(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290112 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.13

(22) Дата подачи заявки
2020.07.29

(51) Int. Cl. ***A61K 38/16*** (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ-АГОНИСТЫ GIPR

(31) **62/881,685**
(32) **2019.08.01**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/043988**
(87) **WO 2021/021877 2021.02.04**

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

(72) Изобретатель:
Альсина-Фернандес Хорхе, Гейсер Андреа Рене, Гуо Лили, Кисер Саманта Грейс Лайонс, Ли Джон, Цюй Хунчан, Роэлл Уильям Кристофер (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, обладающим активностью в отношении рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP) человека. Настоящее изобретение также относится к соединениям, обладающим увеличенной продолжительностью действия в отношении рецептора GIP. Такие соединения могут быть полезны при лечении диабета, в том числе сахарного диабета 2 типа ("СД2"). Кроме того, указанные соединения могут быть полезны при лечении ожирения.

202290112 A1

202290112 A1

СОЕДИНЕНИЯ-АГОНИСТЫ GIPR

Настоящее изобретение относится к соединениям, обладающим активностью в отношении рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP) человека. Настоящее изобретение также относится к соединениям, обладающим увеличенной продолжительностью действия в отношении рецептора GIP. Соединения могут быть полезны при лечении сахарного диабета 2 типа («СД2»). Кроме того, указанные соединения могут быть полезны при лечении ожирения.

За последние несколько десятилетий распространенность заболевания диабетом продолжала расти. СД2 является самой распространенной формой диабета, составляющей примерно 90% от всех форм диабета. СД2 характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, связанным в основном с резистентностью к инсулину. Существующий стандарт лечения СД2 включает диету и физические упражнения, лечение пероральными лекарственными препаратами и инъекционными лекарственными средствами, снижающими уровень глюкозы, в том числе лекарственными средствами на основе инкретина, такими как агонисты рецепторов GLP-1. В настоящее время доступны различные агонисты рецепторов GLP-1 для лечения СД2, хотя имеющиеся на сегодняшний день на рынке агонисты рецепторов GLP-1 обычно имеют ограничение в отношении дозы из-за побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, таких как тошнота и рвота.

Подкожная инъекция представляет собой типичный способ введения доступных агонистов рецепторов GLP-1. Когда лечение пероральными лекарственными средствами и препаратами на основе инкретина оказывается недостаточным, рассматривается возможность лечения инсулином. Несмотря на существующие сегодня успехи при лечении многие пациенты с СД2 не могут достичь своих целей с точки зрения гликемического контроля. Неконтролируемый диабет приводит к нескольким патологическим состояниям, связанным с повышенной заболеваемостью и смертностью пациентов.

Существует потребность в разработке способа лечения, который позволит большему количеству пациентов с СД2 достичь своих целей при лечении гликемии.

Ожирение представляет собой сложное заболевание, приводящее к чрезмерному накоплению массы жировой ткани. В настоящее время ожирение является глобальной угрозой здоровью общества, связанной с нежелательными последствиями для здоровья и заболеваемостью. Предпочтительные способы лечения пациентов с ожирением должны привести к снижению избыточного веса тела, уменьшению сопутствующих заболеваний, связанных с ожирением, и поддержанию долгосрочного снижения веса. Существующие

способы лечения ожирения особенно неэффективны для пациентов с тяжелым ожирением. Существует потребность в альтернативных вариантах лечения, вызывающих терапевтическую потерю веса у пациентов, нуждающихся в таком лечении.

В WO2016/111971 описаны определенные пептиды, обладающие активностью агонистов GLP-1R и GIPR. В WO2013/164483 также описаны соединения, обладающие активностями GLP-1R и GIPR.

В WO2018/181864 описаны определенные соединения, обладающие активностью агониста GIPR.

Существует потребность в способах лечении СД2, способных обеспечить эффективный гликемический контроль для большей части пациентов, нуждающихся в таком лечении. Кроме того, существует потребность в способах лечения СД2, способных обеспечить эффективный гликемический контроль и обладающих благоприятным профилем побочных эффектов. Существует потребность в альтернативных вариантах лечения для обеспечения терапевтической потери веса у пациента, нуждающегося в таком лечении, например у пациента с тяжелым ожирением. Существует потребность в вариантах лечения диабета, которые можно комбинировать с инсулиновой терапией и/или инкретиновой терапией для обеспечения у пациента превосходных результатов с точки зрения гликемического состояния и/или более желательных профилей побочных эффектов.

Для обеспечения менее частого введения соединения требуются соединения с увеличенной продолжительностью действия в отношении рецептора GIP.

Соответственно, вариант реализации 1 представляет собой соединение формулы I $Z_1X_1X_2EGTX_6ISDYSIX_{13}LDX_{16}X_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}X_{22}VX_{24}X_{25}X_{26}L$ $X_{28}X_{29}GPSSGAPPPSZ_2$ (SEQ ID NO:4) где:

Z_1 представляет собой модификацию N-концевой аминогруппы, при этом указанная модификация выбрана из группы, состоящей из ацетила и отсутствия такой модификации;

X_1 выбран из группы, состоящей из Y и D-Tyr;

X_2 выбран из группы, состоящей из Aib, A и D-Ala;

X_6 выбран из группы, состоящей из F, αMeF, Iva, L, αMeL и αMeF(2F);

X_{13} выбран из группы, состоящей из αMeL, A, L и Aib;

X_{16} выбран из группы, состоящей из K, E и Orn;

X_{17} выбран из группы, состоящей из I и K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H;

X_{18} выбран из группы, состоящей из H, A и R;

X_{20} выбран из группы, состоящей из Aib и Q;

X_{21} выбран из группы, состоящей из D и E;

X_{22} выбран из группы, состоящей из F и αMeF;

X_{24} выбран из группы, состоящей из E, N, Q и D-Glu;

X_{25} выбран из группы, состоящей из Y, 4-Pal, W и αMeY;

X_{26} выбран из группы, состоящей из L и K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H;

X_{28} выбран из группы, состоящей из E и A;

X_{29} выбран из группы, состоящей из G, A, Q и T; q выбран из группы, состоящей из 16 и 18; и

Z_2 отсутствует или представляет собой модификацию C-концевой группы, при этом указанная модификация представляет собой амидирование;

при этом одна и только одна группа, выбранная из X_{17} и X_{26}, представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H;

или его фармацевтически приемлемую соль.

Вариант реализации 2 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, в котором Z_1 отсутствует и X_1 представляет собой Y.

Вариант реализации 3 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1 или варианту реализации 2, в котором X_2 представляет собой Aib.

Вариант реализации 4 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-3, в котором:

X_6 выбран из группы, состоящей из F и αMeF(2F).

Вариант реализации 5 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-4, в котором:

X_{13} выбран из группы, состоящей из L и αMeL.

Вариант реализации 6 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-5, в котором X_{16} представляет собой K или Orn.

Вариант реализации 7 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 6, в котором X_{16} представляет собой K.

Вариант реализации 8 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-7, в котором X_{18} представляет собой H.

Вариант реализации 9 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-8, в котором X_{20}

представляет собой Aib; и X_{22} представляет собой F.

Вариант реализации 10 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-9, в котором X_{21} представляет собой D.

Вариант реализации 11 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-10, в котором X_{25} представляет собой 4-Pal или Y.

Вариант реализации 12 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-11, в котором:

X_{17} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H; и

X_{26} представляет собой L.

Вариант реализации 13 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-11, в котором:

X_{17} представляет собой I; и

X_{26} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H.

Вариант реализации 14 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-13, в котором q равно 16.

Вариант реализации 15 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно любому из вариантов реализации 1-13, в котором q равно 18.

Вариант реализации 16 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, в котором: Z_1 отсутствует;

X_1 представляет собой Y;

X_2 выбран из группы, состоящей из Aib и D-Ala; X_6 представляет собой F;

X_{13} выбран из группы, состоящей из αMeL и L;

X_{16} выбран из группы, состоящей из K и Orn;

X_{18} выбран из группы, состоящей из H и A;

X_{20} представляет собой Aib;

X_{22} представляет собой F;

X_{24} выбран из группы, состоящей из E, N и D-Glu;

X_{25} выбран из группы, состоящей из Y, 4-Pal и W;

X_{28} выбран из группы, состоящей из E и A;

X_{29} выбран из группы, состоящей из G, A и Q; и q выбран из группы, состоящей из

16 и 18.

Вариант реализации 17 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 16, в котором:

Z_1 отсутствует;

X_2 представляет собой Aib;

X_{13} представляет собой αMeL;

X_{18} представляет собой H;

X_{24} выбран из группы, состоящей из E и D-Glu;

X_{25} выбран из группы, состоящей из Y и 4-Pal;

X_{28} представляет собой E;

X_{29} выбран из группы, состоящей из G и A.

Вариант реализации 18 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 17, в котором: X_{17} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H; и

X_{26} представляет собой L.

Вариант реализации 19 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 17, в котором: X_{17} представляет собой I; и X_{26} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H.

Вариант реализации 20 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту 1, при этом указанное соединение выбрано из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

Вариант реализации 21 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:5. Вариант реализации 22 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:6. Вариант реализации 23 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:7. Вариант реализации 24 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:8. Вариант реализации 25 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:9. Вариант реализации 26 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение

представляет собой SEQ ID NO:10. Вариант реализации 27 относится к соединению или его фармацевтически приемлемой соли согласно варианту реализации 1, при этом указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:11.

Один из вариантов реализации относится к способу лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из диабета, ожирения и метаболического синдрома, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно любому из вариантов реализации 1-27 или фармацевтически его приемлемой соли. Один из вариантов реализации относится к способу лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2, ожирения и метаболического синдрома, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Один из вариантов реализации относится к способу обеспечения терапевтического снижения веса, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Один из вариантов реализации представляет способ лечения СД2, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно любому из вариантов реализации 1-27 или его фармацевтически приемлемой соли.

Один из вариантов реализации относится к соединению формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для применения в терапии. Один из вариантов реализации относится к соединению согласно любому из вариантов реализации 1-27 или его фармацевтически приемлемой соли для применения в терапии для лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из диабета, ожирения и метаболического синдрома. Один из вариантов реализации относится к соединению формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для применения в терапии для лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2, ожирения и метаболического синдрома. Согласно одному из вариантов реализации такое патологическое состояние представляет собой СД2. Согласно одному из вариантов реализации такое патологическое состояние представляет собой ожирение. Согласно одному из вариантов реализации такое патологическое состояние представляет собой диабет 1 типа (СД1). Согласно одному из вариантов реализации такое патологическое состояние представляет собой диабет у пациента, получающего инсулинотерапию. Согласно одному из вариантов реализации такое патологическое состояние представляет собой метаболический синдром.

