

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190477 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.04

(22) Дата подачи заявки
2019.08.22

(51) Int. Cl. A61K 38/23 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
C07K 14/585 (2006.01)

(54) АЦИЛИРОВАННЫЕ МИМЕТИКИ КАЛЬЦИТОНИНА

(31) 1813678.8

(32) 2018.08.22

(33) GB

(86) PCT/EP2019/072533

(87) WO 2020/039051 2020.02.27

(71) Заявитель:

КИ БИОСАЙЕНС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Андреассен Ким В, Хенриксен Ким,
Сонне Нина, Карсдал Мортен Ассер
(DK)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении описаны миметики кальцитонина, которые ацилированы по остатку лизина, расположенному в положении 11 или положении 19 миметика кальцитонина, и их применения в качестве лекарственных средств при лечении различных заболеваний и нарушений, включая сахарный диабет, избыточную массу тела, чрезмерное потребление пищи и метаболический синдром, НАСГ, алкогольную и неалкогольную жировую болезнь печени, регулирование уровней глюкозы в крови, регулирование ответа на тест толерантности к глюкозе, регулирование потребления пищи и лечение остеопороза и остеоартрита.

A1

202190477

202190477

A1

АЦИЛИРОВАННЫЕ МИМЕТИКИ КАЛЬЦИТОНИНА

Данное изобретение относится к ацилированным миметикам кальцитонина и распространяется на их применение в качестве лекарственных средств при лечении различных заболеваний и расстройств, включая, но не ограничиваясь указанными, сахарный диабет (I тип и II тип), избыточную массу тела, чрезмерное потребление пищи и метаболический синдром, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), алкогольную и неалкогольную жировую болезнь печени, регуляцию уровня глюкозы в крови, регуляцию ответа на глюкозотолерантный тест, регулирование потребления пищи, лечение остеопороза и лечение остеоартрита.

Во всем мире насчитывается около 250 миллионов больных сахарным диабетом, и, предполагается, в течение следующих двух десятилетий их число удвоится. Более 90% этой группы населения (популяции) страдают сахарным диабетом 2 типа (СД2Т). По оценкам, в настоящее время диагноз поставлен только 50-60% людей, страдающих СД2Т, или находящихся на стадии, предшествующей клиническому проявлению СД2Т.

СД2Т представляет собой гетерогенное заболевание, характеризующееся нарушениями углеводного и жирового обмена. Причины возникновения СД2Т являются многофакторными и включают как генетические, так и связанные с окружающей средой факторы, оказывающие воздействие на функцию β -клеток и чувствительность к инсулину в таких тканях, как мышцы, печень, поджелудочная железа и жировая ткань. В результате этого наблюдается пониженная секреция инсулина, которая происходит параллельно с прогрессирующим снижением функции β -клеток и развитием хронической резистентности к инсулину. Неспособность эндокринной части поджелудочной железы компенсировать периферическую резистентность к инсулину приводит к гипергликемии и началу развития клинических проявлений сахарного диабета. Резистентность тканей к опосредованному инсулином поглощению глюкозы в настоящее время считается основным патофизиологическим фактором развития СД2Т.

Критерием успешного исхода оптимальной коррекции СД2Т является снижение уровней глюкозы в крови, которое может представлять собой как хроническое снижение уровней глюкозы в крови, так и повышение способности переносить высокие уровни глюкозы после приема пищи, что характеризуется снижением пиковых уровней глюкозы и более быстрым клиренсом. Обе эти ситуации приводят к меньшей нагрузке на β -клетки в отношении выработки инсулина и их функционирования.

Сахарный диабет I типа характеризуется потерей способности вырабатывать инсулин в ответ на прием пищи и, следовательно, неспособностью регулировать уровень глюкозы в крови до нормального физиологического уровня.

Физическая структура кости может быть нарушена в результате воздействия множества факторов, включая болезнь и повреждение. Одной из самых распространенных болезней костей является остеопороз, который характеризуется низкой костной массой и структурной деградацией костной ткани, приводящей к ломкости костей и повышенной чувствительности к переломам, в частности шейки бедренной кости, позвоночника и запястья. Остеопороз развивается при таком нарушении равновесия, когда скорость резорбции кости превышает скорость формирования кости. Было показано, что введение эффективного количества противорезорбтивного средства, такого как кальцитонин, предотвращает резорбцию кости.

Воспалительные или дегенеративные заболевания, включая заболевания суставов, например, остеоартрит (ОА), ревматоидный артрит (РА) или ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА), а также включая воспаление, являющееся результатом аутоиммунного ответа, например, волчанку, анкилозирующий спондилоартрит (АС) или рассеянный склероз (РС), могут приводить к значительной потере подвижности из-за боли и разрушения сустава. Хрящ, покрывающий кость в суставах и обеспечивающий амортизацию, со временем может разрушаться, таким образом, допуская нежелательное прямое соприкосновение двух костей, которое может ограничивать движение одной кости относительно другой и/или вызывать повреждение одной кости другой во время движения сустава. Субхондральная кость, подлежащая под хрящом, также может разрушаться. Введение эффективного количества противорезорбтивного средства, такого как кальцитонин, может предотвратить резорбцию кости.

Кальцитонины являются высококонсервативными у большого числа видов. Полноразмерный нативный кальцитонин состоит из 32 аминокислот. Последовательности примеров природных кальцитонинов приведены ниже:

Лосось	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP
Угорь	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP
Курица	CASLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP
Мышь	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVEAP
Крыса	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVGAP

Лошадь	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP
Собака-1	CSNLSTCVLGTYSKDLNNFHTFSGIGFGAETP
Собака-2	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP
Свинья	CSNLSTCVLSAYWRNLNNFHRFSGMGFGPETP
5 Человек	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP

Искусственные варианты природных кальцитонинов с модифицированными аминокислотными последовательностями, которые предназначены для обеспечения улучшенных свойств, раскрыты в WO2013/067357 и WO 2015/071229.

Однако, пептиды, такие как кальцитонин и миметики кальцитонина, обычно имеют недостаточную абсорбцию, распределение, метаболизм и экскрецию, быстрый клиренс и короткий период полувыведения. Соответственно, лекарственные средства на основе пептидов обычно требуют ежедневного парентерального введения. Ежедневное применение лечения посредством подкожных (п/к) инъекций в настоящее время не является оптимальным способом введения, поскольку оно создает неудобства для отдельных пациентов и может вызвать несоблюдение плана лечения пациентами, пытающимися избежать дискомфорта, связанного с ежедневными инъекциями. Таким образом, прием лекарственного средства один раз в неделю посредством подкожной инъекции повысит качество жизни указанных пациентов и будет способствовать соблюдению плана лечения.

В данной области техники известен целый ряд подходов к попыткам улучшить период полувыведения *in vivo* пептидных лекарственных средств. Такие подходы включают повышение протеолитической стабильности (например, путем защиты N- и C-концов, замены аминокислот на D-аминокислоты или неприродные аминокислоты, циклизацию пептида и т.д.) и снижение почечного клиренса (например, путем конъюгирования пептида к макромолекулам, таким как крупные полимеры, альбумин, иммуноглобулины и т.д.). Однако в данной области техники также известно, что внесение таких модификаций в пептидные лекарственные средства может быть вредным с точки зрения, например, снижения активности лекарственного средства и непредсказуемых нежелательных побочных реакций, таких как сенсibilизация лекарственного средства. В частности, невозможно предсказать, обязательно ли такие модификации улучшат терапевтический профиль пептидного лекарственного средства.

Соответственно, разработка пептидных лекарственных средств, требующих введения их только один раз в неделю, представляет собой трудную, но интересную задачу.

Одним из подходов к улучшению фармакокинетических и фармакодинамических свойств пептидных лекарственных средств является ацилирование пептида. Trier и соавт. (PhD диссертация, 2016, "Acylation of Therapeutic Peptides", DTU; доступна для скачивания с http://orbit.dtu.dk/files/127682557/PhD_thesis_Sofie_Trier.pdf) изучали эффект ацилирования двух терапевтических пептидов, а именно глюкагоноподобного пептида 2 (GLP2) и кальцитонина лосося (sCT) ацильными группами различной длины (C₈-C₁₆). В то время как эффекты ацилирования GLP2 оказались в значительной степени предсказуемыми на основании предыдущих наблюдений над подобными пептидами, эффекты, наблюдаемые при ацилировании sCT, оказались непредсказуемыми. Например, Trier и соавт. обнаружили, что ацилирование sCT (в различных положениях на коре пептида) последовательно вызывало существенную потерю активности рецептора (потеря 60-80%), тогда как для GLP-2 эффективность рецептора после ацилирования сохранялась. Соответственно, в то время как Trier и соавт. обнаружили некоторые полезные свойства, связанные с ацилированием sCT (особенно в отношении ацилирования короткой цепью (C₈)), также было ясно, что с ацилированием sCT связаны многочисленные непредсказуемые и значительно неблагоприятные эффекты, в первую очередь значительная потеря активности по отношению к рецепторам. Следует также отметить, что исследования Trier и соавт. сосредоточены на ацилировании 18-го положения (Lys18) кальцитонина лосося. Это связано с тем, что в предыдущих исследованиях, направленных на повышение эффективности кальцитонина лосося, было определено, что положение 18 является лучшим для модификации (в этом случае путем пегилирования, а не ацилирования). В этих исследованиях было обнаружено, что пегилирование положения Lys18 в sCT приводит к большей эффективности, по сравнению с аналогичными пептидами, модифицированными в положениях Cys1 или Lys11 (Youn et al, J. Control. Release, 2006, 334-342).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения обнаружили, что ацилирование миметиков кальцитонина по остатку лизина, расположенному в положении 11 миметиков кальцитонина, или по остатку лизина, расположенному в положении 19 миметиков кальцитонина, в частности, некоторыми конкретными ацильными фрагментами, приводит

к неожиданному улучшению эффективности пептида по сравнению с эквивалентным неацилированным пептидом, а также к увеличению продолжительности действия пептида. Точно так же было обнаружено, что наибольшее улучшение эффективности миметика кальцитонина соответствовало ацилированию в положении 11 или 19, тогда как ацилирование положения 18 приводило к худшему результату, что противоречит выводам Youn и соавт. По существу, авторы данного изобретения разработали новые эффективные миметики ацилированного кальцитонина, которые, возможно, необходимо вводить только один раз в неделю, а не один раз в день.

Соответственно, в одном аспекте данное изобретение относится к миметику кальцитонина, который ацилируют по остатку лизина, расположенному в положении 11 миметика кальцитонина, и/или который ацилируют по остатку лизина, расположенному в положении 19 миметика кальцитонина. ϵ -аминогруппа боковой цепи указанного остатка лизина ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего: жирной кислоты C16 или жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером; или двухосновной жирной кислоты C16 или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером.

Термин «миметик кальцитонина», в контексте данного документа, означает пептид, который активирует рецептор кальцитонина (т.е., агонист рецептора кальцитонина) и предпочтительно также активирует рецептор амилина (т.е., двойной агонист рецептора амилина и кальцитонина).

В некоторых предпочтительных вариантах реализации, миметик кальцитонина имеет длину от 32 до 37 аминокислот. Наиболее предпочтительно, миметик кальцитонина имеет длину 32 аминокислоты.

В одном предпочтительном аспекте, в котором миметик кальцитонина ацилирован по остатку лизина, расположенному в положении 11, данное изобретение относится к миметику кальцитонина формулы (I)(a):



где

$X_2 = A, G$ или S

$X_3 = N$ или S

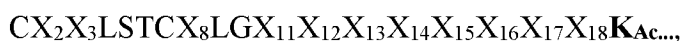
$X_8 = M, V$ или α -аминоизомасляная кислота (AiB)

и где K_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером, или

двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером.

5 В другом предпочтительном аспекте, в котором миметик кальцитонина ацилирован по остатку лизина, расположенному в положении 19, данное изобретение относится к миметику кальцитонина формулы (I)(b):



где

10 $X_2 = A, G$ или S

$X_3 = N$ или S

$X_8 = M, V$ или α -аминоизомасляная кислота (AlB)

$X_{11} = R, K, T, A$ или K_{Ac} (предпочтительно R, K или K_{Ac} , наиболее предпочтительно R или K)

15 $X_{12} = L$ или Y (наиболее предпочтительно L)

$X_{13} = S, T, W$ или Y (предпочтительно T, S или Y)

$X_{14} = Q, K, R$ или A (предпочтительно Q или A , наиболее предпочтительно Q)

$X_{15} = D, E$ или N (предпочтительно D или E)

$X_{16} = L$ или F (наиболее предпочтительно L)

20 $X_{17} = H$ или N

$X_{18} = R, K$ или N (предпочтительно R или K)

и где K_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

25 жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером, или

двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером.

Предпочтительно, миметик кальцитонина формулы (I)(a) или (I)(b) имеет длину от 30 32 до 37 аминокислот, предпочтительно длину 32, 33, 35, 36 или 37 аминокислот.

Наиболее предпочтительно, миметик кальцитонина формулы (I)(a) или (I)(b) имеет длину 32 аминокислоты.

В предпочтительном аспекте данного изобретения, миметик кальцитонина 35 представляет собой 32-мерный миметик кальцитонина формулы (II):

$CX_2X_3LSTCX_8LGX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}GX_{29}X_{30}X_{31}P$,

где

$X_2 = A, G$ или S

$X_3 = N$ или S

5 $X_8 = M, V$ или α -аминоизомасляная кислота (AiB)

$X_{11} = K_{Ac}, R, K, T$ или A (наиболее предпочтительно K_{Ac}, R или K)

$X_{12} = L$ или Y

$X_{13} = S, T, W$ или Y

$X_{14} = Q, K, R$ или A

10 $X_{15} = D, E$ или N

$X_{16} = L$ или F

$X_{17} = H$ или N

$X_{18} = R, K$ или N

$X_{19} = K_{Ac}, L, F$ или K (наиболее предпочтительно K_{Ac}, L или F)

15 $X_{20} = Q, H$ или A

$X_{21} = T$ или R

$X_{22} = Y$ или F

$X_{23} = S$ или P

$X_{24} = G, K, Q$ или R

20 $X_{25} = T, I$ или M

$X_{26} = S, N, D, G$ или A

$X_{27} = T, V, F$ или I

$X_{29} = S, A, P$ или V

$X_{30} = N, G$ или E

25 $X_{31} = A, T$ или S (наиболее предпочтительно A или T)

где или X_{11} представляет собой K_{Ac} и/или X_{19} представляет собой K_{Ac} (так, что или

X_{11} представляет собой K_{Ac} и X_{19} представляет собой L, F или K , предпочтительно L или

F ; или X_{11} представляет собой R, K, T или A , предпочтительно R или K , и X_{19}

представляет собой K_{Ac} ; или X_{11} представляет собой K_{Ac} и X_{19} представляет собой K_{Ac}),

30 и где K_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью,

двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью,

35 линкер- C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью, или

линкер-С₁₆ или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью.

Предпочтительно, 32-мерный миметик кальцитонина формулы (II) представляет собой:

5 CX₂X₃LSTCX₈LGX₁₁LX₁₃X₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈X₁₉X₂₀TX₂₂PX₂₄TDVGANAP,

где

X₂ = A, G или S

X₃ = N или S

X₈ = M, V или AiB

10 X₁₁ = K_{Ac}, R, K, T или A (наиболее предпочтительно K_{Ac}, R или K)

X₁₃ = T, S или Y

X₁₄ = Q или A (наиболее предпочтительно Q)

X₁₅ = D или E

X₁₇ = H или N

15 X₁₈ = R или K

X₁₉ = K_{Ac}, L, F или K (наиболее предпочтительно K_{Ac}, L или F)

X₂₀ = Q, H или A

X₂₂ = Y или F

X₂₄ = K, Q или R

20 где или X₁₁ представляет собой K_{Ac}, и/или X₁₉ представляет собой K_{Ac},

и где K_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ε-аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

жирной кислоты С₁₆ или жирной кислоты с более длинной цепью,

двухосновной жирной кислоты С₁₆ или двухосновной жирной кислоты с более

25 длинной цепью,

линкер-С₁₆ или жирной кислоты с более длинной цепью, или

линкер-С₁₆ или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью.

Предпочтительно, X₂ представляет собой S и X₃ представляет собой N; или X₂ представляет собой G и X₃ представляет собой N; или X₂ представляет собой A и X₃ представляет собой S.

Предпочтительно, X₁₃ представляет собой S или T, наиболее предпочтительно S.

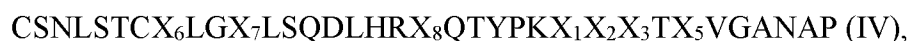
Предпочтительно, X₂₄ представляет собой R или K.

представляет собой R или K, X_{13} представляет собой T, X_{17} представляет собой N, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой K_{Ac} , X_{20} представляет собой H или A, и X_{22} представляет собой F.

В другом предпочтительном аспекте, данное изобретение относится к миметику кальцитонина, причем миметик кальцитонина представляет собой 33-мерный пептид в соответствии с формулой (III):



или причем миметик кальцитонина представляет собой 35-мерный пептид в соответствии с формулой (IV):



или причем миметик кальцитонина представляет собой 36-мерный пептид в соответствии с формулой (IV):



или причем миметик кальцитонина представляет собой 37-мерный пептид в соответствии с формулой (IV):



где каждый из X_1 - X_4 представляет собой любую аминокислоту, при условии, что по меньшей мере один из X_1 - X_4 представляет собой остаток основной аминокислоты и/или по меньшей мере два из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере один из X_1 - X_4 представляет собой остаток Gly, и при этом ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты;

где X_5 представляет собой D или N;

где X_6 представляет собой AiB или M;

где или X_7 представляет собой K_{Ac} и X_8 представляет собой L, или X_7 представляет собой R или K, и X_8 представляет собой K_{Ac} ,

где Z выбран из SQDLHRLSNNFGA, SQDLHRLQTYGAI или ANFLVHSSNNFGA; и

где K_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью, двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью,

линкер- C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью, или

линкер- C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью.

Предпочтительно, по меньшей мере один из X_1 или X_4 формул (III)-(VI) представляет собой остаток основной аминокислоты. Тем не менее, предпочтительно, по меньшей мере один из X_1 или X_4 представляет собой остаток основной аминокислоты, и по меньшей мере еще один из X_1 - X_4 независимо представляет собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты. Тем не менее, предпочтительно, по меньшей мере три из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты. Более предпочтительно, все из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты. Более предпочтительно, все из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, по меньшей мере три из X_1 - X_4 представляют собой остаток основной аминокислоты, ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты.

Остатки основной аминокислоты могут быть любыми природными или неприродными аминокислотными остатками с основными боковыми цепями и могут быть выбраны из, но не ограничиваясь этим, Arg, His или Lys. Остатки полярной аминокислоты могут быть любыми природными или неприродными аминокислотными остатками с полярными незаряженными боковыми цепями и могут быть выбраны из, но не ограничиваясь этим, Ser, Thr, Asn, Gln или Cys. Термин «остаток кислой аминокислоты», в контексте данного документа, относится к любому природному или неприродному остатку аминокислоты, который имеет кислотную боковую цепь, такую как, например, Glu или Asp.

В предпочтительном варианте реализации, X_1 выбран из Asn, Phe, Val, Gly, Ile, Leu, Lys, His или Arg;

X_2 выбран из Ala, Asn, His, Leu, Ser, Thr, Gly или Lys;

X_3 выбран из Ala, Phe, Ile, Ser, Pro, Thr, Gly или Lys; и/или

X_4 выбран из Ile, Leu, Gly, His, Arg, Asn, Ser, Lys, Thr или Gln;

при условии, что по меньшей мере один из X_1 или X_4 представляет собой остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере два из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты и/или остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере один из X_1 - X_4 представляет собой остаток Gly.

В предпочтительном варианте реализации, X_1 выбран из Asn, Gly, Ile, His или Arg;

X_2 выбран из Asn, Leu, Thr, Gly или Lys;

X_3 выбран из Phe, Pro, Ile, Ser, Thr, Gly или Lys; и/или

X_4 выбран из Gly, His, Asn, Ser, Lys, Thr или Gln;

5 при условии, что по меньшей мере один из X_1 или X_4 представляет собой остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере два из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты и/или остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере один из X_1 - X_4 представляет собой остаток Gly.

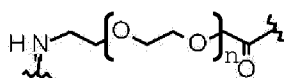
10 Пептиды по данному изобретению в соответствии с формулами (III)-(V), см. выше, могут содержать одну или более из следующих консервативных замен:

- остаток Asp в положении 15 пептида заменен на Glu;
- остаток Arg в положении 18 пептида заменен на Lys; и/или
- остаток Lys в положении 24 пептида заменен на Arg.

15 Пептиды по данному изобретению в соответствии с формулами (VI), выше, где Z-компонент пептида формулы (VI) представляет собой SQDLHRLSNNFGA или SQDLHRLQTYGAI, могут содержать одну или более из следующих консервативных замен:

- 20
- остаток Asp в положении 15 пептида заменен на Glu; и/или
 - остаток Arg в положении 18 пептида заменен на Lys.

Во всех аспектах данного изобретения линкер предпочтительно содержит остаток глутаминовой кислоты и/или линкер с аминокислотным олигоэтиленгликолем (ОЭГ),
 25 содержащий один аминокислотный ОЭГ или два, или более аминокислотных ОЭГ, связанных вместе, причем указанный аминокислотный ОЭГ представляет собой:

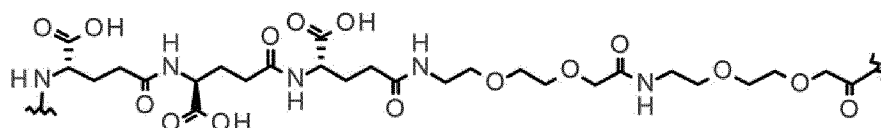
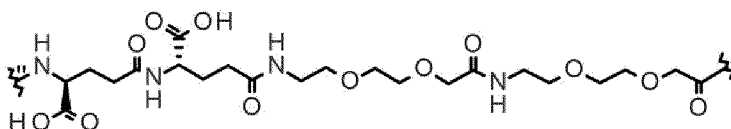
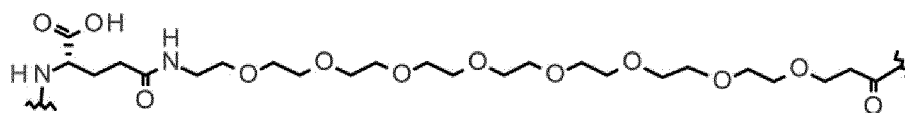
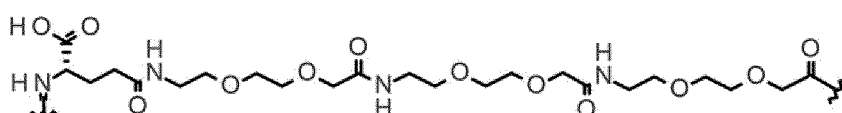
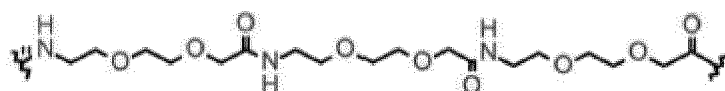
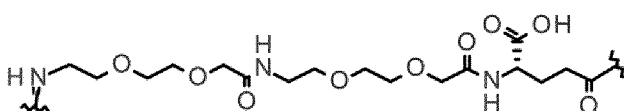
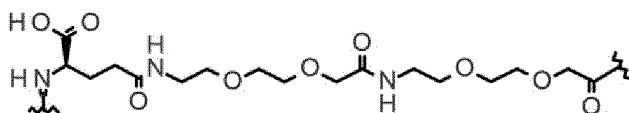
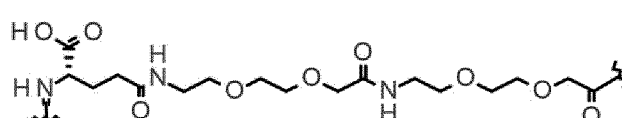
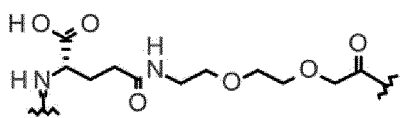
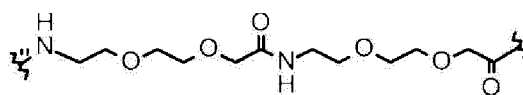
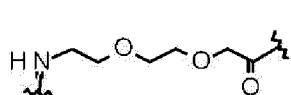


и где n равно от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 3,
 30 предпочтительно от 1 или 2, и наиболее предпочтительно 1.

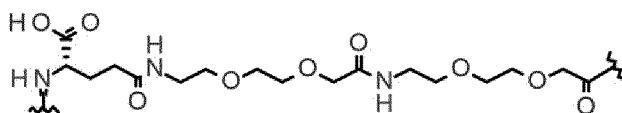
Линкер с аминокислотным ОЭГ может предпочтительно содержать один аминокислотный ОЭГ или от двух до шести аминокислотных ОЭГ, связанных вместе.

Более предпочтительно, линкер с аминокислотным ОЭГ содержит один аминокислотный ОЭГ или два-три аминокислотных ОЭГ, связанные вместе. Наиболее предпочтительно линкер с аминокислотным ОЭГ содержит два аминокислотных ОЭГ, связанных вместе.

Линкер с аминокислотным ОЭГ может дополнительно содержать один или более остатков глутаминовой кислоты, связанных с аминоконцом или с карбоксильным концом линкера с аминокислотным ОЭГ. Предпочтительно, линкер с аминокислотным ОЭГ выбран из любого одного из следующего:



Предпочтительно, линкер с аминокислотным ОЭГ представляет собой:

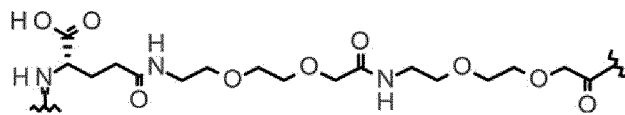


В предпочтительном варианте реализации, ацильная группа выбрана из жирной кислоты C₁₈ или жирной кислоты с более длинной цепью, жирной кислоты C₁₈ или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью, линкер-C₁₈ или жирной кислоты с более длинной цепью, или линкер-C₁₈, или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью. Предпочтительно, ацильная группа выбрана из любого одного из следующего:

C₁₈-C₃₀ жирной кислоты, предпочтительно C₁₈-C₂₂ жирной кислоты, C₁₈-C₃₀ жирной двухосновной кислоты, предпочтительно C₁₈-C₂₂ жирной двухосновной кислоты, линкер-C₁₈-C₃₀ жирной кислоты, предпочтительно линкер-C₁₈-C₂₂ жирной кислоты или линкер-C₁₈-C₃₀ жирной двухосновной кислоты, предпочтительно линкер-C₁₈-C₂₂ жирной кислоты.

Предпочтительно, C₁₈ жирная двухосновная кислота представляет собой октадекандиовую кислоту (CAS № 871-70-5).

В предпочтительном варианте реализации, **K_{Ac}** ацилирован линкер-жирной двухосновной кислотой, причем жирная двухосновная кислота представляет собой C₁₈-C₂₂ жирную двухосновную кислоту, а линкер представляет собой



. Предпочтительно, C₁₈ жирная двухосновная кислота представляет собой октадекандиовую кислоту.

Предпочтительно миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением выбран из любого одного из следующего:

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQELHRLQTYPKTDVGANAP

CSNLSTCVLG**K_{Ac}**LSQELHKLQTYPRTDVGANAP

CASLSTCVLG**K_{Ac}**LSQDLHKLQTFPKTDVGANAP

CGNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLNKFHTFPQTDVGANAP

CSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP

CGNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LTQDLNKFHTFPKTDVGANAP

5 CSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSNTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLSNNFGAILSSTNVGANAP

10 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYGAILSPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKILSSTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKGLITTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKNNFGTDVGANAP

15 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKRTTQTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTTNTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHGGQTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHKKNTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHKKHTDVGANAP

20 CSNLSTC(AiB)LGRLSQDLHR**K_{Ac}**QTYPKTDVGANAP

CSNLSTCMLGRLSQELHR**K_{Ac}**QTYPKTDVGANAP

где **K_{Ac}** является таким, как определено выше. Аминоостаток кислой аминокислоты в положении 8 вышеупомянутых пептидов, где это еще не так, необязательно замещен AiB.

Предпочтительно миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением
25 выбран из любого одного из следующего:

AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂

AcCGNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LTQDLNKFHTFPKTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTCVLG**K_{Ac}**LSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH₂

30 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQELHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂

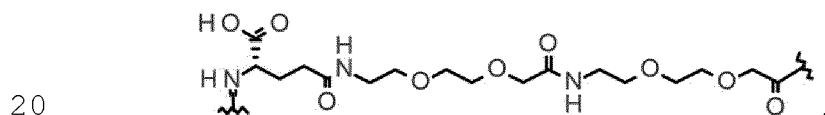
AcCASLSTCVLG**K_{Ac}**LSQDLHKLQTFPKTDVGANAP-NH₂

AcCGNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLNKFHTFPQTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSNTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLSNNFGAILSSTNVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYGAILSPKTDVGANAP-NH₂
 5 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKILSSTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKGLITTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKNNFGTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKRTTQTDVGANAP-NH₂
 10 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTTNTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHGGQTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHKKNTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHKKHTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP-NH₂
 15 AcCSNLSTC(AiB)LGRLSQDLHR**K_{Ac}**QTYPKTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLGRLSQELHR**K_{Ac}**QTYPKTDVGANAP-NH₂,

где **K_{Ac}** ацилирован линкер-жирной двухосновной кислотой, и причем жирная
 двухосновная кислота представляет собой жирную двухосновную кислоту C₁₈-C₂₂, а
 линкер представляет собой



Предпочтительно, жирная двухосновная кислота C₁₈ представляет собой
 октадекандиовую кислоту. Аминоостаток кислой аминокислоты в положении 8
 вышеупомянутых пептидов, где это уже не является случаем, необязательно замещен AiB.
 В указанных выше пептидах «Ac» указывает, что N-конец пептида ацетилирован, а «-
 25 NH₂» указывает, что C-конец пептида амидирован.

Миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением может быть
 составлен в композицию, предназначенную для энтерального введения. Например,
 миметик кальцитонина может быть включен в фармацевтическую композицию для
 перорального введения, содержащую частицы лимонной кислоты, покрытые оболочкой,
 30 причем частицы лимонной кислоты, покрытые оболочкой, увеличивают биодоступность
 пептида при пероральном введении. Альтернативно или в дополнение к этому миметик
 кальцитонина может быть составлен в предназначенную для перорального введения
 композицию с носителем. Типовой носитель может включать 5-CNAC, SNAD или SNAC.

Миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением также может быть составлен в композицию, предназначенный для парентерального введения. Например, миметик кальцитонина может быть составлен в композицию, предназначенную для инъекции.

- 5 Данное изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей миметик кальцитонина, как описано выше.

 Данное изобретение также относится к миметику кальцитонина, описанному выше, для применения в качестве лекарственного средства. В связи с этим миметик кальцитонина может использоваться при лечении сахарного диабета (I типа и/или II типа),
10 избыточной массы тела, чрезмерного потребления пищи, метаболического синдрома, ревматоидного артрита, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени, алкогольной жировой болезни печени, остеопороза или остеоартрита, плохо регулируемых уровней глюкозы в крови, плохо регулируемого ответа на глюкозотолерантный тест или плохо регулируемого потребления пищи. Миметик
15 кальцитонина также может быть введен в сочетании с метформином или другим сенсibilизатором инсулина.

 Пептиды в соответствии с данным изобретением могут быть ацилированы на своем N-конце или модифицированы иным образом для уменьшения положительного заряда первой аминокислоты и независимо от этого могут быть амидированы на своем C-конце.

20 Пептид может быть составлен в композицию для введения в качестве фармацевтического препарата и может быть составлен в композицию, предназначенную для энтерального или парентерального введения. Предпочтительными являются инъекционные композиции, предпочтительно для подкожной инъекции, однако пептид может быть составлен в предназначенную для перорального введения композицию с
25 носителем, и, при этом, необязательно носитель увеличивает биодоступность пептида при пероральном введении. Подходящие носители включают носители, содержащие 5-CNAC, SNAD или SNAC.

