых нарушена толерантность к глюкозе или нарушенной гликемии натощак, субъекты, чья масса тела составляет примерно 25% или более выше нормальной массы тела для роста и тела субъекта, субъекты, имеющие одного или более родителей с диабетом типа 2, субъекты, у которых был гестационный диабет и субъекты с нарушениями обмена веществ, такими как нарушения, вызванные уменьшением эндогенной секреции инсулина. Соединения по данному изобретению могут быть применены для предотвращения у пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе развития диабета 2 типа, предотвращения дегенерации β -клеток поджелудочной железы, индуцирования пролиферации β -клеток, улучшения β -клеточной функции, активации спящих β -клеток, содействия дифференциации клеток в β -клетки, стимуляции репликации β -клеток и ингибирования апоптоза β -клеток. Другие заболевания и патологические состояния, которые могут быть вылечены или предотвращены с применением соединений по данному изобретению в способах по данному изобретению, включают сахарный диабет взрослого типа у молодых (MODY) (Herman, et al., Diabetes 43:40, 1994); латентный аутоиммунный диабет у взрослых (LADA) (Zimmet, et al., Diabetes Med. 11:299, 1994); нарушение толерантности к глюкозе (IGT) (Комитет экспертов по классификации сахарного диабета, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999); нарушенную гликемию натощак (IFG) (Charles, et al., Diabetes 40:796, 1991); сахарный диабет при беременности (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); метаболический синдром X, дислипидемию, гипергликемию, гиперинсулинемию, гипертриглицеридемию и резистентность к инсулину.

Соединения по данному изобретению могут также применять в способах по данному изобретению для лечения вторичных причин диабета (Экспертный комитет по классификации сахарного диабета, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999). Такие вторичные причины включают избыток глюкокортикоидов, избыток гормона роста, феохромоцитому и диабет, вызванный лекарственными средствами. Препараты, которые могут индуцировать диабет, включают, но не ограничиваются ими, пириминил, никотиновую кислоту, глюкокортикоиды, фенитоин, гормон щитовидной железы, β -адренергические средства, α -интерферон и лекарства, используемые для лечения ВИЧ-инфекции.

Соединения по данному изобретению могут быть эффективными в подавлении приема пищи и лечении ожирения.

"Эффективное количество" соединения по данному изобретению равно количеству, которое приводит к желаемому терапевтическому и/или профилактическому эффекту, не вызывая неприемлемых побочных эффектов при введении субъекту. "Желаемый терапевтический эффект" включает в себя одно или несколько из следующего: 1) улучшение симптомов (симптомов), связанных с заболеванием или патологическим состоянием; 2) задержку появления симптомов, связанных с заболеванием или патологическим состоянием; 3) увеличение продолжительности жизни по сравнению с отсутствием лечения; и 4) более высокое качество жизни по сравнению с отсутствием лечения. Например, "эффективное количество" соединения по данному изобретению для лечения T2D представляет собой количество, которое приведет к большему контролю концентрации глюкозы в крови, чем при отсутствии лечения, что приведет к задержке начала диабетических осложнений, таких как ретинопатия, невропатия или заболевание почек. "Эффективное количество" соединения по данному изобретению для профилактики диабета типа 2, например, у пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе или нарушенной глюкозой натощак, является количеством, которое задерживает по сравнению с отсутствием лечения начало повышения уровня глюкозы в крови, требующего лечения антигипергликемическими препаратами, такими как сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, инсулин и/или бисгуанидины.

"Эффективное количество" соединения по данному изобретению, вводимого субъекту, также будет зависеть от типа и тяжести заболевания и от характеристик субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и толерантность к лекарственным средствам. Доза соединения по данному изобретению, эффективная для нормализации уровня глюкозы в крови субъекта, будет зависеть от ряда факторов, среди которых включают, без ограничения, пол субъекта, вес и возраст, тяжесть неспособности регулировать уровень глюкозы в крови, способ введения и биодоступность, фармакокинетический профиль пептида, активность и состав.

Некоторые соединения по данному изобретению обычно эффективны в широком диапазоне доз. Например, дозировки для однократного приема дозы могут находиться в пределах от 0,05 до 30 мг на

человека в неделю. Некоторые соединения по данному изобретению могут ежедневно дозироваться. Кроме того, определенные соединения по данному изобретению могут вводить каждые два раза в неделю, раз в неделю или ежемесячно.

"Субъект" является млекопитающим, предпочтительно человеком, но также может быть животным, включая животных-компаньонов (например, собак, кошек и т.п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторных животных (например, крыс, мышей, морских свинок и т.п.).

В контексте данного документа термины "лечение" или "лечить" включают сдерживание, замедление, остановку или отмену прогрессирования или тяжести существующего симптома или разложения.

Термин "время полужизни в плазме" относится к времени, требуемому для того, чтобы половина соответствующих соединений была выведена из плазмы. Альтернативно используемый термин представляет собой "период полувыведения". Термин "расширенный" или "более продолжительный", используемый в контексте периода полувыведения плазмы или периода полувыведения, означает, что наблюдается значительное увеличение периода полувыведения соединения по данному изобретению по сравнению с термином эталонной молекулы (например, конъюгированной с жирной кислотой формы пептида, человеческим ОХМ дикого типа или семаглутидом), как определено в сопоставимых условиях.

Клиренс представляет собой меру способности организма выводить лекарственное средство из кровообращения. Поскольку клиренс уменьшается из-за, например, изменений в лекарственном средстве, ожидается, что время полужизни увеличится. Однако данные взаимоотношения точны только тогда, когда нет изменений в объеме распределения. Полезная приблизительная связь между конечным временем полужизни ($T_{1/2}$), клиренсом (C) и объемом распределения (V) задается уравнением $T_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. Клиренс не указывает сколько лекарств удаляется, а скорее объем биологической жидкости, такой как кровь или плазма, которые должны быть полностью освобождены от лекарственного средства, для обусловливания выведения. Клиренс выражается как объем за единицу времени.

В контексте данного документа термин "гидрофильный" относится к свойству легко поглощать влагу и иметь сильно полярные группы, которые легко взаимодействуют с водой.

В контексте данного документа "семаглутид" относится к химически синтезированному аналогу GLP-1, который имеет основную цепь пептида и общую структуру соединения, найденного под регистрационным номером CAS.

Аминокислотные последовательности по данному изобретению содержат стандартные однобуквенные или трехбуквенные коды для 20 встречающихся в природе аминокислот. Кроме того, "Aib" представляет собой альфа-аминоизомасляную кислоту, "Abu" представляет собой аминотетрагидрокантаридиновую кислоту, "Orn" представляет собой орнитин, "Cit" - цитруллин и "Sar" - саркозин.

В контексте данного документа термин "С-концевая аминокислота" относится к последней аминокислоте в последовательности пептида, которая содержит свободную карбоксильную группу. С-концевая аминокислота соединений по данному изобретению представляет собой Gly в положении 34.

Данное изобретение также охватывает новые промежуточные продукты и процессы, пригодные для синтеза соединений по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли. Промежуточные соединения и соединения по данному изобретению могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. В частности, процесс, использующий химический синтез, проиллюстрирован в примере ниже. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов могут быть объединены различными способами для получения соединений по данному изобретению или их солей. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалисту в данной области техники. Было понятно, что данные примеры не предназначены для ограничения объема изобретения каким-либо образом.

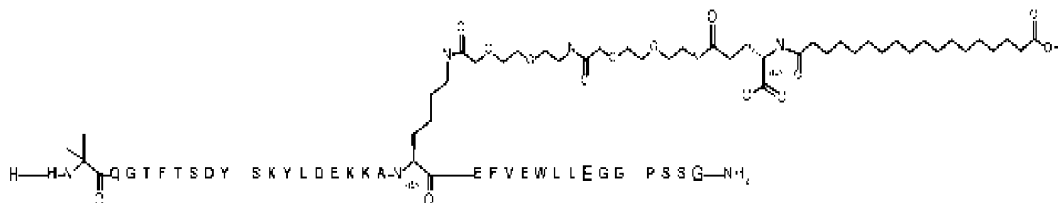
Пример 1.



где Xaa2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи К с $([2-(2\text{-аминоэтоксипропилоксиэтил]этилкарбонил})_2-(\gamma\text{Glu})_4\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-CO}_2\text{H}$; и

С - концевая аминокислота амидирована в виде С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 5).



На приведенной выше диаграмме проиллюстрирована структура соединения SEQ ID NO: 5 (именуемого в дальнейшем, как "соединение 1") с использованием стандартного однобуквенного кода обозначения аминокислот, за исключением остатков Aib2 и K20, где структуры этих аминокислот были

расширены.

