

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191850** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.10.31**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.06.16**

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

---

(54) **ГЛЮКАГОН И КОАГОНИСТЫ ГПП-1**

---

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

(32) **2015.06.22**

(33) **US**

(62) **201792562; 2016.06.16**

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

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

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

---

(57) В данном изобретении предложен глюкагон и коагонисты ГПП-1, которые являются пригодными при лечении диабета типа 2, ожирения, безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и/или безалкогольного стеатогепатита (NASH).

**A1**

**202191850**

**202191850**

**A1**

## ГЛЮКАГОН И КОАГОНИСТЫ ГПП-1

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

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

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

Gcg представляет собой 29-аминокислотный пептид, который соответствует от 53 до 81 аминокислотам препроглюкагона. ОХМ представляет собой 37-аминокислотный пептид и состоит из полной 29-аминокислотной последовательности Gcg с октапептидным

карбоксильным терминальным расширением (аминокислоты с 82 по 89 пред-проглюкагон и называется «промежуточным пептидом 1» или IP-1). Основной биологически активный фрагмент GLP-1 (GLP-1<sub>7-36</sub>) вырабатывается в виде 30-аминокислотного С-концевого амидированного пептида, который соответствует от 98 до 127 аминокислотам пре-проглюкагона.

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

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

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

Эти данные свидетельствуют о том, что ОХМ имеет потенциал быть хорошо переносимым агентом по борьбе с диабетом/ожирением. Однако ОХМ представляет

несколько проблем для развития в качестве коммерчески жизнеспособный терапевтический агент. Эндогенный ОХМ быстро деградирует *in vivo* дипептидилпептидазой IV и другими пептидазами, а также подвергается быстрому почечному клиренсу из-за его небольшого размера. Поэтому желательно идентифицировать пептиды, которые активируют рецепторы Gcg и GLP-1 с улучшенной метаболической стабильностью и сниженной скоростью клиренса.

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

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

В одном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

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

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

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

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

В другом аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

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

где

Xaa2 представляет собой Aib;

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

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

В еще одном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

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

где

Xaa2 представляет собой Aib;

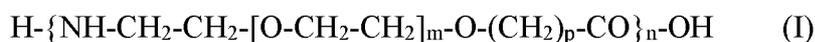
Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с C14-C24 жирной кислоты через (i) непосредственную связь или (ii) линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой; и

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

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

Более предпочтительно, линкер выбран из группы, состоящей из:

(a) аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I:



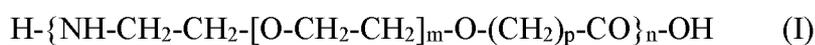
где  $m$  равен любому целому числу от 1 до 12,  $n$  равен любому целому числу от 1 до 12, и  $p$  равен 1 или 2;

- (b) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аргинина (Arg), аспарагина (Asn), аспарагиновой кислоты (Asp), глутамина (Gln), глутаминовой кислоты (Glu), гистидина (His), лизина (Lys), серина (Ser), треонина (Thr), цитруллина (Cit), орнитина (Orn), саркозина (Sar), глицина (Gly),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $\gamma$ -Abu) и  $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu);
- (c) дипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;
- (d) трипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu;
- (e) полипептида, выбранного из группы, состоящей из  $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$   $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$  и  $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_t$ , (6-аминогексановой кислоты) $_s$ , (5-аминовалериановой кислоты) $_s$ , (7-аминогептановой кислоты) $_s$ , и (8-аминооктановой кислоты) $_s$ , где  $q$  равен целому числу от 2 до 5,  $r$  равен целому числу от 1 до 3 и  $s$  равен целому числу от 4 до 15; и
- (f) линкера конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I как указано в определении в (a) конъюгирован с:
- (i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu;
- (ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;
- (iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -

Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu; или

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

В предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей, линкер представляет собой аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I:



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

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

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

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

Предпочтительно, аминокислота представляет собой  $\gamma$ -Glu.

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

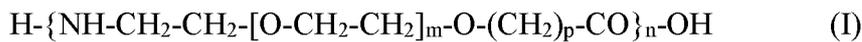
Предпочтительно, дипептид представляет собой  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

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

трипептид выбран из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей, линкер представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)<sub>q</sub> (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub> и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub>, (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15.

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



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

конъюгирован с:

- (i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu;
- (ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;
- (iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu; или
- (iv) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)<sub>q</sub> (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub> и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub>, (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q

равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15.

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

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

Еще более предпочтительно, аминокислота представляет собой  $\gamma$ -Glu.

Еще более предпочтительно, дипептид представляет собой  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

В предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению, линкер представляет собой  $([2-(2\text{-аминоэтокси})\text{-этокси}]\text{-ацетил})_2\text{-}(\gamma\text{-Glu})_t$ , где t равен 1 или 2.

Предпочтительно, t равен 1.

Более предпочтительно, t равен 2.

В еще одном дополнительном предпочтительном аспекте соединений по данному изобретению или их фармацевтически приемлемых солей, C14-C24 жирная кислота представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

His-Xaa<sup>2</sup>-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

где Xaa<sup>2</sup> представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO<sub>2</sub>H; и С-концевая аминокислота амидирована (SEQ ID NO: 5), или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

His-Xaa<sup>2</sup>-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

где Хаа 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO<sub>2</sub>H; и

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

или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

His-Xaa<sub>2</sub>-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-  
Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

где Хаа 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO<sub>2</sub>H; и

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

или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном аспекте в данном изобретении предложено соединение формулы:

His-Xaa<sub>2</sub>-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-  
Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

где Хаа 2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эпсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO<sub>2</sub>H; и

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

или представляет собой его фармацевтически приемлемая соль.

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

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

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении Способ лечения предложен способ лечения диабета типа 2 Соединение у субъекта, нуждающегося в этом,

включающий введение субъекту эффективного количества соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

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

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

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

В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложен способ индуцирования нетерапевтической потери веса у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по данному изобретению Соединение или его фармацевтически приемлемой соли.

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

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

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

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

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

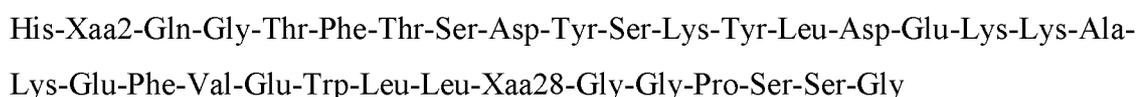
В еще одном дополнительном аспекте в данном изобретении предложено применение соединения по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения диабета типа 2.

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

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

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

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

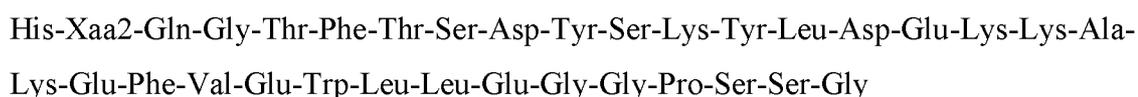


где Xaa 2 представляет собой Aib;

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

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

Предпочтительно, в данном изобретении предложено промежуточное соединение следующей формулы:

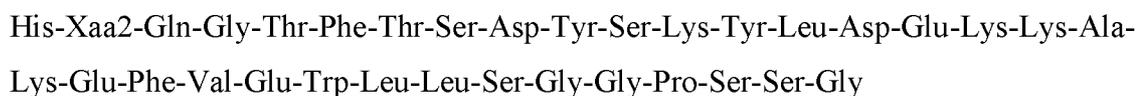


где Xaa 2 представляет собой Aib; и

C-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 10);

или представляет собой его фармацевтически приемлемую соль.

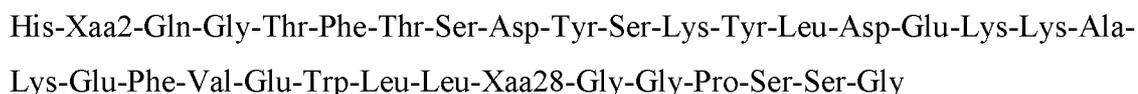
Более предпочтительно в данном изобретении предложено промежуточное соединение следующей формулы:



где Xaa 2 представляет собой Aib; и

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

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



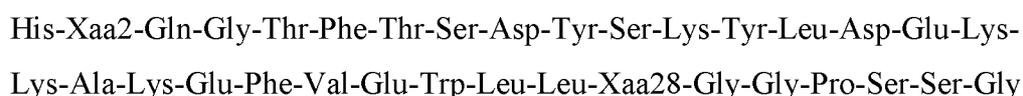
где Xaa 2 представляет собой Aib; и

Xaa<sub>28</sub> представляет собой Glu или Ser;

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

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

(i) модифицирование промежуточного соединения следующей формулы:



где Xaa<sub>2</sub> представляет собой Aib;

Xaa<sub>28</sub> представляет собой Glu или Ser; и

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

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

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

Соединения по данному изобретению способны связываться с и активировать оба рецептор GLP-1 и рецептор Gcg. Соединения по данному изобретению способны вызвать снижение потребления пищи у пациентов с избыточным весом и ожирением. Соединения по данному изобретению обладают потенциалом для обеспечения превосходного эффекта

потери веса по сравнению с человеческим ОХМ дикого типа. Соединения по данному изобретению могут улучшить толерантность к глюкозе и профиль липидов у пациентов с T2D и/или связанными с ними метаболическими нарушениями и могут сделать это более эффективно, чем человеческий ОХМ дикого типа.

