

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193102** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.02.17

(22) Дата подачи заявки
2020.05.20

(51) Int. Cl. *A61K 38/26* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/724 (2006.01)

(54) **ИНЪЕКЦИОННЫЕ СОВМЕСТНЫЕ СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА,
СОДЕРЖАЩИЕ ИНГИБИТОРЫ SGLT2 И ИНКРЕТИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ**

(31) 62/850,710

(32) 2019.05.21

(33) US

(86) PCT/EP2020/064128

(87) WO 2020/234384 2020.11.26

(71) Заявитель:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Лейн Энн-Лор, Ермутус Луц, Гомес
Дос Сантос Ана (GB)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены совместные составы, содержащие циклодекстрин, которые позволяют осуществлять одновременное подкожное введение ингибиторов натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2i), таких как дапаглифлозин, и инкретиновых пептидов, таких как пептиды, являющиеся двойными агонистами GLP-1/глюкагона.

A1

202193102

202193102

A1

ИНЪЕКЦИОННЫЕ СОВМЕСТНЫЕ СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНА, СОДЕРЖАЩИЕ ИНГИБИТОРЫ SGLT2 И ИНКРЕТИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0001] Содержание перечня последовательностей, поданного в электронном виде в текстовом файле в формате ASCII (название sequencelisting_ascii.txt; размер: 4 096 килобайт и дата создания: 21 мая 2019 г.), поданного с заявкой, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Множество сложных прогрессирующих заболеваний, включая астму, рак, диабет и многие другие, вносят вклад в бремя заболеваний во всем мире. Для того, чтобы надлежащим образом контролировать прогрессирование этих гетерогенных заболеваний, комбинированные терапевтические средства были продемонстрированы как эффективная стратегия применения лекарственных препаратов. Как правило, пациенты начинают принимать одно лекарственное средство для контроля симптомов и задержки прогрессирования заболевания, к которому добавляются дополнительные лекарственные средства, поскольку основная патофизиология со временем ухудшается, и симптомы становятся менее контролируемыми.

[0003] Диабет 2 типа (СД2) представляет собой нарушение метаболизма, характеризующееся высокими уровнями глюкозы в крови, которое, если плохо контролируется, может привести к опасным для жизни осложнениям здоровья. При отсутствии эффективности первоначального вмешательства в виде только режима питания и физической нагрузки начинается применение противодиабетических лекарственных средств, при котором пациенты начинают монотерапию с применением метформина. По мере того, как заболевание прогрессирует и уровень глюкозы в крови возвращается в диабетический диапазон, добавляются дополнительные лекарственные препараты с различными механизмами действия. Наконец, пациенты с T2D проходят двойную или тройную терапию, предусматривающую метформин или инсулин в качестве одного из активных ингредиентов их "коктейля" лекарственных средств. Такая значительная нагрузка лекарственными препаратами часто приводит к низкой степени соблюдения режима терапии.

[0004] Несоблюдение терапии диабета является общепризнанной проблемой и одной из основных причин, по которым пациенты не могут эффективно осуществлять гликемический контроль. Как правило, более чем половина пациентов, проходящих противодиабетическую терапию, не находятся под должным контролем, что определяется как уровень HbA1c, составляющий более чем 7,5%. Это обусловлено комбинацией как прогрессирования основного заболевания, так и плохим соблюдением режима терапии. Согласно клиническим данным из Соединенного Королевства, менее чем 15% пациентов удается придерживаться назначенных им лекарственных препаратов для лечения диабета. Показатели соблюдения режима терапии коррелируют со сложностью схемы и снижаются от монотерапии к комбинации, при этом самая низкая степень соблюдения режима терапии связана с комбинациями лекарственных препаратов для перорального введения и инъекционных лекарственных препаратов.

[0005] Два новейших поколения противодиабетических лекарственных средств, ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2is) и агонисты инкретинов, вводятся в виде лекарственных препаратов для перорального введения и инъекционных лекарственных препаратов соответственно. Соответственно, требуются совместные составы, которые могут внести значительный вклад в повышение степени соблюдения режима терапии посредством обеспечения удобного и одновременного введения двух лекарственных средств, которые в ином случае необходимо было бы принимать отдельно (например, одно как средство для перорального введения, а другое как инъекционное средство).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В данном документе предусмотрены фармацевтические совместные составы, содержащие (i) инкретиновые пептиды, включая, в частности, липидированные инкретиновые пептиды, (ii) ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2is) и (iii) циклодекстрины.

[0007] В одном случае жидкая фармацевтическая композиция содержит (i) липидированный инкретиновый пептид, (ii) ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2i) и (iii) циклодекстрин.

[0008] В одном случае инкретиновый пептид является монолипидированным. В одном случае инкретиновый пептид представляет собой пептид, являющийся двойным

агонистом GLP-1/глюкагона. В одном случае инкретиновый пептид представляет собой MEDI0382, лираглутид или семаглутид.

- [0009] В одном случае SGLT2i представляет собой дапаглифлозин.
- [0010] В одном случае циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В одном случае бета-циклодекстрин представляет собой гидроксипропил- β -циклодекстрин. В одном случае циклодекстрин представляет собой сульфобутиловый эфир циклодекстрина.
- [0011] В одном случае липидированный инкретиновый пептид присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл. В одном случае SGLT2i присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 17 мг/мл. В одном случае циклодекстрин присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 7% вес/объем.
- [0012] В одном случае SGLT2i и циклодекстрин характеризуются стехиометрическим соотношением, составляющим приблизительно 1:1.
- [0013] В одном случае pH композиции составляет от приблизительно 6,5 до приблизительно 8. В одном случае pH композиции составляет от приблизительно 7 до приблизительно 8. В одном случае pH композиции составляет приблизительно 7.
- [0014] В одном случае объем композиции составляет 1 мл или меньше.
- [0015] В одном случае композиция предназначена для парентерального введения. В одном случае парентеральное введение представляет собой подкожное введение.
- [0016] В одном случае композиция содержит комплексы включения, содержащие липидированный инкретиновый пептид, SGLT2i и циклодекстрин.
- [0017] В одном случае композиция не содержит фибриллы липидированного инкретинового пептида.
- [0018] В одном случае композиция не снижает аффинность липидированного инкретинового пептида в отношении рецептора GLP-1 и/или рецептора глюкагона.
- [0019] В одном случае введение композиции крысе приводит к достижению C_{max} липидированного инкретинового пептида, составляющей приблизительно 390 нг/мл, T_{max} липидированного инкретинового пептида, составляющего приблизительно 1 час, периода полувыведения липидированного инкретинового пептида, составляющего приблизительно 5 часов, и/или AUC_{0-inf} липидированного инкретинового пептида, составляющей приблизительно 3500-4000 нг.ч/мл.
- [0020] Также в данном документе предусмотрен шприц-ручка для инъекций, содержащий любую композицию, предусмотренную в данном документе. В одном

случае шприц-ручка для инъекций обеспечивает доставку приблизительно 600 мкл композиции.

[0021] Также в данном документе предусмотрен способ лечения диабета 2 типа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой композиции, предусмотренной в данном документе. В одном случае субъект характеризуется избыточным весом или страдает ожирением.

[0022] Также в данном документе предусмотрен способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) или неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой композиции, предусмотренной в данном документе. В одном случае субъект характеризуется избыточным весом или страдает ожирением.

[0023] Также в данном документе предусмотрен способ снижения количества жира в печени субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой композиции, предусмотренной в данном документе. В одном случае субъект характеризуется избыточным весом или страдает ожирением.

[0024] В одном случае в способах при введении доставляют пациенту приблизительно 10 мг SGLT2i и/или приблизительно 300 мкг липидированного инкретинового пептида. В одном случае введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0025] На **ФИГ. 1** показана химическая структура, химическая формула ($C_{167}H_{252}N_{42}O_{55}$) и молекулярная масса (3728,09) MEDI0382 (SEQ ID NO:4).

[0026] На **ФИГ. 2** представлена диаграмма фазовой растворимости для комплексов дапаглифлозин (DPZ) : гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP β CD) и комплексов эмпаглифлозин (EPZ) : HP β CD. Значения кажущейся растворимости DPZ и EPZ повышаются с повышением значений концентрации HP β CD. (См. пример 1.)

[0027] На **ФИГ. 3** показаны результаты кинетических исследований агрегации MEDI0382 (SEQ ID NO: 4) в различных составах, в том числе в буфере, в 7% HP β CD, и в совместном составе с DPZ в 7% HP β CD. **(А)** График, демонстрирующий временную динамику образования фибрилл с последующим измерением интенсивности флуоресценции ThT. Результаты демонстрируют полное подавление фибриллообразования при добавлении циклодекстрина, как в присутствии DPZ, так и в отсутствие DPZ. Данные представлены в виде среднего значения \pm SD (n = 3). **(В)**

График, демонстрирующий характеристику вторичной структуры MEDI0382 в буфере и 7% HP β CD посредством кругового дихроизма в дальнем УФ-диапазоне до и после инкубации при 37°C. MEDI0382 в буфере демонстрирует типичный профиль альфа-спирали при T0 и присутствие структуры типа β -слой в точке Tконечн. (218 нм), что подтверждает присутствие фибрилл. При составлении с HP β CD наблюдался сдвиг спектра CD, но он оставался неизменным в течение периода инкубации. (См. пример 2.)

[0028] На **ФИГ. 4** показаны репрезентативные ТЕМ-изображения MEDI0382 до и после инкубации при 37°C, подтверждающие образование фибрилл в составе MEDI0382 только в буфере (масштабные отрезки = 200 нм). (См. пример 2.)

[0029] На **ФИГ. 5** показаны репрезентативные ТЕМ-изображения лираглутида в буфере и в HP β CD и связанных средствах-носителях после анализа с применением Tht, подтверждающие образование фибрилл в составе лираглутида только в буфере. (масштабные отрезки = 200 нм) (см. пример 2.)

[0030] На **ФИГ. 6** показан FTIR-спектр лираглутида после анализа с применением Tht. (См. пример 2.)

[0031] На **ФИГ. 7** показана характеристика взаимодействия MEDI0382-HP β CD. **(А)** График, представляющий качественную оценку заполненности полости циклодекстрина посредством измерения флуоресценции ANS. Из-за свойств ANS излучать флуоресценцию при комплексообразовании с HP β CD, ANS был использован в качестве зонда для оценки степени незаполненности полости в различных составах, в том числе в 7% среде-носителе HP β CD, MEDI0382 в 7% HP β CD, DPZ в 7% HP β CD и MEDI0382 + DPZ в 7% HP β CD. Буферную среду-носитель и MEDI0382 в буфере использовали в качестве контроля. Более низкая флуоресценция указывает на более высокую заполненность. Данные представлены в виде среднего значения \pm SD. (n = 3) **(В)** График, демонстрирующий результаты измерения собственной флуоресценции триптофана (Тгр). Спектр излучения флуоресценции Тгр информирует об изменении микроокружения в соответствии с составом. Состав на основе MEDI0382 + DPZ не подвергали измерению по причине помех от DPZ. Данные представлены в виде среднего значения \pm SD. (n = 3) (См. примеры 3 и 4.)

[0032] На **ФИГ. 8** показаны спектры кругового дихроизма MEDI0382 в ближнем УФ-диапазоне в буфере и в 7% HP β CD. Вклад ароматических остатков выделен следующим образом: 285-310 нм для триптофана (Тгр), 275-285 нм для тирозина (Тур) и 255-270 нм для фенилаланина (Phe). (См. пример 4.)

- [0033] На **ФИГ. 9** показаны типичные ИТС-изотермы, соответствующие титрованию (A) HP β CD : DPZ и (B) HP β CD:MEDI0382. Титрование HP β CD : DPZ приводит к экзотермическому профилю, тогда как HP β CD:MEDI0382 дает эндотермическую изотерму. (См. пример 3.)
- [0034] На **ФИГ. 10** продемонстрирована область 1H-1H NOESY спектров MEDI0382 с 10% HP β CD (подавление сигнала от воды при ЯМР). (A) Области NOESY сфокусированы на взаимодействиях между ароматическим остатком и HP β CD. (B) Схематическое представление взаимодействия с Тгр. (C) Области NOESY сфокусированы на взаимодействиях между липидной цепью пальмитиновой кислоты. (D) Схематическое представление взаимодействия. (См. примеры 4 и 5.)
- [0035] На **ФИГ. 11** показаны (A) моментальные снимки после 100 нс моделирования комплекса MEDI0382 : HP β CD, начатого с HP β CD, состыкованного с пептидом. Липидная цепь образует комплекс включения с HP β CD. (B) Также показана количественная оценка типов взаимодействий между HP β CD и остатками пептида. В среднем в ходе моделирования образуются специфические водородные связи (серые столбцы) между HP β CD и атомами боковой цепи, и во многих случаях молекула воды (черный столбец) является мостиком для взаимодействия. (См. пример 5.)
- [0036] На **ФИГ. 12** показана флуоресценция Тгр (слева) и характеристика MEDI0382 посредством кругового дихроизма в дальнем УФ-диапазоне в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие при pH 6,5 и 8. (См. пример 6.)
- [0037] На **ФИГ. 13** показан кинетический профиль агрегации MEDI0382 по данным флуоресценции Tht в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие при pH 6,5 и 8. (См. пример 6.)
- [0038] На **ФИГ. 14** показаны AFM- и TEM-изображения MEDI0382 в буфере и в HP β CD после анализа с применением Tht при pH 6,5 и pH 8,0. (См. пример 6.)
- [0039] На **ФИГ. 15** показан CD-спектр MEDI0382 в дальнем УФ-диапазоне после анализа с применением Tht в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие при pH 6,5 и 8. Состав вторичной структуры указан в таблице (см. пример 6).
- [0040] На **ФИГ. 16** показаны результаты анализа кинетики агрегации MEDI0382 в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие при pH 6,5 и 8. (См. пример 6.)
- [0041] На **ФИГ. 17** показан кинетический профиль агрегации по данным флуоресценции лираглутида в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие при pH 6,5 и 8. (См. пример 6.)

[0042] На **ФИГ. 18** показан CD-спектр лираглутида в дальнем УФ-диапазоне после анализа с применением Tht в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие при pH 6,5 и 8. (См. пример 6.)

[0043] На **ФИГ. 19** показана эффективность совместного состава *in vitro* и *in vivo*. Анализ активности *in vitro* в отношении **(А)** рецептора GLP1 (GLP1 R) и **(В)** рецептора глюкагона (GluR). Профиль зависимости концентрации **(С)** MEDI0382 и **(D)** дапаглифлозина в плазме крови от времени после подкожной инъекции крысам. (См. пример 7.)

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0044] Следует понимать, что конкретные варианты реализации, показанные и описанные в данном документе, являются примерами, и не предполагается, что они в иных обстоятельствах каким-либо образом ограничивают объем применения.

[0045] Опубликованные патенты, заявки на патенты, веб-сайты, названия компаний и научная литература, упоминаемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте в той же степени, как если бы было указано, что каждый из них был конкретно и отдельно включен посредством ссылки. Любое противоречие между какими-либо источниками, цитируемыми в данном документе, и конкретными идеями настоящего описания будет разрешаться в пользу последнего. Подобным образом, любое противоречие между понимаемым в данной области техники определением слова или фразы и определением слова или фразы, которое отдельно приведено в данном описании, будет разрешаться в пользу последнего.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0046] Используемые в данном описании формы единственного числа, в частности, охватывают также формы множественного числа для терминов, к которым они относятся, если содержание явно не указывает иное. В связи с этим формы единственного числа, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

[0047] Используемый в данном документе термин "приблизительно" означает примерно, в диапазоне, ориентировочно или около. Если термин "приблизительно" используется совместно с числовым диапазоном, то он модифицирует данный диапазон, расширяя границы выше и ниже изложенных числовых значений. В целом,

если не указано иное, термин "приблизительно" используется в данном документе для модификации числового значения в большую и меньшую сторону от приведенного значения с отклонением на 20%.

[0048] Кроме того, сочетание союзов "и/или", в случае его использования в данном документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В, и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0049] Если не определено иное, то используемые в данном документе технические и научные термины имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится настоящая заявка. В данном документе приведены ссылки на различные методики и материалы, известные специалистам в данной области техники. Стандартные справочные издания, в которых изложены общие принципы синтеза пептидов, включают W. C. Chan and P. D. White, "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", Oxford University Press, Oxford (2004). Кроме того, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалиста предоставляется общий словарь со многими из терминов, используемых в настоящем изобретении.

[0050] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, которая принята согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от аминоконца к карбоксиконцу. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты настоящего изобретения, которые могут обеспечиваться ссылкой на описание в целом. Исходя из этого, термины, которые определены непосредственно ниже, более точно определены по ссылке на описание во всей его полноте.

[0051] Термины "пептид", "полипептид", "белок" и "фрагмент белка" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимеру из двух или более аминокислотных остатков. Термины применимы к полимерам из аминокислот, в

которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимерам из не встречающихся в природе аминокислот. Термин "пептид" дополнительно включает пептиды, которые были подвергнуты посттрансляционным или постсинтетическим модификациям, например, гликозилированию, ацетилированию, фосфорилированию, амидированию, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическому расщеплению или модификации с помощью не встречающихся в природе аминокислот. "Пептид" может представлять собой часть слитого пептида, содержащего дополнительные компоненты, такие как, например, Fc-домен или домен альбумина, для повышения периода полувыведения. Пептид, описанный в данном документе, также может быть дериватизирован посредством ряда различных способов.

[0052] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые выполняют функцию, аналогичную таковой у встречающихся в природе аминокислот. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые затем модифицируются, например, гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат и *O*-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые характеризуются такой же основной химической структурой, как у встречающейся в природе аминокислоты, например, альфа-углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги могут содержать модифицированные R-группы (например норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохранять такую же основную химическую структуру, как у встречающейся в природе аминокислоты. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые характеризуются структурой, отличающейся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют так же, как и встречающаяся в природе аминокислота. Термины "аминокислота" и "аминокислотный остаток" используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0053] Термин "выделенный" относится к состоянию, в котором пептиды или нуклеиновые кислоты будут в целом соответствовать настоящему изобретению. Выделенные пептиды и выделенные нуклеиновые кислоты не будут содержать или практически не будут содержать материал, с которым они связаны в природных

условиях, например другие пептиды или нуклеиновые кислоты, с которыми они встречаются в их природной среде или среде, в которой их получают (например клеточная культура), если такое получение осуществляется посредством технологии рекомбинантных ДНК, осуществляемой на практике *in vitro* или *in vivo*. Пептиды и нуклеиновую кислоту можно составлять с разбавителями или вспомогательными веществами и оставлять выделенными для практических целей – например, пептиды, как правило, будут смешивать с желатином или другими носителями, в случае применения для покрытия микротитрационных планшетов для применения в иммуноанализах, или будут смешивать с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями при применении в диагностике или терапии.

[0054] "Рекомбинантный" пептид относится к пептиду, полученному посредством технологии рекомбинантных ДНК. Полученные рекомбинантным путем пептиды, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, поскольку представляют собой нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или в значительной степени очищены посредством любой подходящей методики.

[0055] Термины "фрагмент", "аналог", "производное" или "вариант" в контексте инкретинового пептида подразумевают любой пептид, у которого сохраняется по меньшей мере некоторая требуемая активность, например связывание с рецепторами глюкагона и/или GLP-1. Предусмотренные в данном документе фрагменты инкретиновых пептидов включают фрагменты, подвергнутые протеолитическому расщеплению, фрагменты, подвергнутые делеции, которые проявляют требуемые свойства в ходе экспрессии, очистки и/или введения субъекту.