Пептидный компонент соединения 1 синтезируют автоматизированным твердофазным синтезом с использованием флуоренилметилоксикарбонильного (Fmoc)/трет-бутил (t-Bu) метода синтеза на 12-канальном мультиплексном пептидном синтезаторе Symphony (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

Синтетическая смола состоит из 1%-го поперечно-сшитого полистирола ДББ (Fmoc-Rink-MBHA смола с низкой загрузкой, 100-200 меш, EMD Millipore, Темекула, Калифорния) при замещении 0,3-0,4 мэкв/г. Стандартными защитными группами боковой цепи являются: трет-бутилоксикарбонил (Boc) для Trp и Lys; трет-бутиловый эфир (OtBu) для Asp и Glu; tBu для Ser, Thr и Tyr; и трифенилметил (Trt) для Gln; N- α -Fmoc-N- ϵ -4-метилтретил-L-лизин (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) использовали для лизина в положении 20 SEQ ID NO: 3 и N- α ,N-(im)di-Boc-L-histidine (Boc-His(Boc)-OH) использовали для гистидина в положении 1. Группы Fmoc удаляли перед каждой стадией связывания (2×7 мин) с использованием 20%-го пиперидина в диметилформамиде (ДМФА). Все стандартные конденсации аминокислот выполняют в течение 1 ч с использованием равного молярного соотношения Fmoc-аминокислоты (EMD Millipore, Темекула, Калифорния), диизопропилкарбодиимида (DIC) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) и Охута (Охута Pure, Iris Biotech, Марктредвиц, Германия) при 9-кратном молярном избытке по отношению к теоретической загрузке пептида и при конечной концентрации 0,18 М в ДМФА.

Два исключения: глутаминовый остаток в положении 3 SEQ ID NO: 5, который дважды конденсирован (2×1 ч), и гистидиновый остаток в положении 1 SEQ ID NO: 5, который конденсировали с 6-кратным молярным избытком, используя 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt) вместо Охута в течение 18 ч. После завершения синтеза линейного пептида смолу переносили в одноразовый шприц из 25 мл полипропилена (Torvig, Найлс, Мичиган), оснащенный краном из политетрафторэтилена (PTFE) (Biotage, Шарлотт, Северная Каролина) и 4-метилтретилную (Mtt) защитную группу на лизине в положении 20 SEQ ID NO: 5 избирательно удаляли из пептидной смолы с использованием трех обработок с 20%-м гексафторизопропанолом (Oakwood Chemicals, Запад Колумбия, Южная Каролина) в ДХМ (2×10 мин и 1×45 мин), чтобы высвободить свободную эпсилон-аминогруппу на лизине в положении 20 и сделать его доступным для дальнейшей реакции.

Последующее присоединение жирнокислотного фрагмента линкера осуществляют путем выполнения двух последующих конденсаций [2-(2-(Fmoc-амино)этокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH) (ChemPer, Inc. Веллингтон, Флорида; 3-кратный избыток аминокислоты (AA):1-[бис-(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксид гексафторфосфата (HATU):N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) [1:1:5 моль/моль] в течение 3 ч времени конденсации) с последующей конденсацией α -трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu) (Ark Pharm, Inc. Либертивилл, Иллинойс, 3-кратный избыток AA:HATU:DIPEA [1:1:5 моль/моль] в течение 3-ч времени конденсации). В каждом случае фрагмент Fmoc удаляют, как описано выше. Наконец, моно-OtBu-октадекандикарбоновую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) конденсировали со смолой в течение 18 ч с использованием 3-кратного избытка кислоты:HATU:DIPEA (1:1:5 моль/моль). После завершения синтеза пептидную смолу промыли дихлорметаном (ДХМ), диэтиловым эфиром и тщательно высушили воздухом путем вакуумного всасывания в шприц в течение 5 мин. Сухую смолу обрабатывают коктейлем для расщепления (трифторуксусная кислота (ТФК):анизол:вода:триизопропилсилан 88:5:5:2 по объему) в течение 2 ч при комнатной температуре для высвобождения пептида из твердой подложки и удаляют все защитные группы боковой цепи. Смолу отфильтровывают, дважды промывают чистой ТФК и объединенные фильтраты обрабатывают холодным диэтиловым эфиром для осаждения неочищенного пептида. Затем суспензию пептида/эфира центрифугируют при 4000 об/мин с образованием твердого осадка, декантируют супернатант и твердый осадок, растирают с эфиром два раза и сушат в вакууме. Неочищенный пептид солибилизируют в 20%-м ацетонитриле/воде и очищают обращенно-фазной ВЭЖХ на препаративной колонке C8 (Luna, 21×250 мм, Phenomenex, Торранс, Калифорния) с линейными градиентами ацетонитрила и воды с использованием трех различных буферных систем:

- 1) 0,1 М ацетат аммония в воде, pH 5,0;
- 2) 0,1% ТФК в воде и
- 3) 5% уксусная кислота в воде.

Последующая лиофилизация конечного основного пула продуктов дает лиофилизированную ацетатную соль пептида.

В синтезе, выполняемом, по существу, как описано выше, чистоту соединения 1 оценивают, используя аналитическую обращенно-фазную ВЭЖХ и которая составляет 97%.

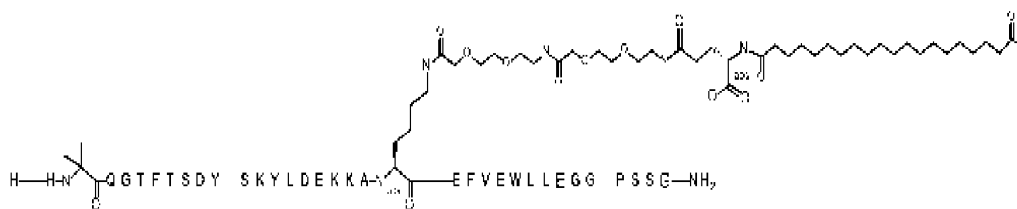
Молекулярную массу определяют аналитической масс-спектрометрией с электрораспылением. Рассчитанная молекулярная масса соединения 1 равна 4535,0 Да, в то время как наблюдаемая деконволюционированная усредненная молекулярная масса была определена как 4535,0 Да, и наблюдались следующие ионы: 1512,3 (M+3H), 1134,3 (M+4H), 908 (M+5H).

Пример 2.

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG.

где Хаа2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; и С-концевая аминокислота амидирована в виде С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 6).



На приведенной выше диаграмме проиллюстрирована структура SEQ ID NO: 6 (именуемое в дальнейшем "соединение 2") с использованием стандартного однобуквенного кода обозначения аминокислот, за исключением остатков Aib2 и K20, где структуры этих аминокислот были расширены.

Соединение 2 синтезируют как в примере 1, за исключением того, что моно-OtBu-эйкозандикарбоновую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) конденсируют со смолой в течение 18 ч с использованием 3-кратного избытка AA:HATU:DIPEA (1:1:5 моль/моль), а не моно-OtBu-октадекандикарбоновую кислоту, как в примере 1.

Рассчитанная молекулярная масса соединения 2 равна 4563,1 Да, тогда как наблюдаемая деконволюция усредненной молекулярной массы была определена как 4562,9 Да, и наблюдались следующие ионы: 1521,7 (M+3H), 1141,3 (M+4H), 913,5 (M+5H).

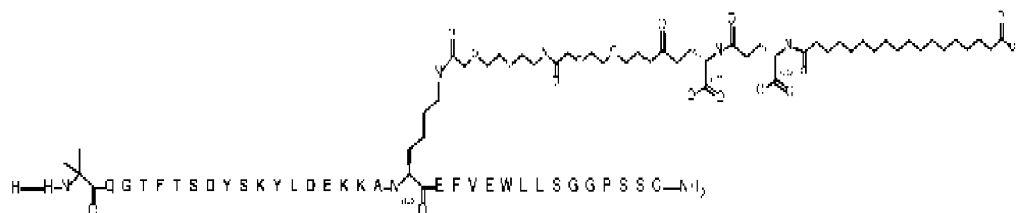
Пример 3.

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG.

где Хаа2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; и

С-концевая аминокислота амидирована в виде С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 7).



На приведенной выше диаграмме проиллюстрирована структура SEQ ID NO: 7 (именуемое в дальнейшем "соединение 3") с использованием стандартного однобуквенного кода обозначения аминокислот, за исключением остатков Aib2 и K20, где структуры этих аминокислот были расширены.

Соединение 3 синтезируют, как в примере 1, за исключением того, что в цикл синтеза линкера добавляют дополнительную фракцию Fmoc-Glu-OtBu. Рассчитанная молекулярная масса соединения 3 равна 4622,1 Да, в то время как наблюдаемая деконволюционированная усредненная молекулярная масса была определена как 4621,9 Да, и наблюдались следующие ионы: 1541,3 (M+3H), 1156,2 (M+4H), 925,2 (M+5H).