 Необязательно, пептид, составленный в фармацевтическую композицию для перорального введения, содержащую частицы лимонной кислоты, покрытые оболочкой, и
30 причем частицы лимонной кислоты, покрытые оболочкой, увеличивают биодоступность пептида при пероральном введении.

 Данное изобретение включает пептид в соответствии с данным изобретением, предназначенный для использования в качестве лекарственного средства. Пептид может

применяются при лечении сахарного диабета (I типа и/или II типа), избыточной массы тела, чрезмерного потребления пищи, метаболического синдрома, ревматоидного артрита, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени, алкогольной жировой болезни печени, остеопороза или остеоартрита, плохо

регулируемых уровней глюкозы в крови, плохо регулируемого ответа на глюкозотолерантный тест или плохо регулируемого потребления пищи. В частности, пептиды могут использоваться для понижения нежелательно высокого уровня глюкозы в крови натощак или для понижения нежелательно высокого HbA1c, или для понижения нежелательно высокого ответа на глюкозотолерантный тест. Пептиды в соответствии с данным изобретением также могут использоваться для понижения уровня триглицеридов в печени и/или для уменьшения накопления жира в печени субъекта.

Пептиды в соответствии с данным изобретением могут быть получены с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники для получения пептидов, такого как синтетические (химические) и рекомбинантные технологии. Предпочтительно пептиды получают с помощью синтетических способов. Синтез искусственных пептидов хорошо известен в данной области техники и включает (но не ограничивается этим) твердофазный синтез пептидов с использованием различных стратегий защитных групп (например, с использованием Fmoc, Boc, Bzl, трет-Bu и т.д.).

В некоторых вариантах реализации, N-концевой участок миметиков кальцитонина, обсуждаемых выше, модифицируется для уменьшения положительного заряда первой аминокислоты. Например, ацетильная, пропионильная или сукцинильная группа может быть замещена на цистеин-1. Альтернативные пути уменьшения положительного заряда включают, но не ограничиваются этим, пэгилирование на основе полиэтиленгликоля или добавление другой аминокислоты, такой как глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота, на N-конце. Альтернативно, к N-концу пептидов, обсуждаемых выше, могут быть добавлены другие аминокислоты, включая, но не ограничиваясь этим, лизин, глицин, формилглицин, лейцин, аланин, ацетилаланин и диаланил. Специалистам в данной области техники понятно, что пептиды, имеющие множество остатков цистеина, часто образуют дисульфидный мостик между двумя такими остатками цистеина. Все указанные в данном документе пептиды определяются как необязательно включающие один или более таких дисульфидных мостиков, в частности в положениях Cys1-Cys7. В подражание этого, цистеины в положениях 1 и 7 могут совместно быть заменены на α -аминосубериновую кислоту. Хотя миметики кальцитонина в соответствии с данным изобретением могут существовать в форме свободной кислоты, предпочтительно, чтобы

С-концевая аминокислота была амидирована. Заявители предполагают, что такое амидирование может способствовать эффективности и/или биодоступности пептида. Для амидирования С-концевой аминокислоты могут быть использованы синтетические химические способы. Другой способ производства амидированных версий миметиков кальцитонина в соответствии с данным изобретением заключается во взаимодействии предшественников (содержащих глицин вместо С-концевой аминокислоты желаемого амидированного продукта) в присутствии пептидилглицин альфа-амидирующей монооксигеназы в соответствии с известными способами, причем предшественники превращаются в амидированные продукты в реакциях, описанных, например, в США 4708934, EP0308067 и EP0382403.

Получение амидированных продуктов также может осуществляться с использованием способа и амидирующего фермента, представленного Consalvo и др. в США 7445911; Miller et al, US2006/0292672; Ray et al, 2002, Protein Expression and Purification, 26:249-259; и Mehta, 2004, Biopharm. International, July, pp. 44-46.

Получение предпочтительных амидированных пептидов может осуществляться, например, путем получения удлиненного глицином предшественника в *E. coli* в виде растворимого слитого белка с глутатион-S-трансферазой или путем прямой экспрессии предшественника в соответствии с методикой, описанной в США 6103495. Такой удлиненный глицином предшественник имеет молекулярную структуру, идентичную желаемому амидированному продукту за исключением фрагмента на С-конце (где продукт заканчивается фрагментом --X--NH₂, тогда как предшественник заканчивается --X-gly, X является С-концевым аминокислотным остатком продукта). Альфа-амидированный фермент, описанный в вышеуказанных публикациях, катализирует превращение предшественников в продукт. Такой фермент предпочтительно получают рекомбинантным способом, например, в клетках яичника китайского хомячка (CHO), как описано в цитированных выше статьях, опубликованных в Biotechnology and Biopharm.

Пептидные активные агенты в соответствии с данным изобретением в форме свободных кислот могут быть получены подобным образом, за исключением отсутствия включения С-концевого глицина в «предшественник», при этом предшественник является альтернативой окончательного пептидного продукта и не требует стадии амидирования.

За исключением случаев, когда оговорено особо, предпочтительная дозировка миметиков кальцитонина в соответствии с данным изобретением полностью аналогична, как для терапевтической, так и для профилактической цели. Желательные дозировки более подробно обсуждаются ниже и различаются в зависимости от способа введения.

За исключением случаев, когда указано иное или когда очевидно из контекста, дозировки в данном описании относятся к массе активных соединений (т.е. миметиков кальцитонина), не изменяющихся под действием или без учета фармацевтических вспомогательных веществ, разбавителей, носителей или других ингредиентов, несмотря на то, что такие дополнительные ингредиенты при желании входят в состав. Любая лекарственная форма (капсула, таблетка, инъекция или тому подобное), обычно используемые в фармацевтическом производстве для доставки пептидных активных агентов, подходят для использования в данном случае, и при этом термины «вспомогательное вещество», «разбавитель» или «носитель» включают такие неактивные ингредиенты, которые, как правило, входят в состав вместе с активными ингредиентами в такие лекарственные формы при производстве. Предпочтительная пероральная лекарственная форма обсуждается более подробно ниже, однако, она не должна рассматриваться как исключительный способ введения активных агентов в соответствии с данным изобретением.

Миметики кальцитонина в соответствии с данным изобретением могут вводиться для лечения целого ряда заболеваний и нарушений у пациента. Термин «пациент», в контексте данного документа, означает любой организм, принадлежащий к царству животных. В одном варианте реализации термин «пациент» относится к позвоночным, более предпочтительно к млекопитающим, включая человека.

Соответственно, данное изобретение включает применение пептидов при лечении сахарного диабета I типа, сахарного диабета II типа или метаболического синдрома, ожирения или подавления аппетита, или для снижения резистентности к инсулину, или для уменьшения нежелательно высокого уровня глюкозы в сыворотке крови натошак, или для уменьшения нежелательно высокого уровня глюкозы в сыворотке крови, или для уменьшения нежелательно высокого уровня инсулина в сыворотке, или для уменьшения нежелательно сильного ответа на глюкозотолерантный тест, или для лечения остеопороза, или для лечения остеоартрита, или для лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), или для лечения алкогольной жировой болезни печени, или для снижения триглицеридов в печени, или для уменьшения накопления жира в печени субъекта.

В данной области техники существует ряд принятых систем измерений диапазона нормальных значений массы тела с учетом ряда факторов, таких как пол, возраст и рост. Пациент, нуждающийся в режимах лечения или профилактики, изложенных в данном документе, включает пациентов, масса тела которых превышает признанные нормы, или у которых, вследствие наследственности, факторов окружающей среды или другого

общепризнанного фактора риска, имеется более высокий риск приобретения избыточной массы тела или ожирения, чем у всей популяции. В соответствии с данным изобретением предполагается, что миметики кальцитонина могут использоваться для лечения сахарного диабета, в том случае, когда контроль за массой тела является вопросом осуществления

5 лечения.

В одном варианте реализации способ включает энтеральное введение пациенту, нуждающемуся в этом, для лечения указанного состояния, фармацевтически эффективного количества любого одного из описанных в данном документе пептидов.

В одном варианте реализации способ включает парентеральное введение пациенту, нуждающемуся в этом, для лечения указанного состояния, фармацевтически

10 эффективного количества любого одного из описанных в данном документе пептидов.

Для парентерального введения (включая внутрибрюшинную, подкожную, внутривенную, внутрикожную или внутримышечную инъекцию) могут использоваться, например,

15 растворы пептида в соответствии с данным изобретением или в кунжутном, или в

арахисовом масле, или в водном пропиленгликоле. При необходимости водные растворы должны быть соответствующим образом забуферены, а жидкий разбавитель сначала приводят в изотоническое состояние. Эти водные растворы являются подходящими для внутривенных инъекций. Масляные растворы пригодны для внутрисуставных, внутримышечных и подкожных инъекций. Приготовление всех этих растворов в

20 стерильных условиях легко осуществляется с помощью общепринятых фармацевтических

способов, хорошо известных специалисту в данной области техники. Примеры подходящих для парентерального применения препаратов включают растворы, предпочтительно масляные или водные растворы, а также суспензии, эмульсии или имплантаты, включая суппозитории. Пептиды могут входить в состав стерильной формы,

25 содержащей несколько доз или однократную дозу, например, будучи диспергированными в жидком носителе, таком как стерильный физиологический раствор или 5% солевые растворы с декстрозой, обычно используемые в сочетании с инъекционными лекарственными средствами.

Указанный способ может включать предварительную стадию установления,

30 страдает ли пациент от указанного состояния, и/или следующую стадию определения насколько указанное лечение является эффективным для облегчения состояния у указанного пациента, например, в каждом случае проведение перорального теста на толерантность к глюкозе или теста на уровень сахара в крови в покое.

Пероральные энтеральные композиции предназначены для потребления путем проглатывания с целью последующего высвобождения в кишечнике, ниже желудка, и, следовательно, доставки через воротную вену в печень, в противоположность композициям, которые должны находиться во рту, чтобы попасть в кровоток после подъязычного или щечного рассасывания

Подходящие для использования в данном изобретении лекарственные формы включают таблетки, мини-таблетки, капсулы, гранулы, пеллеты, порошки, шипучие твердые и жевательные твердые композиции. Такие композиции могут включать желатин, который предпочтительно является гидролизованным желатином или желатином с низкой молекулярной массой. Такие композиции могут быть получены с помощью лиофильной сушки гомогенного водного раствора, содержащего миметик кальцитонина и гидролизованный желатин, или низкомолекулярный желатин, и последующей обработки полученного твердого вещества до получения указанной фармацевтической композиции для перорального приема, и при этом желатин может иметь среднюю молекулярную массу от 1000 до 15000 дальтон. Такие композиции могут включать протективное соединение-носитель, такое как 5-CNAC или другие, как описано в данном документе.

В то время как пероральные композиции, такие как таблетки и капсулы, являются предпочтительными, композиции, предназначенные для применения в данном изобретении, могут также иметь форму сиропов, эликсиров или тому подобного, и суппозиторий или тому подобного. Пероральная доставка обычно является предпочтительным способом доставки, поскольку этот способ является удобным, относительно простым и в большинстве случаев безболезненным, что дает в результате лучшее соблюдение режима лечения пациентами по сравнению с другими способами доставки. Однако, биологический, химический и физический барьеры, такие как изменение значения pH в желудочно-кишечном тракте, сильные пищеварительные ферменты и непроницаемые для активных агентов гастроинтестинальные оболочки, делают проблематичной пероральную доставку кальцитонин-подобных пептидов млекопитающим, например, подтверждено, что пероральная доставка кальцитонинов, которые являются длинноцепочечными полипептидными гормонами, секретируемыми парафолликулярными клетками щитовидной железы у млекопитающих и ульtimoбранхиальной железой у птиц и рыб, исходно затруднена, по меньшей мере отчасти, вследствие недостаточной стабильности кальцитонина в желудочно-кишечном тракте, а также неспособности кальцитонина легко транспортироваться через кишечные стенки в кровоток.

Однако, композиции, подходящие для перорального приема, описываются ниже.

Лечение пациентов

В одном варианте реализации, миметик кальцитонина согласно данного изобретения в соответствующей дозировке для сохранения уровней миметика в сыворотке

5 пациентов в пределах от 5 пикограмм до 1000 нанограмм на миллилитр, предпочтительно в пределах от 50 пикограмм до 500 нанограмм, например, от 1 до 300 нанограмм на миллилитр. Уровни в сыворотке могут быть измерены с помощью любых подходящих методов, известных в данной области техники, таких как радиоиммунный анализ или масс-спектрометрия. Лечащий врач может контролировать ответ пациента и затем

10 изменять дозировку, чтобы обеспечить метаболизм и ответ у отдельного пациента. Практически одновременное высвобождение лучше всего достигается путем введения всех компонентов в соответствии с данным изобретением в виде одной пиллюли или капсулы. Однако, данное изобретение также включает, например, разделение

15 необходимого количества миметика кальцитонина между двумя или более таблетками, или капсулами, которые могут вводиться вместе, так что они совместно обеспечивают необходимое количество ингредиентов. «Фармацевтическая композиция», в контексте данного документа, включает, но не ограничивается этим, полную дозировку, подходящую для конкретного введения пациенту, независимо от того, одна или более

20 таблеток, или капсул (или других лекарственных форм) рекомендуются при данном введении.

Миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением может быть заключен в композицию для перорального введения с применением способов, использованных в продуктах Unigene Enteripep®. Включаются способы, описанные в патенте США № 5912014, патенте США № 6086918, патенте США № 6673574, патенте

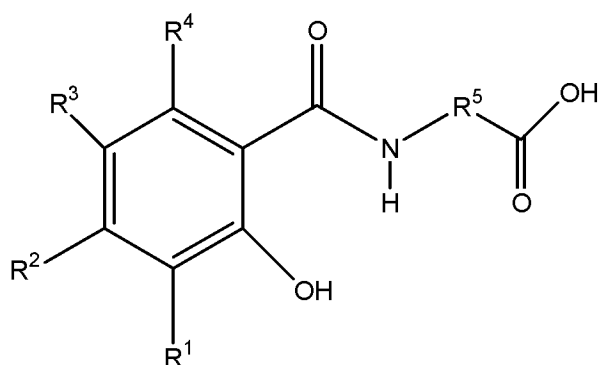
25 США № 7316819, патенте США № 8093207 и публикации США № 2009/0317462. В частности, возможно использование конъюгации соединения с мембранным транслокатором, таким как домен белковой трансдукции белка HIV TAT, заключение в композицию вместе с одним или более ингибиторами протеазы и/или с агентом, понижающим значение pH, на который может быть нанесено покрытие и/или защитным

30 кислотоустойчивым носителем, и/или усилителем абсорбции, который может представлять собой поверхностно-активное вещество.

В одном варианте реализации, миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением составляется в композицию предпочтительно для пероральной доставки известным способом, как в патентной публикации США 2009/0317462.

В одном варианте реализации, миметик кальцитонина в соответствии с данным изобретением может заключаться в состав для энтерального, в частности перорального, введения смеси с подходящим соединением-носителем. Подходящие соединения-носители включают соединения, описанные в патенте США 5773647 и патенте США 5866536 и среди них особенно эффективным является 5-CNAC (N-(5-хлорсалицилоил)-8-аминокаприловая кислота, обычно в виде ее динатриевой соли). Другими предпочтительными носителями или средствами доставки являются SNAD (натриевая соль 10-(2-гидроксibenзамидо)декановой кислоты) и SNAC (натриевая соль N-(8-[2-гидроксibenзоил]амино)каприловой кислоты). В одном варианте реализации, фармацевтическая композиция в соответствии с данным изобретением содержит эффективное для доставки количество носителя, такого как 5-CNAC, то есть количества, достаточного для доставки соединения, необходимого для достижения желательного эффекта. Обычно, такой носитель, как 5-CNAC присутствует в количестве от 2,5% до 99,4% по массе, более предпочтительно от 25% до 50% по массе от всей композиции.

Кроме того, в WO 00/059863 раскрываются динатриевые соли формулы I



где

R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо представляют собой водород, -OH, -NR⁶R⁷, галоген, C₁-C₄ алкил или C₁-C₄ алкокси;

R^5 представляет собой замещенный или незамещенный C₂-C₁₆ алкилен, замещенный или незамещенный C₂-C₁₆ алкенилен, замещенный или незамещенный C₁-C₁₂ алкил (арилен) или замещенный или незамещенный арил(C₁-C₁₂ алкилен); и R^6 , и R^7 независимо представляют собой водород, кислород или C₁-C₄ алкил; и их гидраты и сольваты, как особенно эффективные для пероральной доставки активных агентов, таких как кальцитонины, например, кальцитонин лосося, и они могут использоваться в данном изобретении.

Предпочтительные кишечнорастворимые композиции, необязательно с использованием микронизированного 5-CNAC, могут быть в основном такими, как описано в WO2005/014031.

5 Соединение может быть заключено в композицию для перорального введения с помощью способов, использованных в продукте Capsitonin от компании Bone Medical Limited. Они могут включать способы, как в композициях Axcress. Конкретнее, активный ингредиент может быть инкапсулирован в капсулу с энтеросолюбильным покрытием, способным выдерживать прохождение через желудок. Капсула может содержать активное соединение вместе с веществом, усиливающим абсорбцию гидрофильного
10 ароматического спирта, например, как описано в WO02/028436. Известно, что энтеросолюбильное покрытие может становиться проницаемым в зависимости от значения pH, например, при значении pH от 3 до 7. В WO2004/091584 также описываются подходящие способы создания композиций с использованием ароматического спирта-усилителя абсорбции.

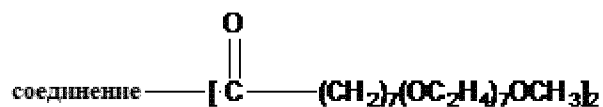
15 Данное соединение может быть создано с помощью способов, используемых в продуктах Oramed, которые могут включать композицию с омега-3 жирной кислотой, как показано в WO2007/029238 или как описано в США 5102666.

В общем, могут использоваться фармацевтически приемлемые соли (в частности моно- или динатриевые соли), сольваты (например, спиртовые сольваты) и гидраты этих
20 носителей или средства доставки.

Пероральное введение фармацевтических композиций по данному изобретению может осуществляться регулярно, например, один или более раз в день или в неделю; периодически, например, нерегулярно в течение дня или недели; или циклически, например, регулярно в течение нескольких дней или недель, с последующим периодом без
25 введения. Лекарственная форма фармацевтических композиций, раскрываемых в данном документе вариантов реализации, может быть любой известной формой, например, жидкой или твердой лекарственной формой. Жидкие лекарственные формы включают растворы, эмульсии, суспензии, сиропы и эликсиры. Кроме активного соединения и носителя, такого как 5-CNAC, жидкие композиции также могут включать инертные
30 вспомогательные вещества, обычно используемые в данной области техники, например, солюбилизующие вещества, например, этанол; масла, такие как хлопковое, касторовое и кунжутное масло; смачивающие вещества; эмульгирующие вещества; суспендирующие вещества; подсластители; ароматизирующие вещества и растворители, такие как вода. Твердые лекарственные формы включают капсулы, мягкие желатиновые капсулы,

таблетки, капсуловидные таблетки, порошки, гранулы или другие твердые лекарственные формы для перорального приема, все из которых могут быть получены с помощью хорошо известных в данной области техники способов. Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать вспомогательные вещества в обычно используемых количествах включая, но не ограничиваясь этим, вещество, регулирующее значение pH, консервант, ароматизатор, вещество, исправляющее вкус, ароматизирующее вещество, увлажняющее вещество, тонизирующий агент, краситель, поверхностно-активное вещество, смягчающее вещество, смазывающее вещество, такое как стеарат магния, вещество для повышения текучести, добавку для прессования, солубилизатор, наполнитель, разбавитель, такой как микрокристаллическая целлюлоза, например, Avicel PH 102, поставляемый корпорацией FMC, или любую их комбинацию. Другие добавки могут включать фосфатно-буферные соли, лимонную кислоту, гликоли и другие диспергирующие средства. Данная композиция также может включать один или более ингибиторов ферментов, таких как актинонин или эпиактинонин и их производные; апротинин, трасилол и ингибитор Бовмана-Бирка. Кроме того, ингибитор транспорта, т.е. [rho]-гликопротеин, такой как кетопрофин, может присутствовать в композициях в соответствии с данным изобретением. Твердые фармацевтические композиции текущего раскрытия могут быть получены с помощью общеизвестных способов, например, путем смешивания смеси активного соединения, носителя, такого как 5-CNAC, и любых других ингредиентов, перемешивания и заполнения капсул или, вместо наполнения капсул, формования с последующим таблетированием или прессованием в форме с получением таблеток. Кроме того, с помощью известных способов может быть получена твердая дисперсия, с последующей дополнительной обработкой с целью получения таблетки или капсулы. Предпочтительно, ингредиенты в фармацевтических композициях данного раскрытия являются равномерно или однородно смешанными по всей твердой лекарственной форме.

Альтернативно, активное соединение может быть заключено в композицию в виде конъюгата с указанным носителем, который может быть олигомером, как описано, например, в US2003/0069170.



Такие конъюгаты могут вводиться в комбинации с жирной кислотой и солью желчной кислоты, как описано в данном документе.

Могут применяться конъюгаты с полиэтиленгликолем (ПЭГ), как описано, например, в работе Mansoor и соавторов.

Альтернативно, активные соединения могут быть смешаны с нитрозо-N-ацетил-D,L-пеницилламином (SNAP) и раствором карбопола или с таурохолатом и раствором карбопола для получения мукоадгезивной эмульсии.

Активное соединение может быть составлено в композицию с помощью загрузки в нанокапсулы из хитозана, как раскрывается в работе Prego et al (необязательно, модифицированные ПЭГ, как в работе Prego Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Alonso MJ.) или покрытые хитозаном или ПЭГ липидные наночастицы, как раскрывается в работе Garcia-Fuentes и соавт. Наночастицы хитозана для этой цели могут быть модифицированы иминотиолом, как описано в работе Guggi и соавт. Они могут входить в состав эмульсий вода/масло/вода, как описано в работе Dogru и соавт. Биодоступность активных соединений может быть увеличена использованием тауродезоксихолата или лауроилкарнитина, как описано в работе Sinko и соавт. или в работе Song и соавт. В целом, пригодные в качестве носителей наночастицы обсуждаются в работе de la Fuente и соавт. и могут использоваться в данном изобретении.

Другие подходящие стратегии для композиций, предназначенных для перорального применения, включают использование системы временного усилителя проницаемости (TPE), описанной в WO 2005/094785 от компании Chiasma Ltd. TPE использует масляную суспензию твердых гидрофильных частиц в гидрофобной среде для защиты молекулы лекарственного средства от инактивирования агрессивной окружающей средой желудочно-кишечного (GI) тракта и в то же самое время оказывает воздействие на стенку GI, индуцируя проникновение доставляемых молекул лекарственного средства.

Кроме того, включается использование глутатиона или соединений, содержащих многочисленные тиоловые группы, как описано в US 2008/0200563, для ингибирования работы выкачивающих насосов в мембранах клеток слизистой оболочки. Примеры практического осуществления таких способов также описаны в Caliceti, P. Salmaso, S., Walker, G. and Bernkop-Schnürch, A. (2004) 'Development and in vivo evaluation of an oral insulin-PEG delivery system.' Eur. J. Pharm. Sci., 22, 315-323, в Guggi, D., Krauland, A.H., and Bernkop-Schnürch, A. (2003) 'Systemic peptide delivery via the stomach: in vivo evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin'. J. Control. Rel. 92,125-135, и в Bernkop-Schnürch, A., Pinter, Y., Guggi, D., Kahlbacher, H., Schöffmann, G., Schuh, M., Schmerold, I., Del Curto,

M.D., D'Antonio, M., Esposito, P. and Huck, Ch. (2005) 'The use of thiolated polymers as carrier matrix in oral peptide delivery'-Proof of concept. J. Control. Release, 106, 26-33.

Активное соединение может быть заключено в бесшовные микросферы, как описано в WO 2004/084870, где активный фармацевтический ингредиент
5 солюбилизируется в виде эмульсии, микроэмульсии или суспензии, помещается внутрь мини-сфер; и покрывается различными покрытиями либо с помощью общепринятых, либо новых технологий нанесения покрытий. Результатом является инкапсулированное лекарственное средство в «предварительно солюбилизированной» форме, что при пероральном введении обеспечивает заранее заданное немедленное или длительное
10 высвобождение активного лекарственного средства в точно определенных местоположениях и с определенными скоростями на всем протяжении желудочно-кишечного тракта. В сущности, предварительная солюбилизация лекарственного средства повышает предсказуемость его кинетического профиля, одновременно повышает проницаемость и стабильность лекарственного средства.

15 Можно использовать покрытые хитозаном нанокapsулы, как описано в US2009/0074824. Введенная с помощью этой технологии активная молекула является защищенной, находясь внутри нанокapsул, поскольку они являются устойчивыми к действию желудочного сока. Кроме того, мукоадгезивные свойства системы увеличивают время адгезии к стенкам кишечника (было установлено, что существует задержка при
20 транзите по желудочно-кишечному тракту этих систем), способствуя более эффективной абсорбции активной молекулы.

Могут использоваться способы, разработанные компанией TSRI Inc. Эти способы включают технологию гидрофильной солюбилизации (HST), в которой желатин, природный экстракт коллагена, несущий как положительные, так и отрицательные
25 заряды, покрывает частицы активного ингредиента, содержащегося в лецитиновых мицеллах, и предотвращает их агрегацию или слипание. Это приводит к улучшенной смачиваемости частиц гидрофобного лекарственного средства за счет полярных взаимодействий. Кроме того, амфифильный лецитин снижает поверхностное натяжение между растворяющей жидкостью и поверхностью частиц.

30 Активный ингредиент может быть заключен в композицию с кукурбитурилами в качестве наполнителей.

Альтернативно, может применяться технология GIPET компании Merriion Pharmaceuticals для получения таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, содержащих активный ингредиент с усилителем всасывания, который может представлять

собой жирную кислоту со средней длиной цепи или производное жирной кислоты со средней длиной цепи, как описано в США 2007/0238707, или транслоцируемый через мембрану пептид, как описано в США 7268214.

Можно применять технологию GIRES™, которая состоит из лекарственной формы с контролируемым высвобождением внутри надуваемого мешка, который помещается в капсулу с лекарственным средством для перорального введения. После растворения капсулы газогенерирующая система надувает мешок в желудке. В клинических испытаниях было показано, что мешок остается в желудке в течение 16-24 часов.

Альтернативно, активное соединение может быть конъюгировано с защитным модификатором, что позволяет ему противостоять ферментативной деградации в желудке и облегчает его всасывание. Активное соединение может быть ковалентно конъюгировано с монодисперсным производным короткоцепочечных метоксиполиэтиленгликоль гликолипидов, которое кристаллизуется и лиофилизируется в сухой активный фармацевтический ингредиент после очистки. Такие способы описаны в США 5438040 и на сайте www.biocon.com.

Для доставки активного соединения также может применяться везикула, нацеленная на печень (HDV). HDV может состоять из липосом (диаметр ≤ 150 нм), инкапсулирующих активное соединение, которые также содержат в своем липидном бислое молекулу, нацеленную на гепатоциты. Нацеливающая молекула направляет доставку инкапсулированного активного соединения в клетки печени, вследствие чего для обеспечения эффекта требуется относительно небольшое количество активного соединения. Такая технология описана в США 2009/0087479 и дополнительно на сайте www.diasome.com.

Активное соединение может быть включено в композицию, дополнительно содержащую в основном неводную гидрофильную среду, включающую спирт и сорастворитель в сочетании с неполным глицеридом со средней длиной цепи, необязательно в смеси с длинноцепочечными видами ПЭГ, как описано в США 2002/0115592 в отношении инсулина.

Альтернативно, можно применять кишечные пластыри, как описано в работе Shen Z, Mitragotri S, Pharm Res. 2002 Apr;19(4):391-5 'Intestinal patches for oral drug delivery'.

Активное соединение может быть включено в размываемую матрицу, образованную из гидрогеля, смешанного с гидрофобным полимером, как описано в патенте США № 7189414.

5 Подходящие дозировки для перорального приема при лечении взрослых людей могут находиться в пределах от 0,05 до 5 мг, предпочтительно около от 0,1 до 2,5 мг.

Частота приема дозировки пациентами может составлять от одного до четырех раз в неделю, предпочтительно один-два раза в неделю и наиболее предпочтительно один раз в неделю. Желательно, чтобы лечение продолжалось в течение длительного периода времени, составляющего по меньшей мере 6 недель, предпочтительно, по меньшей мере 6
10 месяцев, предпочтительно, по меньшей мере год и необязательно в течение всей жизни.

Комбинированное лечение при соответствующих состояниях может проводиться с применением композиции согласно данному изобретению и с отдельным введением одного или более других терапевтических средств. Альтернативно, композиция согласно
данному изобретению может включать одно или более других терапевтических средств
15 для совместного введения.

Комбинированное лечение по данному изобретению включает комбинации активного соединения, как описано, с инсулином, GLP-2, GLP-1, GIP или амилином или, как правило, с другими антидиабетическими средствами. Таким образом, комбинированное лечение, включая применение совместных композиций, может
20 проводиться с применением агентов, увеличивающих чувствительность к инсулину, включая бигуаниды, такие как метформин, буформин и фенформин, TZD (PPAR), такие как балаглитазон, пиоглитазон, ривоглитазон, росиглитазон и троглитазон, двойные агонисты PPAR, такие как алеглитазар, мураглитазар и тезаглитазар, или стимуляторы секреции, включая препараты сульфонилмочевины, такие как карбутамид, хлорпропамид,
25 гликлазид, толбутамид, толазамид, глипизид, глибенкламид, глибурид, гликвидон, гликлопирамид и глимепририд, меглитиниды/глиниды (K⁺), такие как натеглинид, репаглинид и митиглинид, аналоги GLP-1, такие как эксенатид, ликсисенатид, лираглутид, семаглутид, дулаглутид и албиглутид, ингибиторы DPP-4, такие как алоглиптин, линаглиптин, саксаглиптин, ситаглиптин и вилдаглиптин, аналоги инсулина или
30 специальные композиции, такие как (быстрого действия) инсулин лиспро, инсулин аспарт, инсулин глулизин, (длительного действия) инсулин гларгин, инсулин детемир), вдыхаемый инсулин-эклубра и NPH инсулин, и другие, включая ингибиторы альфа-глюкозидазы, такие как акарбоза, миглитол и воглибоза, аналоги амилина, такие как прамлинтид, ингибиторы SGLT2, такие как дапаглифлозин, эмпаглифлозин,

ремоглифлозин и серглифлозин, а также прочие агенты, включая бенфлуорекс и толрестат.

Дополнительные комбинации включают совместное введение или совместное заключение в состав с лептинами. Резистентность к лептину является точно

- 5 установленным компонентом сахарного диабета 2 типа; однако, инъекции лептина до настоящего времени оказывались неспособными улучшить это состояние. В противоположность этому, существуют доказательства, подтверждающие, что амилин и, следовательно, молекулы с амилинподобными свойствами, такие как миметики кальцитонина лосося, способны улучшать чувствительность к лептину. Комбинация
- 10 амилин/лептин оказывает синергическое действие на массу тела и потребление пищи, а также резистентность к инсулину [Kusakabe T et al].

Еще одна предпочтительная комбинированная терапия включает совместное составление в композицию или совместное введение пептидов в соответствии с данным изобретением с одним или более лекарственным средствами для снижения массы тела. Такие

- 15 лекарственные средства для снижения массы тела включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы липазы (например, ингибиторы липазы поджелудочной железы, такие как орлистат), производные амфетамина, подавляющие аппетит (например, фентермин), топирамат, Qysmia® (комбинация фентермина/топирамата), агонисты рецепторов 5-HT_{2C} (например, локасерин), Contrave® (комбинация налтрексона/бупропиона), аналоги и
- 20 производные глюкагоноподобного пептида-1 [GLP-1] (например, лираглутид, семаглутид), ингибиторы Ca²⁺ АТФазы (например, SERCA) сарко/эндоплазматического ретикула (SR) (например, сарколипин), агонисты рецептора фактора роста фибробластов 21 [FGF-21] (например, аналоги FGF-21) и агонисты β₃-адренорецептора (например, мирабегрон). Такие комбинации могут применяться для лечения состояния
- 25 избыточной массы тела, например, ожирения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

- Фиг. 1:** Сравнение КВР346, КВР347, КВР349, КВР351, КВР352, КВР353 и КВР089 по потреблению пищи и массе тела. А) Потребление пищи, 0-4 часа. В) Изменение массы
- 30 тела, 4 часа. С) Потребление пищи, 4-24 часа. D) Изменение массы тела, 24 часа. Е) Потребление пищи, 24-49 часа. F) Изменение массы тела, 48 часов.

