

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040723

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.21

(21) Номер заявки
201991345

(22) Дата подачи заявки
2017.12.01

(51) Int. Cl. C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

(54) НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПЕПТИДНЫХ ТРОЙНЫХ АГОНИСТОВ
РЕЦЕПТОРОВ GLP-1/ГЛЮКАГОНА/GIP

(31) 16306604.6

(32) 2016.12.02

(33) EP

(43) 2019.11.29

(86) PCT/EP2017/081125

(87) WO 2018/100134 2018.06.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(56) WO-A1-2015155141
WO-A1-2014096145
WO-A1-2013192129
WO-A1-2015067716
WO-A1-2016198624

(72) Изобретатель:
Боссарт Мартин, Эферс Андреас,
Хаак Торстен, Кадерайт Дитер,
Лоренц Катрин, Вагнер Михаэль,
Пфайффер-Марек Стефания, Лоренц
Мартин (DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к тройным агонистам рецепторов GLP-1/глюкагона/GIP и их медицинскому применению, например, в лечении нарушений при метаболическом синдроме, в том числе диабета и ожирения, а также для снижения избыточного потребления пищи.

040723

B1

040723

B1

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к новым соединениям, которые являются тройными агонистами рецепторов GLP-1/глюкагона/GIP, и их медицинскому применению, например, при лечении нарушений при метаболическом синдроме, в том числе диабета и ожирения, а также для снижения избыточного потребления пищи. Соединения по настоящему изобретению структурно происходят от эксендина-4 и проявляют высокую растворимость и стабильность в кислых условиях в присутствии противомикробных консервантов, таких как м-крезол или фенол, что делает их особенно подходящими для комбинаций с другими противодиабетическими соединениями.

Уровень техники изобретения

В работах Bhat et al. (Diabetologia, 2013, 56, 1417-1424), Bhat et al. (Biochem. Pharmacol. 2013, 85, 1655-62), Gault et al. (J. Biol. Chem. 2013, 288, 35581-91), а также Finan et al. (Nat. Med. 2015, 21, 27-36) описаны тройные агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагона и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP), например, разработанные путем объединения действий GLP-1, глюкагона и GIP в одной молекуле, что приводит к получению терапевтического действующего вещества с противодиабетическим действием и выраженным эффектом снижения веса, превосходящими таковые у чистых агонистов GLP-1, благодаря, среди прочего, повышению чувства насыщения и расхода энергии, опосредованному рецептором глюкагона, а также повышению секреции инсулина, опосредованному рецептором GIP.

Аминокислотная последовательность GLP-1(7-36)-амида показана под SEQ ID NO: 1:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGR-NH₂

Лираглутид представляет собой представленный на рынке химически модифицированный аналог GLP-1, в котором среди прочих модификаций жирная кислота связана с лизином в положении 20, что приводит к продолжительной длительности действия (Drucker et al., Nat. Rev. Drug Disc. 2010, 9, 267-268; Buse et al., Lancet 2009, 374, 39-47).

Аминокислотная последовательность лираглутида показана под SEQ ID NO: 2:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK (S)-4-карбокси-4-гексадеканойламинобутирил) EFWLVRGRG-OH.

Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, который высвобождается в кровоток при низком уровне циркулирующей в крови глюкозы.

Аминокислотная последовательность глюкагона показана под SEQ ID NO 3:

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-OH

При гипогликемии, когда уровни глюкозы в крови опускаются ниже нормальных, глюкагон посылает печени сигнал о необходимости расщепления гликогена и высвобождения глюкозы, в результате чего уровни глюкозы в крови повышаются, достигая нормального уровня. Последние публикации свидетельствуют о том, что глюкагон дополнительно оказывает благоприятные эффекты на снижение массы жира в организме, снижение потребления пищи и увеличение расхода энергии (Heppner et al., Physiology & Behavior, 2010, 100, 545-548).

GIP (глюкозозависимый инсулинотропный полипептид) представляет собой пептид из 42 аминокислот, который выделяется К-клетками кишечника после потребления пищи. GIP и GLP-1 представляют собой два гормона, продуцируемые энтероэндокринными клетками кишечника, отвечающих за инкретиновый эффект, на долю которого приходится свыше 70% инсулиновой реакции на пероральную глюкозную нагрузку (Baggio et al. Gastroenterology, 2007, 132, 2131-2157).

Аминокислотная последовательность GIP показана под SEQ ID NO: 5:

YAEFTFISDYSIAMDKINHQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ-OH

Пептиды, в основе которых лежит структура GLP-1 или глюкагона, и которые связывают и активируют рецепторы GLP-1, глюкагона и GIP, были описаны в заявках на патенты WO 2010/011439, WO 2010/148089, WO 2012/088116, WO 2013/192129, WO 2013/192130, WO 2014/049610 и WO 2015/067716. Дополнительные триспецифические агонисты на основе эксендина-4 были описаны в WO 2014/096145, WO 2015/086731, WO 2015/086732, WO 2015/086733, WO 2015/155141 и PCT/EP2016/063332. Было показано, что соединения, описанные в них, приводят к улучшенному гликемическому контролю, возможному сохранению островковых клеток и бета-клеток и интенсивному снижению веса тела.

Пептиды, которые связывают и активируют как рецептор GIP, так и рецептор GLP-1, сконструированные в виде аналогов эксендина-4 и замещенные боковой цепью жирной кислоты, описаны в заявках на патенты WO 2014/096145 A1, WO 2014/096150 A1, WO 2014/096149 A1 и WO 2014/096148 A1.

Эксендин-4 представляет собой пептид из 39 аминокислот, который продуцируется слюнными железами аризонского ядозуба (*Heloderma suspectum*). Эксендин-4 является активатором рецептора GLP-1, в то же время он демонстрирует низкий уровень активации рецептора GIP и не активирует рецептор глюкагона (см. табл. 1).

Таблица 1

Эффективность эксендина-4 в отношении рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона человека (указана в пМ) при увеличении концентраций и измерении образующегося cAMP, как описано в разделе "Способы"

SEQ ID NO:	Пептид	EC50 для hGLP-1 R [пМ]	EC50 для hGIP R [пМ]	EC50 для hGlucagon R [пМ]
4	Эксендин-4	0,4	12500,0	>10000000

Аминокислотная последовательность эксендина-4 представлена под SEQ ID NO: 4:
HGGFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH2

Эксендин-4 обладает многими общими глюкорегуляторными действиями, которые наблюдаются у GLP-1. Клинические и доклинические исследования показали, что эксендин-4 обладает несколькими благоприятными противодиабетическими свойствами, в том числе глюкозозависимым усилением синтеза и секреции инсулина, глюкозозависимым подавлением секреции глюкагона, замедлением опорожнения желудка, снижением потребления пищи и веса тела, а также повышением массы бета-клеток и маркеров функции бета-клеток.

Данные эффекты могут быть благоприятными не только для больных диабетом, но также для пациентов, страдающих ожирением. Пациенты с ожирением имеют более высокий риск развития диабета, гипертензии, гиперлипидемии, заболеваний сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата.

По сравнению с GLP-1 эксендин-4 является устойчивым к расщеплению дипептидилпептидазой-4 (DPP4), что приводит к более длительному периоду полужизни и продолжительности активности *in vivo* (Eng. J., Diabetes, 1996, 45 (Suppl 2):152A (abstract 554)).

Также было показано, что эксендин-4 является в значительной степени более стабильным в отношении расщепления нейтральной эндопептидазой (NEP) по сравнению с GLP-1, глюкагоном или оксинтомодулином (Druce et al., Endocrinology, 2009, 150(4), 1712-1722). Вместе с тем эксендин-4 является химически неустойчивым вследствие окисления метионина в положении 14 (Hargrove et al., Regul. Pept., 2007, 141, 113-119), а также дезамидирования и изомеризации аспарагина в положении 28 (WO 2004/035623).

Bloom et al. (WO 2006/134340) раскрывают, что пептиды, которые связываются и активируют как рецептор глюкагона, так и рецептор GLP-1, можно создавать в виде гибридных молекул из глюкагона и эксендина-4, где N-концевая часть (например, остатки 1-14 или 1-24) происходит из глюкагона и C-концевая часть (например, остатки 15-39 или 25-39) происходит из эксендина-4. Такие пептиды содержат аминокислотный мотив YSKY глюкагона в положении 10-13. Krstenansky et al. (Biochemistry, 1986, 25, 3833-3839) показали важность этих остатков 10-13 из глюкагона для взаимодействий с его рецептором и активации аденилатциклазы.

По сравнению с GLP-1, глюкагоном и оксинтомодулином эксендин-4 характеризуется благоприятными физико-химическими свойствами, такими как растворимость и стабильность в растворе и при физиологических условиях (в том числе стабильность в отношении разрушения при воздействии ферментами, такими как DPP4 или NEP), результатом чего является более длительная продолжительность активности *in vivo*.

Тем не менее также было показано, что эксендин-4 является химически неустойчивым вследствие окисления метионина в положении 14, а также дезамидирования и изомеризации аспарагина в положении 28. Стабильность можно дополнительно улучшать с помощью замены метионина в положении 14 и исключения последовательностей, которые, как известно, склонны к разрушению посредством образования аспартимида, в частности, Asp-Gly или Asn-Gly в положениях 28 и 29.

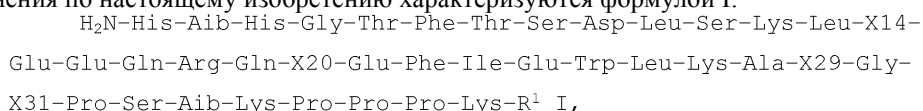
Описание изобретения

У соединений по настоящему изобретению несколько из лежащих в их основе остатков отличаются от остатков глюкагона и пептидов, описанных в WO 2006/134340. В частности, остатки Tyr10 и Tyr13, которые, как известно, способствуют фибриллированию глюкагона (J.S. Pedersen et al., Biochemistry, 2006, 45, 14503-14512), заменены на Leu. Эта замена, особенно в комбинации с изолейцином в положении 23 и глутаматом в положении 24, приводит к образованию производных эксендина-4 с потенциально улучшенными биофизическими свойствами, такими как растворимость или способность к агрегации в растворе. Замена ароматической аминокислоты на алифатическую аминокислоту в положении 13 аналога эксендина-4 приводит к образованию пептидов с высокой активностью в отношении как рецептора глюкагона, так и рецептора GIP с сохранением их активности в отношении рецептора GLP-1.

Нативный эксендин-4 представляет собой чистый агонист рецептора GLP-1, который не проявляет активности в отношении рецептора глюкагона и характеризуется низкой активностью в отношении рецептора GIP. В основе соединений по настоящему изобретению лежит структура нативного эксендина-4,

но они отличаются по 14 или более положениям по сравнению с SEQ ID NO: 4, причем данные отличия обуславливают усиление агонистической активности в отношении рецептора глюкагона и рецептора GIP. Среди прочих замен метионин в положении 14 заменен аминокислотой, несущей группу $-NH_2$ в боковой цепи, которая дополнительно замещена липофильным остатком (например, жирной кислотой в сочетании с линкером). Дополнительная замена аминокислот эксендина-4 в положениях 13, 19, 20, 32, 34, 35 и 39 - на Leu в положении 13, на Gln в положении 19, на аминокислоту Aib или Lys в положении 20, на Aib в положении 34, на Pro в положении 32 и на Lys в положениях 35 и 39 - приводит к высокой активности в отношении рецептора глюкагона, а также рецептора GIP с сохранением высокой активности в отношении рецептора GLP-1. Данные пептиды также проявляют высокую химическую стабильность, растворимость и физическую стабильность при кислых значениях pH, таких как pH 4,5.

Соединения по настоящему изобретению характеризуются формулой I:



где X14 представляет собой аминокислотный остаток с функционализированной группой $-NH_2$ боковой цепи, выбранный из группы, состоящей из Lys, Orn, Dab или Dar, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализирована с помощью $-Z-C(O)-R^5$, где Z представляет собой линкер во всех стереоизомерных формах и R^5 представляет собой фрагмент, содержащий не более 50 атомов углерода и гетероатомы, выбранные из N и O;

X20 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Aib и Lys;

X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;

X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;

R^1 представляет собой NH_2 или OH,

или их соль или сольват.

Соединения по настоящему изобретению являются агонистами рецепторов GLP-1, глюкагона и GIP, как определено путем наблюдения того, что они способны стимулировать образование внутриклеточного cAMP в анализируемой системе, описанной в разделе "Способы".

Согласно другому варианту осуществления соединения по настоящему изобретению, в частности, с лизином в положении 14, который дополнительно замещен липофильным остатком, проявляют относительную активность, составляющую по меньшей мере 0,1% (т.е. $EC_{50 < 700 \text{ нМ}}$), более предпочтительно 1% (т.е. $EC_{50 < 70 \text{ нМ}}$), более предпочтительно 3,5% (т.е. $EC_{50 < 20 \text{ нМ}}$) и еще более предпочтительно 7% (т.е. $EC_{50 < 10 \text{ нМ}}$) по сравнению с относительной активностью GLP-1(7-36)-амида в отношении рецептора GLP-1. Кроме того, соединения по настоящему изобретению проявляют относительную активность, составляющую по меньшей мере 0,1% (т.е. $EC_{50 < 500 \text{ нМ}}$), более предпочтительно 0,5% (т.е. $EC_{50 < 100 \text{ нМ}}$), более предпочтительно 1% (т.е. $EC < 50 \text{ нМ}$) и еще более предпочтительно 5% (т.е. $EC_{50 < 10 \text{ нМ}}$) по сравнению с относительной активностью природного глюкагона в отношении рецептора глюкагона. Кроме того, соединения по настоящему изобретению проявляют относительную активность, составляющую по меньшей мере 0,1% (т.е. $EC_{50 < 400 \text{ нМ}}$), более предпочтительно 0,4% (т.е. $EC_{50 < 100 \text{ нМ}}$), более предпочтительно 1% (т.е. $EC < 40 \text{ нМ}$) и еще более предпочтительно 4% (т.е. $EC_{50 < 10 \text{ нМ}}$) по сравнению с относительной активностью природного GIP в отношении рецептора GIP.

Термин "активность", используемый в данном документе, предпочтительно относится к способности соединения активировать рецептор GLP-1 человека, рецептор глюкагона человека и рецептор GIP человека. Более предпочтительно термин "активность", используемый в данном документе, относится к способности соединения стимулировать образование внутриклеточного cAMP. Термин "относительная активность", используемый в данном документе, понимают как относящийся к способности соединения активировать рецептор в определенном соотношении по сравнению с другим агонистом рецептора или по сравнению с другим рецептором. Активацию рецепторов агонистами (например, путем измерения уровня cAMP) определяют, как описано в данном документе, например, как описано в разделе "Примеры".

Соединения по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются EC_{50} для рецептора hGLP-1, составляющей 450 пМ или меньше, предпочтительно 200 пМ или меньше, более предпочтительно 100 пМ или меньше, более предпочтительно 50 пМ или меньше, более предпочтительно 25 пМ или меньше, более предпочтительно 10 пМ или меньше, более предпочтительно 8 пМ или меньше и более предпочтительно 5 пМ или меньше, и EC_{50} для рецептора hGlucagon, составляющей 450 пМ или меньше, предпочтительно 200 пМ или меньше, более предпочтительно 100 пМ или меньше, более предпочтительно 50 пМ или меньше, более предпочтительно 25 пМ или меньше, более предпочтительно 10 пМ или меньше, более предпочтительно 8 пМ или меньше и более предпочтительно 5 пМ или меньше, и EC_{50} для рецептора hGIP, составляющей 450 пМ или меньше, предпочтительно 200 пМ или меньше, более предпочтительно 100 пМ или меньше, более предпочтительно 50 пМ или меньше, более предпочтительно 25 пМ или меньше, более предпочтительно 10 пМ или меньше, более

предпочтительно 8 пМ или меньше и более предпочтительно 5 пМ или меньше. EC_{50} для рецептора hGLP-1, рецептора hGlucagon и рецептора hGIP можно определить, как описано в данном документе в разделе "Способы" и как применяли для получения результатов, описанных в разделе "Примеры".

Соединения формулы I, в частности соединения с лизином в положении 14, который дополнительно замещен липофильным остатком, демонстрируют повышенную активацию рецептора глюкагона по сравнению с производными, содержащими исходный метионин (от эксендина-4) или лейцин в положении 14 (см. также WO 2014/056872). Кроме того, окисление (in vitro или in vivo) метионина более не является возможным.

Соединения формулы I демонстрируют высокую активность не только в отношении рецептора глюкагона, но также в отношении рецептора GIP. Дополнительная высокая активность в отношении рецептора GIP предназначена для повышения эффективности в отношении контроля уровня глюкозы в крови по сравнению с чистым агонизмом в отношении рецептора GLP-1 и для снижения вероятности связанных с GLP-1 побочных эффектов, таких как расстройство желудочно-кишечного тракта, поскольку вклад части GLP-1 может быть уменьшен. Дополнительная активность в отношении GIPR также предназначена для уравнивания потенциального повышения уровня глюкозы при активации рецептора глюкагона, что, таким образом, обеспечивает возможность проявления более высокой активности рецептора глюкагона, как наблюдается у соединений формулы I (Finan et al. Nat. Med. 2015, 21, 27-36).

В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению характеризуются высокой растворимостью при кислых и/или физиологических значениях pH в присутствии противомикробного консерванта, такого как фенол или м-крезол, например, при степени кислотности в диапазоне pH 4-5, в частности pH 4,5, и/или более физиологическом диапазоне pH 6-8, в частности при pH 7,4 при 25 или 40°C, в другом варианте осуществления по меньшей мере 1 мг/мл и в конкретном варианте осуществления по меньшей мере 5 мг/мл.

Кроме того, соединения по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются высокой стабильностью при хранении в растворе в присутствии противомикробного консерванта, такого как фенол или м-крезол. Предпочтительными условиями анализа для определения стабильности является хранение в течение 28 дней при 25 или 40°C в растворе при степени кислотности в диапазоне pH 4-5, в частности pH 4,5. Стабильность пептидов определяют с помощью хроматографических анализов, описанных в разделе "Способы". Предпочтительно через 28 дней при 40°C в растворе при pH 4,5 потеря чистоты составляет не более 20%, более предпочтительно не более 15% и еще более предпочтительно не более 12%.

В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению характеризуются гидродинамическим радиусом R_h , составляющим 5 нм или меньше, при значениях концентрации ≥ 1 мг/мл в присутствии противомикробного консерванта, такого как фенол или м-крезол, например, при степени кислотности в диапазоне pH 4-5 при 25°C, в частности pH 4,5 при 25°C, что анализировали с помощью динамического рассеяния света, как описано в разделе "Способы".

В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению не демонстрируют увеличения интенсивности флуоресценции с применением тиофлавина T в качестве флуоресцентного зонда при значениях концентрации 3 мг/мл в присутствии противомикробного консерванта, такого как фенол или м-крезол, например, при степени кислотности в диапазоне pH 4-5, в частности pH 4,5 при 37°C, в течение 5 ч, более предпочтительно в течение 10 ч, более предпочтительно в течение 20 ч, более предпочтительно в течение 30 ч, более предпочтительно в течение 40 ч и еще более предпочтительно в течение 45 ч, что анализировали с помощью анализа с применением ThT, как описано в разделе "Способы".

В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению более устойчивы к расщеплению нейтральной эндопептидазой (NEP) и дипептидилпептидазой-4 (DPP4), что приводит к более длительным периоду полужизни и продолжительности действия in vivo по сравнению с нативными GLP-1 и глюкагоном.

В одном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению содержат пептидный фрагмент, который представляет собой линейную последовательность из 39 аминокислот, в частности α -аминокислот, связанных пептидными, т.е. карбоксамидными связями.

В одном варианте осуществления R^1 представляет собой NH_2 .

Конкретные предпочтительные примеры групп $-Z-C(O)-R^5$, которые перечислены в табл. 2, выбраны из:

- (S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутирил-,
- (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-,
- (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирила,
- (4S)-карбокси[2-(2-{2-[(4R)-5-карбокси-4-гексадеканоиламинопентаноиламино]этоксис}этоксис)-ацетиламино]бутирила,
- (4S)-карбокси[2-(2-{2-[(4R)-5-карбокси-4-гексадеканоиламинопентаноиламино]этоксис}этоксис)-ацетиламино]бутирила,
- (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино]этоксис}этоксис)ацетиламино]-

этокси}этокси)ацетила,

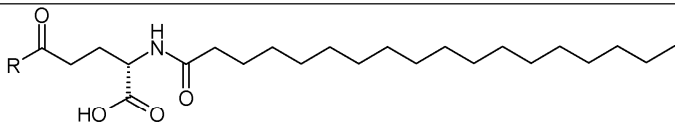
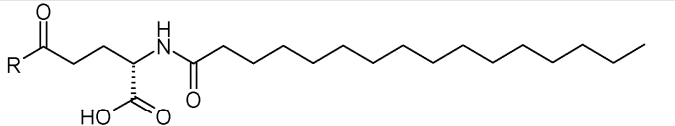
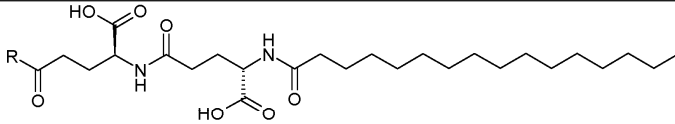
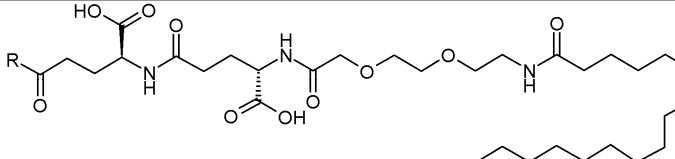
(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутириламино]этокси}этокси)ацетиламино]-

этокси}этокси)ацетила,

[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-октадеканоиламиноэтокси)этокси]ацетиламино}этокси)этокси]ацетил-амино}этокси)этокси]ацетил-

Кроме того, предпочтительными являются стереоизомеры, в частности энантиомеры данных групп, либо S-, либо R-энантиомеры. Термин "R" в табл. 2 предназначен для обозначения места присоединения -Z-C(O)-R⁵ в пептидном остове, например эпсилон-аминогруппы Lys.

Таблица 2

Структура/название согласно IUPAC	Название
 (S)-4-Карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-	gGlu- Stea
 (S)-4-Карбокси-4-гексадеканоиламинобутирил-	gGlu- Palm
 (S)-4-Карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)-бутирил-	gGlu- gGlu- Palm
 [[(4S)-4-Карбокси-4-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[2-[2-[2-(гексадеканоиламино) этокси] этокси] ацетил] амино] бутирил	gGlu- gGlu- AEEAc- Palm

амино]-бутирил-	
(4S)-Карбокси-[2-(2-{2-[(4R)-5-карбокси-4-гексадеканоиламино]пентаноиламино}-этоксид)-этоксид]-ацетиламино]-бутирил	gGlu- AEEAc- gAAA- Palm
(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-Карбокси-4-гексадеканоиламино-бутириламино]-этоксид)-этоксид]-ацетиламино]-этоксид}-этоксид)-ацетил	AEEAc- AEEAc- gGlu- Palm
(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-Карбокси-4-октадеканоиламино-бутириламино]-этоксид)-этоксид]-ацетиламино]-этоксид}-этоксид)-ацетил	AEEAc- AEEAc- gGlu- Stea
[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-Карбокси-4-октадеканоиламиноэтоксид]этоксид]ацетиламино}этоксид)этоксид]ацетиламино}этоксид)этоксид]ацетил-	AEEAc- AEEAc- AEEAc- Stea

Дополнительный вариант осуществления относится к соединениям формулы I, где

X14 представляет собой Lys, где группа -NH_2 боковой цепи функционализирована группой -Z-C(O)R^5 , где

Z представляет собой группу, выбранную из gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-AEEAc-gAAA-, gGlu-gGlu-AEEAc, AEEAc-AEEAc-gGlu и AEEAc-AEEAc-AEEAc; и

R^5 представляет собой группу, выбранную из пентадеканила или гептадеканила.

Дополнительный вариант осуществления относится к соединениям формулы I, где

X14 представляет собой Lys, где группа -NH_2 боковой цепи функционализирована группой -Z-C(O)R^5 , где

Z представляет собой группу, выбранную из gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-AEEAc-gAAA- и gGlu-gGlu-AEEAc; и

R^5 представляет собой группу, выбранную из пентадеканила или гептадеканила.

Дополнительный вариант осуществления относится к соединениям формулы I, где

X14 представляет собой Lys, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализирована с помощью

(S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутирил-,

(S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-,

(S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,

(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино]этокси}этокси)ацетиламино]-этокси}этокси)ацетила,

(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутириламино]этокси}этокси)ацетиламино]-

(S)-4-карбоксит-4-((S)-4-карбоксит-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
(S)-4-карбоксит-4-октадеканоиламинобутирил-,

X20 представляет собой Aib;

X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;

X31 представляет собой Pro;

R¹ представляет собой NH₂,

или их соли или сольваты.

Дополнительный вариант осуществления относится к соединениям формулы I, где

X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализирована с помощью (S)-4-карбоксит-4-((S)-4-карбоксит-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,

X20 представляет собой Aib;

X29 представляет собой D-Ala;

X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;

R¹ представляет собой NH₂,

или их соли или сольваты.

Конкретными примерами соединений формулы I являются соединения под SEQ ID NO: 6-27, а также их соли или сольваты.

Конкретными примерами соединений формулы I являются соединения под SEQ ID NO: 6, 9 и 11, а также их соли или сольваты.

Конкретным примером соединений формулы I являются соединения под SEQ ID NO: 6, а также их соли или сольваты.

Конкретным примером соединений формулы I являются соединения под SEQ ID NO: 9, а также их соли или сольваты.

Конкретным примером соединений формулы I являются соединения под SEQ ID NO: 11, а также их соли или сольваты.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению в смеси с носителем. В предпочтительных вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтически приемлемую композицию, а носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель. Соединения по настоящему изобретению могут быть в форме соли, например фармацевтически приемлемой соли, или сольвата, например гидрата. В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции для применения в способе медицинского лечения, в частности в медицине человека.