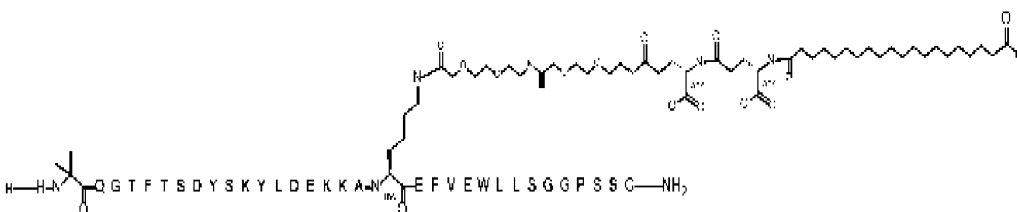
Пример 4.

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG.

где Хаа2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; и

С-концевая аминокислота амидирована в виде С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 8).



На приведенной выше диаграмме проиллюстрирована структура SEQ ID NO: 8 (именуемое в дальнейшем "соединение 4") с использованием стандартного однобуквенного кода обозначения аминокислот, за исключением остатков Aib2 и K20, где структуры этих аминокислот были расширены.

Соединение 4 синтезируют как в примере 1, за исключением того, что моно-OtBu-эйкозандикарбоновую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) конденсировали со смолой в течение 18 ч с использованием 3-кратного избытка AA:HATU:DIPEA (1:1:5 моль/моль), а не моно-OtBU-

октадекандикарбоновую кислоту, используемую в примере 1. Дополнительно в цикл синтеза линкера добавляется дополнительная аминокислотная фракция Fmoc-Glu-OtBu.

Рассчитанная молекулярная масса пептида равна 4650,1 Да, тогда как наблюдаемая деконволюция усредненной молекулярной массы была определена как 4650,1 Да, и наблюдались следующие ионы: 1550,7 (M+3H), 1163,3 (M+4H), 930,8 (M+5H).

Физические характеристики.

Вязкость.

Вязкость соединений по данному изобретению измеряли на вискозиметре Rheosense mVtoc со следующими настройками:

- (a) емкость шприца: шприц 500 мкл;
- (b) скорость потока: скорость потока 100 мкл/мин;
- (c) средняя температура: 25°C;
- (d) скорость сдвига: 1934 с⁻¹.

Сухой порошок (соединение) взвешивают, растворяют в воде в виде мутного осадка и титруют 1 N NaOH до около pH 8,0. Раствор обрабатывают ультразвуком и перемешивают вручную, пока пептид не переходит в раствор. Образцы стерильно фильтруют (0,22 мкм ПВДФ-фильтры). Образцы затем анализируют с помощью УФ в видимой области для оценки концентраций основного раствора. Растворы разбавляют до конечной концентрации с использованием 3× м-крезола в буфере 10 mM Трис pH 8,0 до конечных концентраций около 10 мг/мл пептида по массе в 10 mM Трис+3 мг/мл м-крезола при pH 8,0. Образцы фильтруют через фильтры 0,22 мкм непосредственно перед анализом вязкости. 25 мкл образца удаляют для проверки концентрации с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ до и после анализа.

Содержание воды и буферного контроля в образцах измеряют до и после каждого анализа образца. Прибор промывают буфером (3 раза) между анализом каждого образца. Образцы загружаются в отдельные шприцы и анализируются. Первое измерение не включено в окончательный расчет, чтобы обеспечить равновесие с системой. Образцы затем анализируют в трех повторах (n=3).

Вязкость соединений 1-4 была измерена, по существу, так, как описано в этом анализе. Данные о вязкости для соединений 1-4 суммированы в табл. 1.

Таблица 1
Данные о вязкости для соединений 1-4

Образец	вязкость в 500 мкл шприце (сР или мПа·с)
Буферный контроль	0,99
Соединение 1	1,06
Соединение 2	1,04
Соединение 3	1,03
Соединение 4	1,05

Растворимость.

Растворимость соединений по данному изобретению измерена на Agilent 1100 HPLC, Agilent 1200 HPLC и Nanodrop 2000. Использовали следующие ВЭЖХ колонки:

- (a) обращенно-фазная ВЭЖХ: Waters Symmetry Shield C18, 3,6 мкм, 4,6×100 мм;
- (b) эксклюзионная ВЭЖХ: Tosoh Biosciences, TSK2000_{SWXL} 7,8 см×30 мм.

Все концентрации пептидов получали при 10 мг/мл в следующем:

- (a) 10 mM Трис pH 8,0 + 3 мг/мл м-крезол
- (b) 10 mM Трис pH 8,0 + 3 мг/мл м-крезол + 150 mM NaCl
- (c) 10 mM Трис pH 8,0 + 3 мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20
- (d) ФСБ pH 7,4

5 мл 10 мг/мл пептида растворили в 10 mM Трис при pH 8,0 концентрировали до около 20 мг/мл, используя Amicon-ultra 3 кДа НОММ устройства. Раствор отфильтровали с использованием фильтров Millivex 0,22 мкм (мембрана ПВДФ) и конечную концентрацию измерили спектрометром NanoDrop. Этот исходный раствор использовали для приготовления до конечных растворов, указанных выше, с использованием растворов 3× м-крезола, 10× NaCl и 100× Твин-20. Раствор PBS 10 мг/мл также получали путем непосредственного растворения при 5 мг/мл и концентрирования с использованием ПВДФ Amicon-ultra 3кДа НОММ устройства.

Каждый раствор помещали в холодильник при 4°C в течение 1 недели с анализом с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ для оценки концентрации и эксклюзионной ВЭЖХ для оценки образования частиц с ВМВ. Анализы завершены на неделе T-0 и недели T-1.

Растворимость соединений 1-4 измерялась, по существу, так, как описано в этом анализе. Данные растворимости для соединений 1-4 обобщены в табл. 2(a)-(d).

Таблица 2(a)

Данные растворимости для соединения 1

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол (T8m); 10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол + 150 mM NaCl (T8Nm); 10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(T8Tm); 10 мг/мл растворимость в ФСБ, pH 7,4; Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C; На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с BMB не наблюдали; Обращенно-фазовая ВЭЖХ подтверждает, что 10 мг/мл концентрация сохранялась в течение 1 недели исследования.

Таблица 2(b)

Данные растворимости для соединения 2

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол (T8m); 10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол + 150 mM NaCl (T8Nm); 10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(T8Tm); 10 мг/мл растворимость в ФСБ, pH 7,4; Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C; На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с BMB не наблюдали; Обращенно-фазовая ВЭЖХ подтверждает, что 10 мг/мл концентрация сохранялась в течение 1 недели исследования.

Таблица 2(c)

Данные растворимости для соединения 3

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол (T8m); 10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол + 150 mM NaCl (T8Nm); 10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(T8Tm); 10 мг/мл растворимость в ФСБ, pH 7,4; Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C; На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с BMB не наблюдали;

	Обращенно-фазовая ВЭЖХ подтверждает, что 10 мг/мл концентрация сохранялась в течение 1 недели исследования.
--	---

Таблица 2(d)

Данные растворимости для соединения 4

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3 мг/мл м-крезол (T8m);
	10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3 мг/мл м-крезол + 150 mM NaCl (T8Nm);
	10 мг/мл растворимость в Трис pH 8 + 3 мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(T8Tm);
	10 мг/мл растворимость в ФСБ, pH 7,4;
	Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C;
	На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с BMB не наблюдали;
	Обращенно-фазовая ВЭЖХ подтверждает, что 10 мг/мл концентрация сохранялась в течение 1 недели исследования.

In vitro функция.

Аффинность связывания соединений 1-4 для человеческого рекомбинантного рецептора Gcg (hGcg-R) и человеческого рецептора GLP-1 (hGLP-1-R)

Конкурентный анализ связывания радиолиганда с использованием сцинтилляционного анализа сближения (SPA) и мембран, полученных из стабильных трансфицированных клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих hGcg-R или hGLP-1-R, проводили для определения равновесных констант диссоциации (K_i) для соединений 1-4. Ниже приведены экспериментальные протоколы и результаты.

Анализ связывания hGLP-1R.

Анализ связывания с GLP-1 рецептором использует клонированные hGLP-1-R (Graziano M.P., Hey P.J., Borkowski D., Chicchi G.G., Strader C.D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 196(1): 141-6, 1993), выделенные из клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hGLP-1R. кДНК hGLP-1R субклонировуют в экспрессию плазмиды pHd (трансактивированная экспрессия полностью гамма-карбоксилированного рекомбинантного человеческого белка C, антитромботического фактора. Orinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. и Yan, S.B. Bio/Technology 5:1189-1192, 1987). Указанную плазмидную ДНК трансфицируют в клетки 293НЕК и выбирают с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

Сырые плазменные мембраны получают с использованием клеток из адгезивной культуры. Клетки лизируют на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 mM Трис HCl, pH 7,5 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ с ЭДТА. Остаточная клеточная суспензия разрушается с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пептидом Teflon® для 25 ударов. Гомогенат центрифугируют 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 центрифугируют при 1100×g в течение 10 мин. Второй супернатант в сочетании с первым супернатантом центрифугировали при 35000×g в течение 1 ч при 4°C. Мембранный осадок ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеазы, быстро замораживают в жидком азоте и хранят в виде аликвот в морозильнике -80°C до использования.