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

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

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

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

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

Некоторые соединения по данному изобретению имеют сбалансированное соотношение Gcg-R/GLP-1-R активность коагониста. Сбалансированная активность Gcg и GLP-1 в контексте данного документа относится к соединению, которое имеет сродство к Gcg и GLP-1 рецепторам в *in vitro* анализ связывания, которое близко к 1:1, такому как 1:1 GLP-1/Gcg, 2:1 GLP-1/Gcg, 3:2 GLP-1/Gcg, 1:2 GLP-1/Gcg, или 2:3 GLP-1/Gcg. Исследование, проведенное авторами изобретения, показало, что длина, состав и положение жирной кислоты являются критическими для достижения сбалансированного

соотношения Gcg-R/GLP-1-R активность коагониста, которая является характеристичной для соединений по данному изобретению, а также влияния периода полувыведения плазмы, физической стабильности, растворимости и *in vivo* стабильности соединений по данному изобретению.

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

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

S2Aib замещение защищает пептид от деградации пептидазами, в частности, дипептидилпептидазой IV. S16E, R17K, R18K и Q20K замещения способны улучшить активность соединений по данному изобретению в *in vitro* исследованиях и на *in vivo* моделях животных. Замещения D21E и Q24E способны улучшать стабильность соединений по данному изобретению и модулировать активность *in vitro*. Замещение M27L способно защищать пептид от окисления остатка метионина. Замещение N28E способно улучшать растворимость соединений, содержащих это замещение. Замещение N28S также способно улучшить растворимость соединений, содержащих это замещение, но не в той же степени, что и замещение N28E. Однако растворимость соединений, включающих замещение N28S, может быть улучшена путем выбора подходящего линкера. Замещение аспарагинового

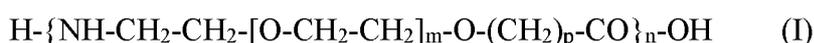
остатка в положении 28 исключает возможность дезамидирования, происходящего в этом положении.

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

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

В некоторых аспектах соединений по данному изобретению, С14-С24 жирная кислота представляет собой конъюгированную с эпсилон-аминогруппой боковой цепи лизина через линкер, где линкер выбран из группы, состоящей из:

(a) аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I:



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

- (b) аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu;
- (c) дипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;
- (d) трипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-

Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu;

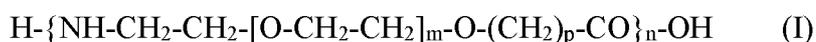
- (e) полипептида, выбранного из группы, состоящей из  $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$   $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$  и  $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_t$ , (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15; и
- (f) линкера конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I как указано в определении в (a) конъюгирован с:
- (i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu;
- (ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;
- (iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu; или
- (iv) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из  $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$   $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$  и  $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_t$ , (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub> и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3 и s равен целому числу от 4 до 15.

В предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению, линкер представляет собой аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I или линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I конъюгирован с аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6, m равен 1 и p равен 1.

В более предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению, линкер представляет собой аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I, или линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I конъюгирован с

аминокислотой, дипептидом, трипептидом или полипептидом, как указано в определении выше, где n равен 2, m равен 1 и p равен 1.

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



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

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

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

таким образом конъюгирован с C14-C24 жирной кислотой через линкер конъюгации как указано в определении выше.

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

Предпочтительные линкеры, содержащие мини-ПЭГ Формулы I, включают, но не ограничиваются ими, ([2-(2-аминоэтокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub> и 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту.

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

В более предпочтительных аспектах, аминокислота представляет собой  $\gamma$ -Glu.

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

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

В более предпочтительных аспектах линкер представляет собой  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

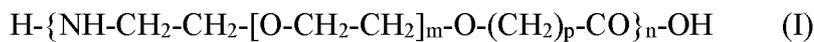
В некоторых аспектах, линкер представляет собой трипептид где аминокислоты трипептида независимо выбраны из группы, состоящей из: Ala,  $\beta$ -Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $\gamma$ -Abu),  $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu), 6-аминогексановой кислоты,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

В предпочтительных аспектах линкер представляет собой трипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu-

$\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu.

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

В предпочтительном аспекте линкер представляет собой линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I:



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

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

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

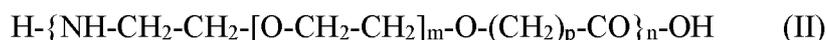
В более предпочтительном аспекте линкер содержит ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-( $\gamma$ -Glu)<sub>t</sub> (также называемый, как (AEEA)<sub>2</sub>-( $\gamma$ -Glu)<sub>t</sub>), где t равен 1 или 2. Жирная кислота и гама-глутаминовая кислота в линкере действуют как связывание альбумина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

Как показано в химических структурах Примеров 1-4, первая [2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетильная группа связана с эpsilon-аминогруппой боковой цепи лизина. Вторая [2-(2-Аминоэтоксид)-этоксид]-ацетильная группа затем присоединена к аминогруппе первой [2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетильной группы. Затем первая  $\gamma$ -Glu группа присоединена к аминогруппе второй [2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетильной группы через  $\gamma$ -карбоксильную группу боковой цепи. При t = 2 вторая  $\gamma$ -Glu группа присоединена к  $\alpha$ -аминогруппе первой  $\gamma$ -Glu группы через  $\gamma$ -карбоксильную группу боковой цепи. Наконец,

жирная кислота присоединена к  $\alpha$ -аминогруппе первой (когда  $t = 1$ ) или второй (при  $t = 2$ )  $\gamma$ -Glu группы.

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

Аналогично, когда линкер представляет собой линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I:



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

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

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

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

В соединениях по данному изобретению применяют C14-C24 жирную кислоту, химически конъюгированную с эпсилон-аминогруппой боковой цепи лизина, либо путем непосредственной связи, либо линкером. Термин «C14-C24 жирная кислота» в данном документе означает карбоновую кислоту с 14 и 24 атомами углерода. Пригодная для

применения в данном изобретении C14-C24 жирная кислота могут представлять собой насыщенную монокислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту. Под «насыщенной» подразумевается, что жирная кислотой не содержит двойных или тройных углерод-углеродных связей.

**ПРИМЕРЫ** специфических насыщенных жирных кислот C14-C24, которые являются пригодными для соединений и их применения, раскрытых здесь, включают, но не ограничиваются ими, миристиновую кислоту (тетрадекановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C14), тетрадекандикарбоновую кислоту (C14-дикарбоновую кислоту), пальмитиновую кислоту (гексадекановую кислоту) (C16-монокарбоновую кислоту), гексадекандикарбоновую кислоту (C16-дикарбоновую кислоту), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C17), гептадекандикарбоновую кислоту (C17-дикарбоновую кислоту), стеариновую кислоту (октадекановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C18), октадекандикарбоновую кислоту (C18-дикарбоновую кислоту), нонадециловую (C19-монокарбоновую кислоту), арахадиновую кислоту (эйкозановую кислоту) (C20-монокарбоновую кислоту), эйкозандикарбоновую кислоту (C20-дикарбоновую кислоту), гнейкозиловую кислоту (гнейкозановую кислоту) (монокислота C21), гнейкозандикарбоновую кислоту (C21 дикислоту), бегеновую кислоту (докозановую кислоту) (C22), докозандикарбоновую кислоту (C22-дикислоту), лигноцериновую кислоту (тетракозановую кислоту) (монокарбоновую кислоту C24), тетракозандикарбоновую кислоту (C24-дикарбоновую кислоту), включая их разветвленные и замещенные производные.