[0056] Термин "вариант", используемый в данном документе, относится к пептиду, который отличается от упомянутого пептида вследствие аминокислотных замен, делеций, вставок и/или модификаций. Варианты можно получать с применением известных из уровня техники методик мутагенеза. Варианты могут также или в качестве альтернативы содержать другие модификации – например, пептид можно конъюгировать или связывать, например сливать с гетерологичной аминокислотной последовательностью или другим фрагментом, например для повышения периода полувыведения, растворимости или стабильности. Примеры фрагментов, подлежащих конъюгации или связыванию с пептидом, предусмотренным в данном документе, включают без ограничения альбумин, Fc-область иммуноглобулина, полиэтиленгликоль (PEG) и т. п. Пептид может быть также конъюгирован или получен в виде связанного с линкером или другой последовательностью для облегчения

синтеза, очистки или идентификации пептида (например 6-His) или для усиления связывания полипептида с твердой подложкой.

[0057] Термин "фармацевтический совместный состав" относится к композициям, содержащим инкретиновый пептид и SGLT2i, например, вместе с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или разбавителями для введения субъекту, нуждающемуся в лечении, например субъекту человеку с диабетом 2 типа.

[0058] Термин "фармацевтически приемлемый" относится к композициям, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для контакта с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности или других осложнений в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

[0059] Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к одному или нескольким нетоксичным материалам, которые не препятствуют эффективности биологической активности инкретинового пептида и/или SGLT2i.

[0060] "Эффективное количество" представляет собой такое количество инкретинового пептида и/или SGLT2i, введение которого субъекту, либо в однократной дозе, либо в виде части серии доз, является эффективным для лечения, например лечения диабета 2 типа. Данное количество может представлять собой фиксированную дозу для всех субъектов, подлежащих лечению, или может варьироваться в зависимости от веса, состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению, требуемой степени потери веса или поддержания веса и других значимых факторов.

[0061] Термин "субъект" означает любого субъекта, в частности субъекта-млекопитающего, нуждающегося в лечении с помощью фармацевтического совместного состава, предусмотренного в данном документе. Субъекты-млекопитающие включают без ограничения людей, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей, коров, обезьян, мартышек, орангутангов, шимпанзе и т. п. В одном случае субъектом является субъект-человек.

[0062] Используемая в данном документе фраза "субъект, нуждающийся в этом" относится к индивидууму, которого желательно подвергать лечению, например субъекту с диабетом 2 типа.

[0063] Такие термины, как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить" относятся к терапевтическим мерам, посредством которых излечивается диагностированное патологическое состояние или нарушение и/или останавливается

его прогрессирование. Такие термины, как "предупреждение", относятся к профилактическим или предупредительным мерам, посредством которых предупреждается и/или замедляется развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже имеется заболевание или состояние. Таким образом, нуждающиеся в предупреждении включают тех, кто склонен к развитию заболевания или состояния, и тех, у кого необходимо предупредить заболевание или состояние. Например, фраза "лечение пациента", страдающего диабетом 2 типа, относится к снижению тяжести заболевания или состояния до такой степени, что субъект больше не страдает от дискомфорта и/или вызванного им изменения функции. Лечение включает терапевтические меры, посредством которых замедляются или ослабляются симптомы диагностированного патологического состояния или нарушения.

[0064] Используемый в данном документе термин "пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона" представляет собой химерный пептид, который проявляет активность в отношении рецептора глюкагона, составляющую по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с нативным глюкагоном, и также проявляет активность в отношении рецептора GLP-1, составляющую по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с нативным GLP-1.

[0065] Используемый в данном документе термин "нативный глюкагон" относится к встречающемуся в природе глюкагону, например глюкагону человека, содержащему последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQW LMNT (SEQ ID NO: 1). Термин "нативный GLP-1" относится к встречающемуся в природе GLP-1, например человеческому GLP-1, и является общим термином, который охватывает, например, GLP-1(7-36)амид (HAEGT FTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR; SEQ ID NO: 2), GLP-1(7-37)кислоту (HAEGT FTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG; SEQ ID NO: 3) или смесь этих двух соединений. Подразумевается, что используемая в данном документе общая ссылка на "глюкагон" или "GLP-1" в отсутствие любого дополнительного обозначения означает нативный глюкагон человека или нативный GLP-1 человека соответственно. Если не указано иное, "глюкагон" относится к глюкагону человека, и "GLP-1" относится к GLP-1 человека.

II. ИНКРЕТИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ

[0066] Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, содержат инкретиновые пептиды, включая, в частности, липидированные инкретиновые пептиды. Инкретиновые пептиды являются агонистами GLP-1, и они включают одобренные моноагонисты GLP-1, а также двойные или тройные агонисты, такие как MEDI0382, двойной агонист рецепторов GLP-1/глюкагона. (См. Henderson SJ *et al.*, *Diabetes Obes Metab.* 18:1176-90 (2016), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.) Липидирование может продлить циркуляцию инкретиновых пептидов в крови. Кроме того, как показано в данном документе, ароматические остатки в липидной цепи способны взаимодействовать с циклодекстрином (например HP β CD) таким образом, что снижается степень агрегации инкретинового пептида.

[0067] В одном случае инкретиновый пептид для применения в фармацевтических совместных составах, предусмотренных в данном документе, представляет собой MEDI0382. MEDI0382 представляет собой линейный пептид из 30 аминокислот с последовательностью HSQGTFTSDX₁₀SEYLDSEARDFVAVLEAGG-кислота, где X₁₀ = лизин с пальмитоиловой группой, конъюгированной с эpsilon-атомом азота посредством линкера гамма-глутаминовой кислоты (т. е. K(gE-palm)). (SEQ ID NO: 4). MEDI0382 пальмитоилирован для повышения периода полувыведения за счет связи с сывороточным альбумином, что снижает его склонность к почечному клиренсу. MEDI0382 был сконструирован для усиления всех положительных терапевтических свойств, связанных с аналогами GLP-1 (см. Meier JJ., *Nat Rev Endocrinol.* 8:728-42. (2012), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), включая эффективный гликемический контроль, задержку опорожнения желудка, индукцию насыщения и снижение веса тела в сочетании с дополнительным эффектом глюкагона на затраты энергии и скорость метаболизма. Чтобы повысить время системной циркуляции пептида к его аминокислотной последовательности была ковалентно присоединена цепь C16, обеспечивающая обратимое связывание с сывороточным альбумином. Ранее эту стратегию успешно применяли к лираглутиду, одобренному моноагонисту пептида GLP-1, продаваемому под торговым названием Victoza[®]. В ходе доклинических исследований повторные инъекции MEDI0382 приводили к заметной потере веса и надежному контролю уровня глюкозы у мышей DIO и нечеловекообразных приматов. В настоящее время при клинической оценке для лечения пациентов с избыточным весом или ожирением, страдающих диабетом 2 типа, MEDI0382 продемонстрировал эффективность при снижении уровня глюкозы, веса и количества жира в печени у пациентов с избыточным весом и ожирением, страдающих

диабетом 2 типа. (См. Ambery P, et al., *Lancet*. 391:2607-18 (2018), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0068] В одном случае инкретиновый пептид представляет собой MEDI0382, семаглутид или лираглутид.

[0069] Дополнительные инкретиновые пептиды также могут быть использованы в фармацевтических совместных составах, предусмотренных в данном документе. Иллюстративные липидированные инкретиновые пептиды приведены, например, в Wang et al., *J. Control Release* 241:25-33 (2016), которая включена в данный документ посредством ссылки. В определенных случаях липидированный инкретиновый пептид для применения в фармацевтическом совместном составе, предусмотренном в данном документе, представляет собой монолипидированный инкретиновый пептид.

[0070] Инкретиновые пептиды для применения в фармацевтических совместных составах, предусмотренных в данном документе, могут быть ацилированы.

[0071] Инкретиновые пептиды для применения в фармацевтических совместных составах, предусмотренных в данном документе, могут быть связаны с гетерологичным фрагментом, например для повышения периода полувыведения. Гетерологичный фрагмент может представлять собой белок, пептид, домен белка, линкер, органический полимер, неорганический полимер, полиэтиленгликоль (PEG), биотин, альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA), часть, отвечающую за связывание HSA с FcRn, альбумин-связывающий домен, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркас, отличный от каркаса FnIII, эпитопную метку, рекомбинантный полипептидный полимер или комбинацию двух или более таких фрагментов.

[0072] Инкретиновые пептиды могут быть получены посредством любого подходящего способа. Например, в определенных вариантах осуществления инкретиновые пептиды химически синтезируют посредством способов, известных специалистам в данной области техники, например посредством твердофазного синтеза, как описано Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Твердофазный синтез пептидов можно осуществлять, например, с помощью автоматических синтезаторов с применением стандартных реагентов, например, как объяснено в примере 1 из WO 2014/091316.

[0073] В качестве альтернативы, инкретиновые пептиды можно получить рекомбинантным путем с применением подходящей комбинации вектор/клетка-хозяин, как хорошо известно специалисту в данной области техники. Доступен ряд способов рекомбинантного получения инкретиновых пептидов. В целом,

полинуклеотидная последовательность, кодирующая инкретиновый пептид, вставляется в соответствующее средство для экспрессии, например вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности. Нуклеиновая кислота, кодирующая инкретиновый пептид, вставляется в вектор в соответствующей рамке считывания. Затем вектором экспрессии трансфицируется подходящая клетка-хозяин, которая будет экспрессировать инкретиновый пептид. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения клетки бактерий, дрожжей или млекопитающих. Ряд коммерчески доступных векторных систем для экспрессии в хозяине можно применять для экспрессии инкретиновых пептидов.

III. СОВМЕСТНЫЕ СОСТАВЫ

- [0074]** Предусмотренные в данном документе совместные составы содержат инкретиновый пептид (как обсуждалось выше), ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2i) и циклодекстрин.
- [0075]** SGLT2i представляют собой класс лекарственных препаратов для применения с режимом питания и физической нагрузкой для снижения уровня сахара в крови у взрослых с диабетом 2 типа. SGLT2i снижают уровень глюкозы в крови посредством блокирования реабсорбции глюкозы в почке. Поскольку этот механизм не зависит от инсулина и напрямую коррелирует с уровнем глюкозы в крови, SGLT2i обеспечивает подход с длительным снижением уровня глюкозы, что также минимизирует гипогликемические эпизоды.
- [0076]** Иллюстративные SGLT2i включают дапаглифлозин (DPZ), эмпаглифлозин (EPZ) и канаглифлозин. В определенных случаях SGLT2i представляет собой DPZ или EPZ. В определенных случаях SGLT2i представляет собой DPZ.
- [0077]** В определенных случаях SGLT2i (например DPZ) присутствует в фармацевтическом совместном составе, предусмотренном в данном документе, в концентрации, составляющей приблизительно 17 мг/мл.
- [0078]** Циклодекстрины являются циклическими олигосахаридами, содержащими звенья глюкопиранозы. Циклодекстрины включают альфа-, бета- и гамма-циклодекстрины, которые содержат различные количества звеньев глюкопиранозы. В определенных случаях циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. Иллюстративный циклодекстрин представляет собой гидроксипропил-β-циклодекстрин (HPβCD). Дополнительный иллюстративный циклодекстрин представляет собой сульфобутиловый эфир циклодекстрина.

- [0079] В определенных случаях циклодекстрин (например HP β CD) присутствует в фармацевтическом совместном составе, предусмотренном в данном документе, в концентрации, составляющей приблизительно 7% вес/объем.
- [0080] В некоторых случаях фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, SGLT2i (например DPZ) и циклодекстрин (например HP β CD) характеризуются стехиометрическим соотношением, составляющим приблизительно 1:1.
- [0081] Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, могут содержать концентрацию липидированного инкретинового пептида (например MEDI0382), составляющую приблизительно 0,5 мг/мл.
- [0082] Как продемонстрировано в данном документе, инкретиновый пептид (например MEDI0382), SGLT2i (например DPZ) и циклодекстрин (например HP β CD) могут присутствовать в комплексах включения в фармацевтических совместных составах, предусмотренных в данном документе.
- [0083] Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, могут характеризоваться рН, составляющим по меньшей мере 6,5. Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, могут характеризоваться рН, составляющим по меньшей мере 7.
- [0084] Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, могут характеризоваться рН, составляющим от приблизительно 6,5 до приблизительно 8. Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, могут характеризоваться рН, составляющим от приблизительно 7 до приблизительно 8. Фармацевтические совместные составы, предусмотренные в данном документе, могут характеризоваться рН, составляющим приблизительно 7.
- [0085] Совместные составы могут быть предназначены для парентеральной, например подкожной, доставки. Совместные составы могут быть предназначены, например, для доставки с помощью устройства, представляющего собой шприц-ручку. Соответственно, в данном документе также предусмотрены шприцы-ручки для инъекций, содержащие фармацевтический совместный состав, предусмотренный в данном документе.
- [0086] В совместных составах SGLT2i и инкретиновый пептид могут вводиться в одном и том же объеме. Проблемы с болью и переносимостью могут возникать при больших объемах. Соответственно, совместный состав может характеризоваться объемом, составляющим 1 мл или меньше. Поэтому совместный состав может быть разработан для введения в объеме, составляющем приблизительно 600 мкл. Как

продемонстрировано в данном документе, циклодекстрин (например гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP β CD)) можно использовать в качестве средства, повышающего растворимость, для обеспечения терапевтически эффективной дозы SGLT2i в необходимом объеме.

[0087] Инкретиновые пептиды, как известно, сложно составлять по причине присущих им свойств, заключающихся в самоассоциации и агрегации, а также их растворимости и стабильности в зависимости от pH. Как продемонстрировано в данном документе, циклодекстрин (например HP β CD) можно использовать для предотвращения агрегации инкретинового пептида. Соответственно, композиция, предусмотренная в данном документе, может не содержать фибрилл инкретинового пептида (например MEDI0382). Наличие фибрилл может быть оценено, например, с применением трансмиссионной электронной микроскопии (TEM) или анализа с применением тиофлавина Т (ThT) (например, как продемонстрировано в данном документе в примере 2).

[0088] Как продемонстрировано в данном документе, присутствие циклодекстрина и/или SGLT2i в совместном составе с инкретиновым пептидом не снижает активность инкретинового пептида (например MEDI0382). Активность инкретинового пептида (например MEDI0382) может быть оценена, например, с применением анализов *in vitro* и/или *in vivo*. Например, активность инкретинового пептида (например MEDI0382) может быть оценена на основании его активности в отношении рецепторов GLP-1 и/или глюкагона (например, как измерено по EC50 в анализе накопления cAMP, необязательно как продемонстрировано в примере 7).

IV. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[0089] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения диабета 2 типа, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, предусмотренного в данном документе фармацевтического совместного состава, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением.

[0090] Настоящее изобретение предусматривает способ снижения количества жира в печени, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, предусмотренного в данном документе фармацевтического совместного состава, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ). Снижение количества жира в печени может привести к повышению чувствительности к инсулину и/или улучшению функции печени. В определенных случаях введение снижает уровни гемоглобина A1c (HbA1c). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. В определенных случаях субъект страдает сахарным диабетом 2 типа.

[0091] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH), включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, предусмотренного в данном документе фармацевтического совместного состава, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. В определенных случаях субъект страдает сахарным диабетом 2 типа.

[0092] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, предусмотренного в данном документе фармацевтического совместного состава, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект

характеризуется BMI, составляющим по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. В определенных случаях субъект страдает сахарным диабетом 2 типа.

[0093] Настоящее изобретение предусматривает способ лечения ожирения или связанного с ожирением заболевания или нарушения, снижения веса тела, снижения количества жира в организме, предупреждения повышения веса тела, предупреждения набора жира, стимуляции снижения веса, стимуляции потери жира, лечения заболевания или состояния, вызванных или характеризующихся избыточным весом тела или избыточным количеством жира в организме, контроля веса, улучшения гликемического контроля или достижения гликемического контроля, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в лечении, фармацевтического совместного состава, предусмотренного в данном документе, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ). В определенных случаях введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке. В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 27 до 40 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим от 30 до 39,9 кг/м². В определенных случаях субъект характеризуется BMI, составляющим по меньшей мере 40. В определенных случаях у субъекта имеется избыточный вес. В определенных случаях субъект страдает ожирением. В определенных случаях субъект страдает сахарным диабетом 2 типа.

[0094] Примеры других связанных с ожирением (связанных с избыточным весом тела) нарушений включают без ограничения инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе, преддиабет, повышенный уровень глюкозы натощак, диабет 2 типа, гипертензию, дислипидемию (или комбинацию этих факторов риска, связанных с метаболизмом), типы глюкозаемии, сердечно-сосудистые заболевания, такие как застойная сердечная недостаточность, атеросклероз, артериосклероз, коронарное заболевание сердца или заболевание периферических артерий, инсульт, дыхательную дисфункцию или заболевание почек.

[0095] В определенных случаях путь введения предусмотренного в данном документе фармацевтического совместного состава, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ), является парентеральным. В определенных случаях путь введения предусмотренного в данном документе фармацевтического совместного состава, содержащего липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например

DPZ), является подкожным. В определенных случаях предусмотренный в данном документе фармацевтический совместный состав, содержащий липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ), вводится путем инъекции, например, с помощью шприца-ручки. В определенных случаях предусмотренный в данном документе фармацевтический совместный состав, содержащий липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ), вводится путем подкожной инъекции.

[0096] В определенных случаях предусмотренный в данном документе фармацевтический совместный состав, содержащий липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ), можно вводить один раз в день. В определенных случаях предусмотренный в данном документе фармацевтический совместный состав, содержащий липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ), можно вводить один раз в день путем инъекции (например подкожного введения). В определенных случаях предусмотренный в данном документе фармацевтический совместный состав, содержащий липидированный инкретиновый пептид (например MEDI0382) и SGLT2i (например DPZ), можно вводить один раз в день путем инъекции (например подкожного введения) в течение периода времени, составляющего по меньшей мере одну неделю, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере две недели, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере три недели, или в течение периода времени, составляющего по меньшей мере четыре недели.

ПРИМЕРЫ

Материалы

[0097] Воду для HPLC и ацетонитрил приобретали у компании VWR (VWR Radnor, Пенсильвания, США). Дапаглифлозин был предоставлен компанией AstraZeneca. Kleptose[®] НРВ (2-гидроксипропил- β -циклодекстрин) был предоставлен компанией Roquette (Roquette Freres, Лестрем, Франция). Captisol[®] (сульфобутилэфир- β -циклодекстрин) был предоставлен компанией Ligand pharmaceuticals (Ligand Pharmaceuticals, Сан-Диего, Калифорния, США. 8-Анилино-1-нафталинсульфоновая кислота (ANS) и тиофлавин t (ThT) приобретали у компании Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Двухосновный гептагидрат фосфата натрия и

одноосновный моногидрат фосфата натрия были предоставлены J. T. Baker (J. T. Baker chemical co, Филипсбург, Нью-Джерси, США).

Скрининг растворимости

[0098] Дапаглифлозин (ДПЗ) взвешивали в стеклянном флаконе. К порошку добавляли соответствующую водную среду-носитель с достижением конечной концентрации 17 мг/мл, перемешивали на встряхивателе и обрабатывали ультразвуком. Критерии соответствия/несоответствия для состава определяли посредством визуального наблюдения.

Фазовая растворимость DPZ в HP β CD (Kleptose HPB)

[0099] Различные растворы HP β CD (Kleptose HPB, Roquette) с возрастающими концентрациями получали в воде в диапазоне от 5% до 20% (вес/объем). Вкратце, HP β CD взвешивали в мерной колбе и добавляли очищенную воду до 80% (объем/объем) от конечного объема. Содержимое колбы перемешивали до полной солюбилизации и доводили до конечного объема очищенной водой. Примерно 30 мг DPZ взвешивали в каждом стеклянном флаконе для HPLC, к которому при перемешивании на магнитной мешалке добавляли 500 мкл соответствующего раствора HP β CD. Каждое значение концентрации измеряли два раза. Составы оставляли при перемешивании на магнитной мешалке на 21 ч 40 мин. Затем каждый образец переносили в пробирку типа "эппендорф" объемом 1,5 мл и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Затем из супернатанта отбирали 200 мкл и снова центрифугировали в пробирке типа "эппендорф" объемом 1,5 мл в течение 30 мин при 13000 об/мин. Образцы окончательно разбавляли в буфере А (95% воды для HPLC/5% ACN + 0,03% TFA) и концентрацию измеряли посредством UPLC по калибровочной кривой, проверенной посредством контроля качества.