GLP-1 подвергают радиоiodированию методом I-125-лактопероксидазы и очищают с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ в Perkin-Elmer (NEX308). Конкретная активность составляет 2200 Ки/ммоль. K_D , выполняемое гомологичной конкуренцией вместо связывания путем насыщения из-за высокого содержания пропанола в материале GL-1 I-125. По оценкам K_D составляет 1,24 nM и используется для расчета значений K_i для всех тестируемых соединений.

Анализ связывания рецептора проводят с использованием формата сцинтилляционного анализа сближения (SPA) с гранулами агглютинина (Wkin) из пшеничного зародыша (Perkin Elmer). Буфер связывания содержит 25 mM 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислоту (HEPES), pH 7,4, 2,5 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0,1% (мас./об.), бацитрацин (Affymetrix), 0,003% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбитан монолаурат (ТВИН®-20) и ингибиторы протеазы Roche Complete™ без ЭДТА. GLP-1 растворяют в

ДМСО при 0,339 мг/мл (0,1 mM) и хранят в замороженном состоянии при -20 °C в аликвотах по 100 мкл. Аликвоту GLP-1 развели и использовали в анализе связывания в течение часа. Пептидный аналог растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) и в 3 раза последовательно разбавляют в 100% ДМСО. Затем 5 мкл последовательно разбавленного соединения или ДМСО переносят в чистые аналитические планшеты Corning® 3632, содержащие 45 мкл аналитического буфера связывания или немеченого контроля GLP-1 (неспецифическое связывание (NSB) с конечной 0,25 мкМ). Затем добавляют 50 мкл hGLP-1R-мембран (0,5 мкг/лунку), 50 мкл I-125 GLP-1 (0,15 нМ) и 50 мкл шариков WGA (150 мкг/лунка), планшеты герметизируют и перемешивают шейкер (установка 6) в течение 1 мин. Планшеты читают с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после 12 ч времени отстаивания при комнатной температуре.

Результаты рассчитывают как процент специфического связывания I-125-GLP-1 в присутствии соединения. Абсолютная IC₅₀ концентрация соединения получена путем нелинейной регрессии процентного удельного связывания I-125-GLP-1 с концентрацией связанного соединения. Концентрация IC₅₀ преобразуется в K_i с использованием уравнения Ченга-Прусоффа (Cheng, Y., Prusoff, W.H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

K_i соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1 (7-36)NH₂ на hGLP-1-R показаны в табл. 3 ниже. Число копий (n) указано в скобках. А (>) указывает, что уровень ингибирования не достигает 50%, и расчетный K_i получается с использованием самой высокой концентрации, n=1/n указывает, что средние значения не вычисляются, когда все значения имеют знак > и указанное значение равно наименьшему вычисленному значению.

Таблица 3

K_i соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1(7-36)NH₂ на hGLP-1-R

Соединение	K _i , нМ ± SEM, (n)
Соединение 1	23,0 ± 5,5 (n=6)
Соединение 2	28,6 ± 4,8 (n=4)
Соединение 3	8,68 ± 1,60 (n=4)
Соединение 4	20,2 ± 8,2 (n=4)
Человеческий Gcg	>4940 (n=1/2)
Человеческий GLP-1 (7-36)NH ₂	0,75 ± 0,056 (n=67)

Анализ связывания hGcg-R.

Анализ связывания рецептора Gcg использует клонированный hGcg-R (Lok, S, et. al., Gene 140 (2), 203-209 (1994)), выделенный из клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hGcg-R. кДНК hGcg-R субклонируют в экспрессионную плазмиду pHd (трансактивированная экспрессия полностью гамма-карбоксилированного рекомбинантного человеческого белка C, антитромботического фактора. Grinnell, B.W., et. al., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Указанную плазмидную ДНК трансфицируют в клетки 293НЕК и выбирают с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

Сырые плазматические мембраны получают с использованием клеток из адгезивной культуры. Клетки лизируют на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 mM Трис HCl, pH 7,5 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ с ЭДТА. Остаточная клеточная суспензия разрушается с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пептидом Teflon® для 25 ударов. Гомогенат центрифугируют 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 центрифугируют при 1100×g в течение 10 мин. Второй супернатант в сочетании с первым супернатантом центрифугировали при 35000×g в течение 1 ч при 4°C. Мембранный осадок ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеазы, быстро замораживают в жидком азоте и хранят в виде аликвот в морозильнике -80°C до использования.

Gcg радиоiodируют методом I-125-лактопероксидазы и очищают с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ в Perkin-Elmer (NEX207). Конкретная активность составляет 2200 Ки/ммоль. Определение K_D выполняют гомологичной конкуренцией вместо связывания путем насыщения из-за высокого содержания пропанола в материале I-125 Gcg. По оценкам K_D составляет 3,92 нМ и используется для расчета значений K_i для всех тестируемых соединений.

Анализ связывания рецептора проводят с использованием формата анализа сцинтилляционного сближения (SPA) с гранулами агглютинаина (Wkin) из пшеничного зародыша (Perkin Elmer). Буфер свя-

завязывания содержит 25 мМ HEPES, pH 7,4, 2,5 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,1% (мас./об.) бацитрацина (Affymetrix), 0,003% (мас./об.) полиоксидэтиленсорбин монолаурата (ТВИН®-20) и Roche Complete™. Ингибиторы протеазы без ЭДТА. Gcg растворяют в ДМСО при 3,48 мг/мл (1 мМ) и хранят в замороженном состоянии при -20°C в аликвотах по 100 мкл. Аликвоту Gcg развели и использовали в анализе связывания в течение часа. Аналог пептида растворяют в ДМСО и в 3 раза последовательно разбавляют в 100% ДМСО. Затем 5 мкл последовательно разбавленное соединение или ДМСО переносят в чистые аналитические планшеты Corning® 3632, содержащие 45 мкл анализирующего связывания буфера или немеченого контроля Gcg (NSB на конечную концентрацию 1 мкМ). Затем добавляют 50 мкл hGcg-R мембран (0,5 мкг/лунку), 50 мкл I-125 Gcg (0,15 нМ в реакции) и 50 мкл шариков WGA (150 мкг/лунку), планшеты закрывают и перемешивают (установка 6) в течение 1 мин. Планшеты считывают с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после 12 ч времени отстаивания при комнатной температуре.

Результаты рассчитывают, как процент специфического связывания I-125-Gcg в присутствии соединения. Абсолютную IC₅₀ концентрацию соединения получили нелинейной регрессией процентного удельного связывания I-125-Gcg с концентрацией связанного соединения. Концентрация IC₅₀ преобразуется в K_i с использованием уравнения Ченга-Прусоффа (Cheng, Y., Prusoff, W.H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)). K_i для соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1(7-36)NH₂ на hGcg-R показаны в табл. 4 ниже. Число копий (n) указано в скобках. А (>) указывает, что уровень ингибирования не достигает 50%, и расчетная K_i получается с использованием самой высокой концентрации, n=1/2 указывает, что средние значения не вычисляются, когда все значения имеют знак >, а показанное значение результата имеет наивысшее вычисленное значение.

Таблица 4

K_i соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1(7-36)NH₂ для hGcg-R

Соединение	K _i , нМ ± SEM, (n)
Соединение 1	14,6 ± 4,4 (n=6)
Соединение 2	17,7 ± 5,0 (n=4)
Соединение 3	37,3 ± 4,2 (n=4)
Соединение 4	27,4 ± 3,3 (n=4)
Человеческий Gcg	2,49 ± 0,24 (n=73)
Человеческий GLP-1(7-36)NH ₂	>2420 (n=1/2)

Функциональные анализы hGLP-1-R и hGcg-R.

Функциональная активность определяется в hGLP-1-R и hGcg-R, экспрессирующих клональные клеточные линии НЕК-293. Ниже приведены экспериментальные протоколы и результаты.

Каждую клеточную линию, экспрессирующую рецептор, обрабатывают пептидом в DMEM (модифицированная Eulle Medium, Gibco кат. № 31053), дополненную 1X GlutaMAX™ (L-аланил-L-глутамин дипептидом в 0,85% NaCl, Gibco кат. № 35050), 0,25% ФБС (диализованная фетальная бычья сыворотка, Gibco кат. № 26400), 0,05% фракции V BSA (фракция бычьего альбумина V, Gibco Cat # 15260), 250 мкМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин) и 20 мМ HEPES [N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота), HyClone кат. № SH30237,01] в объеме анализа 40 мкл. После 60-минутной инкубации при комнатной температуре получили увеличение внутриклеточного цАМФ (аденозин 3',5'-циклический монофосфат) количественно определяют с использованием набора для анализа CISBio HTRF 2 набор для динамического анализа цАМФ (62AM4PEJ). Уровни цАМФ внутри клетки обнаруживают добавлением конъюгата цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (20 мкл), а затем прибавляли антитело анти-цАМФ-Eu³⁺-криптата, также в буфере для лизиса клеток (20 мкл). Полученный конкурентный анализ инкубируют в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре, затем детектируют с использованием прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и эмиссией при 665 и 620 нм. Единицы измерения (излучение при 665/620 нм * 10000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием стандартной кривой цАМФ. Количество произведенной цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразуется в процент от максимального ответа, наблюдаемого с помощью 10 нМ человеческого GLP-1 (7-36) NH₂ или 10 нМ человеческого Gcg.