Соединения формулы I или их фармацевтически приемлемые соли могут быть полезны при лечении разнообразных симптомов или расстройств. Например, некоторые

варианты реализации относятся к способу лечения у пациента СД2, включающему введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Согласно одному из вариантов реализации предложен способ лечения у пациента ожирения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Согласно одному из вариантов реализации предложенный способ вызывает нетерапевтическую потерю веса у субъекта и включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения у пациента метаболического синдрома, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Согласно одному из вариантов реализации предложенный способ представляет собой способ лечения диабета у пациента, получающего инсулинотерапию, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. Кроме того, в настоящем документе описано соединение согласно настоящему изобретению для одновременного, раздельного и последовательного применения в комбинациях с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4, ингибитора натрий-глюкозного котранспортера-2 (SGLT-2), модулятора фактора роста и дифференцировки 15 («GDF15»), пептидного тирозин-тирозинового модулятора («PYY»), модифицированного инсулина, амилина, двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина и агониста оксинтомодулина («OXM»), при лечении патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2, ожирения и метаболического синдрома. Кроме того, в данном документе предложено соединение согласно настоящему изобретению для одновременного, раздельного и последовательного применения в комбинациях с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4, ингибитора натрий-глюкозного котранспортера-2 (SGLT-2), модулятора фактора роста и дифференцировки 15 («GDF15»), пептидного тирозин-тирозинового модулятора («PYY»), модифицированного инсулина, агониста рецепторов амилина, двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина, модифицированного аналога урокортина-2 (UCN-2), агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста рецепторов глюкагона и двойного агониста рецепторов GLP-1-глюкагона, в том числе

оксинтомодулина и его аналогов, при лечении патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2, ожирения и метаболического синдрома. Согласно одному из вариантов реализации предложено соединение согласно настоящему изобретению в комбинации с фиксированной дозой с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4, ингибитора SGLT-2, GDF15, PYY, модифицированного инсулина, амилина, двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина, и OXM. Согласно одному из вариантов реализации предложено соединение согласно настоящему изобретению в комбинации с фиксированной дозой с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4, ингибитора SGLT-2, GDF15, аналога PYY, модифицированного инсулина, агониста рецепторов амилина, двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина, модифицированного аналога урокортина-2 (UCN-2), агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста рецепторов глюкагона и двойного агониста рецепторов GLP-1-глюкагона, в том числе OXM и его аналогов. Согласно одному из вариантов реализации предложено соединение согласно настоящему изобретению для одновременного, раздельного и последовательного применения в комбинациях с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4, ингибитора SGLT-2, GDF15, PYY, модифицированного инсулина, амилина, двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина и OXM, при лечении патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2 и ожирения. Согласно одному из вариантов реализации предложено соединение согласно настоящему изобретению для одновременного, раздельного и последовательного применения в комбинациях с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4, ингибитора SGLT-2, GDF15, аналога PYY, модифицированного инсулина, агониста рецепторов амилина, двойного агониста рецепторов амилина и кальцитонина, модифицированного аналога урокортина-2 (UCN-2), агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста рецепторов глюкагона и двойного агониста рецепторов GLP-1-глюкагона, в том числе OXM и его аналогов, при лечении патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2 и ожирения. Согласно одному из вариантов реализации предложено соединение согласно настоящему изобретению для одновременного, раздельного и последовательного применения в комбинациях с одним или более средствами, выбранными из метформина, тиазолидиндиона, сульфонилмочевины, ингибитора дипептидилпептидазы 4 и ингибитора SGLT-2, при лечении патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2

и ожирения.

Согласно одному из вариантов реализации предложен способ лечения диабета у пациента, получающего инсулинотерапию, включающий введение эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, нуждающемуся в этом. Один из вариантов реализации представляет собой способ лечения пациента, получающего инсулинотерапию по поводу СД1. Один из вариантов реализации представляет собой способ лечения пациента, получающего инсулинотерапию по поводу СД2. Один из вариантов реализации представляет собой введение дозы один раз в неделю. Один из вариантов реализации представляет собой способ лечения путем подкожного введения один раз в неделю пациенту, получающему инсулинотерапию. Существует вариант реализации, согласно которому инсулинотерапия включает базальную инсулинотерапию. Существует вариант реализации, согласно которому инсулинотерапия включает инсулинотерапию во время еды. Существует вариант реализации, согласно которому инсулинотерапия включает сверхбыструю инсулинотерапию. Инсулинотерапия, применяемая путем экстренных инфузий соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, может усиливать подвижность глюкагона у пациентов, перенесших гипогликемический клэмп, что, тем самым, приводит к усилению естественной защиты организма от гипогликемии. Соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить один раз в неделю независимо от типа применяемого инсулина или доз применяемого инсулина. Один из вариантов реализации представляет собой соединение согласно любому из вариантов реализации 1-27 или его фармацевтически приемлемую соль, вводимое в виде эффективного количества пациенту, получающему инсулинотерапию, независимо от типа применяемого инсулина или доз применяемого инсулина. Один из вариантов реализации представляет собой соединение согласно любому из вариантов реализации 1-27 или его фармацевтически приемлемую соль, вводимое один раз в неделю в виде эффективного количества пациенту, получающему инсулинотерапию, независимо от типа применяемого инсулина или доз применяемого инсулина. В контексте настоящего документа термин «инсулинотерапия» означает лечение пациента с диабетом с помощью одобренного способа лечения препаратами инсулина. Такая инсулинотерапия известна квалифицированному специалисту в данной области техники и/или клиническому специалисту в области здравоохранения. Например, инсулинотерапия может включать лечение с применением базального инсулина. Такую «инсулинотерапию» на основе базального инсулина можно использовать в режиме дозирования с инсулином во время еды и/или сверхбыстрым инсулином. В контексте настоящего документа термин «инсулин во время еды» означает инсулин и/или модифицированный инсулин, вводимый вместе с едой,

например, помимо прочего, инсулин лизпро. В контексте настоящего документа «базальный инсулин» означает модифицированный инсулин с более продолжительным действием, такой как, например, помимо прочего, инсулин гларгин.

Еще один вариант реализации относится к применению соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного средства для лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из СД2, ожирения и метаболического синдрома. Один из вариантов реализации относится к применению соединения согласно любому из вариантов реализации 1-27 или его фармацевтически приемлемой соли при изготовлении лекарственного средства для лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из диабета, ожирения и метаболического синдрома. Согласно одному из вариантов реализации указанное лекарственное средство предназначено для лечения СД2. Согласно одному из вариантов реализации указанное лекарственное средство предназначено для лечения ожирения. Согласно одному из вариантов реализации указанное лекарственное средство предназначено для лечения диабета у пациента, получающего инсулинотерапию.

Еще один вариант реализации относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один компонент, выбранный из группы, состоящей из носителя, разбавителя и наполнителя. Согласно одному из вариантов реализации предложена фармацевтическая композиция для подкожного введения.

В контексте настоящего документа термин «лечение» или «лечить» включает сдерживание, замедление, остановку или обращение вспять прогрессирования или тяжести симптома, патологического состояния или расстройства.

Некоторые соединения согласно настоящему изобретению в целом эффективны в широком диапазоне доз. Например, дозировки для парентерального введения один раз в неделю могут находиться в диапазоне от 0,05 мг до примерно 60 мг на человека в неделю.

Соединения формулы I или их фармацевтически приемлемые соли включают новые аминокислотные последовательности, обладающие сродством к рецептору GIP, с требуемой эффективностью в отношении рецептора. GIP представляет собой пептид из 42 аминокислот (SEQ ID NO:1), который, подобно GLP-1, известен как инкретин, при этом он играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы путем стимуляции секреции инсулина из бета-клеток поджелудочной железы в присутствии глюкозы.

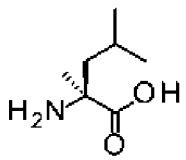
GLP-1 представляет собой пептид из 36 аминокислот, основной биологически активный фрагмент которого продуцируется в виде 30-аминокислотного С-концевого амидированного пептида (GLP-1_{7-36}) (SEQ ID NO:2).

Глюкагон представляет собой пептидный гормон из 29 аминокислот (SEQ ID NO:3), секретируемый α-клетками островка Лангерганса в поджелудочной железе, который участвует в гомеостазе глюкозы.

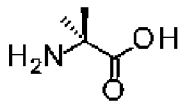
Соединения согласно настоящему изобретению обеспечивают требуемую эффективность в отношении рецептора GIP с высокой степенью селективности в отношении GLP-1R и рецептора глюкагона. Согласно одному из вариантов реализации предложенные соединения обладают требуемой активностью рецептора GIP с увеличенной продолжительностью действия.

В контексте настоящего документа термин «аминокислота» означает как природные аминокислоты, так и неприродные аминокислоты. Аминокислоты обычно обозначают с помощью стандартных однобуквенных кодов (например, L = лейцин), и также альфа-метилзамещенных остатков природных аминокислот (например, α-метиллейцин или αMeL, и α-метилфенилаланин или αMeF) и некоторых других неприродных аминокислот, таких как альфа-аминоизомасляная кислота или «Aib», «4Pal», «Orn» и т.п. Структуры указанных аминокислот приведены ниже:

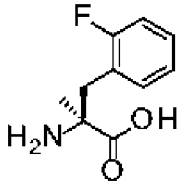
αMeL



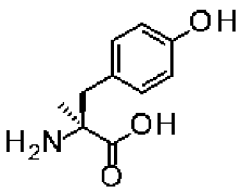
Aib



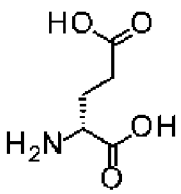
αMeF(2F)



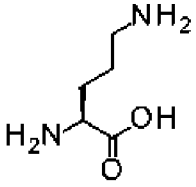
αMeY



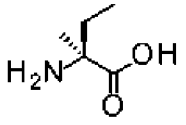
D-Glu



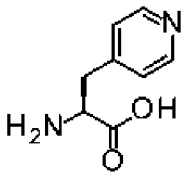
Orn



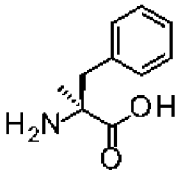
Iva



4Pal



αMeF



В контексте настоящего документа «Orn» означает L-орнитин. В контексте настоящего документа «4Pal» означает 3-(4-пиридил)-L-аланин. В контексте настоящего

документа термин «αMeF(2F)» означает альфа-метил-2-фтор-L-фенилаланин. В контексте настоящего документа «αMeY» и «αMeL» означают альфа-метил-L-тирозин и альфа-метил-L-лейцин соответственно. В контексте настоящего документа «e» и «D-Glu» означают D-глутаминовую кислоту. В контексте настоящего документа «D-Tyr» и «y» каждый означают D-тирозин. В контексте настоящего документа «D-Ala» и «a» каждый означают D-аланин. В контексте настоящего документа «αMeF» означает альфа-метил-F и альфа-метил-Phe. В контексте настоящего документа «Iva» означает L-изовалин.