Изотермическая титрационная калориметрия

[0100] Измерения посредством изотермической титрационной калориметрии (ИТС) проводили при 25°C посредством титрования циклодекстрина в растворе пептида или DPZ с применением устройства Microcal Auto ITC 200 (Malvern). Растворы MEDI0382 и DPZ получали при 0,13 и 0,12 мМ соответственно и циклодекстрин (HP β CD) получали при 3 мМ в подходящем буфере. Эксперименты проводили в трех повторностях и каждый анализ включал 20 инъекций по 2 мкл (первая инъекция только 0,4 мкл) со скоростью перемешивания, установленной на 750 об/мин. Изотермы

подгоняли с применением модели одного набора сайтов связывания с помощью программного обеспечения Malvern Origin.

Флуоресценция триптофана

[0101] Измерения флуоресценции проводили на спектрофотометре F-7000 FL при комнатной температуре. 100 мкл состава на основе пептида добавляли в 96-луночный планшет (с лунками в половину объема) в трех повторностях. Длину волны возбуждения устанавливали на 277 нм для селективного возбуждения флуоресценции триптофана. Спектры излучения флуоресценции сканировали в диапазоне от 285 до 385 нм. Входные щели для возбуждения и излучения устанавливали на 2,5 нм. Каждый спектр представлял собой среднее значение после трех сканирований.

Круговой дихроизм (CD)

[0102] Спектры кругового дихроизма свежеприготовленного раствора пептида в 20 mM натрий-фосфатном (NaP) буфере с pH 7,0 или в 7% HP β CD/20 mM NaP буфере с pH 7,0 при 0,5 мг/мл получали при комнатной температуре на спектрополяриметре Jasco J-815. Данные CD в дальнем УФ-диапазоне собирали при от 180 до 260 нм с применением кюветы с длиной пути 0,1 мм и спектры подвергали деконволюции с помощью алгоритмов CONTINLL, SELCON3 и CDSSTR с применением программного обеспечения CDPго. Данные CD в ближнем УФ-диапазоне собирали при от 250 до 350 нм с применением кюветы с длиной пути 1 см.

Кинетика агрегации

[0103] Для экспериментов по кинетике агрегации MEDI0382 подвергали мониторингу посредством анализа связывания тиофлавина Т (ThT) и сравнивали в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие. Измерения флуоресценции проводили на микропланшет-ридере Fluostar Optima (BMG Labtech, Оффенбург, Германия), термостатированном при 37°C. Связывание ThT с фибриллами подвергали мониторингу с применением фильтра возбуждения при 440 нм и регистрации излучения флуоресценции при 480 нм. Тестируемые составы представляли собой 20 mM NaP буфер с pH 7,0 с циклодекстрином и без циклодекстрина при 7% вес/объем. MEDI0382 составляли при 0,5 мг/мл, а DPZ при 17 мг/мл. 100 мкл состава пипеткой вносили в лунки 96-луночного планшета с лунками в половину объема из черного полистирола с прозрачным дном (Corning 3881, США), к которому добавляли 10 мкл 0,5 mM раствора ThT в воде. Каждый образец получали в трех повторностях. Для

предотвращения испарения использовали герметизирующую ленту и герметизирующую фольгу (Costar Thermowell). Считывание лунок планшета проводили каждые 30 минут с 5-минутным встряхиванием перед каждым измерением. Каждый цикл выполняли на орбитальном встряхивателе при 350 об/мин, 5 вспышек на лунку.

ЯМР

[0104] 2D NOESY ЯМР-спектры получали с подавлением сигнала от воды из растворов MEDI0382 при 4,3 мг/мл в NaP буфере с pH 7,6 с 10% HP β CD и без него. Все ЯМР-эксперименты проводили при температуре 300 К на ЯМР-спектрометре Bruker Avance-III HD при 600 МГц, оснащенный криозондом TCI размером 5 мм (Bruker-Biospin), с применением стандартных импульсных последовательностей из библиотеки Bruker (TopSpin 3.5). Фазочувствительные NOESY-эксперименты (импульсная программа "noesyegpph") проводили с применением метода моделирования возбуждения для подавления сигнала от растворителя (Hwang T.L SAJ. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*.112(2):275-9 (1995)). Спектры получали с релаксационной задержкой 1,5 с с применением $4 \text{ К} \times 512$ точек данных по ширине спектра 10 ppm в режиме States-TPPI (Dominique Marion Mk, et al., *Journal of Magnetic Resonance* 85(2):393-9 (1989)) с временем экспозиции 0,341 и 0,043 с в F2 и F1 соответственно (заполнение нулями от 1К до F1). Было собрано 128 сканов и 16 ложных сканов для каждого приращения F1 с временем смешивания 0,15 с. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Topspin 3.5 (Bruker-Biospin) с применением синусоидально-квадратичной оконной функции перед преобразованием Фурье в обоих измерениях F1 и F2.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ)

[0105] Составы на основе MEDI0382 до и после инкубации при 37°C адсорбировали на сетках из медной/углеродной пленки с 400 меш (разрешение EM), два раза промывали деионизированной водой и затем негативно окрашивали с применением 1,5 % уранилацетата в деионизированной воде. Образцы визуализировали в электронном микроскопе FEI Tecnai G2 (Thermo Fisher Scientific) при 120 кэВ с применением апертуры объектива диаметром 20 мкм для улучшения контраста. Изображения получали с помощью камеры АМТ.

Молекулярное моделирование

- [0106]** Процедуры моделирования молекулярной динамики (MD) проводили с помощью программного обеспечения Desmond (Материалы конференции ACM/IEEE по суперкомпьютерным вычислениям (SC06), Тампа, Флорида, 11-17 ноября 2006 г.). Исходную геометрию генерировали, как описано ниже, для каждого отдельного случая. Осуществляли построение пептида MEDI0382 с применением рентгеновской структуры аналога глюкогона, PDB, код 1BH0 (Sturm NS, *et al.*, *J Med Chem.* 41(15):2693-700 (1998)). Аминокислоты подвергали мутации вручную с применением инструментов для редактирования пептидов в Maestro (Schrödinger Release 2018-1: Jaguar, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018). Недостающие аминокислоты в направлении к С-концу достраивали без матрицы. Боковую цепь Tyr10 удаляли и заменяли на модель жирной кислоты С-16 К(γ E-palm) вручную. Все карбоновые кислоты находились в заряженном состоянии, за исключением С-конца, который был протонирован. Обеспечивали релаксацию конечной 3D-модели MEDI0382 посредством симуляции молекулярной динамики (MD) в течение 10 нс. Уравновешенную модель использовали в качестве начальной точки для всех дополнительных процедур моделирования. Осуществляли построение 3D-модели HP β CD на основе рентгеновской структуры β -циклодекстрина (β -CD), извлеченной из базы данных CSD (BCDEXD10) (Klaus Lindner WS, *Carbonhydrate Research.* 99(2):103-15 (1982)). Четыре группы 2-гидроксипропила вручную добавляли к исходной структуре β -CD. Данную геометрию подвергали релаксации до ближайшего энергетического минимума. Релаксированную 3D-модель HP β CD использовали в качестве исходной геометрии для всех дальнейших исследований.
- [0107]** Модели гомологии пептидов вставляли в систему, содержащую 50000 TIP3-моделей молекул воды с блоком моделирования размером 100x100x100Å. Систему подвергали нейтрализации посредством добавления ионов Na⁺. Концентрацию пептида устанавливали на 0,55 мМ, а концентрацию натрия устанавливали на 2,76 мМ. Все процедуры моделирования проводили с использованием силового поля OPLS3 (OPLS3e, Schrödinger, Inc., Нью Йорк, штат Нью-Йорк, 2013) (Shivakumar D, *et al.*, *J Chem Theory Comput.* 8(8):2553-8 (2012)) для пептида, циклодекстрина и ионов Na. Исходной системе обеспечивали прохождение через релаксационную последовательность: а) 100 пс броуновской динамики NVT, T=10 К; б) 12 пс NVT MD, T=10 К, с ограничениями на тяжелые атомы в растворе с малым временным шагом; в) 12 пс NPT MD, T=10 К, с ограничениями на тяжелые атомы в растворе; д) 12 пс NPT

MD, T=300 K, с ограничениями на тяжелые атомы в растворе, и е) NPT MD, T=300 K, без ограничений. После протокола релаксации начинали моделирование получения с помощью ансамбля NPT с применением термостата Нозе-Гувера с временем релаксации 1 пс с поддержанием температуры 300 K и баростата Мартина-Тобиаса-Кляйна с поддержанием давления в 1 атмосферу с временем ослабления 2 пс. Алгоритм RESPA использовали для интегрирования уравнения движения с временным шагом 2 фс.

Анализ активности *in vitro*

[0108] Линии клеток CHO-K1, стабильно экспрессирующие рецепторы GLP-1 или GCG, стабильно трансдуцировали элементом ответа на cAMP, соединенным с репортерным геном люциферазы, для определения *in vitro* активности агониста MEDI0382 в буфере, в циклодекстрине и в совместном составе с DPZ. Вкратце, клетки высевали по 20000 клеток на лунку в 96-луночные белые микротитрационные планшеты (Corning, США) и инкубировали с последовательно разбавленными образцами пептидов в течение 4 часов до лизиса и измерения активности cAMP-зависимой люциферазы с применением субстрата люциферазы Steady-Glo (Promega, США). Планшеты считывали на планшет-ридере SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, США) и кривые "концентрация-ответ" с 10 точками генерировали в трех повторностях. Результаты выражали в виде относительной активности тестируемого образца по сравнению с эталонным лигандом посредством расчета отношения значений EC50 эталона и образца, полученных в результате подгонки 4-PL после теста в отношении параллелизма с применением программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices, США), а представленные данные представляли собой среднее значение из двух независимых анализов. Кривые подгоняли с применением нелинейного регрессионного анализа в программном обеспечении GraphPad Prism 6.03 (GraphPad, США).

Составы на основе MEDI0382 и DPZ для исследования РК

- [0109]** Для исследования РК получали MEDI0382 отдельно в буфере при 0,5 мг/мл в 50 mM Na-фосфатном буфере с pH 7,8 + 1,85% пропиленгликоля (PG) (J.T. Baker). Данный буфер позволяет сравнить профиль РК с уже имеющимися данными.
- [0110]** Среда-носитель на основе циклодекстрина, используемая для исследования РК, представляла собой 7% вес/объем HPβCD в 50 mM Na-фосфатном буфере с pH 7,8 + 0,5% объем PG. Добавляли PG с доведением осмолярности составов до 260 мОсм.

Вкратце, DPZ солюбилизировали в (7% вес/объем HPβCD в 50 mM NaP буфере с pH 7,8 + 0,5% объем/объем PG) среде-носителя при концентрации 5 мг/мл, затем добавили MEDI0382 с достижением концентрации 0,5 мг/мл. Параллельно получали MEDI0382 отдельно в буфере при 0,5 мг/мл в 50 mM NaP буфере с pH 7,8 + 1,85% объем/объем PG. Затем составы разбавляли до 1/10 соответствующей средой-носителем.

[0111] Дозу для исследования РК устанавливали на уровне 0,5 мг/кг и 0,05 мг/кг для DPZ и MEDI0382 с объемом дозы 1 мл/кг.

[0112] В каждую группы включали трех животных и серийный забор крови для оценки РК проводили через 0,5, 1, 2, 4, 7 и 24 ч после введения дозы. И MEDI0382, и DPZ анализировали из образцов плазмы крови с применением валидированных способов, состоящих из получения образца денатурированного белка плазмы крови с последующей LC-MS/MS.

ПРИМЕР 1. Циклодекстрин повышает растворимость SGLT2i

[0113] Рекомендуемая доза DPZ составляет 10 мг в форме таблетки один раз в день для монотерапии и дополнительной комбинированной терапии с другими лекарственными препаратами, снижающими уровень глюкозы (рекомендация Европейского агентства по лекарственным средствам) (EMA). Учитывая, что DPZ хорошо всасывается после перорального введения (достигая 78% абсолютной биодоступности), и что аналогичное воздействие можно ожидать при введении путем подкожной инъекции, дозу DPZ для совместного состава фиксировали на уровне 10 мг. Поэтому скрининговый анализ разрабатывали с целевой концентрацией 17 мг/мл, что соответствует дозе 10 мг в объеме дозы 600 мкл. Вспомогательные вещества выбирали на основании нескольких критериев, таких как статус одобрения для подкожного введения доз, совместимость с пептидом и/или преимущество в повышении растворимости DPZ. Подвергнутые скринингу вспомогательные вещества включали PEG 400, PG, DSPE-PEG 2000, глицерин, коллифор 188, HPβCD и BSA. Большинство вспомогательных веществ не были способны достичь необходимых концентраций или удержать DPZ в растворе. Только состав, содержащий циклодекстрин, оказался успешным и поэтому был взят для дополнительной оценки в качестве потенциальной среды-носителя для совместного состава.

[0114] Чтобы лучше понять усиливающую способность циклодекстрина, проводили исследование фазовой растворимости DPZ в HPβCD (ФИГ. 2). Растворимость DPZ в воде экспериментально измеряли при 1,6 мг/мл. При добавлении HPβCD растворимость DPZ линейно возрастала с повышением концентрации HPβCD,

что указывает на образование комплекса включения со стехиометрическим соотношением, составляющим 1:1. Константа связывания, определенная посредством линейной регрессии, составляла $4,7 \times 10^3 \text{M}^{-1}$. На основании диаграммы фазовой растворимости количество HP β CD, необходимое для повышения растворимости до 17 мг/мл, составляет 5,5% (вес/объем). Однако для составления раствора рекомендуется не превышать 80% от растворимости при насыщении для обеспечения стабильности, что устанавливает уровень, составляющий 7% вес/объем. Чтобы подтвердить, что HP β CD можно применять в отношении других составов на основе SGLT2i, получали диаграмму фазовой растворимости с эмпаглифлозином (EPZ), который также продемонстрировал линейное повышение растворимости в присутствии HP β CD (ФИГ. 2).

ПРИМЕР 2. HP β CD подавляет агрегацию MEDI0382 и вызывает конформационное изменение

[0115] Тенденция пептидов, таких как MEDI0382, к агрегации, является одной из основных проблем при разработке составов на основе пептидов. Для оценки физической стабильности MEDI0382 в совместном составе проводили кинетическое исследование агрегации посредством анализа с применением тиофлавина Т (ThT), который основан на свойстве красителя ThT излучать сильно усиленную флуоресценцию при связывании с фибриллами (Biancalana M, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. 1804(7):1405-12 (2010)). Анализ с применением ThT использовали для сравнения агрегации MEDI0382 при 37°C в различных условиях составления, в том числе с циклодекстрином и без него, а также в отсутствие DPZ или в его присутствии (ФИГ. 3А). Концентрацию MEDI0382 устанавливали на уровне 0,5 мг/мл, что соответствует клинической дозе 300 мкг.

[0116] Перед проведением теста в отношении агрегации вторичную структуру свежеприготовленных составов анализировали посредством CD в дальнем УФ-диапазоне (ФИГ. 3В) и получали ТЕМ-изображения (ФИГ. 4). Раствор MEDI0382 в буфере демонстрировал спектр CD, характерный для структуры типа α -спираль, с положительной полосой при 192 нм и двумя отрицательными полосами при 207 и 222 нм (ФИГ. 3В). Посредством деконволюции спектра с применением CDpro подтверждали наличие большей части α -спиральной конформации (51%) и низкой доли структуры типа β -слой (11%). (См. таблицу 1 ниже.) При составлении HP β CD наблюдали резкую структурную модификацию с положительной полосой при 190 нм меньшей интенсивности, чем в буфере, отрицательной полосой при 203 нм и полосой

низкой интенсивности при 224 нм. Определение вторичной структуры с применением CDPro свидетельствовало о потере спиральности до 18%, компенсированной повышением вклада β -слоя и случайной спирали. (См. таблицу 1 ниже.)

Таблица 1: CDPro MEDI0382

	Альфа-спираль	Бета-лист	Поворот	Неупорядоченная структура
MEDI0382 в буфере, T₀	51,4%	10,7%	15,3%	23,1%
MEDI0382 в 7% HPβCD, T₀	18,1%	26,3%	22,2%	34,0%
MEDI0382 в буфере, T_{конечн.}	49,2%	12,8%	13,5%	24,7%
MEDI0382 в 7% HPβCD, T_{конечн.}	18,1%	26,7%	21,7%	34,8%

[0117] Для совместного состава не удалось получить CD-спектр по причине DPZ, который обладает хиральным центром. Во всех трех составах на основе MEDI0382 отсутствие фибрилл подтверждали с помощью ТЕМ-изображений (ФИГ. 4).

[0118] Затем осуществляли мониторинг кинетики агрегации MEDI0382 в буфере, в циклодекстрине и в совместном составе с DPZ в HP β CD посредством измерения флуоресценции ThT (ФИГ. 3А). Профиль ThT MEDI0382 в буфере следовал сигмоидной кривой, указывающей на образование фибрилл с начальной фазой задержки, составляющей 50 ч, и последующей фазой удлинения, которая, похоже, достигла плато к концу анализа. ТЕМ-изображения, сделанные в конечный момент времени, подтверждали наличие фибрилл (ФИГ. 4). CD-спектр в дальнем УФ-диапазоне после анализа с применением ThT указывал на повышение содержания β -слоев, как и ожидалось для фибрилл, но он также продемонстрировал достаточно высокий процент спиральности, информирующий о структуре фибрилл.

[0119] Интересно, что при добавлении циклодекстрина наблюдали полное подавление фибриллообразования в течение анализа. Отсутствие фибрилл на ТЕМ-изображениях (ФИГ. 4) и неизменный CD-спектр после анализа с применением ThT (ФИГ. 3А) исключают возможность ложного отрицательного результата по причине присутствия циклодекстрина и подтверждают подавляющее действие макроциклической молекулы. Интересно, что способность сдерживать рост фибрилл также наблюдали и в случае лираглутида, другого липидированного аналога GLP1 (ФИГ. 5 и 6).

[0120] Наконец, совместный состав, содержащий MEDI0382 и DPZ в среденосителе HP β CD при pH 7, также подвергали анализу с применением ThT, чтобы

оценить влияние присутствия DPZ на физическую стабильность пептида. DPZ не препятствовал ингибирующему действию циклодекстрина, и фибриллообразование не происходило, что подтверждается ТЕМ-изображениями (ФИГ. 4).

[0121] Для определения механизма, лежащего в основе ингибирующего агрегацию эффекта HP β CD, проводили тщательное определение характеристик с оценкой взаимодействия между макроциклом и активными молекулами.