Фиг. 2: Испытание однократной дозы КВР375, КВР376 и КВР377. Однократная доза вводилась при $t = 0$, и эффект на потребление пищи и массу тела однократной дозы 36 нмоль/кг каждой молекулы отслеживали в течение 168 часов и проводили прямое

сравнение с неацилированным стандартом. А) Потребление пищи. В) Изменение массы тела.

Фиг. 3: Испытание зависимости доза-эффект КВР356, КВ358, КВР362, КВР364, КВ368 и КВР370. Однократная доза вводилась при $t = 0$, и эффект на потребление пищи и массу тела однократной дозы 36 нмоль/кг каждой молекулы отслеживали в течение 168 часов. А-В) Потребление пищи и масса тела ацилированных вариантов КВР-066. С-D) Потребление пищи и масса тела ацилированных вариантов КВР-062. Е-F) Потребление пищи и масса тела ацилированных вариантов КВР-110.

Фиг. 4: Эффект однократной высокой дозы КВР372 и КВР356 на потребление пищи и массу тела. А) КВР-042А11.03 (КВР372) эффект на потребление пищи. В) КВР-042А11.03 (КВР372) эффект на массу тела. С) КВР-066А11.03 (КВР356) эффект на потребление пищи. D) КВР-066А11.03 (КВР356) эффект на массу тела.

Фиг. 5: 4-часовое исследование потребление пищи для КВР350.

Фиг. 6: Суммарное потребление пищи. А) Суммарное потребление пищи с течением времени. Потребление пищи контролируется один раз в день в течение первых 21 дней исследования. $n=3-4$ клетки. $\pm$ SEM. В) Общая площадь под кривой данных, представленных на Фигуре 9А. $n = 9-10$. $\pm$ SEM.

Фиг. 7: Масса тела крыс ZDF во время исследования. А) Масса тела отдельных крыс в граммах В) Масса тела, приведенная к носителю, в процентах. Масса тела регистрируется ежедневно в течение первых 21 дней, затем дважды в неделю до одной недели до окончания исследования (день 62). Массу тела группы КВР-066А11.03 контролировали ежедневно до одной недели до окончания исследования (62-й день). $n=9-10$ крыс. $\pm$ SEM.

Фиг. 8: Уровень глюкозы в крови натощак у ZDF. Уровень глюкозы в крови натощак измеряли через 6 часов голодания на 0, 14, 28, 42 и 62 день после начала исследования. $n=9-10$. $\pm$ SEM.

Фиг. 9: Значения ZDF HbA1c. А) уровень HbA1c на исходном уровне. В) уровень HbA1c в конце исследования. Уровень HbA1c измеряется на -3 день от начала исследования. Уровень HbA1c измеряют в конце исследования, на 62-й день. $n=9-10$. $\pm$ SEM.

Фиг. 10: Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ). А) ПГТТ более 180 мин у самцов крыс ZDF. В) Общая площадь под кривой во время ПГТТ, проиллюстрированная на А). ПГТТ выполняли после 8 недель лечения. Крыс не кормили в течение 11 часов до момента времени -30 минут. Уровни глюкозы в крови измеряли в момент времени -30, 0, 15, 30, 60, 120 и 180 минут. Глюкозу вводили перорально в момент времени 0 минут. Значения глюкозы в крови выше $33,3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ назначали верхним пределом

обнаружения; $33,3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Крысам не вводили предварительную дозу физиологического раствора или KBP-066 или KBP-066A в тот же день. $n=9-10$. $\pm$ SEM.

Фиг. 11: Испытание однократной дозы KBP-305, KBP-306, KBP-307, KBP-356, KBP-381, KBP-382 и KBP-383. Однократная доза вводилась при $t=0$, и эффект на потребление пищи и массу тела однократной дозы 3 нмоль/кг каждой молекулы отслеживали в течение 96 часов и проводили прямое сравнение друг с другом и с носителем для определения оптимальной длины ацилирования. А) Краткосрочное потребление пищи в граммах (г). В) Изменение массы тела в граммах (г). $n=4$ крыс на группу. Данные в виде $\pm$ SEM.

Фиг. 12: Шестинедельное исследование потери массы тела на крысах SD на HFD (ВЖД) с использованием соединений KBP-066A11 с различной длиной ацилирования, .03, .04 и .05 ацилирования. Крысам вводили KBP-066A11.03, KBP-066A11.04, KBP-066A11.05 или носитель, и каждые 3 дня вводили однократную п/к инъекцию 4 нмоль соединения/кг. Массу тела регистрировали ежедневно на протяжении всего исследования. А) Ежедневное потребление пищи в граммах (г) В) Потеря массы тела отдельных крыс в граммах (г). $n=6$ крыс на группу. Данные в виде $\pm$ SEM.

Фиг. 13: Дополнительные параметры из исследования потери массы на крысах SD на ВЖД с использованием соединений KBP-066A11 с различной длиной ацилирования, .03, .04 или .05 ацилирования. Крысам вводили KBP-066A11.03, KBP-066A11.04, KBP-066A11.05 или носитель. Крысам каждые 3 дня вводили однократную п/к инъекцию 4 нмоль соединения/кг. А) Пероральный глюкозотолерантный тест. В) Приращение площади под кривой ПГТТ. С) Масса эпидидимальной БЖТ в конце исследования в граммах (г). D) Масса ингвинальной БЖТ в конце исследования в граммах (г). E) Масса периренальной БЖТ в конце исследования в граммах (г). F) Изменение массы тела в конце исследования от исходного уровня в граммах (г). Массу тела регистрировали ежедневно на протяжении всего исследования. $n=6$ крыс на группу. Данные в виде $\pm$ SEM.

Фиг. 14: Анализ конкурентного связывания с лигандом с использованием радиоактивно меченого кальцитонина лосося (^{125}I -sCT) в качестве индикатора и использованием 2% сывороточного альбумина двух разных видов: крысы (*Rattus norvegicus*) и человека (*Homo sapiens*). В качестве индикатора использовали $0,25 \text{ нМ}$ ^{125}I -sCT. А) Анализ конкурентного связывания в присутствии 2% RSA. В) Анализ конкурентного связывания в присутствии 2% HSA. Данные в виде $\pm$ SEM.

Фиг. 15: Испытание однократной дозы KBP-356, KBP-386, KBP-387, KBP-388, KBP-389 и KBP-390 в исследовании положения ацилирования основной цепи KBP-066. Однократная доза вводилась при $t=0$, и эффект на потребление пищи и массу тела однократной дозы 3 нмоль/кг каждой молекулы отслеживали в течение 96 часов и проводили прямое

сравнение друг с другом и с носителем для определения оптимальной позиции ацилирования. А) Краткосрочное потребление пищи в граммах (г). В) Изменение массы тела в граммах (г). n=4 крыс на группу. Данные в виде +/- SEM.

Фиг. 16: Испытание однократной дозы КВР-391, КВР-312, КВР-313, КВР-314, КВР-315, КВР-316, КВР-317 и КВР-318 в исследовании положения ацилирования основной цепи КВР-021. Однократная доза вводилась при t=0, и эффект на потребление пищи и массу тела однократной дозы 3 нмоль/кг каждой молекулы отслеживали в течение 96 часов и проводили прямое сравнение друг с другом или с носителем для определения оптимальной позиции ацилирования. А) Краткосрочное потребление пищи в граммах (г).

В) Изменение массы тела в граммах (г). n=4 крыс на группу. Данные в виде +/- SEM.

Фиг. 17: Шестинедельное исследование потери массы на крысах SD на ВЖД с использованием соединений КВР-066 с той же длиной ацилирования, .03, но в другом положении, A11 и A19. Крысам каждые 3 дня вводили однократную п/к инъекцию 4 нмоль соединения/кг КВР-066A11.03 (КВР-356), КВР-066A19.03 (КВР-389) или носителя.

Массу тела и потребление пищи регистрировали ежедневно на протяжении всего исследования. А) Ежедневное потребление пищи во время исследования в граммах (г). В) Потеря массы тела отдельных крыс в граммах (г). n=6 крыс на группу. Данные в виде +/- SEM.

Фиг. 18: Дополнительные параметры из исследования потери массы тела на крысах SD на ВЖД с использованием соединений КВР-066A11 с различной длиной ацилирования, .03, .04 и .05 ацилирования. Крысам вводили КВР-066A11.03 или КВР-066A19.03, или носитель. Крысам каждые 3 дня вводили однократную п/к инъекцию 4 нмоль соединения/кг. А) Пероральный глюкозотолерантный тест. В) Приращение площади под кривой ПГТТ. С) Масса эпидидимальной БЖТ в конце исследования в граммах (г). D) Масса ингвинальной БЖТ в конце исследования в граммах (г). Е) Масса периренальной БЖТ в конце исследования в граммах (г). F) Изменение массы тела в конце исследования от исходного уровня в граммах (г). Массу тела регистрировали ежедневно на протяжении всего исследования. n=6 крыс на группу. Данные в виде +/- SEM.

Фиг. 19: Исследование линкера ацилирования основной цепи КВР-066 с использованием испытания однократной дозы КВР-356, КВР-384 и КВР-385. Однократная доза вводилась при t=0, и эффект на массу тела однократной дозы 4 нмоль/кг каждой молекулы отслеживали в течение 96 часов и проводили прямое сравнение друг с другом для определения оптимального линкера ацилирования А) Краткосрочное потребление пищи в граммах (г). В) Изменение массы тела в граммах (г). n=4 крыс на группу. Данные в виде +/- SEM.

Примеры

Раскрытые в данном документе варианты реализации описываются в следующих примерах, которые предоставлены для понимания раскрытия и не должны истолковываться, как ограничивающие каким-либо образом объем данного изобретения, установленные в формуле изобретения, предоставленной в дальнейшем. Следующие далее примеры приводятся для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как выполнить и применить описанные варианты реализации, и не предназначены для ограничения объема данного изобретения, а также не предназначены для утверждения, что эксперименты, предоставленные ниже, являются всеми или единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия по обеспечению точности в отношении используемых количественных показателей (например, количества, температуры и т.д.), однако некоторые экспериментальные ошибки и отклонения следует принимать во внимание. Если не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса представляет собой средневзвешенную молекулярную массу, температура предоставляется в градусах по Цельсию, а давление является атмосферным или близким к атмосферному. В представленных далее примерах были использованы следующие материалы и методы.

Клетки и клеточные линии

Были приобретены приведенные ниже линии клеток, экспрессирующие рецепторы кальцитонина, амилина и CGRP, которые культивировали в соответствии с инструкциями производителя.

1. Рецептор кальцитонина (CTR): U2OS-CALCR от компании DiscoverX (каталожный №: 93-0566C3).
2. Рецептор амилина (AMY-R): CHO-K1 CALCR + RAMP3 от компании DiscoverX (каталожный №: 93-0268C2).

Реагенты

Тиофлавин Т (T3516, Sigma). Исходный раствор ThT для анализа готовили в виде 10 мМ раствора в 5 мМ растворе фосфата натрия, pH 7,2. Аликвоты хранили в защищенном от света месте при -20 °C. Исходный ThT размораживали и разбавляли непосредственно перед использованием.

Для тестируемых миметиков кальцитонина (в дальнейшем именуемых «ацилированные КВР» или просто «КВР») конечным буферным раствором являются 10 мМ трис-HCl, pH 7,5.

Конечная концентрация пептида в лунках должна составлять 100-200 мкМ, а конечная концентрация ThT должна составлять 4 мкМ. ThT добавляется последним (10 мкл).

Модели животных

В исследованиях на животных моделях использовали 12-недельных здоровых крыс Sprague Dawley (SD) для оценки активности ацилированных КВР. В некоторых примерах их кормили нормальной пищей во время до и во время тестов, тогда как в других примерах здоровых крыс породы SD в течение 12 недель кормили диетой с высоким содержанием жиров (ВЖД) в течение восьми недель перед испытанием и в течение всего испытания.

Ацилированные миметики кальцитонина

В следующих таблицах 1a и 1b представлены аминокислотные последовательности тестируемых миметиков ацилированного кальцитонина. В контексте данного документа:

ацилирование 1 означает K_{Ac}-(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(C16 жирная кислота [пальмитат]);

ацилирование 2 означает K_{Ac}-(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота]);

ацилирование 3 означает K_{Ac} -(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота]).

ацилирование 4 означает K_{Ac}-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C20 [эйкозандиовая кислота]).

ацилирование 5 означает K_{Ac}-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C22 [докозандиовая кислота]).

ацилирование 6 означает K_{Ac}-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C16 [гексадекандиовая кислота]).

ацилирование 7 означает КАс-(3хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота]).

5 **ацилирование 8** означает КАс-(аминокислоты 1хОЭГ, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота]).

ацилирование 9 означает КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C24 [тетракозандиовая кислота]).

10 **ацилирование 10** означает КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C26 [гексакозандиовая кислота]).

15 **ацилирование 11** означает КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C14 [тетрадекандиовая кислота]).

Тестируемые миметики кальцитонина основаны на следующих коровых пептидных последовательностях до модификации:

CSNLSTCMLGRLSQDLHRLQTYPKTDVGANAP (KBP089)
 CSNLSTC(AiB)LGRLSQDLHRLQTYPKTDVGANAP (KBP066)
 20 CGNLSTC(AiB)LGRLTQDLNKFHTFPKTDVGANAP (KBP062)
 CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP (KBP042)
 CSNLSTC(AiB)LGRLANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP (KBP110)
 CSNLSTCMLGRLSQELHRLQTYPKTDVGANAP (KBP021)

В таблице 1b также используется следующая дополнительная номенклатура:

Ацилированный	КВР
Амино	Название
Кислота	Модификатор
01	A01
02	A02
03	A03
..	..
XX	AXX
..	..

31	A31
32	A32

Тип	Название
Ацилирование	Присоединение
C16	.01
Двухосновная кислота C18	.02
Двухосновная кислота C18 2*ОЭГ	.03
Двухосновная кислота C20 2*ОЭГ	.04
Двухосновная кислота C22 2*ОЭГ	.05
Двухосновная кислота C16 2*ОЭГ	.06
Двухосновная кислота C18 3*ОЭГ	.07
Двухосновная кислота C18 1*ОЭГ	.08
Двухосновная кислота C24 2*ОЭГ	.09
Двухосновная кислота C26 2*ОЭГ	.10
Двухосновная кислота C14 2*ОЭГ	.11

Таким образом, в качестве примера, номенклатура КВР-066A11.03 указывает на то, что пептид состоит из коровой последовательности КВР-066, модифицированной заменой в положении 11 остатком лизина с ацилированием двухосновной кислотой C18 2*ОЭГ.

Таблица 1. Ацилированные миметики кальцитонина

КВР	№- конец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	С- конец					
346	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	1	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P	K					-NH2					
347	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	1	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
349	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	1	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
350	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	1	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
351	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	1	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
352	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	1	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
353	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
354	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	3	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
355	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	2	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
356	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	3	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P						-NH2					
357	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	2	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2										
358	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K	K					3				
359	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	2										
360	Ac-	C	G	N	L	S	T	C	X	3	G	R	L	T	Q	D	L	N	K	F	H	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2										
361	Ac-	C	G	N	L	S	T	C	X	2	G	R	L	T	Q	D	L	N	K	F	H	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2										
362	Ac-	C	G	N	L	S	T	C	X	L	G	3	L	T	Q	D	L	N	K	F	H	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2										
363	Ac-	C	G	N	L	S	T	C	X	L	G	2	L	T	Q	D	L	N	K	F	H	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2										
364	Ac-	C	G	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	T	Q	D	L	N	K	F	H	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K						3				
365	Ac-	C	G	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	T	Q	D	L	N	K	F	H	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K						2				
366	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	3	G	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	P	K	T	D	V	G						A	N	A	P	-NH2
367	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	2	G	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	P	K	T	D	V	G						A	N	A	P	-NH2
368	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	3	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2					
369	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	2	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2					
370	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	3					
371	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	2					
372	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	3	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P	K					-NH2					

373	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	V	3	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2
374	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	E	L	H	K	L	Q	T	Y	P	R	T	D	V	G	A	N	A	P	K	3
375	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	3	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2
376	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	3	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2
377	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K	3
378	Ac-	C	A	S	L	S	T	C	V	3	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2
379	Ac-	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	3	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2
380	Ac-	C	A	S	L	S	T	C	V	L	G	K	L	S	Q	D	L	H	K	L	Q	T	F	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K	3
	1	K _{Ac} -(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(C16 жирная кислота [пальмитат])																																	
	2	K _{Ac} -(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота])																																	
	3	K _{Ac} -(2xOЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота])																																	
	X	Аминоизомасляная кислота (AiB); № CAS 62-57-7																																	

Таблица 1b-Миметики ацилированного кальцитонина

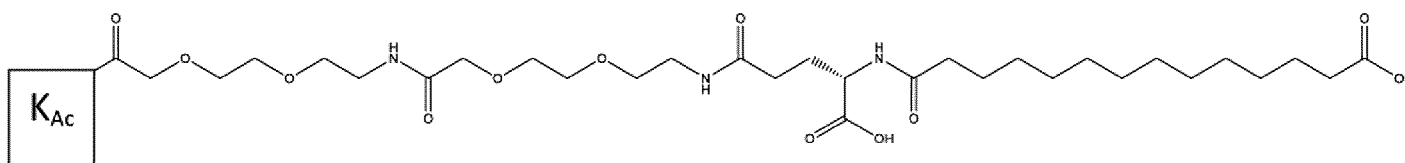
КВР	Коровий пептид	Ацилирование	N-конец																													С-конец				
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		29	30	31	32
383	КВР-066	A11.04	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	4	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
382	КВР-066	A11.05	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	5	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
381	КВР-066	A11.06	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	6	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
385	КВР-066	A11.07	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	7	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
384	КВР-066	A11.08	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	8	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
307	КВР-066	A11.09	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	9	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
306	КВР-066	A11.10	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	10	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
305	КВР-066	A11.11	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	11	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2
354	КВР-066	A09.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	3	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	-NH2

356	KBP-066	A11.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	3	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
386	KBP-066	A12.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	3	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
387	KBP-066	A16.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	3	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
388	KBP-066	A18.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	3	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
389	KBP-066	A19.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	3	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
399	KBP-066	A19.05	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	5	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
390	KBP-066	A24.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	3	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
358	KBP-066	A32.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	X	L	G	R	L	S	Q	D	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K	3	
312	KBP-021	A09.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	3	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
391	KBP-021	A11.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	3	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
393	KBP-021	A11.04	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	4	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
394	KBP-021	A11.05	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	5	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
313	KBP-021	A12.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	3	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
314	KBP-021	A16.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	3	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
315	KBP-021	A18.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	3	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
316	KBP-021	A19.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	3	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
395	KBP-021	A19.05	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	5	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
317	KBP-021	A24.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	3	T	D	V	G	A	N	A	P		-NH2	
318	KBP-021	A32.03	Ac-	C	S	N	L	S	T	C	M	L	G	R	L	S	Q	E	L	H	R	L	Q	T	Y	P	K	T	D	V	G	A	N	A	P	K	3	
X	Аминоизомасляная кислота (AiB); № CAS 62-57-7																																					
3	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота])																																					
4	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C20 [эйкозандиовая кислота])																																					
5	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C22 [докозандиовая кислота])																																					
6	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C16 [гексадекандиовая кислота])																																					
7	КАс-(3хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота])																																					
8	КАс-(1хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота])																																					
9	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C24 [тетракозандиовая кислота])																																					

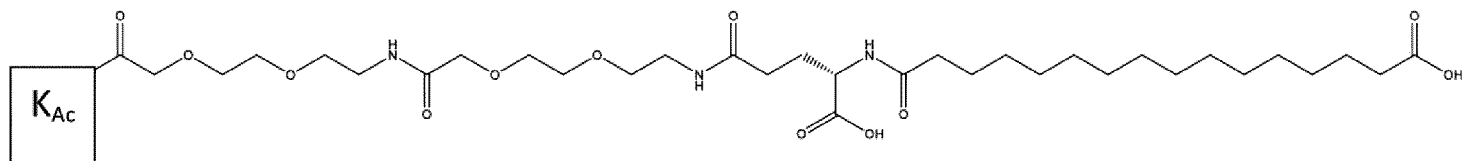
10	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C26 [гексакозандиовая кислота])
11	КАс-(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C14 [тетрадекандиовая кислота])

Различные ацилирования имеют следующие химические структуры:

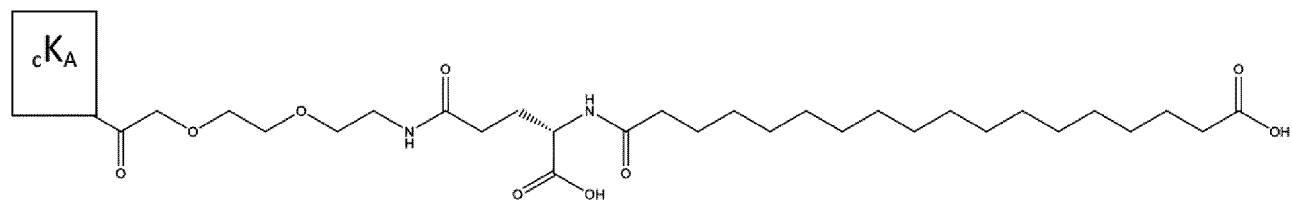
ОЭГ-ОЭГ-γGlu-двухосновная кислота C14 (т.е. ацилирование 11)



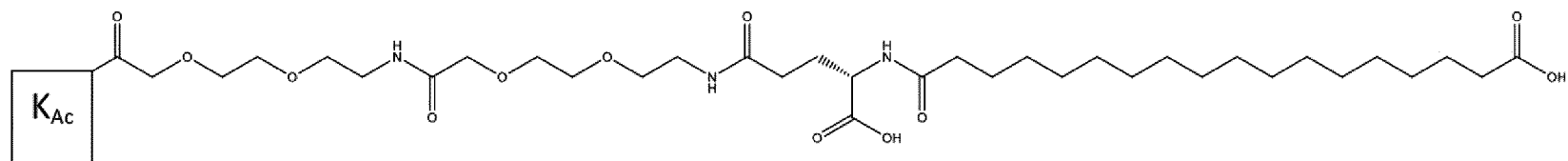
ОЭГ-ОЭГ-yGlu-двухосновная кислота C16 (т.е. ацилирование **6**)



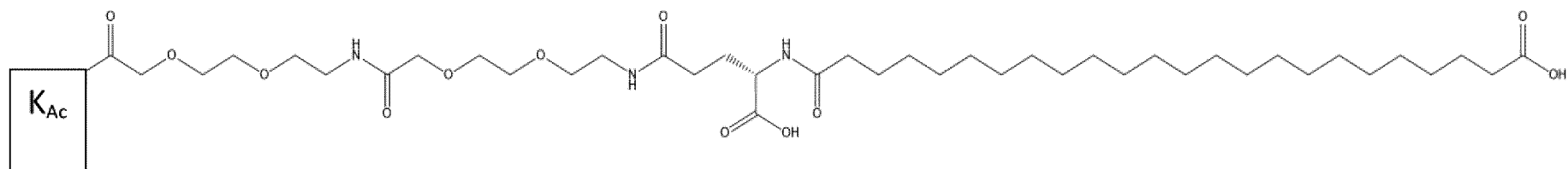
ОЭГ-yGlu-двухосновная кислота C18 (т.е. ацилирование **8**)



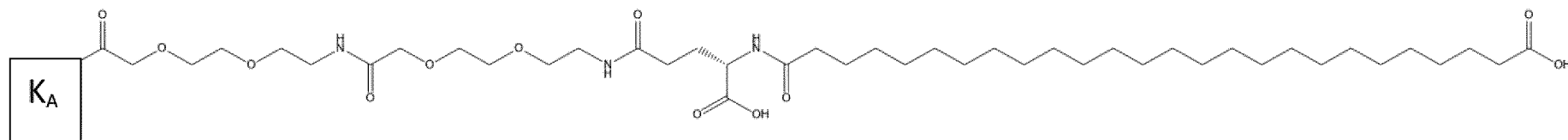
ОЭГ-ОЭГ-yGlu-двухосновная кислота C18 (т.е. ацилирование **3**)



ОЭГ-ОЭГ-γGlu-двухосновная кислота C24 (т.е. ацилирование **9**)



ОЭГ-ОЭГ-γGlu-двухосновная кислота C26 (т.е. ацилирование **10**)



НАЧАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО АЦИЛИРОВАНИЮ (Примеры 1-5)

Пример 1 (Фиг. 1 и 5)

Сравнительный эффект однократной дозы ацилированных в различных положениях вариантов 1 (9 положение «A09», 11 положение «A11», 16 положение «A16», 18 положение «A18» и 32 положение «A32») по сравнению с неацилированным пептидом-стандартом (КВР-089) на потреблении пищи и массу тела у 12-недельных тощих крыс SD.

КВР	Кор	Положение/Ацилирование
КВР-346	КВР-042	A11/ацилирование 1
КВР-347	КВР-089	A18/ацилирование 1
КВР-349	КВР-089	A11/ацилирование 1
КВР-350	КВР-089	A12/ацилирование 1
КВР-351	КВР-089	A16/ацилирование 1
КВР-352	КВР-089	A9/ацилирование 1
КВР-353	КВР-089	A32/ацилирование 1

За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на шесть групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 25 нмоль/кг (^ 100 мкг/кг)). Их не кормили в течение ночи, а затем утром вводили однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 24 часа и 48 часов после подкожной инъекции.

Ацилирование в положениях «A09», «A11» и «A32» с ацилированием 1 вызывало длительный ответ *in vivo* (Фиг. 1), который заслуживал дальнейшего тестирования (см. ниже). Позиции 12 (Фиг. 5), 16 и 18 дали неприемлемый результат и не были использованы в дальнейших экспериментах.

Пример 2: анализ β -аррестина

Анализы β -аррестин GPCR PathHunter представляют собой цельноклеточные функциональные анализы, которые напрямую измеряют способность лиганда активировать GPCR путем обнаружения взаимодействия β -аррестина с активированным GPCR. Поскольку рекрутирование β -аррестина не зависит от передачи сигналов G-белка, эти анализы дают мощную и универсальную платформу

для скрининга и профилирования, которую можно использовать практически для любого Gi-, Gs или Gq-сопряженного рецептора.

В этой системе GPCR сливается в рамке с небольшим фрагментом фермента ProLink™ и совместно экспрессируется в клетках, стабильно экспрессирующих слитый белок β-аррестин и более крупный мутант β-gal с N-концевой делецией (называемый акцептором фермента или EA). Активация GPCR стимулирует связывание β-аррестина с GPCR, меченным ProLink, и усиливает комплементацию двух фрагментов фермента, что приводит к образованию активного фермента β-gal. Это взаимодействие приводит к увеличению активности фермента, которую можно измерить с помощью хемилюминесцентных реагентов для обнаружения PathHunter®.

В независимых биоанализах, CTR и AMY-R клетки обрабатывали в указанные моменты времени увеличивающимися дозами KBps, указанными в таблицах 2 и 3 ниже (100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 нМ и носителем). Анализ выполняли в белых 384-луночных планшетах (Greiner Bio-One, 784080). Клетки высевали по 2500 клеток на лунку в 10 мкл среды, специфичной для клеточного типа, за день до эксперимента. Для количественной оценки GPCR-опосредованного рекрутирования β-аррестина использовали набор для обнаружения Pathhunter™ (93-0001, Dпредставляет собойcoverX) и проводили анализ в соответствии с инструкциями производителя.

Продолжительный/продолгованный ответ оценивали с использованием клеточной линии с рецептором кальцитонина (CTR): U2OS-CALCR от DiscoverX (кат. №: 93-0566C3), и в отличие от классического накопления в течение трех часов, накопление β-аррестина проводили в течение 3, 6, 24, 48 или 72 часов, а затем тестировали и анализировали. В таблице 2 (**ацилирование 2**) и в таблице 3 (**ацилирование 3**) представлены результаты анализа β-аррестина.

Таблица 2. Анализ β -аррестина для ацилирования **2** (K_{Ac} -(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(двухосновная кислота C18))

Соединение			U2OS (CTR)	U2OS (CTR)	CHO-K1 (AMY-R)
Ацилированные КВР Ацилирование 3			β -аррестин	β -аррестин	β -аррестин
			Кратность Захват	Продолжительный ответ CTR (10 нМ)	Кратность Захват
№	Кор Последовательность	Ацилирование Положение/Тип	Значения EC50 (10^{-9} М)	значение tAUC 0-72ч	Значения EC50 (10^{-9} М)
КВР-355	КВР-066	A09/2	$31,2 \pm 4,4$ (3)	147 ± 004 (2)	509 ± 695 (3)
КВР-357	КВР-066	A11/2	$9,2 \pm 1,0$ (3)	1576 ± 171 (2)	$11,4 \pm 5,8$ (3)
КВР-359	КВР-066	A32/2	$40,8 \pm 7,2$ (3)	1438 ± 003 (2)	$96,5 \pm 65$ (3)
КВР-361	КВР-062	A09/2	$127,5 \pm 45$ (3)	136 ± 007 (2)	18,4 (1)
КВР-363	КВР-062	A11/2	$10,9 \pm 7,0$ (3)	1581 ± 066 (2)	$36,6 \pm 31$ (2)
КВР-365	КВР-062	A32/2	$34,6 \pm 6,8$ (3)	1282 ± 034 (2)	$51,9 \pm 1,6$ (2)
КВР-367	КВР-110	A09/2	> 1000 (3)	095 ± 020 (3)	> 1000 (3)
КВР-369	КВР-110	A11/2	$182 \pm 1,2$ (3)	537 ± 073 (3)	$230 \pm 4,3$ (3)
КВР-371	КВР-110	A32/2	> 1000 (3)	109 ± 001 (3)	> 1000 (3)

Таблица 2: *in vitro* скрининговые характеристики пептидов.
 AX/2 означает положение X с ацилированием 2, например A09/2 означает ацилирование в положении 9 с ацилированием 2.

Таблица 3. Исследование β -аррестина для ацилирования **3** K_{Ac} -(2хОЭГ аминокислоты, связанные вместе с остатком глутаминовой кислоты, присоединенным к N-концу)-(двухосновная кислота C18 [октадекандиовая кислота]).