В предпочтительных аспектах соединений по данному изобретению, C14-C24 жирная кислота выбрана из группы, состоящей из насыщенной C14-монокарбоновой кислоты, насыщенной C14-дикарбоновой кислоты, насыщенной C16-монокарбоновой кислоты, насыщенной C16-дикарбоновой кислоты, насыщенной C18-монокарбоновой кислоты, насыщенной C18-дикарбоновой кислоты, насыщенной C19-дикарбоновой кислоты, насыщенной C20-монокарбоновой кислоты, насыщенной C20-дикарбоновой кислоты, насыщенной C22-дикарбоновой кислоты и их разветвленных и замещенных производных.

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

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

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

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

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

Соединения по данному изобретению обычно будут вводить парентерально. Парентеральное введение включает, например, системное введение, такое как внутримышечная, внутривенная, подкожная, внутрикожная или внутрибрюшинная инъекция. Предпочтительный способ введения представляет собой подкожную инъекцию. Соединение по данному изобретению, вводимое субъекту в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом в составе фармацевтической композиции для лечения диабета 2 типа, ожирения, NAFLD и/или NASH. Фармацевтическая композиция может представлять собой раствор или суспензию, такую как соединение, в котором соединение по данному изобретению образует комплекс с катионом двухвалентного металла, таким как цинк. Соединение по данному изобретению также может быть включено в состав в твердом виде, путем как

лиофилизации или распылительной сушки, который затем перед введением перерастворяется в растворе пригодных разбавителей. Пригодные фармацевтические носители могут содержать инертные компоненты, которые не взаимодействуют с пептидом или производным пептида. Пригодные фармацевтические носители для парентерального введения включают, например, стерильную воду, физиологический раствор, бактериостатический солевой раствор (физиологический раствор, содержащий около 0,9% мг/мл бензилового спирта), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Хэнкса, пилинг-лактат и тому подобное. Некоторые примеры пригодных эксципиентов включают лактозу, декстрозу, сахарозу, трегалозу, сорбит и маннит и консерванты, такие как фенол и м-крезол.

Могут применяться стандартные методы приготовления фармацевтической композиции, такие как описанные в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006), . Соединения по данному изобретению могут альтернативно быть приготовлены для введения буккальным, пероральным, трансдермальным, назальным или легочным путем.

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

Соединения по данному изобретению могут применять для лечения диабета, особенно диабета типа 2. К другим субъектам, которые могут получить благоприятный эффект от лечения соединениями по данному изобретению, относятся те, у которых нарушена толерантность к глюкозе или нарушенной гликемии натощак, субъекты, чья масса тела составляет примерно 25% или более выше нормальной массы тела для роста и тела субъекта, субъекты, имеющие одного или более родителей с диабетом типа 2, субъекты, у которых был гестационный диабет и субъекты с нарушениями обмена веществ, такими как нарушения, вызванные уменьшением эндогенной секреции инсулина. Соединения по данному изобретению могут быть применены для предотвращения у пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе развития диабета 2 типа, предотвращения деградации  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, индуцирования пролиферации  $\beta$ -клеток, улучшения  $\beta$ -клеточной функции, активации спящих  $\beta$ -клеток, содействия дифференциации клеток в  $\beta$ -клетки, стимуляции репликации  $\beta$ -клеток и

ингибировании апоптоза  $\beta$ -клеток. Другие заболевания и патологические состояния, которые могут быть вылечены или предотвращены с применением соединений по данному изобретению в способах по данному изобретению, включают: сахарный диабет взрослого типа у молодых (MODY) (Herman, et al., *Diabetes* 43:40, 1994); латентный аутоиммунный диабет у взрослых (LADA) (Zimmet, et al., *Diabetes Med.* 11:299, 1994); нарушение толерантности к глюкозе (IGT) (Комитет экспертов по классификации сахарного диабета, *Diabetes Care* 22 (Supp. 1):S5, 1999); нарушенную гликемию натощак (IFG) (Charles, et al., *Diabetes* 40:796, 1991); сахарный диабет при беременности (Metzger, *Diabetes*, 40:197, 1991); метаболический синдром X, дислипидемию, гипергликемию, гиперинсулинемию, гипертриглицеридемию и резистентность к инсулину.

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

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

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

с отсутствием лечения начало повышения уровня глюкозы в крови, требующего лечения антигипергликемическими препаратами, такими как сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, инсулин и/или бисуанидины.

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

Некоторые соединения по данному изобретению обычно эффективны в широком диапазоне доз. Например, дозировки для однократного приема дозы могут находиться в пределах от 0,05 до 30 мг на человека в неделю. Некоторые соединения по данному изобретению могут ежедневно дозироваться. Кроме того, определенные соединения по данному изобретению могут вводить каждые два раза в неделю, раз в неделю или ежемесячно.

«Субъект» является млекопитающим, предпочтительно человеком, но также может быть животным, включая животных-компаньонов (например, собак, кошек и т. п.), Сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т.п.) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и тому подобное).

В контексте данного документа, термин «лечение» или «лечение» включает сдерживание, замедление, остановку или отмену прогрессирования, или тяжести существующего симптома или разложения.

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

Клиренс представляет собой меру способности организма выводить лекарственное средство из кровообращения. Поскольку клиренс уменьшается из-за, например, изменений

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

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

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

Аминокислотные последовательности по данному изобретению содержат стандартные однобуквенные или трехбуквенные коды для двадцати встречающихся в природе аминокислот. Кроме того, «Aib» представляет собой альфа-амино изомасляную кислоту, «Abu» представляет собой аминомасляную кислоту, «Orn» представляет собой орнитин, «Cit» - цитруллин и «Sar» - саркозин

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

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

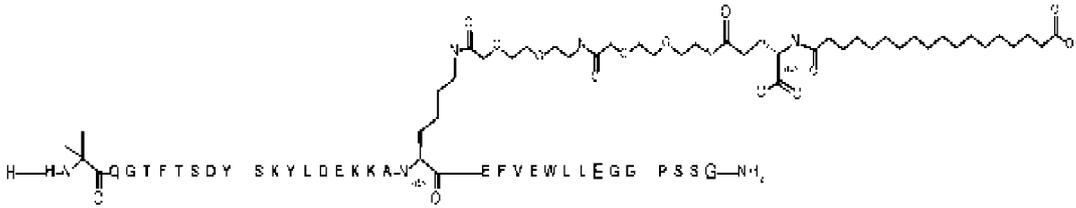
## **ПРИМЕР 1**

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

где Хаа2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)<sub>1</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CO<sub>2</sub>H; и

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



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

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

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

отношению к теоретической загрузке пептида и при конечной концентрации 0,18 М в ДМФА.

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

Последующее присоединение жирнокислотного фрагмента линкера осуществляют путем выполнения двух последующих конденсаций [2-(2-(Fmoc-амино)этокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH) (ChemPer, Inc. Веллингтон, Флорида; 3-кратный избыток аминокислоты (AA): 1-[бис (диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксид гексафторфосфата (НАТУ): N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) [1:1:5 моль/моль] в течение 3-часов времени конденсации) с последующей конденсацией  $\alpha$ -трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu) (Ark Pharm, Inc. Либертвилл, Иллинойс, 3-кратный избыток AA: НАТУ: DIPEA [1:1:5 моль/моль] в течение 3-часов времени конденсации). В каждом случае фрагмент Fmoc удаляют, как описано выше. Наконец, моно-OtBu-октадекандикарбоновую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) конденсировали со смолой в течение 18 часов с использованием 3-кратного избытка кислоты: НАТУ: DIPEA (1:1:5 моль/моль). После завершения синтеза пептидную смолу промыли дихлорметаном (ДХМ), диэтиловым эфиром и тщательно высушили воздухом, путем вакуумного всасывания в шприц в течение 5 минут. Сухую смолу обрабатывают коктейлем для расщепления (трифторуксусная кислота (ТФК): анизол: вода: триизопропилсилан, 88: 5: 5: 2 по объему) в течение 2 часов при комнатной температуре для высвобождения пептида из твердой подложки и удаляют все защитные группы боковой цепи. Смолу отфильтровывают, дважды промывают чистой ТФК, и объединенные фильтраты обрабатывают холодным диэтиловым эфиром для осаждения неочищенного пептида. Затем суспензию пептида/эфира центрифугируют при 4000 об/мин с образованием твердого осадка, декантируют супернатант и твердый осадок,

растирают с эфиром два раза и сушат в вакууме. Неочищенный пептид солюбилизируют в 20% ацетонитриле/воде и очищают обращено-фазной ВЭЖХ на препаративной колонке C8 (Luna, 21 x 250 мм, Phenomenex, Торранс, Калифорния) с линейными градиентами ацетонитрила и воды с использованием трех различных буферных систем:

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

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

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

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

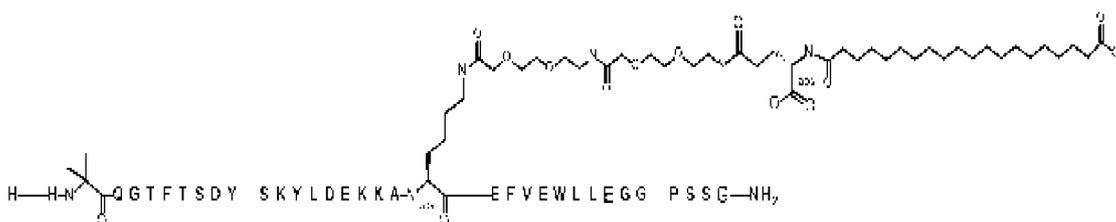
## ПРИМЕР 2

**NXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG**

где Xaa2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)<sub>1</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H; и

С-концевая аминокислота амидирована в виде С-концевого первичного амида (SEQ ID NO: 6).