ПРИМЕР 3. Циклодекстрин образует комплекс включения с MEDI0382 и DPZ

[0122] ANS представляет собой амфифильный краситель, который связывается преимущественно с гидрофобными полостями, и флуоресценция которого зависит от окружающей среды. В полярной среде выход флуоресценции остается низким, в то время как при взаимодействии с гидрофобной поверхностью происходит его повышение. Поскольку АНС способен образовывать комплекс включения с циклодекстрином (Nishijo J, *et al.*, *J Pharm Sci.* 80(1):58-62 (1991)), его использовали для качественного сравнения гидрофобного ядра, имеющегося в различных составах (ФИГ. 7А). При добавлении к среде-носителю, представляющей собой циклодекстрин, флуоресценция ANS значительно усиливалась по сравнению с буфером по причине взаимодействия с полостью циклодекстрина. Интересно, что интенсивность флуоресценции снижалась, если DPZ или MEDI0382 составляли с циклодекстрином, что свидетельствует о том, что обе молекулы лекарственных средств образовывали комплекс включения с циклодекстрином, что приводило к уменьшению гидрофобной поверхности, доступной для зонда на основе ANS. Самую низкую интенсивность среди составов на основе циклодекстрина наблюдали в случае совместного состава на основе DPZ и пептида, что продемонстрировало, что обе молекулы способны взаимодействовать с циклодекстрином, несмотря на присутствие другой молекулы (ФИГ. 7А). ANS также инкубировали с MEDI0382 в буфере, но сигнал оставался низким, так как пептид содержит в основном структуру типа альфа-спираль и поэтому имеет небольшую гидрофобную поверхность (ФИГ. 7А).

[0123] Комплекс с HP β CD дополнительно характеризовали посредством экспериментов с применением изотермической титрационной микрокалориметрии (ИТС) (ФИГ. 9). ИТС представляет собой методику без применения метки, которая позволяет определять термодинамические параметры биомолекулярных взаимодействий посредством измерения тепла, которое выделяется или поглощается в ходе события связывания. (См. Claveria-Gimeno R, *et al*, *Expert Opin Drug Discov.* 12:363-77 (2017) и Klebe G., *Nat Rev Drug Discov.* 14:95-110 (2015)). В последнее

десятилетие ИТС все чаще становится методикой выбора для определения характеристик взаимодействия циклодекстрина с другим соединением из-за ее высокой чувствительности. Такая высокая чувствительность позволяет измерять константы диссоциации от миллимолярного до наномолярного диапазона (Bouchemal K, *et al.*, *Drug Discov Today* 17(11-12):623-9 (2012)). Поэтому данный подход использовали для изучения взаимодействия между MEDI0382 с HP β CD и сравнения с таковым DPZ с HP β CD. Два противоположных термодинамических профиля получали при титровании HP β CD в DPZ или пептиде (ФИГ. 9). Связывание HP β CD:DPZ демонстрировало экзотермический профиль с равным вкладом энтальпии и энтропии, что свидетельствует о благоприятных водородных связях и гидрофобном взаимодействии. Константа аффинности комплекса DPZ:HP β CD, определенная посредством ИТС ($6,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), хорошо согласуется со значением, рассчитанным по диаграмме фазовой растворимости ($4,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$). Стехиометрическое соотношение 1:1 HP β CD:DPZ, определенное ранее по диаграмме фазовой растворимости, подтверждали посредством ИТС, как показано в таблице 2 ниже.

[0124] В отличие от DPZ, взаимодействие HP β CD:MEDI0382 оказалось эндотермическим, характерным взаимодействием под действием энтропии с преобладанием гидрофобного взаимодействия. Подгонка кривой по результатам измерения посредством ИТС свидетельствует о стехиометрическом соотношении, составляющем 3:1. Для сравнения проводили титрование с глюкозагом, а также с нелипидированным аналогом MEDI0382. В обоих случаях термодинамического сигнала не наблюдали, что свидетельствует о том, что липидная цепь является ключевым фактором взаимодействия между циклодекстрином и MEDI0382.

Таблица 2: определенные посредством ИТС термодинамические параметры взаимодействий HP β CD: MEDI0382 и

HP β CD: DPZ

	n	K (M^{-1})	ΔH (ккал/моль)	$-\Delta S$ (ккал/моль)
HP β CD: MEDI0382	2,8	1,02E+04	2,9	-8,4
HP β CD: DPZ	1,2	0,43E+04	-4,2	-0,8

ПРИМЕР 4. НРβCD образует комплекс с MEDI0382 посредством взаимодействия с ароматическими остатками и липидной цепью

[0125] Для того чтобы получить некоторое представление о взаимодействии между НРβCD и MEDI0382, проводили CD-анализ состава в ближнем УФ-диапазоне.

Поскольку при CD в ближнем УФ-диапазоне основную роль играют ароматические хромофоры тирозина (Tyr), фенилаланина (Phe) и триптофана (Trp), изменение сигнала может обеспечить информацию об их микроокружении. Спектры MEDI0382 в буфере и MEDI0382 в циклодекстрине демонстрируют различные паттерны поглощения (ФИГ. 8) для каждой области ароматической аминокислоты, причем наибольшее влияние оказывает Trp. Это свидетельствует об изменении локального окружения для всех трех хромофоров либо по причине вторичных структурных изменений, либо по причине прямого взаимодействия с НРβCD.

[0126] Для дополнительной оценки взаимодействия с Trp подвергали мониторингу собственную флуоресценцию Trp, чтобы получить информацию об изменениях при составлении в циклодекстрине (ФИГ. 7B). Измерения проводили с 0% и 7% циклодекстрином. Максимальные значения собственной флуоресценции триптофана, измеренные при 342 нм в буфере, указывают на экспонированный в растворитель остаток Trp, как ранее сообщалось для денатурированных белков, таких как глюкагон (352 нм) и мелиттин (346 нм) (Ghisaidoobe AB, *et al.*, *Int J Mol Sci.* 15:22518-38 (2014)). Интересно, что при составлении в циклодекстрине наблюдали примерно 2-кратное повышение интенсивности флуоресценции Trp. Снижение интенсивности флуоресценции в буфере, вероятно, является результатом эффекта гашения по причине экспонирования Trp в воде (Muino PL, *et al.*, *J Phys Chem B.* 113:2572-7 (2009)), в то время как повышение флуоресценции может быть связано с переходом к менее полярной среде, такой как полость НРВ. Аналогичное усиление излучения флуоресценции наблюдали со свободной молекулой Trp в присутствии циклодекстрина. Это наблюдение указывает на существование взаимодействия между НРβCD и остатком Trp в MEDI0382.

[0127] Для подтверждения сайтов взаимодействия между циклодекстрином и пептидом проводили 2D NOESY ЯМР-анализ состава на основе MEDI0382 с циклодекстрином по сравнению с MEDI0382 в буфере. 2D NOESY ЯМР-спектры получали с подавлением сигнала от воды из растворов MEDI0382 при 4,3 мг/мл в буфере с 10% НРβCD и без него. Соотношение MEDI0382:циклодекстрин необходимо было снизить по сравнению с составом, чтобы избежать проблем с динамическим диапазоном в спектре NOESY ЯМР. По причине нечувствительности методики ЯМР

концентрацию MEDI0382 значительно повышали (~ в 10 выше по сравнению с составом), тогда как количество циклодекстрина только незначительно повышали, чтобы избежать проблемы с динамическим диапазоном и маскировкой ЯМР-сигналов пептидов. Посредством CD-анализа подтвердили, что несмотря на изменение соотношения вторичная структура была затронута в равной степени с переходом от альфа-спирали к β -слою. ЯМР-спектр пептида был предварительно подтвержден. Однако все аминокислоты еще не были полностью определены в данном растворе. Определение резонанса циклодекстрина осуществляли на основе значений из литературы (*Schneider et al. Chemical Reviews, 1998, Vol. 98, No. 5*). Спектры MEDI0382 в присутствии HP β CD позволили выявить сильные взаимодействия между протонами H-5 и H-6 в HP β CD (ФИГ. 10B) и несколькими протонами из пептида. Перекрестные пики при ~7,55, 7,40, 7,1, 7,05 ppm в F2 и 3,80 ppm в F1 (ФИГ. 10A) указывают на NOE между H5/H-6 в HP β CD с ароматическими протонами 43, 40, 41, 42 в Tgr (ФИГ. 10B). Перекрестные пики при ~7,25 ppm в F2 и 3,80 ppm в F1 (ФИГ. 10A) указывают на NOE между H5/H-6 в HP β CD и ароматическим протоном 36 в Tgr и ароматическими протонами в Phe. Другой NOE наблюдали при 3,75 ppm в F2 и 1,20 ppm в F1 (ФИГ. 10C), что указывает на NOE между циклодекстрином и липидной цепью (ФИГ. 10D).

ПРИМЕР 5. Механизм подавления фибриллообразования обусловлен стерическим затруднением, препятствующим П-П стекингу, а также электростатическим притяжением и взаимодействием с липидами.

[0128] О стабилизирующем эффекте циклодекстрина на пептид ранее сообщалось в литературе для инсулина, амилоида- β и глюкагона (см. Kitagawa K, *et al., Amyloid*. 22:181-6 (2015); Matilainen L, *et al., J Pharm Sci.* 97:2720-9 (2008), и Ren B, *et al., Phys Chem Chem Phys.* 18:20476-85 (2016)). Однако эффект проявлялся только в виде задержки по времени на несколько часов или снижения количества фибрилл; полного ингибирования не было достигнуто, несмотря на сходное соотношение пептид:циклодекстрин, использованное в случае инсулина и глюкагона. Это различие, вероятно, вызвано процессом фибриллообразования пептида и типом взаимодействий между циклодекстрином и пептидом. Для пептидов, о которых сообщалось в литературе, Tgr и Phe являются распространенным сайтом преимущественного взаимодействия с бета-циклодекстринами (см. Kitagawa (2015); Matilainen (2008); Ren (2016); и Qin XR, *et al., Biochem Biophys Res Commun.* 297:1011-15 (2002)). Образование комплекса включения между циклодекстрином и ароматическими остатками, возможно, способно предотвратить меж/внутримолекулярные П-П взаимодействия. Взаимодействие с Tgr и Phe было четко продемонстрировано для MEDI0382

посредством дальнего УФ-диапазона, флуоресценции Тгр и ЯМР-анализов. Кроме того, при составлении в циклодекстрине наблюдали значительное изменение вторичной структуры со снижением вклада альфа-спирали, компенсируемым высоким содержанием β -слоя, как оценено посредством CD рго. Это превращение свидетельствует о том, что при составлении в циклодекстрине сеть Н-связей, обычно стабилизирующих спиральную структуру, нарушается, возможно по причине преимущественно образования Н-связей между НР β CD и несколькими аминокислотами. Поскольку определение пептидов посредством ЯМР еще не полностью завершено, анализ взаимодействия был ограничен аминокислотами, которые были определены. Поэтому проводили компьютерное моделирование с прогнозированием дополнительного взаимодействия, происходящего между НР β CD и MEDI0382. Интересно, что моделирование продемонстрировало тепловое движение липидной цепи, приводящее к образованию комплекса включения с полостью циклодекстрина, который сохранялся на протяжении моделирования. Более того, анализ моделирования позволил выявить многочисленные взаимодействия водородных связей, возникающие между НР β CD и несколькими аминокислотными остатками, включая аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu) и N-концевой гистидин (His) (ФИГ. 11). Помимо подтверждения гипотезы о том, что модификация вторичной структуры происходит за счет Н-связей, это наблюдение дает новое представление о механизме фибриллообразования. Значение рКа кислотных остатков Glu и Asp в качестве боковой цепи составляет 3,9 и 4,0 соответственно, в то время как N-концевой His представляет две основные группы, альфа-аминогруппу и имидазольную группу. В глюкогене, который характеризуется структурой, сходной с MEDI0382, значение рКа 2 функциональных групп от His составляло 7,6 и 7,4 соответственно (Hefford MA, *et al.*, *Biochemistry* 24(4):867-74 (1985)). Поэтому при рН 7 оба Glu и Asp заряжены отрицательно, тогда как His заряжен положительно, что может способствовать образованию фибрилл посредством электростатического взаимодействия. Однако, если MEDI0382 составляется в циклодекстрине, комплекс включения с заряженным остатком может стерически препятствовать самосборке. Наконец, хотя роль липидной цепи в процессе агрегации изучена недостаточно хорошо, взаимодействие с циклодекстрином, подтвержденное посредством ЯМР, ИТС и моделирования, может создавать дополнительное стерическое затруднение для самосборки.

ПРИМЕР 6. Влияние pH на инкретиновые пептиды, составленные совместно с DPZ в циклодекстрине

- [0129]** Чтобы оценить влияние pH на инкретиновые пептиды с DPZ в циклодекстрине совместные составы оценивали при pH 6,5 и 8 с применением (i) собственной флуоресценции trp, (ii) кругового дихроизма (CD) до и после анализа с применением Tht и (iii) ТЕМ и визуализации с помощью атомно-силового микроскопа (AFM) после анализа с применением Tht.
- [0130]** Внутреннюю флуоресценцию Trp использовали для сравнения составов на основе MEDI0382 при pH 6,5 и 8 в присутствии циклодекстрина и в его отсутствие. В отсутствие циклодекстрина повышение pH с 6,5 до 8 было связано со смещением флуоресценции trp в красную область с 344 нм до 348 нм соответственно. Напротив, при составлении в циклодекстрине $\lambda_{\text{макс. trp}}$ измеряли при 346 нм независимо от pH. Кроме того, интенсивность флуоресценции повысилась в 2 раза (ФИГ. 12, слева). CD-спектры в дальнем УФ-диапазоне также демонстрировали резкое структурное изменение при составлении в циклодекстрине с потерей спиральности до 18-19%, компенсируемой повышением вклада β -слоя и случайной спирали (ФИГ. 12, справа).
- [0131]** При pH 6,5 профиль Tht демонстрировал очень короткое время задержки, за которым следовала 30-часовая фаза роста перед достижением плато (ФИГ. 13). AFM-изображение, сделанное в конце анализа, подтвердило присутствие волокон (ФИГ. 14), а CD-спектр после анализа с применением Tht указывал на потерю спиральности (ФИГ. 15). При повышении pH до 8 флуоресценция Tht оставалась на уровне контрольного буфера (фиг. 13), что свидетельствует об отсутствии образования волокон, что подтверждается отсутствием упорядоченных агрегатов на AFM-изображениях (ФИГ. 14).
- [0132]** Интересно, что при добавлении циклодекстрина при pH 6,5, несмотря на то, что образование волокон MEDI0382 в буфере происходило быстро (время задержки = 3 часа), циклодекстрин полностью подавлял агрегацию в ходе анализа (ФИГ. 13). Отсутствие волокон на AFM-изображении (ФИГ. 14) и отсутствие изменения CD-спектра до и после анализа с применением ThT (ФИГ. 15) исключают возможность ложного отрицательного результата по причине присутствия циклодекстрина и подтверждают подавляющее действие макроциклической молекулы.
- [0133]** Анализ кинетики агрегации также проводили с совместным составом при pH 6,5 и pH 8. Анализ с применением Tht при pH 6,5 демонстрировал повышение флуоресценции на 75 часов в случае совместного состава, что не наблюдалось в случае MEDI0382 отдельно в циклодекстрине (ФИГ. 16). Однако по сравнению с MEDI0382 в

буфере фаза задержки была намного длиннее в случае совместного состава, что означает, что фибриллообразование все же происходило с задержкой (ФИГ. 16). В отличие от рН 6,5, при рН 8 совместный состав оказался стабильным (ФИГ. 16).

[0134] Сходные эксперименты также проводили с использованием совместных составов на основе лираглутида. Циклодекстрин, по-видимому, снижает степень фибриллообразования лираглутида при рН 6,5, как измерено в анализе с применением Tht (ФИГ. 17). Сходно с MEDI0382, циклодекстрин изменяет вторичную структуру лираглутида как при рН 6,5, так и при рН 8, и CD при рН 6,5 после Tht позволил подтвердить присутствие волокон в буфере и в составе на основе циклодекстрина (ФИГ. 18).

[0135] Эти результаты демонстрируют, что циклодекстрин способен повышать стабильность липидированных инкретиновых пептидов при по меньшей мере от рН 6,5 до 8.

ПРИМЕР 7. MEDI0382, составленный совместно с DPZ в циклодекстрине, сохраняет активность

[0136] Хотя HP β CD повышает физическую стабильность пептида, потеря альфа-спирали может оказать значительное влияние на активность пептида. Несколько исследований действительно доказали, что вторичная структура GLP-1 и аналога GLP-1 играет фундаментальную роль в связывании с соответствующим рецептором и его активации (см. например, Donnelly D., *Br J Pharmacol.* 166:27-41 (2012)). Более конкретно, α -спиральная структура, по-видимому, является ключевым фактором, определяющим аффинность и активность пептида (Adelhorst K, et al., *J Biol Chem.* 269:6275-8 (1994)). Поэтому биологическую активность MEDI0382 оценивали *in vitro* на рецепторах GLP1 и глюкагона с оценкой влияния присутствия циклодекстрина и DPZ на его агонистические свойства. Удельную активность *in vitro* оценивали на клетках CHO, сверхэкспрессирующих человеческие рекомбинантные рецепторы GLP-1 или глюкагона, и активность представляли в виде значений EC50 после измерения накопления cAMP. Как показано на ФИГ. 19А и 19В, не наблюдали изменения EC50 для любого из рецепторов независимо от состава. Кроме того, стоит отметить, что ни среда-носитель, ни DPZ в среде-носителе не демонстрировали активности в отношении рецепторов. Совместный состав совместим с частотой приема один раз в день как для MEDI0382, так и для DPZ.

[0137] Эффективность MEDI0382 в совместном составе окончательно оценивали *in vivo* с оценкой влияния циклодекстрина и присутствия DPZ (ФИГ. 19С и D).

Фармакокинетическое исследование MEDI0382 проводили в циклодекстрине отдельно или в совместном составе с DPZ и сравнивали с фармакокинетикой MEDI0382 в буфере после подкожной инъекции крысам. Профиль зависимости концентрации MEDI0382 в плазме крови от времени и соответствующие параметры PK представлены на ФИГ. 19C и в таблице 3. Временной профиль концентрации DPZ в плазме крови представлен на ФИГ. 19D.

Таблица 3: Средние параметры PK MEDI0382

Доза MEDI0382 (мг/кг)	Состав	C _{max} (SD) (нг/мл)	T _{max} ¹ (ч)	Период полувыведения (SD) (ч)	AUC _{inf} (SD) (нг.ч/мл)
0,05	Буфер	235 (5,4)	4	5,7 (0,3)	3207 (237)
0,05	MEDI0382 в 7% HPβCD	346 (74)	1	5,8 (0,5)	3850 (972)
0,05	MEDI0382 + DPZ в 7% HPβCD	391 (37)	1	4,9 (1,2)	3682 (531)

C_{max} = максимальная концентрация в плазме крови; T_{max} = время достижения максимальной концентрации в плазме крови; AUC_{inf} = площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени до бесконечности; SD = стандартное отклонение

(1) T_{max} представлено в виде медианных значений

[0138] MEDI0382 в буфере демонстрировал кинетику медленного всасывания с достижением максимальной концентрации через 4 ч после инъекции. При составлении только с циклодекстрином T_{max} было значительно короче (1 ч против 4 ч для составов на основе HPβ и буферных составов соответственно), а C_{max} была в примерно 1,5 раза выше, чем у буферного состава. Сходным образом, общее воздействие было повышено в 1,2 раза в присутствии циклодекстрина. Присутствие DPZ в группе совместного состава не вызвало какого-либо дальнейшего изменения в PK по сравнению с MEDI0382 в циклодекстрине. Фаза выведения MEDI0382 оставалась сходной во всех трех составах, что свидетельствует о том, что состав не влияет на выведение MEDI0382, главным образом за счет связывания с альбумином.

[0139] Кроме того, PK DPZ оставалась неизменной в присутствии MEDI0382.

[0140] Эти данные демонстрируют, что совместные составы на основе MEDI0382 и DPZ в циклодекстрине сохраняют стабильность и биологическую активность MEDI0382 в отношении рецепторов GLP1 и глюкагона *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, совместные составы совместимы с частотой приема один раз в день как для MEDI0382, так и для DPZ.