Согласно одному из вариантов реализации конъюгация представляет собой ацилирование. Согласно одному из вариантов реализации в конъюгации участвуют эпсилон-аминогруппы боковой цепи K. Согласно одному из вариантов реализации соединений, предложенных в настоящем изобретении, фрагмент жирной кислоты конъюгирован через линкер с K в положении 17. Согласно одному из вариантов реализации соединений, предложенных в настоящем изобретении, фрагмент жирной кислоты конъюгирован через линкер с K в положении 26.

Согласно одному из вариантов реализации q выбран из группы, состоящей из 16 и 18. Согласно одному из вариантов реализации q равен 16. Согласно одному из вариантов реализации q равен 18.

При применении в настоящем документе в отношении рецептора GIP термины «активность», «активировать [уют]», «активация[ирование]» и т.п. относятся к способности соединения или его фармацевтически приемлемой соли связываться с рецептором и индуцировать у него реакцию, измеряемую с помощью анализов, известных в данной области, таких как анализы *in vitro,* описанные ниже.

Сродство соединений формулы I или их фармацевтически приемлемой соли к рецептору GIP можно измерить с помощью известных в данной области техники методов измерения уровней связывания рецептора, в том числе, например, методов, описанных ниже в примерах, при этом указанное сродство обычно выражают как значение K_i. Активность соединений согласно настоящему изобретению в отношении рецептора GIP также можно измерить с применением известных в данной области методов, в том числе, например, анализов активности *in vitro*, описанных ниже, при этом указанную активность обычно выражают как значение EC_{50}, которое представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальную стимуляцию на кривой доза-эффект.

Кроме того, для демонстрации степени селективности соединений согласно настоящему изобретению в отношении GIPR для каждого соединения приведены данные об активности и сродстве к рецепторам GLP 1 и глюкагона.

Согласно одному из вариантов реализации фармацевтическая композиция

соединения формулы I подходит для введения парентеральным путем (например, подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным или трансдермальным путем). Некоторые фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области. (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)).

Соединения согласно настоящему изобретению могут взаимодействовать с любым соединением из ряда неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты/основания. Фармацевтически приемлемые соли и общепринятые методики их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, P. Stahl, *et al*. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению включают, помимо прочего, натриевые, трифторацетатные, гидрохлоридные, аммониевые и ацетатные соли. Согласно одному из вариантов реализации фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из натриевых, гидрохлоридных и ацетатных солей.

Настоящее изобретение также включает новые промежуточные соединения и способы, применимые для синтеза соединений согласно настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемых солей. Промежуточные продукты и соединения согласно настоящему изобретению можно получить с помощью различных процедур, известных в данной области. В частности, в приведенных ниже примерах описан способ с применением химического синтеза. Для получения соединений согласно настоящему изобретению конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно комбинировать различным образом. Реагенты и исходные материалы легко доступны обычному специалисту в данной области техники.

При применении в настоящем документе, термин «эффективное количество» относится к количеству или дозе соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном дозированном введении пациенту обеспечивает у пациента требуемый эффект при диагностике или лечении. Эффективное количество может определить специалист в данной области путем применения известных методов и наблюдения за результатами, полученными при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для субъекта учитывают ряд факторов, в том числе, помимо прочего: вид млекопитающего; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное заболевание или расстройство; степень заболевания или расстройства или вовлечение в патологический процесс, или серьезность заболевания или расстройства; реакцию отдельного пациента;

конкретное вводимое соединение; режим введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранный режим дозирования; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие соответствующие обстоятельства.

При применении в настоящем документе, термин «субъект, нуждающийся в этом» относится к млекопитающему, предпочтительно человеку, с заболеванием или патологическим состоянием, требующим лечения или терапии, в том числе, например, терапий, перечисленных в предыдущих абзацах.

В контексте настоящего документа термин «ЭДТА» означает этилендиаминтетрауксусную кислоту. В контексте настоящего документа термин «ДМСО» означает диметилсульфоксид. В контексте настоящего документа термин «CPM» означает количество импульсов в минуту. В контексте настоящего документа «IBMX» означает 3-изобутил-1-метилксантин. В контексте настоящего документа термин «ЖХ/МС» означает жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию. В контексте настоящего документа термин «HTRF» означает гомогенную флуоресценцию с временным разрешением. В контексте настоящего документа термин «ДМФ» относится к N,N-диметилформамиду. В контексте настоящего документа термин «ДХМ» относится к дихлорметану. В контексте настоящего документа термин «ТФК» относится к трифторуксусной кислоте. В контексте настоящего документа термин «соль ТФК» относится к трифторацетатной соли. В контексте настоящего документа термин «ВЭЖХ с обращенными фазами» означает высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенными фазами.

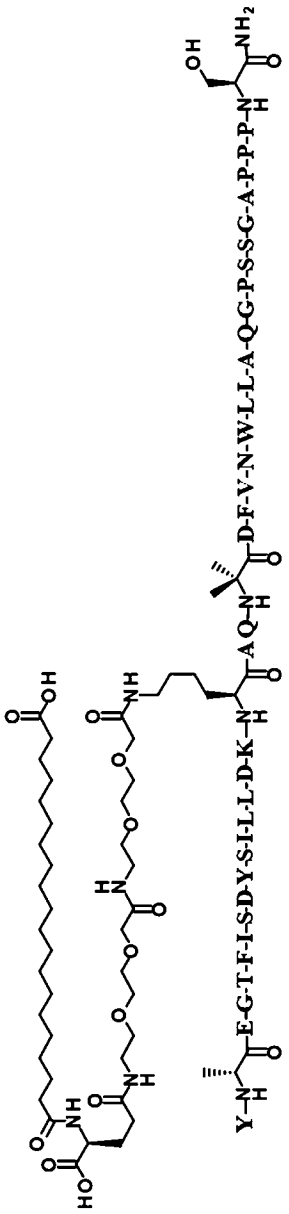
Далее настоящее изобретение проиллюстрировано с помощью следующих примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ

Пример 1

Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)18-CO_2H)AQ-Aib-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH_2 (SEQ ID NO:5)

Структура SEQ ID NO:5 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков D-Ala2, K17, Aib20 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:



Пептидный остов соединения согласно примеру 1 синтезировали с применением химии на основе флуоренил-метилоксикарбонил (Fmoc)/трет-бутила (t-Bu) на мультиплексном пептидном синтезаторе Symphony (Gyros Protein Technologies. Тусон, Аризона; 3.3.0.1), версия программного обеспечения 3.3.0.

Смола состояла из аминометилполистирола, функционализированного линкером в виде смолы Ринка (полистирол AM RAM, RAPP polymeric GmbH, H40023, 200-400 меш) при замещении 0,8 ммоль/г. Стандартные защитные группы боковых цепей применяли при следующих исключениях: Fmoc-Lys(Mtt)-OH, где Mtt представлял собой 4-метилтритил, использовали для лизина в положении 17 и Boc-Tyr(t-Bu)-OH использовали для тирозина в положении 1. Fmoc-группы удаляли перед каждой стадией связывания (2 × 10 минут) путем применения 20% пиперидина в ДМФ. Все стандартные процедуры связывания аминокислот выполняли с применением равного молярного соотношения аминокислоты Fmoc (0,3 М в

ДМФ), диизопропилкарбодиимида (0,9 М в ДХМ) и оксима (0,9 М в ДМФ) при 9-кратном молярном избытке по сравнению с теоретической загрузкой пептида. Процессы связывания могли продолжаться в течение 1,5 часов при следующих исключениях: связывание валина, 3 часа; связывание Cα-метилированных аминокислот, 6 часов; связывание с Cα-метилированными аминокислотами, от 6 до 10 часов. После завершения синтеза пептидного остова смолу тщательно промывали ДХМ для удаления остаточного ДМФ. Защитную группу Mtt на лизине в положении 17 селективно удаляли из пептидной смолы путем 3-х разовой обработки 30% гексафторизопропанолом (Oakwood Chemicals) в ДХМ (3 обработки × 20 минут), и затем смолу тщательно промывали ДХМ и ДМФ.

Последующее присоединение фрагмента линкер- жирная кислота осуществляли путем связывания 2-[2- (2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоты (Fmoc-AEEA-OH, ChemPep, Inc.) и α-трет-бутилового эфира Fmoc-глутаминовой кислоты (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.) в соответствии с процедурами, описанными выше для стандартных реакций связывания и снятия защиты. После удаления последней защитной Fmoc группы моно-OtBu-эйкозандионовую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай) связывали в течение 1 часа с применением 4-кратного избытка дикислоты, PyBOP, и диизопропилэтиламина (1:1:1 моль/моль/моль) в ДХМ/ДМФ, 1:1.

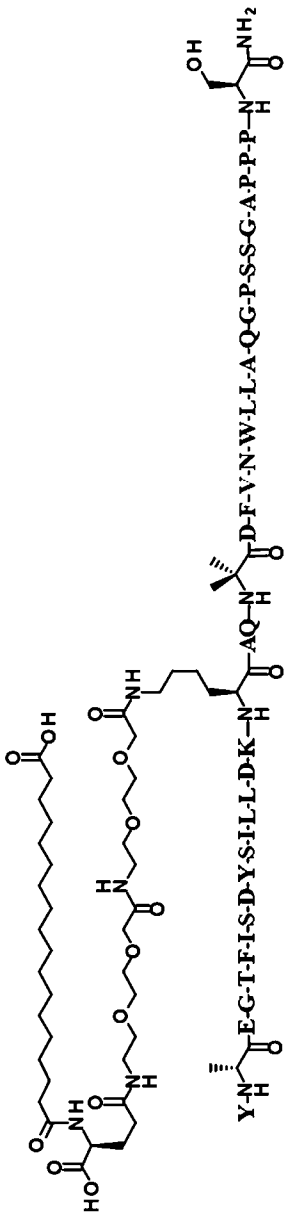
После завершения синтеза пептидную смолу промывали ДХМ и затем тщательно высушивали в вакууме. Сухую пептидную смолу обрабатывали раствором для отщепления продукта (10 мл ТФК, 0,5 мл триизопропилсилана, 0,5 мл воды и 0,5 мл 1,2-этандитиола) в течение 2 часов при комнатной температуре. Раствор пептидной смолы отфильтровывали в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл и обрабатывали 5-кратным избыточным объемом холодного диэтилового эфира (-20 °C) для осаждения сырого пептида. Суспензию пептид/эфир центрифугировали при относительном центробежном ускорении (rcf) 3000 в течение 1,5 минут с образованием твердого осадка, и декантировали надосадочную жидкость. Осадок дополнительно промывали два раза холодным диэтиловым эфиром, каждый раз центрифугировали в течение 1 минуты, затем высушивали в вакууме. Сырой пептид солюбилизировали в смеси 20% уксусной кислоты/80% воды и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенными фазами на препаративной колонке SymmetryPrep 7 мкм C18 (18 × 300 мм, Waters) с применением линейных градиентов на основе 100% ацетонитрила и буферной системы 0,1% ТФК/вода (25-45% ацетонитрила в течение 65 минут). Чистоту пептида оценивали с помощью аналитической ВЭЖХ с обращенными фазами, при этом критерий объединения составлял >95%. Было установлено, что чистота основного пула соединения согласно примеру 1 составляла 96,8%. В результате последующей лиофилизации конечного основного пула продуктов получали

лиофилизированную ТФК соль пептида. Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (найдено: $[M+3H]^{3+}$= 1638,4; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1638,53; найденная молекулярная масса (среднее значение) = 4912,2; расчетная молекулярная масса (среднее значение): 4912,58).