Соединения формулы I являются подходящими для лечения человека без дополнительного терапевтически эффективного средства. В других вариантах осуществления, тем не менее, соединения можно применять вместе по меньшей мере с одним дополнительным терапевтически активным средством, как описано в разделе "Комбинированная терапия".

Соединения формулы I являются особенно подходящими для лечения или предупреждения заболеваний или нарушений, вызванных, связанных с и/или сопровождающихся нарушениями метаболизма углеводов и/или липидов, например, для лечения или предупреждения гипергликемии, диабета 2 типа, нарушения толерантности к глюкозе, диабета 1 типа, ожирения и метаболического синдрома. Кроме того, соединения по настоящему изобретению могут подходить для лечения или предупреждения дегенеративных заболеваний, в частности нейродегенеративных заболеваний.

Описанные соединения нашли свое применение, среди прочего, в предупреждении прибавления веса тела или в снижении веса тела. Термин "предупреждение" означает ингибирование или уменьшение по сравнению с отсутствием лечения и необязательно означает полное прекращение нарушения.

Соединения по настоящему изобретению могут вызывать снижение потребления пищи и/или увеличение расхода энергии, что приводит к наблюдаемому эффекту в отношении веса тела.

Вне зависимости от их эффекта в отношении веса тела соединения по настоящему изобретению могут оказывать благоприятный эффект в отношении уровней холестерина в циркулирующей крови, будучи способными улучшать уровни содержания липидов, в частности уровни LDL, а также HDL (например, увеличивая соотношение HDL/LDL).

Таким образом, соединения по настоящему изобретению можно применять для непосредственной или опосредованной терапии любого состояния, вызванного или характеризующегося избыточным весом тела, такой как лечение и/или предупреждение ожирения, ожирения, препятствующего нормальному функционированию организма, воспаления, связанного с ожирением, заболевания желчного пузыря, связанного с ожирением, приступа апноэ во сне, вызванного ожирением. Их можно использовать также для лечения и предупреждения метаболического синдрома, диабета, гипертензии, атерогенной дислипидемии, атеросклероза, артериосклероза, ишемической болезни сердца или инсульта. Их эффекты при данных состояниях могут являться результатом их эффекта в отношении веса тела или быть связанными с ним или могут быть независимыми от него.

Варианты медицинского применения включают задержку или предупреждение прогрессирования заболевания при диабете 2 типа, лечение метаболического синдрома, лечение ожирения или предупреждение

дение избыточного веса, снижения потребления пищи, увеличение расхода энергии, снижение веса тела, задержку прогрессирования нарушения толерантности к глюкозе (IGT) в диабет 2 типа; задержку прогрессирования диабета 2 типа в инсулинозависимый диабет.

Определения

Аминокислотные последовательности по настоящему изобретению содержат обычные однобуквенные и трехбуквенные коды для встречающихся в природе аминокислот, а также общепринятые трехбуквенные коды для других аминокислот, таких как Aib (α -аминоизомасляная кислота).

Термин "нативный эксендин-4" относится к нативному эксендину-4, имеющему последовательность

HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 4)

Настоящее изобретение относится к пептидным соединениям, определенным формулой I.

Пептидные соединения по настоящему изобретению содержат линейный остов из аминокарбоновых кислот, связанных пептидными, т.е. карбоксамидными, связями. Предпочтительно аминокарбоновые кислоты представляют собой α -аминокарбоновые кислоты и более предпочтительно L- α -аминокарбоновые кислоты, если не указано иное. Такие пептидные соединения предпочтительно содержат каркасную последовательность из 39 аминокарбоновых кислот.

Аминокислоты в пептидном фрагменте (формула I) можно рассматривать как последовательно пронумерованные от 1 до 39 в общепринятом направлении от N-конца к C-концу. Ссылка на "положение" в пептидном фрагменте I должна быть составлена таким образом, как необходимо ссылаться на положения в нативном эксендине-4 и других молекулах, например в эксендине-4 His находится в положении 1, Gly находится в положении 2, ..., Met находится в положении 14, ... и Ser находится в положении 39.

Аминокислотный остаток с группой -NH₂ боковой цепи, например Lys, Orn, Dab или Dar, функционализирует в том отношении, что по меньшей мере один атом Н группы -NH₂ боковой цепи заменяют на -Z-C(O)-R⁵, где R⁵ содержит липофильный фрагмент, например ациклическую линейную или разветвленную (C₈-C₃₀) насыщенную или ненасыщенную углеводородную группу, которая является незамещенной или замещенной, например, галогеном (F, Cl, Br, J), -ОН и/или CO₂H, а Z содержит линкер во всех стереоизомерных формах, например линкер, содержащий одну или несколько, например от 1 до 5, предпочтительно 1, 2 или 3, аминокислотных линкерных групп, выбранных из группы гамма-глутамата (gGlu), gAAA и AEEAc. Предпочтительные группы R⁵ содержат липофильный фрагмент, например ациклическую линейную или разветвленную (C₁₂-C₂₀) насыщенную или ненасыщенную углеводородную группу, например пентадеканил, гексадеканил или гептадеканил, которая является незамещенной или замещенной CO₂H, более предпочтительно пентадеканил или гептадеканил. В одном варианте осуществления аминокислотные линкерные группы выбраны из gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-gGlu-AEEAc, gGlu-AEEAc-gAAA, AEEAc-AEEAc-gGlu и AEEAc-AEEAc-AEEAc. В другом варианте осуществления аминокислотная линкерная группа представляет собой gGlu. В другом варианте осуществления аминокислотная линкерная группа представляет собой gGlu-gGlu. В другом варианте осуществления аминокислотная линкерная группа представляет собой gGlu-gGlu-AEEAc. В другом варианте осуществления аминокислотная линкерная группа представляет собой gGlu-AEEAc-gAAA. В другом варианте осуществления аминокислотная линкерная группа представляет собой AEEAc-AEEAc-gGlu. В другом варианте осуществления аминокислотная линкерная группа представляет собой AEEAc-AEEAc-AEEAc.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению, описанное в данном документе, или его соль или сольват в смеси с носителем.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата, в частности для лечения состояния, описанного в данном описании.

Настоящее изобретение также относится к композиции, где композиция представляет собой фармацевтически приемлемую композицию и носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель.

Синтез пептидов.

Специалисту в данной области техники известен ряд различных способов получения пептидов. Такие способы включают без ограничения синтетические подходы и экспрессию рекомбинантных генов. Таким образом, одним способом получения пептидов является синтез в растворе либо на твердой подложке и последующие выделение и очистка. Другим способом получения пептидов является экспрессия генов в клетке-хозяине, в которую была введена последовательность ДНК, кодирующая пептид. В качестве альтернативы экспрессии генов можно достичь без использования клеточной системы. Описанные выше способы можно также комбинировать любым способом.

Предпочтительным способом получения соединений по настоящему изобретению является твердофазный синтез на подходящей смоле. Твердофазный синтез пептидов является хорошо отработанной методикой (см., например, Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford,

III., 1984; E. Atherton and R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*, Oxford-IRL Press, New York, 1989). Твердофазный синтез инициируют посредством присоединения защищенной с N-конца аминокислоты с помощью ее карбоксиконца к инертной твердой подложке, несущей расщепляемый линкер. Данная твердая подложка может представлять собой любой полимер, который обеспечивает соединение с первой аминокислотой, например тритильную смолу, хлортритильную смолу, смолу Ванга или смолу Ринка, при этом связывание карбоксильной группы (или карбоксамидной для смолы Ринка) со смолой является чувствительным к кислоте (при применении стратегии Fmoc). Полимерная подложка должна быть стабильной в условиях, используемых для снятия защиты с α -аминогруппы в ходе синтеза пептидов.

После связывания защищенной с N-конца первой аминокислоты с твердой подложкой защитную группу для α -аминогруппы этой аминокислоты удаляют. Затем остальные защищенные аминокислоты связывают одну за другой или с заранее преобразованным дипептидом, трипептидом или тетрапептидом в порядке, представленном пептидной последовательностью, с помощью соответствующих реагентов, связывающих амиды, например BOP, HBTU, HATU или DIC (N,N'-диизопропилкарбодиимид)/HOBT (1-гидроксibenзотриазол), где BOP, HBTU и HATU применяют с основаниями третичных аминов. В качестве альтернативы освобожденный N-конец можно функционализировать группами, отличными от аминокислот, например карбоновыми кислотами и т.д.

Как правило, реакционноспособные группы боковых цепей аминокислот защищают подходящими блокирующими группами. Данные защитные группы удаляют после завершения сборки требуемых пептидов. Их удаляют одновременно с отщеплением требуемого продукта от смолы при тех же условиях. Защитные группы и процедуры для введения защитных групп можно найти в *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed., Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., Wiley & Sons (New York, 1999).

В некоторых случаях может быть желательным иметь защитные группы боковых цепей, которые можно селективно удалять, в то время как другие защитные группы боковых цепей остаются нетронутыми. В таком случае освобожденную функциональную группу можно селективно функционализировать. Например, лизин можно защищать с помощью защитной группы ivDde ([1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил] (S.R. Chhabra et al., *Tetrahedron Lett.* 39, (1998), 1603), которая является лабильной в отношении высоконуклеофильного основания, например 4% гидразина в DMF (диметилформамид). Таким образом, если N-концевая аминогруппа и все функциональные группы боковой цепи защищены кислото-неустойчивыми защитными группами, то группу ivDde можно селективно удалять с применением 4% гидразина в DMF, а затем соответствующую свободную аминогруппу можно дополнительно модифицировать, например, с помощью ацилирования. В качестве альтернативы лизин можно присоединять к защищенной аминокислоте, а затем снимать защиту с аминогруппы данной аминокислоты с получением в результате другой свободной аминогруппы, которую можно ацилировать или прикреплять к дополнительным аминокислотам. В качестве альтернативы боковую цепь (описанную в табл. 2) можно вводить вместе с лизином в ходе синтеза пептидов с применением предварительно функционализированной структурной единицы, например, (2S)-6-[[[(4S)-5-трет-бутокс-4-[[[(4S)-5-трет-бутокс-4-(гексадеканоиламино)-5-оксепентаноил]амино]-5-оксепентаноил]амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексановой кислоты, в качестве партнера сочетания.

В конечном итоге пептид отщепляют от смолы. Этого можно достичь с помощью использования смеси Кинга (D.S. King, C.G. Fields, G.B. Fields, *Int. J. Peptide Protein Res.* 36, 1990, 255-266). Затем исходный материал можно очищать с помощью хроматографии, например препаративной RP-HPLC, при необходимости.

Эффективность.

Используемые в данном документе термины "эффективность" или "эффективность in vitro" представляют собой показатель способности соединения активировать рецепторы GLP-1, глюкагона или GIP в исследовании на клетках. Численно это выражается как "значение EC₅₀", которое представляет собой эффективную концентрацию соединения, индуцирующую полумаксимальное повышение ответа (например, образование внутриклеточного cAMP) в эксперименте зависимости доза-ответ.

Терапевтические применения.

Метаболический синдром представляет собой комбинацию болезней, которые, возникая вместе, увеличивают риск развития диабета 2 типа, а также атеросклеротических сосудистых заболеваний, например сердечно-сосудистых заболеваний и инсульта. Определяющие медицинские параметры метаболического синдрома включают сахарный диабет, нарушение толерантности к глюкозе, повышенный уровень глюкозы в крови натощак, инсулинорезистентность, секрецию альбумина с мочой, центральное ожирение, гипертензию, повышенный уровень триглицеридов, повышенный уровень холестерина LDL и сниженный уровень холестерина HDL.

Ожирение является нарушением, при котором избыток жира в организме накопился до такой степени, при которой он может оказывать неблагоприятный эффект на здоровье и продолжительность жизни, и в связи с увеличением распространенности ожирения у взрослых и детей оно стало одной из ведущих предупреждаемых причин смерти в современном мире. Оно увеличивает вероятность различных других

заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа, обструктивного апноэ во сне, некоторых видов рака и остеоартрита, и чаще всего вызвано комбинацией избыточного потребления пищи, сниженного расхода энергии, а также генетической предрасположенностью.

Сахарный диабет, часто называемый просто диабетом, представляет собой группу метаболических заболеваний, при которых индивидуум имеет высокие уровни сахара в крови, либо потому, что организм не вырабатывает достаточного количества инсулина, либо потому, что клетки не реагируют на вырабатываемый инсулин. Наиболее распространенными типами диабета являются (1) диабет 1 типа, при котором организм не в состоянии вырабатывать инсулин; (2) диабет 2 типа (T2DM), при котором организм не в состоянии использовать инсулин надлежащим образом в сочетании с увеличением дефицита инсулина с течением времени; и (3) гестационный диабет, при котором у женщины развивается диабет вследствие беременности. Все формы диабета увеличивают риск долговременных осложнений, которые, как правило, развиваются по прошествии многих лет. Основой большинства таких долговременных осложнений является повреждение кровеносных сосудов, и их можно разделить на две категории: "макрососудистое" заболевание, возникающее в результате атеросклероза крупных кровеносных сосудов, и "микрососудистое" заболевание, возникающее в результате повреждения мелких кровеносных сосудов. Примерами макрососудистых заболеваний являются ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт и заболевание периферических сосудов. Примерами микрососудистых заболеваний являются диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, а также диабетическая нейропатия.

Рецепторы для GLP-1 и GIP, а также для глюкагона являются представителями семейства 7-спиральных трансмембранных, гетеротримерных, связанных с G-белком рецепторов. Они структурно связаны друг с другом и имеют не только значительный уровень идентичности последовательности, но и обладают аналогичными механизмами распознавания лиганда и внутриклеточными сигнальными путями.

Аналогичным образом пептиды GLP-1, GIP и глюкагон имеют участки высокой идентичности/подобия последовательности. GLP-1 и глюкагон получают из общего предшественника, препроглюкагона, который дифференцированно процессируется тканеспецифичным образом с получением, например, GLP-1 в эндокринных клетках кишечника и глюкагона в альфа-клетках панкреатических островков. GIP является производным более крупного предшественника-прогормона про-GIP и синтезируется и выделяется K-клетками, расположенными в тонком кишечнике.

Пептидные инкретиновые гормоны GLP-1 и GIP секретируются эндокринными клетками кишечника в ответ на пищу и отвечают за не более 70% включительно секреции инсулина, стимулированной приемом пищи. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что секреция GLP-1 снижена у субъектов с нарушением толерантности к глюкозе или диабетом 2 типа, тогда как чувствительность к GLP-1 у таких пациентов все еще сохранена. Таким образом, целенаправленное воздействие на рецептор GLP-1 подходящими агонистами предлагает перспективный подход для лечения метаболических нарушений, в том числе диабета. Рецептор для GLP-1 является широко распространенным, и его выявляют главным образом в панкреатических островках, головном мозге, сердце, почках и желудочно-кишечном тракте. В поджелудочной железе GLP-1 действует строго глюкозозависимым образом, увеличивая секрецию инсулина из бета-клеток. Такая зависимость от глюкозы показывает малую вероятность того, что активация рецепторов GLP-1 вызовет гипогликемию. Кроме того, рецептор для GIP широко экспрессируется в периферических тканях, в том числе в панкреатических островках, жировой ткани, желудке, тонком кишечнике, сердце, костях, легких, почках, семенниках, коре надпочечников, гипофизе, эндотелиальных клетках, трахее, селезенке, вилочковой железе, щитовидной железе и головном мозге. В соответствии с его биологической функцией в виде инкретинового гормона, панкреатические β -клетки у людей экспрессируют наивысшие уровни рецептора для GIP.

Существует несколько клинических доказательств того, что опосредованная рецептором GIP передача сигнала может быть нарушена у пациентов с T2DM, однако показано, что нарушение активности GIP является обратимым и может восстанавливаться с улучшением диабетического статуса. Необходимо отметить, что стимуляция секреции инсулина обоими инкретинowymi гормонами, GIP и GLP-1, является строго глюкозозависимой, обеспечивая механизм абсолютной надежности, ассоциированный с низким риском возникновения гипогликемии.

Было показано, что на уровне бета-клеток GLP-1 и GIP стимулируют чувствительность к глюкозе, неогенез, пролиферацию, транскрипцию проинсулина и гипертрофию, а также антиапоптотические свойства. Можно ожидать, что пептид с агонистической активностью как в отношении рецептора GLP-1, так и рецептора GIP будет иметь дополнительную или синергическую противодиабетическую эффективность. Другие значимые эффекты GLP-1 вне поджелудочной железы включают замедленное опорожнение желудка, повышенное чувство насыщения, снижение потребления пищи, уменьшение веса тела, а также нейропротективные и кардиопротективные эффекты. У пациентов с диабетом 2 типа такие экстрапанкреатические эффекты могут быть особенно важны, учитывая высокие уровни сопутствующих патологий, таких как ожирение и сердечно-сосудистое заболевание. Дополнительное действие GIP в периферических тканях за пределами поджелудочной железы включает повышенное образование костной ткани и сниженную резорбцию костной ткани, а также нейропротективные эффекты, которые могут быть по-

лезны для лечения остеопороза и когнитивных нарушений, таких как болезнь Альцгеймера.

Глюкагон представляет собой пептидный гормон из 29 аминокислот, который продуцируется панкреатическими альфа-клетками и выделяется в кровоток при низком уровне циркулирующей в крови глюкозы. Важной физиологической ролью глюкагона является стимуляция образования глюкозы в печени, что представляет собой процесс, обеспечивающий основной антагонистический механизм для инсулина в поддержании гомеостаза глюкозы *in vivo*.

Однако рецепторы глюкагона также экспрессируются во внепеченочных тканях, таких как почки, сердце, адипоциты, лимфобласты, головной мозг, сетчатка, надпочечники и желудочно-кишечный тракт, что указывает на более широкую физиологическую роль помимо гомеостаза глюкозы. Соответственно недавние исследования показали, что глюкагон характеризуется терапевтически положительными эффектами в отношении регуляции расхода энергии, в том числе стимуляции расхода энергии и термогенеза, сопровождающихся уменьшением потребления пищи и снижением веса тела. В целом, стимуляция рецепторов глюкагона может быть пригодной при лечении ожирения и метаболического синдрома.

Оксинтомодулин представляет собой пептидный гормон, состоящий из глюкагона с восемью аминокислотами, содержащими С-концевое удлинение. Подобно GLP-1 и глюкагону, он преобразован в препроглюкагон и расщепляется и секретируется тканеспецифичным образом эндокринными клетками тонкого кишечника. Известно, что оксинтомодулин стимулирует рецепторы как для GLP-1, так и для глюкагона и, таким образом, является прототипом двойного агониста (см. Pocai, *Molecular Metabolism*, 2013; 3:241-51).

Поскольку GLP-1 и GIP известны своими противодиабетическими эффектами, как GLP-1, так и глюкагон известны своими эффектами, подавляющими потребление пищи, а глюкагон также является медиатором дополнительного расхода энергии, можно предположить, что объединение активностей трех гормонов в одной молекуле может дать мощный лекарственный препарат для лечения метаболического синдрома и, в частности, таких его составляющих, как сахарный диабет и ожирение.

Исходя из этого, соединения по настоящему изобретению можно использовать для лечения нарушения переносимости глюкозы, инсулинорезистентности, преддиабета, повышенного уровня глюкозы в крови натощак (гипергликемии), диабета 2 типа, гипертензии, дислипидемии, атеросклероза, ишемической болезни сердца, заболевания периферических артерий, инсульта или любой комбинации компонентов этих отдельных заболеваний.

Кроме того, их можно использовать для контроля аппетита, питания и потребления калорий, увеличения расхода энергии, предупреждения прибавления веса тела, стимуляции снижения веса тела, снижения избыточного веса тела и в целом для лечения ожирения, в том числе ожирения, препятствующего нормальному функционированию организма.

Соединения по настоящему изобретению являются агонистами рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона (например, "тройными агонистами") и могут обеспечивать терапевтическое преимущество при решении клинической проблемы, связанной с метаболическим синдромом, с помощью одновременного лечения диабета и ожирения.

Дополнительные патологические состояния и состояния здоровья, которые можно лечить соединениями по настоящему изобретению, представляют собой связанное с ожирением воспаление, связанное с ожирением заболевание желчного пузыря и приступ апноэ во сне, вызванный ожирением.

Несмотря на то что все данные состояния могут быть непосредственно или опосредованно связаны с ожирением, эффекты соединений по настоящему изобретению могут быть опосредованы в целом или частично эффектом на вес тела или не зависеть от него.

Кроме того, подлежащие лечению заболевания могут представлять собой нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона, или другие дегенеративные заболевания, описанные выше.

В одном варианте осуществления соединения являются пригодными при лечении или предупреждении гипергликемии, диабета 2 типа и/или ожирения.

Соединения по настоящему изобретению могут обладать способностью замедлять прохождение содержимого через кишечник, увеличивать содержимое желудка и/или снижать потребление пищи пациентом. Данные виды активности соединений по настоящему изобретению можно оценивать на животных моделях, известных специалисту в данной области техники и описанных в данном документе в разделе "Способы".

Соединения по настоящему изобретению обладают способностью снижать уровень глюкозы в крови и/или снижать уровни HbA1c у пациента. Данные виды активности соединений по настоящему изобретению можно оценивать на животных моделях, известных специалисту в данной области техники, а также описанных в данном документе в разделах "Способы" и "Примеры".

Соединения по настоящему изобретению также могут обладать способностью снижать вес тела пациента. Данные виды активности соединений по настоящему изобретению можно оценивать на животных моделях, известных специалисту в данной области техники, а также описанных в данном документе в разделах "Способы" и "Примеры".

Соединения по настоящему изобретению могут быть пригодными при лечении или предупрежде-

нии гепатостеатоза, предпочтительно неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH).

Фармацевтические композиции.

Термин "фармацевтическая композиция" означает смесь, содержащую ингредиенты, которые совместимы при смешивании и которые можно вводить. Фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько лекарственных средств для медицинского применения. Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать носители, буферы, подкисляющие средства, подщелачивающие средства, растворители, вспомогательные средства, средства, регулирующие тоничность, смягчающие средства, средства, увеличивающие объем, консерванты, физические и химические стабилизаторы, например поверхностно-активные вещества, антиоксиданты и другие компоненты, независимо от того, считаются ли они активными или неактивными ингредиентами. Руководство для специалиста по составлению фармацевтических композиций можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A.R. Gennaro, 2000, Lippencott Williams & Wilkins и в R.C. Rowe et al. (Ed), Handbook of Pharmaceutical Excipients, PhP, обновленная редакция в мае 2013 г.

Пептидные производные эксендина-4 по настоящему изобретению или их соли вводят в сочетании с приемлемым фармацевтическим носителем, разбавителем или наполнителем в качестве части фармацевтической композиции.

"Фармацевтически приемлемый носитель" представляет собой носитель, который является физиологически приемлемым (например, имеет физиологически приемлемое значение pH), сохраняя при этом терапевтические свойства вещества, с которым его вводят. Стандартные приемлемые фармацевтические носители и их составы известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A.R. Gennaro, 2000, Lippencott Williams & Wilkins и в R.C. Rowe et al. (Ed), Handbook of Pharmaceutical excipients, PhP, обновленная редакция в мае 2013 г. Одним иллюстративным фармацевтически приемлемым носителем является физиологический солевой раствор.

В одном варианте осуществления носители выбраны из группы буферов (например, цитрат/лимонная кислота, ацетат/уксусная кислота), подкисляющих средств (например, хлористоводородная кислота), подщелачивающих средств (например, гидроксид натрия), консервантов (например, фенол, м-крезол), вспомогательных растворителей (например, полиэтиленгликоль 400), средств, регулирующих тоничность (например, маннит, глицерин), стабилизаторов (например, поверхностно-активное вещество, антиоксиданты, аминокислоты).

Используемые концентрации находятся в диапазоне, который является физиологически приемлемым.

Приемлемые фармацевтические носители или разбавители включают такие, которые используют в составах, подходящих для перорального, ректального, назального или парентерального (в том числе подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрикожного и чрескожного) введения. Соединения по настоящему изобретению, как правило, вводят парентерально.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соли соединений по настоящему изобретению, которые являются безопасными и эффективными для применения у млекопитающих.

Термин "сольват" означает комплексы соединений по настоящему изобретению или их солей с молекулами растворителя, например молекулами органического растворителя и/или воды.

В фармацевтической композиции производное эксендина-4 может быть в мономерной или олигомерной форме.

Термин "терапевтически эффективное количество" соединения относится к нетоксичному, однако достаточному для обеспечения требуемого эффекта количеству соединения. Количество соединения формулы I, необходимое для достижения требуемого биологического эффекта, зависит от ряда факторов, например, конкретного выбранного соединения, предполагаемого применения, режима введения и клинического состояния у пациента. Соответствующее "эффективное" количество в каждом отдельном случае может быть определено специалистом в данной области техники путем проведения стандартных экспериментов. Например, "терапевтически эффективное количество" соединения формулы I составляет приблизительно 0,01-50 мг/доза, предпочтительно 0,02-1 мг/доза.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются такими, которые подходят для парентерального (например, подкожного, внутримышечного, внутрикожного или внутривенного), ректального, местного и перорального (например, подязычного) введения, хотя наиболее подходящий способ введения в каждом отдельном случае зависит от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению, а также от природы соединения формулы I, используемого в каждом случае. В одном варианте осуществления применение является парентеральным, например подкожным.

В случае парентерального применения благоприятным может являться, чтобы соответствующие составы содержали по меньшей мере один противомикробный консервант для подавления роста микроорганизмов и бактерий между введениями. Предпочтительными консервантами являются бензиловый спирт или фенольные соединения, такие как фенол или м-крезол. Было описано, что эти ингредиенты могут индуцировать агрегацию пептидов и белков, что приводит к более низкой растворимости и ста-

бильности в составе (см. R.L. Bis et al., Int. J. Pharm. 472, 356-361, 2014; T.J. Kamerzell, Adv. Drug Deliv. Rev., 63, 1118-1159, 2011).