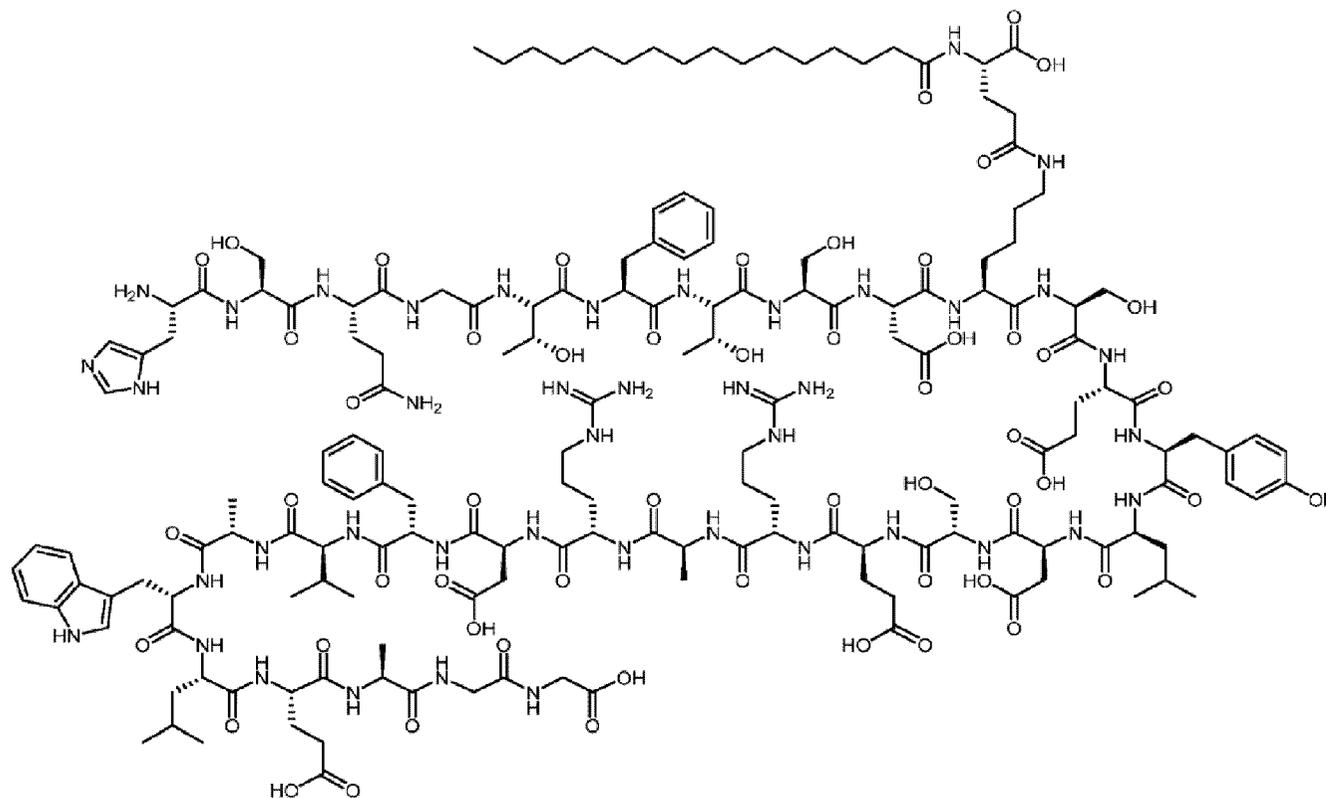
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая фармацевтическая композиция, содержащая (i) липидированный инкретиновый пептид, (ii) ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2i) и (iii) циклодекстрин.
2. Композиция по п. 1, где инкретиновый пептид является монолипидированным.
3. Композиция по п. 1 или п. 2, где инкретиновый пептид представляет собой пептид, являющийся двойным агонистом GLP-1/глюкагона.
4. Композиция по любому из пп. 1-3, где инкретиновый пептид представляет собой MEDI0382, лираглутид или семаглутид.
5. Композиция по любому из пп. 1-4, где SGLT2i представляет собой дапаглифлозин.
6. Композиция по любому из пп. 1-5, где циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин, где необязательно бета-циклодекстрин представляет собой гидроксипропил- β -циклодекстрин.
7. Композиция по любому из пп. 1-5, где циклодекстрин представляет собой сульфобутиловый эфир циклодекстрина.
8. Композиция по любому из пп. 1-7, где липидированный инкретиновый пептид присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл.
9. Композиция по любому из пп. 1-8, где SGLT2i присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 17 мг/мл.
10. Композиция по любому из пп. 1-9, где циклодекстрин присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 7% вес/объем.
11. Композиция по любому из пп. 1-10, где SGLT2i и циклодекстрин характеризуются стехиометрическим соотношением, составляющим приблизительно 1:1.
12. Композиция по любому из пп. 1-11, где композиция характеризуется рН от приблизительно 6,5 до приблизительно 8 или от приблизительно 7 до приблизительно

- 8, где необязательно композиция характеризуется рН, составляющим приблизительно 7.
13. Композиция по любому из пп. 1-12, где композиция характеризуется объемом, составляющим 1 мл или меньше.
14. Композиция по любому из пп. 1-13, где композиция предназначена для парентерального введения, где необязательно парентеральное введение представляет собой подкожное введение.
15. Композиция по любому из пп. 1-14, где композиция содержит комплексы включения, содержащие липидированный инкретиновый пептид, SGLT2i и циклодекстрин.
16. Композиция по любому из пп. 1-15, где композиция не содержит фибриллы липидированного инкретинового пептида.
17. Композиция по любому из пп. 1-16, где композиция не снижает аффинность липидированного инкретинового пептида в отношении рецептора GLP-1 и/или рецептора глюкагона.
18. Композиция по любому из пп. 1-17, где введение композиции крысе приводит к достижению C_{max} липидированного инкретинового пептида, составляющей приблизительно 390 нг/мл, T_{max} липидированного инкретинового пептида, составляющего приблизительно 1 час, периода полувыведения липидированного инкретинового пептида, составляющего приблизительно 5 часов, и/или AUC_{0-inf} липидированного инкретинового пептида, составляющей приблизительно 3500-4000 нг.ч/мл.
19. Шприц-ручка для инъекций, содержащий композицию по любому из пп. 1-18, где необязательно шприц-ручка для инъекций обеспечивает доставку приблизительно 600 мкл композиции.
20. Способ лечения диабета 2 типа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту композиции по любому из пп. 1-18, где необязательно субъект характеризуется избыточным весом или страдает ожирением.
21. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (NASH) или неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение

субъекту композиции по любому из пп. 1-18, где обязательно субъект характеризуется избыточным весом или страдает ожирением.

22. Способ снижения количества жира в печени субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту композиции по любому из пп. 1-18, где обязательно субъект характеризуется избыточным весом или страдает ожирением.
23. Способ по любому из пп. 20-22, где при введении пациенту доставляют приблизительно 10 мг SGLT2i и/или приблизительно 300 мкг липидированного инкретинового пептида.
24. Способ по любому из пп. 20-23, где введение является дополнением к режиму питания и физической нагрузке.

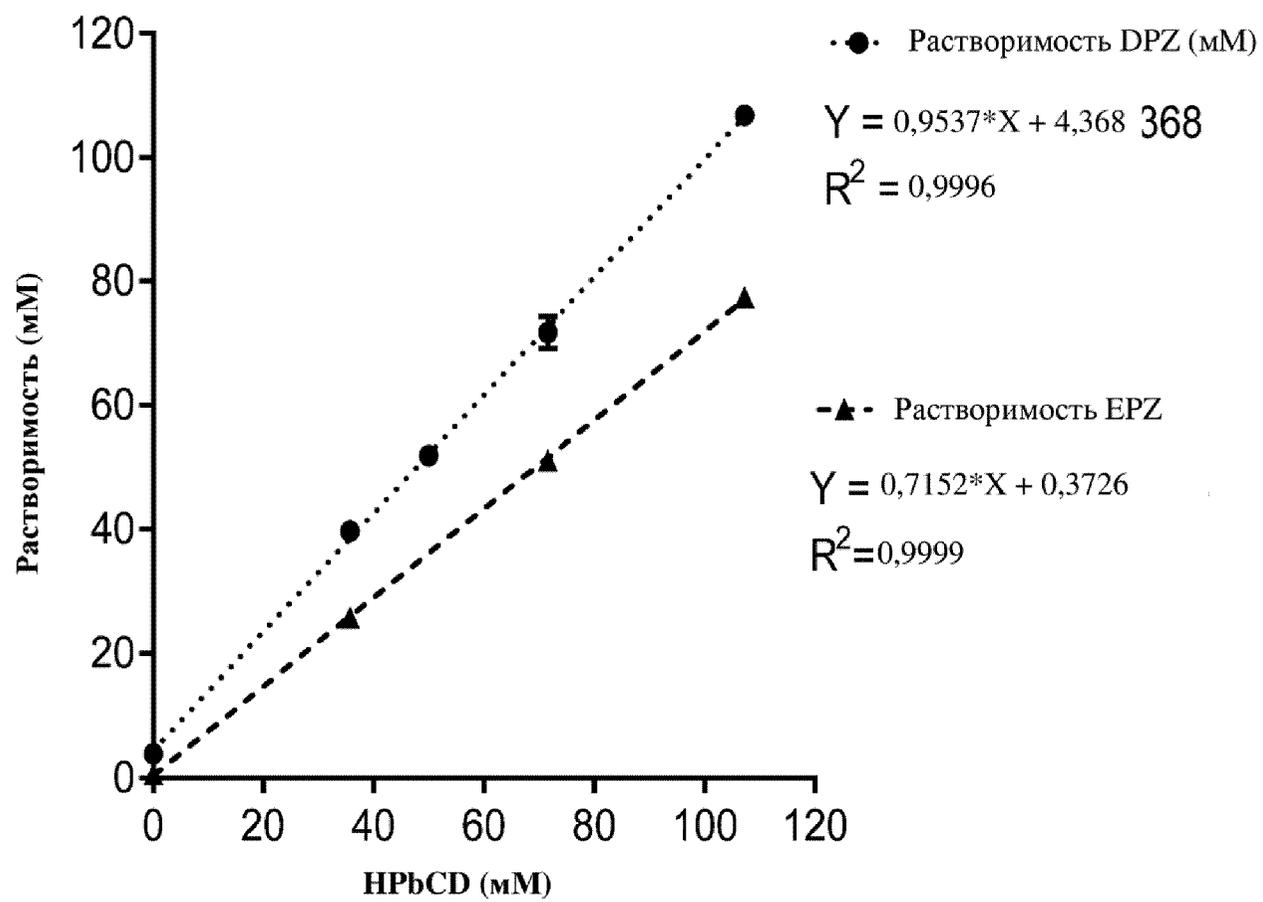


Молекулярная формула: $C_{167}H_{252}N_{42}O_{55}$

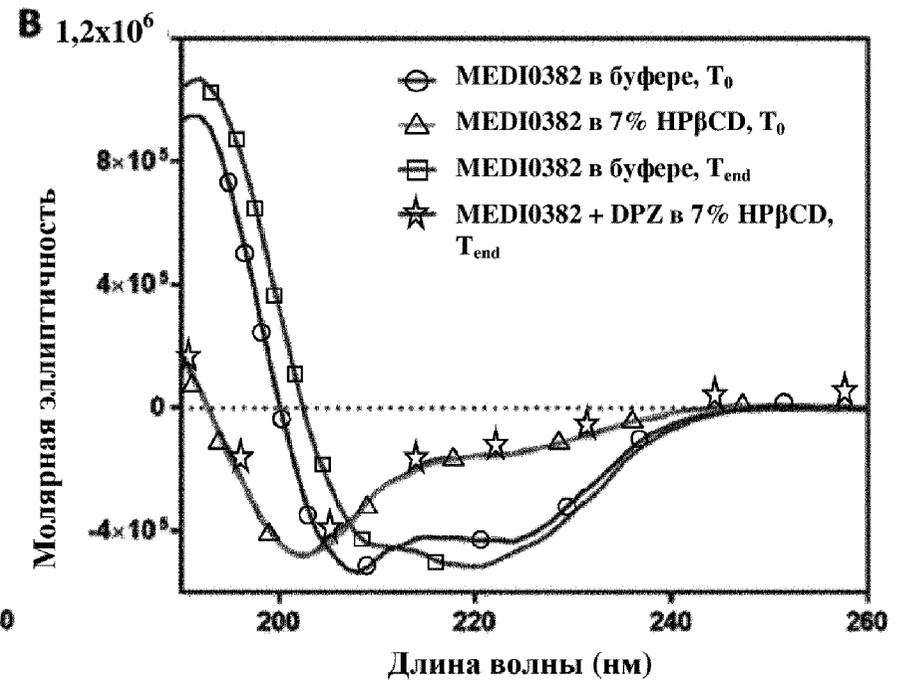
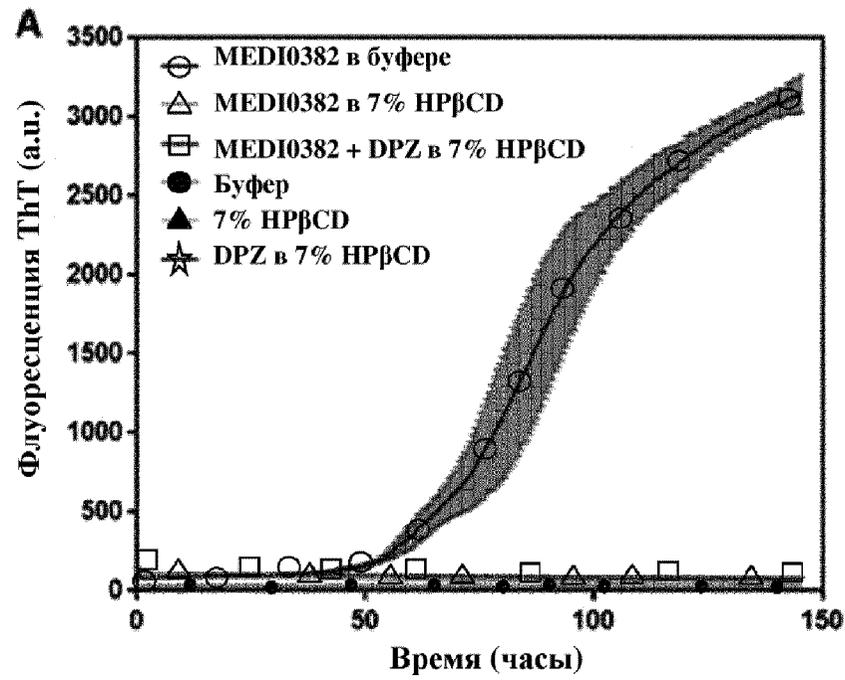
Молекулярная масса: 3728,03618

HisSerGlnGlyThrPheThrSerAspLys[Glu.C(O)C16]SerGluTyrLeuAspSer
 GluArgAlaArgAspPheValAlaTrpValGluAlaGlyGly (SEQ ID NO:4)