Пример 2

Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)16-CO_2H)AQ-Aib-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH_2 (SEQ ID NO:6)

Структура SEQ ID NO:6 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков D-Ala2, K17, Aib20 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:



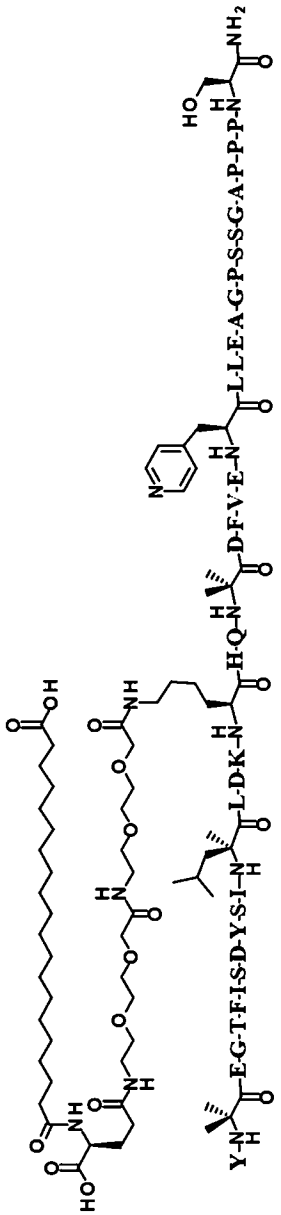
Соединение согласно SEQ ID NO:6 получали по существу с применением процедур,

описанных в примере 1, при этом альтернативно защищенная двухосновная кислота представляла собой моно-OtBu-октадекандиовую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай). Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (найдено: $[M+3H]^{3+}$ = 1629,15; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1629,18; найденная молекулярная масса (среднее значение) = 4884,45; расчетная молекулярная масса (среднее значение) = 4884,53).

Пример 3

Y-Aib-EGTFISDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-Aib-DFVE-4-Pal-LLEAGPSSGAPPPS-NH_2 (SEQ ID NO:7)

Структура SEQ ID NO:7 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков Aib2, αMeL13, K17, Aib20, 4-Pal25 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:

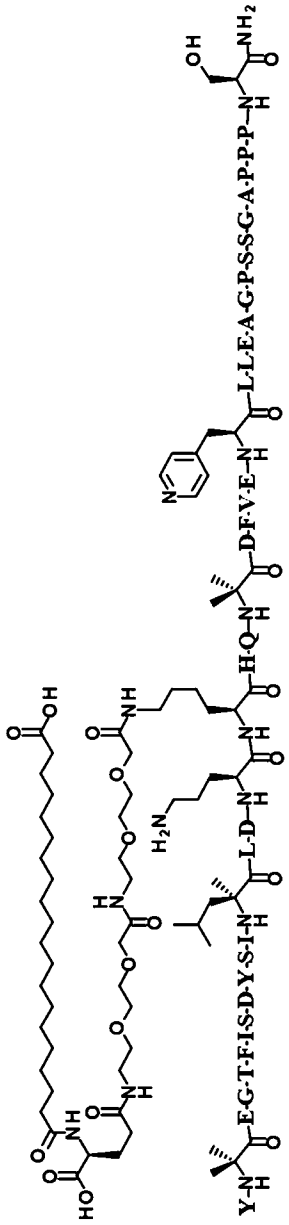


Соединение согласно SEQ ID NO:7 получали по существу с применением процедур, описанных в примере 1. Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (найдено: $[M+3H]^{3+}$ = 1662,52; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1662,55; найденная молекулярная масса (среднее значение) = 4984,55; расчетная молекулярная масса (среднее значение) = 4984,64).

Пример 4

Y-Aib-EGTFISDYSI-αMeL-LD-Orn-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)_{18}$-CO_2H)HQ-Aib-DFVE-4-Pal-LLEAGPSSGAPPPS-NH_2 (SEQ ID NO:8)

Структура SEQ ID NO:8 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков Aib2, αMeL13, Orn16, K17, Aib20, 4-Pal25 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:

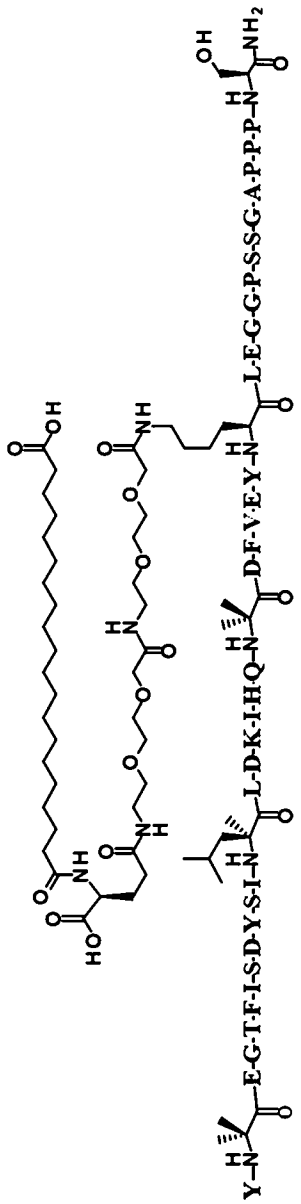


Соединение согласно SEQ ID NO:8 получали по существу с применением процедур, описанных в примере 1. Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (найдено: $[M+3H]^{3+}$ = 1657,82; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1657,87; найденная молекулярная масса (среднее значение) = 4970,46; расчетная молекулярная масса (среднее значение) = 4970,62).

Пример 5

Y-Aib-EGTFISDYSI-αMeL-LDKIHQ-Aib-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$ (SEQ ID NO:9)

Структура SEQ ID NO:9 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков Aib2, αMeL13, Aib20, K26 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:



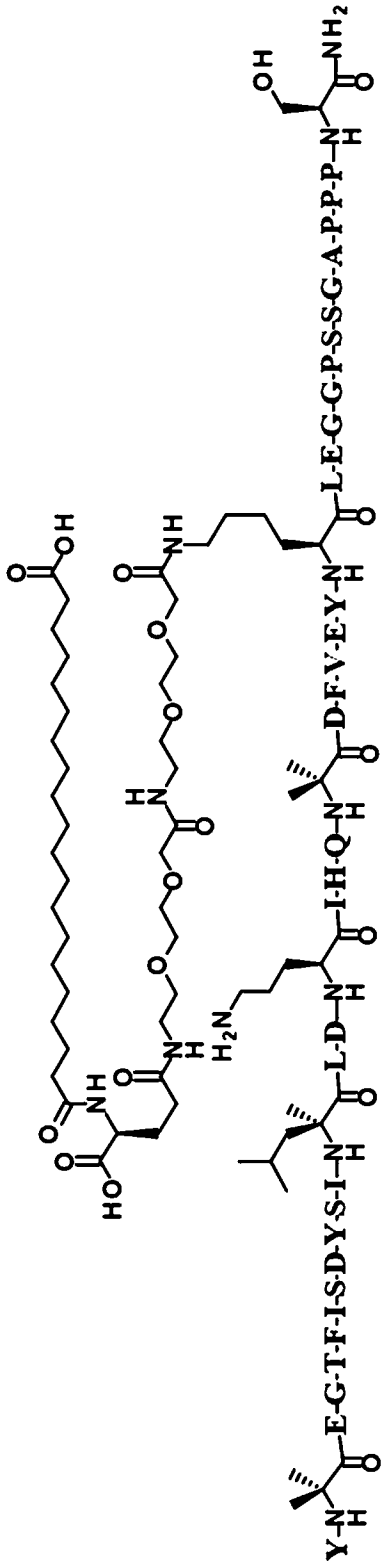
Соединение согласно SEQ ID NO:9 получали по существу с применением процедур, описанных в примере 1, при этом для лизина Fmoc-Lys(Mtt)-OH использовали в положении 26, а не в положении 17. Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (обнаружено: $[M+3H]^{3+}$ = 1662,8; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1662,88; найденная молекулярная масса (среднее значение) = 4985,4; расчетная молекулярная масса (среднее значение) = 4985,63).

Пример 6

Y-Aib-EGTFISDYSI-αMeL-LD-Orn-IHQ-Aib-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)LEGGPSSGAPPPS-NH_2 (SEQ ID NO:10)

Структура SEQ ID NO:10 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков Aib2, αMeL13, Orn16, Aib20,

K26 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:



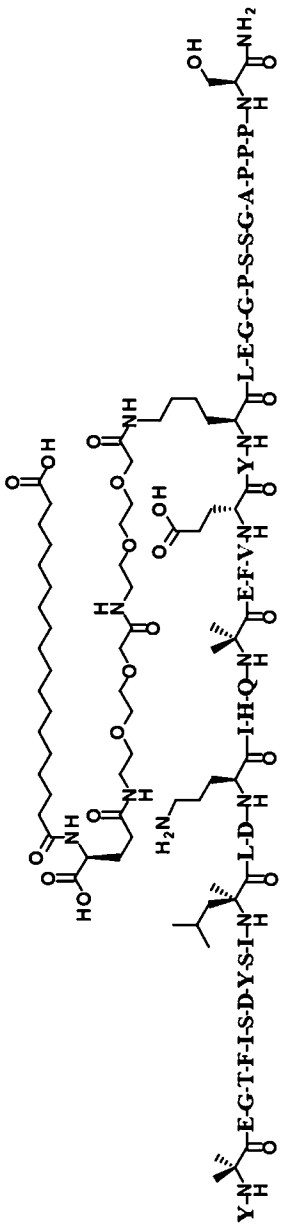
Соединение согласно SEQ ID NO:10 получали по существу с применением процедур, описанных в примере 1, при этом для лизина Fmoc-Lys(Mtt)-OH использовали в положении 26, а не в положении 17. Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (обнаружено: $[M+3H]^{3+}$ = 1658,1; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1658,20; найденная

молекулярная масса (среднее значение) = 4971,3; расчетная молекулярная масса (среднее значение) = 4971,6).