Относительное значение EC₅₀ и верхний процент (E_{max}) получают путем нелинейного регрессион-

ного анализа с использованием процентного максимального отклика по сравнению с концентрацией добавляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами (Genedata Screener®).

Функциональные данные для соединений 1-4, человеческого GLP-1 (7-36) NH₂, человеческого Gcg и человеческого ОХМ дикого типа показаны в табл. 5 ниже. Среднее для EC₅₀ выражаются как геометрические средние ± стандартная ошибка среднего (SEM) с количеством повторений (n), указанных в скобках. Средние для E_{max} выражаются как арифметическое среднее ± стандартная ошибка. Нет данных означает, что активность агониста не обнаружена. Все показанные значения равны трем (3) значащим цифрам.

Таблица 5
Функциональная активность (EC₅₀) и эффективность (E_{max})
для соединений 1-4 человека GLP- (7-36)NH₂,
человеческого Gcg и человеческого ОХМ дикого типа

Соединение	Человеческий GLP-1-R		Человеческий Gcg-R	
	EC ₅₀ , нМ ± SEM (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ ± SEM, (n)	E _{max} , %
Соединение 1	23,9 ± 4,5 (13)	104 ± 7	7,21 ± 1,06 (13)	112 ± 3
Соединение 2	83,1 ± 16,8 (15)	107 ± 7	26,5 ± 2,2 (15)	114 ± 5
Соединение 3	34,3 ± 9,4 (13)	105 ± 5	15,3 ± 2,2 (13)	104 ± 5
Соединение 4	106 ± 18 (13)	85,2 ± 6,0	68,8 ± 7,2 (15)	116 ± 4
Человеческий Gcg	НЕТ ДАННЫХ	НЕТ ДАННЫХ	0,023 ± 0,014 (47)	113 ± 1
Человеческий GLP-1(7-36)NH ₂	0,168 ± 0,008 (51)	101 ± 1	НЕТ ДАННЫХ	НЕТ ДАННЫХ
Человеческий ОХМ дикого типа	9,54 ± 1,34 (8)	96,9 ± 5,7	0,757 ± 0,090 (8)	121 ± 7

Функциональная активация крысиного GLP-1-R в клеточной линии инсулиномы INS1 832-3.

Клеточная линия поджелудочной железы крысы, клетки INS1 832-3, используется для определения функциональной активности соединений 1-4 при стимуляции продукции цАМФ у эндогенных рецепторов GLP-1. Клетки содержатся в среде RPMI 1640 (HyClone, кат. номер SH30027) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамин, 50 мкМ 2-меркаптоэтанол и 100 У/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина в 37°C, 5% CO₂-инкубаторе и пропускали два раза в неделю.

Производительность анализа требует отсоединения клеток из культуральных колб с использованием ферментного стримера без клеток и осажденного центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Клетчатый осадок ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (EBSS), дополненном 11,2 мМ глюкозы и 0,1% BSA. 40 мкл клеточной суспензии с плотностью 1×10⁶/мл помещают в 96-луночные половинные черные планшеты (Costar 3875) и инкубируют при 37°C, 5% CO₂-инкубаторе в течение 2 ч для восстановления и голодания. Последовательные разведения тестовых соединений получают при 100% конечной концентрации теста в 100% ДМСО и дополнительно разводят в 20 раз в EBSS, дополненном 11,2 мМ глюкозы, 0,1% БСА и 1,25 мМ IBMX (Sigma I-7816). После 2 ч голодания клетки обрабатывают соединением, добавляя 10 мкл разведения 5X соединений в клеточные планшеты (n=2) и инкубируют в инкубаторе 37°C, 5% CO₂ в течение 30 мин.

Концентрация цАМФ, измеренная с использованием набора для анализа цАМФ HTRF (Cisbio): конъюгат цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (20 мкл), а затем прибавляли также в буфере для лизиса клеток (20 мкл) к ячейкам планшета антитело анти-цАМФ-Eu³⁺-криптат. Полученный конкурентный анализ инкубируют в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре и затем детектируют с использованием прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и испусканием при 665 и 620 нм. Единицы измерения (излучение при 665/620 нм * 10000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием стандартной кривой цАМФ.

Концентрацию цАМФ в каждой лунке (нМ) рассчитывали с использованием стандартной кривой цАМФ и превращали в процент от максимального отклика, наблюдаемого с нативным пептидом GLP-1 при 300 нМ для подгонки кривой.

Относительное значение EC₅₀ и верхний % (% E_{max}) получают путем нелинейного регрессионного анализа с использованием процентного максимального отклика по отношению к концентрации добав-

ляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами (программное обеспечение GraphPad Prism (Version 6,05)). Анализ проводят с использованием дублированных планшетов. Число копий (n) указано в скобках.

EC₅₀ и % E_{max} для человеческого ОХМ дикого типа, семаглутида и соединений 1 и 2 были рассчитаны, как описано выше. Данные EC₅₀ и % E_{max} для этих соединений приведены в табл. 6. Кроме того, соединения 1 и 2 увеличивают производство цАМФ дозозависимым образом (данные не проиллюстрированы).

Таблица 6
EC₅₀ человеческого ОХМ дикого типа для семаглутида и соединений 1 и 2 на крысе GLP-1-R в линии клеток инсулиномы INS1 832-3

Соединение	EC ₅₀ (нМ)	E _{max} (%)
Человеческий ОХМ дикого типа	7,3 (n=1)	121,1
Семаглутид	5,8 (n=1)	107,2
Соединение 1	26,1 (n=1)	112,3
Соединение 2	62 (n=1)	104,5

Функциональная активация hGcg-R в первичных гепатоцитах человека.

Первичные человеческие гепатоциты используются для определения функциональной активности соединений на стимулирующую продукцию цАМФ у эндогенных рецепторов Gcg. Флаконы первичных гепатоцитов человека замораживают в резервуаре с жидким азотом. После извлечения флаконы немедленно размораживают на водяной бане с температурой 37°C. Затем суспензию клеток переносят в 50 мл CHRM (Gibco/Life Technologies кат. № CM7000 Криоконсервированная восстановленная среда для гепатоцитов).

Клеточную суспензию центрифугируют при 1000×g в течение 10 мин. Клеточные гранулы ресуспендируют в 5 мл среды для планшетов после удаления CHRM путем аспирации. Среду для планшетов готовят путем добавления всего содержимого добавок CM3000 Pack к 500 мл питательной среде Вильямса (Gibco/Life Technologies) с последующей стерильной фильтрацией через мембрану 0,22 мкм.

Плотность клеток рассчитывают на гемоцитометре, добавляя 100 мкл клеточной суспензии к 100 мкл Трупан Блу (HyClone Трупан Блу 0,04%, номер каталога SV30084,01). Клеточную суспензию далее разбавили в среде для планшетов до конечной плотности клеток 0,8×10⁶ клеток на мл. В каждую лунку 96-луночного планшета с коллагеновым покрытием (Corning BioCoat, номер по каталогу 354649, лот № 22314033) добавляли 65 мл среды для планшетов. Затем к каждой лунке 96-луночного планшета с коллагеновым покрытием добавляли 65 мл клеточной суспензии до конечной плотности клеток 50000 клеток на лунку. Планшет с клетками инкубируют в инкубаторе 37°C, 5% CO₂ в течение 3-4 ч.

После 3-4 ч инкубации среду отсасывают и заменяют 100 мл поддерживающей средой. Поддерживающую среду готовят путем добавления всего содержимого пакетов добавки CM4000 к 500 мл среде Вильямса (Gibco/Life Technologies) с последующей стерильной фильтрацией через мембрану 0,22 мкм. Планшет с клетками возвращают в 37°C, 5% CO₂-инкубатор в течение ночи при подготовке к анализу цАМФ.

При подготовке к анализу соединения 1 и 2 и человеческой ОХМ дикого типа подвергают 3-кратным серийным разведениям в буфере для анализа соединения (HBSS, содержащем 20 мМ HEPES и 1% теплоинактивированного ФБС) для 10 концентраций.

Клеточные планшеты удаляют из инкубатора и среду удаляют путем нежной аспирации без нарушения монослоя ячейки. Клетки обрабатывают добавлением 40 мкл буфера для анализа клеток и 40 мкл тестового раствора (например, соединение 1, соединение 2 или человеческого ОХМ дикого типа, разведенного в буфере для анализа соединения) в клеточные планшеты и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч с нежным встряхиванием.