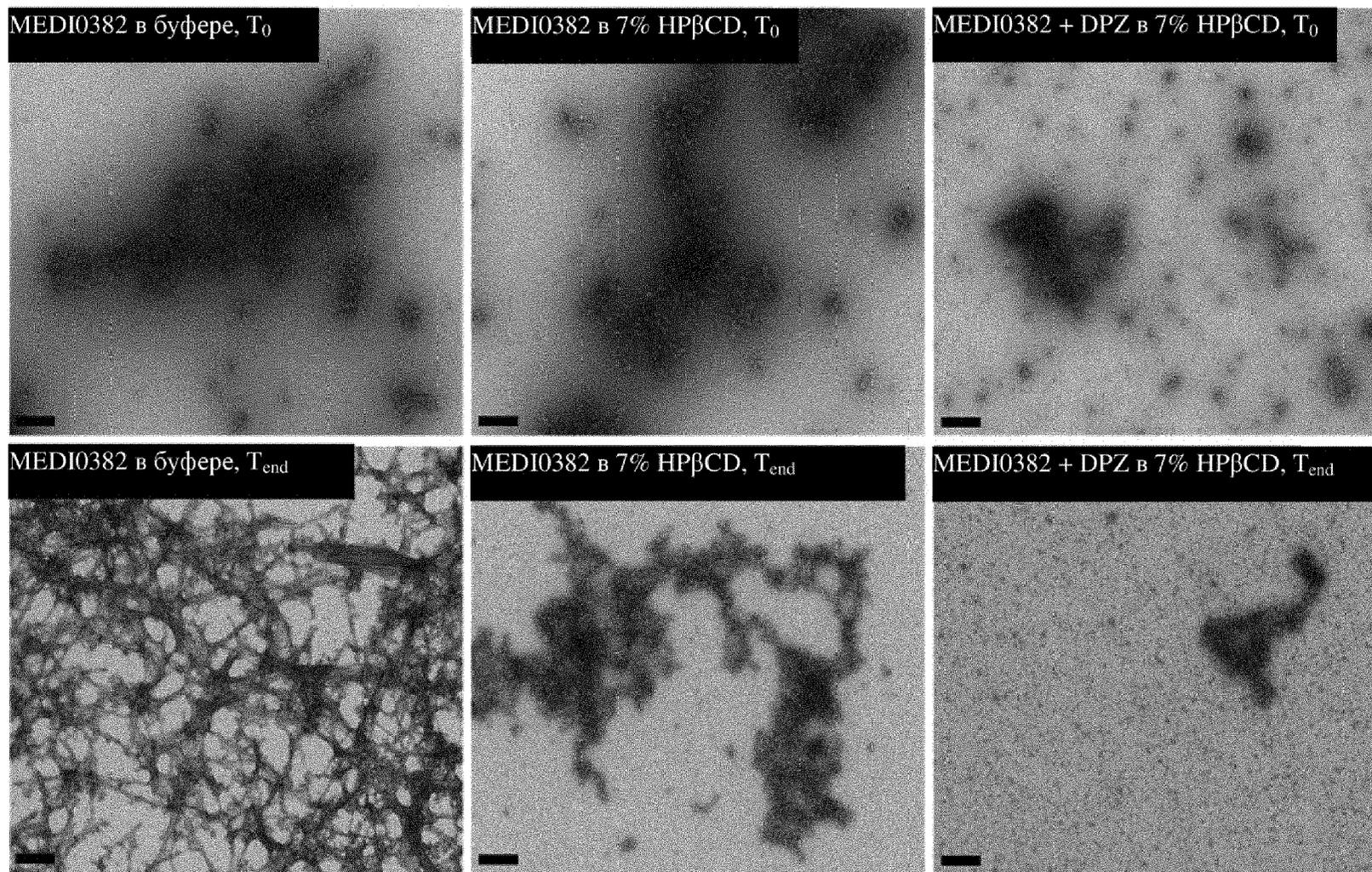
ФИГ. 1



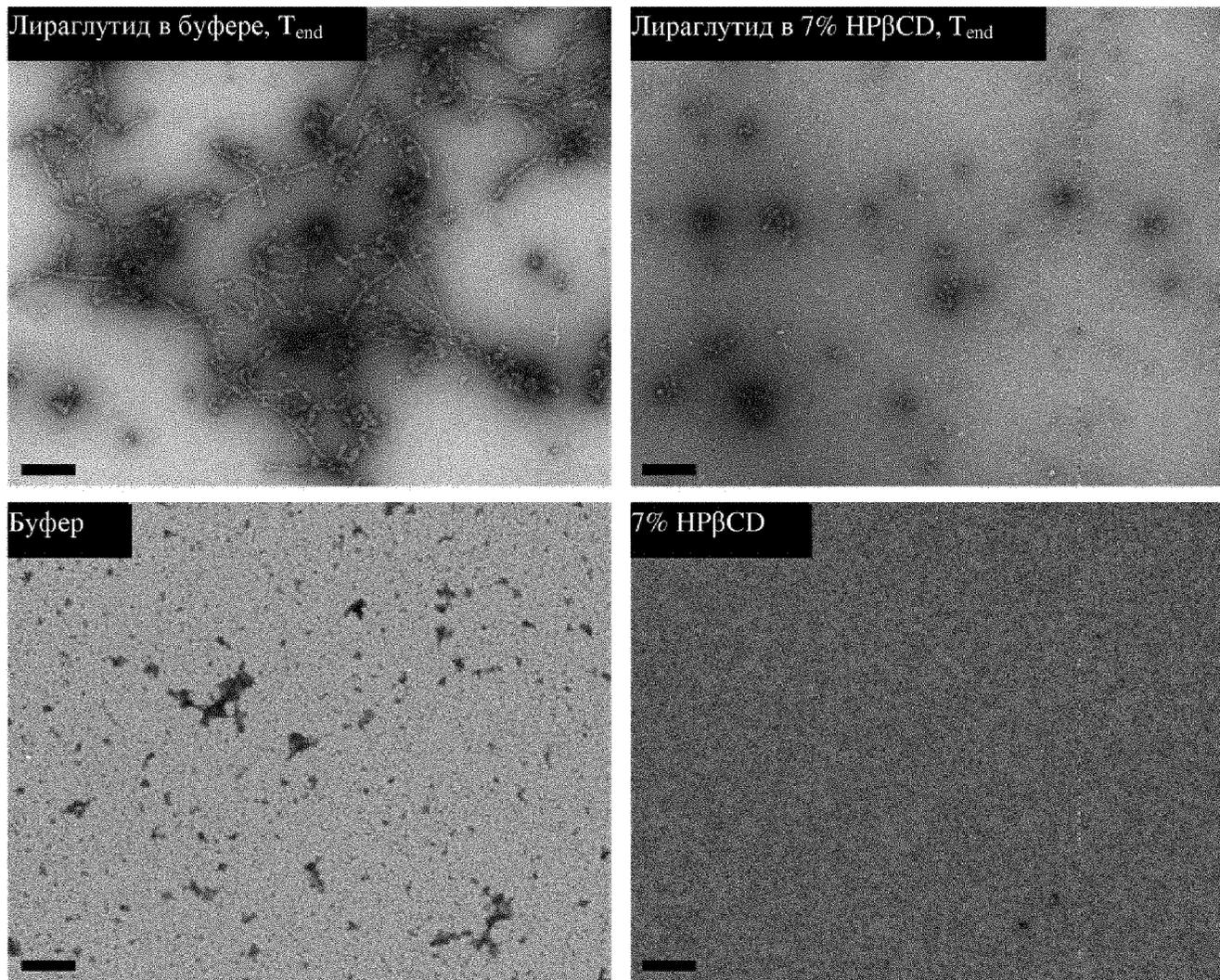
ФИГ. 2



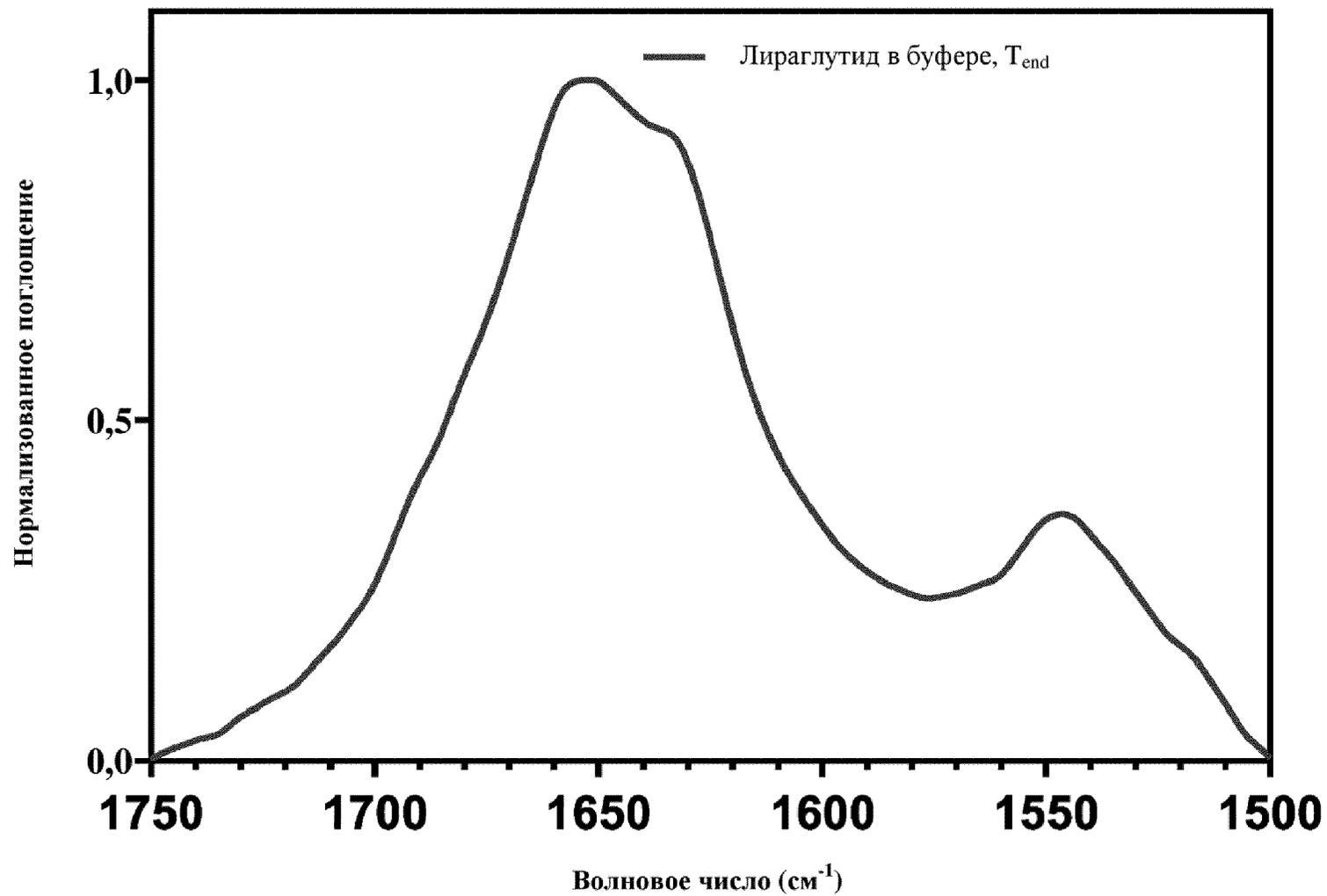
ФИГ. 3



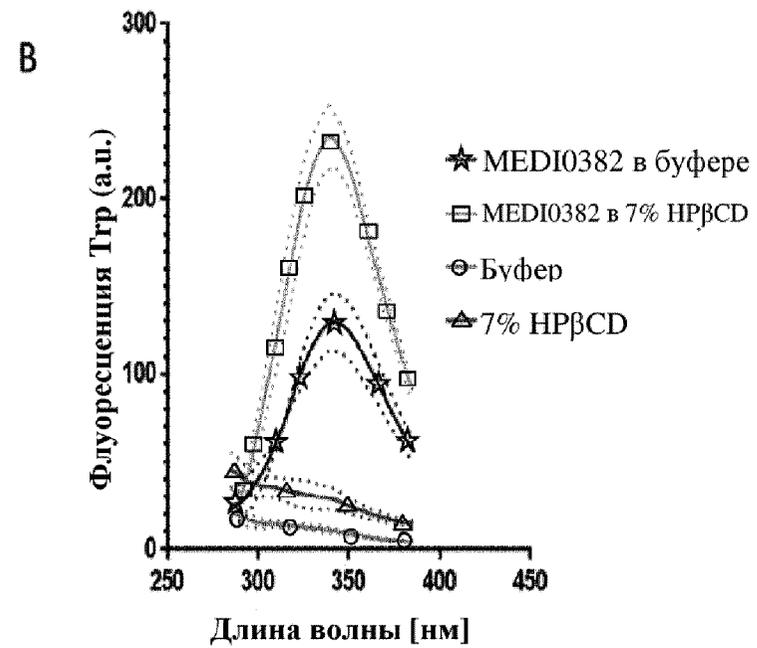
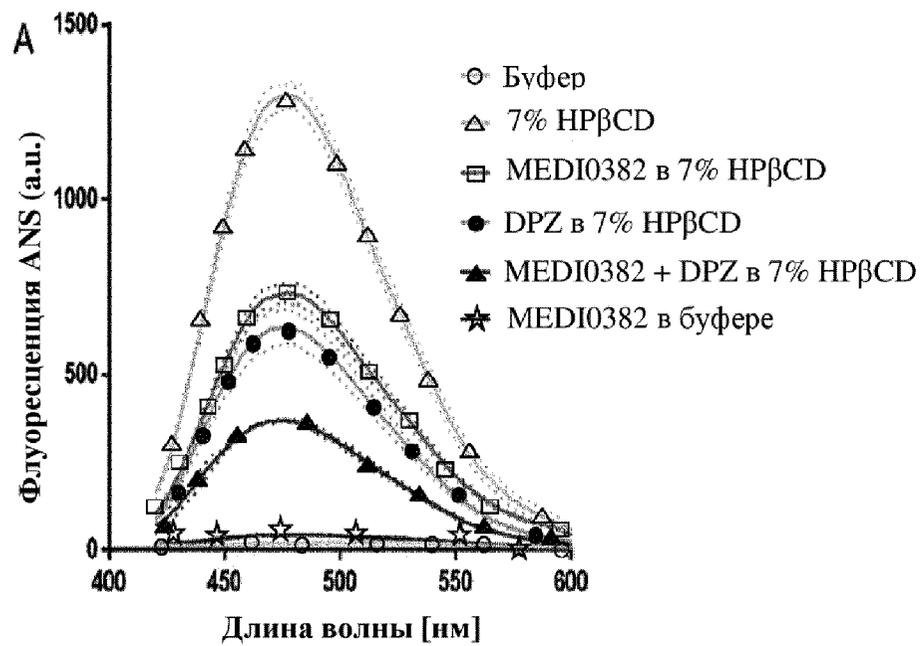
ФИГ. 4



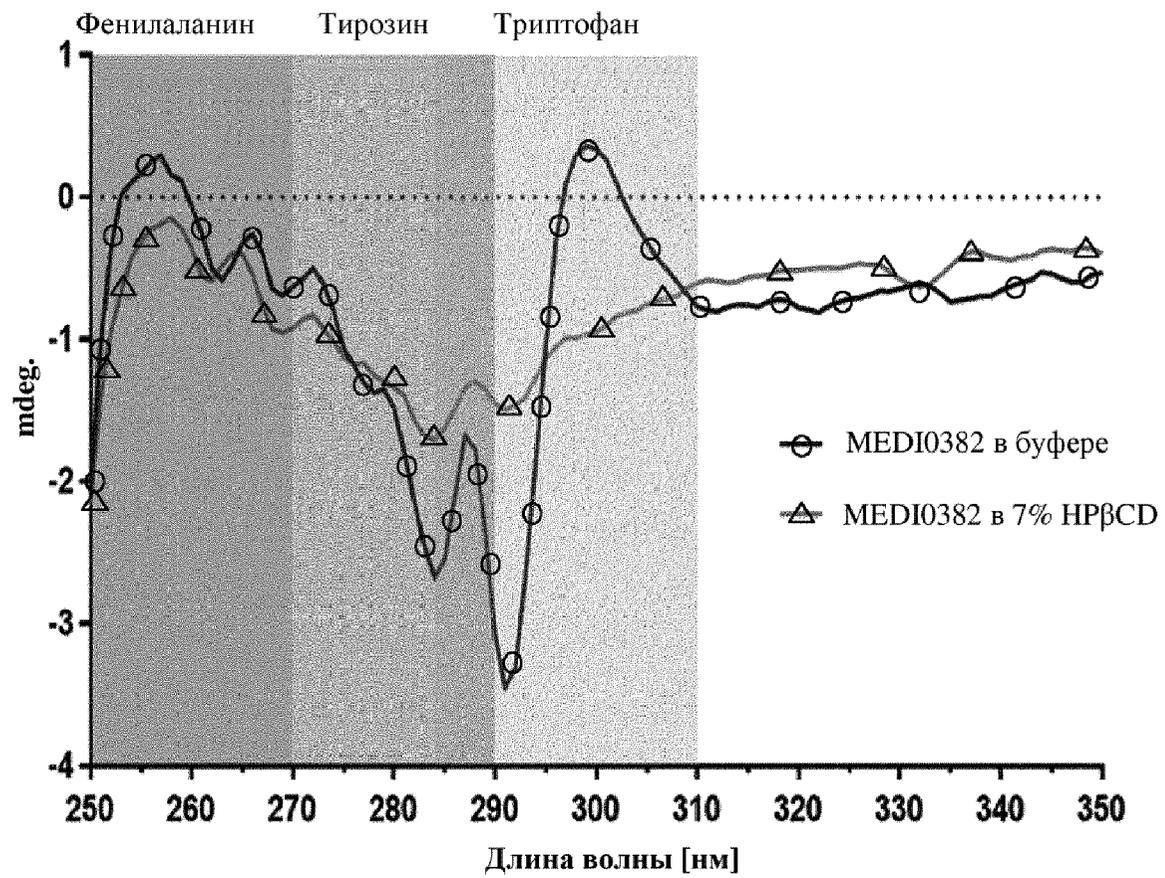
ФИГ. 5



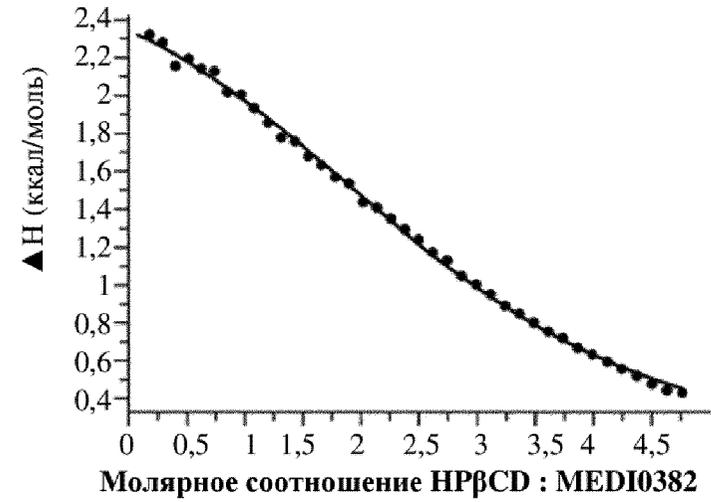
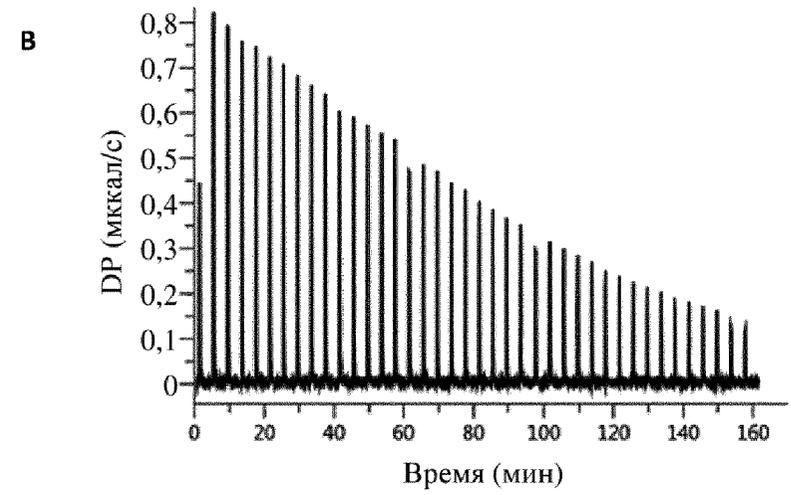
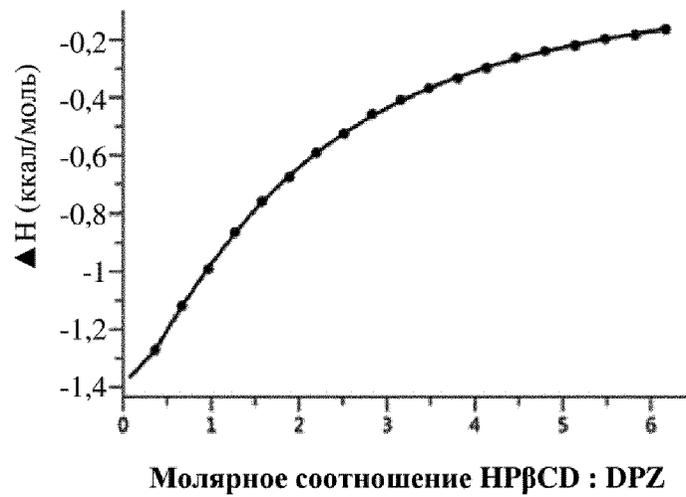
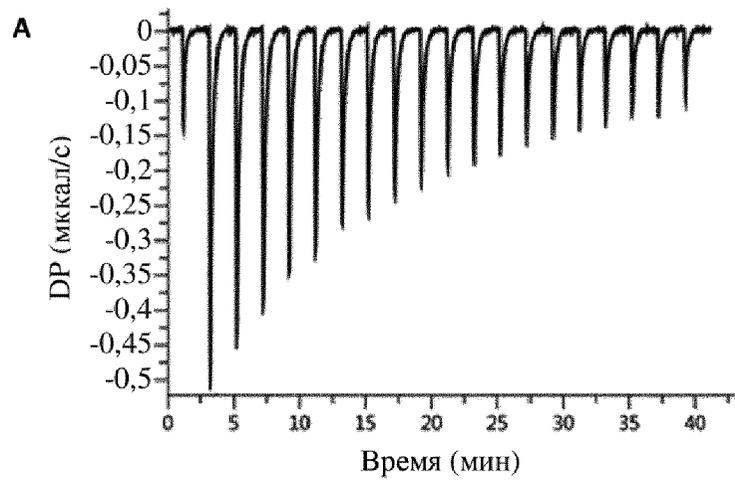
ФИГ. 6