Пример 7

Y-Aib-EGTFISDYSI-αMeL-LD-Orn-IHQ-Aib-EFV-(D-Glu)-YK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$ (SEQ ID NO:11)

Структура SEQ ID NO:11 изображена ниже с применением стандартных однобуквенных кодов аминокислот за исключением остатков Aib2, αMeL13, Orn16, Aib20, D-Glu24, K26 и Ser39, при этом структуры таких аминокислотных остатков были увеличены:



Соединение согласно SEQ ID NO:11 получали по существу с применением процедур,

описанных в примере 1, при этом для лизина Fmoc-Lys(Mtt)-OH использовали в положении 26, а не в положении 17, и защищенная двухосновная кислота представляла собой моно-OtBu-октадекандиовую кислоту (WuXi AppTec, Шанхай, Китай). Молекулярную массу определяли с помощью ЖХ/МС (найдено: $[M+3H]^{3+}$ = 1653,4; рассчитано $[M+3H]^{3+}$ = 1653,52; найденная молекулярная масса (среднее значение) = 4957,2; расчетная молекулярная масса (среднее значение) = 4957,57).

Соединения согласно примеру 8 (SEQ ID NO:12) - примеру 122 (SEQ ID NO:126) получали по существу с применением процедур, описанных в примере 1.

Пример	**SEQ ID NO**	**Название соединения**	**Расчетная (средняя) молекулярная масса**	**Найденная (средняя) молекулярная масса**
8	12	Y-(Aib)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)AQ-(Aib)-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4926,61	4926,6
9	13	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4978,64	4978,4
10	14	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQQDFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4950,59	4950,4
11	15	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)AQQDFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4955,61	4955,2
12	16	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)AQQDFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4884,53	4884,4
13	17	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQQEFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5035,7	5035,2
14	18	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQQDFVEWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5036,68	5036,8

15	19	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQQDFVNYLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4998,63	4998,4
16	20	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)AQ-(Aib)-DFVEWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4899,54	4899,3
17	21	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)AQ-(Aib)-DFVNWLLEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4942,56	4941,9
18	22	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)AQ-(Aib)-DFVN-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4846,48	4846,5
19	23	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)AQ-(Aib)-DFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4813,45	4813,2
20	24	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)AQ-(Aib)-EFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4898,55	4898,4
21	25	Y-(Aib)-EGTFISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4828,42	4827,9
22	26	Y-(Aib)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4870,5	4870,5
23	27	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4842,45	4842,3
24	28	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(Aib)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4842,45	4842,3
25	29	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4907,56	4907,1
26	30	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4925,56	4925,4

27	31	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)AQ-(Aib)-EFVQWLLAGGPSSGAPPPS-NH_2	4841,5	4841,4
28	32	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)AQ-(Aib)-EFVNWLLEGGPSSGAPPPS-NH_2	4885,51	4885,2
29	33	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)AQ-(Aib)-EFVEWLLAGGPSSGAPPPS-NH_2	4842,49	4842,45
30	34	Ацетил-(D-Tyr)-AEGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)HQ-(Aib)-EFVNYLLAGGPSSGAPPPS-NH_2	4902,47	4902,0
31	35	Y-(Aib)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVNYLLAAGPSSGAPPPS-NH_2	4884,53	4884,6
32	36	Y-(D-Ala)-EGTLISDYSILLDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)AQ-(Aib)-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH_2	4850,51	4850,4
33	37	Ацетил-(D-Tyr)-AEGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-EFVNYLLEGGPSSGAPPPS-NH_2	4988,56	4988,1
34	38	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-EFVNYLLATGPSSGAPPPS-NH_2	4946,57	4946,4
35	39	Y-(Aib)-EGT-(αMeL)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-EFVNYLLATGPSSGAPPPS-NH_2	4894,56	4894,2
36	40	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH_2	5005,59	5005,8
37	41	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEGGPSSGAPPPS-NH_2	4961,54	4961,4

38	42	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	4990,58	4990,2
39	43	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4946,53	4946,4
40	44	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEWLLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5028,63	5028,6
41	45	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	4972,59	4972,5
42	46	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4999,61	4999,8
43	47	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4942,56	4942,2
44	48	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4928,54	4928,1
45	49	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5014,67	5014,65
46	50	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5041,69	5041,35
47	51	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4970,62	4970,4
48	52	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4912,58	4912,8
49	53	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4884,51	4884,6

50	54	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4926,61	4926,9
51	55	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4944,6	4944,6
52	56	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4926,61	4926,3
53	57	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEYLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4927,59	4927,5
54	58	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEWLLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4950,63	4950,6
55	59	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4864,54	4864,8
56	60	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-D- (αMeF)-VE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4926,61	4926,6
57	61	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4997,69	4997,5
58	62	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH$_2$	4970,66	4970,4
59	63	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4940,63	4940,4
60	64	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5011,71	5011,5

61	65	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH$_2$	4984,69	4984,8
62	66	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4954,66	4954,2
63	67	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVEYLLEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5070,73	5070,9
64	68	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5043,71	5043,9
65	69	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVEYLLEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	5013,68	5013,9
66	70	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5029,68	5029,2
67	71	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5056,71	5056,8
68	72	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4999,65	4999,2
69	73	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4985,63	4985,7
70	74	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH$_2$	4956,63	4956,3
71	75	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVEWLLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5052,72	5052,6
72	76	Y-(Aib)-EGTLISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5009,69	5009,7

73	77	Y-(Aib)-EGTLISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-EFVEYLLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4965,64	4965,3
74	78	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4922,57	4922,4
75	79	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	4966,63	4966,8
76	80	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4908,55	4908,6
77	81	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	4952,6	4952,4
78	82	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4926,61	4926,3
79	83	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH$_2$	4983,66	4983,3
80	84	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5000,64	5000,4
81	85	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5027,67	5027,7
82	86	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4956,59	4956,45
83	87	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDEK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH$_2$	4957,57	4957,8

84	88	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDEK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH_2	4984,6	4984,2
85	89	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDEK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH_2	4927,55	4927,2
86	90	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDEK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH_2	4913,52	4913,1
87	91	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH_2	4942,56	4942,8
88	92	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH_2	4936,6	4936,2
89	93	Y-(Aib)-EGTLISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH_2	4950,63	4950,6
90	94	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(αMeY)-LLEAGPSSGAPPPS-NH_2	5013,64	5013,6
91	95	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)HQ-(Aib)-DFVE-(αMeY)-LLEGGPSSGAPPPS-NH_2	4999,61	4999,5
92	96	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{18}$-CO_2H)LEQGPSSGAPPPS-NH_2	5056,71	5057,1
93	97	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKIAQ-(Aib)-DFVNWK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)LAQGPSSGAPPPS-NH_2	4884,53	4884,3
94	98	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)$_{16}$-CO_2H)LAGGPSSGAPPPS-NH_2	4874,46	4874,4

95	99	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4960,55	4960,8
96	100	Y-(Aib)-EGTFISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4870,5	4870,2
97	101	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4884,53	4884,6
98	102	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LAGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4902,52	4902,15
99	103	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4961,54	4961,4
100	104	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIHQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4984,64	4984,2
101	105	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFV-(D-Glu)-YK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4971,6	4971,75
102	106	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFV-(D-Glu)-YK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4985,63	4985,1
103	107	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4943,55	4943,4
104	108	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4999,65	4999,2
105	109	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LETGPSSGAPPPS-NH$_2$	5029,68	5029,2

106	110	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5056,71	5056,8
107	111	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4985,63	4985,4
108	112	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4956,59	4956,3
109	113	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4970,62	4970,4
110	114	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4942,56	4942,2
111	115	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4928,54	4928,4
112	116	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4946,53	4946,4
113	117	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H) LEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4960,55	4960,8
114	118	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H) LEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5017,6	5017,2
115	119	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIRQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	5004,63	5004,6
116	120	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IRQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4990,61	4990,2

117	121	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4999,65	4999,8
118	122	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIRQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	5018,66	5018,4
119	123	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSILLDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEGGPSSGAPPPS-NH$_2$	4988,57	4988,4
120	124	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSILLDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	5002,59	5002,5
121	125	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSILLDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEQGPSSGAPPPS-NH$_2$	5059,64	5059,8
122	126	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-амино-этокси)-этокси]-ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H)LEAGPSSGAPPPS-NH$_2$	4984,64	4984,80

Анализы связывания

Глюкагон (обозначаемый как Gcg или hGcg) представляет собой эталонный стандарт, изготовленный в компании Eli Lilly and Company. GLP-1(7-36)-NH$_2$ (обозначаемый как GLP-1 или hGLP-1) был приобретен в компании CPC Scientific (Саннивейл, Калифорния, чистота 97,2%, аликвоты 100 мкМ в 100% ДМСО). GIP(1-42)-NH$_2$ (обозначаемый как GIP) получали в компании Lilly Research Laboratories путем пептидного синтеза и ВЭЖХ, как описано выше (чистота> 80%, аликвоты 100 мкМ в 100% ДМСО). [^{125}I]-радиоактивно меченный Gcg, GLP-1, или GIP получали с применением [^{125}I]-лактопероксидазы и приобретали в компании Perkin Elmer (Бостон, Массачусетс).

Стабильно трансфицированные клеточные линии получали путем субклонирования кДНК рецептора в экспрессионную плазмиду pcDNA3 и трансфицировали в эмбриональные клетки почки человека (HEK) 293 (hGcgR и hGLP-1R) или клетки яичника китайского хомячка (CHO) (hGIPR) с последующей селекцией с помощью генетицина (hGLP-1R и hGIPR) или гигромицина B (hGcgR).

Для получения неочищенных клеточных мембран использовали два способа.

Способ 1. Замороженные клеточные осадки лизировали на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 мМ Трис HCl, pH 7,5 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ с ЭДТА. Суспензию клеток разрушали с применением стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пестиком Teflon® для 25 ударов. Гомогенат центрифугировали при 4 °C при 1100×g в течение 10 минут. Супернатант собирали и хранили на льду, тогда как осадки ресуспендировали в буфере для гомогенизации и повторно гомогенизировали, как описано выше. Гомогенат центрифугировали при 1100×g в течение 10 минут. Второй супернатант объединяли с первым супернатантом и центрифугировали при 35000×g в течение 1 часа при 4 °C. Полученный осадок мембран ресуспендировали в буфере для гомогенизации, содержащем ингибиторы протеаз в концентрации приблизительно от 1 до 3 мг/мл, быстро замораживали в жидком азоте и хранили в виде аликвот в морозильной камере с температурой -80 °C до применения.

Способ 2. Замороженные клеточные осадки лизировали на льду в гипотоническом буфере, содержащем 50 мМ Трис HCl, pH 7,5, 1 мМ $MgCl_2$, ингибиторы протеазы Roche Complete™, не содержащие ЭДТА, и 25 единиц/мл ДНКазы I (Invitrogen). Суспензию клеток разрушали с помощью стеклянного гомогенизатора Potter-Elvehjem, оснащенного пестиком Teflon® для от 20 до 25 ударов. Гомогенат центрифугировали при 4°C при 1800×g в течение 15 минут. Супернатант собирали и хранили на льду, тогда как осадки ресуспендировали в буфере для гомогенизации (без ДНКазы I) и повторно гомогенизировали, как описано выше. Гомогенат центрифугировали при 1800×g в течение 15 минут. Второй супернатант объединяли с первым супернатантом и дополнительно центрифугировали при 1800×g в течение 15 минут. Затем весь супернатант центрифугировали при 25000×g в течение 30 минут при 4° C. Полученный осадок мембран ресуспендировали в буфере для гомогенизации (без ДНКазы I), содержащем ингибиторы протеаз в концентрации приблизительно от 1 до 3 мг/мл, и хранили в виде аликвот в морозильной камере с температурой -80 °C до применения.