Концентрация цАМФ, измеренная с использованием набора для анализа цАМФ HTRF (Cisbio): конъюгат цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (40 мкл) с последующей обработкой антителом анти-цАМФ-Eu³⁺-криптат также прибавили в буфере для лизиса клеток (40 мкл) к клеткам в планшете. Полученный конкурентный анализ инкубируют в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре, затем детектируют с использованием прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и эмиссией при 665 и 620 нм. Единицы измерения (излучение при 665/620 нм * 10000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием стандартной кривой цАМФ.

Концентрация цАМФ в каждой лунке (нМ) рассчитывается с использованием стандартной кривой цАМФ и преобразуется в процент от максимального отклика, наблюдаемого с аналогом Gcg, конъюгированным с насыщенной C18 жирной кислотой (дикарбоновой кислотой) для подгонки кривой.

Относительное значение EC₅₀ и верхний % (% E_{max}) выводится с помощью нелинейного регрессионного анализа с использованием процентного максимального отклика по сравнению с концентрацией

добавляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами (программное обеспечение GraphPad Prism (Version 6,05)).

EC₅₀ и уровень E_{max} для соединений 1 и 2 и человеческого ОХМ дикого типа были рассчитаны, по существу, так, как описано выше. Данные EC₅₀ и % E_{max} для этих соединений представлены в табл. 7. Кроме того, соединения 1 и 2 увеличивают продуцирование цАМФ дозозависимым образом (данные не проиллюстрированы). Число копий (n) указано в скобках.

Таблица 7
EC₅₀ соединений 1 и 2 и человеческого ОХМ дикого типа
на hGcg-R в первичных гепатоцитах человека

Соединение	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
Человеческий ОХМ дикого типа	29,8 (n=1)	90,0
Соединение 1	99,9 (n=1)	100,0
Соединение 2	159,4 (n=1)	101,2

Фармакокинетика.

Фармакокинетика у яванских макаков.

Фармакокинетические свойства *in vivo* для соединений по данному изобретению продемонстрированы с использованием яванских макаков. Соединения вводят однократной внутривенной или подкожной дозой 50 или 250 нмоль/кг. У каждого животного производят забор крови через 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 208, 480, 576 и 672 ч после введения дозы.

Концентрации концентраций плазмы в плазме определяют методом ЖХ/МС. Вкратце, соединение по данному изобретению экстрагируют из 100% плазмы обезьяны (25 мкл) с использованием ацетонитрила. Два разных слоя образуются при центрифугировании соединения в жидком слое. 80 мкл аликвоты супернатанта переносят в 96-луночный планшет, разбавляют 150 мкл воды и 25 мкл муравьиной кислоты. Разведенный образец (10 мкл) вводят на колонку Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 см × 1 мм, 3 мкм. Вытекающий из колонны поток направлен в масс-спектрометр Thermo Q-Exactive для определения и количественного определения.

В экспериментах, проведенных, по существу, так, как описано для этого анализа, яванским макакам подкожно вводят однократную (50 нмоль/кг) дозу соединения 1 в 40 mM Трис HCl (pH 8,0) при объеме 0,20 мл/кг. Из каждого животного производили забор крови через 2 (исключительно IV), 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576 и 672 ч после введения дозы.

Другим яванским макакам внутривенно вводили (50 нмоль/кг) или подкожно (50 или 250 нмоль/кг) однократную дозу соединения 2 в 40 mM Трис HCl (pH 8,0) при объеме 0,20 мл/кг. Производили забор крови у каждого животного при 2 (IV исключительно) через 2, 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576 и 672 ч после введения дозы.

Данные для соединения 1 приведены в табл. 9, а данные для соединения 2 приведены в табл. 10. Соединение 1 достигало средней максимальной концентрации в плазме приблизительно через 12 ч после подкожного введения дозы 50 нмоль/кг. Среднее время полужизни составляет 57 ч, а средний клиренс составляет 2,16 мл/ч/кг (табл. 8).

Соединение 2 достигало средней максимальной концентрации в плазме через приблизительно 24 ч после подкожного введения дозы 50 нмоль/кг. Среднее время полужизни составляло 122 ч и средний клиренс составлял 0,55 мл/ч/кг (табл. 9).

Таблица 8
Индивидуальные и средние фармакокинетические параметры
после однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг
соединения 1 самцам яванских макаков

Соединение	Идентификационный номер животного	T _{1/2} (час)	T _{max} (час)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{0-inf} (ч*нмоль/л)	CL/F (мл/ч/кг)
Соединение 1: SC 50 нмоль/кг	I07762	47	12	253	21672	2,31
	I07763	67	12	236	24865	2,01
	Среднее	57	12	244	23268	2,16

Условные сокращения: AUC_{0-inf} = площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность.

T_{max} = время для достижения максимальной концентрации, C_{max} = максимальная концентрация в плазме, T_{1/2}

= время полужизни.

Таблица 9

Индивидуальные и средние фармакокинетические параметры соединения 2 после однократной внутривенной или подкожной дозы для самцов яванских макак

Соединение/Пу ть/ Доза	Идентификационн ый номер животного	T _{1/2} (час)	T _{max} (час)	C ₀ или C _{max} (нмоль/ л)	AUC _{0-inf} (ч*нмоль/ л)	CL/F (мл/ч/кг г)
Соединение 2: IV 50нмоль/кг	I07772	88	NA	1017	94828	0,53
	I07773	131	NA	1105	93174	0,54
	Среднее	110	NA	1061	94001	0,53
Соединение 2: SC 50нмоль/кг	I07764	137	24	474	100967	0,50
	I07765	106	24	452	82792	0,60
	Среднее	122	24	463	91879	0,55
Соединение 2: SC 250нмоль/кг	I07766	115	12	3640	429859	0,58
	I07767	104	12	3615	540175	0,46
	Среднее	110	12	3628	485017	0,52

Условные сокращения: AUC_{0-inf} = площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL = клиренс, CL/F = клиренс/биодоступность, T_{max} = время для достижения максимальной концентрации, C₀ = концентрация, экстраполированная ко времени 0 часов, C_{max} = максимальная концентрация в плазме, T_{1/2} = время полужизни, NA = неприменимо.

In vivo исследования.

Пероральный тест на толерантность к глюкозе (OGTT) у мышей DIO.

Модель мышей с алиментарным ожирением (DIO) представляет собой модель резистентности к инсулину. В данном исследовании используются пяти-шестимесячные мыши DIO (C57BL/6) из Taconic Biosciences. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24°C) объекте с 12-часовым светом/темным циклом (свет в 06:00) и свободным доступом к пище и воде. Период акклиматизации к объекту представляет собой две недели. 3 день до исследования животные рандомизируются в группы по своему весу. В тот же день животных оставляют без пищи в чистых клетках и дозируют несущей средой (40 mM Трис -HCl, pH 8,0) или испытываемым соединением путем подкожной инъекции. На следующее утро через 16 ч после инъекции пептида для расчета доз глюкозы получают массы тела натошак. Производится забор образцов крови для измерения нулевого уровня глюкозы. Затем животным дают пероральный зонд глюкозы (2 г/кг). Два показания глюкозы через глюкометры были получены через 15, 30, 60 и 120 мин после пероральной глюкозы. В каждый момент времени сообщается среднее значение двух показаний глюкозы и вычисляется площадь под кривой. Статистика анализировалась с использованием ANOVA с критерием Даннетта JMP 6; значимость обозначается при p≤0,05 в сравнении с несущей средой.

В экспериментах, проведенных, по существу, как описано в этом исследовании, соединение 2 показало дозозависимое снижение уровня глюкозы во время теста толерантности, а площадь под кривой глюкозы была снижена для всех трех испытанных доз 1, 3 и 10 нмоль/кг (табл. 10).

Таблица 10

Площадь под кривой глюкозы для самцов мышей DIO, которых лечили соединением 2 и семаглутидом в ответ на OGTT (2 г/кг)

Соединение	Доза (нмоль/кг)	Площадь под кривой глюкозы (% несущей среды)
Соединение 2	1	76*
Соединение 2	3	50*
Соединение 2	10	39*
Семаглутид	1	59*
Семаглутид	3	51*
Семаглутид	10	38*

% несущей среды, рассчитанный как 100 x (Значение, рассчитанное для соединения группы/значение, рассчитанное для несущей среды группы)

* p ≤ 0,05

Мыши DIO, обработанные OGTT в стрептозотине (STZ).