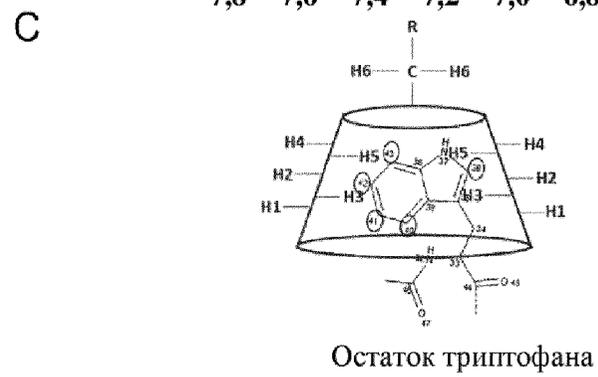
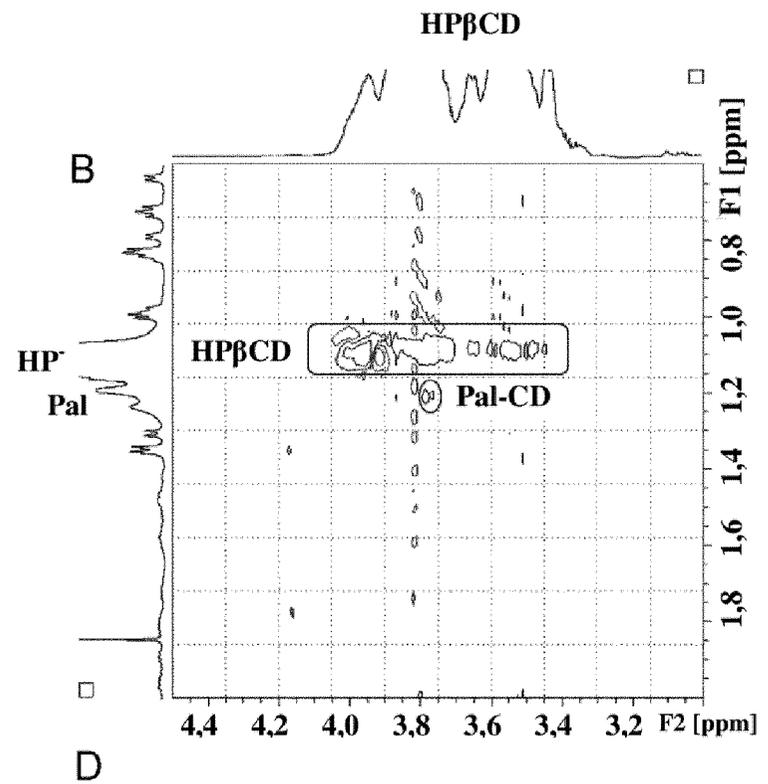
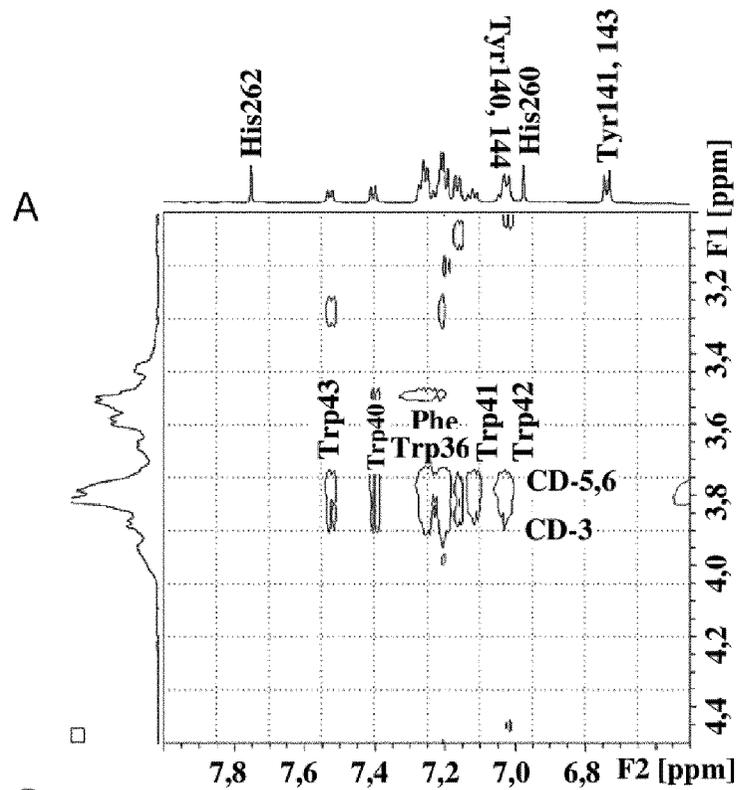
ФИГ. 7



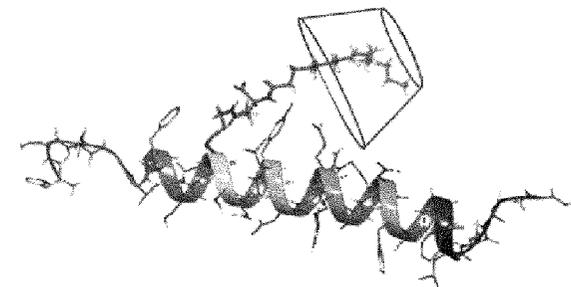
ФИГ. 8

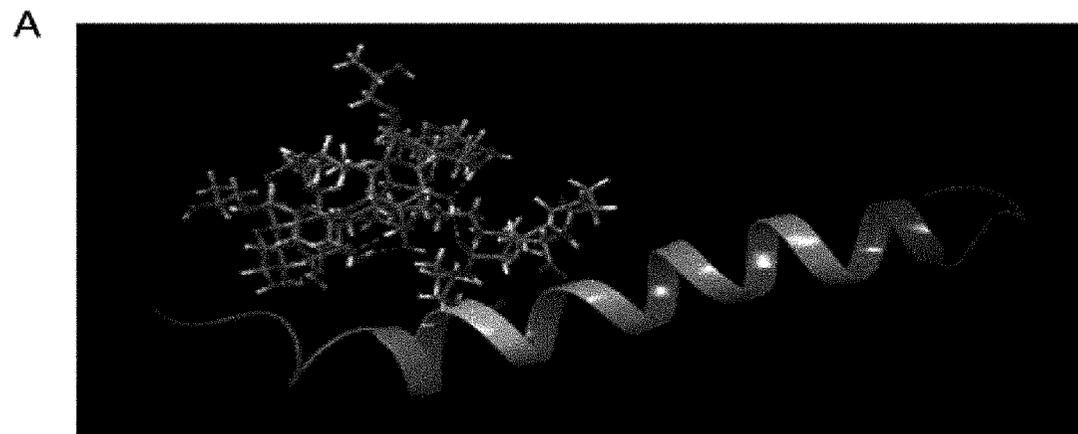


ФИГ. 9

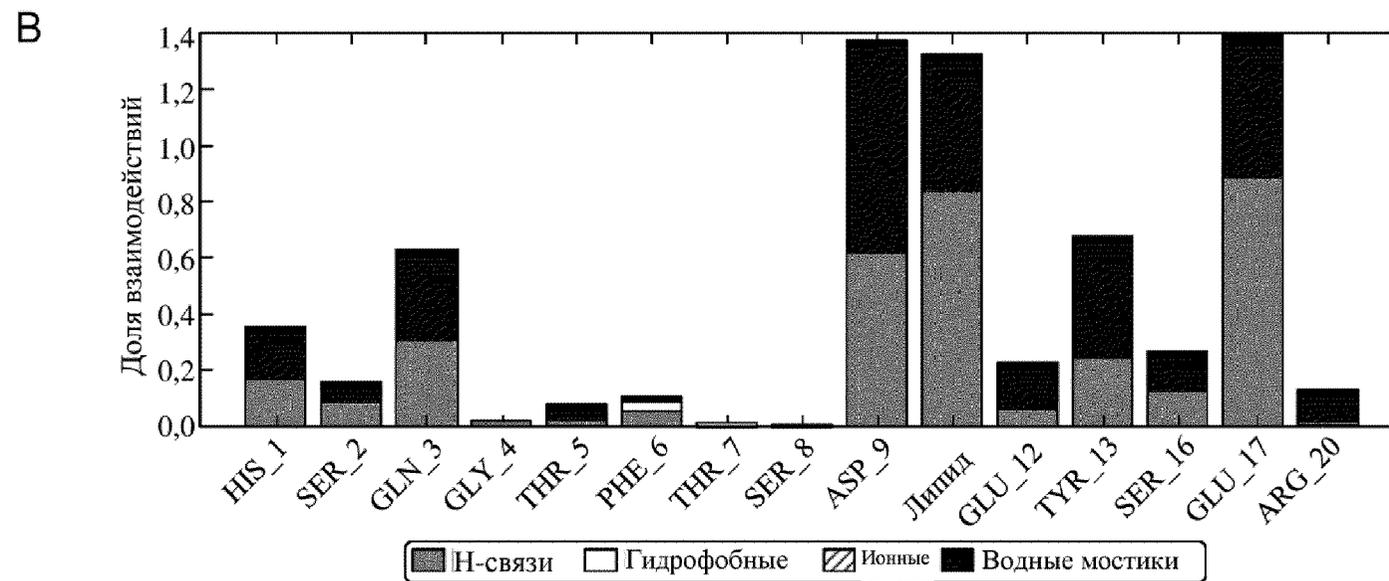


ФИГ. 10

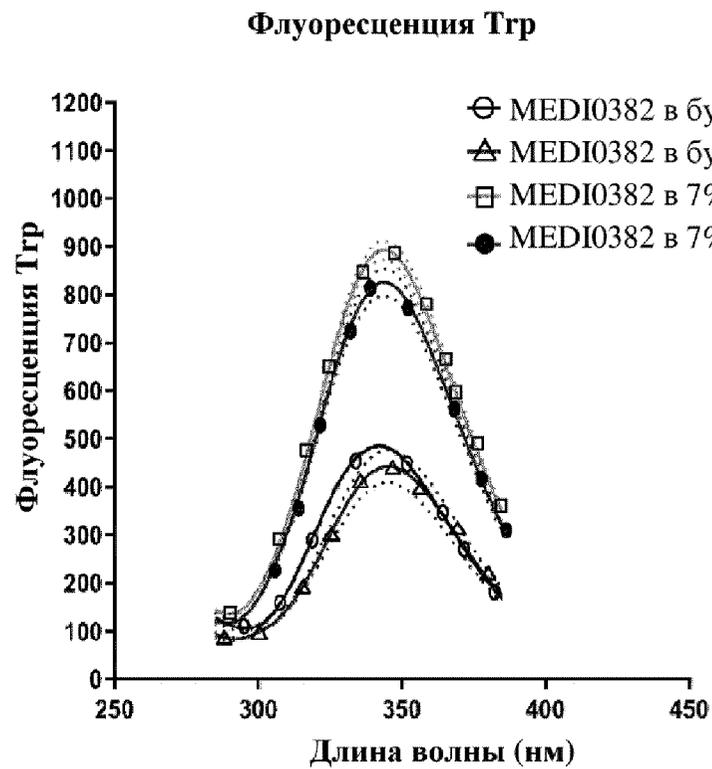




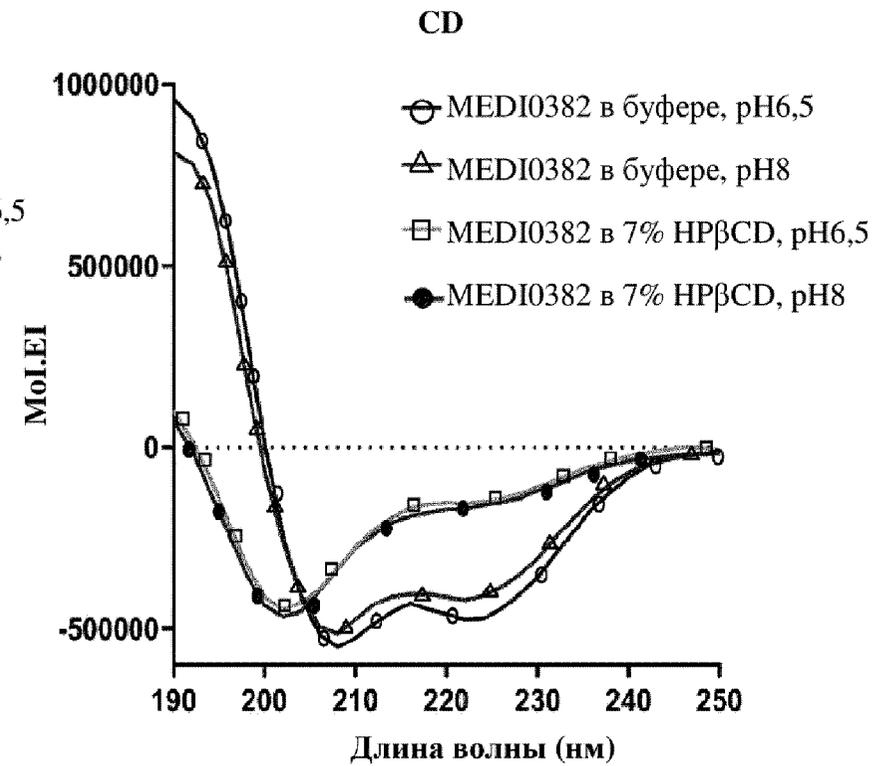
Контакты белок-лиганд



ФИГ. 11



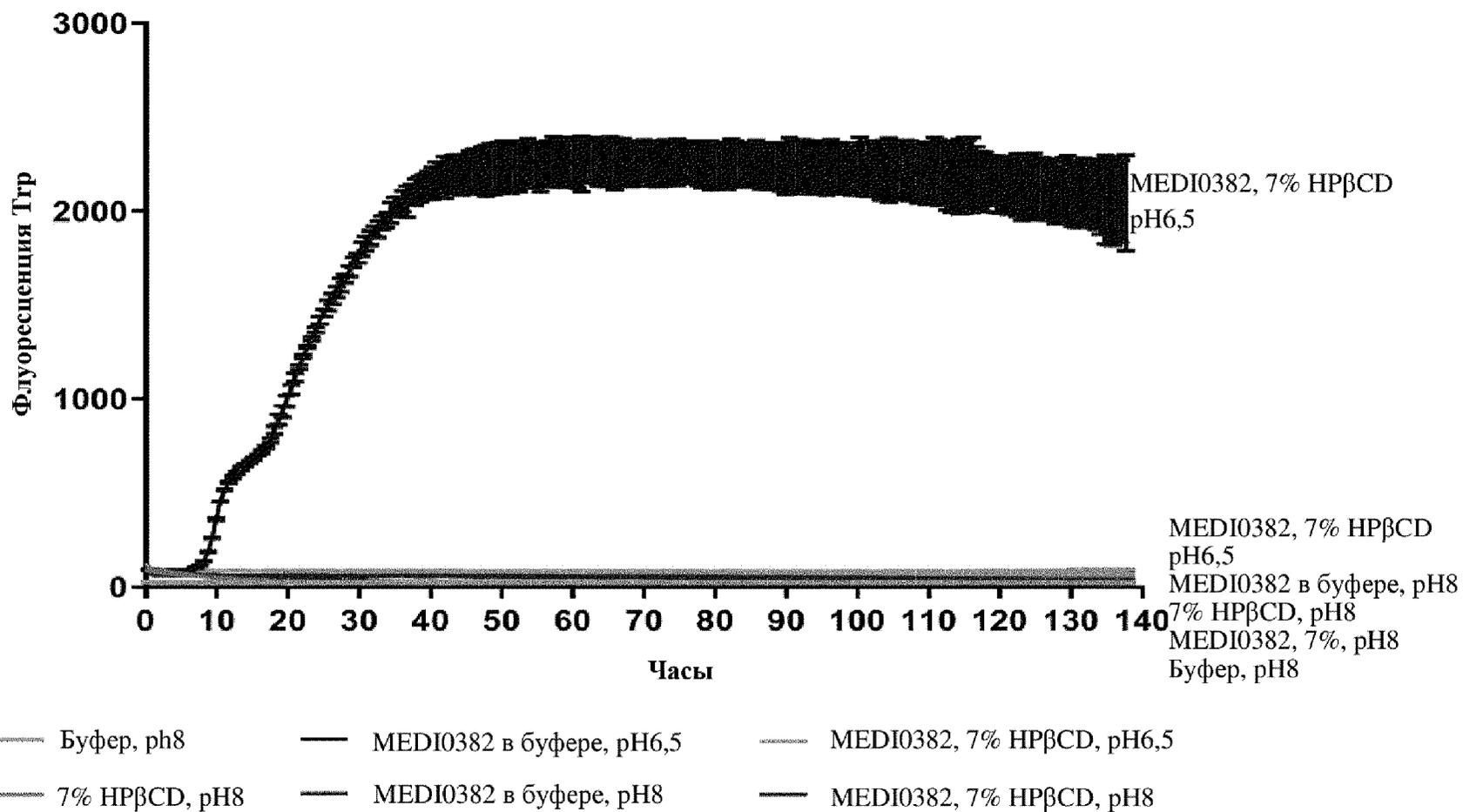
$\lambda_{\text{макс.}}$ (нм)	pH 6,5	pH 8
Буфер	344 ± 1	348 ± 1
7% HPβCD	346 ± 1	346 ± 1



	α -спираль	β -слой (%)	Повороты (%)	Неупорядоченная структура (%)
Буфер, pH6,5	56 ± 4	8 ± 3	15 ± 2	22 ± 5
Буфер, pH8	49 ± 4	8 ± 4	17 ± 3	25 ± 4
HPβCD, pH6,5	18 ± 1	26 ± 2	22 ± 1	33 ± 0
HPβCD, pH8	19 ± 1	27 ± 1	22 ± 1	33 ± 0