Способы определения связывания

Константы диссоциации равновесного связывания (K_d) для различных взаимодействий рецептор/радиолиганд определяли на основе анализа гомологичного конкурентного связывания, а не связывания насыщения, из-за высокого содержания пропанола в [^{125}I] исходном материале. Значения K_d, определенные для препаратов рецепторов, были следующими: hGcgR (3,9 нМ), hGLP-1R (1,2 нМ) и hGIPR (0,14 нМ).

Связывание [^{125}I]-глюкагона

Анализы связывания рецептора человеческого Gcg проводили с применением

формата сцинтилляционного анализа сближения (SPA) с гранулами агглютинина из проростков пшеницы (WGA) (Perkin Elmer). Буфер для связывания содержал 25 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), pH 7,4, 2,5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1% (масс/об.) бацитрацина (Research Products), 0,003% (масс./об.) монолаурата полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20) и ингибиторы протеазы Roche Complete™ без ЭДТА. Пептиды и Gcg размораживали и проводили 3-кратное последовательное разведение в 100% ДМСО (кривые концентрация-эффект по 10 точкам). Затем 5 мкл последовательно разбавленного соединения или ДМСО переносили в аналитические планшеты с прозрачным дном Corning® 3632, содержащие 45 мкл буфера для анализа связывания или немеченый контрольный Gcg (неспецифическое связывание или NSB, при конечной концентрации 1 мкМ). Затем с помощью дозатора Biotek Multiflo добавляли 50 мкл [^{125}I]-Gcg (конечная концентрация 0,15 нМ), 50 мкл мембран человеческого GcgR (1,5 мкг/лунка) и 50 мкл гранул WGA SPA (от 80 до 150 мкг/лунка). Планшеты герметично закрывали и перемешивали на планшетном шейкере (настройка 6) в течение 1 минуты и считывали с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после 12 часов инкубации/осаждения при комнатной температуре. Конечные диапазоны аналитических концентраций для исследуемых пептидов обычно составляли на кривых концентрация-эффект от 1150 нМ до 0,058 нМ и для контрольного Gcg от 1000 нМ до 0,05 нМ.

Связывание [^{125}I]-GLP-1

Анализ связывания рецептора человеческого GLP-1 проводили с применением формата SPA с гранулами WGA. Буфер для связывания содержал 25 мМ HEPES, pH 7,4, 2,5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1% (масс/об.) бацитрацина, 0,003% (масс/об.) TWEEN®-20 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ без ЭДТА. Пептиды и GLP-1 размораживали и проводили 3-кратное последовательное разведение в 100% ДМСО (кривые концентрация-эффект по 10 точкам). Затем 5 мкл последовательно разбавленного соединения или ДМСО переносили в аналитические планшеты с прозрачным дном Corning® 3632, содержащие 45 мкл буфера для анализа связывания или немеченый контрольный GLP-1 (неспецифическое связывание или NSB, при конечной концентрации 0,25 мкМ). Затем с помощью дозатора Biotek Multiflo добавляли 50 мкл [^{125}I]-GLP-1 (конечная концентрация 0,15 нМ), 50 мкл мембран человеческого GLP-1R (0,5 мкг/лунка) и 50 мкл гранул WGA SPA (от 100 до 150 мкг/лунка). Планшеты герметично закрывали и перемешивали на планшетном шейкере (настройка 6) в течение 1 минуты и считывали с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после от 5 до 12 часов инкубации/осаждения при комнатной температуре. Конечные диапазоны аналитических концентраций для исследуемых пептидов обычно составляли на кривых концентрация-эффект от 1150 нМ до 0,058 нМ и

для контрольного GLP-1 от 250 нМ до 0,013 нМ.

Связывание [^{125}I]-GIP

Анализ связывания рецептора человеческого GIP проводили с применением формата SPA с гранулами WGA. Буфер для связывания содержал 25 мМ HEPES, pH 7,4, 2,5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1% (масс/об.) бацитрацина, 0,003% (масс/об.) TWEEN®-20 и ингибиторы протеазы Roche Complete™ без ЭДТА. Пептиды и GIP размораживали и проводили 3-кратное последовательное разведение в 100% ДМСО (кривые концентрация-эффект по 10 точкам). Затем 5 мкл последовательно разбавленного соединения или ДМСО переносили в аналитические планшеты Corning® 3632 с прозрачным дном, содержащие 45 мкл буфера для анализа связывания или немеченый контрольный GIP (неспецифическое связывание или NSB, при конечной концентрации 0,25 мкМ). Затем с помощью дозатора Biotek Multiflo добавляли 50 мкл [^{125}I]-GIP (конечная концентрация от 0,075 до 0,15 нМ), 50 мкл мембран человеческого GIPR (3 мкг/лунка) и 50 мкл гранул WGA SPA (от 100 до 150 мкг/лунка). Планшеты герметично закрывали и перемешивали на планшетном шейкере (настройка 6) в течение 1 минуты и считывали с помощью сцинтилляционного счетчика PerkinElmer Trilux MicroBeta® после от 2,5 до 12 часов инкубации/осаждения при комнатной температуре. Конечные диапазоны аналитических концентраций для исследуемых пептидов обычно составляли на кривых концентрация-эффект от 1150 нМ до 0,058 нМ или от 115 нМ до 0,0058 нМ и для контрольного GIP от 250 нМ до 0,013 нМ.

Анализ данных анализа связывания

Необработанные данные CPM для концентрационных кривых пептидов, Gcg, GLP-1 или GIP преобразовывали в степень ингибирования в процентах путем вычитания неспецифического связывания (связывание в присутствии избытка немеченого Gcg, GLP-1 или GIP, соответственно) из отдельных значений CPM и деления на общий сигнал связывания, также скорректированный путем вычитания неспецифического связывания. Данные анализировали с помощью методов четырехпараметрической нелинейной регрессии (максимум кривой, минимум кривой, IC_{50}, угловой коэффициент Хилла) (Genedata Screener, версия 12.0.4, Genedata AG, Базель, Швейцария). Константу сродства (Ki) рассчитывали из абсолютного значения IC_{50} на основе уравнения $K_i = IC_{50}/(1 + D/K_d)$, где D представляет собой концентрацию радиолиганда, применяемого в эксперименте, IC_{50} представляет собой концентрацию, вызывающую 50% ингибирование связывания, и K_d представляет собой константу диссоциации равновесного связывания радиолиганда (описанного выше). Значения K_i приведены в виде среднего геометрического значения с погрешностью, выраженной в виде стандартной погрешности среднего значения (SEM), при этом n равно количеству независимых параллельных анализов (определено в анализах,

проводимых в разные дни). Геометрические средние значения рассчитывали следующим образом:

Среднее геометрическое значение = $10^{(\text{Среднее арифметическое значений Log Ki})}$

n = y/x означает, что только одну подгруппу параллельных анализов (y) из общего числа параллельных анализов (x) использовали для выражения среднего значения. SEM рассчитывали только при y = 2 или более. Средние значения выражали как геометрические средние значения со стандартной погрешностью среднего значения (SEM) и числом параллельных анализов (n), указанным в скобках.

Таблица 1. Сродство связывания (K_i) *in vitro* указанных иллюстративных соединений и молекул-компараторов для человеческих GcgR, GIPR и GLP-1R в присутствии 0,1% бацитрацина.

Иллюстративное соединение или компаратор	**K_i hGcgR (нМ) (SEM, n)**	**K_i hGIPR (нМ) (SEM, n)**	**K_i hGLP1R (нМ) (SEM, n)**
hGIP-NH_2	1150 (18,3, n=4)	0,125 (0,00511, n=319)	1100 (143, n=4)
hGlucagon	3,05 (0,120, n=457)	>2420 (n=3)	>4940 (n=5)
hGLP-1 (7-36) NH_2	>4590 (n=5)	>2300 (n=3)	0,785 (0,0252, n=489)
1	228 (46,6, n=5)	0,0667 (0,0566, n=5)	57,8 (16,7, n=5)
2	379 (218, n=3)	0,0373 (0,000430, n=3)	77,9 (20,2, n=3)
3	338 (220, n=8)	0,0525 (0,0215, n=8)	381 (226, n=8)
4	431 (253, n=6)	0,0620 (0,0259, n=6)	423 (235, n=6)
5	619 (140, n=9)	0,0771 (0,0342, n=9)	>913 (n=9)
6	453 (125, n=7)	0,104 (0,0866, n=7)	571 (368, n=7)
7	>961 (n=5)	0,193 (0,157, n=5)	>913 (n=5)
8	101	0,027	38,1
9	>230	0,110	168
10	>230	0,159	60,7
11	163	0,0584	85,9
12	134	0,0876	46,8
13	>230	0,237	>213
14	>230	0,460	>213
15	>254	0,471	>236
16	549	0,0438	99,2
17	274	0,0571	106

18	463	0,0331	158
19	335	0,0469	15,2
20	216	0,0477	79,8
21	>1530	1,46	801
22	>1380	0,219	388
23	323	0,0341	251
24	>960	0,254	729
25	101	0,0417	15,8
26	74,1	0,045	16,5
27	401	0,0354	23,2
28	86,8	0,0732	6,46
29	133	0,0569	22,7
30	407	0,037	26,5
31	>959	0,0473	266
32	>959	0,0343	85,2
33	63,5	0,0369	31,2
34	143	0,034	201
35	>960	0,0351	177
36	201	0,0683	393
37	51,4	0,026	83,9
38	182 (59,8, n=2)	0,0588 (0,0112, n=2)	776 (134, n=2)
39	76,0 (19,3, n=2)	0,0444 (0,00439, n=2)	235 (8,34, n=2)
40	50,9	0,0594	302
41	758	0,143	>906
42	99,1	0,0392	563
43	285 (121, n=2)	0,0366	605
44	50	0,059	209
45	660 (257, n=3)	0,0663 (0,0241, n=3)	>909 (n=3)
46	435 (89,6, n=3)	0,0319 (0,00724, n=3)	744 (58,2, n=3)
47	175 (69,7, n=3)	0,0452 (0,0127, n=3)	320 (77,8, n=3)
48	267	0,0498	211
49	>960	0,0512	596
50	23,4	0,0501	34,9
51	26,7	0,0386	54,1
52	114	0,0372	128
53	152	0,0184	62,9
54	386	0,0326	49,9
55	>960	0,0331	262
56	193	0,0487	530
57	422	0,0154	280
58	418	0,0324	459