Подходящие фармацевтические композиции могут быть в форме отдельных единиц, например капсул, таблеток и порошков, во флаконах или ампулах, каждое из которых содержит определенное количество соединения; в форме порошков или гранул; в форме раствора или суспензии в водной или неводной жидкости или в форме эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле". Она может быть представлена разовой или многократной дозой в инъекционной форме, например в виде шприц-ручки. Как уже было упомянуто, композиции можно получать любым подходящим фармацевтическим способом, который включает стадию, на которой активный ингредиент и носитель (который может состоять из одного или нескольких дополнительных ингредиентов) приводят в контакт.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть предоставлена вместе с устройством для применения, например, вместе со шприцем, шприц-ручкой или автоинжектором. Такие устройства могут быть предоставлены отдельно от фармацевтической композиции или предварительно заполненными фармацевтической композицией.

Единица введения, упаковка, устройство по типу ручки и введение.

Соединение(я) по настоящему изобретению можно получать для применения в подходящих фармацевтических композициях. Подходящие фармацевтические композиции могут находиться в виде одной или нескольких единиц введения.

Композиции можно получать посредством любого подходящего фармацевтического способа, который включает стадию, на которой соединение(я) по настоящему изобретению и носитель (который может состоять из одного или нескольких дополнительных ингредиентов) приводят в контакт.

Единицы введения могут представлять собой, например, капсулы, таблетки, драже, гранулы, саше, капли, растворы, суспензии, лиофилизаты и порошки, все из которых содержат определенное количество соединения(й) по настоящему изобретению.

Каждую из вышеуказанных единиц введения соединения(й) по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению (единицы введения) можно поставлять в упаковке для легкой транспортировки и хранения. Единицы введения упаковывают в стандартные упаковки, содержащие разовые или многократные дозы, при этом их вид, материал и форма зависят от типа полученных единиц.

Например, таблетки и другие формы твердых единиц введения можно упаковывать в виде единиц с разовой дозой, и упакованные единицы с разовой дозой можно упаковывать в контейнеры, представляющие собой групповую тару.

Жидкие составы можно упаковывать в виде единиц с разовой дозой, таких как, например, флаконы, картриджи, шприцы/предварительно заполненные шприцы, инфузионные пакеты, мягкие пластиковые пакеты, инфузионные бутылки, бутылки, изготовленные по технологии выдувание-наполнение-запаивание или инфузионные трубки, или в инъекционной форме с разовой или многократной дозами, например, в виде устройства по типу ручки, насоса или шприца, и при этом упакованные единицы с разовой дозой можно упаковывать в контейнеры, представляющие собой групповую тару. Упаковка с разовой дозой может содержать только одну или множество единиц введения. Упаковку можно изготавливать, например, из бумаги, картона, упаковочного картона, пластика, металла, комбинаций или слоистых материалов на основе одного или нескольких из бумаги, разновидностей пластика и металла или стекла. Иллюстративные варианты осуществления представляют собой блистерные упаковки, содержащие, например, таблетки или капсулы, которые, в свою очередь, можно поставлять внутри картонной коробки, саше из многослойного материала с алюминиевым защитным покрытием, содержащие, например, порошок, стеклянные или пластиковые бутылки, содержащие, например, таблетки или раствор, или флаконы, картриджи, шприцы, инфузионные пакеты, инфузионные бутылки, инфузионные трубки или ампулы, содержащие раствор или суспензию.

В определенных вариантах осуществления единицы введения можно поставлять вместе с устройством для применения, например, вместе со шприцем, шприцем-ручкой или автоинжектором. Такие устройства могут быть предоставлены отдельно от фармацевтической композиции или предварительно заполненными фармацевтической композицией.

"Устройство для инъекции по типу ручки", часто коротко называемое "шприцем-ручкой", представляет собой, как правило, устройство для инъекции, характеризующееся продолговатой формой, которая напоминает авторучку для письма. Хотя такие ручки обычно характеризуются трубчатым поперечным сечением, они легко могут характеризоваться различным поперечным сечением, таким как треугольное, прямоугольное или квадратное или любой вариацией, основанной на таких геометрических формах. В целом, устройства для инъекции по типу ручки содержат три первичных элемента: картриджную часть, которая предусматривает картридж, часто содержащийся внутри корпуса или держателя; узел для иглы, присоединенный к одному концу картриджной части; и участок дозирования, присоединенный к другому концу картриджной части. Картридж, также часто называемый "ампулой", как правило, предусматривает резервуар, который заполнен лекарственным препаратом, съемную резиновую пробку или заглушку, расположенную на одном конце резервуара картриджа, и верхнюю часть, имеющую прокалываемое ре-

зиновое уплотнение, расположенное в другом, часто суженном конце. Обжимную кольцевую металлическую ленту, как правило, применяют для закрепления резинового уплотнения на месте. В то время как корпус картриджа обычно можно изготавливать из пластика, резервуары картриджа традиционно изготавливают из стекла.

Комбинированная терапия.

Соединения по настоящему изобретению, тройные агонисты рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона, можно комбинировать со многими другими фармакологически активными соединениями, такими как все лекарственные средства, упомянутые в Rote Liste 2016, например, со всеми средствами, снижающими вес тела или подавляющими аппетит, упомянутыми в Rote Liste 2016, главе 1, со всеми гиполипидемическими средствами, упомянутыми в Rote Liste 2016, главе 58, со всеми антигипертензивными и нефропротективными средствами, упомянутыми в Rote Liste 2016, или со всеми диуретиками, упомянутыми в Rote Liste 2016, главе 36.

Комбинации активных ингредиентов можно использовать, в частности, для синергического улучшения активности. Их можно применять либо путем раздельного введения активных ингредиентов пациенту, либо в форме комбинированных продуктов, где в одном фармацевтическом препарате присутствует множество активных ингредиентов. Если активные ингредиенты вводят путем раздельного введения активных ингредиентов, то это можно выполнять одновременно или последовательно.

Другие активные вещества, которые являются подходящими для таких комбинаций, включают, в частности, те, которые, например, усиливают терапевтический эффект одного или нескольких активных веществ в отношении одного из упомянутых показаний к применению и/или которые позволяют уменьшать дозировку одного или нескольких активных веществ.

Терапевтические средства, которые являются подходящими для комбинаций, включают, например, противодиабетические средства, такие как:

инсулин и производные инсулина, например гларгин/Lantus®, 270-330 ед./мл инсулина гларгина (EP 2387989 A), 300 ед./мл инсулина гларгина (EP 2387989 A),
 глулизин/Apidra®, детемир/Levemir®, лизпро/Humalog®/Liprolog®,
 деглюдек/деглюдек плюс, аспарт,
 базальный инсулин и аналоги (например, LY-2605541, LY2963016, NN1436),
 пэгилированный инсулин лизпро, Humulin®, линжета, SuliXen®, NN1045,
 инсулин плюс симлин, PE0139,
 инсулины быстрого действия и короткого действия (например, линжета, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) с гидрогелем,

пероральные, ингаляционные, трансдермальные и сублингвальные инсулины (например, Exubera®, Nasulin®, афрезза, трегопил, TPM 02, капсулин, Oral-lyn®, пероральный инсулин Cobalamin®, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab, пероральный инсулин Oshadi).

Также дополнительно включены такие производные инсулина, которые связаны с альбумином или другим белком с помощью бифункционального линкера.

GLP-1, аналоги GLP-1 и агонисты рецептора GLP-1, например ликсисенатид/AVE0010/ZP10/ликсумия, эксенатид/эксендин-4/баетта/бидуреон/ITCA 650/AC-2993, лираглутид/виктоза, семаглутид, таспоглутид, синкрин/албиглутид, дулаглутид, рекомбинантный эксендин-4, CJC-1134-PC, PB-1023, TTP-054, эфпегленатид/HM-11260C, CM-3, GLP-1 Eligen, ORMD-0901, NN-9924, NN-9926, NN-9927, нодексен, Viador-GLP-1, CVX-096, ZYOG-1, ZYD-1, GSK-2374697, DA-3091, MAR-701, MAR709, ZP-2929, ZP-3022, ZP-DI-70, TT-401, MK-8521, MEDI0382, BHM-034, HM12525A, MOD-6030, CAM-2036, DA-15864, ARI-2651, ARI-2255, LY3298176, NN1177, эксенатид-XTEN и глюкагон-XTEN, NN9030.

Ингибиторы DPP-4, например алоглиптин/несина, тражента/линаглиптин/BI-1356/ондеро/тражента/траджента/трайента/традзента, саксаглиптин/онглиза, ситаглиптин/янувия/кселевия/тесаве/янумет/вельметиа, галвус/вилдаглиптин, анаглиптин, гемиглиптин, тенелиглиптин, мелоглиптин, трелаглиптин, DA-1229, омариглиптин/MK-3102, KM-223, эвоглиптин, ARI-2243, PBL-1427, пиноксацин.

Ингибиторы SGLT2, например инвокана/канаглифлозин, форксига/дапаглифлозин, ремоглифлозин, серглифлозин, эмпаглифлозин, ипраглифлозин, тофоглифлозин, лузоглифлозин, сотаглифлозин (LX-4211), эртуглифлозин/PF-04971729, RO-4998452, бексаглифлозин (EGT-0001442), KGA-3235/DSP-3235, LK066, SBM-TFC-039, хенаглифлозин (SHR3824), янаглифлозин, тианаглифлозин, AST1935, JRP493, NEC-44616.

Бигуаниды (например, метформин, буформин, фенформин), тиазолидиндионы (например, пиоглитазон, ривоглитазон, розиглитазон, троглитазон), двойные агонисты PPAR (например, алеглитазар, мураглитазар, тезаглитазар), сульфонилмочевины (например, толбутамид, глибенкламид, глимепирид/амарил, глипизид), меглитиниды (например, натеглинид, репаглинид, митиглинид), ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, миглитол, воглибоза), амилин и аналоги амилина (например, прамлинтид, симлин).

Агонисты GPR119 (например, GSK-263A, PSN-821, MBX-2982, APD-597, ZYG-19, DS-8500), агонисты GPR40 (например, фазиглифам/ТАК-875, TUG-424, P-1736, JTT-851, GW9508).

Другими подходящими партнерами для комбинаций являются:

циклосет, ингибиторы 11-бета-HSD (например, LY2523199, BMS770767, RG-4929, BMS816336, AZD-8329, HSD-016, BI-135585),

активаторы глюкокиназы (например, TTP-399, AMG-151, TAK-329, GKM-001),

ингибиторы DGAT (например, LCQ-908),

ингибиторы протеин-тирозинфосфатазы 1 (например, тродусквемин),

ингибиторы глюкозо-6-фосфатазы,

ингибиторы фруктозо-1,6-бис-фосфатазы,

ингибиторы гликогенфосфорилазы,

ингибиторы фосфоенолпируваткарбоксикиназы,

ингибиторы киназы гликогенсинтазы,

ингибиторы пируватдегидрокиназы,

антагонисты альфа-2-рецепторов,

антагонисты CCR-2,

ингибиторы SGLT-1 (например, LX-2761).

В качестве партнеров для комбинаций подходящими являются также одно или несколько гипополипидемических средств, таких как, например:

ингибиторы HMG-CoA-редуктазы (например, симвастатин, аторвастатин),

фибраты (например, бензафибрат, фенофибрат),

никотиновая кислота и ее производные (например, ниацин),

агонисты или модуляторы PPAR-(альфа, гамма или альфа/гамма) (например, алеглитазар),

агонисты PPAR-дельта,

ингибиторы ACAT (например, авасимиб),

ингибиторы абсорбции холестерина (например, эзетимиб),

вещества, связывающие желчные кислоты (например, холестирамин),

ингибиторы транспорта желчных кислот в подвздошной кишке,

ингибиторы MTP или модуляторы PCSK9.

Соединения, повышающие уровень HDL, такие как: ингибиторы CETP (например, торцетрапид, ан-ацетрапид, дальцетрапид, эвацетрапид, JTT-302, DRL-17822, TA-8995) или регуляторы ABC1.

Другие подходящие партнеры для комбинаций представляют собой одно или несколько активных веществ для лечения ожирения, таких как, например, сибутрамин, тезофензин, орлистат, антагонисты каннабиноидного рецептора 1 типа, антагонисты рецептора MCH-1, агонисты рецептора MC4, антагонисты NPY5 или NPY2 (например, велнеперит), бета-3-агонисты, лептин или лептиномиметики, агонисты рецептора 5HT2c (например, лоркасерин) или комбинации бупропион/налтрексон, бупропион/зонисамид, бупропион/фентермин или прамлинтид/метрелептин.

Другие подходящие партнеры для комбинаций представляют собой приведенные ниже.

Дополнительные желудочно-кишечные пептиды, такие как пептид YY 3-36 (PYY3-36) или его аналоги, панкреатический полипептид (PP) или его аналоги.

Агонисты или антагонисты рецептора глюкагона, агонисты или антагонисты рецептора GIP, антагонисты или обратные агонисты грелина, ксенин и его аналоги.

Кроме того, комбинации с лекарственными средствами для воздействия на высокое кровяное давление, хроническую сердечную недостаточность или атеросклероз, такие как, например, антагонисты рецепторов ангиотензина II (например, телмисартан, кандесартан, валсартан, лозартан, эпросартан, ирбесартан, олмесартан, тазосартан, азилсартан), ингибиторы ACE, ингибиторы ECE, диуретики, бета-блокаторы, антагонисты кальция, средства против гипертензии центрального действия, антагонисты альфа-2-адренергического рецептора, ингибиторы нейтральной эндопептидазы, ингибиторы агрегации тромбоцитов и другие или их комбинации, также являются подходящими.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения согласно настоящему изобретению или его физиологически приемлемой соли в комбинации по меньшей мере с одним из активных веществ, описанных выше, в качестве партнера для комбинации для получения лекарственного препарата, который является подходящим для лечения или предупреждения заболеваний или состояний, на которые можно оказывать влияние путем связывания с рецепторами для GLP-1 и глюкагона и путем модуляции их активности. Оно предпочтительно представляет собой заболевание в контексте метаболического синдрома, в частности, одно из заболеваний или состояний, перечисленных выше, наиболее предпочтительно диабет или ожирение или их осложнения.

Применение соединений согласно настоящему изобретению или их физиологически приемлемой соли в комбинации с одним или несколькими активными веществами может происходить одновременно, по отдельности или последовательно.

Применение соединения согласно настоящему изобретению или его физиологически приемлемой соли в комбинации с другим активным веществом может происходить одновременно или со сдвигом во

времени, но, в частности, в течение короткого промежутка времени. Если их вводят одновременно, то два активных вещества дают пациенту вместе; если их применяют со сдвигом во времени, то два активных вещества дают пациенту в течение периода, меньшего или равного 12 ч, но, в частности, меньшего или равного 6 ч.

Следовательно, в другом аспекте настоящее изобретение относится к лекарственному препарату, который содержит соединение согласно настоящему изобретению или физиологически приемлемую соль такого соединения и по меньшей мере одно из активных веществ, описанных выше в качестве партнеров для комбинации, необязательно вместе с одним или несколькими инертными носителями и/или разбавителями.

Соединение согласно настоящему изобретению или его физиологически приемлемая соль или сольват и дополнительное активное вещество, подлежащее объединению с ними, могут оба присутствовать вместе в одном составе, например в таблетке или капсуле, или отдельно в двух одинаковых или разных составах, например в форме так называемых составных наборов.

Описание графических материалов

Фиг. 1. Сравнение кривых, построенных по динамической модели Дебая, для составов на основе пептидов, демонстрирующих обратимую самоассоциацию (притягательные взаимодействия) и отталкивающие взаимодействия согласно вириальному коэффициенту.

Фиг. 2. SEQ ID NO: 6, профиль уровней глюкозы в крови после первой обработки у мышей с DIO, получавших корм.

Фиг. 3. SEQ ID NO: 6, масса тела мышей с DIO.

Фиг. 4. SEQ ID NO: 6, изменение массы тела у мышей с DIO.

Фиг. 5. SEQ ID NO: 6, изменение общей массы жира в организме у мышей с DIO.

Фиг. 6. SEQ ID NO: 6, оценка потребления корма мышами с DIO.

Фиг. 7. SEQ ID NO: 6, масса печени у мышей с DIO перед умерщвлением.

Фиг. 8. SEQ ID NO: 6, уровень триглицеридов в плазме крови у мышей с DIO, получавших корм, перед умерщвлением.

Фиг. 9. SEQ ID NO: 6, уровень LDL в плазме крови у мышей с DIO, получавших корм.

Фиг. 10. SEQ ID NO: 11, профиль уровней глюкозы в крови после первой обработки у мышей с DIO, получавших корм.

Фиг. 11. SEQ ID NO: 11, масса тела мышей с DIO.

Фиг. 12. SEQ ID NO: 11, изменение общей массы тела у мышей с DIO.

Фиг. 13. SEQ ID NO: 11, изменение общей массы жира в организме у мышей с DIO.

Фиг. 14. SEQ ID NO: 11, оценка потребления корма мышами с DIO.

Фиг. 15. SEQ ID NO: 11, масса печени у мышей с DIO перед умерщвлением.

Фиг. 16. SEQ ID NO: 11, уровень триглицеридов в плазме крови у мышей с DIO, получавших корм, перед умерщвлением.

Фиг. 17. SEQ ID NO: 11, уровень LDL в плазме крови у мышей с DIO, получавших корм.

Фиг. 18. SEQ ID NO: 11, уровень инсулина в плазме крови у мышей с DIO, получавших корм, перед умерщвлением.

Фиг. 19. SEQ ID NO: 11, уровень глюкозы в плазме крови у мышей с DIO, получавших корм, перед умерщвлением.

Фиг. 20. SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, профиль уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 21. SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, площадь под кривой зависимости уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 22. SEQ ID NO: 7, профиль уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 23. SEQ ID NO: 7, площадь под кривой зависимости уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 24. SEQ ID NO: 11, профиль уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 25. SEQ ID NO: 11, площадь под кривой зависимости уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 26. SEQ ID NO: 11, концентрация триацилглицерина в сыворотке крови у мышей db/db, получавших корм, перед умерщвлением.

Фиг. 27. SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 26, профиль уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 28. SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 26, площадь под кривой зависимости уровней глюкозы в крови у мышей db/db, получавших корм.

Фиг. 29. Данные наблюдения потребления пищи и веса тела (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6, лираглутид).

Фиг. 30. Данные площади аортальной бляшки (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6, лираглутид).

Фиг. 31. Данные уровня общего холестерина и LDL-холестерина в сыворотке крови (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6, лираглутид).

Способы

Использовали следующие сокращения:

AA - аминокислота;
 AEEAc - (2-(2-аминоэтокси)этокси)ацетил;
 Aib - альфа-аминоизомасляная кислота;
 cAMP - циклический аденозинмонофосфат;
 Boc - трет-бутилоксикарбонил;
 BOP - гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)-трис-(диметиламино)фосфония;
 BSA - бычий сывороточный альбумин;
 tBu - третичный бутил;
 dAla - D-аланин;
 DCM - дихлорметан;
 Dde - 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексиден)этил;
 ivDde - 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексиден)-3-метилбутил;
 DIC - N,N'-диизопропилкарбодиимид;
 DIPEA - N,N'-диизопропилэтиламин;
 DMEM - среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко;
 DMF - диметилформамид;
 DMS - диметилсульфид;
 EDT - этандитиол;
 FA - муравьиная кислота;
 FBS - фетальная бычья сыворотка;
 Fmoc - флуоренилметилоксикарбонил;
 gAAA - гамма-аминоадипиновая кислота;
 gGlu - гамма-глутамат (γ E);
 HATU - гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония;
 HBSS - сбалансированный солевой раствор Хэнкса;
 HBTU - гексафторфосфат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония;
 HEPES - 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновая кислота;
 HOBt - 1-гидроксibenзотриазол;
 HOSu - N-гидроксисукцинимид;
 HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография;
 HTRF - гомогенная флуоресценция с разделением во времени;
 IBMX - 3-изобутил-1-метилксантин;
 LC/MS - жидкостная хроматография/масс-спектрометрия;
 Mmt - монометокситритил;
 Palm - пальмитоил;
 PBS - фосфатно-солевой буферный раствор;
 PEG - полиэтиленгликоль;
 PK - фармакокинетический;
 RP-HPLC - обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
 Stea - стеарил;
 TFA - трифторуксусная кислота;
 Trt - тритил;
 UV - ультрафиолет.
 Общий синтез пептидных соединений.
 Материалы.

Различные амидные смолы Ринка (4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)феноксиацетамидо-норлейциламинотетильная смола, Merck Biosciences; 4-[(2,4-диметоксифенил) (Fmoc-амино)метил]-феноксиацетамидотетильная смола, Agilent Technologies) использовали для синтеза пептидных амидов с загрузками в диапазоне 0,2-0,7 ммоль/г.

Защищенные Fmoc природные аминокислоты приобрели у Protein Technologies Inc., Senn Chemicals, Merck Biosciences, Novabiochem, Iris Biotech, Bachem, Chem-Impex International или MATRIX Innovation.

В ходе синтеза использовали следующие стандартные аминокислоты:

Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH,
 Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH,
 Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH,
 Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH,
 Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH,
 Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH,
 Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH.

Кроме того, следующие конкретные аминокислоты приобретали у тех же поставщиков, которые

указаны выше: Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-L-His(Boc)-OH (доступна в виде сольвата с толуолом) и Boc-L-His(Trt)-OH.

Кроме того, можно применять структурные единицы, представляющие собой (2S)-6-[[[(4S)-5-трет-бутокси-4-[[[(4S)-5-трет-бутокси-4-(гексадеканоиламино)-5-оксопентаноил]амино]-5-оксопентаноил]-амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексановую кислоту и Boc-L-His(Trt)-Aib-OH. Обе структурные единицы синтезировали отдельно.

Способы твердофазного синтеза пептидов проводили, например, на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies Inc.) или аналогичном автоматическом синтезаторе с применением стандартной Fmoc-химии и активации HBTU/DIPEA. В качестве растворителя применяли DMF. Снятие защиты: 20% пиперидин/DMF в течение 2×2,5 мин. Промывания: 7× DMF. Присоединение 2:5:10 200 mM AA/500 mM HBTU/2M DIPEA в DMF 2× в течение 20 мин. Промывания: 5× DMF.

В случаях, когда модифицировали боковую цепь Lys, в соответствующем положении использовали Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH или Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH. После завершения синтеза группу ivDde удаляли в соответствии с модифицированной процедурой из литературных источников (S.R. Chhabra et al., Tetrahedron Lett., 1998, 39, 1603) с использованием 4% гидрата гидразина в DMF. Группу Mmt удаляли посредством повторной обработки с помощью AcOH/TFE/DCM (1/2/7) в течение 15 мин при к.т., затем смолу повторно промывали с помощью DCM, 5% DIPEA в DCM и 5% DIPEA в DCM/DMF.

Последующие реакции ацилирования проводили путем обработки смолы с использованием сложных N-гидроксисукцинимидных эфиров требуемой кислоты или с использованием связывающих реагентов, таких как HBTU/DIPEA или HOBt/DIC.

Все пептиды, которые были синтезированы, отщепляли от смолы с использованием смеси Кинга для расщепления, состоящей из 82,5% TFA, 5% фенола, 5% воды, 5% тиаоанизола, 2,5% EDT. Затем неочищенные пептиды осаждали в диэтиловом или диизопропиловом эфире, центрифугировали и лиофилизировали. Пептиды анализировали с помощью аналитической HPLC и проверяли с помощью масс-спектрометрии ESI. Неочищенные пептиды очищали с помощью стандартной процедуры очистки с помощью препаративной RP-HPLC.

В качестве альтернативы пептиды синтезировали с использованием процедуры синтеза вручную: 0,3 г высушенной амидной смолы Ринка MBHA (0,66 ммоль/г) помещали в полиэтиленовый сосуд, оснащенный полипропиленовым фильтром. Обеспечивали набухание смолы в DCM (15 мл) в течение 1 ч и в DMF (15 мл) в течение 1 ч. Снятие защитной Fmoc-группы на смоле осуществляли путем ее обработки дважды с использованием 20% (об./об.) раствора пиперидин/DMF в течение 5 и 15 мин. Смолу промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). Тест Кайзера (количественный способ) использовали для подтверждения удаления Fmoc с твердой подложки. С-концевую аминокислоту, защищенную Fmoc (5-экв. избыток, соответствующий нагрузке смолы), в сухом DMF добавляли к смоле с удаленной защитной группой и инициировали присоединение следующей защищенной Fmoc аминокислоты с 5-эквивалентным избытком DIC и HOBt в DMF. Концентрация каждого реагента в реакционной смеси составляла примерно 0,4 М. Смесь перемешивали на роторе при комнатной температуре в течение 2 ч. Смолу фильтровали и промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). Тест Кайзера на аликвоте смолы с пептидом после завершения присоединения был отрицательным (окрашивание смолы отсутствовало). После присоединения первой аминокислоты не вступившую в реакцию аминогруппу, при наличии такой, в смоле блокировали с использованием смеси уксусный ангидрид/пиперидин/DCM (1:8:8) в течение 20 мин, чтобы избежать какого-либо удаления в последовательности. После блокирования смолу промывали DCM/DMF/DCM/DMF (6/6/6/6 раз каждым). Защитную Fmoc-группу на С-концевой аминокислоте, присоединенной к пептидильной смоле, удаляли путем ее обработки дважды с использованием 20% (об./об.) раствора пиперидин/DMF в течение 5 и 15 мин. Смолу промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). Тест Кайзера на аликвоте смолы с пептидом после завершения снятия Fmoc-защиты был положительным.

Остальные аминокислоты в целевой последовательности на амидной смоле Ринка MBHA последовательно присоединяли с применением способа Fmoc AA/DIC/HOBt с использованием 5-эквивалентного избытка, соответствующего нагрузке смолы, в DMF. Концентрация каждого реагента в реакционной смеси составляла примерно 0,4 М. Смесь перемешивали на роторе при комнатной температуре в течение 2 ч. Смолу фильтровали и промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). После каждой стадии присоединения и стадии снятия Fmoc-защиты проводили тест Кайзера для подтверждения завершенности реакции.