ФИГ. 12

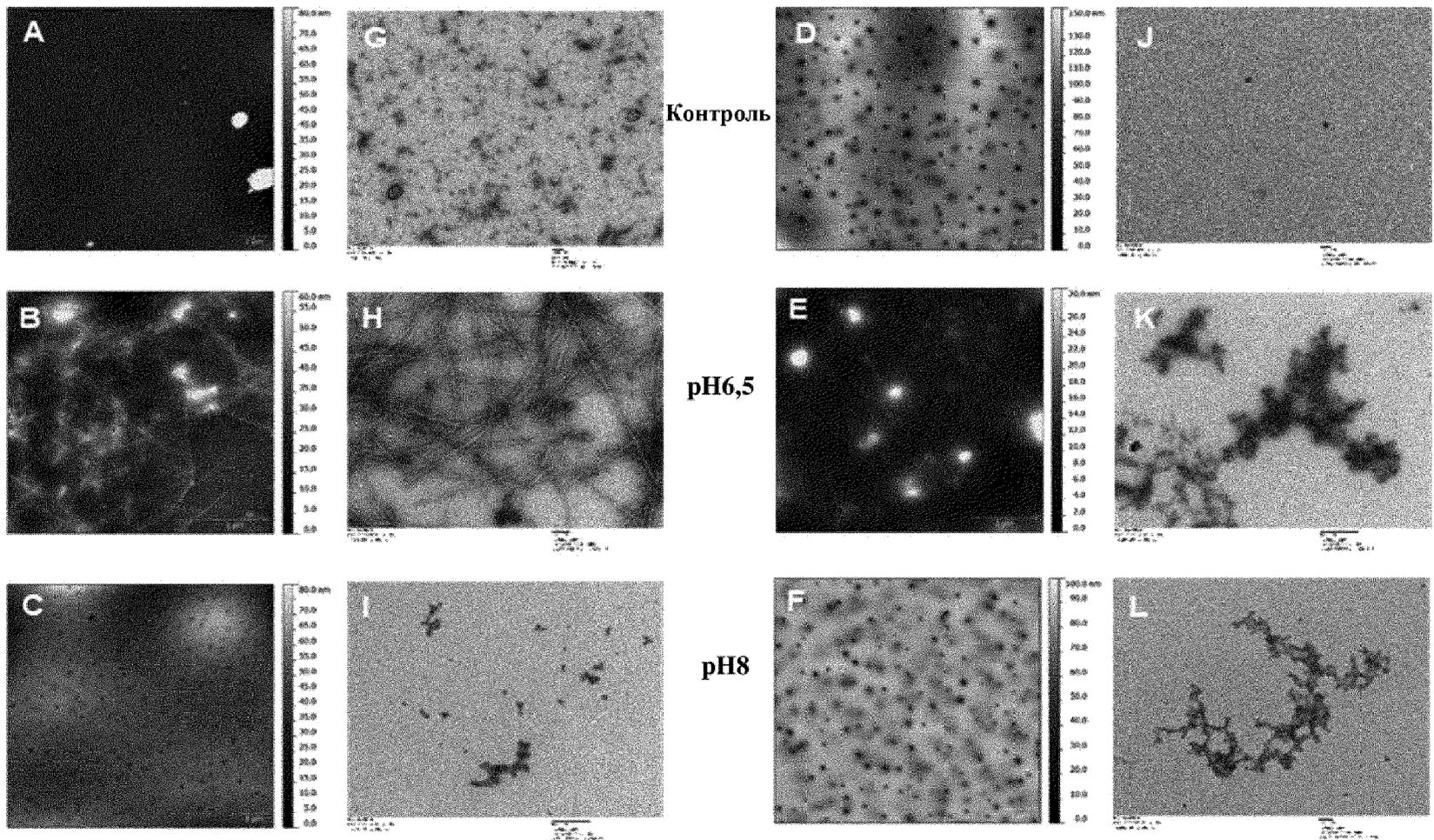
Анализ с применением Tht



ФИГ. 13

Буфер

7% HPβCD

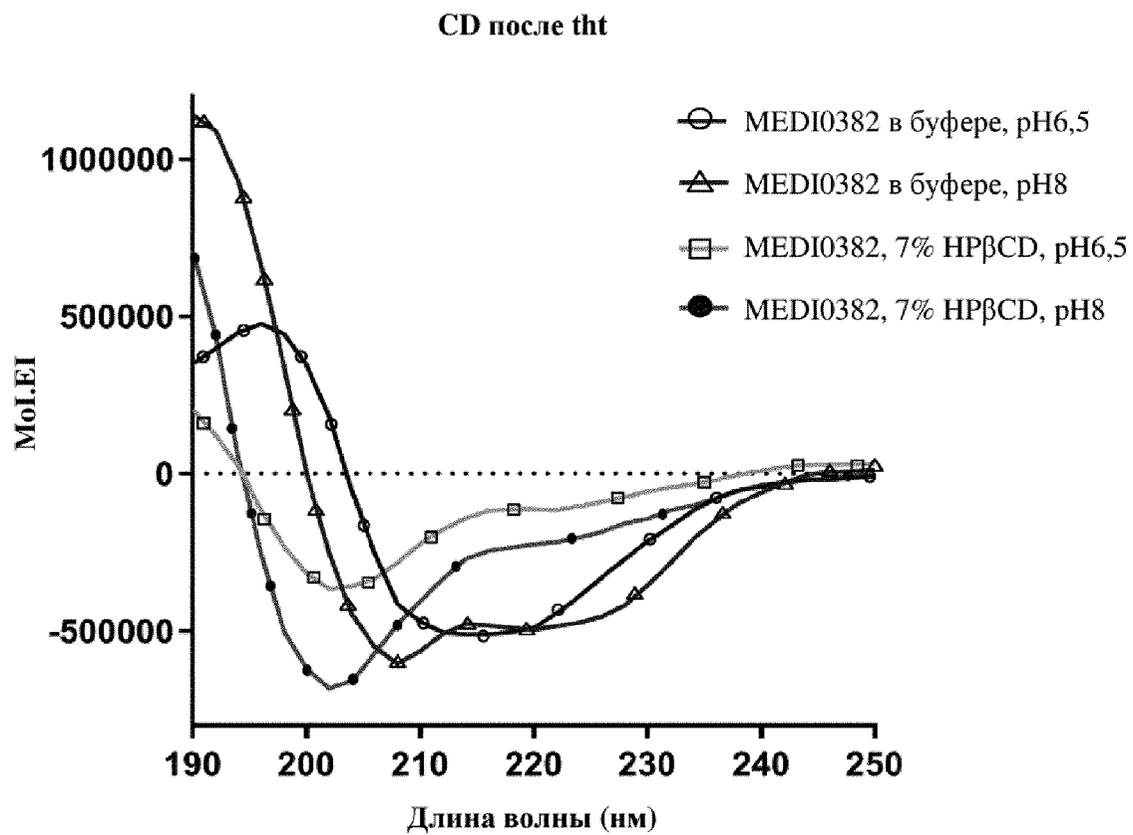


Контроль

pH6,5

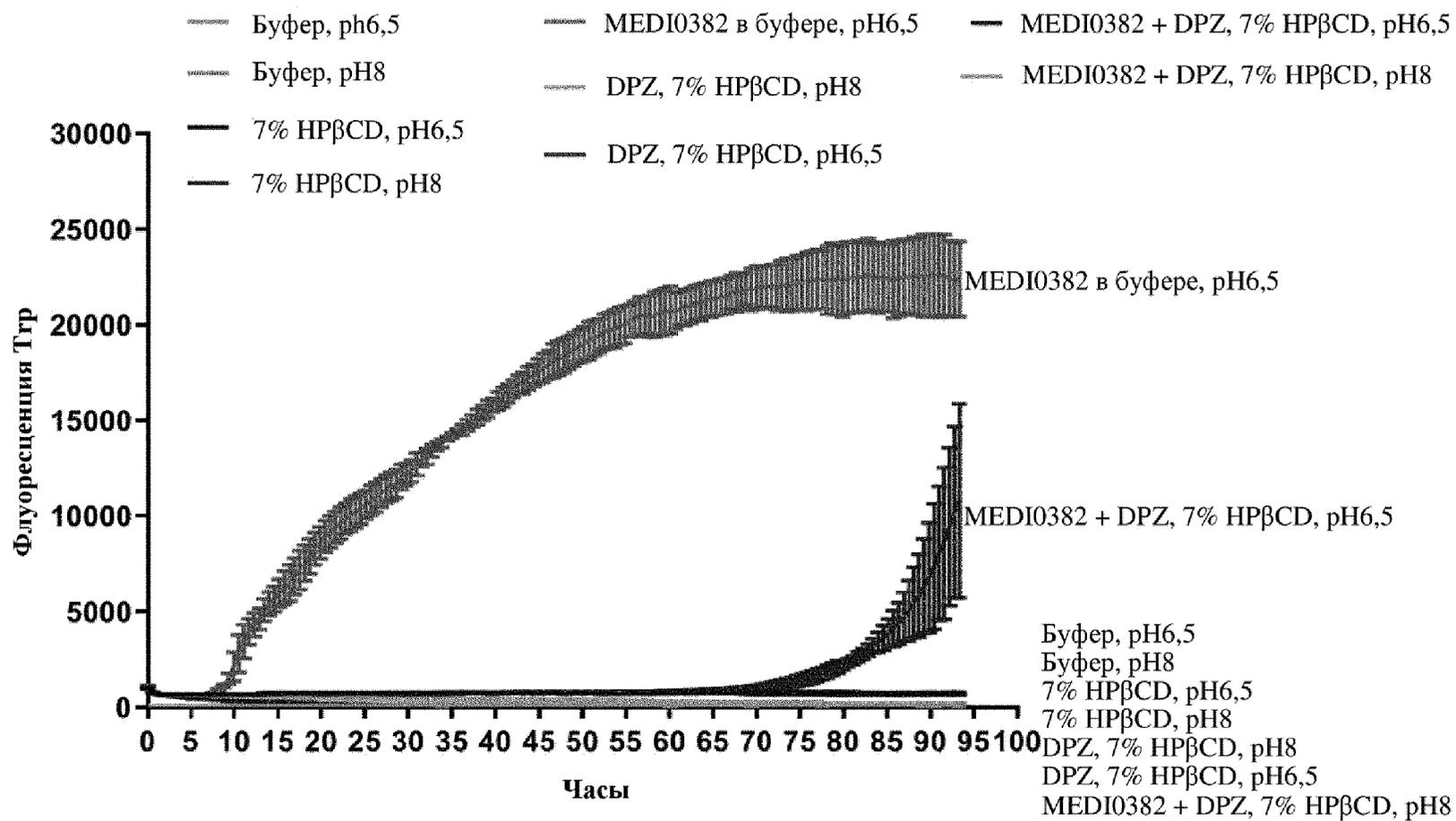
pH8

ФИГ. 14

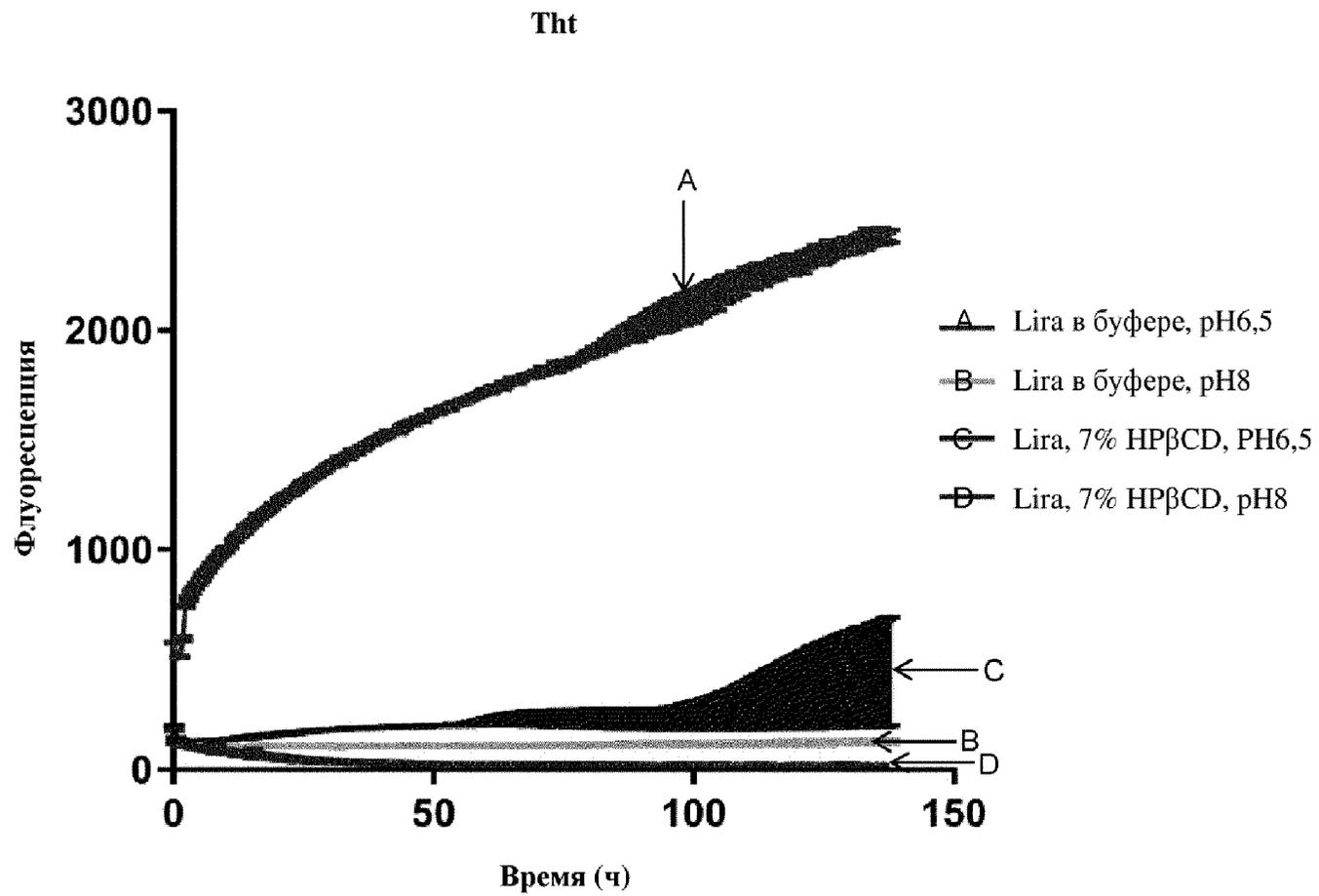


ФИГ. 15

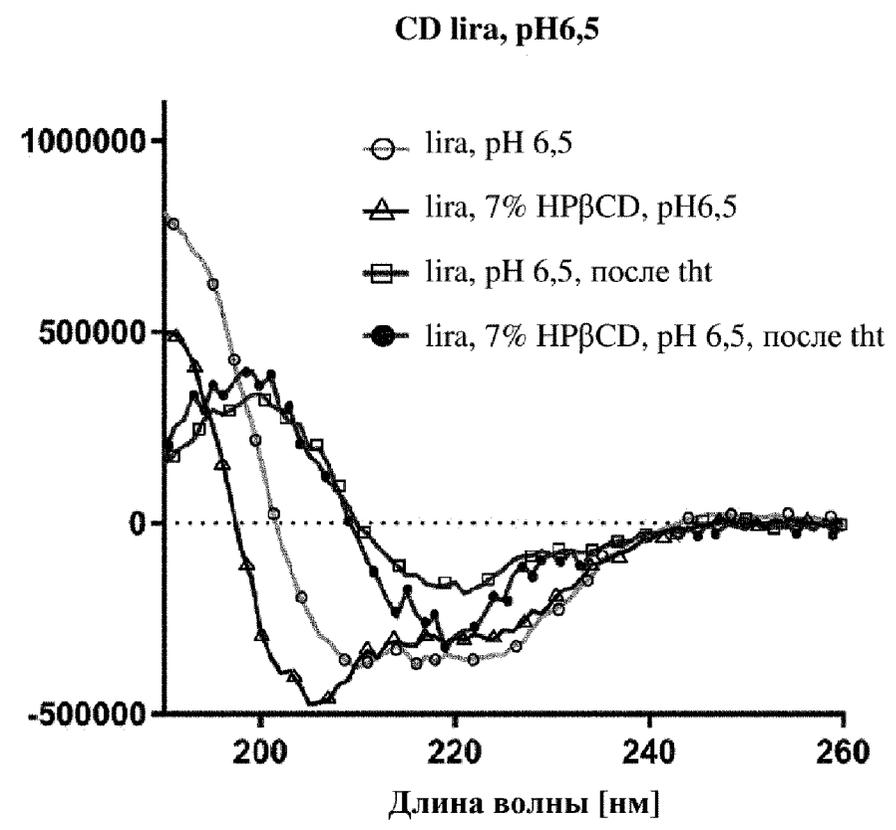
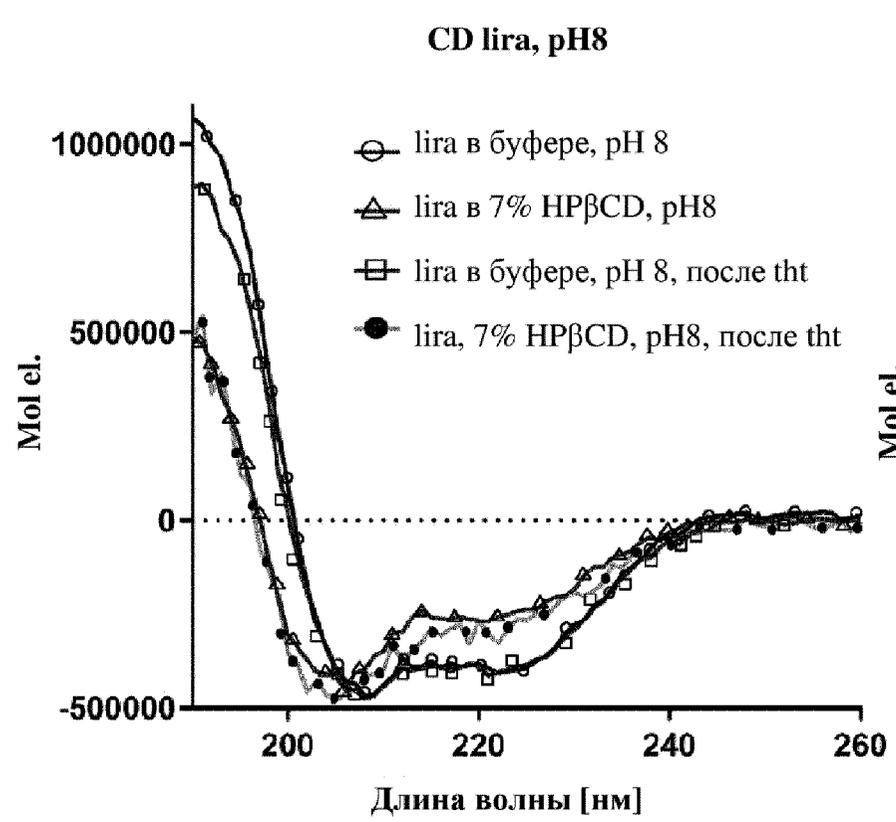
	α -спираль	β -слой (%)	Повороты (%)	Неупорядоченная структура (%)
Буфер, pH6,5	42 ± 5	18 ± 11	19 ± 3	21 ± 8
Буфер, pH8	57 ± 4	8 ± 3	13 ± 2	21 ± 4
7% HPβCD, pH6,5	14 ± 6	30 ± 5	22 ± 3	32 ± 2
7% HPβCD/pH8	19 ± 3	26 ± 5	21 ± 1	34 ± 3



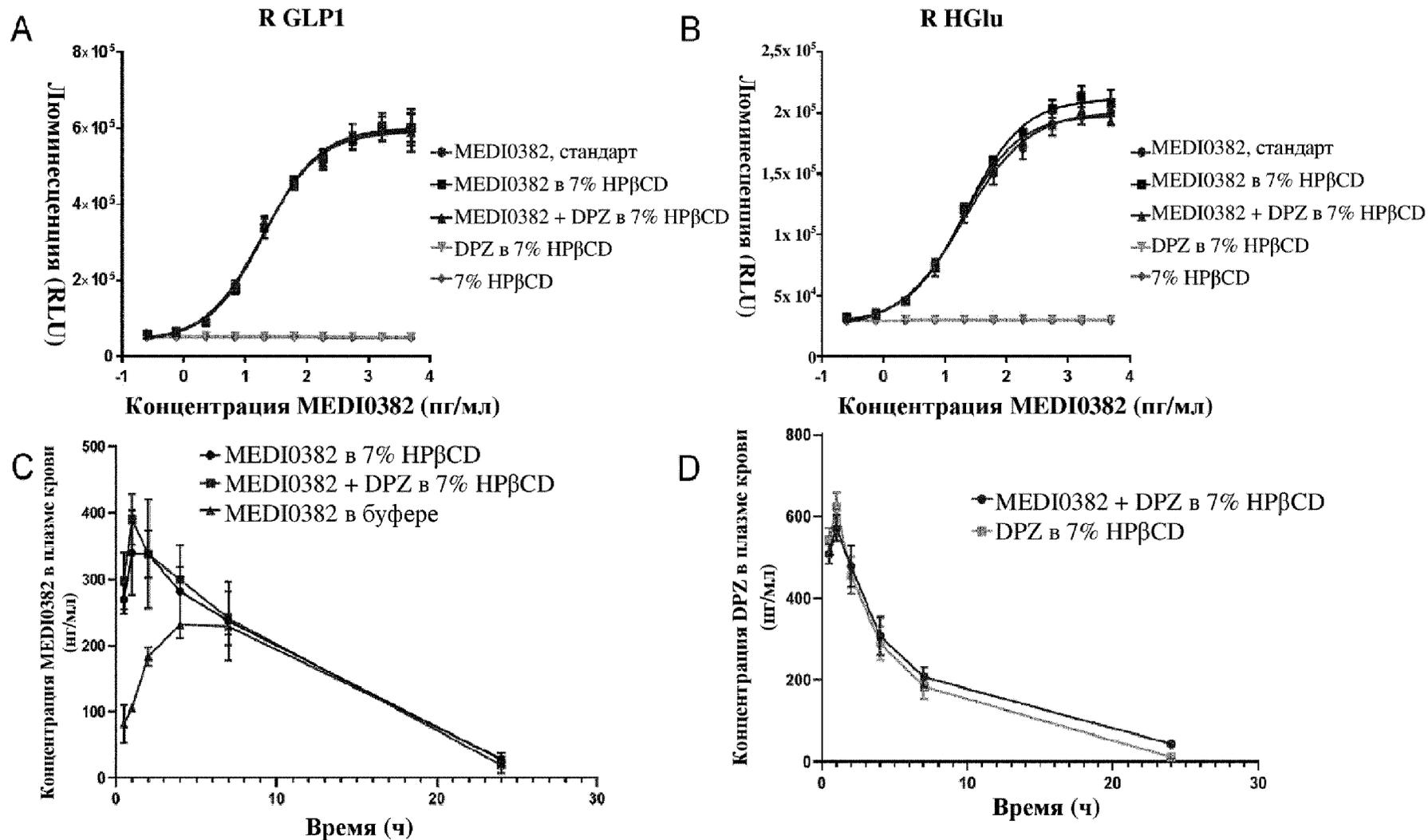
ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19