Соединение			U2OS (CTR)	U2OS (CTR)	CHO-K1 (AMY-R)	Потребление пищи
Ацилированные КВР Ацилирование 2			β -аррестин	β -аррестин	β -аррестин	Δ ЕДА
			Кратность Захват	Продолжительный ответ CTR (10 нМ)	Кратность Захват	Устойчивое подавление (36 нмоль/кг)
№	Кор Последовательность	Ацилирование Тип	Значения EC50 (10^{-9} М)	значение tAUC 0-72ч	Значения EC50 (10^{-9} М)	Часы (ч)
КВР-354	КВР-066	A09/3	$4,7 \pm 0,6$ (3)	260 ± 019 (2)	$93,0 \pm 26$ (3)	4 ч
КВР-356	КВР-066	A11/3	$8,5 \pm 0,8$ (3)	2512 ± 295 (2)	$12,0 \pm 4,0$ (3)	96 ч

КВР-358	КВР-066	A32/3	44,2 ± 5,7 (3)	1460 ± 202 (2)	98,6 ± 53 (3)	72 ч
КВР-360	КВР-062	A09/3	45,2 ± 9,4 (3)	182 ± 006 (2)	83,9 ± 42 (3)	4 ч
КВР-362	КВР-062	A11/3	13,2 ± 9,6 (3)	1784 ± 330 (2)	14,5 ± 0,2 (2)	72 ч
КВР-364	КВР-062	A32/3	53,3 ± 8,6 (3)	1322 ± 035 (2)	106 ± 32 (2)	48 ч
КВР-366	КВР-110	A09/3	> 1000 (3)	084 ± 007 (3)	> 1000 (3)	4 ч
КВР-368	КВР-110	A11/3	193 ± 2,9 (3)	827 ± 140 (3)	166 ± 43 (3)	72 ч
КВР-370	КВР-110	A32/3	473 ± 34 (3)	635 ± 077 (3)	> 1000 (3)	4 ч
КВР-373	КВР-042	A09/3	96,5 ± 17 (3)	337 (1)	263 ± 7,3 (3)	4 ч
КВР-372	КВР-042	A11/3	7,8 ± 2,5 (3)	1304 ± 238 (3)	45,6 ± 12 (3)	96 ч
КВР-374	КВР-042	A32/3	49,2 ± 6,4 (3)	1073 (1)	151 ± 15 (4)	72 ч
КВР-375	КВР-089	A09/3	56,3 ± 20 (3)	624 (1)	232 ± 27 (4)	4 ч
КВР-376	КВР-089	A11/3	14,7 ± 2,7 (3)	1395 (1)	25,0 ± 2,2 (4)	96 ч
КВР-377	КВР-089	A32/3	66,0 ± 36 (3)	1403 (1)	73,1 ± 7,4 (4)	72 ч

Таблица 3: *In vitro* скрининговые характеристики пептидов

AX/3 означает положение X с ацилированием 3, например A09/3 означает ацилирование в положении 9 с ацилированием 3.

Исследования β -аррестина показали следующее:

1) Эффективность ацилирования с точки зрения положения ацилирования на пептиде следующая: A11 > A32 > A09.

5 2) ацилирование **2** или **3** в положении 11 (A11), как правило, представляет собой намного лучшую комбинацию ацилирование/положение для каждого пептидного кора с точки зрения активации рецептора кальцитонина (CTR), рецептора амилина (AMY-R), пролонгированного ответа CTR и подавления потребления пищи.

10 3) Ацилированные КВР с разными корами демонстрируют сходную активность и паттерн активности *in vitro* при модификации с помощью идентичных ацилирований.

Пример 3 (Фиг. 2)

Сравнительный эффект однократной дозы A09 (КВР375), A11 (КВР376) и A32 (КВР377) ацилированных вариантов **3** КВР089 по сравнению с неацилированным стандартным КВР089 на потреблении пищи и массу тела у 20-недельных крыс SD на ВЖД (HFD).

КВР	Кор	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-375	КВР-089	КВР-089A09.03	A9/ацилирование 3
КВР-376	КВР-089	КВР-089A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-377	КВР-089	КВР-089A32.03	A32/ацилирование 3

За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на шесть групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 36 нмоль/кг (150-157 мкг/кг)). Их не кормили в течение ночи, а затем утром вводили однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов...144-168 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 24 часа после подкожной инъекции.

Исследования на животных моделях подтвердили результаты исследования β -аррестина и продемонстрировали улучшенную эффективность по сравнению со стандартным пептидом:

1) A11 > A32 > A09 с точки зрения преимущества положения ацилирования с использованием КВР-089 в качестве корового пептида.

2) ацилирование **2** и ацилирование **3** намного превосходят неацилированный КВР-089 в указанной дозе с точки зрения продолжительной активности и эффективности *in vivo*.

Исследование на животных моделях также показало, что ацилирование в положении 9 снижает активность пептида по сравнению с исходным пептидом, тем самым исключая положение 9 как положение, представляющее интерес для дальнейших исследований.

Пример 4 (Фиг. 3)

Сравнительный эффект однократной дозы ацилированных вариантов A11 и A32 **3** с различным пептидным кором по сравнению с неацилированными стандартными КВР (КВР-066, КВР-062 и КВР-110) на потребление пищи и массу тела у 20-недельных крыс SD на ВЖД (HFD).

КВР	Кор	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-356	КВР-066	КВР-066A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-358	КВР-066	КВР-066A32.03	A32/ацилирование 3
КВР-362	КВР-062	КВР-062A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-364	КВР-062	КВР-062A32.03	A32/ацилирование 3
КВР-368	КВР-110	КВР-110A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-370	КВР-110	КВР-110A32.03	A32/ацилирование 3

За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на одинадцать групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 4 нмоль/кг (^17 мкг/кг), 12 нмоль/кг (^50 мкг/кг) или 36 нмоль/кг (^150 мкг/кг)). Их не кормили в течение ночи, а затем утром вводили однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов...144-168 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 24 часа после подкожной инъекции.

Результаты приведены ниже:

1) Пептидный кор не влияет на улучшение, наблюдаемое при ацилировании по 11 или 32 положениям.

2) A11 представляет собой лучший сайт для ацилирования, по сравнению с A32.

Пример 5 (Фиг. 4)

Эффект однократной высокой дозы A11/ацилированных **3** вариантов КВР-042 и КВР-066 на потребление пищи и массу тела у 20-недельных крыс SD на ВЖД (HFD). За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на шесть групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 300 нмоль/кг (^1000 мкг/кг)).

КВР	Кор	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-372	КВР-042	КВР-042A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-356	КВР-066	КВР-066A11.03	A11/ацилирование 3

Крыс не кормили в течение ночи, а затем утром вводили однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов...188-312 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 24 часа после подкожной инъекции.

Тест с высокой дозой с использованием KBP356 и KBP372 продемонстрировал превосходную длительную эффективность *in vivo*, которая длилась несколько дней. Эти ацилированные пептиды, таким образом, являются очевидными кандидатами на разработку пептидного терапевтического лекарственного средства, применяемого один раз в неделю.

Пример 6 (Фиг. 6-10)

Дальнейшая работа была выполнена с соединением KBP-356 (KBP-066A11.03), которое содержит остаток Aib в положении 8 и предпочтительное ацилирование в положении 11 пептида.

Хроническое исследование было выполнено на крысах-самцах ZDF. (гомозиготный рецессивная (fa/fa) порода с ожирением: 370) (Charles River, США). Крыс получали в возрасте 5 недель. Крыс содержали по 2-3 на клетку.

Хроническое лечение крыс-самцов ZDF:

Крысы были доставлены в виварий Nordic Bioscience в возрасте пяти недель (-6 День). Крыс акклиматизировали в течение трех суток. Уровни HbA1c и BW регистрировали (-3 День). Крыс рандомизировали на основе уровня HbA1c (в первую очередь) и BW (во вторую очередь) на 4 день. Исследование начинали на 1 День.

Концентрации и частота дозирования

Животным вводили один раз в день KBP-066 или физиологический раствор (носитель). Дозирование KBP-066A11.03 проводили один раз в три дня. Дозировку вводили подкожно (ПК) около полудня.

Физиологический раствор: Объем дозировки составлял 1 мл/кг.

KBP-066: Объем дозировки составлял 1 мл/кг, концентрация дозировки составляла 5, 50 или 500 мкг/кг, а концентрация соединения составляла 5, 50 или 500 мг/л. Эквивалент дозы в нмоль/кг составлял 1,43, 14,3 и 143 нмоль/кг соответственно.

KBP-066A11.03: Объем дозировки составлял 1 мл/кг, концентрация дозировки составляла 25 нмоль/кг, а концентрация соединения составляла 25 ммоль/л. Эквивалент дозы в мкг/кг составлял 104 мкг/кг.

Группы лечения в нмоль/кг

Введение	Соединение	Объем дозирования	Дозировка конц.	Соединение конц.	Способ введения	n
Носитель	Физиологический раствор	1 мл/кг	NA	NA	ПК	10
1,43 нмоль/кг	КВР-066	1 мл/кг	1,43 нмоль/кг	1,43 мкмоль/л	ПК	10
14,3 нмоль/кг	КВР-066	1 мл/кг	14,3 нмоль/кг	14,3 мкмоль/л	ПК	10
143 нмоль/кг	КВР-066	1 мл/кг	143 нмоль/кг	143 мкмоль/л	ПК	10
25,0 нмоль/кг	КВР-066A11.03	1 мл/кг	25,0 нмоль/кг	25,0 мкмоль/л	ПК	10

Группы лечения в мкг/кг

Введение	Соединение	Объем дозирования	Дозировка конц.	Соединение конц.	Способ введения	n
Носитель	Физиологический раствор	1 мл/кг	NA	NA	ПК	10
5 мкг/кг	КВР-066	1 мл/кг	5 мкг/кг	5 мг/л	ПК	10
50 мкг/кг	КВР-066	1 мл/кг	50 мкг/кг	50 мг/л	ПК	10
500 мкг/кг	КВР-066	1 мл/кг	500 мкг/кг	500 мг/л	ПК	10
104 мкг/кг	КВР-066A11.03	1 мл/кг	104 мкг/кг	104 мг/л	ПК	10

Общая еженедельная доза на группу лечения:

- 5 5 мкг/кг КВР-066 равно 35 мкг/кг/неделю или 10 нмоль/кг/неделю
 50 мкг/кг КВР-066 равно 350 мкг/кг/неделю или 100,4 нмоль/кг/неделю
 500 мкг/кг КВР-066 равно 3500 мкг/кг/неделю или 1004 нмоль/кг/неделю
 25 нмоль/кг КВР-066 равно 243,4 мкг/кг/неделю или 58,3 нмоль/кг/неделю
 Соединения растворяли в физиологическом растворе и хранили при -20 °С.
- 10 Непосредственно перед введением аликвоты размораживали.

Сбор результатов тестирования

- 3 День: Измерение уровня HbA1c
- 1 День: (первый день исследования) крыс не кормили в течение 6 часов и брали анализ крови и ВГ. Впоследствии было произведено дозирование.
- 15 14 День: Уровень глюкозы в крови натощак (УГВКН) + образец крови (6 часов натощак)
- 28 День: УГВКН + образец крови (6 ч натощак)

42 День: УГВКН + образец крови (6 ч натощак)

57 День: (гр. 1 + 2)/58 (гр. 3 + 4) ПГТТ без предварительной дозировки КВР-066 или КВР-066A11.03 (11 часов натощак). Hb1Ac измеряли во время ПГТТ при $t = 120$ или $t = 180$.

5 62 День: УГВКН + образец крови (6 ч натощак)

Потребление пищи

За потреблением пищи следили ежедневно. Массу тела контролировали ежедневно в течение первых трех недель, затем дважды в неделю после третьей недели.

10

Уровень глюкозы в крови натощак

Уровень глюкозы в крови натощак контролировали каждые две недели с помощью системы мониторинга Accu-Check® Avia (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Швейцария): Для измерения использовали кровь из хвостовой вены (игла 25G).

15

HbA1c

Крысы не голодали для первого (рандомизация) и второго (после второго ПГТТ) измерения уровня HbA1c. На кассету HbA1c наносили одну каплю крови и измеряли уровень HbA1c с помощью анализатора DCA Vantage. Дозирование соединения или физиологического раствора выполняли последовательно во время первого и второго измерения уровня HbA1c.

20

Пероральный тест на толерантность к глюкозе

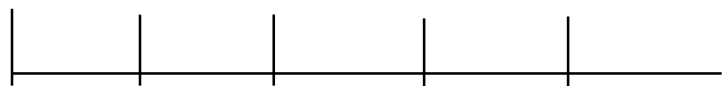
Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) проводили после восьми недель лечения. Для расчета введенной дозы глюкозы использовали массу тела за день до теста. Животных не кормили в течение 11 часов. Тепло было приложено в течение около 45 мин до момента времени -30 мин (см. Фиг. ниже). Животным предварительно вводили КВР-066, КВР-066A11.03 или физиологический раствор во время первого ПГТТ, но не во время второго ПГТТ, (С) на Фиг. ниже.

25

30

График ПГТТ

-30 0 15 30 60 120 мин



В	В	В	В	В	В
BG	BG	BG	BG	BG	BG
(C)	G				

- 5 В = образец крови (ЭДТА), около 200-300 мкл
 BG = уровень глюкозы в крови.
 G = глюкоза (перорально. 1 г глюкозы/кг МТ, 2 мл/кг))
 С = соединение (или физиологический раствор) (ПК)

10 РЕЗУЛЬТАТЫ

Фиг. 6А+В, Суммарное потребление пищи

На Фиг. 6А представлено суммарное потребление пищи в ходе исследования. Все группы лечения ели меньше, чем группы носителя. Кроме того, более высокие дозы приводили к большему сокращению потребления пищи. В группе лечения

- 15 ацилированным КВР-066А11.03 наблюдалось наибольшее снижение потребления пищи по сравнению с КВР-066 при всех дозировках. В конце исследования во всех группах лечения наблюдалось значительное снижение количества потребляемой пищи в ходе исследования по сравнению с носителем, причем обработка ацилированным КВР-066А11.03 показала наибольшее снижение потребления пищи; Сокращение
 20 потребления пищи на ~ 35% по сравнению с носителем (Фиг. 6В).

Фиг. 7А+В, Масса тела

Все группы лечения потеряли в массе тела в течение первых трех недель исследования. По мере того, как крысы ZDF в группе носителя становились все более больными и,
 25 таким образом, не могли поддерживать свою массу тела/скорость прироста (Фиг. 7А), группы лечения догнали группу носителя с точки зрения массы тела. Скорость увеличения массы тела по сравнению с группой носителя зависела от дозы, а также от типа соединения, используемого в группе лечения (Фиг. 7В). Группа лечения ацилированным КВР-066А11.03 имеет самую медленную скорость восстановления, за
 30 ней следуют группы 14,3 и 143 нмоль/кг и 1,43 нмоль/кг как группы наиболее быстрого восстановления массы тела.

Это показывает, что ацилированный КВР-66А11.03, вводимый подкожно один раз в три дня, имеет дополнительные фармакологические преимущества по сравнению с неацилированным КВР-066, вводимым подкожно один раз в день.

Фиг. 8, Уровень глюкозы в крови натощак

По мере того, как крысы ZDF в группе носителя становились все более больными и, таким образом, не могли поддерживать УГВКН, все группы лечения эффективно уменьшали УГВКН на время исследования по сравнению с носителем. Лечение ацилированным КВР-066A11.03 было наиболее эффективным лечением, позволявшим лишь умеренное увеличение УГВКН на 5 мМ в течение 62-дневного исследования в этой сверхагрессивной животной модели сахарного диабета 2 типа. Неацилированный КВР-066 снижал УГВКН дозозависимым образом, но не был таким активным, как группа лечения ацилированным пептидом, в ослаблении УГВКН. Опять же, это показывает, что ацилированный КВР-66A11.03 имеет дополнительные фармакологические преимущества по сравнению с неацилированным КВР-066.

Фиг. 9, Уровень HbA1c на исходном уровне и в конце исследования

Как и ожидалось, значения уровня HbA1c на исходном уровне практически идентичны до начала сахарного диабета и способов лечения у самцов крыс ZDF (Фиг. 9А). В конце исследования (62 день) во всех группах лечения были значительно снижены уровни HbA1c по сравнению с группами носителя. Интересно, что группа лечения ацилированным КВР-066A11.03 имела самые низкие значения уровня HbA1c. Кроме того, уровень HbA1c также был значительно ниже, чем во всех группах лечения неацилированным КВР-066 (Фиг. 9В), что демонстрирует дополнительное преимущество ацилирования по сравнению с неацилированным эквивалентом.

Фиг. 10, Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ)

После восьми недель лечения был проведен пероральный тест на толерантность к глюкозе, результаты представлены на Фиг. 10А. Из-за вызванных лечением различий в УГВКН отдельные кривые ПГТТ заметно отличаются. Эта разница выражена в рассчитанных значениях tAUC (Фиг. 10В). Все группы лечения имели значительно более низкую tAUC по сравнению с носителем. Группа обработки ацилированным КВР-066A11.03 имела самое низкое значение tAUC, а также оно было значительно ниже, чем в двух из трех групп лечения неацилированным КВР-066, и со значением $p < 0,06$ по сравнению с последней группой 143 нмоль/кг КВР-066 (Фиг. 10В).

В заключение, совокупные данные показывают, что ацилированный КВР-66A11.03, вводимый подкожно каждые три дня, имеет значительно более благоприятные дополнительные фармакологические преимущества по сравнению с неацилированным КВР-066, вводимым подкожно один раз в день крысам ZDF с ожирением и диабетом.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕРОВ 1-6

Результаты исследований ацилирования по сайту ацилирования

10 Положение A09 (ацилирование в положении 9 пептида)

Ацилирование положения A09 ацилированием **1** дало устойчивую пролонгированную активность *in vivo*, которая заслуживала дальнейшего тестирования (Фиг. 1A-F).

Кроме того, ацилирование положения A09 ацилированием **2** и **3** ослабляет EC50 как на для рецептора CTR, так и для рецептора AMYR и не вызывает длительного
15 ответа на CTR (таблица 3-4).

Однако ацилирование A09 с помощью ацилирования **2** и **3** нарушило ранее наблюдаемую пролонгированную эффективность основного пептида *in vivo*, что сделало эффективность ацилированного КВР аналогичной эффективности носителя. Следовательно, эти ацилирования были менее эффективными, чем неацилированный
20 коровый пептид (Фиг. 2A-B), как в отношении снижения потребления пищи, так и массы тела после однократной подкожной инъекции 36 нмоль/кг соединения.

Поэтому положение A09 не рассматривалось как положение для дальнейшей разработки.

25 Положение A11 (ацилирование пептида в положении 11)

Ацилирование положения A11 ацилированием **1** дало устойчивую пролонгированную активность *in vivo*, которая заслуживала дальнейшего тестирования (Фиг. 1A-F).

Ацилирование положения A11 ацилированием **2** и **3** привело к наилучшему
30 проанализированному значению EC50 как для рецептора CTR, так и для рецептора AMYR и к получению самых высоких значений пролонгированного ответа (tAUC) для всех тестируемых коровых пептидов (таблица 3-4).

Кроме того, ацилирование A11/**3** значительно улучшило *in vivo* активность корового пептида по сравнению с неацилированным коровым пептидом как в

отношении снижения потребления пищи (Фиг. 2А), так и массы тела (Фиг. 2В) после однократной п/к инъекции соединения 36 нмоль/кг. Ацилирование A11/3 также лучше снижало потребление пищи и массу тела, чем любые другие ацилированные положения, при использовании КВР-089 в качестве корового пептида (Фиг. 2А-В).

5 Это различие было дополнительно подчеркнуто в тесте доза-ответ (Фиг. 3А-Ф), в котором все три дозы (4 нмоль/кг, 12 нмоль/кг и 36 нмоль/кг) превосходили соответствующие ацилированные пептиды A32/3. С точки зрения эффективности, самая низкая доза 4 нмоль/кг A11/3 имела профиль, аналогичный профилю ацилированных пептидов A32/3, 36 нмоль/кг. Это было последовательно
10 продемонстрировано для всех тестируемых коровых пептидов (Фиг. 3А-Ф).

Для дальнейшего исследования активности положения A11 с ацилированием 3, КВР-042 и КВР-066, ацилированные в положении A11 с ацилированием 3, были протестированы в высокой дозе (300 нмоль/кг) и по сравнению с неацилированными версиями, чтобы продемонстрировать потенциальный максимальный эффект
15 продолжительной эффективности *in vivo* в сочетании с длительной биодоступностью (Фиг. 4А-Д).

Ацилирование 3 в положении A11 уменьшало потребление пищи более чем на 120 часов, возвращая к уровням потребления пищи в группе носителя через ^ 144 часов как для КВР-042 (Фиг. 4А), так и для КВР-066 (Фиг. 4С). Опосредованная лечением
20 потеря массы тела достигла пика через 96 часов, а масса тела вернулась к исходным уровням через ^ 240 часов как для КВР-042 (Фиг. 4В), так и для КВР-066 (Фиг. 4Д).

В заключение, A11 было лучшим положением, протестированным с точки зрения сохранения активности лиганда и максимизации длительной эффективности *in vivo*.

25

Положение A12 (ацилирование пептида в положении 12)

Положение A12 с ацилированием 1 дало худший результат *in vivo* в исследовании потребления пищи за 4 часа по сравнению с группой носителя (Фиг. 5).

Таким образом, положение A12 не было подходящим кандидатом для
30 ацилирования и в дальнейшем не тестировалось.

Положение A16 (ацилирование пептида в положении 16)

Положение A16 с ацилированием 1 не продемонстрировало пролонгированной активности *in vivo* (Фиг. 1А-Ф).

Таким образом, положение A16 не было подходящим кандидатом для ацилирования **1** и в дальнейшем не тестировалось.

Положение A18 (ацилирование пептида в положении 18)

5 Положение A18 с ацилированием **1** было эффективным в течение 4-24 часового периода тестирования, однако наблюдаемая эффективность не поддерживалась в продолжительном исследовании активности (КВР-347, 48 часов, Фиг. 1F).

 Таким образом, положение A18 не было подходящим кандидатом для ацилирования **1** и в дальнейшем не тестировалось.

10

Положение A32 (ацилирование пептида в положении 32)

 Положение A32 с ацилированием **1** продемонстрировало пролонгированный эффект *in vivo* как на потребление пищи, так и на массу тела и было одним из лучших из протестированных соединений (Фиг. 1A-F).

15 Положение A32 с ацилированием **2** и **3** приводило к худшим значениям EC50 для обоих рецепторов CTR и AMYR по сравнению с положением A11. Ацилирование положения A32 несколько ослабляло опосредованный CTR пролонгированный ответ по сравнению с положением A11, но все же поддерживало пролонгированный ответ (таблица 3-4).

20 Ацилирование в положении A32 улучшало *in vivo* эффективность п/к обработки однократной дозой по сравнению с аналогами без ацилирования для всех тестируемых коровых пептидов.

 Однако положение было хуже, чем A11 во всех испытанных ацилированиях **2** и **3** во время исследований *in vivo* при эквивалентных дозах (Фиг. 2A-B, Фиг. 3A-F).

25 В заключение, положение A32 было посредственным с точки зрения сохранения активности лиганда и повышения эффективности *in vivo* с использованием ацилирования **1**, **2** и **3** по сравнению с положением A11.

ДАЛЬНЕЙШИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АЦИЛИРОВАНИЯ (Примеры 7-12)

Пример 7: анализы β -аррестина и анализы с тиофлавином Т

Дополнительные анализы PathHunter β -Arrestin GPCR проводили с использованием того же протокола, который описан выше в примере 2. В независимых биологических анализах клетки CTR и AMY-R обрабатывали в указанные моменты времени возрастающими дозами КВР, указанными в таблицах 4.1-4.4 (в диапазоне от 1 мкМ до 0,1 нМ и носителем).

Также были проведены анализы с тиофлавином Т. Тиофлавин Т (ThT) представляет собой краситель, широко используемый для обнаружения амилоидных фибрилл. В присутствии фибрилл ThT имеет максимум возбуждения при 450 нм и усиленное излучение при 480 нм, тогда как ThT практически не флуоресцирует на этих длинах волн, когда не связан с амилоидными фибриллами.

Таким образом, ThT в сочетании с флуоресцентным планшет-ридером является идеальным инструментом для скрининга большого количества образцов *in vitro* на наличие амилоидных фибрилл. Анализ ThT, использованный для KBPS, был модификацией процедуры, описанной Nielsen *et al.* (Nielsen L, Khurana R, Coats A, FrØkjaer S, Brange J, Vyas S, *et al.* Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*. 2001; 40 (20): 6036-46.1) для измерения фибрилляции инсулина.

Фибрилляционные скрининговые анализы проводили в 384-луночных планшетах (Greiner Bio-One, 784080) в трехкратных повторях с конечным объемом 20 мкл. Планшеты герметизировали с помощью оптической клейкой пленки для предотвращения испарения образца в ходе анализа.

Планшеты помещали в флуоресцентный планшет-ридер, такой как SpectraMax с программным обеспечением SoftMax Pro 7.0.2, и устанавливали температуру на 37 °C с длиной волны возбуждения 450 нм и длиной волны излучения 480 нм.

Считыватель планшетов должен был измерять флуоресценцию каждые 10 минут в течение 24 часов с пятисекундным встряхиванием планшета перед первым считыванием и трехсекундным встряхиванием планшета перед всеми другими считываниями. Альтернативно, планшет считывали после следующих периодов инкубации; 0, 1, 2, 4 и 24 часа.

Затем строили график с относительными единицами флуоресценции (RFU) как функцией времени. Фибрилляция определяется как увеличение RFU по сравнению с исходным уровнем, как описано Nielsen *et. al.*

В этой заявке четыре уровня фибрилляции были определены на основе 18- часового сигнала флуоресценции, чтобы получить единственный выходной сигнал, который отражает потенциал фибрилляции пептидов: Нет = <1000 RFU, низкий = 1000-3000 RFU, средний = 3000-10000, высокий => 10000

Результаты анализов с тиофлавином Т также показаны в таблицах 4.1-4.4.

Таблица 4.1. Исследование β -аррестина для различной длины ацилирования (КАс-(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(двухосновная кислота от C14 до C26))

Соединения			U2OS (CTR)	CHO-K1 (AMY-R)	Пептид Фибрилляция	Потребление пищи
Ацилированные КВР			β -аррестин	β -аррестин	Тиофлавин Т	Δ ЕДА
			Кратность Захват	Кратность Захват	Δ Флуоресценция 18-часовой анализ	Устойчивое подавление (4 нмоль/кг)
№	Кор Последовательность	Ацилирование Тип	Значения EC50 (10^{-9} М)	Значения EC50 (10^{-9} М)	Оценка	Часы (ч)
356	КВР-066	A11.03	$3,0 \pm 2,4$ (23)	$7,2 \pm 4,7$ (26)	Нет (10)	72-96ч
383	КВР-066	A11.04	$33,0 \pm 10,3$ (3)	$16,6 \pm 2,9$ (3)	Нет (3)	96ч
382	КВР-066	A11.05	$56,1 \pm 10,6$ (3)	$23,3 \pm 4,2$ (3)	Нет (3)	96ч
381	КВР-066	A11.06	$3,9 \pm 0,9$ (3)	$1,0 \pm 0,5$ (3)	Нет (3)	24-48 часов
307	КВР-066	A11.09	$26,6 \pm 6,1$ (3)	149 ± 127 (4)	Нет (3)	72ч
306	КВР-066	A11.10	$65,7 \pm 2,9$ (3)	$82,7 \pm 6,6$ (4)	Нет (3)	48ч
305	КВР-066	A11.11	$2,1 \pm 1,0$ (3)	$0,95 \pm 0,2$ (4)	Нет (3)	24ч
Таблица 4.1: <i>In vitro</i> скрининговые характеристики пептидов.						

Таблица 4.2. Исследование β -аррестина для различных положений ацилирования с использованием основной цепи (КВР-066) и ацилирования **3** (КАс-(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(двухосновная кислота C18))

Соединения			U2OS (CTR)	CHO-K1 (AMY-R)	Пептид Фибрилляция	Потребление пищи
Ацилированные КВР			β- аррестин	β- аррестин	Тиофлавин Т	Δ ЕДА
			Кратность Захват	Кратность Захват	ΔФлуоресценция 18-часовой анализ	Устойчивое подавление (4 нмоль/кг)
№	Кор Последовательность	Ацилирование Тип	Значения EC50 (10 ⁻⁹ М)	Значения EC50 (10 ⁻⁹ М)	Оценка	Часы (ч)
354	КВР-066	A09.03	4,7 ± 0,6 (3) *	93,0 ± 26 (3) *	Нет (3)	4ч
356	КВР-066	A11.03	3,0 ± 2,4 (23)	7,2 ± 4,7 (26)	Нет (10)	72-96ч
386	КВР-066	A12.03	56,5 ± 21,1 (3)	98,9 ± 74,8 (3)	Нет (3)	0-4ч
387	КВР-066	A16.03	25,4 ± 9,9 (3)	21,1 ± 9,9 (3)	Низкая (3)	48ч
388	КВР-066	A18.03	22,8 ± 11,6 (3)	34,7 ± 33,8 (3)	Нет (3)	72ч
389	КВР-066	A19.03	9,4 ± 3,2 (3)	6,5 ± 3,1 (3)	Нет (3)	72-96ч
390	КВР-066	A24.03	11,1 ± 2,8 (3)	6,0 ± 3,3 (3)	Нет (3)	72ч
358	КВР-066	A32.03	44,2 ± 5,7 (3) *	98,6 ± 53 (3) *	Нет (3)	72ч
Таблица 4.2: <i>In vitro</i> скрининговые характеристики пептидов.						
* Данные из оригинальной патентной заявки						

Таблица 4.3. Исследование β-аррестина для различных положений ацилирования с использованием основной цепи (КВР-021) и ацилирования **3** (КАс-(линкер состоящий из глутаминовой кислоты)-(двухосновная кислота C18))

Соединения			U2OS (CTR)	CHO-K1 (AMY-R)	Пептид Фибрилляция	Потребление пищи
Ацилированные КВР			β- аррестин	β- аррестин	Тиофлавин Т	Δ ЕДА
			Кратность Захват	Кратность Захват	ΔФлуоресценция 18-часовой анализ	Устойчивое подавление (4 нмоль/кг)
№	Кор Последовательность	Ацилирование Тип	Значения EC50 (10 ⁻⁹ М)	Значения EC50 (10 ⁻⁹ М)	Оценка	Часы (ч)
312	КВР-021	A09.03	16,7 ± 2,9 (3)	1528 ± 1201 (3)	Низкая (3)	4ч
391	КВР-021	A11.03	12,5 ± 10,9	9,0 ± 2,2 (5)	Нет (3)	72-96ч

			(9)			
393	KBP-021	A11.04	55,1 ± 48,9 (3)	32,8 ± 14,6 (4)	Низкая (3)	72-96ч
394	KBP-021	A11.05	56,9 ± 33,4 (3)	53,9 ± 21,2 (4)	Низкая (3)	24ч
313	KBP-021	A12.03	314 ± 116 (3)	330 ± 124 (4)	Нет (3)	4ч
314	KBP-021	A16.03	183 ± 149 (3)	428 ± 175 (5)	Нет (3)	4ч
315	KBP-021	A18.03	19,2 ± 6,6 (3)	44,9 ± 6,6 (5)	Средняя (3)	48ч
316	KBP-021	A19.03	2,5 ± 1,4 (3)	6,1 ± 1,8 (5)	Высокая (3)	72-96ч
395	KBP-021	A19.05	95,2 ± 95,2 (3)	32,9 ± 12,7 (4)	Высокая (3)	72-96ч
317	KBP-021	A24.03	12,8 ± 12,8 (3)	31,5 ± 7,4 (5)	Нет (3)	24ч
318	KBP-021	A32.03	197 ± 83,6 (3)	301 ± 225 (5)	Низкая (3)	4ч
Таблица 4.3: <i>In vitro</i> скрининговые характеристики пептидов.						

Таблица 4.4. Исследование β-аррестина для различных линкеров ацилирования с использованием одной и той же основной цепи (KBP-066) и того же ацилирования (двухосновная кислота C18))

Соединения			U2OS (CTR)	CHO-K1 (AMY-R)	Пептид Фибрилляция	Потребление пищи
Ацилированные KBP			β- аррестин	β- аррестин	Тиофлавин Т	Δ ЕДА
			Кратность Захват	Кратность Захват	ΔФлуоресценция 18-часовой анализ	Устойчивое подавление (4 нмоль/кг)
№	Кор Последовательность	Ацилирование Тип	Значения EC50 (10 ⁻⁹ М)	Значения EC50 (10 ⁻⁹ М)	Оценка	Часы (ч)
385	KBP-066	A11.07	20,1 ± 11,1 (3)	9,3 ± 1,7 (2)	Нет (3)	72ч
384	KBP-066	A11.08	29,7 ± 29,2 (3)	6,9 ± 1,1 (3)	Низкая (3)	72ч
356	KBP-066	A11.03	3,0 ± 2,4 (23)	7,2 ± 4,7 (26)	Нет (10)	72-96ч
Таблица 4.4: <i>In vitro</i> скрининговые характеристики пептидов.						