После завершения образования линейной последовательности с ε-аминогруппы лизина, использованной в качестве точки ветвления или точки модификации, удаляли защиту с помощью 2,5% гидрата гидразина в DMF в течение 15 мин × 2 и промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). γ-Карбоксильный конец глутаминовой кислоты присоединяли к ε-аминогруппе Lys с применением Fmoc-Glu(OH)-OtBu в способе DIC/HOBt (5-эквивалентный избыток относительно нагрузки смолы) в DMF. Смесь перемешивали на роторе при комнатной температуре в течение 2 ч. Смолу фильтровали и промывали DMF/DCM/DMF (6×30 мл каждого). Снятие защитной Fmoc-группы на глутаминовой кисло-

те осуществляли путем ее двукратной обработки с использованием 20% (об./об.) раствора пиперидин/DMF в течение 5 и 15 мин. (25 мл каждого). Смолу промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). Тест Кайзера на аликвоте смолы с пептидом после завершения снятия Fmoc-защиты был положительным.

Если ответвление боковой цепи также содержит еще одну γ -глутаминовую кислоту, вторую Fmoc-Glu(OH)-OtBu используют для присоединения к свободной аминогруппе γ -глутаминовой кислоты по способу DIC/HOBt (5-эквивалентный избыток относительно нагрузки смолы) в DMF. Смесь перемешивали на роторе при комнатной температуре в течение 2 ч. Смолу фильтровали и промывали DMF/DCM/DMF (6×30 мл каждого). Снятие защитной Fmoc-группы на γ -глутаминовой кислоте осуществляли путем ее двукратной обработки с использованием 20% (об./об.) раствора пиперидин/DMF в течение 5 и 15 мин. (25 мл). Смолу промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым). Тест Кайзера на аликвоте смолы с пептидом после завершения снятия Fmoc-защиты был положительным.

Присоединение пальмитиновой кислоты и стеариновой кислоты к боковым цепям глутаминовой кислоты.

К свободной аминогруппе γ -глутаминовой кислоты добавляли пальмитиновую кислоту или стеариновую кислоту (5 экв.), растворенную в DMF, и присоединение инициировали путем добавления DIC (5 экв.) и HOBt (5 экв.) в DMF. Смолу промывали DMF/DCM/DMF (6:6:6 раз каждым).

Окончательное отщепление пептида от смолы.

Пептидильную смолу, синтезированную в ходе синтеза вручную, промывали DCM (6×10 мл), MeOH (6×10 мл) и простым эфиром (6×10 мл) и сушили в вакуумных сушильных шкафах в течение ночи. Отщепления пептида от твердой подложки достигали путем обработки смолы с пептидом смесью реагентов (80,0% TFA/5% тиоанизол/5% фенол/2,5% EDT, 2,5% DMS и 5% DCM) при комнатной температуре в течение 3 ч. Смесь для отщепления собирали путем фильтрации и смолу промывали TFA (2 мл) и DCM (2×5 мл). Избыток TFA и DCM концентрировали до небольшого объема в атмосфере азота и небольшое количество DCM (5-10 мл) добавляли к остатку и выпаривали в атмосфере азота. Процесс повторяли 3-4 раза, чтобы удалить большую часть летучих примесей. Остаток охлаждали до 0°C и добавляли безводный эфир для осаждения пептида. Осажденный пептид центрифугировали, надосадочную жидкость с эфиром удаляли и свежий эфир добавляли к пептиду и повторно центрифугировали. Неочищенный образец очищали с помощью препаративной HPLC и лиофилизировали. Идентичность пептида подтверждали с помощью LCMS.

Кроме того, используют другой путь введения боковой цепи лизина с применением предварительно функционализированной структурной единицы, в которой боковая цепь уже прикреплена к лизину (например, (2S)-6-[[[(4S)-5-трет-бутоксигексадекан-4-илметоксикарбонил]амино]-5-оксопентаноил]амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбонил)гексановой кислоты) в качестве партнера сочетания в синтезе пептида. 0,67 ммоль смолы с пептидом, несущей аминогруппу, промывают с помощью 20 мл диметилформамида. 2,93 г (2S)-6-[[[(4S)-5-трет-бутоксигексадекан-4-илметоксикарбонил]амино]-5-оксопентаноил]амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбонил)гексановой кислоты растворяют в 20 мл диметилформамида вместе с 310 мг гидрата гидроксибензотриазола и 0,32 мл диизопропилкарбодимида. После перемешивания в течение 5 мин раствор добавляют к смоле. Смолу перемешивают в течение 20 ч и затем промывают 3 раза, при этом каждый раз с помощью 20 мл диметилформамида. Отбирают небольшой образец смолы и подвергают тесту Кайзера и тесту с хлоранилом (E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, Anal. Biochem. 1970, 34, 595-598; Chloranil-Test: T. Vojkovsky, Peptide Research 1995, 8, 236-237). Данная процедура позволяет избежать необходимости стадии селективного снятия защиты, а также селективного присоединения структурных единиц боковой цепи на промежуточное соединение одной из поздних стадий синтеза.

Аналитическая HPLC/UPLC.

Способ А:

обнаружение при 210-225 нм;

колонок: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 мкм (150×2,1 мм) при 50°C;

растворитель: H₂O+0,05% TFA: ACN+0,035% TFA (расход 0,5 мл/мин);

градиент: от 80:20 (0 мин) до 80:20 (3 мин), до 25:75 (23 мин), до 2:98 (23,5 мин), до 2:98 (30,5 мин), до 80:20 (31 мин), до 80:20 (37 мин);

необязательно с масс-анализатором: LCT Premier, режим электрораспыления положительно заряженных ионов.

Способ В:

обнаружение при 214 нм;

колонок: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 мкм (150×2,1 мм) при 50°C;

растворитель: H₂O+0,05% TFA: ACN+0,035% TFA (расход 0,5 мл/мин);

градиент: от 80:20 (0 мин) до 80:20 (3 мин), до 25:75 (23 мин), до 2:98 (23,5 мин), до 2:98 (30,5 мин), до 80:20 (31 мин), до 80:20 (37 мин);

необязательно с масс-анализатором: Agilent 6230 Accurate-Mass TOF, источник ESI Dual Agilent Jet Stream.

Способ С:

обнаружение при 214 нм;

колонок: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 мкм (150×2,1 мм) при 50°C; растворитель: H₂O+0,1% TFA: ACN+0,1% FA (расход 0,5 мл/мин);

градиент: от 80:20 (0 мин) до 80:20 (3 мин), до 25:75 (23 мин), до 2:98 (23,5 мин), до 2:98 (30,5 мин), до 80:20 (31 мин), до 80:20 (38 мин);

необязательно с масс-анализатором: Agilent 6230 Accurate-Mass TOF, источник ESI Agilent Jet Stream.

Способ D:

обнаружение при 220 нм;

колонок: Waters ACQUITY BEH C18 (2,1×100 мм, 1,7 мкм), темп.: 40°C;

Aries XB C18 для пептидов (4,6×250 мм, 3,6 мкм), темп.: 40°C;

растворитель: H₂O+0,1% муравьиная кислота (буфер А): ACN+0,1% муравьиная кислота (расход 1 мл/мин) (буфер В);

градиент: уравнивание колонки с помощью 2% буфера В, а элюирование с помощью градиента от 2% до 70% буфера В в течение 15 мин.

Способ E: обнаружение при 215 нм;

колонок: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 мкм (150×2,1 мм) при 50°C;

растворитель: H₂O+0,05% TFA: ACN+0,035% TFA (расход 0,5 мл/мин);

градиент: от 80:20 (0 мин) до 80:20 (3 мин), до 25:75 (23 мин), до 5:95 (23,5 мин), до 5:95 (25,5 мин), до 80:20 (26 мин), до 80:20 (30 мин).

Общая процедура очистки с помощью препаративной HPLC.

Неочищенные пептиды очищали либо на системе Äkta Purifier, на системе полупрепаративной HPLC Jasco или на системе HPLC Agilent 1100. Препаративные колонки RP-C18-HPLC различных размеров и с различными скоростями потока использовали в зависимости от количества неочищенного пептида, подлежащего очистке. В качестве элюентов использовали ацетонитрил + 0,1% TFA (В) и воду + 0,1% TFA (А). Фракции, содержащие продукт, собирали и лиофилизировали с получением очищенного продукта, как правило, в виде соли TFA.

Оценка растворимости производных эксендина-4.

Перед измерением растворимости партии пептида ее чистоту определяли посредством UPLC/MS.

Для тестирования растворимости целевая концентрация чистого соединения составляла 10 мг/мл. Таким образом, растворы из твердых образцов получали в буферной системе с концентрацией соединения, составляющей 10 мг/мл, на основании предварительно определенного % чистоты.

Буферная система (А) для оценки растворимости: ацетатный буфер, pH 4,5, 100 мМ тригидрата ацетата натрия, 2,7 мг/мл м-крезола.

Буферная система (В) для оценки растворимости: фосфатный буфер, pH 7,4, 100 мМ гидрофосфата натрия, 2,7 мг/мл м-крезола.

Буферная система (С) для оценки растворимости: цитратный буфер, pH 6,0, 100 мМ лимонная кислота, 2,7 мг/мл м-крезола.

UPLC-UV проводили после 1 ч легкого перемешивания с надосадочной жидкостью, которую получали центрифугированием при 2500 RCF (относительное центробежное ускорение) в течение 15 мин.

Растворимость определяли путем сравнения площади UV-пика забуференного образца, разведенного 1:10, который вводили в объеме 2 мкл, со стандартной кривой эталонного пептида с известной концентрацией. Различные коэффициенты экстинкции УФ-излучения для образца и эталонного пептида рассчитывали на основании различных аминокислотных последовательностей и учитывали их при расчете концентрации.

Оценка химической стабильности производных эксендина-4.

Перед измерением химической стабильности партии пептида ее чистоту определяли посредством UPLC/MS. Для тестирования стабильности целевая концентрация чистого соединения составляла 1 мг/мл. Таким образом, растворы из твердых образцов получали в буферной системе с концентрацией соединения, составляющей 1 мг/мл, на основании предварительно определенного % чистоты.

Буферная система (А) для оценки химической стабильности: 25 мМ ацетатный буфер, pH 4,5, 3 мг/мл L-метионина, 2,7 мг/мл м-крезола, 18 мг/мл 85% глицерина.

Буферная система В) для оценки химической стабильности: 25 мМ фосфатный буфер, pH 6,0, 3 мг/мл L-метионина, 2,7 мг/мл м-крезола, 18 мг/мл 85% глицерина.

Растворы с пептидами фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм и разделяли на аликвоты в асептических условиях. В начальный момент времени UPLC-UV проводили с введением 2 мкл неразбавленного образца.

Для тестирования химической стабильности аликвоты хранили в течение 28 дней при 5 и 40°C. По-

сле данного промежутка времени образцы центрифугировали в течение 15 мин при 2500 RCF. Затем 2 мкл неразбавленной надосадочной жидкости анализировали посредством UPLC-UV.

Химическую стабильность оценивали по относительной потере чистоты, рассчитанной с помощью уравнения:

$$[(\text{чистота в исходный момент времени}) - (\text{чистота после 28 дней при } X^{\circ}\text{C})]/(\text{чистота в исходный момент времени})] \times 100\%,$$

X=5 или 40°C.

Чистоту рассчитывали как $[(\text{площадь пика пептида})/(\text{общая площадь пика})] \times 100\%$.

Динамическое рассеяние света (DLS) для оценки физической стабильности.

Монохроматический и когерентный световой пучок (лазер) применяют для облучения жидкого образца. С помощью динамического рассеяния света (DLS) измеряют свет, рассеянный частицами ($1 \text{ нм} \leq \text{радиус} \leq 1 \text{ мкм}$), которые совершают броуновское движение. Данное движение вызвано столкновениями между частицами и молекулами растворителя, которые сами двигаются за счет своей тепловой энергии. Диффузионное движение частиц приводит к флуктуациям рассеянного света во времени [Pecora, R. Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy, Plenum Press, 1985].

Флуктуации интенсивности рассеянного света регистрируют и преобразуют в автокорреляционную функцию. Путем подгонки автокорреляционной кривой к экспоненциальной функции можно получить коэффициент диффузии D частиц в растворе. Коэффициент диффузии затем используют для расчета гидродинамического радиуса R_h (или эффективного радиуса Стокса) с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна, принимая, что частицы имеют сферическую форму. Данный расчет определен в ISO 13321 и ISO 22412 [международный стандарт ISO13321 "Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy", International Organisation for Standardisation (ISO) 1996; международный стандарт ISO22412 "Particle Size Analysis -Dynamic Light Scattering", International Organisation for Standardisation (ISO) 2008].

В случае полидисперсных образцов автокорреляционная функция представляет собой сумму экспоненциальных распадов, соответствующих каждой молекуле. Временные флуктуации рассеянного света можно затем использовать для определения профиля распределения фракции или семейства частиц по размерам. Результат первого порядка представляет собой распределение интенсивности рассеянного света в зависимости от размера частиц. Естественное взвешивание распределения интенсивности осуществляют в соответствии с интенсивностью рассеяния каждой фракцией или семейством частиц. Для биологических материалов или полимеров интенсивность рассеяния частицей пропорциональна квадрату молекулярной массы. Таким образом, небольшое количество агрегатов/агломератов или присутствие или более крупные виды частиц могут играть решающую роль в распределении интенсивности. Тем не менее данное распределение можно использовать в качестве чувствительного индикатора присутствия крупного материала в образце. Распределение интенсивности можно преобразовать в объемное или массовое распределение частиц по размерам с применением теории Ми при определенных допущениях. В отличие от распределения интенсивности, массовое распределение наиболее оптимально использовать для сравнительных целей, и его не следует считать как абсолютное (вследствие лежащих в его основе допущений).

С помощью методики DLS получают распределения с присущим расширением пика. Коэффициент полидисперсности %Pd является показателем ширины распределения частиц по размерам, и его рассчитывают с помощью стандартных способов, описанных в ISO13321 и ISO22412 [международный стандарт ISO13321 "Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy", International Organisation for Standardisation (ISO) 1996; международный стандарт ISO22412 "Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering", International Organisation for Standardisation (ISO) 2008].

DLS параметр взаимодействия (k_D).

DLS параметр взаимодействия (k_D) является показателем, описывающим взаимодействия между частицами, где частицы представляют собой свернутые белки или пептиды [Sandeep Yadav et al. (2009), J. Pharm. Sci., Vol. 99(3), p. 1152-1168; Brian D. Connolly et al. (2012), Biophysical Journal, Volume 103, p. 69-78].

Параметр k_D получают из концентрационной зависимости коэффициента диффузии D, которая определяется разложением по степеням концентрации c:

$$D(c) = D_0(1 + k_D c + k_{1D} c^2 + k_{2D} c^3 + \dots)$$

Пренебрегая членами высшего порядка, т.е. $k_{1D} = k_{2D} = \dots = 0$, данные можно аппроксимировать линейной функцией, и исходя из наклона кривой $D = D_0(1 + k_D c)$ и D_0 получают k_D . D_0 представляет собой коэффициент диффузии при нулевой концентрации. Параметр k_D можно применять для описания взаимодействия молекул белков, или пептидов, или олигомеров между собой и с окружающей их средой в растворе, и он теоретически связан с вириальным коэффициентом B_{22} , как, например, описано Harding и Johnson, где M представляет собой молярную массу, k_s представляет собой зависящий от концентрации коэффициент скорости осаждения первого порядка и v представляет собой парциальный удельный объем [Harding S.E., Johnson P. (1985), Biochem J., 231, p. 543-547].

$$k_D = 2B_{22}M - k_s - v.$$

Положительные значения B_{22} указывают на образцы, для которых предпочтительна сольватация, а не самоассоциация, тогда как отрицательные значения B_{22} указывают на образцы, для которых предпочтительна самоассоциация. С прагматической точки зрения k_D аналогичен по своему значению B_{22} и предоставляет информацию о результирующей силе взаимодействия между молекулами. Высокие значения указывают на сильные результирующие отталкивающие взаимодействия, тогда как низкие значения указывают на результирующие силы притяжения. Таким образом, k_D можно применять для относительного качественного сравнения (см. фиг. 1).

Для каждого раствора с пептидом гидродинамический радиус R_h и константу диффузии D (связанные с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна) определяли как средние значения из трех повторностей. Оба параметра определяли при различных концентрациях пептида (например, R_{h1} и D_1 : 1 мг/мл и R_{h5} и D_5 : 5 мг/мл) в одной и той же буферной системе. Разница таких параметров между низкой и высокой концентрациями пептида является заменой для DLS параметра взаимодействия k_D . $R_{h5} < R_{h1}$ или $D_5 > D_1$ соответствуют $k_D > 0$ и, следовательно, отталкивающим взаимодействиям между частицами, которые приводят к улучшенной физической (или коллоидной) стабильности.

Буферная система (A) для оценки DLS: 25 mM ацетатный буфер, pH 4,5, 3 мг/мл L-метионина, 2,7 мг/мл м-крезола, 18 мг/мл 85% глицерина.

Буферная система (B) для оценки DLS: 25 mM фосфатный буфер, pH 6,0, 3 мг/мл L-метионина, 2,7 мг/мл м-крезола, 18 мг/мл 85% глицерина.

Способ A для оценки DLS.

Измерения DLS проводили на приборе W130i (Avid Nano Ltd, Хай-Вайкомб, Великобритания) и с применением малообъемной одноразовой кюветы (UVette, Eppendorf AG, Гамбург, Германия). Данные обрабатывали с помощью i-Size 3.0, поставляемого Avid Nano. Параметры распределения частиц по размерам определяли с помощью способов наименьших квадратов с ограничениями отрицательных значений (NNLS) с применением алгоритмов DynaLS. Измерения проводили при 25°C с лазерным источником света с длиной волны 660 нм и под углом 90°.

Способ B для оценки DLS.

Измерения DLS проводили на Nanosizer ZS (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания) и с применением одноразовых UV-кювет (Brand, макро, 2,5 мл и Brand, полумикро, 1,5 мл, Brand GmbH+Co KG, Вертгейм, Германия). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Malvern Zetasizer версии 7.10 или 7.01. Параметры распределения частиц по размерам определяли с помощью способов наименьших квадратов с ограничениями отрицательных значений (NNLS). Измерения проводили при 25°C с лазерным источником света с длиной волны 633 нм в режиме NIBS (неинвазивного обратного рассеяния) под углом 173°.

Способ C для оценки DLS.

Измерения DLS проводили на планшет-ридере DynaPro II (Wyatt Technology, Санта-Барбара, Калифорния, США) и с применением одного из следующих черных малообъемных и необработанных планшетов: полистирольного 384-луночного аналитического планшета с прозрачным дном (Corning, Нью-Йорк, США), полистирольного 96-луночного аналитического планшета с прозрачным дном (Corning, Нью-Йорк, США), 384-луночного аналитического планшета из циклоолефинового полимера (COP) с прозрачным дном (Auroga, Монтана, США) или полистирольного 384-луночного аналитического планшета с прозрачным дном (Greiner Bio-One, Германия). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Dynamics, поставляемого Wyatt Technology. Параметры распределения частиц по размерам определяли с помощью способов наименьших квадратов с ограничениями отрицательных значений (NNLS) с применением алгоритмов DynaLS. Измерения проводили при 25°C с лазерным источником света с длиной волны 830 нм под углом 158°.

Анализ с применением ThT для оценки физической стабильности.

Низкая физическая стабильность раствора с пептидом может приводить к образованию амилоидных фибрилл, которые наблюдаются в образце в виде высокоупорядоченных нитевидных макромолекулярных структур, что в конечном итоге может приводить к образованию геля. Тиаофлавин Т (ThT) широко применяют для визуализации и количественной оценки присутствия агрегатов неправильно свернутых белков. [Biancalana et al. (2010), *Biochimica et Biophysica Acta*. 1804(7):1405-1412.]. При его связывании с фибриллами, такими как фибриллы в амилоидных агрегатах, краситель проявляет характерный признак флуоресценции [Naiki et al. (1989), *Anal. Biochem.* 177, 244-249; LeVine (1999), *Methods. Enzymol.* 309, 274-284]. Промежуток времени образования фибрилл часто соответствует характерной форме сигмоидальной кривой и может быть разделен на три области: лаг-фазу, фазу быстрого роста и фазу плато.

Типичный процесс образований фибрилл начинается с лаг-фазы, при которой количество частично свернутого пептида, превращенного в фибриллы, является недостаточно значительным для его выявления. Лаг-период соответствует периоду времени, в ходе которого наращивается критическая масса ядра. За этим следует фаза резкого удлинения, и при этом быстро повышается концентрация фибрилл.

Исследования проводили для определения тенденций фибриллообразования в стрессовых условиях, обеспечиваемых встряхиванием при 37°C в Fluoroskan Ascent FL.

Для тестов в Fluoroskan Ascent FL 200 мкл образца помещали в 96-луночный титрационный микропланшет из PS с плоским дном, Greiner Fluotrac № 655076. Планшеты запечатывали клейкой лентой (Quiagen). Образцы подвергали стрессу с помощью непрерывных циклов встряхивания при 960 об./мин в течение 10 с и периода отдыха при 37°C в течение 50 с. Кинетику отслеживали путем измерения интенсивности флуоресценции каждые 20 мин.

Пептиды разбавляли в буферной системе до конечной концентрации 3 мг/мл. К 2 мл раствора с пептидом добавляли 20 мкл 10,1 mM раствора ThT в H₂O с получением конечной концентрации 100 мкМ ThT. Каждый образец тестировали в восьми повторностях.

Буферная система А) для анализа с применением Tht: 100 mM ацетатный буфер, pH 4,5, содержащий м-крезол (100 mM тригидрата ацетата натрия, регулирование значения pH с применением 2н. CH₃COOH, 2,7 мг/мл м-крезола)

Буферная система (В) для анализа с применением Tht: 100 mM цитратный буфер, pH 6,0.

Клеточные анализы *in vitro* для оценки эффективности в отношении рецепторов GLP-1, глюкагона и GIP.

Агонизм соединений в отношении рецепторов определяли с помощью функциональных анализов измерения ответа cAMP клеточных линий НЕК-293, стабильно экспрессирующих рецепторы GLP-1, GIP или глюкагона человека.

Содержание cAMP в клетках определяли с использованием набора от Cisbio Corp. (№ по кат. 62AM4PEJ) на основе HTRF (гомогенная флуоресценция с разделением во времени). В целях подготовки клетки распределяли по культуральным флаконам T175 и выращивали в течение ночи практически до конfluence в среде (DMEM/10% FBS). Среда затем удаляла и клетки промывали PBS, не содержащим кальция и магния, с последующей обработкой протеиназой совместно с аккутазой (Sigma-Aldrich, № по кат. A6964). Отделенные клетки промывали и ресуспендировали в буфере для анализа (1× HBSS; 20 mM HEPES, 0,1% BSA, 2 mM IBMX) и определяли плотность клеток. Затем их разводили до 400000 клеток/мл и вносили аликвоты по 25 мкл в лунки 96-луночных планшетов. Для проведения измерения в лунки добавляли 25 мкл тестируемого соединения в буфере для анализа с последующей инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре. После добавления реагентов HTRF, разведенных в лизирующем буфере (компоненты набора), планшеты инкубировали в течение 1 ч с последующим измерением соотношения интенсивности флуоресценции при 665/616 нм. Эффективность агонистов *in vitro* количественно оценивали путем определения концентраций, которые вызывали 50% активацию максимального ответа (EC₅₀).

Способ биоаналитического скрининга для количественного определения производных эксендина-4 у мышей и свиней.

Мышам вводили дозу 1 мг/кг подкожно (s.c.). Мышей умерщвляли и образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 и 24 ч после применения. Образцы плазмы анализировали после осаждения белка посредством жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC/MS). Параметры РК и период полужизни рассчитывали с использованием WinonLin версии 5.2.1 (некомпартментная модель).

Самкам карликовых свиней Göttinger вводили дозу 0,05, 0,075 или 0,1 мг/кг подкожно (s.c.). Образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч после применения. Образцы плазмы анализировали после осаждения белка посредством жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC/MS). Параметры РК и период полужизни рассчитывали с использованием WinonLin версии 5.2.1 (некомпартментная модель).

Кратковременные и длительные эффекты в отношении уровня глюкозы в крови, массы тела, общего содержания жира в организме и потребления корма после подкожной обработки у самок мышей C57BL/6 с алиментарным ожирением (DIO).

Самок мышей C57BL/6NHsd заказывали в Envigo RMS Inc. с соблюдением условий группового содержания, доставляли в условиях группового содержания и оставляли в условиях группового содержания с доставленными соседями по клетке в клетках типа коробки для обуви с подстилкой из древесной стружки до дня 38 фазы, предшествующей введению дозы. На момент начала исследования возраст мышей составлял 25-26 недель.

Мышей содержали в условиях вивария, которые включали цикл свет/темнота 12 ч (фаза света 04:00 до полудня - 4:00 после полудня), комнатную температуру от 23 до 26°C и относительную влажность от 30 до 70%. Все животные имели свободный доступ к воде и рациону с высоким содержанием жира (TD97366) в течение 16 недель перед фармакологическим вмешательством (фаза введения дозы). Корм заменяли на свежий корм один раз в неделю до последнего раза в день 38 фазы, предшествующей введению дозы. В ходе последующей фазы введения дозы примерно 50% оставшегося корма удаляли, заменяли свежим кормом и гранулы равномерно перемешивали один раз в неделю.

В день 38 перед введением дозы мышам с DIO, страдающих ожирением, распределяли в группы обработки (n=8) с обеспечением соответствия средних показателей массы тела среди всех групп DIO. Сопоставимую по возрасту группу с неограниченным доступом к поддерживающему рациону для грызунов (Teklad Global Diets Rodent 2014, в виде гранул) включали в исследование в качестве контрольной группы, получающей обедненный рацион. В ходе фазы, предшествующей введению дозы, со дня 32 по 38

всех исследуемых животных обрабатывали средой-носителем (фосфатно-солевой буферный раствор, PBS, Gibco, без CaCl_2 и MgCl_2) один раз в день (с.с, примерно 0,2 мл/мышь).