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

Соединение 2 синтезируют как в Примере 1, за исключением того, что моно-OtBu-эйкозандикарбоновая кислота (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) конденсируют со смолой в течение 18 часов с использованием 3-кратного избытка AA: NATU: DIPEA (1: 1: 5 мол /моль), а не моно-OtBu-октадекандикарбоновой кислоты, как в Примере 1.

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

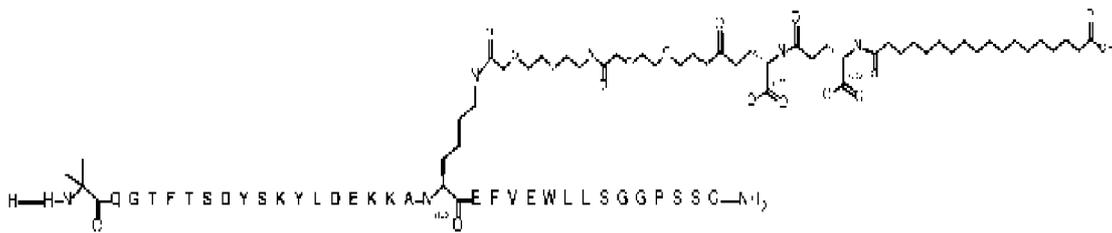
**ПРИМЕР 3**

НХaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

где Хаа2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CO<sub>2</sub>H; и

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



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

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

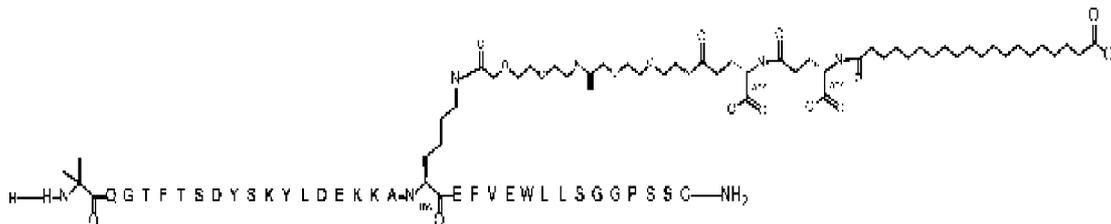
**ПРИМЕР 4**

НХaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

где Хаа2 представляет собой Aib;

К в положении 20 химически модифицирована путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи К с ([2-(2-Амино-этокси)-этокси]-ацетил)<sub>2</sub>-(γGlu)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>H; и

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



На приведенной выше диаграмме проиллюстрирована структура SEQ ID NO: 8 (именуемое в дальнейшем «Соединение 4») с использованием стандартного однобуквенного кода обозначения аминокислот, за исключением остатков Aib<sub>2</sub> и K<sub>20</sub>, где структуры этих аминокислот были расширены.

Соединение 4 синтезируют как в Примере 1, за исключением того, что моно-*Ot*Bu-эйкозандикарбоновая кислота (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) конденсировали со смолой в течение 18 часов с использованием 3-кратного избытка AA: HATU: DIPEA (1:1:5 моль/моль), а не моно-*Ot*Bu-октадекандикарбоновой кислотой, используемой в Примере 1. Дополнительно в цикл синтеза линкера добавляется дополнительная аминокислотная фракция Fmoc-Glu-*Ot*Bu.

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

## **ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

### **Вязкость**

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

- |     |                      |                                |
|-----|----------------------|--------------------------------|
| (a) | Ёмкость шприца:      | шприц 500 мкл                  |
| (b) | Скорость потока:     | скорость потока<br>100 мкл/мин |
| (c) | Средняя температура: | 25°C                           |
| (d) | Скорость сдвига:     | 1934 с <sup>-1</sup>           |

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

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

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

**Таблица 1: Данные о вязкости для соединений 1-4**

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

### **Растворимость**

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

- (a) ОБРАЩЕННО-ФАЗНАЯ ВЭЖХ: Waters Symmetry Shield C18, 3,6 мкм, 4,6 x 100 мм
- (b) ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ: Tosoh Biosciences, TSK2000<sub>SWXL</sub> 7,8 см x 30 мм

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

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

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

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

Растворимость соединений 1-4 измерялась по существу так, как описано в этом анализе. Данные растворимости для соединений 1-4 обобщены в Таблицах

2(a)-(d).

Таблица 2(а): Данные растворимости для соединения 1

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	<p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол (Т8m);</p> <p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол + 150 мМ NaCl (Т8Nm);</p> <p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(Т8Тm);</p> <p>10 мг/мл растворимость в ФСБ, рН 7,4;</p> <p>Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C;</p> <p>На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с ВМВ не наблюдали;</p> <p>Обращенно-фазовая ВЭЖХ подтверждает, что 10 мг/мл концентрация сохранялась в течение 1 недели исследования.</p>

Таблица 2(b): Данные растворимости для соединения 2

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	<p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол (Т8m);</p> <p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол + 150 мМ NaCl (Т8Nm);</p> <p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(Т8Тm);</p> <p>10 мг/мл растворимость в ФСБ, рН 7,4;</p> <p>Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C;</p> <p>На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с ВМВ не наблюдали;</p> <p>Обращенно-фазовая ВЭЖХ подтверждает, что 10 мг/мл концентрация сохранялась в течение 1 недели исследования</p>

Таблица 2(c): Данные растворимости для соединения 3

ПАРАМЕТР	СУЩНОСТЬ
Растворимость/Растворение	<p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол (Т8m);</p> <p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол + 150 мМ NaCl (Т8Nm);</p> <p>10 мг/мл растворимость в Трис рН 8 + 3мг/мл м-крезол + 0,02% Твин-20(Т8Тm);</p> <p>10 мг/мл растворимость в ФСБ, рН 7,4;</p> <p>Не наблюдали никакого видимого осаждения или разделения фаз после хранения в течение 1 недели при 4°C;</p> <p>На эксклюзионной ВЭЖХ образования частиц с ВМВ не наблюдали;</p>

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

Таблица 2(d): Данные растворимости для соединения 4

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

### IN VITRO ФУНКЦИЯ

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

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

#### Анализ связывания hGLP-1R

Анализ связывания с GLP-1 рецептором использует клонированные hGLP-1-R (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196(1): 141-6, 1993), выделенные из клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hGLP-1R. кДНК hGLP-1R субклонировуют в экспрессию плазмиды pH<sub>D</sub> (транс-активированная экспрессия полностью гамма-карбоксилированного

рекомбинантного человеческого белка С, антитромботического фактора. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. и Yan, S.B. *Bio/Technology* 5:1189-1192, 1987). Указанную плазмидную ДНК трансфицируют в клетки 293НЕК и выбирают с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

Сырые плазменные мембраны получают с использованием клеток из адгезивной культуры. Клетки лизируют на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 мМ Трис НСl, рН 7,5 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ с ЭДТА. Остаточная клеточная суспензия разрушается с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пептидом Teflon® для 25 ударов. Гомогенат центрифугируют при 4 °С при 1100 × g в течение 10 минут. Супернатант собирали и хранили на льду, в то время как осадок ресуспендировали в гипотоническом буфере и повторно гомогенизировали. Смесь центрифугируют при 1100 × g в течение 10 минут. Второй супернатант в сочетании с первым супернатантом и центрифугировали при 35000 × g в течение 1 часа при 4 °С. Мембранный осадок ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеазы, быстро замораживают в жидком азоте и хранят в виде аликвот в морозильнике -80 °С до использования.