5

РЕЗУЛЬТАТЫ-Длина цепи ацильной группы

Что касается активности *in vitro* как функции длины цепи ацильной группы, существует четкая корреляция между длиной цепи ацильной группы и

эффективностью *in vitro*. Значения EC50 как для CTR, так и для AMYR при самой короткой длине цепи ацильной группы, **11** (двухосновная кислота C14) и **6** (двухосновная кислота C16), были самыми низкими значениями EC50 для обоих рецепторов (таблица 4.1), тогда как самые длинные цепи ацильной группы, **9** (двухосновная кислота C24) и **10** (C26 дикислота), давала одни из самых высоких зарегистрированных значений EC50 для обоих рецепторов.

Ни один из протестированных ацилированных пептидов в этой серии с использованием основной цепи КВР-066 не имел проблем с фибрилляцией.

10 РЕЗУЛЬТАТЫ-Положение ацильной группы на основной цепи КВР-066

Значения EC50 для CTR и AMYR для этой серии перечислены в таблице 4.2. Что касается активности *in vitro* как функции положения ацильной группы на основной цепи КВР-066, три положения выделяются как мощные двойные агонисты рецепторов кальцитонина и амилина. Все A11, A19 и A24 имеют значения EC50 для обоих рецепторов в диапазоне 5×10^{-9} М как единственные, тогда как все остальные тестируемые положения имеют меньшие значения по сравнению. Повышенная активность A11, A19 и A24, по-видимому, приводит к повышению эффективности *in vivo* для основной цепи КВР-066 (см. Фиг. 15, 17 и 18, описанные ниже). Интересно, что A09 является одним из лучших агонистов CTR, но имеет низкую активность AMYR, что позволяет предположить, что ацилирование вблизи N-конца может нарушить активность AMYR и создать смещенный лиганд.

По-видимому, фибрилляция не является проблемой для основной цепи КВР-066 в большинстве положений, поскольку только один пептид (КВР-066A16.03 (387)) дал «низкий» результат в анализе с ThT.

25 РЕЗУЛЬТАТЫ-Положение ацильной группы на основной цепи КВР-021

Значения EC50 для CTR и AMYR для этой серии перечислены в таблице 4.3. Что касается активности *in vitro* как функции положения ацильной группы на основной цепи КВР-021, два положения выделяются как сильные двойные агонисты. A11 и A19 оба, имеют значения EC50 для обоих рецепторов в диапазоне 5×10^{-9} М как единственные, тогда как все остальные тестируемые положения имеют меньшие значения по сравнению. Повышенная активность A11 и A19, по-видимому, приводит к повышению эффективности *in vivo* для основной цепи КВР-021 (см. Фиг. 16, описанная ниже).

Интересно, что фибрилляция, по-видимому, является проблемой для основной цепи КВР-021, где положение A19 как единственного протестированного пептида получило оценку «высокая» в анализе с ThT, несмотря на хорошую эффективность как *in vitro*, так и *in vivo*. Положение рядом с ним «A18» также имеет высокую оценку с оценкой «средняя» в анализе с ThT, что свидетельствует о том, что основная цепь КВР-021 подвержена фибрилляции при ацилировании в этой области основной цепи.

Кроме того, более длинные ацильные группы, по-видимому, также увеличивают фибрилляцию для этой основной цепи, КВР-021, поскольку ацилирование 4 и 5 в положении A11 имеет оценку «низкая» в анализе с ThT, однако эта проблема не влияет на предпочтительное положение A11 с ацилированием 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ-Ацильный линкер

Значения EC50 для CTR и AMYR для этой серии перечислены в таблице 4.4. С точки зрения активности *in vitro* как функции положения ацильной группы на основной цепи КВР-066 линкер ОЭГ-ОЭГ-γGLU (356) имеет почти в 10 раз лучший показатель EC50 к CTR по сравнению с ОЭГ-ОЭГ-ОЭГ-γGLU (385) и ОЭГ-γGLU (384), однако все линкеры имеют очень похожие EC50 в диапазоне 5×10^{-9} М для AMYR.

Что касается фибрилляции, самый короткий линкер, ОЭГ-γGLU (384), давал оценку «низкая» в анализе с ThT, тогда как два других линкера давали оценку «нет».

Пример 8: (Фиг. 11)

Сравнительный эффект однократной дозы нескольких ацилированных вариантов (3, 4, 5, 6, 9, 10, 11) в одной и той же позиции, и основной цепи, A11 и КВР-066, соответственно, на потребление пищи и массу тела в краткосрочных условиях в 20-недельных крысах SD на ВЖД (HFD) в течение 8 недель до эксперимента.

КВР	Кор	Длина цепи ацильной группы	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-356	КВР-066	Двухосновная кислота C18	КВР-066A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-383	КВР-066	Двухосновная кислота C20	КВР-066A11.04	A11/ацилирование 4
КВР-382	КВР-066	Двухосновная кислота C22	КВР-066A11.05	A11/ацилирование 5
КВР-381	КВР-066	Двухосновная кислота C16	КВР-066A11.06	A11/ацилирование 6
КВР-307	КВР-066	Двухосновная	КВР-066A11.09	A11/ацилирование 9

		кислота C24		
КВР-306	КВР-066	Двухосновная кислота C26	КВР-066A11.10	A11/ацилирование 10
КВР-305	КВР-066	Двухосновная кислота C14	КВР-066A11.11	A11/ацилирование 11

За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на восемь групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 3 нмоль/кг (10^{-11} мкг/кг)). Их не кормили в течение ночи, а затем утром вводили

5 однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов, 48-72 часа и 72-96 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 4 часа, 24 часа, 48 часа, 72 часа и 96 часов после п/к инъекции.

10 **Результаты на Фиг. 11-потребление пищи и масса тела**

Ацилирование **6, 10, 11** способно снизить потребление пищи и массу тела с пиковым подавлением через 24 часа с последующим восстановлением до уровней носителя. Ацилирование **9** способно снизить потребление пищи и массу тела с пиковым подавлением через 48 часов с последующим восстановлением до уровней

15 носителя. Ацилирование **3** способно снизить потребление пищи и массу тела с пиковым подавлением через 72 часа с последующим восстановлением до уровней носителя. Ацилирования **4 и 5** были способны снизить потребление пищи и массу тела с пиковым подавлением через 96 часов с последующим восстановлением.

Следовательно, ацилирования **3, 4 и 5** являются все главными кандидатами на вариацию длины цепи ацильной группы, как начальная цель состояла в том, чтобы подавить потребление пищи и массы тела в течение как минимум 72 часов на каждый

20 3^й день дозирования у грызунов, что как представляется, будет транслироваться в дозирование в один раз в неделю у человека.

25 **Пример 9 (Фиг. 12, 13 и 14)**

Дальнейшую работу проводили с лучшими вариантами из краткосрочного тестирования, ацилированных вариантов (**3, 4, 5**), и проводили исследование с использованием повторных дозировок для сравнительного эффекта ацилирования с тем же положением и основной цепью, A11 и КВР-066, соответственно. Потребление

30 пищи и массу тела оценивали в хронических условиях (пятинедельное исследование)

на 20-недельных крысах SD, получавших ВЖД (HFD) в течение 8 недель до начала исследования.

КВР	Кор	Длина цепи ацильной группы	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-356	КВР-066	Двухосновная кислота C18	КВР-066A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-383	КВР-066	Двухосновная кислота C20	КВР-066A11.04	A11/ацилирование 4
КВР-382	КВР-066	Двухосновная кислота C22	КВР-066A11.05	A11/ацилирование 5

Крыс помещали в клетки по две и две и рандомизировали по массе тела в группы обработки (наполнитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 3 нмоль/кг ($\wedge$ 14 мкг/кг)). За потреблением пищи и массой тела следили ежедневно в течение 35 дней. В конце исследования выполняли ПГТТ с последующим умерщвлением животного, у которого извлекали и взвешивали жировую ткань.

Хроническое лечение крыс-самцов SD на ВЖД (HFD):

Крысы были доставлены в виварий Nordic Bioscience в возрасте двенадцати недель, и сразу же переводили их на ВЖД (HFD) и кормили в течение еще восьми недель. Перед началом исследования крыс рандомизировали по массе тела. Исследование начинали на 1 День.

Концентрации и частота дозирования

Животным вводили КВР один раз в три дня. Дозировка вводилась подкожно (п/к) около полудня каждый день. Соединения растворяли в физиологическом растворе и хранили при -20 °C. Непосредственно перед введением аликвоты размораживали.

Физиологический раствор: Объем дозировки составлял 1 мл/кг.

КВР: Объем дозировки составлял 1 мл/кг, концентрация дозировки составляла 4 нмоль/кг.

Эквивалент дозы в мкг/кг составил $\wedge$ 14 мкг/кг. Общая еженедельная доза на группу лечения: 4 нмоль/кг КВР соответствует 28 нмоль/кг/неделю или $\wedge$ 100 мкг/кг/неделю

Сбор результатов тестирования

1 День: (первый день дозирования исследования)

1-35 День: Ежедневный контроль потребления пищи и массы тела

35 День: Масса тела в конце исследования

5 35 День: Пероральный тест на толерантность к глюкозе

35 День: Умерщвление + взвешивание жировой ткани

Пероральный тест на толерантность к глюкозе

10 Пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) проводили через пять недель лечения. Для расчета введенной дозы глюкозы использовали массу тела за день до теста. Животных не кормили в течение 11 часов. Тепло было приложено в течение около 45 мин до момента времени -30 мин (см. Фиг. ниже). Животным вводили дозу КВР или носитель за день до ПГТТ.

15 График ПГТТ



20 G

BG = уровень глюкозы в крови.

G = глюкоза (перорально. 1 г глюкозы/кг МТ, 2 мл/кг))

25

Белая жировая ткань (БЖТ) Взвешивание

Все эпидидимальные и периренальные депо БЖТ вырезали и взвешивали. Для паховой БЖТ фиксированная анатомически ограниченная область была вырезана и взвешена.

30

На Фиг. 12 представлены потребление пищи и масса тела

На Фиг. 12 представлено изменение в потреблении пищи и массы тела с течением времени во время хронического исследования в зависимости от лечения. На Фиг. 12А представлена динамика потребления пищи между ацилированиями 3, 4 и 5,

тогда как на Фиг. 12В представлена потеря массы тела, опосредованная ацилированием **3, 4 и 5**. Очевидно, что все три ацилирования приводят к значительному снижению массы тела после 5 недель лечения, однако нет различий между ацилированием **3, 4 и 5** с точки зрения эффективности в отношении массы тела.

5

На Фиг. 13 представлены ПГТТ и жировая ткань

На Фиг. 13 представлены результаты ПГТТ с соответствующим iAUC (ПГТТ) (Фиг. А + В), который соответствовал массе трех различных жировых тканей, эпидидимальной, паховой и периренальной (Фиг. 13С-Е), а также массе тела в конце исследования (Фиг. 13F). Обработка ацилированием **3** приводила к значительному снижению iAUC (ПГТТ), размера эпидидимальной БЖТ, размера паховой БЖТ и массы тела в исследовании. Обработка ацилированием **4 и 5** приводила к значительному снижению iAUC (ПГТТ), размера эпидидимальной БЖТ и массы тела в конце исследования, но не влияла на размер периренальной БЖТ. Ни одно лечение не привело к значительному уменьшению размера паховой БЖТ. Ацилирование **3** вело себя немного лучше относительно носителя, по сравнению с **4/5**, но не было никаких существенных различий между группами лечения.

10

15

На Фиг. 14 представлено конкурентное связывание лиганда sCT I-125

Чтобы исследовать, может ли улучшенная эффективность ацилирования **4 и 5** в краткосрочных условиях транслироваться в исследовании на человеке, был проведен конкурентный анализ связывания лиганда для изучения связывания ацилирования с сывороточным альбумином у грызунов и человека. На Фиг. 14 представлено конкурентное связывание KBP-066A11.03 и KBP-066A11.05 с радиоактивно меченным I-125 кальцитонином лосося (NEX423, Perkin Elmer) в 2% сывороточном альбумине грызунов (RSA) (Фиг. 4А) или 2% сывороточном альбумине человека (HSA) (Фиг. 4В). Когда проводили анализ с 2% HSA, различий в EC₅₀ между ацилированием **3 и 5** найдено не было. Однако, когда анализ проводили анализ с RSA, ацилирование **5** сдвигало IC₅₀ дальше вправо, предполагая более сильное сродство к RSA в анализе. Следовательно, повышенная эффективность, наблюдаемая в краткосрочных условиях у грызунов, скорее всего, является феноменом, уникальным для грызунов, и транслируется на человека.

20

25

30

Пример 10 (Фиг. 15)

Сравнительный эффект однократной дозы ацилированных **3** вариантов в разных положениях (9 положение «A09», 11 положение «A11», 12 положение «A12», 16 положение «A16», 18 положение «A18», 19 положение «A19» и 32 положение «A32») относительно друг друга в зависимости от потребления пищи и массы тела у 20-недельных крыс SD на ВЖД (HFD).

КВР	Кор	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-354	КВР-066	КВР-066A09.03	A9/ацилирование 3
КВР-356	КВР-066	КВР-066A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-386	КВР-066	КВР-066A12.03	A12/ацилирование 3
КВР-387	КВР-066	КВР-066A16.03	A16/ацилирование 3
КВР-388	КВР-066	КВР-066A16.03	A18/ацилирование 3
КВР-389	КВР-066	КВР-066A18.03	A19/ацилирование 3
КВР-390	КВР-066	КВР-066A19.03	A24/ацилирование 3
КВР-358	КВР-066	КВР-066A24.03	A32/ацилирование 3

За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на восемь групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 4 нмоль/кг (10^{-11} мкг/кг)). Их не кормили в течение ночи, а затем утром вводили однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов, 48-72 часа и 72-96 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 4 часа, 24 часа, 48 часа, 72 часа и 96 часов после п/к инъекции. Были протестированы две основные цепи: КВР-066 и КВР-021.

На Фиг. 15 представлены потребление пищи и масса тела

Что касается положения на основной цепи, результаты КВР-066 следующие. При 4 нмоль/кг в краткосрочных условиях (Фиг. 5) положения A11 и A19 были двумя лучшими положениями для подавления как потребления пищи в течение 72 часов, так и массы тела в течение 96 часов. Третьим лучшим положением было A24, за ним следовали A18 и A16. Наименее активным положением для ацилирования было A12, которое выглядит невыгодным для ацилирования, поскольку оно несколько мешает опосредованной DACRA эффективности как в отношении потребления пищи, так и в отношении массы тела.

На основании этих данных, A11 и A19 являются предпочтительными положениями для ацилирования основной цепи КВР-066.

На Фиг. 16 представлены потребление пищи и масса тела

- 5 При использовании другой основной цепи, КВР-021, с теми же экспериментальными условиями, что и для КВР-066, поведение положения немного отличалось.

КВР	Кор	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-312	КВР-021	КВР-021A09.03	A9/ацилирование 3
КВР-391	КВР-021	КВР-021A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-313	КВР-021	КВР-021A12.03	A12/ацилирование 3
КВР-314	КВР-021	КВР-021A16.03	A16/ацилирование 3
КВР-315	КВР-021	КВР-021A16.03	A18/ацилирование 3
КВР-316	КВР-021	КВР-021A18.03	A19/ацилирование 3
КВР-317	КВР-021	КВР-021A19.03	A24/ацилирование 3
КВР-318	КВР-021	КВР-021A24.03	A32/ацилирование 3

- 10 При 3 нмоль/кг в краткосрочных условиях (Фиг. 6) положения A11 и A19 были двумя лучшими положениями для подавления как потребления пищи в течение 72 часов, так и массы тела в течение 96 часов, как это наблюдалось для основной цепи КВР-066. Третьим лучшим положением было A18, но оно было намного хуже, чем A11 и A19. Положение A24 было лучше, чем в случае носителя, но далеко не таким, как наблюдалось для основной цепи КВР-066. Положения A16, A12 и A09 не отличались от носителя как при оценке потребления пищи, так и при оценке массы тела, что
- 15 позволяет предположить, что положения, в которых они были ацилированы, были невыгодными, поскольку они негативно повлияли на пептидную активность.

- Однако, как показано в таблице 4.3 с характеристиками *in vitro*, у A19 и A18 есть серьезные проблемы с точки зрения потенциала фибрилляции в сочетании с КВР-021, что делает A11 предпочтительным положением для ацилирования, когда речь идет
- 20 об основной цепи КВР-021.

Пример 11 (Фиг. 17 и 18)

- Дальнейшую работу проводили с лучшими вариантами из краткосрочного тестирования, ацилированных позиций (A11 и A19), и проводили исследование с использованием повторных дозировок для сравнительного эффекта ацилирования с
- 25

тем же ацилированием и основной цепью, а именно ацилирования **3** и KBP-066, соответственно.

Потребление пищи и массу тела оценивали в хронических условиях (пятинедельное исследование) на 20-недельных крысах SD, получавших ВЖД (HFD) в течение 8 недель до начала исследования.

КВР	Кор	Положение ацилирования	Замечания	Положение/Ацилирование
KBP-356	KBP-066	A11	KBP-066A11.03	A11/ацилирование 3
KBP-389	KBP-066	A19	KBP-066A19.03	A19/ацилирование 3

Следовали протоколу эксперимента, описанному выше в примере 9. Вкратце, крыс помещали в клетки по две и две и рандомизировали по массе тела в группы обработки (наполнитель (0,9% NaCl), KBP (дозы: 4 нмоль/кг (^ 14 мкг/кг)). За потреблением пищи и массой тела следили ежедневно в течение 35 дней. В конце исследования выполняли ПГТТ с последующим умерщвлением животного, у которого извлекали и взвешивали жировую ткань.

На Фиг. 17 представлены потребление пищи и масса тела для хронических условий для A11 по сравнению с A19

На Фиг. 17 представлено изменение потребления пищи (Фиг. 17А) и массы тела (Фиг. 17В) с течением времени во время хронического исследования в зависимости от лечения. Очевидно, что A11 и A19 подавляют потребление пищи аналогичным образом и приводят к значительному снижению массы тела после 5 недель лечения, однако нет никакой разницы между положением A11 и A19 с точки зрения эффективности в отношении снижения массы тела.

На Фиг. 18 представлены ПГТТ и жировая ткань

На Фиг. 18 представлены результаты ПГТТ с соответствующим iAUC (ПГТТ) (Фиг. А + В), а также масса трех различных жировых тканей, эпидидимальной, паховой и периренальной (Фиг. 18С-Е), и масса тела в конце исследования (Фиг. 18F). Обработка положением A11 приводила к значительному снижению iAUC (ПГТТ), размера эпидидимальной БЖТ, размера перипочечной БЖТ и массы тела в исследовании. Лечение положением A19 привело к значительному снижению iAUC (ПГТТ), размера эпидидимальной БЖТ и массы тела, как в исследовании, но не

размера периренальной БЖТ. Ни одно лечение не привело к значительному уменьшению размера паховой БЖТ. Положение A11 вело себя немного лучше относительно носителя по сравнению с положением A19, но не было никаких существенных различий между группами лечения.

5

Пример 12 (Фиг. 19)

Сравнительный эффект однократной дозы трех ацилированных вариантов линкеров (**3**, **7** и **8**) в одной и той же позиции и основной цепи, A11 и KBP-066, соответственно, на потребление пищи и массу тела в краткосрочных условиях в 20-недельных крысах SD на ВЖД (HFD) в течение 8 недель до эксперимента.

10

КВР	Кор	Длина цепи ацильной группы	Линкер ацилирования	Замечания	Положение/Ацилирование
КВР-356	КВР-066	Двухосновная кислота C18	ОЭГ-ОЭГ-γGLU	КВР-066A11.03	A11/ацилирование 3
КВР-385	КВР-066	Двухосновная кислота C18	ОЭГ-ОЭГ-ОЭГ-γGLU	КВР-066A11.07	A11/ацилирование 7
КВР-384	КВР-066	Двухосновная кислота C18	ОЭГ-γGLU	КВР-066A11.08	A11/ацилирование 8

За четыре дня до теста крыс содержали в одиночной клетке. Крыс рандомизировали по массе тела на восемь групп (носитель (0,9% NaCl), КВР (дозы: 4 нмоль/кг (¹³-14 мкг/кг)). Их не кормили в течение ночи, а затем утром вводили однократную дозу пептида или носителя путем подкожного введения. За потреблением пищи следили в следующих интервалах (0-4 часа, 4-24 часа, 24-48 часов, 48-72 часа и 72-96 часов). Массу тела измеряли на исходном уровне и через 4 часа, 24 часа, 48 часа, 72 часа и 96 часов после п/к инъекции.

15

На Фиг. 19 представлены потребление пищи и масса тела

Все три протестированных линкера хорошо работали в краткосрочных условиях и подавляли потребление пищи (Фиг. 19А) в течение 72 часов до восстановления. Ацилирование **3** показывало результаты немного лучше, чем **7** и **8** после 96 часов. Это было очевидно из соответствующей потери массы тела (Фиг. 19В), где ацилирование **3** отделялось от ацилирования **7** и **8** на ранней стадии (24 часа) и продолжало отделяться в двух следующих временных точках, 72 часа и 96 часов.

25

Кроме того, с точки зрения потенциала фибрилляции (таблица 4.4), ацилирование **8**, по-видимому, имеет некоторые незначительные тенденции, которые могут затруднить дальнейшую разработку соединения с использованием этого типа ацилирования.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕРОВ 7-12

Длина цепи ацильной группы

Собранные данные на Фиг. 11-14 и в Таблице 4.1 показывают, что ацилирование **3**, **4** и **5** в диапазоне от двухосновной кислоты C18 до двухосновной кислоты C22 является взаимозаменяемым при разработке ацилированных пептидов для режима дозирования один раз в неделю для человека.

Следовательно, двухосновные кислоты C18, C20 и C22 имеют предпочтительную длину ацильной группы для данного изобретения.

15

Положение ацилирования

Собранные данные на Фиг. 15, 17 и 18 продемонстрировали, что A19 может иметь небольшое преимущество в краткосрочных условиях, тогда как A11 имеет небольшое преимущество в хронических условиях при использовании основной цепи КВР-066 и ацилирования **3**.

20

Ни у A11, ни у A19 не было проблем с фибрилляцией в сочетании с основной цепью КВР-066 (таблица 4.2).

В целом, эти данные предполагают, что положения ацилирования A11 и A19 вместе с КВР-066 являются двумя лучшими универсальными положениями для ацилирования для разработки режима дозирования один раз в неделю для человека.

25

Следовательно, A11 и A19 являются предпочтительными положениями для ацилирования КВР-066.

Аналогичным образом, на основании таблицы 4.3 и Фиг. 16 очевидно, что A11 и A19 являются двумя лучшими положениями ацилирования при сочетании с КВР-021.

30

Однако, поскольку A19 очень склонно к фибрилляции в этих условиях, A11 с ацилированием **3** является предпочтительным положением и длиной ацильной группы для основной цепи КВР-021, исходя из общих характеристик.

Линкер ацилирования

На основании этого теста и таблицы 4.4 оказывается, что линкер ОЭГ-ОЭГ- γ GLU является оптимальным линкером, поскольку его укорочение создает потенциальные проблемы фибрилляции, а его удлинение в лучшем случае ничего не дает. Кроме того, как показано на Фиг. 19, линкер ОЭГ-ОЭГ- γ GLU также был лучшим в краткосрочных условиях, *in vivo*, что делало его в целом предпочтительным линкером ацилирования.

В данном описании изобретения, если явно не указано иное, слово «или» используется в смысле оператора, который возвращает истинное значение, когда выполняется одно или оба из указанных условий, в отличие от оператора «исключающее или», который требует, чтобы выполнялось только одно из условий. Слово «содержащий» используется скорее в значении «включающий», чем в значении «состоящий из». Все предшествующие идеи, упомянутые выше, включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Миметик кальцитонина, который ацилирован по остатку лизина,
расположенному в положении 11 миметика кальцитонина, и/или который
ацилирован по остатку лизина, расположенному в положении 19 миметика
кальцитонина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи указанного лизинового
остатка ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из
следующего:
жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью с
необязательным линкером, или
двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более
длинной цепью с необязательным линкером.

2. Миметик кальцитонина по п. 1, отличающийся тем, что миметик кальцитонина
представляет собой миметик кальцитонина формулы (I)(a):
 $CX_2X_3LSTCX_8LGK_{Ac}...$,
где
 $X_2 = A, G$ или S
 $X_3 = N$ или S
 $X_8 = M, V$ или α -аминоизомасляная кислота (AiB),
и где K_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой
цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из
следующего:
жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью с
необязательным линкером, или
двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более
длинной цепью с необязательным линкером.

3. Миметик кальцитонина по п. 1, отличающийся тем, что миметик кальцитонина
представляет собой миметик кальцитонина формулы (I)(b):
 $CX_2X_3LSTCX_8LGX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}K_{Ac}...$,
где
 $X_2 = A, G$ или S
 $X_3 = N$ или S

$X_8 = M, V$ или α -аминоизомасляная кислота (AiB)

$X_{11} = R, K, T, A$ или **KAc**

$X_{12} = L$ или Y

$X_{13} = S, T, W$ или Y

5 $X_{14} = Q, K, R$ или A

$X_{15} = D, E$ или N

$X_{16} = L$ или F

$X_{17} = H$ или N

$X_{18} = R, K$ или N,

10 и где **KAc** представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером, или

15 двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью с необязательным линкером.

4. Миметик кальцитонина по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что миметик кальцитонина представляет собой миметик кальцитонина формулы (II):

20

$CX_2X_3LSTCX_8LGX_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}GX_{29}X_{30}X_{31}P$

где

$X_2 = A, G$ или S

$X_3 = N$ или S

25 $X_8 = M, V$ или α -аминоизомасляная кислота (AiB)

$X_{11} = \mathbf{KAc}, R, K, T$ или A

$X_{12} = L$ или Y

$X_{13} = S, T, W$ или Y

$X_{14} = Q, K, R$ или A

30 $X_{15} = D, E$ или N

$X_{16} = L$ или F

$X_{17} = H$ или N

$X_{18} = R, K$ или N

$X_{19} = \mathbf{KAc}, L, F$ или K

$X_{20} = Q, H$ или A

$X_{21} = T$ или R

$X_{22} = Y$ или F

$X_{23} = S$ или P

5 $X_{24} = G, K, Q$ или R

$X_{25} = T, I$ или M

$X_{26} = S, N, D, G$ или A

$X_{27} = T, V, F$ или I

$X_{29} = S, A, P$ или V

10 $X_{30} = N, G$ или E

$X_{31} = A, T$ или S ,

где или X_{11} представляет собой **K_{Ac}**, и/или X_{19} представляет собой **K_{Ac}**,

и где **K_{Ac}** представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из

15 следующего:

жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью,

двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью,

линкер- C_{16} жирной кислоты или линкер-жирной кислоты с более длинной

20 цепью, или

линкер-двухосновной C_{16} жирной кислоты или линкер-двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью.

5. Миметик кальцитонина по п. 4, отличающийся тем, что миметик кальцитонина
25 формулы (II) представляет собой:

$CX_2X_3LSTCX_8LGX_{11}LX_{13}X_{14}X_{15}LX_{17}X_{18}X_{19}X_{20}TX_{22}PX_{24}TDVGANAP$,

где

$X_2 = A, G$ или S

$X_3 = N$ или S

30 $X_8 = M, V$ или AiB

$X_{11} = \mathbf{K_{Ac}}, R, K, T$ или A

$X_{13} = T, S$ или Y

$X_{14} = Q$ или A

$X_{15} = D$ или E

$X_{17} = \text{H}$ или N

$X_{18} = \text{R}$ или K

$X_{19} = \mathbf{K_{Ac}}$, L , F или K

$X_{20} = \text{Q}$, H или A

5 $X_{22} = \text{Y}$ или F

$X_{24} = \text{K}$, Q или R ,

где или $X_{11} = \mathbf{K_{Ac}}$ и/или $X_{19} = \mathbf{K_{Ac}}$,

и где $\mathbf{K_{Ac}}$ представляет собой остаток лизина, причем ϵ -аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из
10 следующего:

жирной кислоты C_{16} или жирной кислоты с более длинной цепью,

двухосновной жирной кислоты C_{16} или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью,

линкер- C_{16} жирной кислоты или линкер-жирной кислоты с более длинной
15 цепью, или

линкер- двухосновной C_{16} жирной кислоты или линкер-двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью.

6. Миметик кальцитонина по п. 4 или 5, отличающийся тем, что X_2 представляет собой S , и X_3 представляет собой N ; или X_2 представляет собой G и X_3 представляет собой N ; или X_2 представляет собой A , и X_3 представляет собой S .

7. Миметик кальцитонина по любому из пп. 4-6, отличающийся тем, что
25 - X_{11} представляет собой $\mathbf{K_{Ac}}$, X_{17} представляет собой H , X_{18} представляет собой K , X_{19} представляет собой L и X_{20} представляет собой Q или A ; или
- X_{11} представляет собой $\mathbf{K_{Ac}}$, X_{17} представляет собой H , X_{18} представляет собой R , X_{19} представляет собой L и X_{20} представляет собой Q или A ; или
- X_{11} представляет собой $\mathbf{K_{Ac}}$, X_{17} представляет собой N , X_{18} представляет собой K , X_{19} представляет собой F и X_{20} представляет собой H или A ; или
30 - X_{11} представляет собой $\mathbf{K_{Ac}}$, X_{17} представляет собой N , X_{18} представляет собой R , X_{19} представляет собой F и X_{20} представляет собой H или A ; или
- X_{11} представляет собой R или K , X_{17} представляет собой H , X_{18} представляет собой K , X_{19} представляет собой $\mathbf{K_{Ac}}$ и X_{20} представляет собой Q или A ; или

- X_{11} представляет собой R или K, X_{17} представляет собой H, X_{18} представляет собой R, X_{19} представляет собой K_{Ac} и X_{20} представляет собой Q или A; или
- X_{11} представляет собой R или K, X_{17} представляет собой N, X_{18} представляет собой K, X_{19} представляет собой K_{Ac} и X_{20} представляет собой H или A; или
- 5 - X_{11} представляет собой R или K, X_{17} представляет собой N, X_{18} представляет собой R, X_{19} представляет собой K_{Ac} и X_{20} представляет собой H или A.
8. Миметик кальцитонина по любому из пп. 4-7, отличающийся тем, что X_2 представляет собой S, X_3 представляет собой N, X_{11} представляет собой K_{Ac} ,
 10 X_{13} представляет собой S, X_{17} представляет собой H, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой L, X_{20} представляет собой Q или A, и X_{22} представляет собой Y; или где X_2 представляет собой S, X_3 представляет собой N, X_{11} представляет собой R или K, X_{13} представляет собой S, X_{17} представляет собой H, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой K_{Ac} , X_{20}
 15 представляет собой Q или A, и X_{22} представляет собой Y.
9. Миметик кальцитонина по любому из пп. 4-7, отличающийся тем, что X_2 представляет собой A, X_3 представляет собой S, X_{11} представляет собой K_{Ac} ,
 20 X_{13} представляет собой S, X_{17} представляет собой H, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой L, X_{20} представляет собой Q или A, и X_{22} представляет собой F; или где X_2 представляет собой A, X_3 представляет собой S, X_{11} представляет собой R или K, X_{13} представляет собой S, X_{17} представляет собой H, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой K_{Ac} , X_{20}
 25 представляет собой Q или A, и X_{22} представляет собой F.
10. Миметик кальцитонина по любому из пп. 4-7, отличающийся тем, что X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой N, X_{11} представляет собой K_{Ac} ,
 30 X_{13} представляет собой T, X_{17} представляет собой N, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой F, X_{20} представляет собой H или A, и X_{22} представляет собой F; или где X_2 представляет собой G, X_3 представляет собой N, X_{11} представляет собой R или K, X_{13} представляет собой T, X_{17} представляет собой N, X_{18} представляет собой K или R, X_{19} представляет собой K_{Ac} , X_{20}
 представляет собой H или A, и X_{22} представляет собой F.