Модель STZ-обработанной мыши представляет собой модель раннего диабета. В этом исследовании используются пяти-шестимесячные мыши DIO (C57BL/6) из Taconic Biosciences. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24°C) объекте с 12-часовым светом/темным циклом (освещение с 6:00) и свободным доступом к пище и воде. После двухнедельной акклиматизации к

объекту мышам внутрибрюшинно вводят 50 мг/кг СТЗ во вторник и в пятницу. Через две недели после инъекции для исследования OGTT выбраны животные с уровнем глюкозы между 180-300 мг/дл в 09:00. За день до исследования животные рандомизируют в группы по массе тела и уровням глюкозы. Животных обрабатывают несущей средой или исследуемым соединением путем подкожной инъекции непосредственно перед удалением пищи в течение ночи (16:00). На следующее утро в 08:00, через 16 ч после инъекции, производят забор крови для измерения нулевого уровня глюкозы. Животным дают пероральную дозу глюкозы 2 г/кг. Глюкозу измеряют через 15, 30, 60 и 120 мин после пероральной проблемы с глюкозой. Статистика анализируется с использованием ANOVA с критерием Даннетта по JMP 6. Значение обозначается при $p \leq 0,05$ по сравнению с несущей средой.

В экспериментах, проведенных, по существу, как описано в этом анализе, соединение 2 показало дозозависимое снижение содержания глюкозы во время теста толерантности. Площадь под кривой глюкозы была снижена при всех трех дозах, испытанных 1, 3 и 10 нмоль/кг (табл. 11).

Таблица 11

Площадь под кривой глюкозы самцов STZ мышей, обработанных соединением 2 и семаглутидом, в виде отклика на OGTT (2г/кг)

Соединение	Доза (нмоль/кг)	Площадь под кривой глюкозы (% несущей среды)
Соединение 2	1	70*
Соединение 2	3	48*
Соединение 2	10	35*
Семаглутид	1	72*
Семаглутид	3	53*
Семаглутид	10	35*

% несущей среды, рассчитанный как $100 \times (\text{Значение, рассчитанное для соединения группы/значение, рассчитанное для несущей среды группы})$

* $p \leq 0,05$

Гликемический контроль у мышей DIO.

В этом исследовании используются пяти-шестимесячные мыши DIO (C57BL/6) из Taconic Biosciences. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24°C) объекте с 12-часовым светом/темным циклом (освещение с 6:00) и свободным доступом к пище и воде. После двухнедельной акклиматизации к объекту мышей рандомизируют в группы лечения ($n=7/\text{группа}$) в зависимости от их массы тела и уровня глюкозы в крови. Мышам подкожно вводят один раз несущую среду или соединения (25 нмоль/кг). Уровень глюкозы в крови контролируется через 2 и 8 ч после инъекции и затем один раз в день в 08:00 на 4 дня. OGTT выполняются в течение 44 и 78 ч после инъекции пептида. Статистика анализируется с использованием ANOVA с критерием Даннетта по JMP 6. Значение обозначается при $p \leq 0,05$ по сравнению с несущей средой.

В экспериментах, проведенных, по существу, так, как описано в этом анализе, у мышей, обработанных соединением 2 и соединением 4, была более низкая глюкоза, чем при контроле с несущей средой до 96 ч после инъекции. Соединения 2 и соединения 4 имели более низкие уровни глюкозной реакции после перорального введения глюкозы в оба момента времени, когда проводили OGTT.

Соединение 1 и соединение 3 уменьшали уровень глюкозы в крови до 72 ч (табл. 12). Мыши, обработанные соединением 1 и соединением 3, имели более низкие дозы глюкозы после перорального испытания с глюкозой в течение 44 ч после введения пептида (табл. 13).

Таблица 12
Уровень глюкозы в крови, измеренный через 2, 8, 24, 48, 72 и 96 ч после инъекции у самцов мышей DIO

Время	Глюкоза в крови (мг/дл) после инъекции Несущей среды		Глюкоза в крови (мг/дл) после инъекции Соединения 1		Глюкоза в крови (мг/дл) после инъекции Соединения 2		Глюкоза в крови (мг/дл) после инъекции Соединения 3		Глюкоза в крови (мг/дл) после инъекции Соединения 4	
	Среднее	SE М	Среднее	SE М	Среднее	SE М	Среднее	SE М	Среднее	SE М
2	155,7	5,0	168,5	21,4	112,7	8,5	173,4	19,0	110,2	2,3
8	164,5	6,7	79,4	3,4	87,4	1,2	81,4	3,8	91,5	4,4
24	189,1	5,1	90,6	4,0	101,1	3,1	96,6	2,8	87,4	1,6
48	142,6	2,5	101,9	4,1	101,3	3,1	95,8	5,3	102,9	4,7
72	154,2	4,2	113,4	5,6	97,6	3,8	104,7	5,6	115,7	2,8
96	159,4	4,3	150,0	10,4	115,0	5,5	141,1	7,2	104,6	2,6

Таблица 13
Изменения глюкозы во время OGTT в 44 и 78 ч после инъекции соединения

Соединение	44 часа	78 часов
	Площадь под кривой глюкозы (% несущей среды)	Площадь под кривой глюкозы (% несущей среды)
Соединение 1	42*	90
Соединение 2	39*	66*
Соединение 3	35*	76*
Соединение 4	41*	60*

% несущей среды, рассчитанный как $100 \times (\text{значение, рассчитанное для соединения группы} / \text{значение, рассчитанное для несущей среды группы})$

* $p \leq 0,05$

Долговременное лечение мышей DIO.

Влияние на потребление пищи и массу тела/жир оценивают у мышей DIO. В этом исследовании используют пяти-шестимесячные мыши DIO (C57BL/6) из Taconic Biosciences. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24°C) объекте с 12-часовым светом/темным циклом (освещение 6:00) и свободным доступом к пище и воде. Мышам дают акклиматизироваться к установке в течение двух недель. За день до начала исследования масса жира измеряется с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с использованием прибора Echo Medical System (Houston, TX). Мышей рандомизировали в группы лечения (N=7/группа) по массе тела и массе жиров, поэтому каждая группа имела аналогичную исходную массу тела и жиров. Несущую среду (40 mM Трис-HCl, pH 8,0), тестовые соединения или положительный контроль семаглутида вводят путем подкожной (СК) инъекции мышам ad libitum между 8-10 утра каждые три дня в течение 15 дней. СК инъекции производятся на день 1, 4, 7, 10 и 13. Масса тела и потребление пищи измеряются непосредственно перед каждой инъекцией на протяжении всего исследования. Процент изменения массы тела рассчитывается следующим образом:

$100 \times (\text{конечная масса тела животного} - \text{исходная масса тела животного}) / \text{исходная масса тела животного}$

По завершении исследования общую массу жира снова измеряют с помощью ЯМР. Статистика анализируется с использованием ANOVA с критерием Даннетта по JMP 6. Значение обозначается при $p < 0,05$ по сравнению с несущей средой. В экспериментах, выполненных, по существу, как описано в этом анализе, соединения 1-4 уменьшают потребление пищи и массу тела/жир, как показано в табл. 14 ниже.

Таблица 14

% изменение массы тела и % изменение жира в организме у мышей DIO

Соединение	Доза (нмоль/кг)	Масса тела (% изменения по сравнению с несущей средой с Дня 1)	Телесный жир (%изменения по сравнению с несущей средой с Дня 1)
Соединение 1	15	-19*	-49*
	30	-29*	-66*
Соединение 2	15	-19*	-43*
	30	-33*	-70*
Соединение 3	15	-17*	-32*
	30	-37*	-67*
Соединение 4	15	-15*	-26*
	30	-39*	-69*
Семаглутид	30	-8	-20*
	60	-12*	-29*

* p ≤ 0,05

Острое лечение у мышей DIO.

Чтобы исследовать метаболические пути, связанные с лечением соединениями по данному изобретению, независимо от потери веса, соединения тестировали на мышах DIO (C57BL/6) кратковременно. Мышам от трех до четырех месяцев на диете с высоким содержанием жиров в течение как минимум 4 недель. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24°C) объекте с 12-часовым циклом свет/темнота (освещение 6:00) и свободным доступом к пище и воде. Несущую среду или тестовое соединение вводили мышам путем подкожной инъекции в 16:00 за день до исследования. Животных умерщвляли через 16 ч, чтобы собрать кровь с помощью кардиальной пункции. Статистика анализируется с использованием ANOVA с использованием критерия Даннетта для JMP-6. Значимость обозначается при $p \leq 0,05$ в сравнении с несущей средой.

В экспериментах, проведенных, по существу, как описано в анализе, соединения 1-3 снижают уровень холестерина в сыворотке и уровни PCSK9 и увеличивают уровни FGF-21, как показано в табл. 15. Напротив, лечение семаглутидом не снижает уровень холестерина в сыворотке и PCSK9 и увеличивает FGF-21 уровень. Потребление пищи было снижено до уровня, аналогичного уровню во всех группах лечения, что может указывать на то, что изменения в холестерине, PCSK9 и FGF-21 являются независимыми от приема пищи.