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

Анализ связывания рецептора проводят с использованием формата сцинтилляционного анализа сближения (SPA) с гранулами агглютинина (W<sub>kin</sub>) из пшеничного зародыша (Perkin Elmer). Буфер связывания содержит 25 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислоту (HEPES), рН 7,4, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (мас./об.) бацитрацин (Affymetrix), 0,003% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбитан монолаурат (ТВИН®-20) и ингибиторы протеазы Roche Complete™ без ЭДТА. GLP-1 растворяют в ДМСО при 0,339 мг/мл (0,1 мМ) и хранят в замороженном состоянии при -20 °С в аликвотах по 100 мкл. Аликвоту GLP-1 развели и использовали в анализе связывания в течение часа. Пептидный аналог растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) и в 3 раза последовательно разбавляют в 100% ДМСО. Затем 5 мкл последовательно разбавленного Соединения или ДМСО переносят в чистые аналитические планшеты Corning® 3632, содержащие 45 мкл аналитического буфера связывания или немеченого контроля GLP-1 (неспецифическое связывание (NSB) с конечной 0,25 мкМ). Затем добавляют 50 мкл hGLP-1R-мембран (0,5 мкг/лунку), 50 мкл I-125 GLP-1 (0,15 нМ) и 50 мкл шариков WGA (150

мкг/лунка), планшеты герметизируют и перемешивают шейкер (установка б) в течение 1 минуты. Планшеты читают с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta<sup>®</sup> после 12 часов времени отстаивания при комнатной температуре.

Результаты рассчитывают, как процент специфического связывания I-125-GLP-1 в присутствии соединения. Абсолютная IC<sub>50</sub> концентрация соединения получена путем нелинейной регрессии процентного удельного связывания I-125-GLP-1 с концентрацией связанного соединения. Концентрация IC<sub>50</sub> преобразуется в K<sub>i</sub> с использованием уравнения Ченга-Прусоффа (Cheng, Y., Prusoff, W. H., *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108, (1973)).

K<sub>i</sub> соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> на hGLP-1-R показаны в Таблице 3 ниже. Число копий (n) указано в скобках. А (>) указывает, что уровень ингибирования не достигает 50%, и расчетный K<sub>i</sub> получается с использованием самой высокой концентрации. n = 1/n указывает, что средние значения не вычисляются, когда все значения имеют знак> и указанное значение равно наивысшему вычисленному значению.

**Таблица 3: K<sub>i</sub> соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> на hGLP-1-R**

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

#### Анализ связывания hGcg-R

Анализ связывания рецептора Gcg использует клонированный hGcg-R (Lok, S, *et al.*, *Gene* 140 (2), 203-209 (1994)), выделенный из клеток 293НЕК, сверхэкспрессирующих рекомбинантный hGcg-R. кДНК hGcg-R субклонировуют в экспрессионную плазмиду рhD (транс-активированная экспрессия полностью гамма-карбоксилированного

рекомбинантного человеческого белка С, антитромботического фактора. Grinnell, B.W., *et. al.*, *Bio/Technology* 5: 1189-1192 (1987)). Указанную плазмидную ДНК трансфицируют в клетки 293НЕК и выбирают с помощью 200 мкг/мл гигромицина.

Сырые плазменные мембраны получают с использованием клеток из адгезивной культуры. Клетки лизируют на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 мМ Трис НСl, рН 7,5 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ с ЭДТА. Остаточная клеточная суспензия разрушается с использованием стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пептидом Teflon® для 25 ударов. Гомогенат центрифугируют при 4 °С при  $1100 \times g$  в течение 10 минут. Супернатант собирали и хранили на льду, в то время как осадок ресуспендировали в гипотоническом буфере и повторно гомогенизировали. Смесь центрифугируют при  $1100 \times g$  в течение 10 минут. Второй супернатант в сочетании с первым супернатантом и центрифугировали при  $35000 \times g$  в течение 1 часа при 4 °С. Мембранный осадок ресуспендируют в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеазы, быстро замораживают в жидком азоте и хранят в виде аликвот в морозильнике -80 °С до использования.

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

Анализ связывания рецептора проводят с использованием формата анализа сцинтилляционного сближения (SPA) с гранулами агглютинина (Wkin) из пшеничного зародыша (Perkin Elmer). Буфер связывания содержит 25 мМ HEPES, рН 7,4, 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (мас./об.) бацитрацина (Affymetrix), 0,003% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбин монолаурата (ТВИН®-20) и Roche Complete™ Ингибиторы протеазы без ЭДТА. Gcg растворяют в ДМСО при 3,48 мг/мл (1 мМ) и хранят в замороженном состоянии при -20 °С в аликвотах по 100 мкл. Аликвоту Gcg развели и использовали в анализе связывания в течение часа. Аналог пептида растворяют в ДМСО и в 3 раза последовательно разбавляют в 100% ДМСО. Затем 5 мкл последовательно разбавленное соединение или ДМСО переносят в чистые аналитические планшеты Corning® 3632, содержащие 45 мкл анализирующего связывания буфера или немеченого контроля Gcg (NSB на конечную концентрацию 1 мкМ). Затем добавляют 50 мкл hGcg-R мембран (0,5 мкг/лунку), 50 мкл I-125 Gcg (0,15 нМ в реакции) и 50 мкл шариков WGA (150 мкг/лунку), планшеты закрывают и перемешивают на (установка б) в течение 1 минуты.

Планшеты считывают с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после 12 часов времени отстаивания при комнатной температуре.

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

**Таблица 4: K<sub>i</sub> соединений 1-4, человеческого Gcg и человеческого GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> для hGcg-R**

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

#### **Функциональные анализы hGLP-1-R и hGcg-R**

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

Каждую клеточную линию, экспрессирующую рецептор, обрабатывают пептидом в DMEM (модифицированная Eulle Medium, Gibco кат. № 31053), дополненную 1X

GlutaMAX™ (L-аланил-L-глутамин дипептидом в 0,85% NaCl, Gibco кат. № 35050), 0,25% ФБС (диализованная фетальная бычья сыворотка, Gibco кат. № 26400), 0,05% фракции V BSA (фракция бычьего альбумина V, Gibco Cat # 15260), 250 мкМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин) и 20 мМ HEPES [N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота), HyClone кат. № SH30237,01] в объеме анализа 40 мкл. После 60-минутной инкубации при комнатной температуре получили увеличение внутриклеточного цАМФ (аденозин 3',5'-циклический монофосфат) количественно определяют с использованием набора для анализа CISBio HTRF 2 набор для динамического анализа цАМФ (62AM4PEJ). Уровни цАМФ внутри клетки обнаруживают добавлением конъюгата цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (20 мкл), а затем прибавляли антитело анти-цАМФ-Eu<sup>3+</sup>-криптата, также в буфере для лизиса клеток (20 мкл). Полученный конкурентный анализ инкубируют в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре, затем детектируют с использованием прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и эмиссией при 665 нм и 620 нм. Единицы измерения (излучение при 665 нм/620 нм \* 10 000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием стандартной кривой цАМФ. Количество произведенной цАМФ (нМ) в каждой лунке преобразуется в процент от максимального ответа, наблюдаемого с помощью 10 нМ человеческого GLP-1 (7-36) NH<sub>2</sub> или 10 нМ человеческого Gcg.

Относительное значение EC<sub>50</sub> и верхний процент (E<sub>max</sub>) получают путем нелинейного регрессионного анализа с использованием процентного максимального отклика по сравнению с концентрацией добавляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами (Genedata Screener®).

Функциональные данные для соединений 1-4, человеческого GLP-1 (7-36) NH<sub>2</sub>, человеческого Gcg и человеческого ОХМ дикого типа показаны в Таблице 5 ниже. Среднее для EC<sub>50</sub> выражаются как геометрические средние ± стандартная ошибка среднего (SEM) с количеством повторений (n), указанных в скобках. Средние для E<sub>max</sub> выражаются как арифметическое среднее ± стандартная ошибка. Нет данных означает, что активность агониста не обнаружена. Все показанные значения равны трем (3) значащим цифрам.

**Таблица 5: Функциональная активность (EC<sub>50</sub>) и эффективность (E<sub>max</sub>) для соединений 1-4 человека GLP- (7-36)NH<sub>2</sub>, человеческого Gcg и человеческого ОХМ дикого типа**

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

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

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

Производительность анализа требует отслоения клеток из культуральных колб с использованием ферментного стримера без клеток и осажденного центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. Клетчатый осадок ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (EBSS), дополненном 11,2 мМ глюкозы и 0,1% BSA. 40 мкл клеточной суспензии с плотностью 1x10<sup>6</sup>/мл помещают в 96-луночные половинные черные планшеты (Costar 3875) и инкубируют при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 2 часов для восстановления и голодания. Последовательные разведения тестовых соединений получают при 100% конечной концентрации теста в 100% ДМСО и дополнительно разводят в 20 раз в EBSS, дополненном 11,2 мМ глюкозы, 0,1%

БСА и 1,25 мМ IBMX (Sigma I-7816). После 2 часов голодания клетки обрабатывают соединением, добавляя 10 мкл разведения 5X соединений в клеточные планшеты ( $n = 2$ ) и инкубируют в инкубаторе 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 минут.