11. Миметик кальцитонина по п. 1, отличающийся тем, что миметик кальцитонина представляет собой 33-мерный пептид в соответствии с формулой (III):

CSNLSTCX₆LGX₇LSQDLHRX₈QTYPKX₁TX₅VGANAP

или при этом миметик кальцитонина представляет собой 35-мерный пептид в соответствии с формулой (IV):

CSNLSTCX₆LGX₇LSQDLHRX₈QTYPKX₁X₂X₃TX₅VGANAP

или при этом миметик кальцитонина представляет собой 36-мерный пептид в соответствии с формулой (V):

CSNLSTCX₆LGX₇LSQDLHRX₈QTYPKX₁X₂X₃X₄TX₅VGANAP

или при этом миметик кальцитонина представляет собой 37-мерный пептид в соответствии с формулой (VI):

CSNLSTCX₆LG**K**_{Ac}LZX₁X₂X₃X₄TX₅VGANAP,

где каждый из X₁-X₄ представляет собой любую аминокислоту, при условии, что по меньшей мере один из X₁-X₄ представляет собой остаток основной

аминокислоты и/или по меньшей мере два из X₁-X₄ независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере один из X₁-X₄ представляет собой остаток Gly, и при этом ни один из X₁-X₄ не представляет собой остаток кислой аминокислоты; где X₅ представляет собой D или N;

где X₆ представляет собой AiB или M;

где или X₇ представляет собой **K**_{Ac} и X₈ представляет собой L, или X₇

представляет собой R или K, и X₈ представляет собой **K**_{Ac};

где Z выбран из SQDLHRLSNNFGA, SQDLHRLQTYGAI или

ANFLVHSSNNFGA; и

где **K**_{Ac} представляет собой остаток лизина, причем ε-аминогруппа боковой цепи ацилирована ацильной группой, выбранной из любого одного из следующего:

жирной кислоты C₁₆ или жирной кислоты с более длинной цепью,

жирной кислоты C₁₆ или двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью,

линкер-C₁₆ жирной кислоты или линкер-жирной кислоты с более длинной цепью, или

линкер-двухосновной C₁₆ жирной кислоты или линкер-двухосновной жирной кислоты с более длинной цепью.

12. Миметик кальцитонина по п. 11, отличающийся тем, что по меньшей мере один из X_1 или X_4 представляет собой остаток основной аминокислоты.
- 5 13. Миметик кальцитонина по пп. 11 или 12, отличающийся тем, что по меньшей мере один из X_1 или X_4 представляет собой остаток основной аминокислоты и по меньшей мере два из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты.
- 10 14. Миметик кальцитонина по пп. 11-13, отличающийся тем, что по меньшей мере три из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты.
- 15 15. Миметик кальцитонина по пп. 11-14, отличающийся тем, что все из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой остаток кислой аминокислоты.
- 20 16. Миметик кальцитонина по пп. 11-15, отличающийся тем, что все из X_1 - X_4 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты или остаток основной аминокислоты, по меньшей мере три из X_1 - X_4 представляют собой остаток основной аминокислоты, и ни один из X_1 - X_4 не представляет собой
- 25 остаток кислой аминокислоты.
17. Миметик кальцитонина по пп. 11-16, отличающийся тем, что остатки основной аминокислоты выбраны из Arg, His или Lys, и/или остатки полярной аминокислоты выбраны из Ser, Thr, Asn, Gln или Cys.
- 30 18. Миметик кальцитонина по пп. 11-17, отличающийся тем, что X_1 выбран из Asn, Phe, Val, Gly, Ile, Leu, Lys, His или Arg;
 X_2 выбран из Ala, Asn, His, Leu, Ser, Thr, Gly или Lys;
 X_3 выбран из Ala, Phe, Ile, Ser, Pro, Thr, Gly или Lys; и/или

X₄ выбран из Ile, Leu, Gly, His, Arg, Asn, Ser, Lys, Thr или Gln;
 при условии, что по меньшей мере один из X₁ или X₄ представляет собой
 остаток основной аминокислоты и/или по меньшей мере два из X₁-X₄
 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты, и/или
 5 остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере один из X₁-X₄
 представляет собой остаток Gly.

19. Миметик кальцитонина по пп. 11-18, отличающийся тем, что X₁ выбран из
 Asn, Gly, Ile, His или Arg;

10 X₂ выбран из Asn, Leu, Thr, Gly или Lys;

X₃ выбран из Phe, Pro, Ile, Ser, Thr, Gly или Lys; и/или

X₄ выбран из Gly, His, Asn, Ser, Lys, Thr или Gln;

при условии, что по меньшей мере один из X₁ или X₄ представляет собой
 остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере два из X₁-X₄
 15 независимо представляют собой остаток полярной аминокислоты, и/или
 остаток основной аминокислоты, и/или по меньшей мере один из X₁-X₄
 представляет собой остаток Gly.

20. Миметик кальцитонина по пп. 11-19, отличающийся тем, что миметик
 20 кальцитонина в соответствии с формулами (III)-(V) содержит одну или более
 из следующих консервативных замен:

- остаток Asp в положении 15 пептида заменен на Glu;

- остаток Arg в положении 18 пептида заменен на Lys; и/или

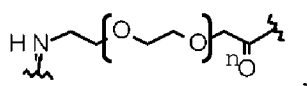
- остаток Lys в положении 24 пептида заменен на Arg.

21. Миметик кальцитонина по пп. 11-19, отличающийся тем, что миметик
 кальцитонина в соответствии с формулами (VI), где Z компонент пептида
 формулы (VI) представляет собой SQDLHRLQTYGAI или
 SQDLHRLSNNFGA, содержит одну или более из следующих консервативных
 30 замен:

- остаток Asp в положении 15 пептида заменен на Glu; и/или

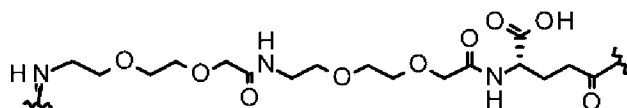
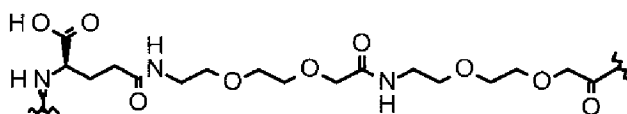
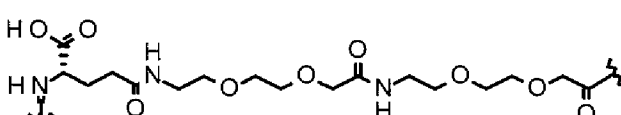
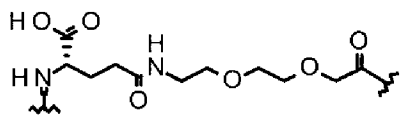
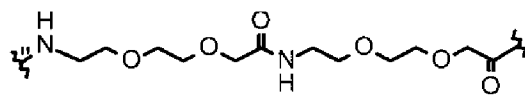
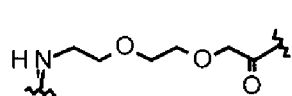
- остаток Arg в положении 18 пептида заменен на Lys.

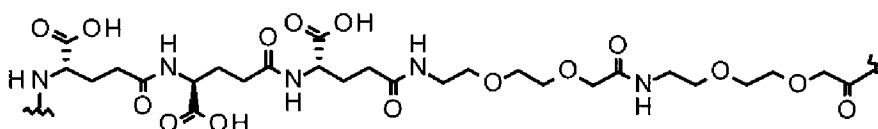
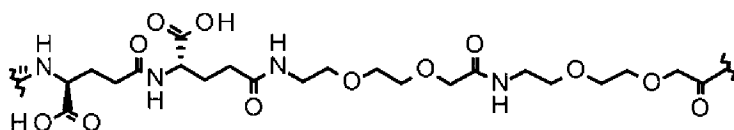
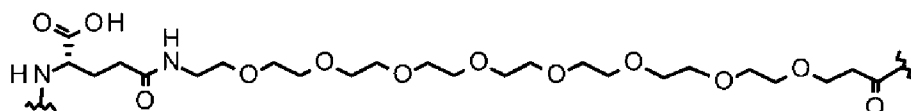
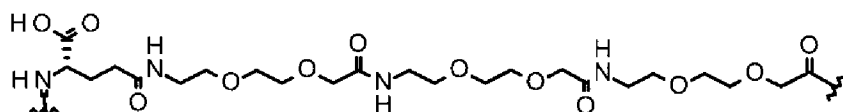
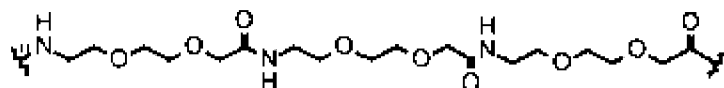
22. Миметик кальцитонина по пп. 1-21, отличающийся тем, что линкер содержит остаток глутаминовой кислоты и/или линкер с аминокислотным олигоэтиленгликолем (ОЭГ), содержащим один аминокислотный ОЭГ или два, или более аминокислотных ОЭГ, связанных вместе, причем указанный аминокислотный ОЭГ представляет собой:



где n равно от 1 до 10.

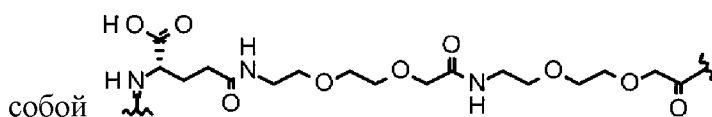
23. Миметик кальцитонина по п. 22, отличающийся тем, что линкер с аминокислотным ОЭГ содержит от двух до шести аминокислотных ОЭГ, связанных вместе.
24. Миметик кальцитонина по п. 22 или 23, отличающийся тем, что указанный линкер с аминокислотным ОЭГ дополнительно содержит один или более остатков глутаминовой кислоты, связанных с аминоконцом или карбоксильным концом линкера с аминокислотным ОЭГ.
25. Миметик кальцитонина по любому из пп. 22-24, отличающийся тем, что n равно 1.
26. Миметик кальцитонина по любому из пп. 22-24, отличающийся тем, что линкер с аминокислотным ОЭГ выбран из любого одного из следующего:





5

27. Миметик кальцитонина по п. 26, отличающийся тем, что линкер представляет



собой

- 10 28. Миметик кальцитонина по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что
ацильная группа выбрана из жирной кислоты C_{18} или жирной кислоты с более
длинной цепью, двухосновной жирной кислоты C_{18} или двухосновной жирной
кислоты с более длинной цепью, линкера- C_{18} жирной кислоты или линкера-
жирной кислоты с более длинной цепью, или линкера- двухосновной C_{18}
15 жирной кислоты или линкера-двухосновной жирной кислоты с более длинной
цепью.

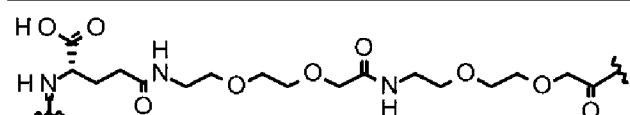
29. Миметик кальцитонина по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что
ацильная группа выбрана из любого одного из следующего:
20 жирной кислоты C_{18} - C_{30} ,
двухосновной жирной кислоты C_{18} - C_{30} ,
линкер- C_{16} - C_{30} жирной кислоты, или

линкер-С₁₆-С₃₀ двухосновной жирной кислоты.

30. Миметик кальцитонина по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что ацильная группа выбрана из любого одного из следующего:

5 жирной кислоты С₁₈-С₂₂,
двухосновной жирной кислоты С₁₈-С₂₂,
линкер-С₁₈-С₂₂ жирной кислоты или
линкер-С₁₈-С₂₂ двухосновной жирной кислоты.

- 10 31. Миметик кальцитонина по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что **K_{Ac}** ацилирован линкер-жирной двухосновной кислотой, причем жирная двухосновная кислота представляет собой двухосновную жирную кислоту С₁₈-С₂₂, и линкер представляет собой



- 15 32. Миметик кальцитонина по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что пептид выбран из любого одного из следующего:

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP

CSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP

20 CGNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LTQDLNKFHTFPKTDVGANAP

CSNLSTCVLG**K_{Ac}**LSQELHKLQTYPRTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQELHRLQTYPKTDVGANAP

CASLSTCVLG**K_{Ac}**LSQDLHKLQTFPKTDVGANAP

CASLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHKLQTFPKTDVGANAP

25 CGNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLNKFHTFPQTDVGANAP

CSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSNTDVGANAP

30 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLSNNFGAILSSTNVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYGAILSPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP

CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKILSSTDVGANAP
 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKGLITTDVGANAP
 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKNNFGTDVGANAP
 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKRTTQTDVGANAP
 5 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTTNTDVGANAP
 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHGGQTDVGANAP
 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHKKNTDVGANAP
 CSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHKKHTDVGANAP
 CSNLSTC(AiB)LGRLSQDLHR**K_{Ac}**QTYPKTDVGANAP
 10 CSNLSTCMLGRLSQELHR**K_{Ac}**QTYPKTDVGANAP

и где **K_{Ac}** имеет значение, определенное в любом из пп. 1-32.

33. Миметик кальцитонина по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что пептид
 выбран из любого одного из следующего:
- 15 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂
 AcCGNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LTQDLNKFHTFPKTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCVLG**K_{Ac}**LSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQELHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂
 20 AcCASLSTCVLG**K_{Ac}**LSQDLHKLQTFPKTDVGANAP-NH₂
 AcCASLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHKLQTFPKTDVGANAP-NH₂
 AcCGNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLNKFHTFPQTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTC(AiB)LG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTDVGANAP-NH₂
 25 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHSSNTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLSNNFGAILSSSTNVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYGAILSPKTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LANFLVHSSNNFGAILPKTDVGANAP-NH₂
 30 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKILSSTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKGLITTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKNNFGTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKRTTQTDVGANAP-NH₂
 AcCSNLSTCMLG**K_{Ac}**LSQDLHRLQTYPKHTTNTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTCMLG**K**_{Ac}LSQDLHRLQTYPKHGGQTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTCMLG**K**_{Ac}LSQDLHRLQTYPKHKKNTDVGANAP-NH₂

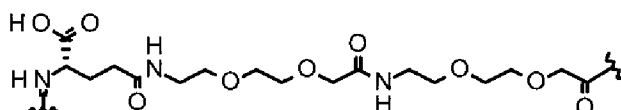
AcCSNLSTCMLG**K**_{Ac}LSQDLHRLQTYPKHKKHTDVGANAP-NH₂

AcCSNLSTC(AiB)LGRLSQDLHR**K**_{Ac}QTYPKTDVGANAP-NH₂

5

AcCSNLSTCMLG**K**_{Ac}LSQELHRLQTYPKTDVGANAP-NH₂

и где **K**_{Ac} ацилирован линкер-жирной двухосновной кислотой, причем жирная двухосновная кислота представляет собой C₁₈-C₂₂ жирную двухосновную кислоту, а линкер представляет собой



10

34. Пептид по любому из пп. 1-33, представленный в виде композиции для энтерального введения.

35. Пептид по п. 34, отличающийся тем, что пептид представлен в виде фармацевтической композиции для перорального введения, содержащей частицы лимонной кислоты, покрытые оболочкой, и при этом частицы лимонной кислоты, покрытые оболочкой, увеличивают пероральную биодоступность пептида.

36. Пептид по любому из пп. 1-35, представленный в виде композиции с носителем для перорального введения.

37. Пептид по п. 36, отличающийся тем, что носитель включает 5-CNAC, SNAD или SNAC.

25

38. Пептид по любому из пп. 1-33, представленный в виде композиции для парентерального введения.

39. Пептид по п. 38, представленный в виде композиции для инъекций.

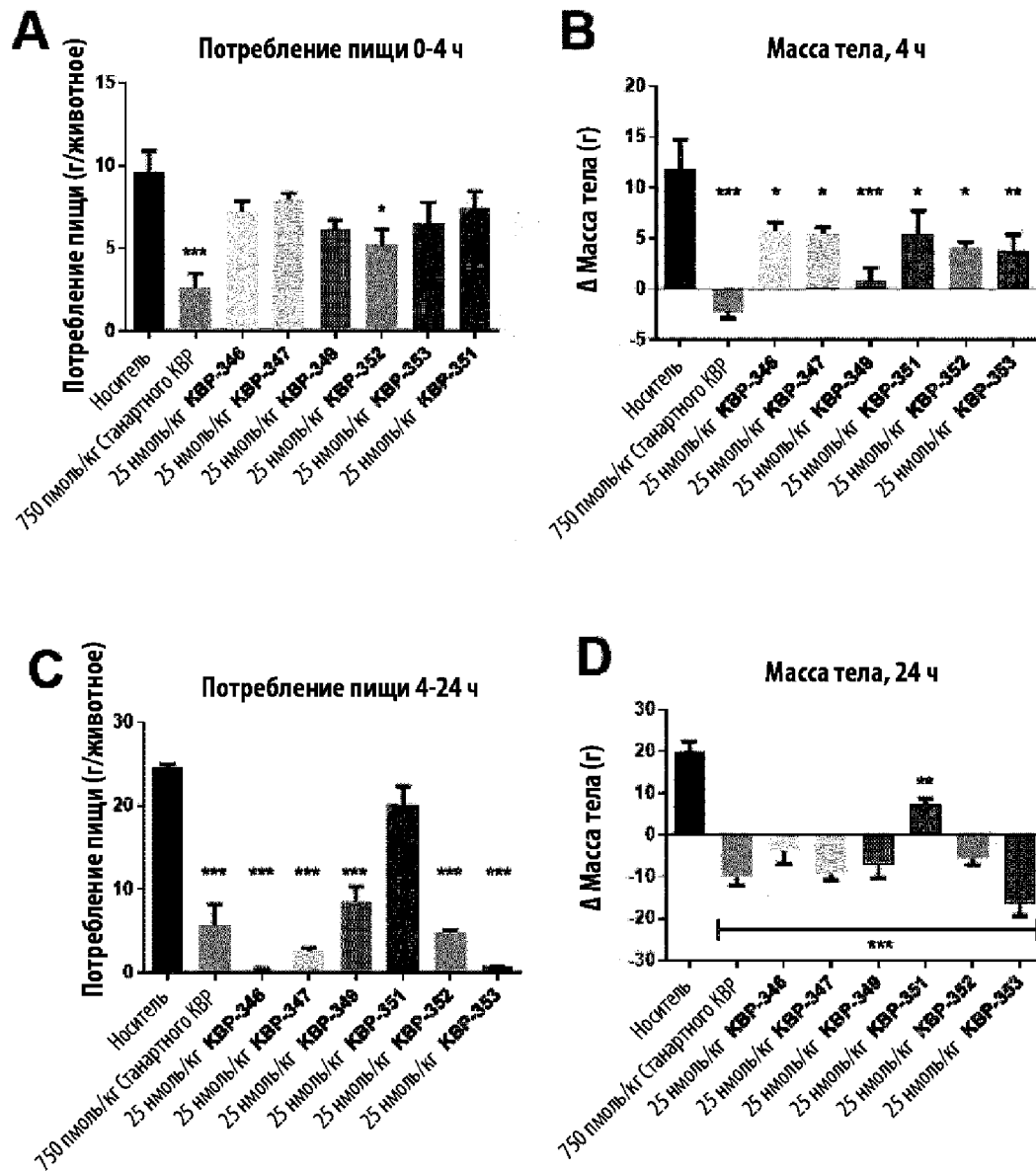
30

40. Фармацевтическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-33.

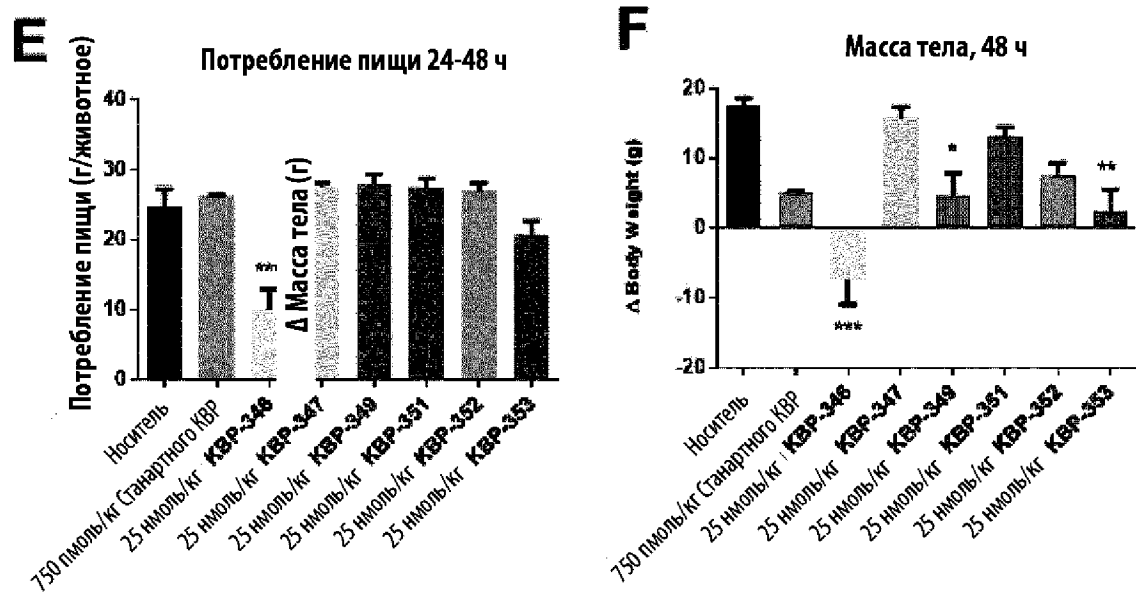
41. Пептид по любому из пп. 1-33 для применения в качестве лекарственного средства.
- 5 42. Пептид по любому из пп. 1-33 для применения при лечении сахарного диабета (I типа и/или II типа), избыточной массы тела, чрезмерного потребления пищи, метаболического синдрома, ревматоидного артрита, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени, алкогольной жировой болезни печени, остеопороза или остеоартрита, плохо регулируемых уровней глюкозы в крови, плохо регулируемого ответа на тест толерантности к глюкозе или плохо регулируемого потребления пищи.
10
43. Пептид по любому из пп. 1-33 в комбинации с метформином или другим сенситизатором инсулина для применения при лечении сахарного диабета (I типа и/или II типа), избыточной массы тела, чрезмерного потребления пищи, метаболического синдрома, ревматоидного артрита, неалкогольного
15 стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени, алкогольной жировой болезни печени, остеопороза или остеоартрита, плохо регулируемых уровней глюкозы в крови, плохо регулируемого ответа на тест толерантности к глюкозе или плохо регулируемого потребления пищи.
20
44. Пептид по любому из пп. 1-33 в комбинации с лекарственным средством для снижения массы тела для применения при лечении состояния, характеризующегося избыточной массой тела.
- 25 45. Пептид по п. 44, отличающийся тем, что состоянием, характеризующимся избыточной массой тела, является ожирение.
46. Комбинированная композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-33 и сенситизатор инсулина.
30
47. Комбинированная композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-33 и лекарственное средство для снижения массы тела.

48. Способ лечения сахарного диабета (I типа и/или II типа), избыточной массы тела, чрезмерного потребления пищи, метаболического синдрома, ревматоидного артрита, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени, алкогольной жировой болезни печени, остеопороза или остеоартрита, плохо регулируемых уровней глюкозы в крови, плохо регулируемого ответа на тест толерантности к глюкозе или плохо регулируемого потребления пищи, включающий введение эффективного количества пептида по любому из пп. 1-33 пациенту, нуждающемуся в указанном лечении.
49. Способ лечения сахарного диабета (I типа и/или II типа), избыточной массы тела, чрезмерного потребления пищи, метаболического синдрома, ревматоидного артрита, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени, алкогольной жировой болезни печени, остеопороза или остеоартрита, плохо регулируемых уровней глюкозы в крови, плохо регулируемого ответа на тест толерантности к глюкозе или плохо регулируемого потребления пищи, включающий введение эффективного количества пептида по любому из пп. 1-33 в комбинации с метформином или другим сенситизатором инсулина пациенту, нуждающемуся в указанном лечении.
50. Способ лечения состояния, характеризующегося избыточной массой тела, включающий введение эффективного количества пептида по любому из пп. 1-33 в комбинации с лекарственным средством для снижения массы тела пациенту, нуждающемуся в указанном лечении.

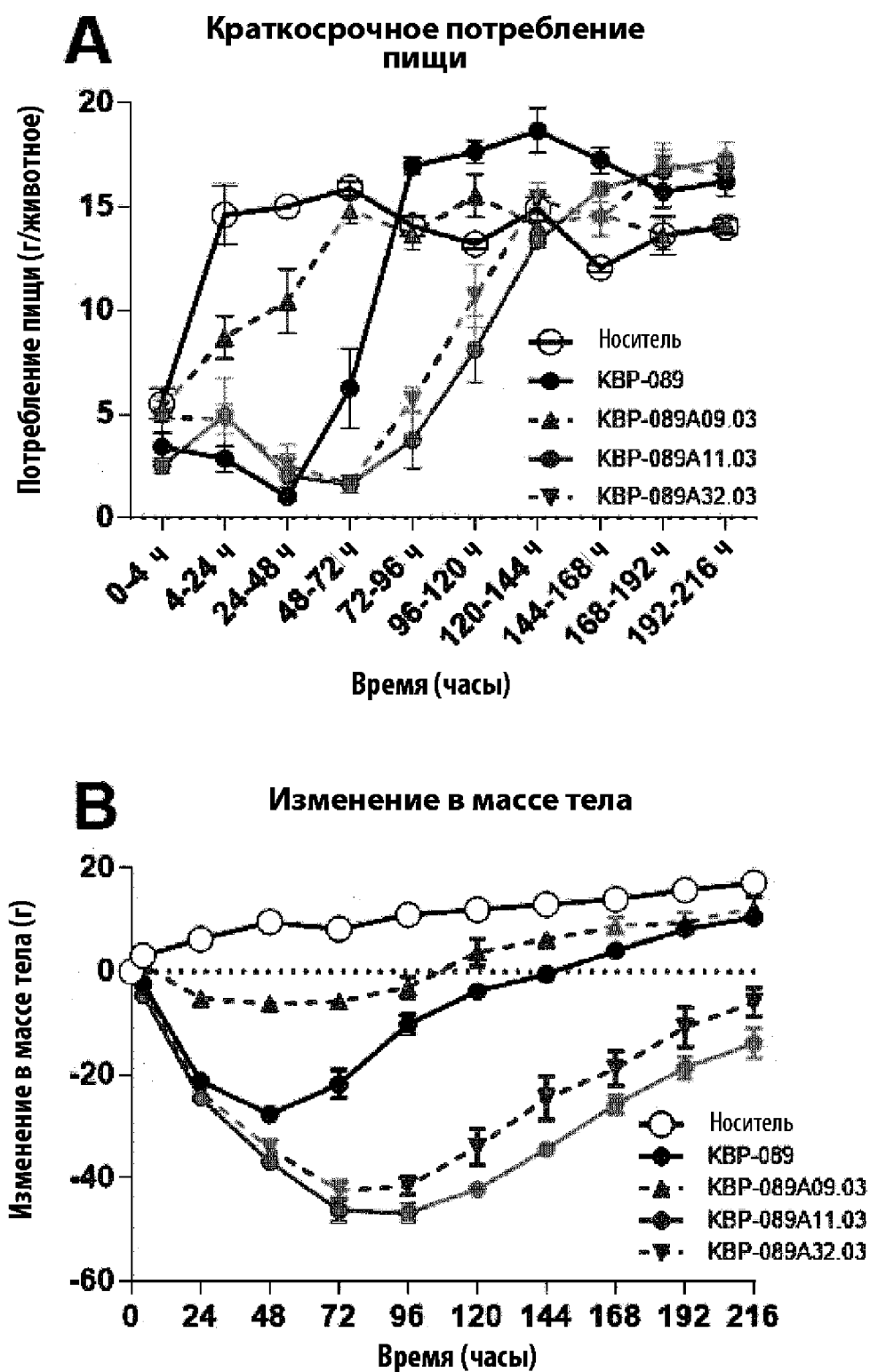
Фиг. 1



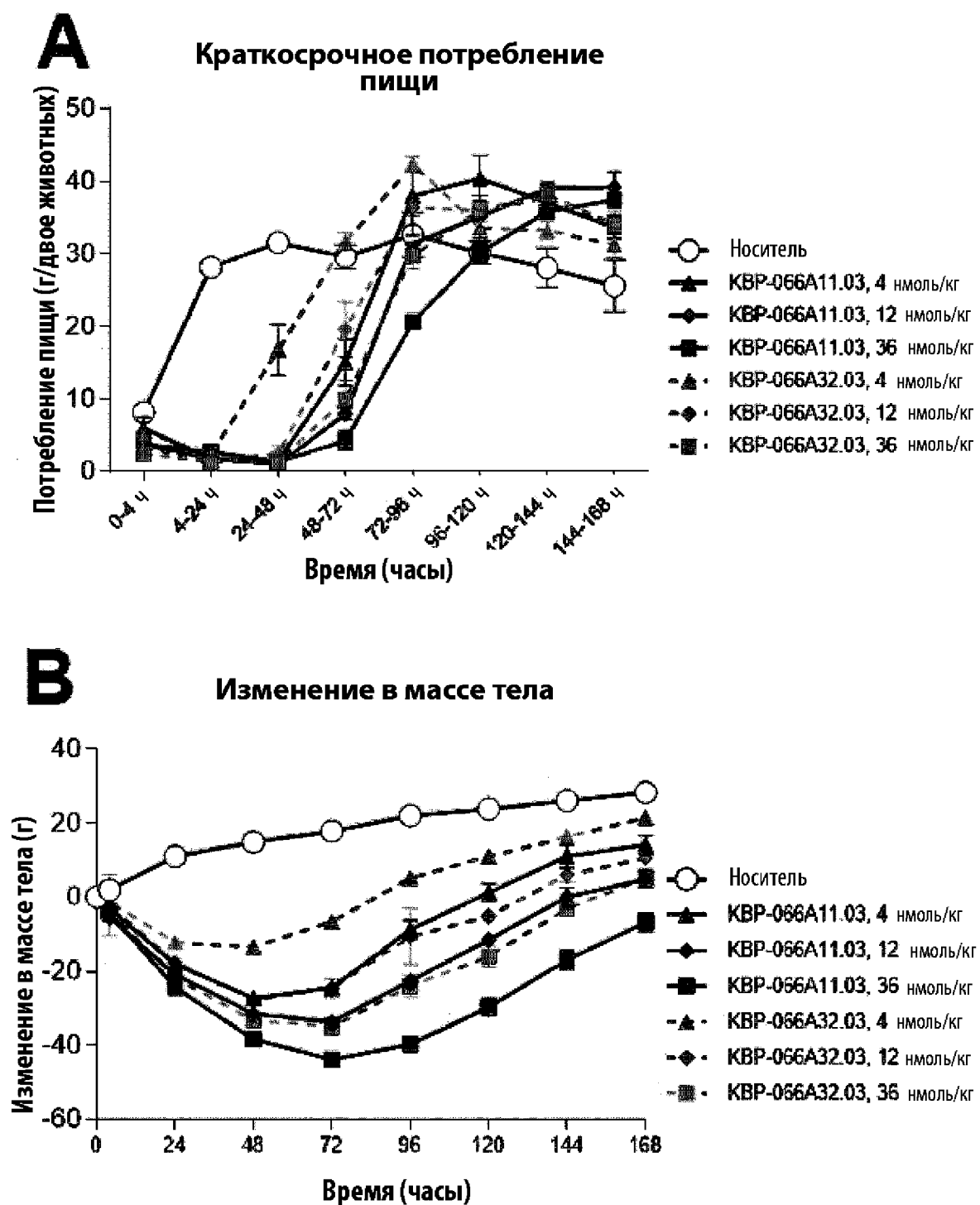
Фиг. 1 (продолж.)