Таблица 15

Кратковременные эффекты на уровни PCSK9, FGF-21 и холестерина

Соединение	Доза (нмоль/кг)	PCSK9 (% несущей среды)	FGF-21 (%несущей среды)	Холестерин (%несущей среды)
Соединение 1	30	14,6*	1770*	60,9*
Соединение 2	30	12,8*	465*	80,6*
Соединение 3	30	15,6*	1124*	55,6*
Семаглутид	30	115,3	75	117,6

% несущей среды, рассчитанной как $100 \times (\text{значение, рассчитанное для соединения группы} / \text{значение, рассчитанное для несущей среды группы})$

* p ≤ 0,05

Влияние на потребление энергии у мышей DIO.

В этом исследовании используются семи-восьмимесячные мыши DIO (C57BL/6) весом 45-50 г для оценки влияния на энергетический обмен соединений по данному изобретению. Животные индивидуально размещены в помещении с температурой (24°C) с 12-часовым циклом свет/темнота (свет в 22:00) и свободным доступом к пище (TD95217) (Teklad) и воде. Через 2 недели акклиматизации к объекту мышей рандомизируют в группы лечения (N= 6/группа) в зависимости от массы тела, поэтому каждая группа имеет аналогичную начальную среднюю массу тела. Животные помещаются в калориметр PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Chesterfield, MO) в течение 8 дней после акклиматизации. Несущую среду (40 mM Трис HCl-буфер при pH 8,0, 10 мл/кг), испытуемое соединение (15 нмоль/кг) или семаглутид (60 нмоль/кг) подкожно вводили ad libitum мышам DIO за 30-90 мин до начала темного цикла каждые три дня в течение 15 дней.

Тепло и дыхательный фактор (RER) измеряются косвенной калориметрией, как описано с использованием системы калориметрии с открытым контуром. RER представляет собой соотношение объема производимого CO₂ (VCO₂) к объему потребляемого O₂ (VO₂). Тепло рассчитывается с учетом сухой

массы тела. Расход энергии составляет ккал/кг/3 день и выражается как среднее $\pm$ SEM 6 мышей на группу. Статистическую значимость оценивают с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным тестом Тьюки.

В экспериментах, проведенных, по существу, так, как описано в этом анализе, мыши, обработанные с помощью соединений 1 и 2, повышали скорость своего метаболизма, начиная с недели 2, и поддерживали эффект в течение периода лечения, как показано в табл. 16. Однако семаглутид не влиял на скорость метаболизма. Это увеличение скорости метаболизма может способствовать дополнительной потере веса, наблюдаемой при введении соединений 1 и 2 по сравнению с введением семаглутида.

Таблица 16

Влияние длительного лечения соединением 1, соединением 2
или семаглутидом на скорость метаболизма у мышей DIO

Период лечения	Аккумулированное тепло (Ккал/кг сухой массы/3 дня)			
	Несущая среда	Семаглутид	Соединение 1	Соединение 2
1 День – 4 День	2184 $\pm$ 27	1973 $\pm$ 51	1749 $\pm$ 136**	1746 $\pm$ 96**
День 4 – День 7	2154 $\pm$ 36	2018 $\pm$ 54	1822 $\pm$ 173	1778 $\pm$ 132*
День 7 – День 10	2239 $\pm$ 28	2151 $\pm$ 48	2349 $\pm$ 129	2549 $\pm$ 129**
День 10 – День 13	2207 $\pm$ 16	2138 $\pm$ 46	2351 $\pm$ 144	2568 $\pm$ 147*

* $p \leq 0,05$ в сравнении с несущей средой

** $p \leq 0,05$ в сравнении с семаглутидом

Аминокислотные последовательности.

SEQ ID NO: 1 (человеческий OXM).

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Ile-Ala
(HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNNIA)

SEQ ID NO: 2 (искусственная последовательность).

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDSEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG),

где Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu (E) или Ser (S);

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислоты; и C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

SEQ ID NO: 3 (искусственная последовательность).

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDSEKKAKEFVEWLLSEGPSSG),

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислоты; и

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

SEQ ID NO: 4 (искусственная последовательность).

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDSEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислоты; и

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

SEQ ID NO: 5 (искусственная последовательность).

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDSEKKAKEFVEWLLSEGPSSG),

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с [(2-(2-аминоэтокси)этокси)ацетил]₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆CO₂H; и

C-концевая аминокислота амидирована.

SEQ ID NO: 6 (искусственная последовательность).

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-

Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLGGPSSG),
где Xaa2 представляет собой Aib;
Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксидетоксид)ацетил})_2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}]$; и C-концевая аминокислота амидирована.
SEQ ID NO: 7 (искусственная последовательность)
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),
где Xaa2 представляет собой Aib;
Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксидетоксид)ацетил})_2-(\gamma\text{-Glu})_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO}_2\text{H}]$; и C-концевая аминокислота амидирована.
SEQ ID NO: 8 (искусственная последовательность).
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),
где Xaa2 представляет собой Aib;
Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с $[(2-(2\text{-аминоэтоксидетоксид)ацетил})_2-(\gamma\text{-Glu})_2\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}]$; и C-концевая аминокислота амидирована.
SEQ ID NO: 9 (искусственная последовательность).
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG),
где Xaa2 представляет собой Aib;
Xaa28 представляет собой Glu (E) или Ser (S); и C-концевая аминокислота необязательно амидирована.
SEQ ID NO: 10 (искусственная последовательность).
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLGGPSSG),
где Xaa2 представляет собой Aib; и C-концевая аминокислота необязательно амидирована.
SEQ ID NO: 11 (искусственная последовательность).
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG),
где Xaa2 представляет собой Aib; и C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представляющее собой агонист рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкагона (Gcg) и имеющее следующую формулу:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислотой через линкер, представляющий собой $[(2-(2\text{-аминоэтоксидетоксид)ацетил})_2-(\gamma\text{-Glu})_t]$, где t равен 1 или 2; и

C-концевая аминокислота амидирована или не амидирована; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где Xaa28 представляет собой Glu.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где Xaa28 представляет собой Ser.

4. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где t равен 1.

5. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где t равен 2.

6. Соединение по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту.

7. Соединение по п.6 или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота

представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту, выбранную из миристиновой кислоты (тетрадекановой кислоты) (C14 монокарбоновой кислоты), тетрадекандикарбоновой кислоты (C14-дикарбоновой кислоты), пальмитиновой кислоты (гексадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C16), гексадекандикарбоновой кислоты (C16-дикарбоновой кислоты), маргариновой кислоты (гептадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C17), гептадекандикарбоновой кислоты (дикарбоновой кислоты C17), стеариновой кислоты (октадекановой кислоты) (C18 монокарбоновой кислоты), октадекандикарбоновой кислоты (C18-дикарбоновой кислоты), нонадециловой кислоты (нонадекановой кислоты) (C19 монокарбоновой кислоты), нонадекандикарбоновой кислоты (C19-дикарбоновой кислоты), арахидиновой кислоты (эйкозановой кислоты) (C20 монокарбоновой кислоты), эйкозандикарбоновой кислоты (C20-дикарбоновой кислоты), гнейкозиловой кислоты (гнейкозановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C21), гнейкозандикарбоновой кислоты (C21-дикарбоновой кислоты), бегеновой кислоты (докозановой кислоты) (C22), докозандикарбоновой кислоты (C22-дикарбоновой кислоты), лигноцериновой кислоты (тетракозановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C24) и тетракозандикарбоновой кислоты (C24-дикарбоновой кислоты).

8. Соединение по п.6 или 7 или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота представляет собой октадекандикарбоновую кислоту.

9. Соединение по п.6 или 7 или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота представляет собой эйкозандикарбоновую кислоту.

10. Соединение по любому из предшествующих пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где С-концевая аминокислота амидирована.

11. Фармацевтическая композиция для лечения диабета типа 2, ожирения, безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и/или безалкогольного стеатогепатита (NASH), где композиция содержит соединение по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

12. Способ лечения диабета типа 2 у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли.

13. Способ лечения ожирения у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Способ лечения безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли.

15. Способ лечения безалкогольного стеатогепатита (NASH) у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли.

16. Способ индуцирования нетерапевтической потери веса у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли.

17. Применение соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения диабета типа 2.

18. Применение соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения ожирения.

19. Применение соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD).

20. Применение соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения безалкогольного стеатогепатита (NASH).

21. Промежуточное соединение для производства соединения по п.1 формулы (SEQ ID NO: 9)
His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly,

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser; и

С-концевая аминокислота амидирована или неамидирована,

или его фармацевтически приемлемая соль.

22. Промежуточное соединение по п.21, где Xaa28 представляет собой Glu.

23. Промежуточное соединение по п.21, где Xaa28 представляет собой Ser.

24. Способ производства соединения по п.1, где указанный способ включает стадию модифицирования промежуточного соединения по п.21 путем конъюгации с эпсилон-аминогруппой боковой цепи Lys в положении 20 промежуточного соединения с C14-C24 жирной кислотой через линкер, представляющий собой ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ-Glu)_n, где n равен 1 или 2.