Концентрация цАМФ, измеренная с использованием набора для анализа цАМФ HTRF (Cisbio): конъюгат цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (20 мкл), а затем прибавляли также в буфере для лизиса клеток (20 мкл) к ячейкам планшета прибавляли антитело анти-цАМФ-Eu<sup>3+</sup>-криптата. Полученный конкурентный анализ инкубируют в течение по меньшей мере 60 минут при комнатной температуре и затем детектируют с использованием прибора PerkinElmer Envision® с возбуждением при 320 нм и испускании при 665 нм и 620 нм. Единицы измерения (излучение при 665 нм/620 нм \* 10000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием стандартной кривой цАМФ.

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

Относительное значение EC<sub>50</sub> и верхний % (% E<sub>max</sub>) получают путем нелинейного регрессионного анализа с использованием процентного максимального отклика по отношению к концентрации добавляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами (программное обеспечение GraphPad Prism (Version 6,05)). Анализ проводят с использованием дублированных планшетов. Число копий ( $n$ ) указано в скобках.

EC<sub>50</sub> и % E<sub>max</sub> для человеческого ОХМ дикого типа, семаглутида и соединения 1 и 2 были рассчитаны, как описано выше. Данные EC<sub>50</sub> и % E<sub>max</sub> для этих соединений приведены в Таблице 6. Кроме того, соединения 1 и 2 увеличивают производство цАМФ дозозависимым образом (данные не проиллюстрированы).

**Таблица 6: EC<sub>50</sub> человеческого ОХМ дикого типа, для семаглутида и Соединений 1 и 2 на крысе GLP-1-R в линии клеток инсулиномы INS1 832-3**

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

### **Функциональная активация hGcg-R в первичных гепатоцитах человека**

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

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

Плотность клеток рассчитывают на гемоцитометре, добавляя 100 мкл клеточной суспензии к 100мкл Trypan Blue (HyClone Trypan Blue 0,04%, номер каталога SV30084,01). Клеточную суспензию далее разбавили в среде для планшетов до конечной плотности клеток 0,8 × 10<sup>6</sup> клеток на мл. В каждую лунку 96-луночного планшета с коллагеновым покрытием (Corning BioCoat, номер по каталогу 354649, лот № 22314033) добавляли 65 мл среды для планшетов. Затем к каждой лунке 96-луночного планшета с коллагеновым покрытием добавляли 65 мл клеточной суспензии до конечной плотности клеток 50 000 клеток на лунку. Планшет с клетками инкубируют в инкубаторе 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 3-4 часов.

После 3-4 часов инкубации среду отсасывают и заменяют 100 мл поддерживающей средой. Поддерживающую среду готовят путем добавления всего содержимого пакетов

добавки CM4000 к 500 мл среде Вильямса (Gibco/Life Technologies) с последующей стерильной фильтрацией через мембрану 0,22 мкм. Планшет с клетками возвращают в 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>-инкубатор в течение ночи при подготовке к анализу цАМФ.

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

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

Концентрация цАМФ, измеренная с использованием набора для анализа цАМФ HTRF (Cisbio): конъюгат цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (40 мкл) с последующей обработкой антителом анти-цАМФ-Eu<sup>3+</sup>-криптата, также прибавили в буфере для лизиса клеток (40 мкл) к клеткам в планшете. Полученный конкурентный анализ инкубируют в течение по меньшей мере 60 минут при комнатной температуре, затем детектируют с использованием прибора PerkinElmer Envision<sup>®</sup> с возбуждением при 320 нм и эмиссией при 665 нм и 620 нм. Единицы измерения (излучение при 665 нм/620 нм \* 10000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ и преобразуются в нМ цАМФ на лунку с использованием стандартной кривой цАМФ.

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

Относительное значение EC<sub>50</sub> и верхний % (% E<sub>max</sub>) выводится с помощью нелинейного регрессионного анализа с использованием процентного максимального отклика по сравнению с концентрацией добавляемого пептида, адаптированного к логистическому уравнению с четырьмя параметрами (программное обеспечение GraphPad Prism (Version 6,05)).

EC<sub>50</sub> и уровень E<sub>max</sub> для соединений 1 и 2 и человеческого ОХМ дикого типа были рассчитаны по существу так, как описано выше. Данные EC<sub>50</sub> и % E<sub>max</sub> для этих соединений представлены в Таблице 7. Кроме того, соединения 1 и 2 увеличивают продуцирование цАМФ дозозависимым образом (данные не проиллюстрированы). Число копий (n) указано в скобках.

**Таблица 7:** EC<sub>50</sub> соединений 1 и 2 и человеческого ОХМ дикого типа на hGcg-R в первичных гепатоцитах человека

Соединение	EC <sub>50</sub> (нМ)	E <sub>max</sub> (%)
Человеческий ОХМ дикого типа	29,8 (n=1)	90,0
Соединение 1	99,9 (n=1)	100,0
Соединение 2	159,4 (n=1)	101,2

## **ФАРМАКОКИНЕТИКА**

### **Фармакокинетика у яванских макак**

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

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

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

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

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

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

**Таблица 8: Индивидуальные и среднее фармакокинетические параметры после однократной подкожной дозы 50 нмоль/кг соединения 1 самцам яванских макак**

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

Условные сокращения: AUC<sub>0-inf</sub> = площадь под кривой от 0 до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность, T<sub>max</sub> = время для достижения максимальной концентрации, C<sub>max</sub> = максимальная концентрация в плазме, T<sub>1/2</sub> = время полужизни.

**Таблица 9: Индивидуальные и средние фармакокинетические параметры Соединения 2 после однократной внутривенной или подкожной дозы для самцов яванских макак**

Соединение/Пу ть/ Доза	Идентификационн ый номер животного	$T_{1/2}$ (час )	$T_{max}$ (час )	$C_0$ или $C_{max}$ (нмоль/ л)	$AUC_{0-inf}$ (ч*нмоль/ л)	$CL/F$ (мл/ч/к г)
Соединение 2: IV 50нмоль/кг	I07772	88	NA	1017	94828	0,53
	I07773	131	NA	1105	93174	0,54
	Среднее	110	NA	1061	94001	0,53
Соединение 2: SC 50нмоль/кг	I07764	137	24	474	100967	0,50
	I07765	106	24	452	82792	0,60
	Среднее	122	24	463	91879	0,55
Соединение 2: SC 250нмоль/кг	I07766	115	12	3640	429859	0,58
	I07767	104	12	3615	540175	0,46
	Среднее	110	12	3628	485017	0,52

Условные сокращения:  $AUC_{0-inf}$  = площадь под кривой от 0 до бесконечности,  $CL$  = клиренс,  $CL/F$  = клиренс/биодоступность,  $T_{max}$  = время для достижения максимальной концентрации,  $C_0$  = концентрация, экстраполированная ко времени 0 часов,  $C_{max}$  = максимальная концентрация в плазме,  $T_{1/2}$  = время полужизни, NA = неприменимо.

## IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

минут после пероральной глюкозы. В каждый момент времени сообщается среднее значение двух показаний глюкозы и вычисляется площадь под кривой. Статистика анализировалась с использованием ANOVA с критерием Даннетта JMP 6; значимость обозначается при  $p \leq 0,05$  в сравнении с несущей средой.

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

**Таблица 10: Площадь под кривой глюкозы для самцов мышей DIO, которых лечили соединением 2 и Семаглутидом в ответ на OGTT (2 г/кг)**

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

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

\*  $p \leq 0,05$

**Мыши DIO, обработанные OGTT в стрептозотоцине (STZ)** Модель STZ-обработанной мыши представляет собой модель раннего диабета. В этом исследовании используются пяти-шестимесячные мыши DIO (C57BL/6) из Taconic Biosciences. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24 °C) объекте с 12-часовым светом/темным циклом (освещение с 6:00) и свободным доступом к пище и воде. После двухнедельной акклиматизации к объекту мышам внутрибрюшинно вводят 50 мг/кг СТЗ во вторник и в пятницу. Через две недели после инъекции для исследования OGTT выбраны животные с уровнем глюкозы между 180-300 мг/дл в 09:00. За день до исследования животные рандомизируют в группы по массе тела и уровням глюкозы. Животных обрабатывают несущей средой или исследуемым соединением путем подкожной инъекции непосредственно перед удалением пищи в течение ночи (16:00). На следующее утро в 08:00,

через 16 часов после инъекции, производят забор крови для измерения нулевого уровня глюкозы. Животным дают пероральную дозу глюкозы 2 г/кг. Глюкозу измеряют через 15, 30, 60 и 120 минут после пероральной проблемы с глюкозой. Статистика анализируется с использованием ANOVA с критерием Даннетта по JMP 6. Значение обозначается при  $p \leq 0,05$  по сравнению с несущей средой.