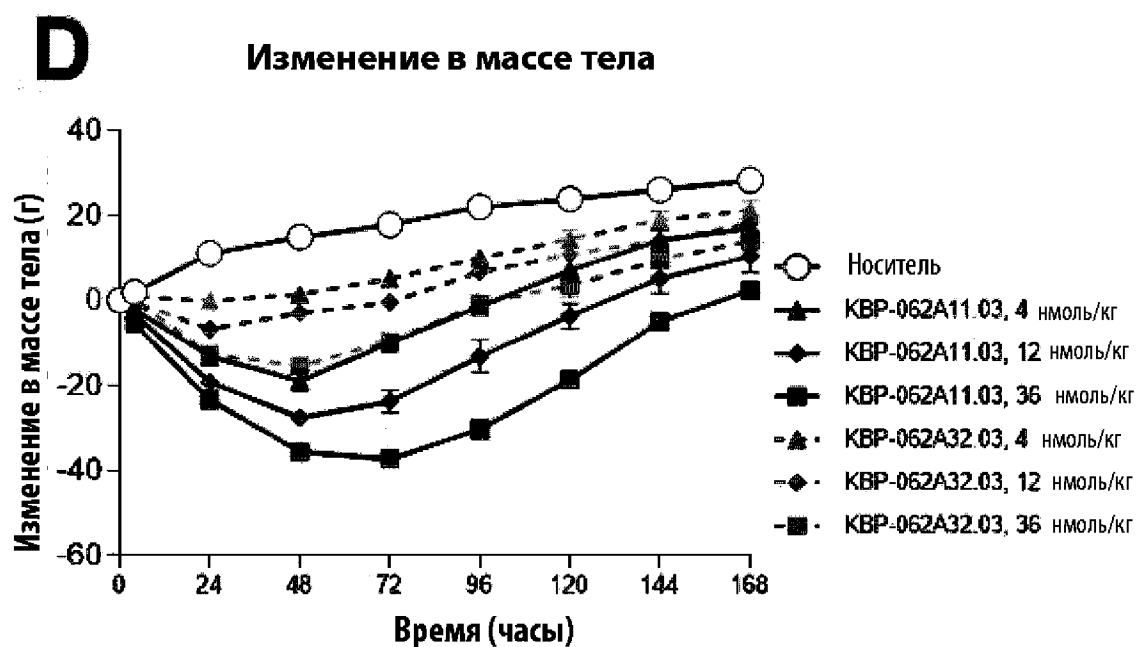
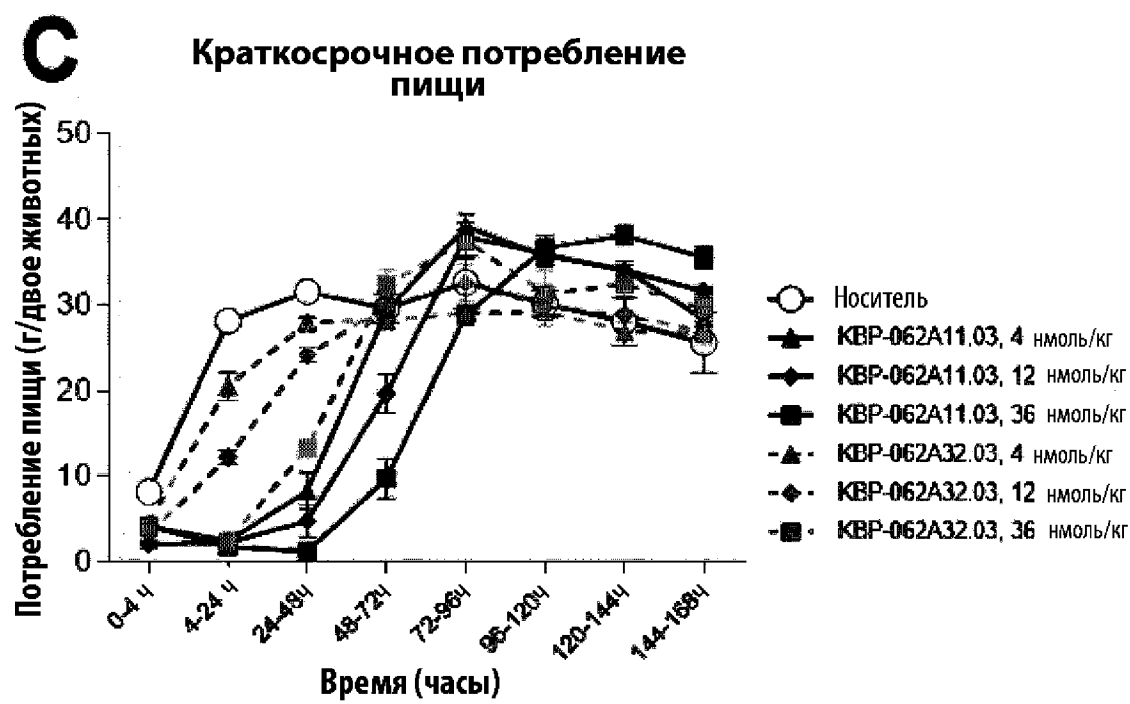
Фиг. 2



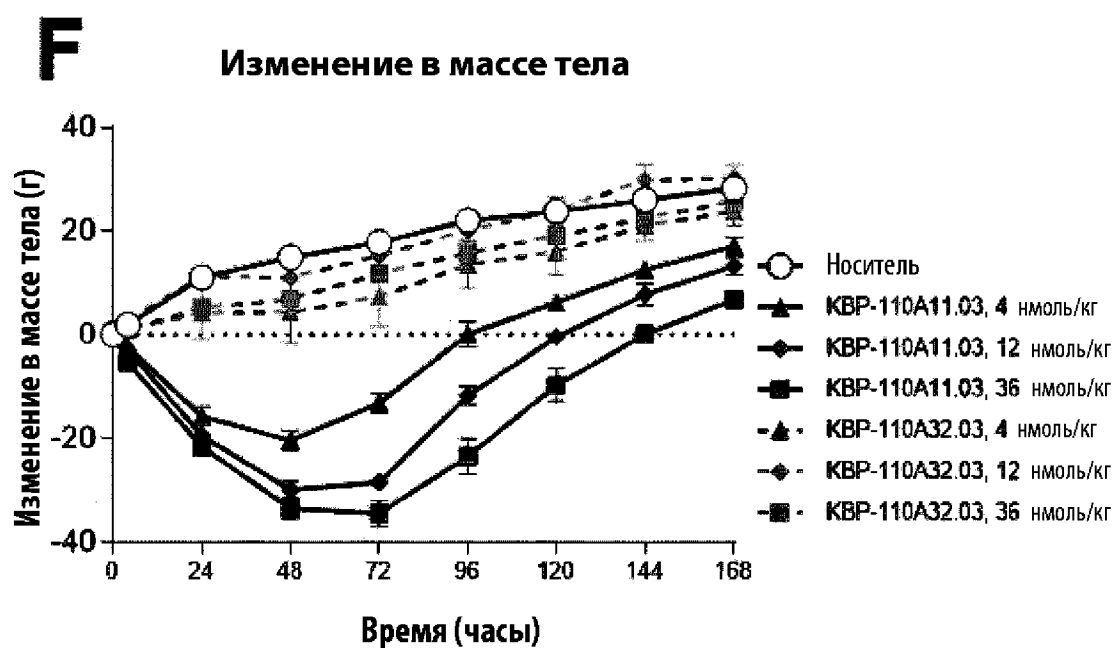
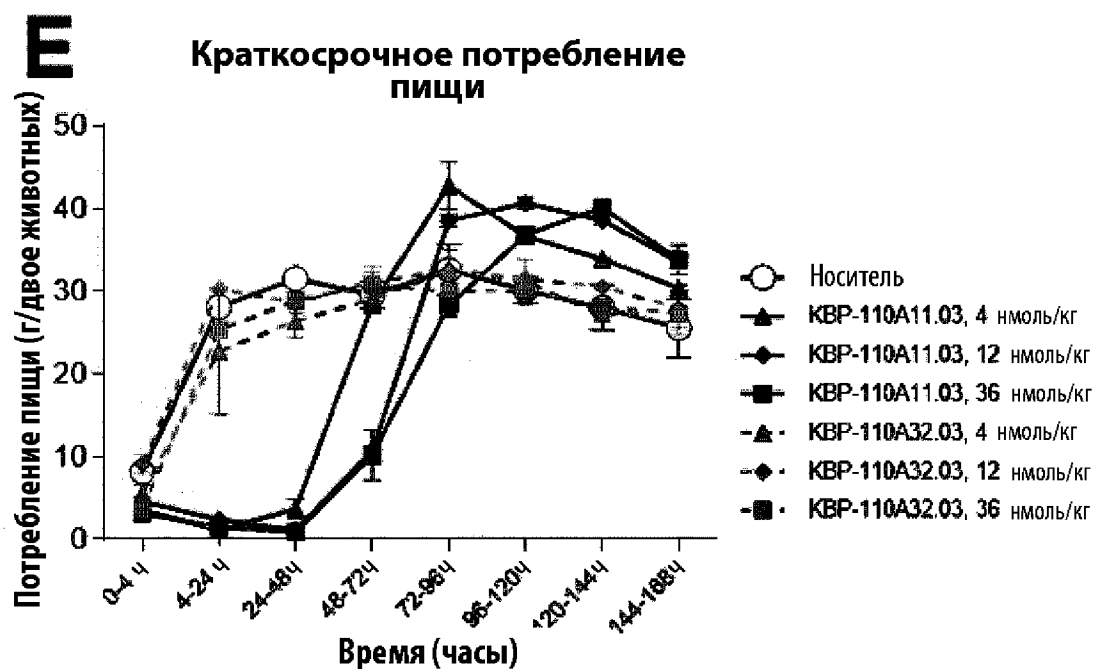
Фиг. 3



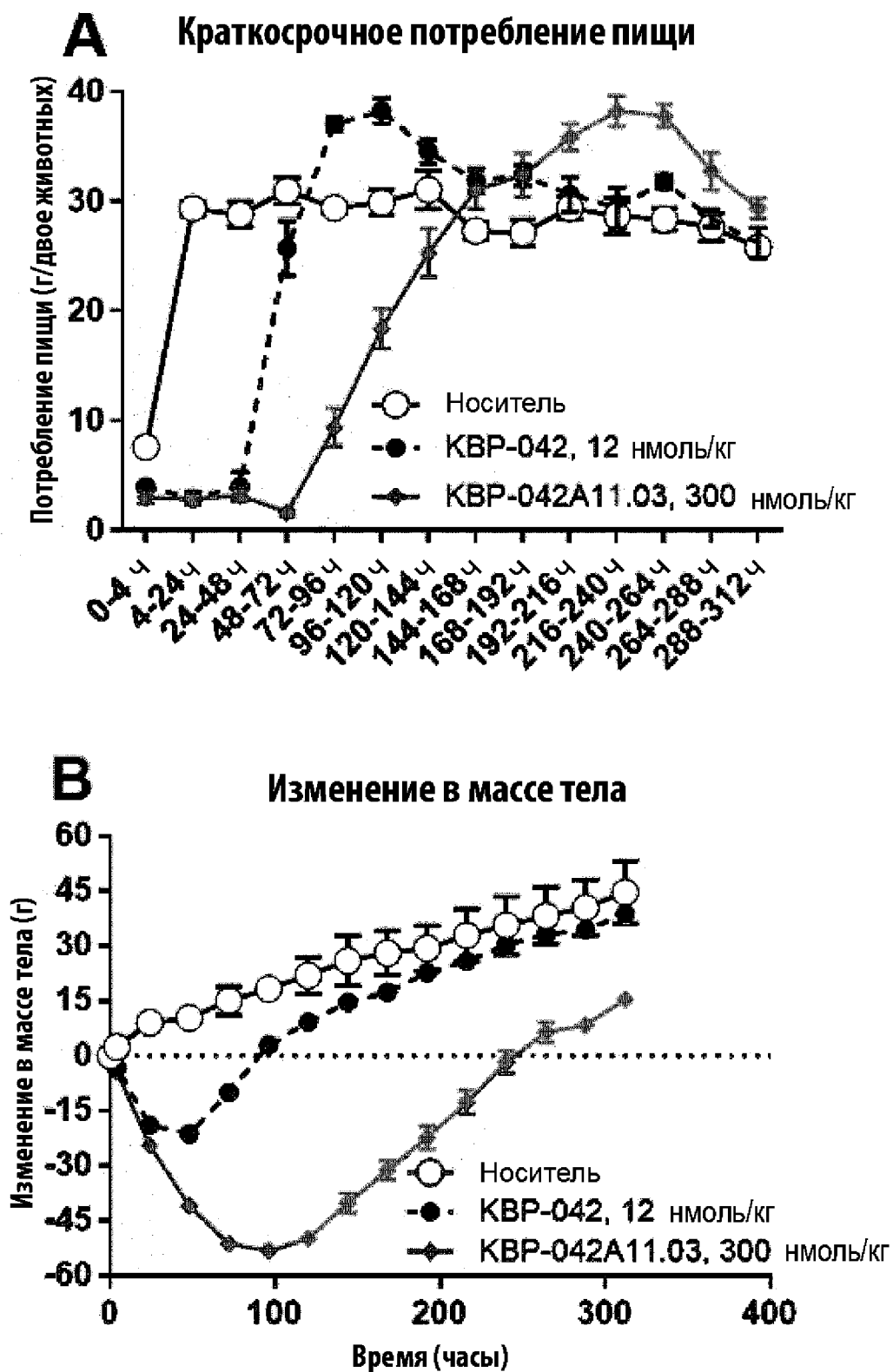
Фиг. 3 (продолж.)



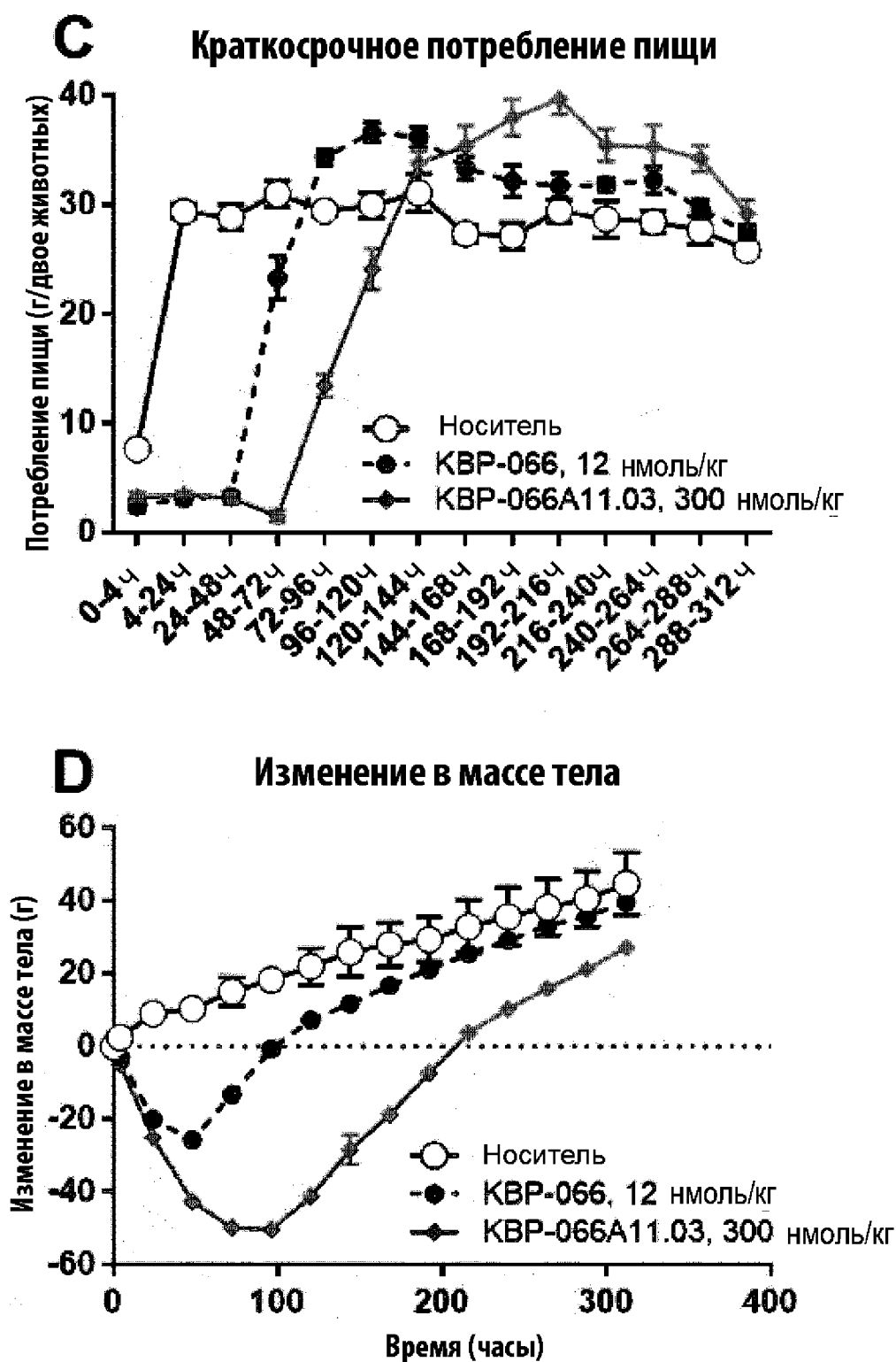
Фиг. 3 (продолж.)



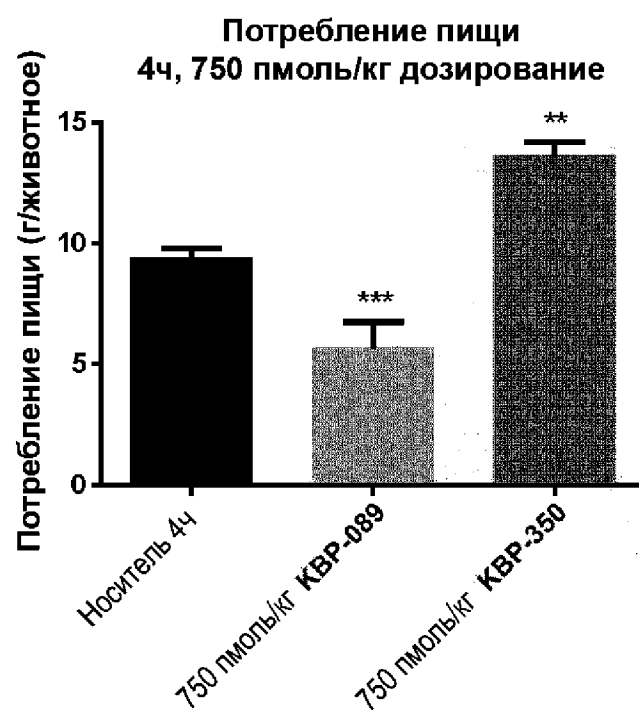
Фиг. 4



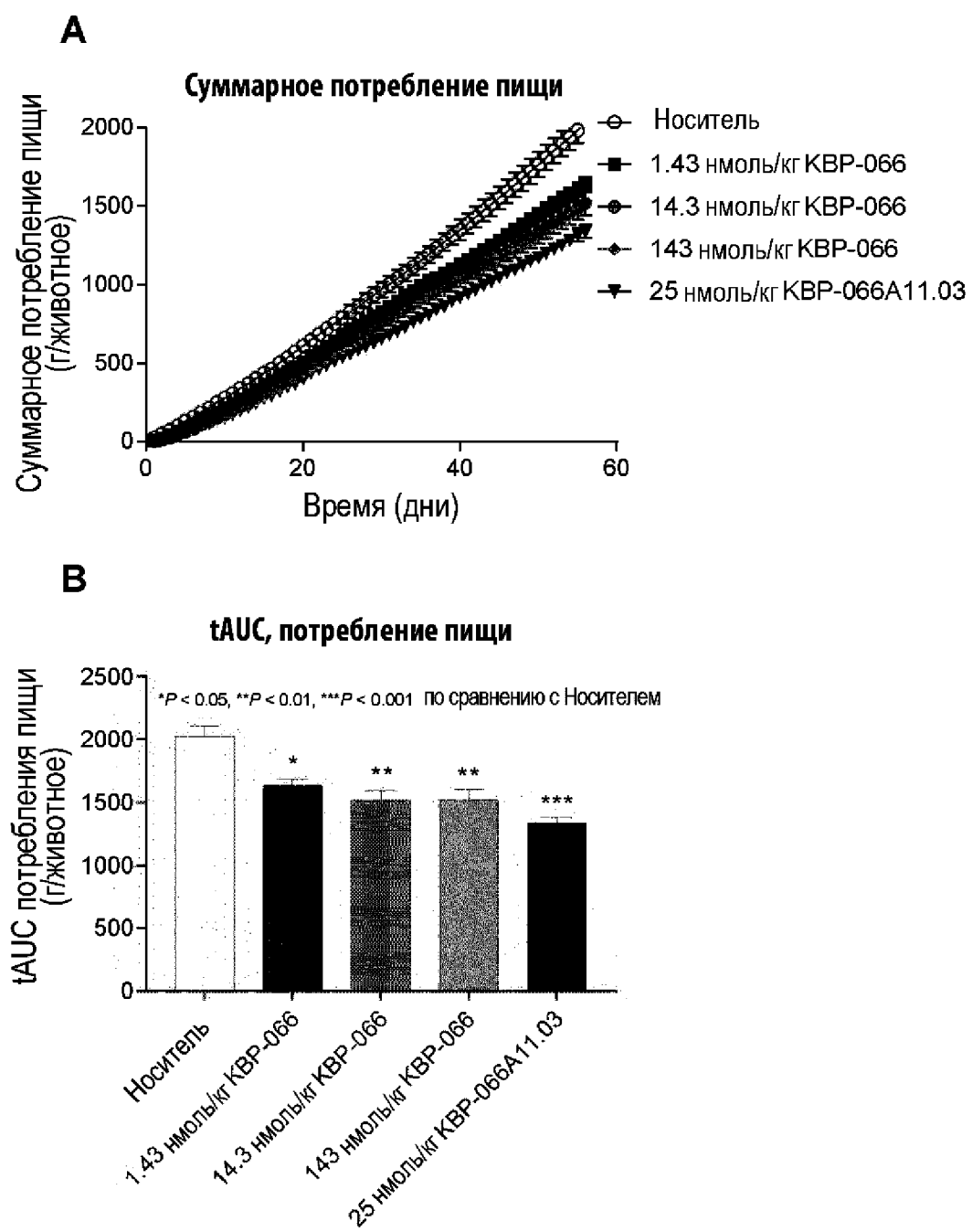
Фиг. 4 (продолж.)



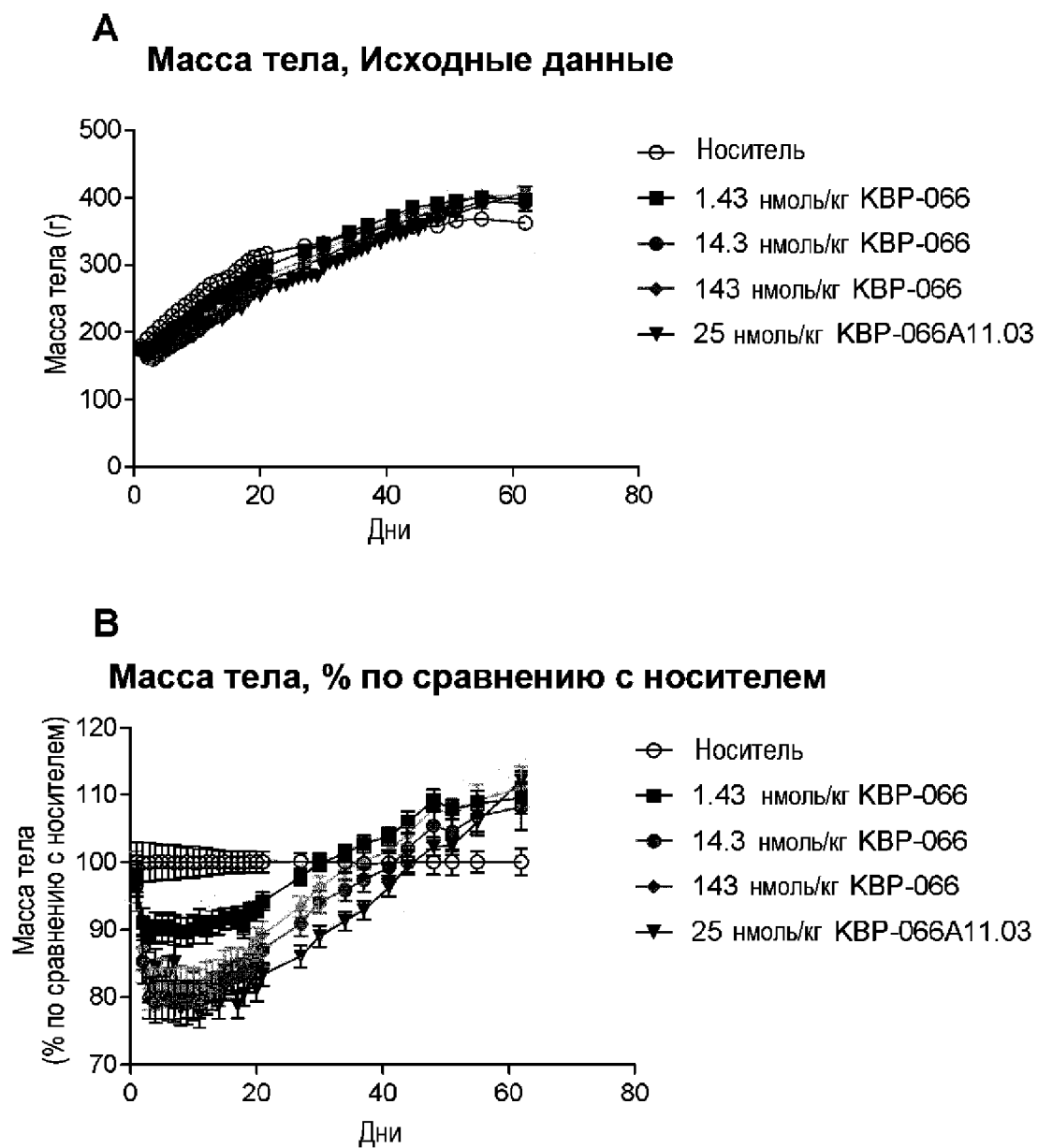
Фиг. 5



Фиг. 6



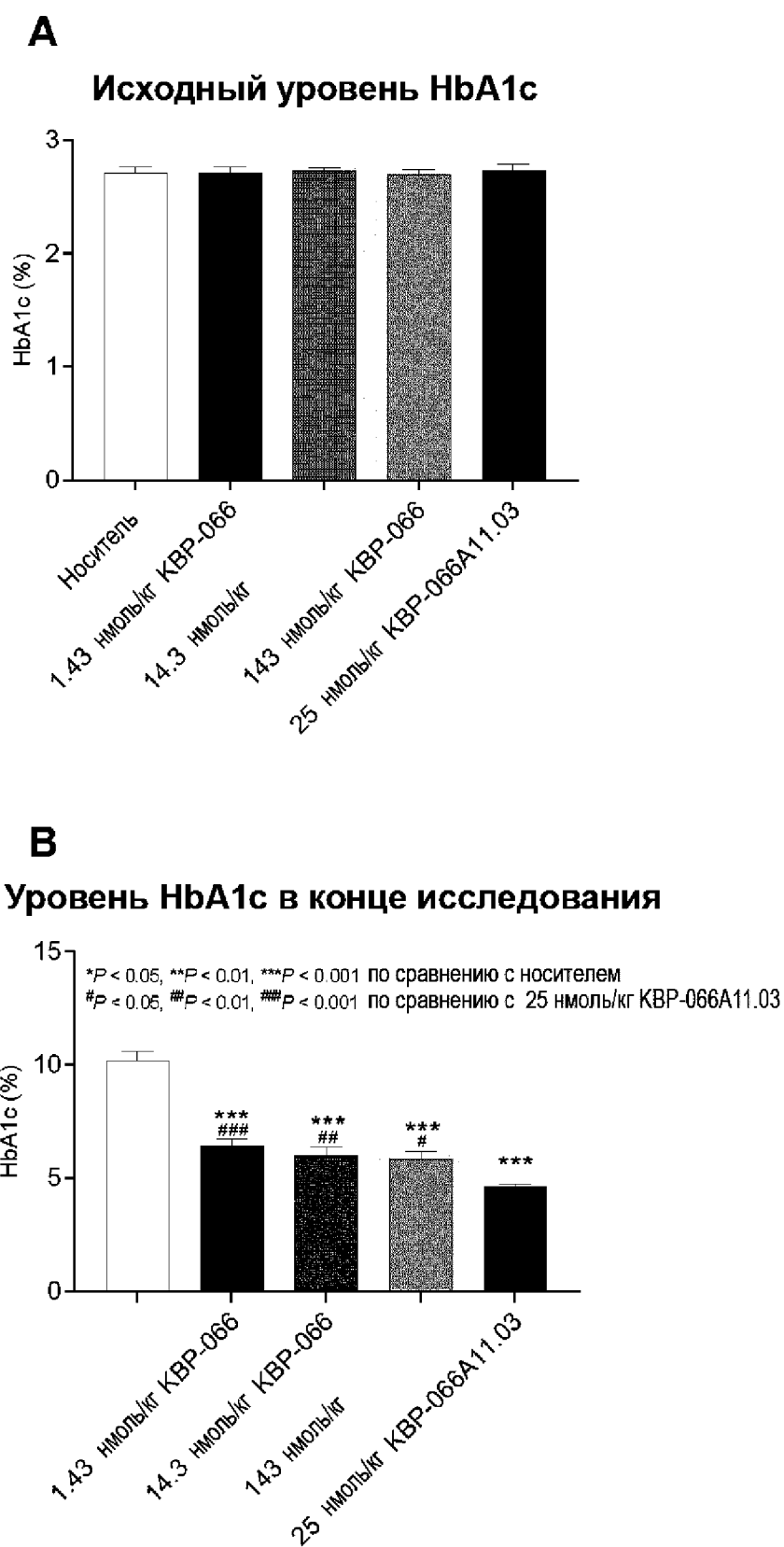
Фиг. 7



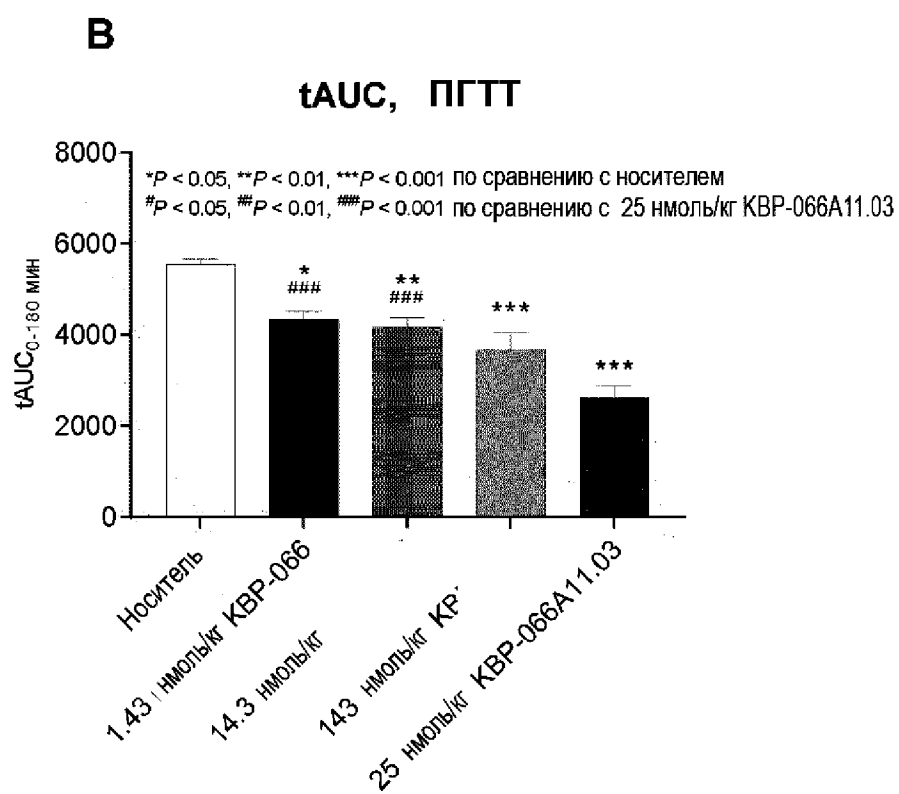
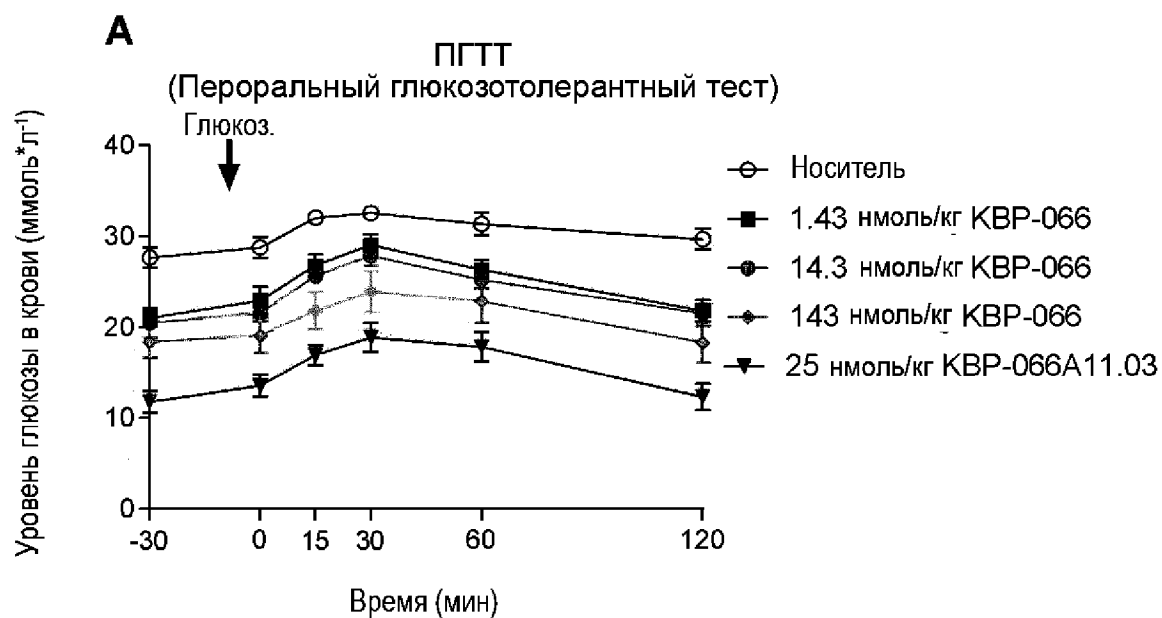
Фиг. 8