В день 37 фазы, предшествующей введению дозы, тестируемый образец разбавляли с помощью PBS до концентрации 100 мкг/мл и аликвоты данного исходного раствора хранили примерно при $\leq -60^\circ\text{C}$. Аликвоты исходного раствора размораживали для еженедельного применения и после этого хранили в холодильнике примерно при 4°C . Раствор тестируемого образца для введения посредством инъекции получали в свежем виде один раз в каждый день введения дозы путем разбавления исходного раствора с помощью PBS до достижения требуемой концентрации.

Мышей обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо тестируемого образца в течение 28 дней. Введение дозы в утреннее время начинали и завершали с 06:00 до 07:30 до полудня, а введение дозы в послеполуденное время осуществляли с 2:00 до 3:30 после полудня. В день 28 фазы введения дозы вводили только утреннюю дозу. Применяемый объем составлял 5 мл/кг, и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Кратковременный эффект в отношении профилей уровней глюкозы в крови у самок мышей с DIO, которых не воздерживали от приема пищи.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы введения дозы у неанестезированных животных собирали примерно 5 мкл крови путем отрезания кончика хвоста в момент времени 0 перед с.с. введением первой дозы среды-носителя PBS или тестируемого образца и через 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч после введения дозы. Забор крови в течение 24 ч проводили перед введением дозы в день 2. Послеполуденную дозу вводили в период между сбором образцов крови в моменты времени через 6-24 ч. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови и в двух или трех повторностях с применением глюкометров Aviva.

2) Длительный эффект в отношении массы тела у самок мышей с DIO, которых не воздерживали от приема пищи.

Массу тела измеряли ежедневно в примерно 06:00-07:30 до полудня со дня 32 по 38 фазы, предшествующей введению дозы, и на протяжении 28 дней фазы введения дозы. В ходе фазы введения дозы мышей обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо тестируемого образца.

3) Длительный эффект в отношении общей массы жира в организме у самок мышей с DIO, которых не воздерживали от приема пищи.

Для определения общей массы жира в организме в день 37 перед введением дозы и в день 26 фазы введения дозы проводили измерения с помощью количественного ядерного магнитного резонанса (QNMР). В ходе фазы введения дозы мышей обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо тестируемого образца.

4) Эффект в отношении потребления корма у самок мышей с DIO.

Потребление корма оценивали на основании ежедневного измерения веса контейнера с кормом в каждой клетке в период 06:00-07:30 до полудня. В каждой клетке содержали по четыре мыши и потребление корма рассчитывали на протяжении 28 дней фазы введения дозы. В ходе фазы введения дозы мышей обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо тестируемого образца.

5) Параметры плазмы крови у самок мышей с DIO, которых не воздерживали от приема пищи, перед умерщвлением.

В день 28 перед определением любых других прижизненных показателей собирали кровь для определения концентраций инсулина в плазме крови. Затем вводили утреннюю дозу и через 4 ч после введения дозы проводили некропсию. Для данной цели животных анестезировали изофлураном и кровь собирали путем кровопускания с орбитального синуса.

6) Масса печени у самок мышей с DIO, которых не воздерживали от приема пищи, перед умерщвлением.

В день 28 и через 4 ч после введения утренней дозы у мышей собирали кровь под изофлурановой анестезией, как описано выше. Затем мышей умерщвляли и образцы печени собирали и взвешивали.

7) Количественное определение липидов печени.

Аликвоты с печенью инкубировали с дихлорметаном:метанолом (2:1). Липофильные и липофобные фазы разделяли с помощью добавления dH_2O и последующего центрифугирования. Собирали нижнюю липофильную фазу и процедуру повторяли с оставшимися липофобным слоем и тканью печени. Затем липофильные фазы объединяли и выпаривали растворитель. Затем образцы инкубировали с 2-пропанолом при 60°C и непрерывном встряхивании. Концентрации общего холестерина, триацилглицерина и фосфолипида количественно определяли ферментативным путем с помощью коммерческого набора в соответствии с инструкциями производителя.

8) Статистические анализы.

Статистические анализы проводили с помощью Sigmaplot 12.5. Двусторонние Т-критерии применяли для сравнения группы мышей с DIO, обработанных средой-носителем (в целом $n=8$), с группой мы-

шей с DIO, обработанных тестируемым образцом (в целом $n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы, получавшей обедненный рацион - среду-носитель приведены на фигурах, но их применяли в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения.

Кратковременные эффекты в отношении концентраций глюкозы в крови после подкожной обработки у самок мышей db/db с диабетом, которых не воздерживали от приема пищи.

Здоровых самок мышей, получавших обедненный рацион BKS.Cg-(истощенные)/OlaHsd и склонных к диабету BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd с ожирением, заказывали в Envigo RMS Inc. с соблюдением условий группового содержания, доставляли в условиях группового содержания и оставляли в условиях группового содержания в клетках типа коробки для обуви с подстилкой из древесной стружки до дня 15 фазы, предшествующей введению дозы. На момент начала исследования возраст мышей составлял примерно 12 недель.

Мышей содержали в условиях вивария, включающих цикл свет/темнота 12 ч (фаза света 04:00 до полудня - 4:00 после полудня), комнатную температуру от 23 до 26°C и относительную влажность от 30 до 70%. Все животные имели свободный доступ к воде и рациону Purina Fomulab 5008.

В день 9 перед введением дозы осуществляли измерения уровня глюкозы в крови и массы тела (в период от примерно 08:00 до 10:00 до полудня), а также уровня HbA1c. В день 15 фазы, предшествующей введению дозы, животных распределяли в группы обработки ($n=8$) и в новые клетки с обеспечением соответствия средних показателей HbA1c и массы тела среди всех групп db/db. Сопоставимую по возрасту группу, получавшую обедненный рацион, включали в исследование в качестве здорового эталона с обедненным рационом.

Перед днем 1 фазы введения дозы тестируемый образец разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco, без CaCl_2 и MgCl_2) до концентрации 1 мг/мл и аликвоты данного исходного раствора хранили примерно при $\leq -60^\circ\text{C}$. В день 1 фазы введения дозы аликвоты исходного раствора размораживали и раствор тестируемого образца для введения посредством инъекции получали в свежем виде путем его разбавления с помощью PBS до достижения требуемой концентрации.

В день 1 фазы введения дозы мышей db/db один раз обрабатывали с помощью s.c. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг тестируемого образца. Эталонную группу с обедненным рационом обрабатывали один раз с помощью s.c. инъекции среды-носителя PBS. Введение дозы начинали и завершали с 08:00 до 10:00 до полудня. Применяемый объем составлял 5 мл/кг, и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Кратковременный эффект в отношении профилей уровней глюкозы в крови у животных, которых не воздерживали от приема пищи.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы введения дозы примерно 5 мкл крови собирали путем отрезания кончика хвоста за 30 мин и в момент времени 0 перед определением любых других прижизненных показателей. В момент времени 0 мыши получали s.c. дозу среды-носителя PBS либо 30 мкг/кг тестируемого образца. Дополнительные образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови с применением глюкометров AlphaTRAK. Если значения концентрации глюкозы согласно двум измерениям отличались на более чем 20 мг/дл, то регистрировали третье значение. Площадь под кривой зависимости (AUC) уровней глюкозы в крови рассчитывали с помощью способа трапеций и для периода, составляющего 24 ч после введения дозы.

2) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM. Статистические анализы проводили с помощью Sigmaplot 12.5. Однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения (способ Даннетта) проводили со сравнением группы мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных средой-носителем ($n=8$), с каждой из мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных тестируемым образцом ($n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы без диабета, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, при этом они служат в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения, без диабета.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано представленными ниже примерами.

Пример 1.

Синтез SEQ ID NO: 6.

Твердофазный синтез, описанный в разделе "Способы", проводили на амидной смоле Ринка Novabiochem (4-(2',4'-диметоксифенил-Фмос-аминометил)феноксиацетамидонорлейциламинометильная смола), 100-200 меш, загрузка 0,43 ммоль/г. Применяли стратегию Фмос-синтеза с активацией HBTU/DIPEA. В протоколе твердофазного синтеза в положении 14 применяли Фмос-Lys(Mmt)-ОН, а в положении 1 применяли Boc-His(Trt)-ОН. Группу Mmt отщепляли от пептида на смоле, как описано в разделе "Способы". Затем Palm-gGlu-gGlu-OSu связывали с освобожденной аминогруппой с примени-

ем DIPEA в качестве основания. Пептид отщепляли от смолы с использованием смеси Кинга (D.S. King, C.G. Fields, G.B. Fields, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, 36, 255-266). Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC на колонке Waters (RP18 XSelectCSH-5 мкм, 50×150 мм) с применением градиента ацетонитрил/вода (оба буфера с 0,1% TFA). Очищенный пептид анализировали с помощью LCMS (способ В).

Деконволюция сигналов массы, обнаруженных под пиком со временем удерживания 8,737 мин, обеспечила выявление массы пептида 4932,68, которая соответствовала ожидаемому значению 4932,67.

Пример 2.

Синтез SEQ ID NO: 11.

Твердофазный синтез, описанный в разделе "Способы", проводили на амидной смоле Ринка Novabiochem (4-(2',4'-диметоксифенил-Фмос-аминометил)феноксиацетамидонорлейциламинометильная смола), 100-200 меш, загрузка 0,43 ммоль/г. Применяли стратегию Фмос-синтеза с активацией HBTU/DIPEA. В протоколе твердофазного синтеза в положении 14 применяли Фмос-Lys(Mmt)-OH, а в положении 1 применяли Boc-His(Trt)-OH. Группу Mmt отщепляли от пептида на смоле, как описано в разделе "Способы". Затем Palm-gGlu-gGlu-OSu связывали с освобожденной аминогруппой с применением DIPEA в качестве основания. Пептид отщепляли от смолы с использованием смеси Кинга (D.S. King, C.G. Fields, G.B. Fields, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, 36, 255-266). Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC на колонке Waters (Sunfire Prep C18 ODB, 5 мкм, 30×250 мм) с применением градиента ацетонитрил/вода (оба буфера с 0,1% TFA). Очищенный пептид анализировали с помощью LCMS (способ В).

Деконволюция сигналов массы, обнаруженных под пиком со временем удерживания 9,995 мин., обеспечила выявление массы пептида 4863,67, которая соответствовала ожидаемому значению 4863,63.

Пример 3.

Синтез SEQ ID NO: 20.

Твердофазный синтез, описанный в разделе "Способы", проводили на амидной смоле Ринка Novabiochem (4-(2',4'-диметоксифенил-Фмос-аминометил)феноксиацетамидонорлейциламинометильная смола), 100-200 меш, загрузка 0,43 ммоль/г. Применяли стратегию Фмос-синтеза с активацией HBTU/DIPEA. В протоколе твердофазного синтеза в положении 14 применяли Фмос-Lys(Mmt)-OH, а в положении 1 применяли Boc-His(Trt)-OH. Группу Mmt отщепляли от пептида на смоле, как описано в разделе "Способы". Затем Palm-gGlu(OSu)-OtBu (CAS 204521-63-1) связывали с освобожденной аминогруппой с применением DIPEA в качестве основания. Пептид отщепляли от смолы с использованием смеси Кинга (D.S. King, C.G. Fields, G.B. Fields, *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, 36, 255-266). Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC на колонке Waters (Sunfire Prep C18 ODB, 5 мкм, 30×250 мм) с применением градиента ацетонитрил/вода (оба буфера с 0,1% TFA). Очищенный пептид анализировали с помощью LCMS (способ В).

Деконволюция сигналов массы, обнаруженных под пиком со временем удерживания 8,837 мин., обеспечила выявление массы пептида 4763,670, которая соответствовала ожидаемому значению 4763,617.

Аналогичным образом синтезировали и определяли характеристики других пептидов, приведенных в табл. 3.

Таблица 3

Перечень синтезированных пептидов и сравнение расчетной молекулярной массы против установленной

SEQ ID NO	Расч. масса	Установленная масса	Моноизотопная или средняя масса	Время удерживания (мин.)
6	4932,7	4932,7	моноизотопная	8,737
7	4946,7	4946,7	моноизотопная	8,699
8	4892,7	4892,7	моноизотопная	9,376
9	4906,7	4906,7	моноизотопная	9,505
10	4849,6	4849,7	моноизотопная	9,758
11	4863,6	4863,7	моноизотопная	9,995
12	4889,6	4889,7	моноизотопная	8,971
13	4903,6	4903,6	моноизотопная	9,184
14	5077,7	5077,8	моноизотопная	8,599
15	5091,8	5091,8	моноизотопная	8,839
16	4734,6	4734,7	моноизотопная	9,589
17	4762,6	4762,7	моноизотопная	10,278
18	4720,6	4720,6	моноизотопная	9,992
19	4748,6	4748,3	моноизотопная	10,822
20	4763,6	4763,7	моноизотопная	8,837
21	4791,6	4791,7	моноизотопная	9,674
22	5094,8	5094,8	средняя	н. о.
23	5108,9	5107,2	средняя	н. о.
24	5025,8	5025,7	средняя	9,510
25	5011,7	5011,6	средняя	9,385
26	5011,7	5011,4	средняя	9,414
27	4997,7	4997,6	средняя	9,280

Пример 4. Стабильность.

Образцы пептидов получали в буферной системе А для оценки химической стабильности и стабильность оценивали, как описано в разделе "Способы". Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Стабильность	
SEQ ID NO	Химическая стабильность [относительная потеря чистоты, 28 дней, 40°C] (%) при pH 4,5
6	7,1
7	8,1
8	10,3
9	6,9
10	10,6
11	8,8
12	11,9
13	10,5
14	8,1
15	7,2
22	9,5
23	8,6

Пример 5. Растворимость.

Образцы пептидов получали в буферной системе А для оценки растворимости и растворимость оценивали, как описано в разделе "Способы". Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Растворимость	
SEQ ID NO	Растворимость [мг/мл] при pH 4,5
6	>9,7
8	9,5

9	>9,3
10	>9,8
11	>9,8
12	>9,1
13	>9,3
14	>9,4
15	>9,5

Пример 6. Стабильность, оцениваемая с помощью DLS параметра взаимодействия.

Гидродинамический радиус R_h образцов пептидов определяли при различных концентрациях пептида (1 мг/мл и 5 мг/мл) в буферной системе А для оценки DLS с применением способа С для оценки DLS, как описано в разделе "Способы", в качестве замены DLS параметра взаимодействия k_D . Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Гидродинамический радиус R_h при концентрациях пептида 1 и 5 мг/мл.

Снижение R_h при более высокой концентрации пептида указывает на более высокую физическую стабильность из-за отталкивающих взаимодействий между частицами

SEQ. ID	R_{h1} [нм] c=1 мг/мл	R_{h5} [нм] c=5 мг/мл	Дельта R_h [нм] = $R_{h5} - R_{h1}$
6	2,5	1,7	-0,9
8	3,0	2,6	-0,4
9	2,8	2,6	-0,2
12	2,9	2,6	-0,3
13	2,8	2,5	-0,3
14	3,0	2,9	-0,1
15	3,0	2,6	-0,4

Пример 7. Стабильность оценивали в анализе с применением ThT.

Лag-период в часах в анализе образцов пептидов с применением тиофлавина Т (ThT) определяли в буферной системе А для анализа с применением ThT, как описано в разделе "Способы". Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7

Ляг-период в часах в анализе с применением тифлавина Т (ThT)

SEQ ID NO	Увеличение FI при pH 4,5	Ляг-период перед увеличением [ч.]
6	Отсутствует	>45
7	Отсутствует	>45
8	Отсутствует	>45
9	Отсутствует	>45
10	Отсутствует	>45
11	Отсутствует	>45
12	Отсутствует	>45
13	Отсутствует	>45
14	Отсутствует	>45
15	Отсутствует	>45
16	Отсутствует	>45
17	Отсутствует	>45
18	Отсутствует	>45
19	Отсутствует	>45
20	Отсутствует	>45
21	Отсутствует	>45
22	Отсутствует	>45
23	Отсутствует	>45

Пример 8. Данные in vitro в отношении рецептора GLP-1, глюкагона и GIP.

Эффективность пептидных соединений в отношении рецепторов GLP-1, глюкагона и GIP определяли посредством воздействия на клетки, экспрессирующие рецептор глюкагона человека (hGlucagon-R), рецептор GIP человека (hGIP-R) и рецептор GLP-1 человека (hGLP-1 R), перечисленными соединениями при возрастающей концентрации и измерения образовавшегося cAMP, как описано в разделе "Способы".

Результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8

Значения EC_{50} производных эксендина-4 в отношении рецепторов GLP-1, глюкагона и GIP человека (указано в пМ)

SEQ ID NO	EC_{50} для hGLP-1R	EC_{50} для hGlucagon R	EC_{50} hGIP R
6	1,4	2,3	2,1
7	1,7	3,2	2,6
8	1,3	2,0	1,6
9	1,6	2,9	2,6
10	2,3	1,6	1,1
11	2,9	2,1	1,5
12	1,8	2,0	1,9
13	2,8	2,1	2,7
14	0,9	3,4	1,2
15	1,1	4,5	1,8
16	7,1	4,3	3,7
17	6,4	5,3	7,3
18	5,3	2,8	2,0
19	6,1	3,1	4,0
20	4,8	4,2	1,9
21	3,4	1,9	2,6
22	1,0	5,9	1,1
23	1,4	6,8	1,5
24	0,8	1,1	0,8
25	0,7	0,7	0,8
26	0,7	1,2	0,7
27	0,5	0,5	0,6

Пример 9. Сравнительное тестирование.

В отношении отбора производных эксендина-4, содержащих (среди прочего) His в положении 1, Leu в положении 13, Glu в положении 15, Gln в положении 19, аминокислоту Aib в положении 34, Pro в положении 32 и Lys в положениях 35 и 39, проводили тестирование со сравнением с соответствующими соединениями, содержащими в данных положениях аминокислотные остатки нативного эксендина-4 или другие аминокислоты. Сравнимые пары соединений и соответствующие значения EC_{50} для рецепторов GLP-1, глюкагона и GIP человека (указаны в пМ) приведены в табл. 9. Как показано, производные эксендина-4 по настоящему изобретению проявляют улучшенную активность в отношении рецептора GIP по сравнению с соответствующими производными, содержащими аминокислоты нативного эксендина-4 или другие аминокислоты, сохраняя свою активность в отношении рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона.

Таблица 9

Сравнение производных эксендина-4, содержащих His в положении 1, Leu в положении 13, Glu в положении 15, Gln в положении 19, аминокислоту Aib в положении 34, Pro в положении 32 и Lys в положениях 35 и 39, с производными эксендина-4, содержащими в данных положениях аминокислотные остатки нативного эксендина-4 (Lys27, Ser32, Gly34, Ala35, Ser39) или другие аминокислоты. Значения EC₅₀ для рецепторов GLP-1, глюкагона и GIP указаны в пМ

SEQ NO	ID	EC50 для hGLP-1R	EC50 для hGlucagon-R	EC50 для hGIP-1	Отличия остатков
28		2,5	1,9	39,7	Gln3, Gln13, Asp15, Ala19, Ser32, Gly34, Ala35, Ser39
21		3,4	1,9	2,6	His3, Leu13, Glu15, Gln19, Pro32, Aib34, Lys35, Lys39
29		15,1	1,2	23,0	Tyr1, Gln3, Gln13, Asp15, Ala19, Ser28, Ser32, Gly34, Ala35, Ser39
21		3,4	1,9	2,6	His1, His3, Leu13, Glu15, Gln19, Ala28, Pro32, Aib34, Lys35, Lys39

Пример 10. Кратковременные и длительные эффекты SEQ ID NO: 6 в отношении уровня глюкозы в крови, массы тела, общего содержания жира в организме, потребления корма, веса печени перед умерщвлением и параметров плазмы крови перед умерщвлением после подкожной обработки у самок мышей C57BL/6 с алиментарным ожирением (DIO), получавших корм.

Животные, план исследования (фаза, предшествующая введению дозы, фаза введения дозы), фармакологическое вмешательство.

1) Профиль уровней глюкозы в крови у животных, получавших корм в утреннее время.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. Концентрации глюкозы в крови определяли в день 1 фазы введения дозы в момент времени 0 перед первой s.c. инъекцией среды-носителя PBS или 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6, а затем через 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч после введения дозы. Послеполуденную дозу вводили в период между сбором образцов крови в моменты времени через 6-24 ч.

У животных, обработанных с помощью SEQ ID NO: 6, наблюдали выраженное снижение концентраций глюкозы в крови в течение 24 ч. В отличие от этого, у контрольных мышей с DIO такого изменения концентраций глюкозы в крови не наблюдали (фиг. 2).

2) Масса тела.

Длительная обработка дважды в день животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6 вызывала стабильное снижение массы тела в течение 28 дней фазы обработки по сравнению с группой с DIO с обработкой средой-носителем (фиг. 3). Длительная обработка дважды в день с помощью SEQ ID NO: 6 приводила к статистически значимому более выраженному снижению массы тела в течение 28 дней фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем (фиг. 4, табл. 10).

3) Общая масса жира в организме.

Измерения общей массы жира в организме проводили в день 37 перед введением дозы и в день 26 фазы введения дозы.

Параллельно с выраженной потерей массы тела длительная обработка дважды в день животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6 приводила к статистически значимому более выраженному снижению общей массы жира в организме в течение 28 дней фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем (фиг. 5, табл. 10).

4) Потребление корма.

В каждой клетке содержали по четыре мыши и потребление корма оценивали на протяжении 28 дней фазы введения дозы.

После начала введения доз длительная обработка дважды в день с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6 обеспечивала снижение уровня потребления корма, однако мыши привыкали к фармакологическим эффектам в течение примерно десяти дней. После этого оцениваемое потребление корма было сопоставимым между группами с DIO с обработкой SEQ ID NO: 6 и с обработкой средой-носителем (фиг. 6).

5) Масса печени перед умерщвлением.

В день 28 мышей подвергали эвтаназии через 4 ч после введения утренней дозы и собирали образцы печени.

Длительная обработка дважды в день животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6 приводила к статистически значимому снижению массы печени в день 28 фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем (фиг. 7, табл. 10).

6) Уровни триглицеридов и LDL в плазме крови перед умерщвлением.

В день 28 и через 4 ч после введения утренней дозы у анестезированных мышей, которых не воздерживали от приема пищи, собирали кровь путем кровопускания с орбитального синуса. Длительная обработка дважды в день животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6 приводила к статистически значимому снижению концентраций триглицеридов в плазме крови при отсутствии воздерживания от приема пищи (фиг. 8, табл. 10) и LDL в плазме крови (фиг. 9, табл. 10) по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем.

7) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM.

Статистические анализы проводили с помощью Sigmaplot 12.5. Двусторонние Т-критерии применяли для сравнения группы мышей с DIO, обработанных средой-носителем (n=8), с группой мышей с DIO, обработанных тестируемым образцом (n=8). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, при этом они служат в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения.

Таблица 10

Эффекты, полученные в результате 28 дней подкожной обработки с помощью SEQ ID NO: 6, у самок мышей C57BL/6 с алиментарным ожирением (DIO), получавших корм. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM. n=8/группа

Параметр	DIO-среда-носитель PBS два раза в день	DIO-SEQ ID NO: 6 30 мкг/кг два раза в день
Изменение массы тела (г)	+3,76 $\pm$ 0,40	-5,51 $\pm$ 0,64 P<0,00001
Изменение общей массы жира в организме (г)	+2,89 $\pm$ 0,27	- 4,68 $\pm$ 0,67 P<0,00001
Масса печени перед умерщвлением (г)	2,13 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,04 P<0,00001
Уровень триглицеридов в плазме крови перед умерщвлением (ммоль/л)	0,64 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,04 P<0,001
Уровень LDL в плазме крови перед умерщвлением (ммоль/л)	1,28 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,06 P<0,00001

Пример 11. Кратковременные и длительные эффекты SEQ ID NO: 11 в отношении уровня глюкозы в крови, массы тела, общего содержания жира в организме, потребления корма, веса печени перед умерщвлением и параметров плазмы крови перед умерщвлением после подкожной обработки у самок мышей C57BL/6 с алиментарным ожирением (DIO), получавших корм.

Животные, план исследования (фаза, предшествующая введению дозы, фаза введения дозы), фармакологическое вмешательство.

Мышей обрабатывали дважды в день с помощью s.c. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 в течение 28 дней, за исключением дня 1 и дня 28, в которые мыши получали разовую дозу. Введение дозы в утреннее время начинали и завершали с 06:00 до 07:30 до полудня, а введение дозы в послеполуденное время осуществляли с 2:00 до 3:30 после полудня. В день 1 и день 28 фазы введения дозы вводили только утреннюю дозу. Применяемый объем составлял 5 мл/кг, и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Профиль уровней глюкозы в крови у животных, получавших корм в утреннее время.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы введения дозы у неанестезированных животных собирали примерно 5 мкл крови путем отрезания кончика

хвоста в момент времени 0 перед с.с. введением первой дозы среды-носителя PBS или 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 и через 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч после введения дозы. Забор крови в течение 24 ч проводили перед введением дозы в день 2. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови и в двух или трех повторностях с применением глюкометров Aviva.

У животных, обработанных с помощью SEQ ID NO: 11, наблюдали выраженное снижение концентраций глюкозы в крови, которое сохранялось в течение 24 ч. В отличие от этого, у контрольных мышей с DIO такого изменения концентраций глюкозы в крови не наблюдали (фиг. 10).

2) Масса тела.