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

**Таблица 11: Площадь под кривой глюкозы самцов STZ мышей, обработанных соединением 2 и семаглутидом, в виде отклика на OGTT (2г/кг)**

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

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

\*  $p \leq 0,05$

**Гликемический контроль у мышей DIOB** этом исследовании используются пятишестимесячные мыши DIO (C57BL/6) из Taconic Biosciences. Животные индивидуально размещены в контролируемом температурой (24 °C) объекте с 12-часовым светом/темным циклом (освещение с 6:00) и свободным доступом к пище и воде. После двухнедельной акклиматизации к объекту мышей рандомизируют в группы лечения ( $n = 7$ /группа) в зависимости от их массы тела и уровня глюкозы в крови. Мышам подкожно вводят один раз несущую среду или соединения (25 нмоль/кг). Уровень глюкозы в крови контролируется через 2 и 8 часов после инъекции и затем один раз в день в 08:00 на 4 дня. OGTT выполняются в течение 44 и 78 часов после инъекции пептида. Статистика

анализируется с использованием ANOVA с критерием Даннетта по JMP 6. Значение обозначается при  $p \leq 0,05$  по сравнению с несущей средой.

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

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

**Таблица 12: Уровень глюкозы в крови, измеренный через 2, 8, 24, 48, 72 и 96 часов после инъекции у самцов мышей ДЮ**

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

**Таблица 13: Изменения глюкозы во время OGTT в 44 часа и 78 часов после инъекции соединения**

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

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

\*  $p \leq 0,05$

### Долговременное лечение мышей DIO

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

$100 \times$  (конечная масса тела животного – исходная масса тела животного)

исходная масса тела животного

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

**Таблица 14: % Изменение массы тела и % изменение жира в организме у мышей DIO**

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

\* p ≤ 0,05

**Острое лечение у мышей DIO**

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

В экспериментах, проведенных, по существу, как описано в анализе, соединения 1-3 снижают уровень холестерина в сыворотке и уровни PCSK9 и увеличивают уровни FGF-21, как показано в Таблице 15. Напротив, лечение семаглутидом не снижает уровень холестерина в сыворотке и PCSK9 и увеличивает FGF-21 уровень. Потребление пищи было

снижено до уровня, аналогичного уровню во всех группах лечения, что может указывать на то, что изменения в холестерине, PCSK9 и FGF-21 являются независимыми от приема пищи.

**Таблица 15:** Кратковременные эффекты на уровни PCSK9, FGF-21 и холестерина

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

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

\*  $p \leq 0,05$

### Влияние на потребление энергии у мышей DIO

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

Тепло и дыхательный фактор (RER) измеряются косвенной калориметрией, как описано с использованием системы калориметрии с открытым контуром. RER представляет собой соотношение объема производимого CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>) к объему потребляемого O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>). Тепло рассчитывается с учетом сухой массы тела. Расход энергии составляет ккал/кг/ 3 день и выражается как среднее  $\pm$  SEM 6 мышей на группу. Статистическую значимость оценивают с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим многократным сравнительным тестом Тьюки.

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

**Таблица 16: Влияние длительного лечения соединением 1, соединением 2 или семаглутидом на скорость метаболизма у мышей DIO**

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

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

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

**АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ****SEQ ID NO: 1 (Человеческий OXM)**

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

**SEQ ID NO: 2 (Искусственная последовательность)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

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

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

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

**SEQ ID NO: 3 (Искусственная последовательность)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGPPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

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

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

**SEQ ID NO: 4 (Искусственная последовательность)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGPPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

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

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

**SEQ ID NO: 5 (Искусственная последовательность)**

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

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO<sub>2</sub>H; и

C-концевая аминокислота амидирована.

**SEQ ID NO: 6 (Искусственная последовательность)**

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

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO<sub>2</sub>H; и

C-концевая аминокислота амидирована.

**SEQ ID NO: 7 (Искусственная последовательность)**

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

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO<sub>2</sub>H; и

C-концевая аминокислота амидирована.

**SEQ ID NO: 8 (Искусственная последовательность)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации эpsilon-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)<sub>2</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CO<sub>2</sub>H; и

C-концевая аминокислота амидирована.

**SEQ ID NO: 9 (Искусственная последовательность)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib;

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

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

**SEQ ID NO: 10 (Искусственная последовательность)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLLEGGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib; и

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

**SEQ ID NO: 11 (Искусственная последовательность)**

-----His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly  
(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

где Xaa2 представляет собой Aib; и

C-концевая аминокислота необязательно амидирована.

## ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представляющее собой агонист рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкагона (Gcg), следующей формулы:

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

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

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

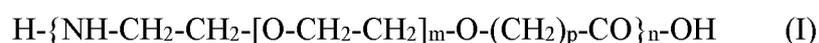
C-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 2);

или его фармацевтически приемлемая соль,

причем линкер не является ([2-(2-аминоэтоксид)-этоксид]-ацетил)<sub>2</sub>-(γ-Glu)<sub>t</sub>, где t равен 1 или 2.

2. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где Xaa28 представляет собой Glu.
3. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где Xaa28 представляет собой Ser.
4. Соединение по любому из пп. 1-3, или его фармацевтически приемлемая соль, где Lys в положении 20 химически модифицирован путем конъюгации с C14-C24 жирной кислотой через линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой.
5. Соединение по любому из предшествующих пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер выбран из группы, состоящей из:

- (а) аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I:



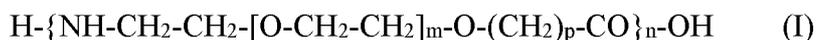
где  $m$  равен любому целому числу от 1 до 12,  $n$  равен любому целому числу от 1 до 12, и  $p$  равен 1 или 2;

- (b) аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из аргинина (Arg), аспарагина (Asn), аспарагиновой кислоты (Asp), глутамина (Gln), глутаминовой кислоты (Glu), гистидина (His), лизина (Lys), серина (Ser), треонина (Thr), цитруллина (Cit), орнитина (Orn), саркозина (Sar), глицина (Gly),  $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $\gamma$ -Abu) и  $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu);
- (c) дипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu)- $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu), Glu- $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu),  $\gamma$ -глутаминовой кислоты ( $\gamma$ -Glu)-Glu,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $\gamma$ -Abu)- $\gamma$ -аминомасляной кислоты ( $\gamma$ -Abu), 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;
- (d) трипептида, выбранного из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu;
- (e) полипептида, выбранного из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)<sub>q</sub> (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub> и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub>, (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где  $q$  равен целому числу от 2 до 5,  $r$  равен целому числу от 1 до 3, и  $s$  равен целому числу от 4 до 15; и
- (f) линкера конъюгации, где аминокполиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I как указано в определении в (a) конъюгирован с:
- (i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu;
- (ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,

Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

- (iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu; или
- (iv) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)<sub>q</sub> (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub> и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub>, (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15.

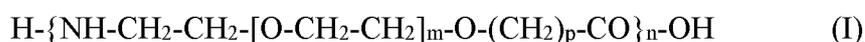
6. Соединение по п. 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I:



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

7. Соединение по п. 6 или его фармацевтически приемлемая соль, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6 и m равен 1 и p равен 1 для аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I.
8. Соединение по п. 6 или 7 или его фармацевтически приемлемая соль, где n равен 2, m равен 1 и p равен 1 для аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I.
9. Соединение по п. 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu.
10. Соединение по п. 9 или его фармацевтически приемлемая соль, где аминокислота представляет собой  $\gamma$ -Glu.