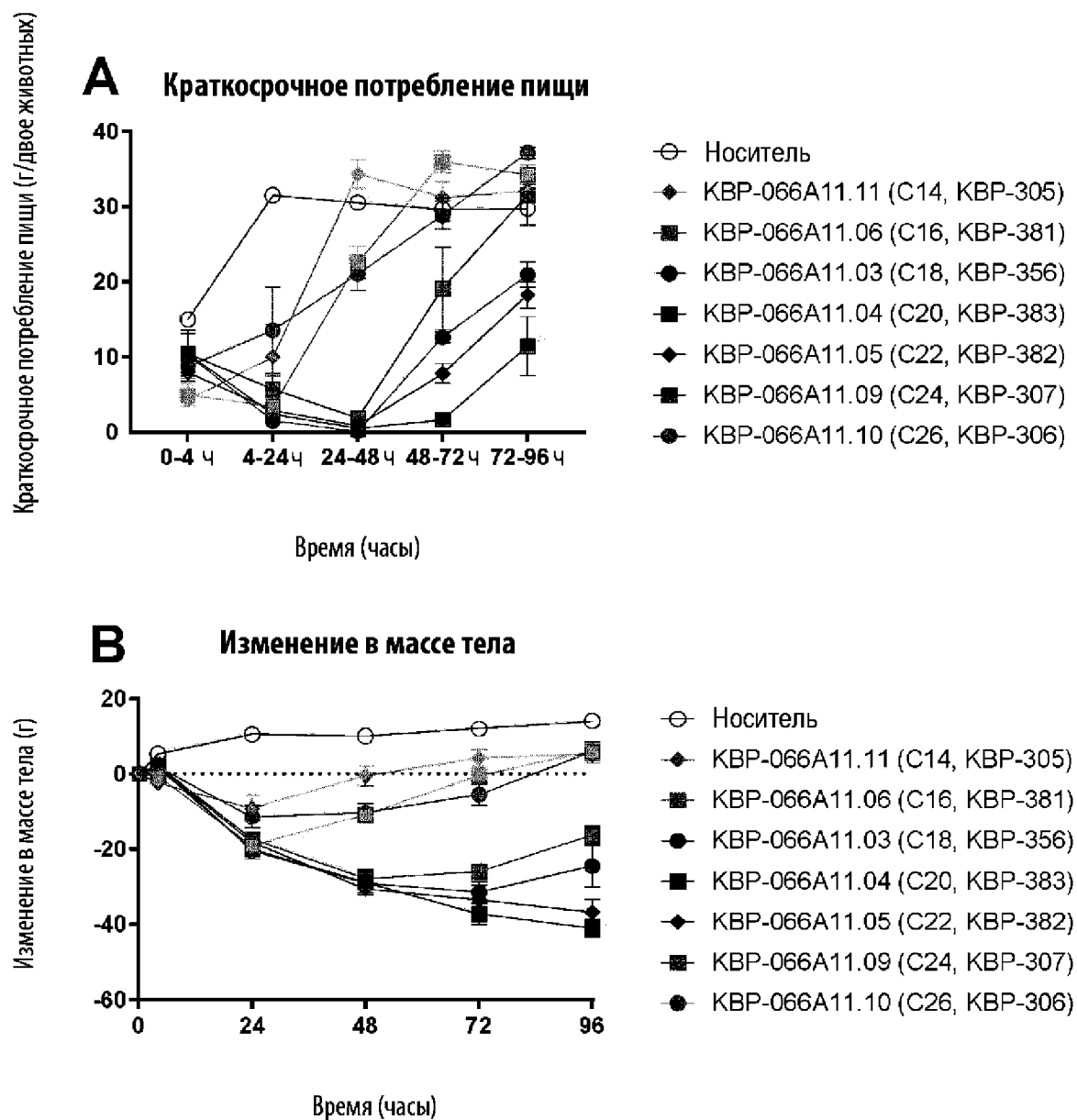
Фиг. 9



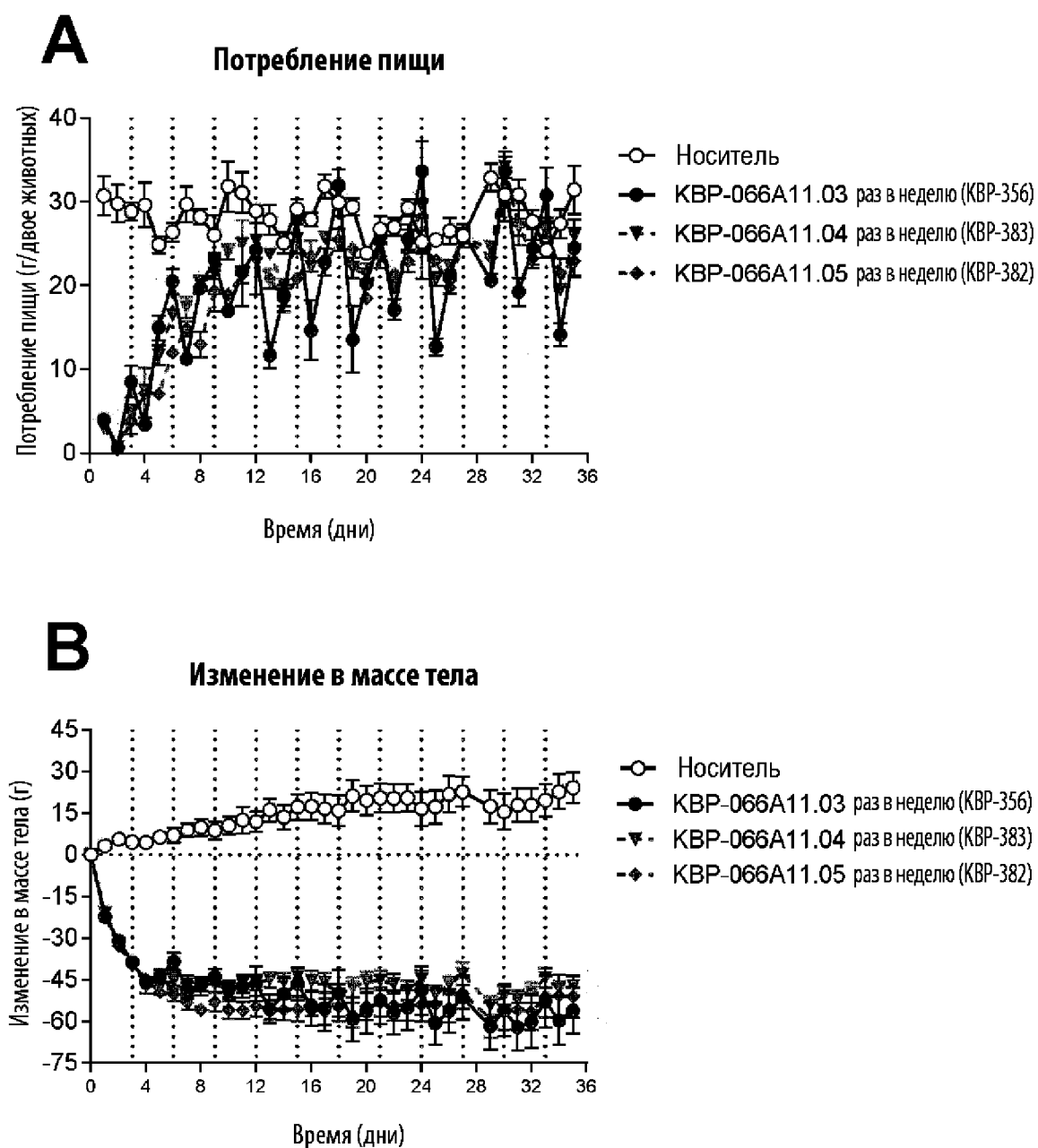
Фиг. 10



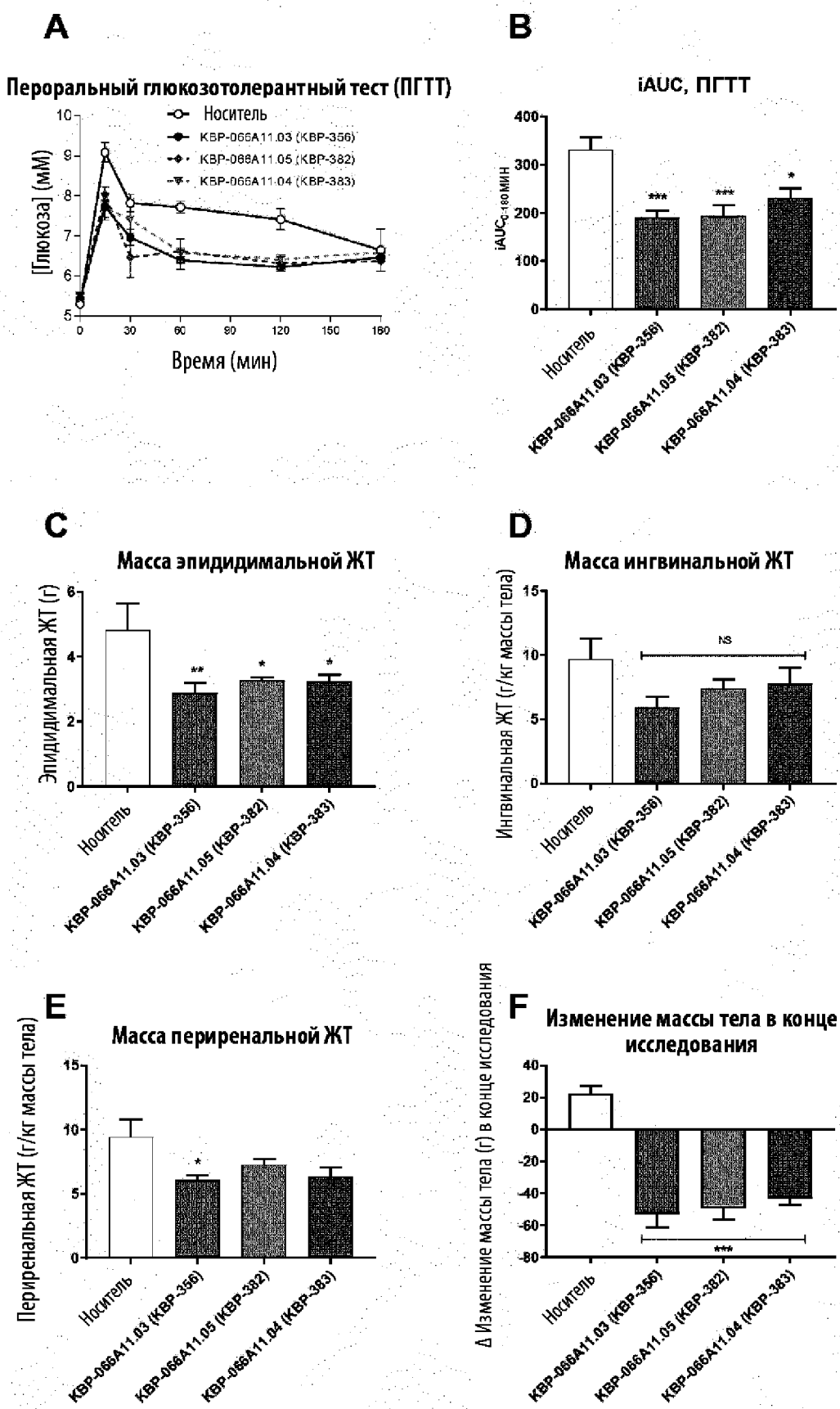
Фиг. 11



Фиг. 12



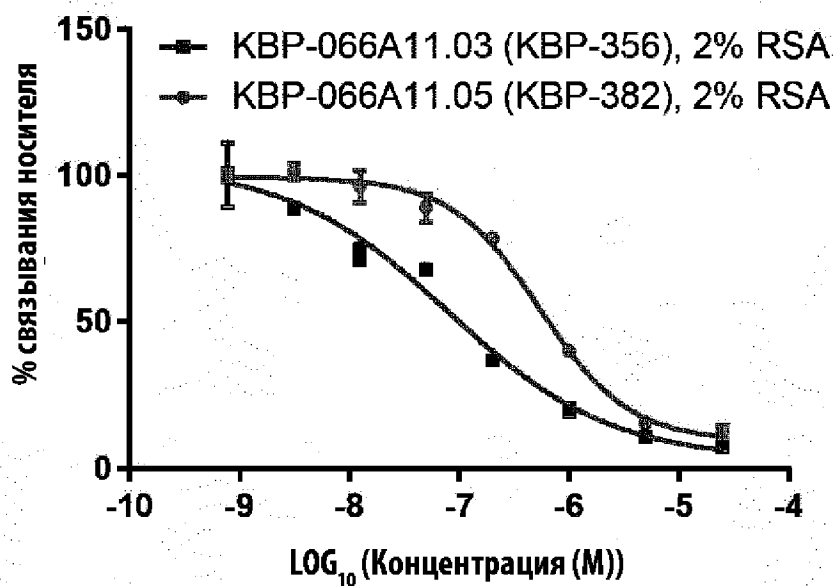
Фиг. 13



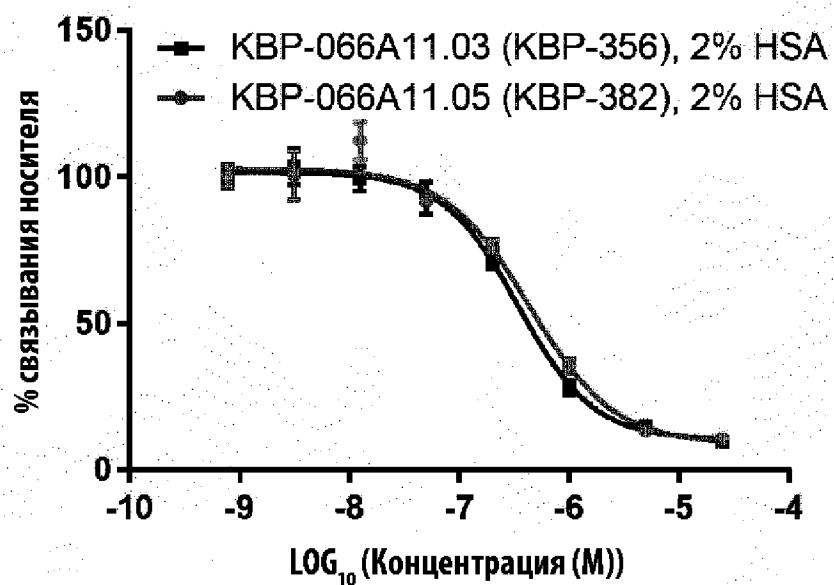
Фиг. 14

A

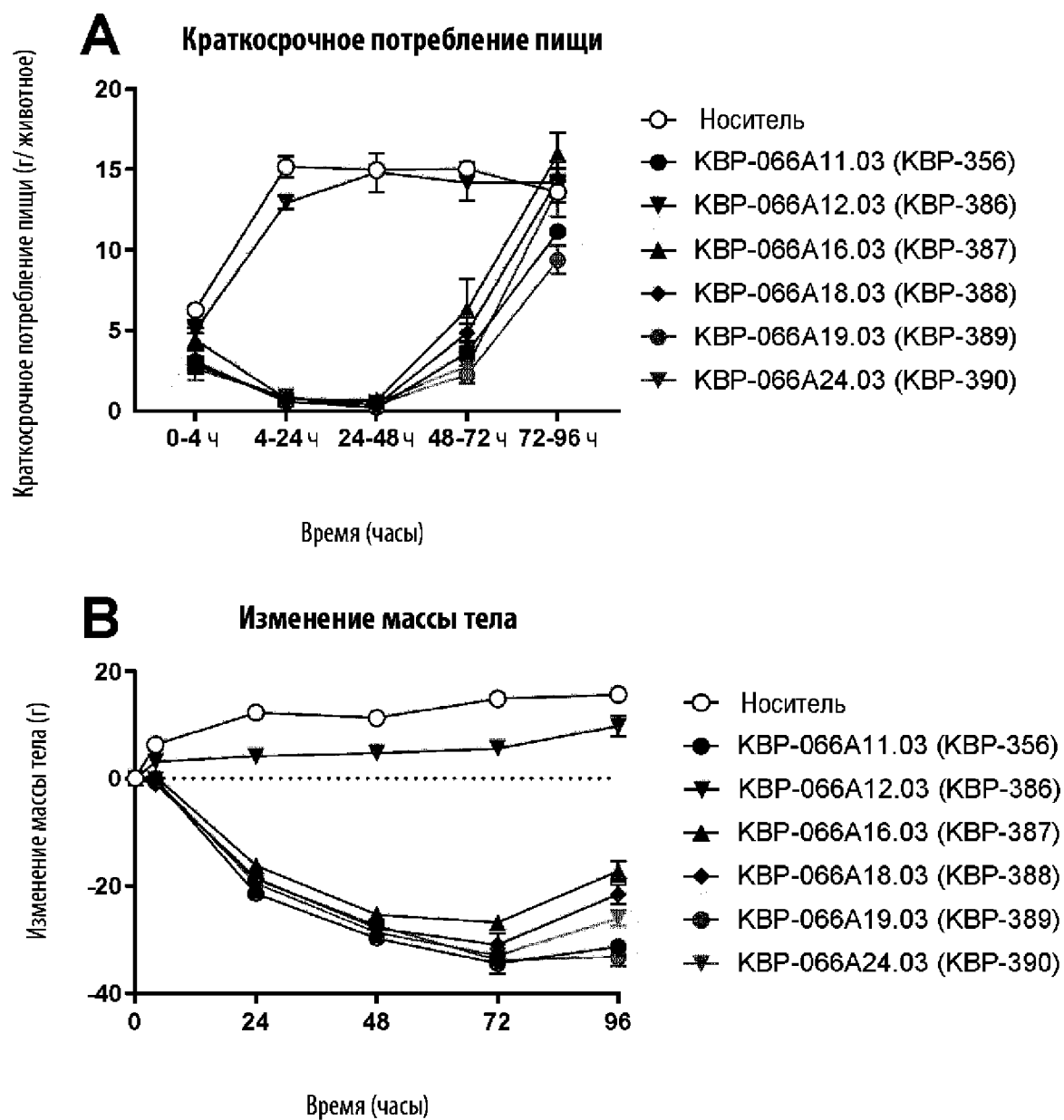
Конкурентное связывание в 2% RSA дикислота C18
по сравнению с дикислотой C22

**B**

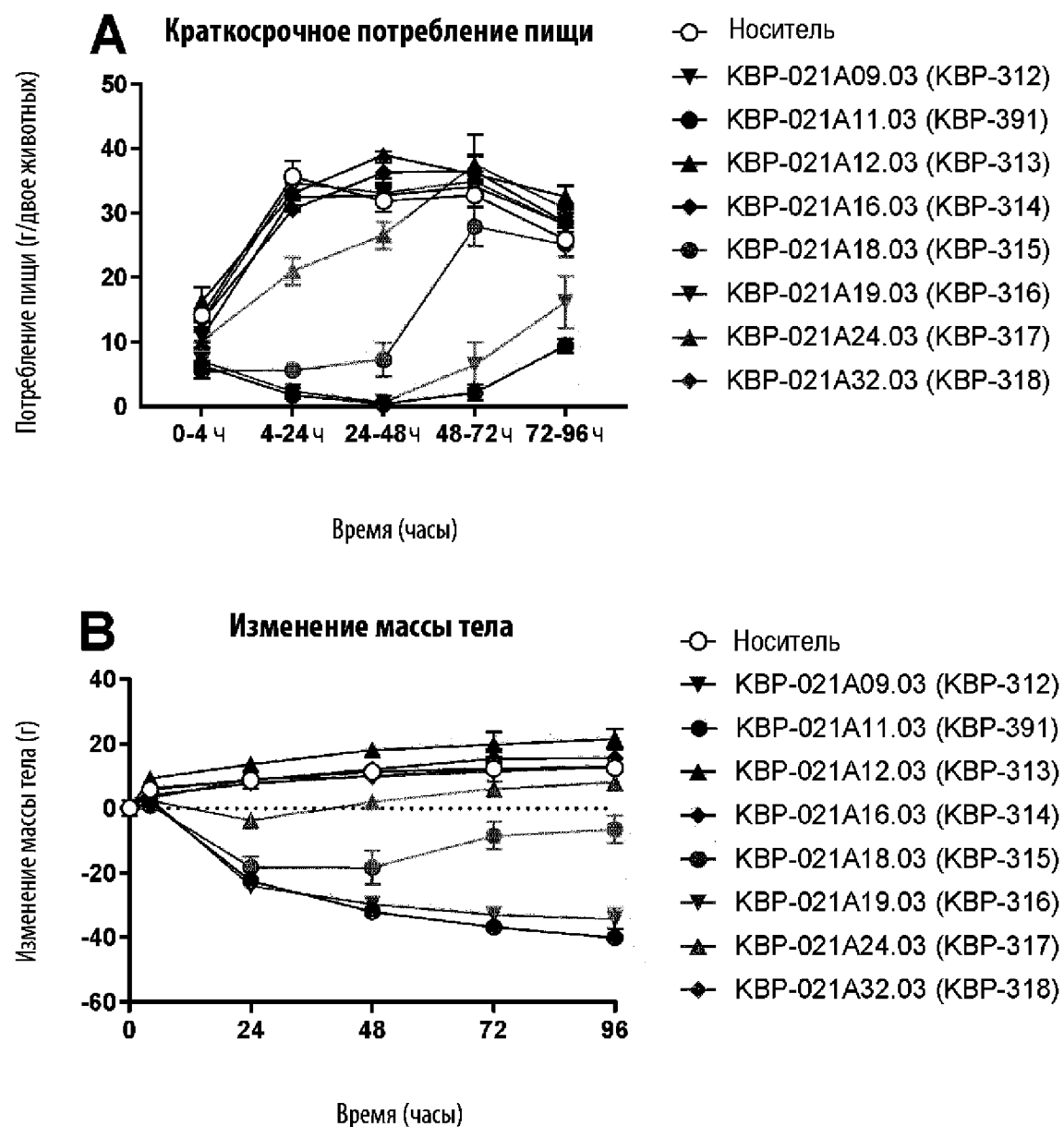
Конкурентное связывание в 2% HSA дикислота
C18 по сравнению с дикислотой C22



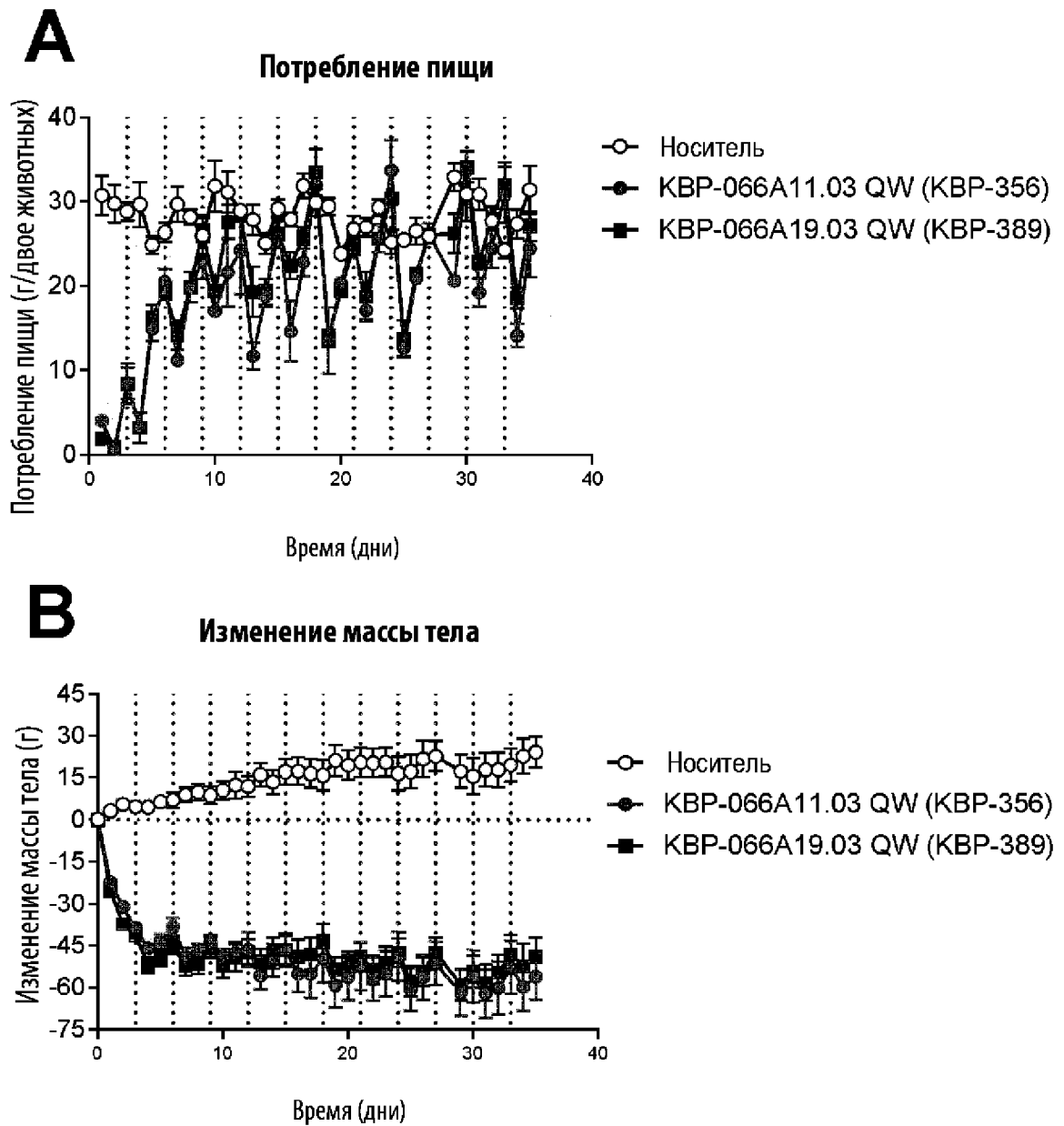
Фиг. 15



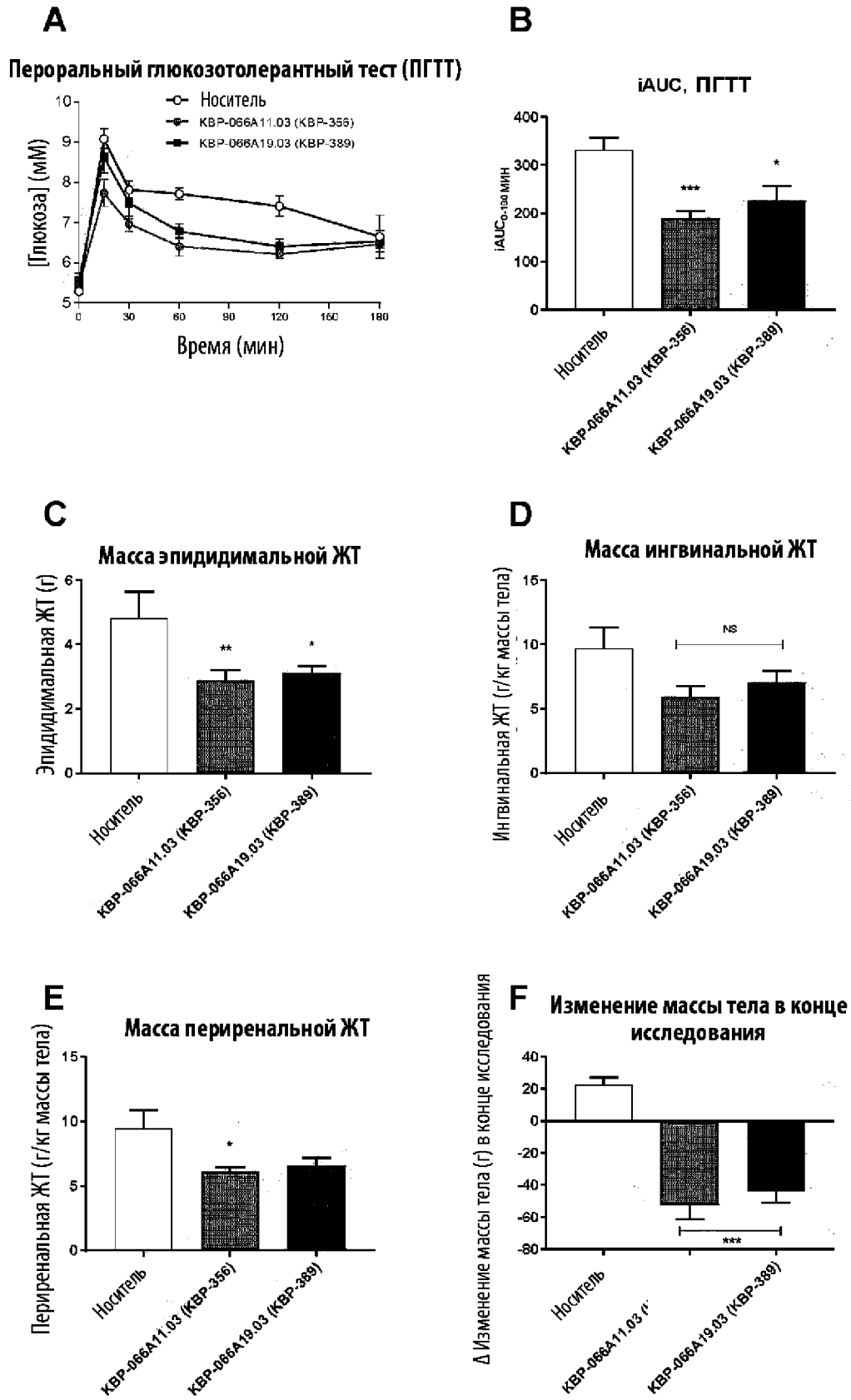
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