Массу тела измеряли ежедневно примерно в 06:00-07:30 до полудня со дня 32 по 38 фазы, предшествующей введению дозы, и на протяжении 28 дней фазы введения дозы. В ходе фазы введения дозы, за исключением дня 1 и 28, животных обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11. Длительная обработка животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 вызвала стабильное снижение массы тела в течение 28 дней фазы обработки по сравнению с группой с DIO с обработкой средой-носителем (фиг. 11). Длительная обработка дважды в день с помощью SEQ ID NO: 11 приводила к статистически значимому более выраженному снижению массы тела в течение 28 дней фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем (двусторонний Т-критерий, $P < 0,001$, фиг. 12, табл. 11).

3) Общая масса жира в организме.

Для определения общей массы жира в организме в день 37 перед введением дозы и в день 26 фазы введения дозы проводили измерения с помощью количественного ядерного магнитного резонанса (QNMР). В ходе фазы введения дозы мышей обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг SEQ ID NO 11.

Параллельно с выраженной потерей массы тела длительная обработка дважды в день животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 приводила к статистически значимому более выраженному снижению общей массы жира в организме в течение 28 дней фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем (двусторонний Т-критерий, $P < 0,001$, фиг. 13, табл. 11).

4) Потребление корма.

Потребление корма оценивали на основании ежедневного измерения веса контейнера с кормом в период 06:00-07:30 до полудня. В каждой клетке содержали по четыре мыши и потребление корма определяли на протяжении 28 дней фазы введения дозы. В ходе фазы введения дозы мышей обрабатывали дважды в день с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг SEQ ID NO 11.

После начала введения доз обработка с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 обеспечивала снижение уровня потребления корма, однако мыши привыкали к фармакологическим эффектам в течение примерно 15 дней. После дня 15 фазы введения дозы оцениваемое потребление корма было сопоставимым среди мышей с DIO, обработанных с помощью SEQ ID NO: 11 и средой-носителем (фиг. 14).

5) Масса печени перед умерщвлением.

В день 28 собирали кровь, затем вводили утреннюю дозу и через 4 ч после введения дозы проводили некропсию. Для данной цели животных подвергали эвтаназии с помощью изофлурановой анестезии, кровь собирали путем кровопускания с орбитального синуса с последующими смещением шейных позвонков, декапитацией, двусторонней торакотомией, обескровливанием или удалением жизненно важных органов для гарантии наступления смерти после последнего сбора крови. Затем собирали образец печени и регистрировали массу печени.

Длительная обработка дважды в день животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 приводила к статистически значимому снижению массы печени в день 28 фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем (двусторонний Т-критерий, $P < 0,001$, фиг. 15, табл. 11).

6) Уровни триглицеридов, LDL, инсулина и глюкозы в плазме крови перед умерщвлением.

В день 28 собирали кровь, затем вводили утреннюю дозу и через 4 ч после введения дозы проводили некропсию. Для данной цели животных, которых не воздерживали от приема пищи, подвергали эвтаназии с помощью изофлурановой анестезии и кровь собирали путем кровопускания с орбитального синуса для измерения параметров плазмы крови.

Через 4 ч после введения последней дозы в день 28 фазы введения дозы по сравнению с животными с DIO, обработанными средой-носителем, длительная обработка животных с DIO с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 приводила к статистически значимому снижению концентраций триглицеридов (двусторонний Т-критерий, $P < 0,05$, фиг. 16, табл. 11), LDL (двусторонний Т-критерий, $P < 0,0001$, фиг. 17, табл. 11), инсулина (двусторонний Т-критерий, $P = 0,001$, фиг. 18, табл. 11) и глюкозы в плазме крови при отсутствии воздерживания от приема пищи (двусторонний Т-критерий, $P < 0,00001$, фиг. 19, табл. 11).

7) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM. Статистические анализы проводили с помощью SigmaPlot 12.5. Двусторонние Т-критерии применяли для сравнения группы мышей с DIO, обработанных средой-носителем ($n=8$), с группой мышей с DIO, обработанных соединением ($n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо раз-

личными. Данные для группы, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, но при этом они служили в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения.

Таблица 11

Эффекты, полученные в результате введения разовой дозы
SEQ ID NO: 11, у самок мышей C57BL/6 с алиментарным
ожирением (DIO), получавших корм. Данные представляют
собой средние значения $\pm$ SEM. n=8/группа

Пример	DIO-среда-носитель	DIO-SEQ ID NO: 11
Доза	PBS два раза в день	30 мкг/кг два раза в день
Изменение массы тела (г)	+4,49 $\pm$ 0,40	- 7,74 $\pm$ 0,56 P<0,00001
Изменение общей массы жира в организме (г)	+3,03 $\pm$ 0,28	-6,84 $\pm$ 0,46 P<0,00001
Масса печени перед умерщвлением (г)	+2,39 $\pm$ 0,21	+1,07 $\pm$ 0,04 P<0,0001
Уровень триглицеридов в плазме крови перед умерщвлением (ммоль/л)	+0,70 $\pm$ 0,15	+0,34 $\pm$ 0,06 P<0,05
Уровень LDL в плазме крови перед умерщвлением (ммоль/л)	+1,58 $\pm$ 0,12	+0,84 $\pm$ 0,05 P<0,0001
Уровень инсулина в плазме крови перед умерщвлением (мкг/л)	+129,35 $\pm$ 21,81	+39,59 $\pm$ 4,74 P=0,001
Уровень глюкозы в плазме крови перед умерщвлением (ммоль/л)	+7,21 $\pm$ 0,26	+4,91 $\pm$ 0,08 P=0,00001

Пример 12. Кратковременные эффекты SEO ID NO: 6, SEO ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 в отношении уровня глюкозы в крови после подкожной обработки у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм

Животные, план исследования (фаза, предшествующая введению дозы, фаза введения дозы), фармакологическое вмешательство.

Здоровых самок мышей, получавших обедненный рацион BKS.Cg-(истощенные)/OlaHsd и склонных к диабету BKS.Cg-+Lep^{db}/+Lep^{db}/OlaHsd с ожирением, заказывали в Envigo RMS Inc. с соблюдением условий группового содержания, доставляли в условиях группового содержания и оставляли в условиях группового содержания в одноразовых клетках типа коробки для обуви с подстилкой из древесной стружки до дня 15 фазы, предшествующей введению дозы. На момент начала исследования возраст мышей составлял примерно 12 недель.

Мышей содержали в условиях вивария, включающих цикл свет/темнота 12 ч (фаза света 04:00 до полудня - 4:00 после полудня), комнатную температуру от 23 до 26°C и относительную влажность от 30 до 70%. Все животные имели свободный доступ к воде и рациону Purina Fomulab 5008.

В день 9 перед введением дозы осуществляли измерения уровня глюкозы в крови и массы тела (в период от примерно 08:00 до 10:00 до полудня), а также уровня HbA1c. В день 15 фазы, предшествующей введению дозы, животных распределяли в группы обработки (n=8) и в новые клетки с обеспечением соответствия средних показателей HbA1c и массы тела среди всех групп db/db. Сопоставимую по возрасту группу, получавшую обедненный рацион, включали в исследование в качестве здорового эталона с обедненным рационом.

Перед днем 1 фазы введения дозы тестируемый образец разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco, без CaCl₂ и MgCl₂) до концентрации 1 мг/мл и аликвоты данного исходного раствора хранили примерно при $\leq$ -60°C. В день 1 фазы введения дозы аликвоты исходного раствора размораживали и раствор тестируемого образца для введения посредством инъекции получали в свежем виде путем его разбавления с помощью PBS до достижения требуемой концентрации.

В день 1 фазы введения дозы мышей db/db один раз обрабатывали с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг тестируемого образца. Эталонную группу с обедненным рационом обрабатывали один раз с помощью с.с. инъекции среды-носителя PBS. Введение дозы начинали и завершали с 08:00 до 10:00 до полудня. Применяемый объем составлял 5 мл/кг, и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Профиль уровней глюкозы в крови у животных, получавших корм в утреннее время.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы вве-

дения дозы примерно 5 мкл крови собирали путем отрезания кончика хвоста за 30 мин и в момент времени 0 перед определением любых других прижизненных показателей. В момент времени 0 мыши получали s.c. дозу среды-носителя PBS либо 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. Дополнительные образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови с применением глюкометров AlphaTRAK. Если значения концентрации глюкозы согласно двум измерениям отличались на более чем 20 мг/дл, то регистрировали третье значение. Площадь под кривой зависимости (AUC) уровней глюкозы в крови рассчитывали с помощью способа трапеций и для периода, составляющего 24 ч после введения дозы.

Однократная обработка мышей db/db с диабетом, которых не воздерживали от приема пищи, с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 в течение 6 ч обеспечивала нормализацию гипергликемии до концентраций глюкозы в крови при отсутствии воздерживания от приема пищи, наблюдаемых у эталонных мышей без ожирения, получавших обедненный рацион. Средние значения концентрации глюкозы в крови через 24 ч после введения дозы у всех обработанных животных соответствовали исходному уровню или приближались к нему (фиг. 20). Однократная обработка мышей db/db с диабетом с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 приводила к статистически значимому снижению AUC уровней глюкозы в крови по сравнению с группой с диабетом - среданоситель (однофакторный ANOVA, способ Даннета, $P < 0,001$ все группы обработки по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель, фиг. 21, табл. 12).

2) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM. Статистические анализы проводили с помощью Sigmaplot 12.5. Однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения (способ Даннета) проводили со сравнением группы мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных средой-носителем ($n=8$), с каждой из мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных соединением ($n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы без диабета, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, при этом они служат в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения, без диабета.

Таблица 12

Эффекты, полученные в результате подкожной обработки с помощью SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм.

Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM. $n=8$ /группа

Пример	Db/db- среда- носитель	db/db-SEQ ID NO: 6	db/db-SEQ ID NO: 8	db/db-SEQ ID NO: 9
Доза	30 мкг/кг PBS	30 мкг/кг один раз	30 мкг/кг один раз	30 мкг/кг один раз
AUC уровней глюкозы в крови (ммоль/л в течение 24 часов)	646,38 $\pm$ 45,04	376,58 $\pm$ 23,20 $P < 0,001$	406,72 $\pm$ 34, 41 $P < 0,001$	422,08 $\pm$ 37,43 $P < 0,001$

Пример 13. Кратковременные эффекты SEQ ID NO: 7 в отношении уровня глюкозы в крови после подкожной обработки у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм.

Животные, план исследования (фаза, предшествующая введению дозы, фаза введения дозы), фармакологическое вмешательство.

Здоровых самок мышей, получавших обедненный рацион BKS.Cg-(истощенные)/OlaHsd и склонных к диабету BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd с ожирением, заказывали в Envigo RMS Inc. с соблюдением условий группового содержания, доставляли в условиях группового содержания и оставляли в условиях группового содержания в одноразовых клетках типа коробки для обуви с подстилкой из древесной стружки до дня 15 фазы, предшествующей введению дозы. На момент начала исследования возраст мышей составлял примерно 12 недель.

Мышей содержали в условиях вивария, включающих цикл свет/темнота 12 ч (фаза света 04:00 до полудня - 4:00 после полудня), комнатную температуру от 23 до 26°C и относительную влажность от 30 до 70%. Все животные имели свободный доступ к воде и рациону Purina Fomulab 5008.

В день 9 перед введением дозы осуществляли измерения уровня глюкозы в крови и массы тела (в период от примерно 08:00 до 10:00 до полудня), а также уровня HbA1c. В день 15 фазы, предшествующей введению дозы, животных распределяли в группы обработки ($n=8$) и в новые клетки с обеспечением соответствия средних показателей HbA1c и массы тела среди всех групп db/db. Сопоставимую по возрасту группу, получавшую обедненный рацион, включали в исследование в качестве здорового эталона с обедненным рационом.

Перед днем 1 фазы введения дозы тестируемый образец разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco, без CaCl_2 и MgCl_2) до концентрации 1 мг/мл и аликвоты данного исходного раствора хранили примерно при $\leq -60^\circ\text{C}$. В день 1 фазы введения дозы аликвоты исходного раствора размораживали и раствор тестируемого образца для введения посредством инъекции получали в свежем виде путем его разбавления с помощью PBS до достижения требуемой концентрации.

В день 1 фазы введения дозы мышей db/db один раз обрабатывали с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг тестируемого образца. Эталонную группу с обедненным рационом обрабатывали один раз с помощью с.с. инъекции среды-носителя PBS. Введение дозы начинали и завершали с 08:00 до 10:00 до полудня. Применяемый объем составлял 5 мл/кг, и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Профиль уровней глюкозы в крови у животных, получавших корм в утреннее время.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы введения дозы примерно 5 мкл крови собирали путем отрезания кончика хвоста за 30 мин и в момент времени 0 перед определением любых других прижизненных показателей. В момент времени 0 мыши получали с.с. дозу среды-носителя PBS либо 30 мкг/кг SEQ ID NO: 7. Дополнительные образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови с применением глюкометров AlphaTRAK. Если значения концентрации глюкозы согласно двум измерениям отличались на более чем 20 мг/дл, то регистрировали третье значение. Площадь под кривой зависимости (AUC) уровней глюкозы в крови рассчитывали с помощью способа трапеций и для периода, составляющего 24 ч после введения дозы.

Однократная обработка мышей db/db с диабетом, которых не воздерживали от приема пищи, с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 7 в течение 6 ч обеспечивала нормализацию гипергликемии до концентраций глюкозы в крови при отсутствии воздерживания от приема пищи, наблюдаемых у эталонных мышей без ожирения, получавших обедненный рацион. Средняя концентрация глюкозы в крови через 24 ч после введения дозы у обработанных с помощью SEQ ID NO: 7 животных соответствовала исходному уровню (фиг. 22). Однократная обработка мышей db/db с диабетом с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 7 приводила к статистически значимому снижению AUC уровней глюкозы в крови по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель (однофакторный ANOVA, способ Даннета, $P < 0,001$ SEQ ID NO: 7 по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель, фиг. 23, табл. 13).

2) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM.

Статистические анализы проводили с помощью Sigmaplot 12.5. Однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения (способ Даннета) проводили со сравнением группы мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных средой-носителем ($n=8$), с мышами db/db с диабетом, ожирением, обработанными соединением ($n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы без диабета, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, при этом они служат в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения, без диабета.

Таблица 13

Эффекты, полученные в результате подкожной обработки с помощью SEQ ID NO: 7 у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM. $n=8$ /группа

Пример Доза	Db/db-среда- носитель PBS	db/db-SEQ ID NO: 7 30 мкг/кг один раз
AUC уровней глюкозы в крови (ммоль/л в течение 24 часов)	705,52 $\pm$ 49,31	480,59 $\pm$ 21,92 $P < 0,001$

Пример 14. Кратковременные эффекты SEQ ID NO: 11 в отношении уровня глюкозы в крови после подкожной обработки у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм.

Животные, план исследования (фаза, предшествующая введению дозы, фаза введения дозы), фармакологическое вмешательство.

Здоровых самок мышей, получавших обедненный рацион BKS.Cg-(истощенные)/OlaHsd и склонных к диабету BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd с ожирением, заказывали в Envigo RMS Inc. с соблюдением условий группового содержания, доставляли в условиях группового содержания и оставляли в условиях группового содержания в одноразовых клетках типа коробки для обуви с подстилкой из древесной стружки до дня 15 фазы, предшествующей введению дозы. На момент начала исследования возраст мы-

шей составлял примерно 12 недель.

В день 15 фазы, предшествующей введению дозы, животных распределяли в группы обработки ($n=8$) и в новые клетки с обеспечением соответствия средних показателей HbA1c и массы тела среди всех групп db/db. Сопоставимую по возрасту группу, получавшую обедненный рацион, включали в исследование в качестве здорового эталона с обедненным рационом.

Перед днем 1 фазы введения дозы тестируемый образец разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco, без CaCl_2 и MgCl_2) до концентрации 1 мг/мл и аликвоты данного исходного раствора хранили примерно при $\leq -60^\circ\text{C}$. В день 1 фазы введения дозы аликвоты исходного раствора размораживали и раствор тестируемого образца для введения посредством инъекции получали в свежем виде путем его разбавления с помощью PBS до достижения требуемой концентрации.

В день 1 фазы введения дозы мышей db/db один раз обрабатывали с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг тестируемого образца. Эталонную группу с обедненным рационом обрабатывали один раз с помощью с.с. инъекции среды-носителя PBS. Введение дозы начинали и завершали с 08:00 до 10:00 до полудня. Применяемый объем составлял 5 мл/кг и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Профиль уровней глюкозы в крови у животных, получавших корм в утреннее время.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы введения дозы примерно 5 мкл крови собирали путем отрезания кончика хвоста за 30 мин и в момент времени 0 перед определением любых других прижизненных показателей. В момент времени 0 мыши получали с.с. дозу среды-носителя PBS либо 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11. Дополнительные образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови с применением глюкометров AlphaTRAK. Если значения концентрации глюкозы согласно двум измерениям отличались на более чем 20 мг/дл, то регистрировали третье значение. Площадь под кривой зависимости (AUC) уровней глюкозы в крови рассчитывали с помощью способа трапеций и для периода, составляющего 24 ч после введения дозы.

Однократная обработка мышей db/db с диабетом, которых не воздерживали от приема пищи, с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 в течение 6 ч обеспечивала нормализацию гипергликемии до концентраций глюкозы в крови при отсутствии воздерживания от приема пищи, наблюдаемых у эталонных мышей без ожирения, получавших обедненный рацион. Средние значения концентрации глюкозы в крови через 24 ч после введения дозы у обработанных с помощью SEQ ID NO: 11 животных по-прежнему были ниже исходных концентраций (фиг. 24). Однократная обработка мышей db/db с диабетом с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 11 приводила к статистически значимому снижению AUC уровней глюкозы в крови по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель (однофакторный ANOVA, способ Даннета, $P<0,001$ SEQ ID NO: 11 по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель, фиг. 25, табл. 14).

2) Концентрации триацилглицерина в сыворотке крови у животных, получавших корм в утреннее время, перед умерщвлением.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В конечный момент времени исследования животных подвергали глубокой анестезии с помощью изофлурана, собирали образец крови с орбитального синуса и получали сыворотку крови для определения уровня триацилглицерина. Средние значения концентрации триацилглицерина в сыворотке крови через 24 ч после введения дозы у обработанных с помощью SEQ ID NO: 11 животных были статистически значимо ниже концентраций, наблюдаемых у животных группы с диабетом - среда-носитель (однофакторный ANOVA, способ Даннета, $P=0,007$ SEQ ID NO: 11 по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель, фиг. 26, табл. 14).

3) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM.

Статистические анализы проводили с помощью Sigmaplot 12.5. Однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения (способ Даннета) проводили со сравнением группы мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных средой-носителем ($n=8$, за исключением $n=7$ для анализа уровня триацилглицерина), с группой мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных соединением ($n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы без диабета, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, при этом они служат в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения, без диабета.

Таблица 14

Эффекты, полученные в результате подкожной обработки с помощью SEQ ID NO: 11 у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM. n=7-8/группа

Пример Доза	Db/db-среда- носитель PBS	db/db-SEQ ID NO: 11 30 мкг/кг один раз
AUC уровней глюкозы в крови (ммоль/л в течение 24 часов)	763,59 $\pm$ 39,53	391,06 $\pm$ 24,25 P<0,001
Концентрация триацилглицерина в сыворотке крови перед умерщвлением (мг/дл)	192,13 $\pm$ 23,32	108,88 $\pm$ 9,89 P=0,007

Пример 15. Кратковременные эффекты SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 26 в отношении уровня глюкозы в крови после подкожной обработки у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм.

Животные, план исследования (фаза, предшествующая введению дозы, фаза введения дозы), фармакологическое вмешательство.

Здоровых самок мышей, получавших обедненный рацион BKS.Cg-(истощенные)/OlaHsd и склонных к диабету BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd с ожирением, заказывали в Envigo RMS Inc. с соблюдением условий группового содержания, доставляли в условиях группового содержания и оставляли в условиях группового содержания в одноразовых клетках типа коробки для обуви с подстилкой из древесной стружки до дня 15 фазы, предшествующей введению дозы. На момент начала исследования возраст мышей составлял примерно 12 недель.

Мышей содержали в условиях вивария, включающих цикл свет/темнота 12 ч (фаза света 04:00 до полудня - 4:00 после полудня), комнатную температуру от 23 до 26°C и относительную влажность от 30 до 70%. Все животные имели свободный доступ к воде и рациону Purina Fomulab 5008.

В день 9 перед введением дозы осуществляли измерения уровня глюкозы в крови и массы тела (в период от примерно 08:00 до 10:00 до полудня), а также уровня HbA1c. В день 15 фазы, предшествующей введению дозы, животных распределяли в группы обработки (n=8) и в новые клетки с обеспечением соответствия средних показателей HbA1c и массы тела среди всех групп db/db. Сопоставимую по возрасту группу, получавшую обедненный рацион, включали в исследование в качестве здорового эталона с обедненным рационом.

Перед днем 1 фазы введения дозы тестируемый образец разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, Gibco, без CaCl₂ и MgCl₂) до концентрации 1 мг/мл и аликвоты данного исходного раствора хранили примерно при $\leq$ -60°C. В день 1 фазы введения дозы аликвоты исходного раствора размораживали и раствор тестируемого образца для введения посредством инъекции получали в свежем виде путем его разбавления с помощью PBS до достижения требуемой концентрации.

В день 1 фазы введения дозы мышей db/db один раз обрабатывали с помощью с.с. инъекции либо среды-носителя PBS, либо 30 мкг/кг тестируемого образца. Эталонную группу с обедненным рационом обрабатывали один раз с помощью с.с. инъекции среды-носителя PBS. Введение дозы начинали и завершали с 08:00 до 10:00 до полудня. Применяемый объем составлял 5 мл/кг и дозу регулировали согласно последнему показателю массы тела, зарегистрированному для каждого индивидуума.

1) Профиль уровней глюкозы в крови у животных, получавших корм в утреннее время.

Животные имели неограниченный доступ к воде и корму в ходе эксперимента. В день 1 фазы введения дозы примерно 5 мкл крови собирали путем отрезания кончика хвоста за 30 мин и в момент времени 0 перед определением любых других прижизненных показателей. В момент времени 0 мыши получали с.с. дозу среды-носителя PBS либо 30 мкг/кг SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 26. Дополнительные образцы крови собирали через 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Измерения уровней глюкозы проводили в цельной крови с применением глюкометров AlphaTRAK. Если значения концентрации глюкозы согласно двум измерениям отличались на более чем 20 мг/дл, то регистрировали третье значение. Площадь под кривой зависимости (AUC) уровней глюкозы в крови рассчитывали с помощью способа трапеций и для периода, составляющего 24 ч после введения дозы.

Однократная обработка мышей db/db с диабетом, которых не воздерживали от приема пищи, с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 26 в течение 6 ч обеспечивала нормализацию гипергликемии до концентраций глюкозы в крови при отсутствии воздерживания от приема пищи, наблюдаемых у эталонных мышей без ожирения, получавших обед-

ненный рацион. Средние значения концентрации глюкозы в крови через 24 ч после введения дозы у всех обработанных животных соответствовали исходному уровню или приближались к нему (фиг. 27). Однократная обработка мышей db/db с диабетом с помощью 30 мкг/кг SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 26 приводила к статистически значимому снижению AUC уровня глюкозы в крови по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель (однофакторный ANOVA, способ Даннетта, $P < 0,001$ все группы обработки по сравнению с группой с диабетом - среда-носитель, фиг. 28, табл. 15).

2) Статистические анализы.

На фигурах данные приведены в виде средних значений $\pm$ SEM.

Статистические анализы проводили с помощью Everstat 6.0.12. Однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения (способ Даннетта) проводили со сравнением группы мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных средой-носителем ($n=8$), с каждой из мышей db/db с диабетом, ожирением, обработанных соединением ($n=8$). Если отличие в средних значениях у двух групп превышало 0,05, то их считали статистически значимо различными. Данные для группы без диабета, получавшей обедненный рацион - среду-носитель, приведены на фигурах, при этом они служат в качестве эталонного набора данных для состояния без ожирения, без диабета.

Таблица 15

Эффекты, полученные в результате подкожной обработки с помощью SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 26 у самок мышей db/db с диабетом, получавших корм. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM. $n=8$ /группа

Пример Доза	AUC уровней глюкозы в крови (ммоль/л в течение 24 часов)
Db/db-среда-носитель PBS	671,39 $\pm$ 15,42
db/db-SEQ ID NO: 10 30 мкг/кг один раз	413,77 $\pm$ 37,33 $P < 0,001$
db/db-SEQ ID NO: 12 30 мкг/кг один раз	334,37 $\pm$ 25,07 $P < 0,001$
db/db-SEQ ID NO: 13 30 мкг/кг один раз	373,42 $\pm$ 13,99 $P < 0,001$
db/db-SEQ ID NO: 16 30 мкг/кг один раз	321,96 $\pm$ 29,27 $P < 0,001$
db/db-SEQ ID NO: 26 30 мкг/кг один раз	416,25 $\pm$ 30,62 $P < 0,001$

Пример 16.

Противоатеросклеротическая активность тройных агонистов GLP-1R/GCGR/GIPR у мышей с КО ApoE.

Мышиную модель с нокаутом (КО) гена аполипопротеина E (ApoE) широко применяют для изучения атеросклероза. У таких мышей самопроизвольно развиваются атеросклеротические очаги, которые по морфологии подобны очагам, наблюдаемым у людей (Meir & Leitersdorf, 2004, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24:1006-1014, Rosenfeld et al. 2000, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20:2587-2592).

Животные.

Самцов мышей с КО ApoE (B.129P2-apoetm1Unc/J) произвольным образом распределяли в группу контроля или группу обработки ($N=15$ на группу); мыши дикого типа (C57BL6/J) получали обработку средой-носителем и выступали в качестве второго здорового контроля.

Процедура исследования.

Мыши с КО ApoE и мыши дикого типа непрерывно получали инфузию в течение 16 недель с применением подкожных осмотических мини-насосов (ALZET™), заполненных средой-носителем (стерильный ацетатный буфер, pH 4,5), пептидами под SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11 (150 мкг/кг/день) либо лираглутидом (600 мкг/кг/день). Вес тела и потребление пищи отслеживали еженедельно на протяжении всего исследования.