11. Соединение по п. 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты, 5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты.
12. Соединение по п. 11 или его фармацевтически приемлемая соль, где дипептид представляет собой  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.
13. Соединение по п. 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой трипептид, выбранный из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu.
14. Соединение по п. 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)<sub>q</sub> (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub> и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub>, (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15.
15. Соединение по п. 5 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой линкер конъюгации, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат  
Формулы I:



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

- (i) аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly,  $\gamma$ -Abu и  $\gamma$ -Glu;
- (ii) дипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu, 6-аминогексановой кислоты-6-аминогексановой кислоты,

5-аминовалериановой кислоты-5-аминовалериановой кислоты, 7-аминогептановой кислоты-7-аминогептановой кислоты и 8-аминооктановой кислоты-8-аминооктановой кислоты;

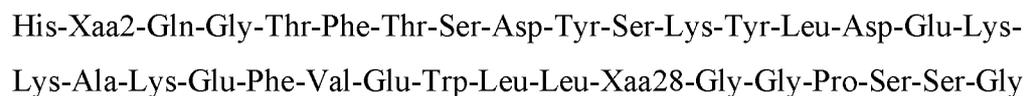
- (iii) трипептидом, выбранным из группы, состоящей из Ala-Ala-Ala,  $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala- $\beta$ -Ala, Glu-Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Glu- $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Glu- $\gamma$ -Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly- $\gamma$ -Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly, Gly- $\gamma$ -Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro и  $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu- $\gamma$ -Abu; или
- (iv) полипептидом, выбранным из группы, состоящей из (Gly-Gly-Ser)<sub>q</sub> (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub> и (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>r</sub>, (6-аминогексановой кислоты)<sub>s</sub>, (5-аминовалериановой кислоты)<sub>s</sub>, (7-аминогептановой кислоты)<sub>s</sub>, и (8-аминооктановой кислоты)<sub>s</sub>, где q равен целому числу от 2 до 5, r равен целому числу от 1 до 3, и s равен целому числу от 4 до 15.

16. Соединение по п. 15 или его фармацевтически приемлемая соль, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6 и m равен 1 и p равен 1 для аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I.
17. Соединение по п. 15 или 16 или его фармацевтически приемлемая соль, где n равен 2, m равен 1 и p равен 1 для аминополиэтиленгликолькарбоксилата Формулы I.
18. Соединение по любому из пп. 15-17 или его фармацевтически приемлемая соль, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I конъюгирован с аминокислотой, где аминокислота представляет собой  $\gamma$ -Glu.
19. Соединение по любому из пп. 15-17 или его фармацевтически приемлемая соль, где аминополиэтиленгликолькарбоксилат Формулы I конъюгирован с дипептидом, где дипептид представляет собой  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.
20. Соединение по любому из предшествующих пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту.
21. Соединение по п. 20 или его фармацевтически приемлемая соль, где жирная кислота представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту или насыщенную дикарбоновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из миристиновой кислоты (тетрадекановой кислоты) (C14 монокарбоновой кислоты), тетрадекандикарбоновой кислоты (C14-дикарбоновой кислоты), пальмитиновой кислоты (гексадекановой

кислоты) (монокарбоновой кислоты C16), гексадекандикарбоновой кислоты (C16-дикарбоновой кислоты), маргариновой кислоты (гептадекановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C17), гептадекандикарбоновой кислоты (дикарбоновой кислоты C17), стеариновой кислоты (октадекановой кислоты) (C18 монокарбоновой кислоты), октадекандикарбоновой кислоты (C18-дикарбоновой кислоты), нонадециловой кислоты (нонадекановой кислоты) (C19 монокарбоновой кислоты), нонадекандикарбоновой кислоты (C19-дикарбоновой кислоты), арахадиновой кислоты (эйкозановой кислоты) (C20 монокарбоновой кислоты), эйкозандикарбоновой кислоты (C20-дикарбоновой кислоты), гнейкозиловой кислоты (гнейкозановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C21), гнейкозандикарбоновой кислоты (C21-дикарбоновой кислоты), бегеновой кислоты (докозановой кислоты) (C22), докозандикарбоновой кислоты (C22-дикарбоновой кислоты), лигноцериновой кислоты (тетракозановой кислоты) (монокарбоновой кислоты C24) и тетракозандикарбоновой кислоты (C24-дикарбоновой кислоты).

22. Соединение по п. 20 или 21 или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота представляет собой октадекандикарбоновую кислоту.
23. Соединение по п. 20 или 21 или его фармацевтически приемлемая соль, где C14-C24 жирная кислота представляет собой эйкозандикарбоновую кислоту.
24. Соединение по любому из предшествующих пунктов или его фармацевтически приемлемая соль, где C-концевая аминокислота амидирована.
25. Фармацевтическая композиция для лечения диабета типа 2, ожирения, безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и/или безалкогольного стеатогепатита (NASH), причем композиция содержит соединение по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.
26. Способ лечения диабета типа 2 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли.
27. Способ лечения ожирения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли.

28. Способ лечения безалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли.
29. Способ лечения безалкогольного стеатогепатита (NASH) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли.
30. Способ индуцирования нетерапевтической потери веса у субъекта, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли.
31. Применение соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения диабета типа 2.
32. Применение соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения ожирения.
33. Применение соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения неалкогольной жирной болезни печени (NAFLD).
34. Применение соединения по любому из пп. 1-24 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения безалкогольного стеатогепатита (NASH).
35. Способ производства соединения формулы:



где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser;

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

C-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 2), заявленный способ включает стадии:

(i) модифицирования соединения формулы:

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

где

Xaa2 представляет собой Aib;

Xaa28 представляет собой Glu или Ser; и

C-концевая аминокислота необязательно амидирована (SEQ ID NO: 9)

путем конъюгации с эpsilon-аминогруппой боковой цепи Lys в положении 20 соединения с C14-C24 жирной кислотой, необязательно через линкер.

36. Способ по п. 35, где Lys в положении 20 промежуточного соединения химически модифицирован путем конъюгации с C14-C24 жирной кислотой через линкер между Lys в положении 20 и C14-C24 жирной кислотой.

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X20637	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2016/037818	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 16 June 2016 (16-06-2016)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 22 June 2015 (22-06-2015)
Applicant  ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/037818

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/US2016/037818

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. A61K38/00 A61K38/26 C07K14/605 C07K14/00 A61P3/00  
 A61P1/00  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61K C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/094337 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]; MAT TAO [U] 4 August 2011 (2011-08-04) paragraphs [0087], [0099], [00237], [00290], [00558]; claims 13-15,36,57,282,286; sequences 900, 901,908, 926 -----	1-44
X	CA 2 852 177 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]) 23 December 2009 (2009-12-23) examples 6,16; table 3; sequence 526 -----	1-44
X	WO 2013/074910 A1 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]) 23 May 2013 (2013-05-23) paragraphs [0017], [0195], [00208], [00377]; sequence 526 ----- -/--	1-44

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search <b>8 August 2016</b>	Date of mailing of the international search report <b>23/08/2016</b>
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <b>Zellner, Eveline</b>
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2016/037818

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/004983 A1 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]; BLOOM STEPHEN ROBERT [GB]) 10 January 2013 (2013-01-10) page 4, line 21 - page 9, line 26; sequences 1, 44	1-44
X	----- WO 2014/152460 A2 (UNIV INDIANA RES & TECH CORP [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) page 46, line 5 - line 25; claim 1 page 115, line 20 - line 31 page 155, line 11 - line 33; sequence 1 -----	1-44

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/037818

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011094337	A1	04-08-2011	CA 2788304 A1 04-08-2011
			CN 102834108 A 19-12-2012
			EP 2528618 A1 05-12-2012
			JP 2013518115 A 20-05-2013
			KR 20120123443 A 08-11-2012
			RU 2012136450 A 10-03-2014
			US 2012322725 A1 20-12-2012
			US 2014107021 A1 17-04-2014
			WO 2011094337 A1 04-08-2011
-----			
CA 2852177	A1	23-12-2009	NONE
-----			
WO 2013074910	A1	23-05-2013	CA 2847246 A1 23-05-2013
			CN 103957927 A 30-07-2014
			EP 2780031 A1 24-09-2014
			HK 1198810 A1 12-06-2015
			JP 2015504431 A 12-02-2015
			KR 20140097151 A 06-08-2014
			RU 2014117678 A 27-12-2015
			US 2013157934 A1 20-06-2013
			WO 2013074910 A1 23-05-2013
-----			
WO 2013004983	A1	10-01-2013	EP 2729493 A1 14-05-2014
			JP 2014520789 A 25-08-2014
			US 2014221280 A1 07-08-2014
			WO 2013004983 A1 10-01-2013
-----			
WO 2014152460	A2	25-09-2014	CN 105324125 A 10-02-2016
			EP 2986314 A2 24-02-2016
			JP 2016521253 A 21-07-2016
			US 2016058881 A1 03-03-2016
			WO 2014152460 A2 25-09-2014
-----			