	(1,17, n=2)	(0,00694, n=2)	(68,3, n=2)
59	230	0,0148	109
60	26,2	0,0390	51,4
61	80,4	0,0665	135
62	31,3	0,0414	47,6
63	185	0,0248	327
64	196	0,022	477
65	279	0,0316	305
66	279	0,0866	326
68	290	0,0948	421
69	114	0,0406	144
70	857	0,0421	570
71	102	0,0422	347
72	837	0,0594	437
73	292	0,036	117
74	511	0,0287	395
75	>958	0,0626	>902
76	358	0,0293	263
77	>958 (n=2)	0,0841 (0,0207, n=2)	>905 (n=2)
78	505	0,0236	394
79	888	0,0229	486
80	>958 (n=2)	0,0828 (0,0284, n=2)	>906 (n=2)
81	699 (35,4, n=2)	0,0374 (0,0106, n=2)	714 (39,8, n=2)
82	305 (112, n=2)	0,0617 (0,00946, n=2)	388 (140, n=2)
83	>958	0,116	452
84	>958	0,0584	325
85	800	0,0529	220
86	462	0,0533	108
87	576	0,0538	849
88	788	0,0830	261
89	611 (n=3)	0,0720 (0,0169, n=4)	294 (72,9, n=4)
90	112	0,129	102
91	54,4	0,122	37,4
92	>958	0,0331	>902
93	>959	0,0430	>909
94	114	0,0310	>909
95	85,0	0,0255	832
96	>960	0,232	>908
97	77,5	0,0249	570
98	38,4	0,0195	311
99	174	0,0341	>901

100	572 (182, n=4)	0,0674 (0,0265, n=3)	>913 (n=3)
101	>961 (n=2)	0,139 (0,0585, n=2)	>913 (n=2)
102	>961 (n=3)	0,164 (0,113, n=3)	>913 (n=3)
103	>960	0,0405	>913
104	>960	0,134	>910
105	>960	0,174	>910
106	304	0,0918	>910
107	347	0,0722	>911
108	>960	0,134	>910
109	>960	0,117	>908
110	>960	0,339	>908
111	>960	0,0871	>908
112	257	0,0742	>908
113	821 (3,12, n=4)	0,108 (0,0287, n=5)	>921 (n=5)
114	>971 (n=3)	0,121 (0,0496, n=4)	>921 (n=4)
115	373 (n=2)	0,0997 (0,0472, n=2)	>912 (n=2)
116	178 (n=2)	0,166 (0,0753, n=2)	>912 (n=2)
117	685	0,0722	591
118	Нет данных	0,0696	>920
119	68,8 (n=2)	0,129 (0,0552, n=2)	723 (119, n=2)
120	575 (n=2)	0,171 (0,231, n=2)	>912 (n=2)
121	94,9 (n=2)	0,103 (0,0473, n=2)	>912 (n=2)
122	957	0,0311	>913

Как показано в таблице 1, иллюстративные соединения согласно настоящему изобретению представляют собой очень эффективные связывающие вещества в отношении человеческого GIPR и имеют более низкое сродство к GLP-1R и GcgR.

Фармакологический функциональный анализ cAMP (циклического аденозинмонофосфата) в присутствии 0,1% казеина

Ряд анализов cAMP проводили с применением клеток HEK293, экспрессирующих человеческий рецептор GLP-1 (GLP-1R), рецептор глюкозозависимого инсулинотропного пептида (GIPR) или рецептор глюкагона (GcgR). Каждую клеточную линию со сверхэкспрессией рецептора (20 мкл) обрабатывали исследуемым пептидом в DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко) (Gibco

кат. № 31053) с добавлением 0,1% казеина (Sigma кат. № C4765), 250 мкМ IBMX (изобутилметилксантин), 1X GlutaMAXTM (Gibco кат. № 35050), и 20 мМ HEPES (HyClone кат. № SH30237.01) в анализируемом объеме 20 мкл. После инкубации в течение 60 минут при комнатной температуре полученное увеличение внутриклеточного cAMP определяли количественно с применением набора для анализа CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Далее, для определения уровня cAMP добавляли буфер для лизиса, содержащий конъюгат cAMP-d2 (20 мкл) и антитело анти-cAMP-Eu3+-криптат (20 мкл). После инкубации в течение 60 минут при комнатной температуре регистрировали сигнал HTRF с помощью планшетного ридера Envision 2104 (PerkinElmer). Измеряли флюоресцентное излучение при 620 нм и при 665 нм и рассчитывали соотношение между 620 нм и 665 нм, которое затем переводили в нМ cAMP на лунку с применением стандартной кривой cAMP. Кривые доза-эффект соединений были построены как степень стимуляции в процентах, нормализованная к минимальным (только буфер) и максимальным (максимальная концентрация каждого контрольного лиганда) значениям, и проанализированы с применением подгонки четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменным наклоном (Genedata Screener 13). EC_{50} представляло собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальную стимуляцию на кривой доза-эффект. Относительное значение EC_{50} получали с помощью нелинейного регрессионного анализа с применением максимального отклика в процентах относительно концентрации добавленного пептида, подогнанного к четырехпараметрическому логистическому уравнению.

Применяя способы гомогенной флуоресценции с временным разрешением, проводили анализы для определения собственной активности иллюстративных молекул и молекул-компараторов, выполняемые в присутствии казеина (вместо сывороточного альбумина) в качестве неспецифического блокатора, не взаимодействующего с фрагментами жирных кислот анализируемых молекул.

Уровни внутриклеточного cAMP определяли путем экстраполяции с применением стандартной кривой. Кривые доза-эффект для соединений были построены как степень стимуляции в процентах, нормализованная к минимальным (только буфер) и максимальным (максимальная концентрация каждого контрольного лиганда) значениям, и проанализированы с применением подгонки четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменным наклоном (Genedata Screener 13). EC_{50} представляло собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальную стимуляцию на кривой доза-эффект. Каждое относительное значение EC_{50} для расчета среднего геометрического значения определяли путем подбора кривой.

Кривые концентрация-эффект соединений были построены как степень стимуляции в процентах, нормализованная к минимальным (только буфер) и максимальным (максимальная концентрация каждого контрольного лиганда) значениям, и проанализированы с применением подгонки четырехпараметрической нелинейной регрессии с переменным наклоном (Genedata Screener 13). EC_{50} представляло собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальную стимуляцию на кривой доза-эффект. Сводные статистические данные для EC_{50} рассчитывали следующим образом: Среднее геометрическое значение:

$GM = 10^{(\text{среднее арифметическое log10-преобразованных значений } EC_{50})}$. Приведена стандартная погрешность среднего значения:

SEM = среднее геометрическое значение × (стандартное отклонение log10-преобразованных значений EC_{50}/квадратный корень из количества анализов) × $\log_e 10$.

Путем логарифмического преобразования учитывали значения EC_{50}, лежащие на мультипликативной, и не на арифметической шкале.

Каждый раз при проведении анализа исследуемые пептиды анализировали вместе с нативными лигандами GIP, GLP-1 и глюкагоном, в качестве исходного уровня (минимум) использовали только буфер и в качестве максимума для расчетов использовали самую высокую концентрацию соответствующих GIP, GLP-1 и глюкагонового стандарта. Для иллюстрации, как показано в примере 1, пептид исследовали в 8 циклах анализа hGIPR cAMP. Во избежание сомнений, значения EC_{50} амида hGIP, амида hGLP-1 и глюкагона в таблице 2 иллюстрируют средние геометрические значения, рассчитанные на основе серии из 18 аналитических значений, при этом значения будут меняться каждый день по сравнению с нулевым буфером. Соответственно, для нормализации результатов анализа иллюстративных соединений для каждого примера использовали среднее геометрическое указанных значений.

Таблица 2. Функциональная активация hGcgR, hGIPR и hGLP-1R в присутствии 0,1% казеина**.**

Иллюстративное соединение или компаратор	**EC_{50} hGcgR cAMP Rel нМ (SEM, n)**	**EC_{50} hGIPR cAMP Rel нМ (SEM, n)**	**EC_{50} hGLP1R cAMP Rel нМ (SEM, n)**
hGIP-NH_2	>5000 (n=5)	0,122 (0,00449, n=494)	>500 (n=3)
hGlucagon	0,0116 (0,000315, n=306)		9,79 (1,83, n=3)

hGLP-1(7-36) NH_2	>500 (n=4)		0,0549 (0,00149, n=490)
1	575 (369, n=4)	0,0476 (0,0253, n=8)	>5000 (n=5)
2	608 (n=11)	0,0123 (0,00751, n=15)	>5000 (n=11)
3	1250 (398, n=6)	0,0178 (0,00680, n=9)	>5000 (n=6)
4	1690 (n=5)	0,0182 (0,00783, n=5)	>5000 (n=5)
5	>5000 (n=5)	0,0148 (0,00434, n=5)	>5000 (n=5)
6	>5000 (n=4)	0,0176 (0,00714, n=14)	>5000 (n=4)
7	>5000 (n=2)	0,0219 (0,00294, n=2)	>5000 (n=2)
8	295 (62,9, n=2)	0,0268 (0,000153, n=3)	>5000 (n=2)
9	>5000	0,165	>100
10	>5000	0,611	>100
11	445	0,0738	>100
12	>5000	0,0911	>100
13	>5000	0,129	>100
14	>5000	0,340	>100
15	>5000	0,282	>100
16	>5000 (n=2)	0,00937 (0,00210, n=2)	>5000 (n=2)
17	>5000 (n=2)	0,0135 (0,00227, n=2)	>5000 (n=2)
18	>5000 (n=2)	0,00656 (0,00228, n=2)	>5000 (n=2)
19	>5000 (n=2)	0,00992 (0,00148, n=3)	>5000 (n=2)
20	>5000 (n=2)	0,00933 (0,00112, n=3)	>5000 (n=2)
21	>5000 (n=3)	0,291 (0,0766, n=4)	>5000 (n=3)
22	1250 (487, n=3)	0,0345 (0,00839, n=4)	>5000 (n=3)
23	>5000 (n=5)	0,0192 (0,00529, n=4)	206 (13,8, n=4)
24	>5000 (n=2)	0,0699 (0,0155, n=3)	>5000 (n=2)
25	>5000 (n=2)	0,0155 (0,00237, n=3)	8,39 (2,46, n=4)
26	>5000 (n=2)	0,00991 (0,00277, n=2)	5,69 (2,48, n=4)
27	>5000 (n=2)	0,0132 (0,000266, n=2)	>5000 (n=2)
28	>5000 (n=2)	0,0118 (0,00124, n=2)	>5000 (n=2)