Липидные параметры крови.

Образцы крови для анализа уровней липидов в крови забирали перед обработкой и в недели 7 и 16 для анализа уровней общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL) и холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) (не показано).

Количественная оценка образования атеросклеротической бляшки.

Аорту вырезали и образование атеросклеротической бляшки на аорте измеряли в виде абсолютной и относительной площади бляшки (% окрашенной масляным красным области от общей площади по-

верхности аорты) с применением количественного и автоматизированного анализа изображений.

Результаты показаны на фигурах.

Фиг. 29. Данные наблюдения потребления пищи и веса тела.

Фиг. 30. Данные площади аортальной бляшки.

Фиг. 31. Данные уровня общего холестерина и LDL-холестерина в сыворотке крови.

У самцов мышей с КО АроЕ длительная обработка в течение 4 месяцев с помощью пептидов под SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11 в дозе 150 мкг/кг/день приводила к значимому снижению количества атеросклеротических бляшек на 63 и 73% по сравнению с контролем со средой-носителем. Противоатеросклеротическая эффективность сопровождалась заметным снижением уровня LDL-холестерина.

В отличие от этого, в 4 раза более высокая доза чистого агониста рецептора GLP-1 лираглутида обеспечивала значимое уменьшение образования аортальных бляшек, но только на 37%, при этом снижение уровня LDL-холестерина было гораздо менее выраженным.

Таблица 16

Последовательности

SEQ. ID	Последовательность
1	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-G-R-NH ₂
2	H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K(gGlu-Palm)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-OH
3	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T-OH
4	H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
5	Y-A-E-G-T-F-I-S-D-Y-S-I-A-M-D-K-I-H-Q-Q-D-F-V-N-W-L-L-A-Q-K-G-K-K-N-D-W-K-H-N-I-T-Q-OH
6	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
7	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
8	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[qGlu-qGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
9	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
10	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
11	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
12	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂

13	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
14	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
15	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
16	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
17	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Stea]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
18	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
19	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Stea]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
20	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
21	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-Stea]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
22	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
23	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-E-Q-R-Q-K-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-H-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
24	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
25	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-dAla-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
26	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-gGlu-AEEA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
	K-NH ₂
27	H-Aib-H-G-T-F-T-S-D-L-S-K-L-K[gGlu-AEEA-gAAA-Palm]-E-E-Q-R-Q-Aib-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-P-S-Aib-K-P-P-P-K-NH ₂
28	H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-K[gGlu-Stea]-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-K-A-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂
29	Y-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-K[gGlu-Stea]-D-E-Q-R-A-K-E-F-I-E-W-L-K-S-G-G-P-S-S-G-A-P-P-P-S-NH ₂

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I

H₂N-His-Aib-His-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Leu-X14-

Glu-Glu-Gln-Arg-Gln-X20-Glu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Ala-X29-Gly-

X31-Pro-Ser-Aib-Lys-Pro-Pro-Pro-Lys-R¹ I,

где X14 представляет собой аминокислотный остаток с функционализированной группой -NH₂ боковой цепи, выбранный из группы, состоящей из Lys, Orn, Dab или Dar, где группа -NH₂ боковой цепи функционализирована с помощью -Z-C(O)-R⁵, где

Z представляет собой линкер во всех стереоизомерных формах и

R⁵ представляет собой фрагмент, содержащий не более 50 атомов углерода и гетероатомы, выбранные из N и O;

X20 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Aib и Lys;

- X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;
 X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;
 R¹ представляет собой NH₂ или OH,
 или его физиологически приемлемая соль.
2. Соединение по п.1, где R¹ представляет собой NH₂, или его физиологически приемлемая соль.
3. Соединение по любому из пп.1, 2, где пептидное соединение характеризуется относительной активностью, составляющей по меньшей мере 5% по сравнению с относительной активностью природного глюкагона в отношении рецептора глюкагона.
4. Соединение по любому из пп.1-3, где пептидное соединение проявляет относительную активность, составляющую по меньшей мере 7% по сравнению с относительной активностью GLP-1(7-36)-амида в отношении рецептора GLP-1.
5. Соединение по любому из пп.1-4, где пептидное соединение проявляет относительную активность, составляющую по меньшей мере 4% по сравнению с относительной активностью GIP в отношении рецептора GIP.
6. Соединение по любому из пп.1-5, где
 X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализована группой -Z-C(O)R⁵, где
 Z представляет собой группу, выбранную из gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-AEEAc-gAAA-, gGlu-gGlu-AEEAc, AEEAc-AEEAc-gGlu и AEEAc-AEEAc-AEEAc; и
 R⁵ представляет собой группу, выбранную из пентадеканила или гептадеканила.
7. Соединение по любому из пп.1-5, где
 X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализована группой -Z-C(O)R⁵, где
 Z представляет собой группу, выбранную из gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-AEEAc-gAAA- и gGlu-gGlu-AEEAc; и
 R⁵ представляет собой группу, выбранную из пентадеканила или гептадеканила.
8. Соединение по любому из пп.1-5, где
 X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализована с помощью
 (S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино]этоксид}этоксид)ацетиламино]-этоксид}этоксид)ацетила,
 (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутириламино]этоксид}этоксид)ацетиламино]-этоксид}этоксид)ацетила,
 [2-(2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-октадеканоиламиноэтоксид]этоксид]ацетиламино}этоксид)этоксид]ацетиламино}этоксид)этоксид]ацетил-амино}этоксид)этоксид]ацетил-;
 R¹ представляет собой NH₂,
 или его физиологически приемлемая соль.
9. Соединение по любому из пп.1-5, где
 X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализована с помощью
 (S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино]этоксид}этоксид)ацетиламино]-этоксид}этоксид)ацетила,
 (2-{2-[2-(2-{2-[(4S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутириламино]этоксид}этоксид)ацетиламино]-этоксид}этоксид)ацетила,
 R¹ представляет собой NH₂,
 или его физиологически приемлемая соль.
10. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализована с помощью (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-;
 X20 представляет собой Lys или Aib;
 X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;
 X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;
 R¹ представляет собой NH₂,
 или его физиологически приемлемая соль.
11. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа -NH₂ боковой цепи функционализована с помощью
 (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-;

- X20 представляет собой Lys;
 X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;
 X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;
 R^1 представляет собой NH_2 ,
 или его физиологически приемлемая соль.
12. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализована с помощью (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-;
 X20 представляет собой Lys;
 X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;
 X31 представляет собой His;
 R^1 представляет собой NH_2 ,
 или его физиологически приемлемая соль.
13. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализована с помощью (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-;
 X20 представляет собой Lys;
 X29 представляет собой Gly;
 X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;
 R^1 представляет собой NH_2 ,
 или его физиологически приемлемая соль.
14. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализована с помощью (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-;
 X20 представляет собой Aib;
 X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;
 X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;
 R^1 представляет собой NH_2 ,
 или его физиологически приемлемая соль.
15. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализована с помощью (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-,
 (S)-4-карбокси-4-октадеканоиламинобутирил-;
 X20 представляет собой Aib;
 X29 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из D-Ala и Gly;
 X31 представляет собой Pro;
 R^1 представляет собой NH_2 ,
 или его физиологически приемлемая соль.
16. Соединение по любому из пп.1-8, где
 X14 представляет собой Lys, где группа $-NH_2$ боковой цепи функционализована с помощью (S)-4-карбокси-4-((S)-4-карбокси-4-гексадеканоиламинобутириламино)бутирил-;
 X20 представляет собой Aib;
 X29 представляет собой D-Ala;
 X31 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из His и Pro;
 R^1 представляет собой NH_2 ,
 или его физиологически приемлемая соль.
17. Соединение по любому из пп.1-16, выбранное из соединений под SEQ ID NO: 6-27, а также их физиологически приемлемых солей.
18. Соединение по п.1, где соединение представлено SEQ ID NO: 6 или его физиологически приемлемой солью.
19. Соединение по п.1, где соединение представлено SEQ ID NO: 9 или его физиологически приемлемой солью.
20. Соединение по п.1, где соединение представлено SEQ ID NO: 11 или его физиологически приемлемой солью.
21. Применение соединения по любому из пп.1-20 в терапии.
22. Применение соединения по любому из пп.1-20 в качестве фармацевтического препарата.
23. Применение по любому из пп.21, 22, где соединение присутствует в качестве активного средства в фармацевтической композиции вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем.

24. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для лечения нарушения толерантности к глюкозе, инсулинорезистентности, преддиабета, повышенного уровня глюкозы в крови натощак, гипергликемии, диабета 2 типа, гипертензии, дислипидемии, атеросклероза, ишемической болезни сердца, заболевания периферических артерий, инсульта или любой комбинации компонентов этих отдельных заболеваний.

25. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для контроля аппетита, питания и потребления калорий, увеличения расхода энергии, предупреждения прибавления веса тела, стимуляции снижения веса тела, снижения избыточного веса тела и, в целом, для лечения ожирения, в том числе ожирения, препятствующего нормальному функционированию организма.

26. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для лечения или предупреждения гепатостеатоза.

27. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для лечения или предупреждения гипергликемии, диабета 2 типа и/или ожирения.

28. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для одновременного лечения диабета 2 типа и ожирения.

29. Применение по любому из пп.21-25, где соединение применяют для лечения диабета.

30. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для лечения ожирения.

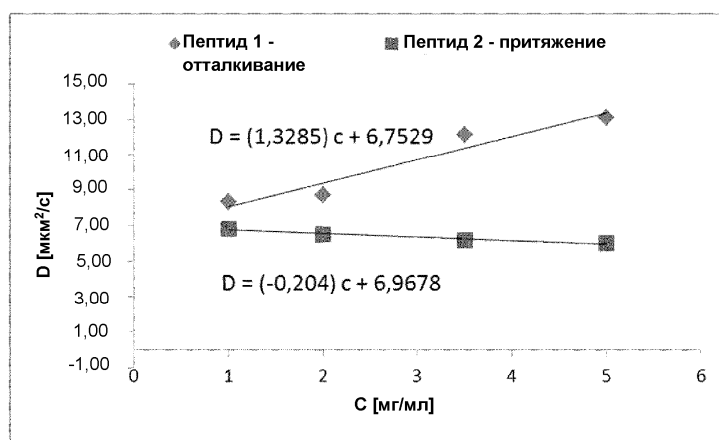
31. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для лечения атеросклероза.

32. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для замедления прохождения содержимого через кишечник, увеличения количества содержимого желудка и/или снижения потребления пищи пациентом.

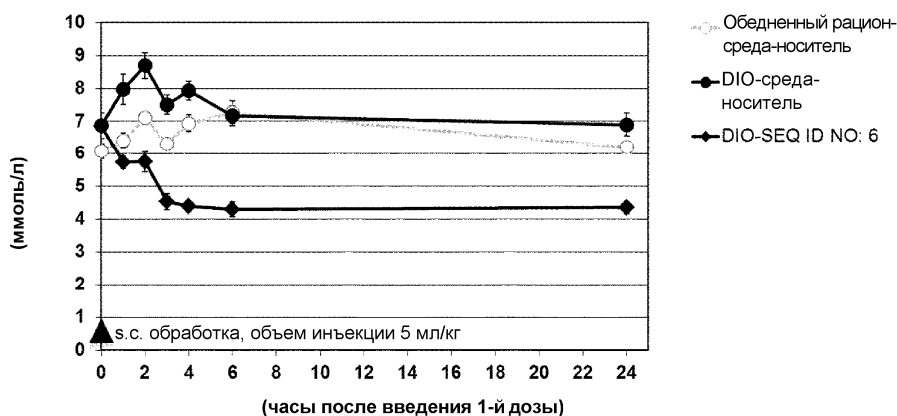
33. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для снижения уровней глюкозы в крови и/или снижения уровней HbA1c у пациента.

34. Применение по любому из пп.21-23, где соединение применяют для снижения веса тела пациента.

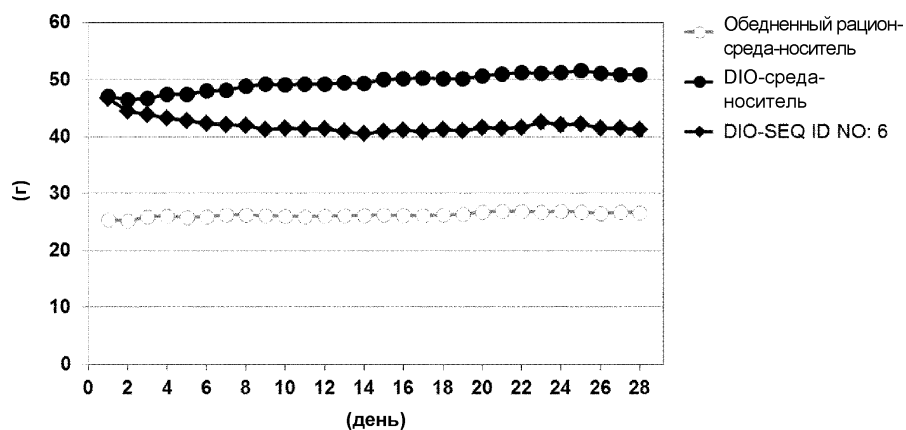
35. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения гипергликемии, диабета 2 типа, ожирения и гепатостеатоза, содержащая по меньшей мере одно соединение по любому из пп.1-20 или физиологически приемлемую соль любого из них.



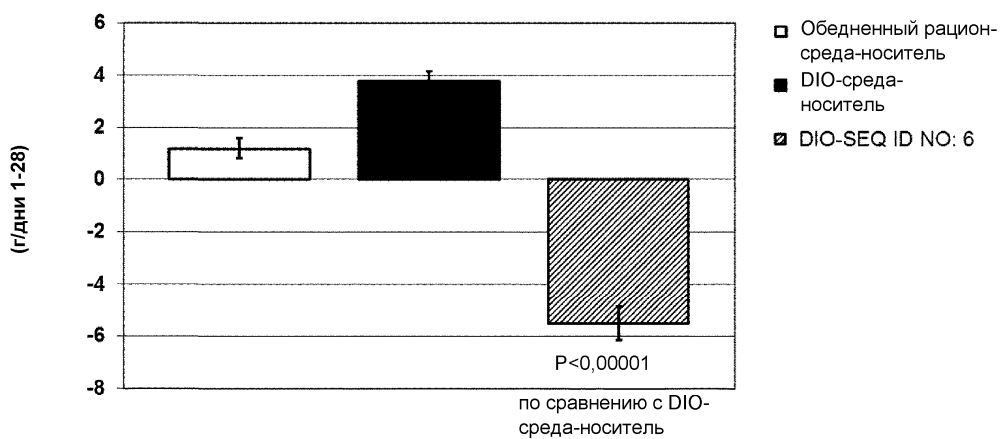
Фиг. 1



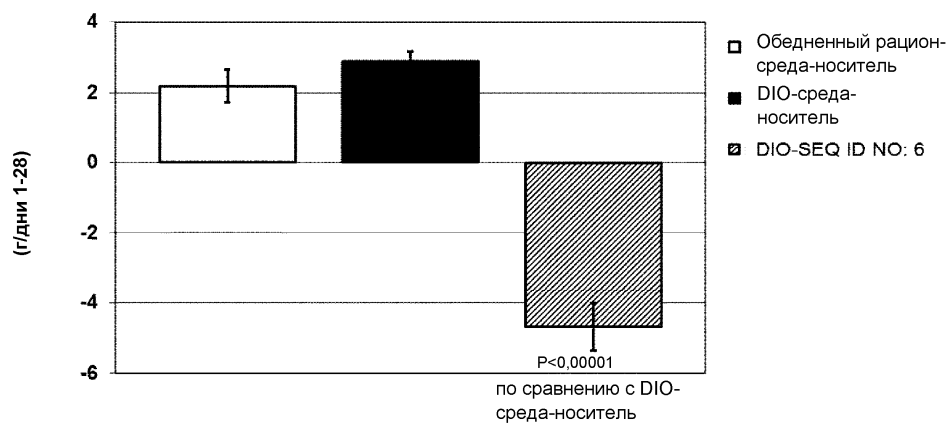
Фиг. 2



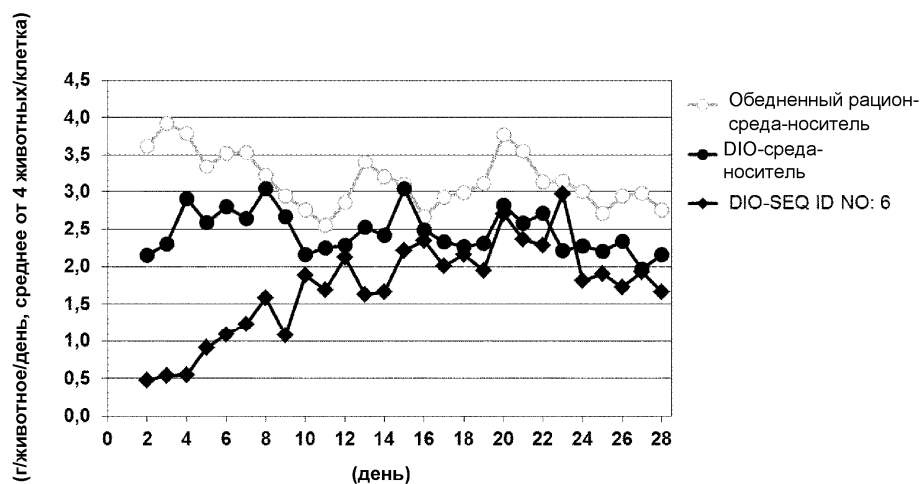
Фиг. 3



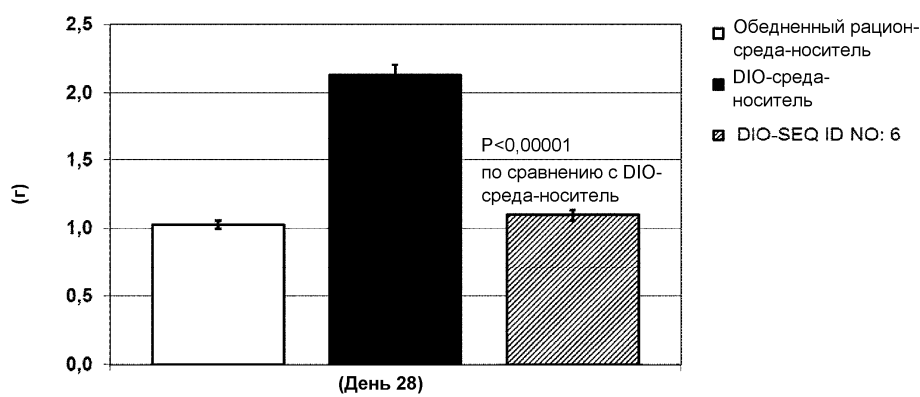
Фиг. 4



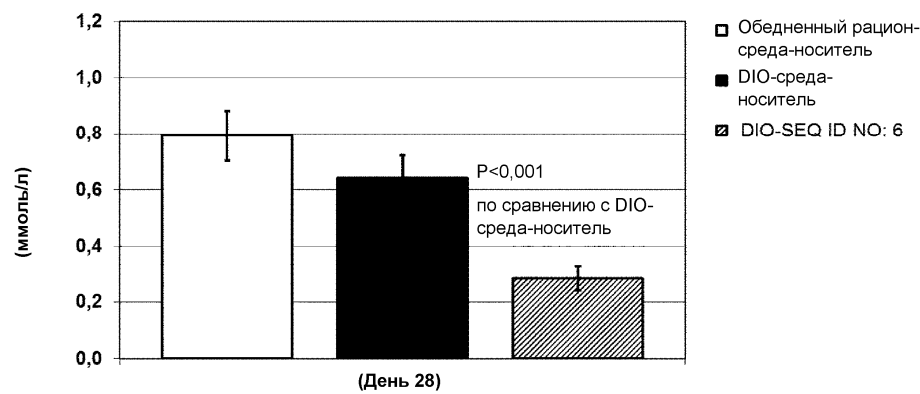
Фиг. 5



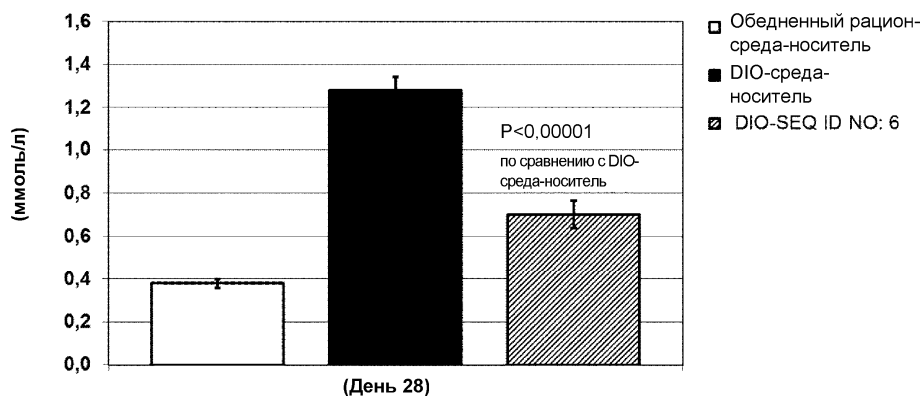
Фиг. 6



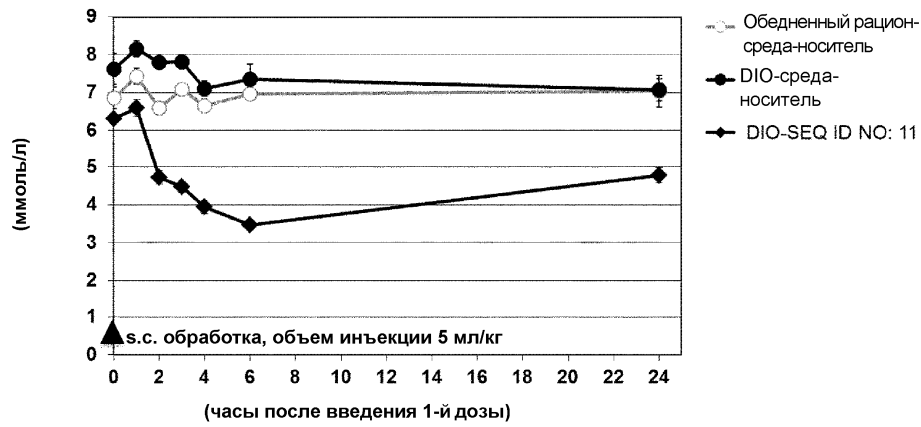
Фиг. 7



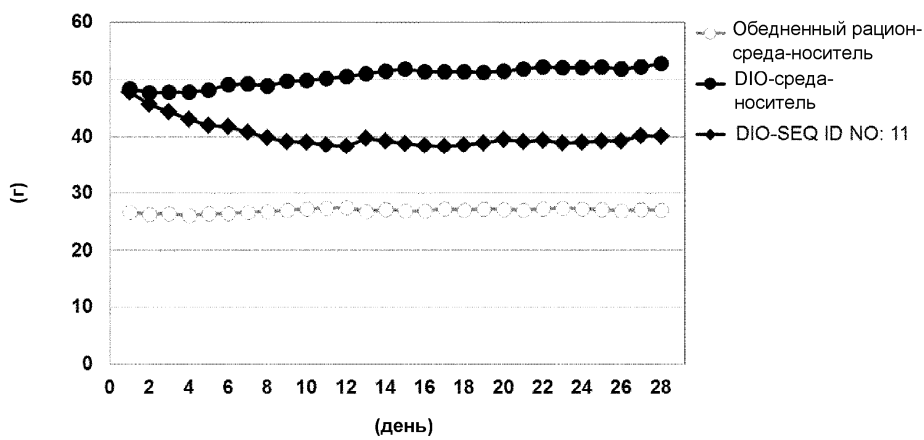
Фиг. 8



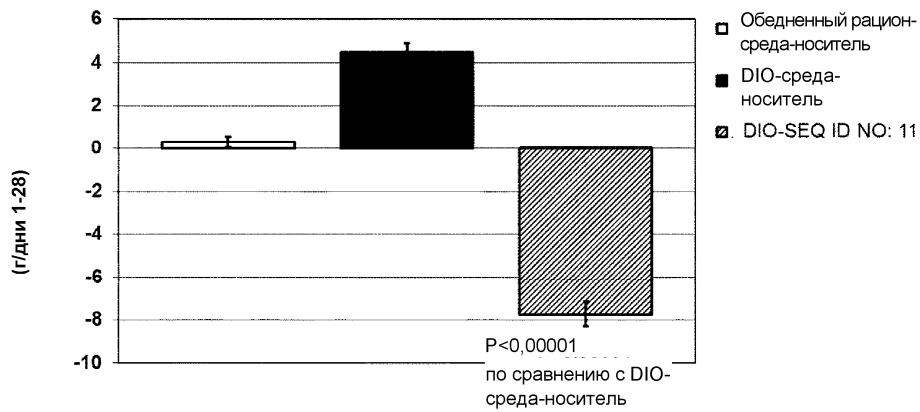
Фиг. 9



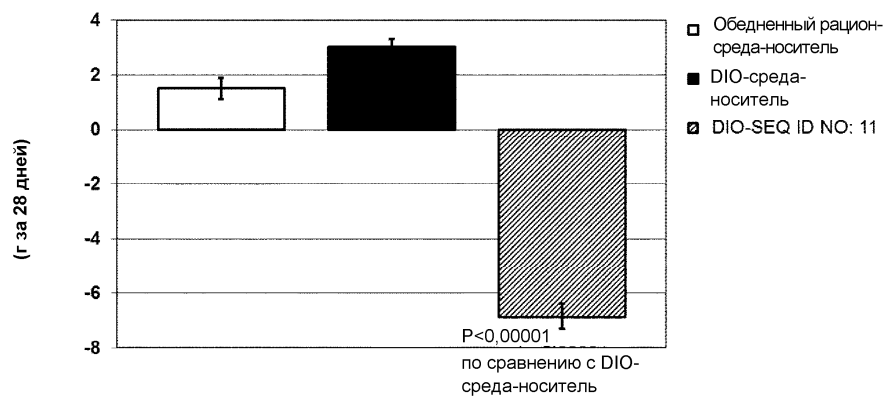
Фиг. 10



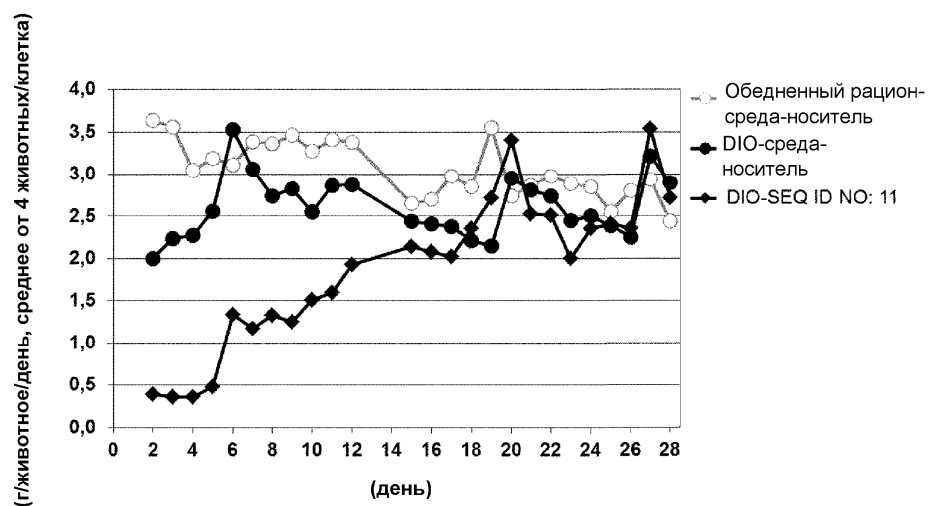
Фиг. 11



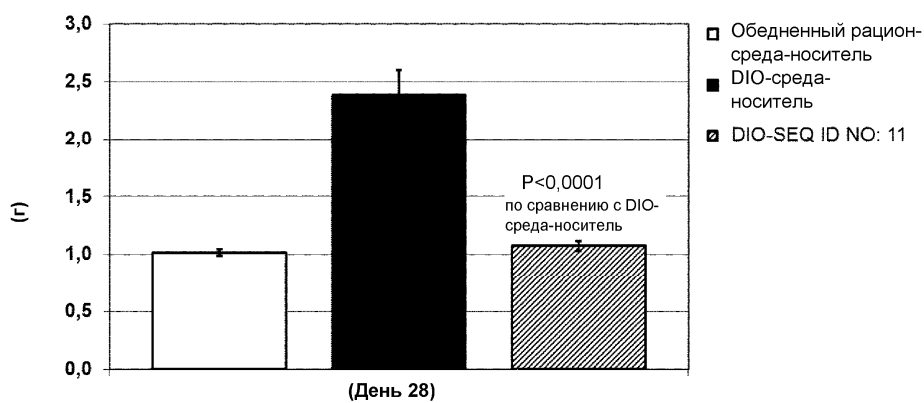
Фиг. 12



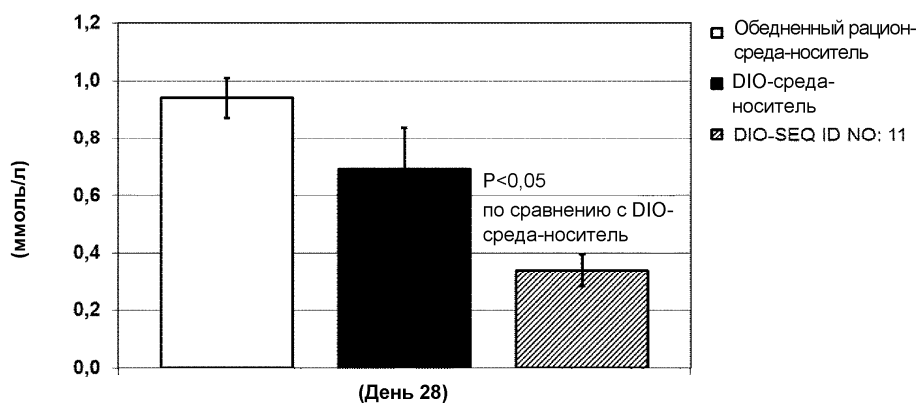
Фиг. 13



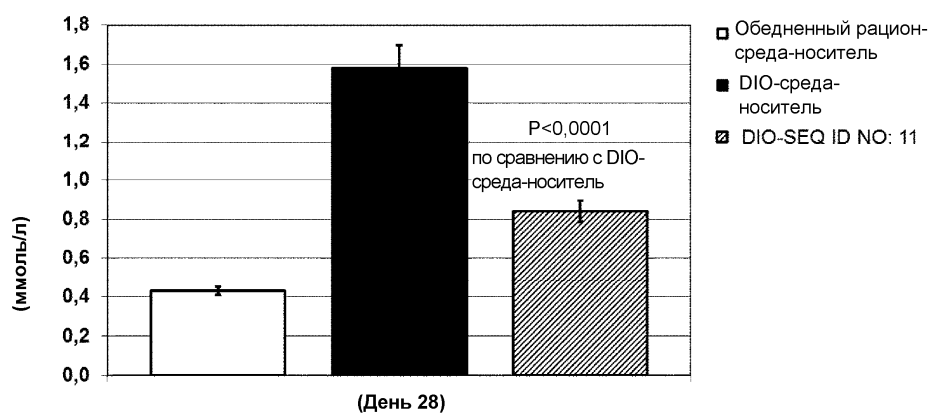
Фиг. 14



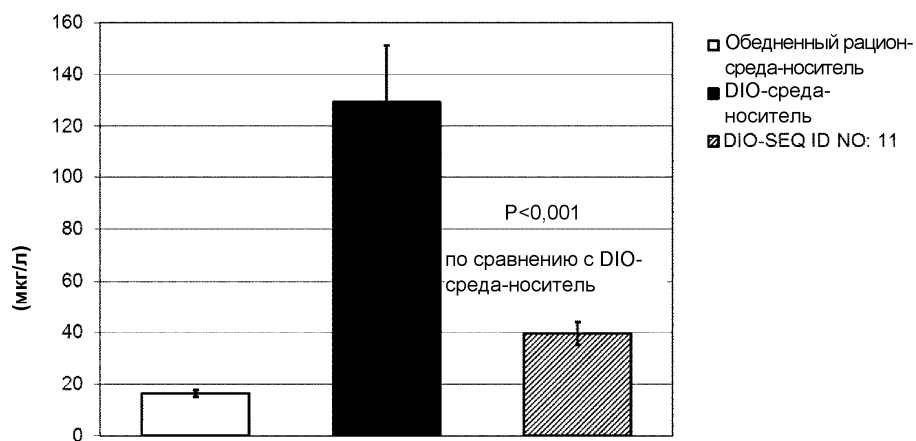
Фиг. 15



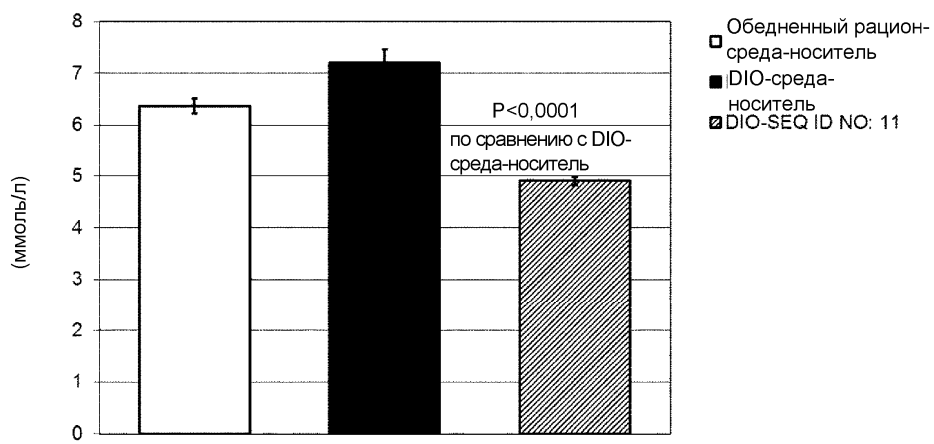
Фиг. 16



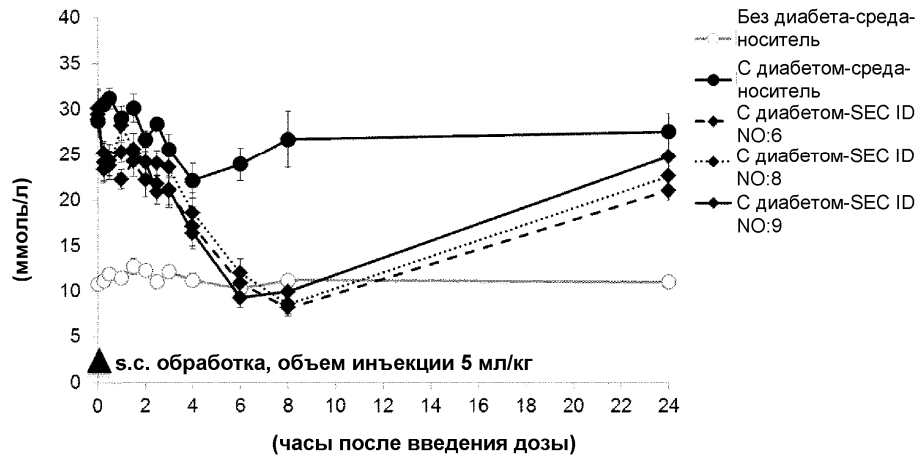
Фиг. 17



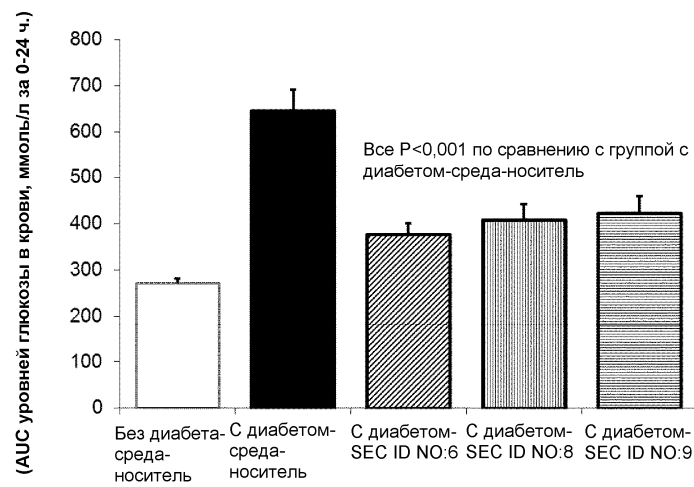
Фиг. 18



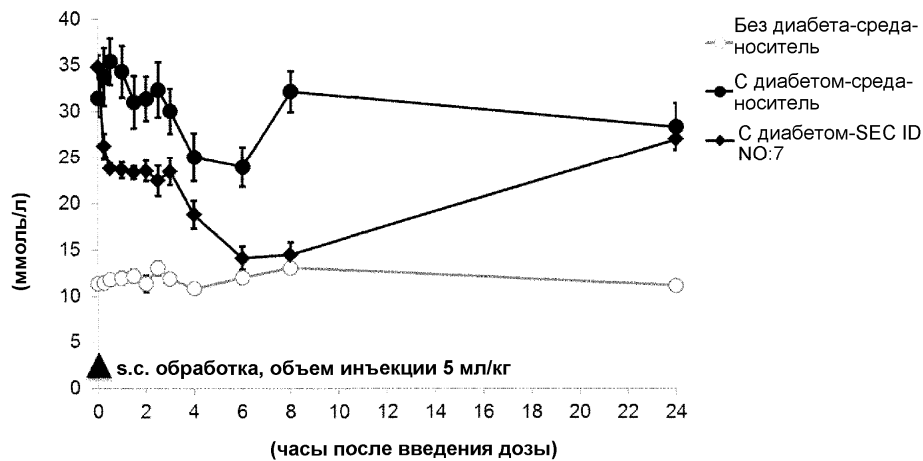
Фиг. 19



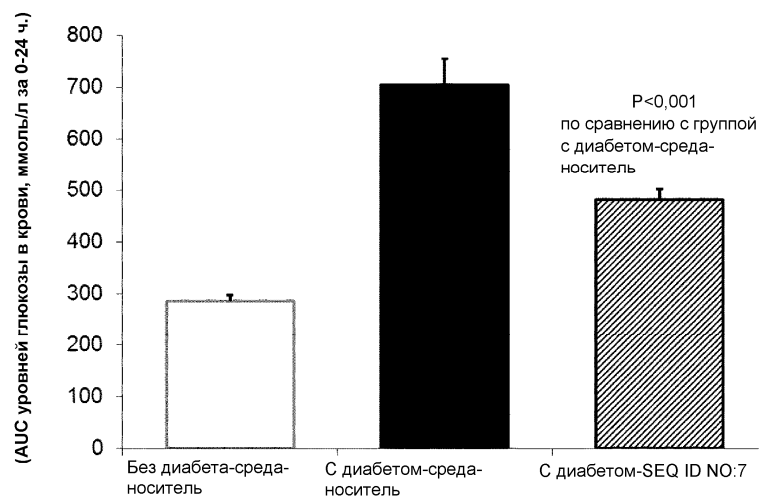
Фиг. 20



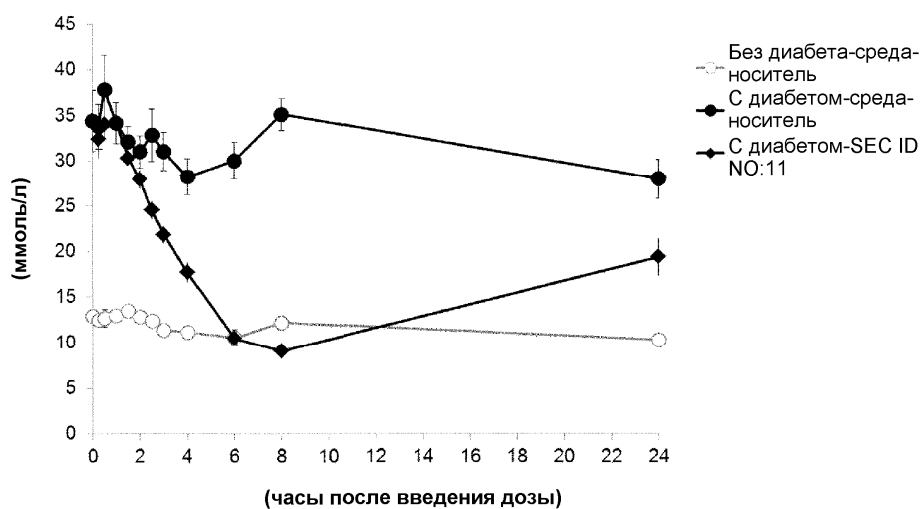
Фиг. 21



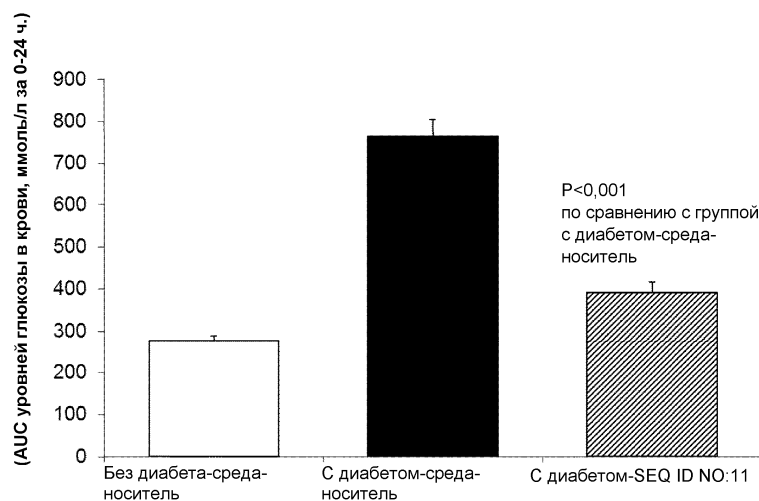
Фиг. 22



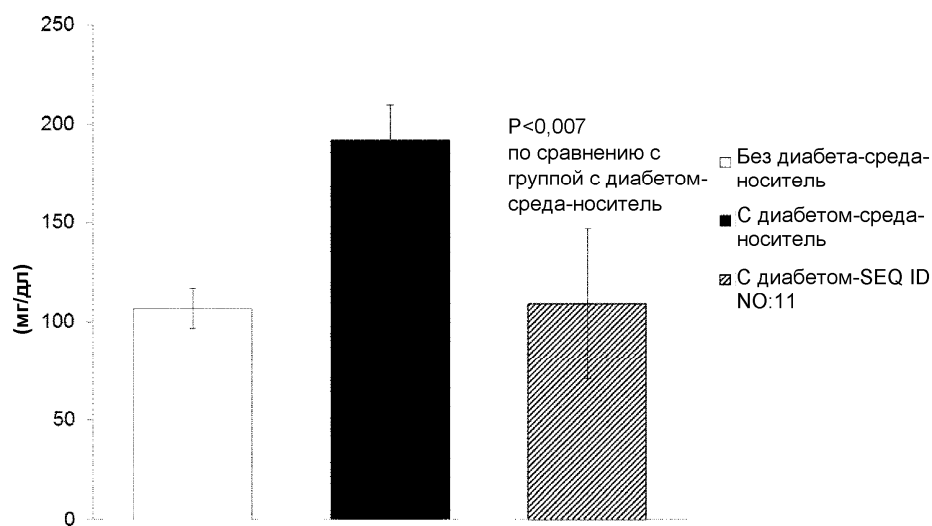
Фиг. 23



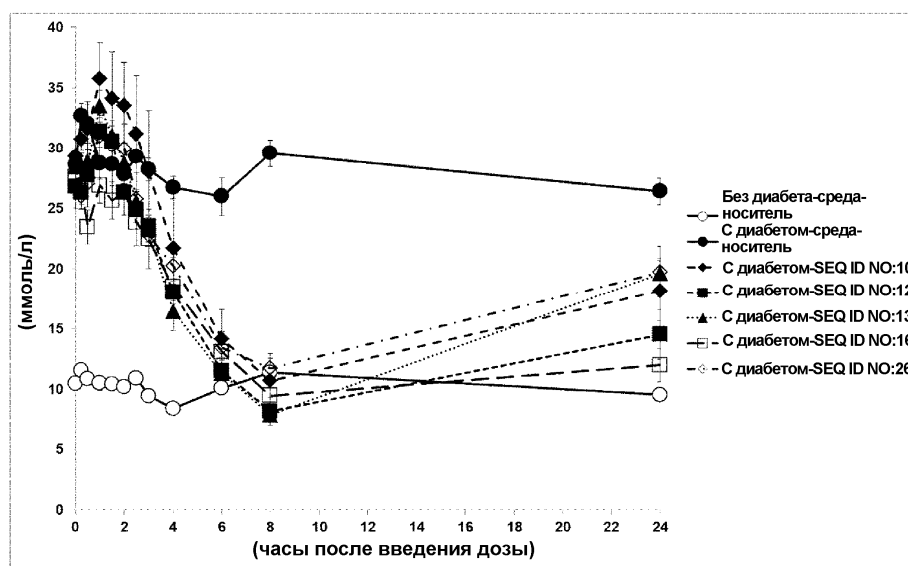
Фиг. 24



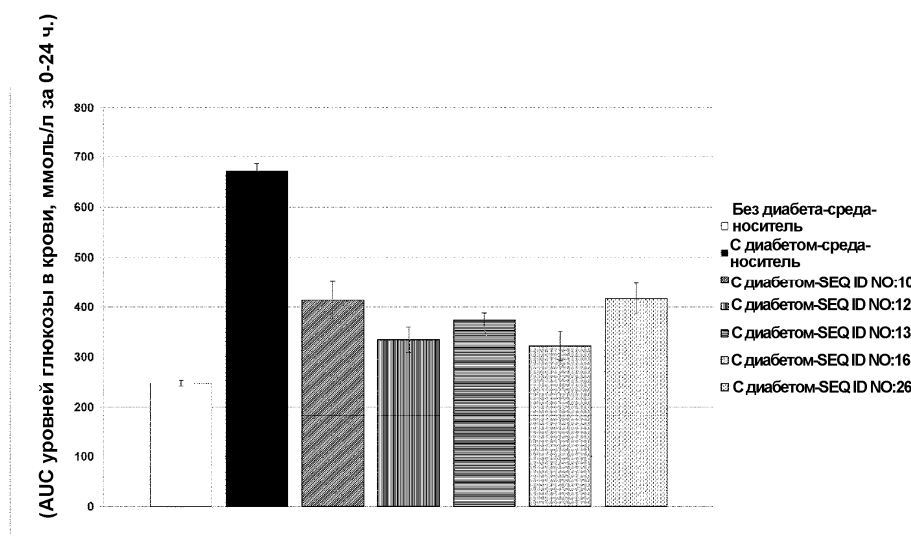
Фиг. 25



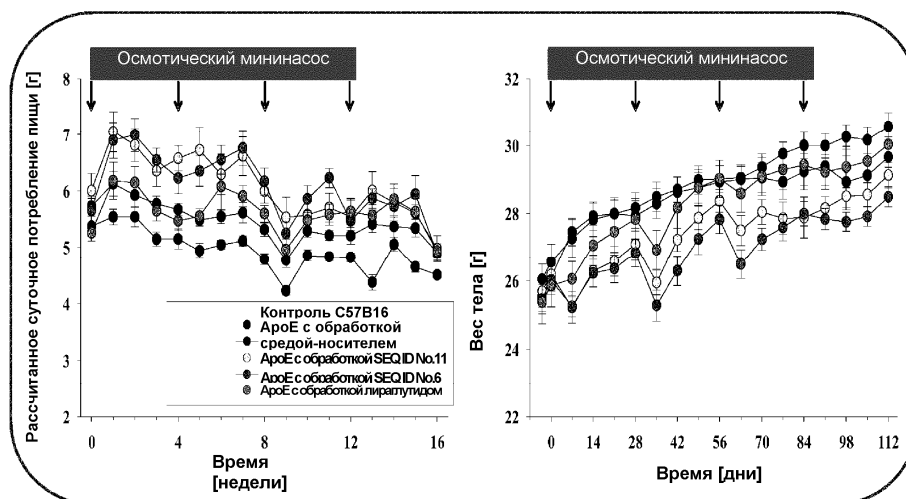
Фиг. 26



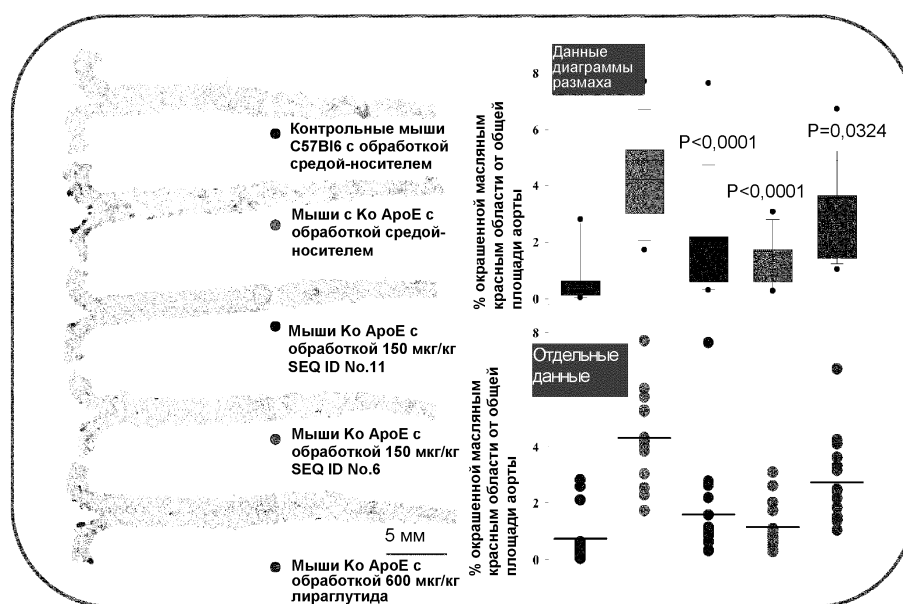
Фиг. 27



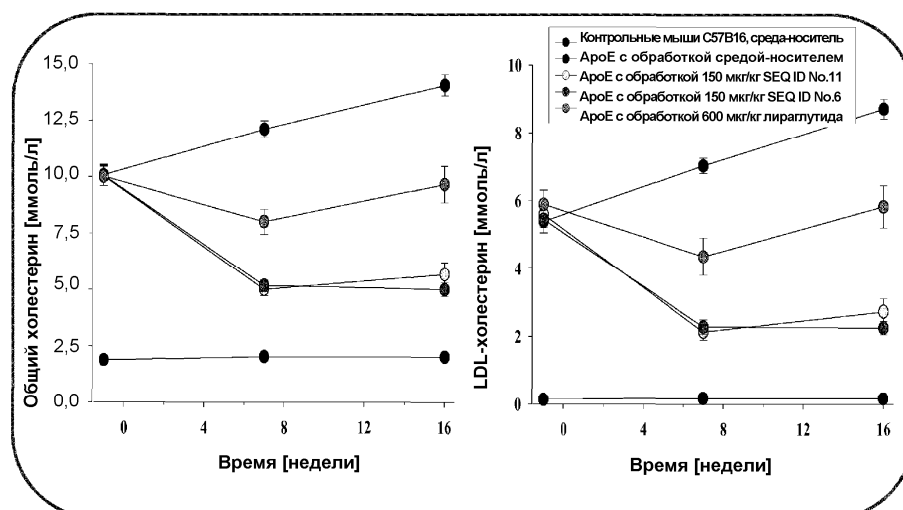
Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31