29	>5000 (n=4)	0,00679 (0,00193, n=4)	>5000 (n=4)
30	>5000 (n=4)	0,00572 (0,00160, n=4)	>5000 (n=4)
31	1750 (886, n=3)	0,0148 (0,00426, n=3)	>5000 (n=3)
32	>5000 (n=2)	0,00469 (0,00199, n=3)	>5000 (n=2)
33	>5000	0,0551	>5000
34	913 (586, n=2)	0,0177 (0,00478, n=2)	462 (321, n=2)
35	>5000	0,0125	>5000
36	>5000	0,0543	1080
37	>5000	0,0360	61,1
38	>5000	0,0368	1390
39	>5000	0,0112	3330
40	>5000	0,0330	2330
41	>5000	0,0281	1800
42	>5000	0,0091	815
43	>5000	0,0154	1020
44	>5000	0,0084	1180
45	1690 (n=2)	0,0490 (0,000420, n=2)	>5000 (n=2)
46	863 (n=2)	0,0294 (0,0166, n=2)	>5000 (n=2)
47	757 (492, n=2)	0,0234 (0,00230, n=2)	>5000 (n=2)
48	1360	0,0166	>5000
49	2860 (620, n=6)	0,0156 (0,00569, n=7)	>5000 (n=6)
50	371,0	0,0212	41,0
51	308,0	0,0166	24,7
52	337,0	0,0194	>5000
53	344 (136, n=2)	0,0194 (0,00603, n=3)	>5000 (n=2)
54	>5000	0,0540	>5000
55	>5000	0,0170	>5000 (n=2)
56	>5000	0,0169	>5000 (n=2)
57	886 (430, n=2)	0,0177 (0,00819, n=3)	>5000 (n=2)
58	>5000	0,0183 (0,00544, n=2)	>5000
59	>5000	0,0202	>5000
60	>5000	0,0369	71
61	>5000	0,0167	192
62	>5000	0,0116	58,2
63	1170	0,0398	>5000
64	3070	0,0448	>5000

65	850	0,0346	>5000
66	>5000	0,0786	>5000
67	>5000	0,0627	>5000
68	3030 (n=2)	0,0768	>5000 (n=2)
69	803 (237, n=2)	0,0302 (0,00976, n=2)	>5000
70	3560	0,0254	>5000
71	581	0,0721	>5000
72	>5000	0,0182	>5000
73	>5000	0,0151	>5000
74	627	0,0167	>5000
75	2170	0,0182	>5000
76	1200	0,0154	>5000
77	2660	0,0265	>5000
78	3000 (n=2)	0,0125 (0,00185, n=2)	>5000 (n=2)
79	>5000	0,0316	>5000
80	>5000 (n=2)	0,0777 (0,0223, n=2)	>5000 (n=2)
81	>5000 (n=2)	0,0282 (0,00791, n=2)	>5000 (n=2)
82	3790 (n=2)	0,0391 (0,00658, n=2)	>5000 (n=2)
83	>5000	0,0432	>5000
84	>5000	0,0340	>5000
85	>5000	0,0359	>5000
86	>5000	0,0300	>5000
87	>5000	0,0107	>5000
88	1670	0,0031	>5000
89	>5000 (n=2)	0,00687 (0,00245, n=2)	>5000 (n=2)
90	>5000	0,0272	>5000
91	289	0,0321	530
92	>5000 (n=2)	0,0191 (0,00110, n=2)	>5000 (n=2)
93	>5000 (n=2)	0,00482 (0,000315, n=2)	884 (n=2)
94	>5000 (n=4)	0,00436 (0,00186, n=4)	1090 (442, n=4)
95	>5000	0,0272 (0,0110, n=2)	>5000
96	>5000	0,0251	>5000
97	>5000	0,0090	2510
98	>5000 (n=2)	0,00718 (0,00331, n=3)	649 (369, n=2)
99	>5000	0,00454 (0,000120, n=2)	>5000
100	>5000	0,0224	>5000

101	>5000 (n=2)	0,0396 (0,00639, n=2)	>5000 (n=2)
102	>5000 (n=2)	0,0166 (0,00337, n=2)	>5000 (n=2)
103	>5000 (n=2)	0,0129 (0,00901, n=2)	>5000 (n=2)
104	>5000	0,0165	>5000
105	>5000	0,0179	>5000
106	>5000	0,0140	>5000
107	>5000	0,0199	>5000
108	>5000	0,0088	>5000
109	>5000	0,0113	>5000
110	>5000	0,0071	>5000
111	>5000	0,0065	>5000
112	>5000	0,0041	>5000
113	>5000 (n=3)	0,0142 (0,0108, n=3)	>5000 (n=3)
114	>5000	0,0075	>5000
115	>5000	0,0372	>5000
116	>5000	0,0280	>5000
117	>5000	0,0617	>5000
118	>5000	0,0611	>5000
119	>5000	0,0220	>5000
120	>5000	0,0228	>5000
121	>5000	0,0196	>5000
122	>5000	0,0100	>5000

Как продемонстрировали данные в таблице 2, иллюстративные соединений согласно настоящему изобретению очень эффективно стимулировали cAMP из человеческого GIPR в присутствии 0,1% казеина.

ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VIVO*

Фармакокинетика у самцов яванских макак

Фармакокинетику выбранных иллюстративных соединений оценивали после однократного подкожного введения 50 нмоль/кг самцам яванских макак. Образцы крови собирали в течение 504 часов и использовали полученные индивидуальные концентрации в плазме для расчета фармакокинетических параметров. Концентрации пептидов в плазме (K_3 EDTA) определяли с применением сертифицированного метода ЖХ/МС, позволяющего измерять массу исходного соединения. Каждый пептид и аналог в качестве внутреннего стандарта экстрагировали из 100% плазмы яванского макака с применением способа осаждения белков. Для детектирования методами LC/MS приборы объединяли. Средние

фармакокинетические параметры приведены в таблице 3.

Таблица 3. Средние фармакокинетические параметры пептидов после однократного подкожного введения 50 нмоль/кг самцам яванских макак.

Пример	$T_{1/2}$ (час)	T_{max} (час)	C_{max}/доза (кг×нмоль/л/нмоль)	AUC_{Inf}/доза (час×кг×нмоль/л/нмоль)	CL/F (мл/час/кг)
1	71,1	24	7,20	786	1,27
2	51,8	6	6,92	624	1,61
3	88,8	60	12,1	1764	0,57
4	124	6	8,71	1387	0,72
5	128	120	12,0	2262	0,44
6	129	6	7,83	1382	0,77
7	109	9	10,1	1603	0,63

Сокращения: $T_{1/2}$ = период полувыведения, T_{max} = время достижения максимальной концентрации, C_{max}/доза = максимальная концентрация в плазме, деленная на дозу, AUC_{Inf}/Dose = AUC_{Inf}, деленная на дозу, CL/F = клиренс/биодоступность. Примечания: Данные представляют собой среднее значение, где n = 2/группа.

Как видно из таблицы 3, для исследованных иллюстративных пептидов результаты такого исследования согласуются с расширенным фармакокинетическим профилем.

Фармакокинетика у самцов крыс линии Спрэг-Доули после подкожного введения

Фармакокинетику выбранных иллюстративных соединений оценивали после однократного подкожного (п/к) введения 100 нмоль/кг самцам крыс линии Спрэг-Доули. Образцы крови собирали через 168 часов после подкожного введения. Фармакокинетические параметры рассчитывали с применением индивидуальных концентраций в плазме. Для определения концентраций в плазме (K_3 ЭДТА) использовали сертифицированный способ ЖХ/МС, позволяющий измерять исходную массу иллюстративных соединений. Каждый пептид и аналог в качестве внутреннего стандарта экстрагировали из 100% плазмы крыс с применением метода осаждения белков. Для детектирования методами LC/MS приборы объединяли. Средние фармакокинетические параметры для иллюстративных соединений показаны в таблице 4.

Таблица 4. Средние (+/- SD) фармакокинетические параметры пептидов после однократного подкожного введения 100 нмоль/кг самцам крыс линии Спрэг-Доули.

Пример	$T_{1/2}$ (час)	T_{max} (час)	C_{max}/доза (кг×нмоль/л/нмоль)	AUC_{Inf}/доза (час×кг×нмоль/л/нмоль)	CL/F (мл/час/кг)
1	37,4	24	3,62	280	3,57
2	26,9	12	5,47	304	3,30
3	24,9	12	3,03	130	7,67
5	27,1	24	4,61	239	4,20
6	34,8	24	4,07	271	3,69

Сокращения: $T_{1/2}$ = период полувыведения, T_{max} = время достижения максимальной концентрации, C_{max}/доза = максимальная концентрация в плазме, деленная на дозу, AUC_{Inf}/Dose = AUC_{Inf}, деленная на дозу, CL/F = клиренс/биодоступность. Примечания: Данные представляют собой среднее значение, где n = 3/группа, за исключением примера 3, где данные получены при n = 1 животное.

Как видно из таблицы 4, результаты данного исследования с применением иллюстративных пептидов согласуются с расширенным фармакокинетическим профилем.

Влияние *in vivo* на секрецию инсулина у самцов крыс линии Вистар

Самцов крыс линии Вистар с канюлями (Envigo, Индианаполис, Индиана) в бедренной артерии и бедренной вене (280-320 граммов) помещали по одному в поликарбонатные клетки с верхними фильтрами. Крыс содержали при цикле чередования света и темноты 12:12 часов (свет включали в 6:00 утра) при 21 °C и давали пищу и деионизированную воду без ограничения. Крыс рандомизировали по массе тела и вводили им подкожно (п/к) 1,5 мл/кг в дозах 0,3, 1,0, 3, 10, 30 и 100 нмоль/кг за 16 часов до введения глюкозы, а затем оставляли без еды. Животных взвешивали и подвергали анестезии с помощью пентобарбитала натрия, который вводили внутрибрюшинно (в.б.) (65 мг/кг, 30 мг/мл). В момент времени 0 образец крови собирали в пробирки с ЭДТА, после чего внутривенно (в/в) вводили глюкозу (0,5 мг/кг, 5 мл/кг). Для определения уровней глюкозы и инсулина образцы крови собирали через 2, 4, 6, 10, 20 и 30 минут после внутривенного введения глюкозы. Уровни глюкозы в плазме определяли с помощью биохимического анализатора. Инсулин в плазме определяли с помощью электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale, Гейтерсбург, Мэриленд). AUC глюкозы и инсулина исследовали путем сравнения с контрольным носителем при n = 5 животных на группу. Результаты приведены (SEM) (N).

Таблица 5: Влияние иллюстративных соединений на секрецию инсулина во время внутривенного теста на толерантность к глюкозе (ivGTT).

Доза (нмоль/кг, п/к)							
Пример	0,0	0,3	1,0	3,0	10	30	100
3	38,3 (8,8)(5)	43,3 (0,8)(5)	45,1 (8,8)(5)	53,3 (6,5)(5)	64,9 (9,3)(5)	116,3 (28,6)(4)	133,6 (16,1)(5)
5	35,9 (7,5)(5)	36,2 (4,4)(5)	45,3 (6,1)(5)	80,6 (6,4)(5)	122,0 (5,9)(5)	144 (16,4)(5)	212,7 (19,4)(5)
6	39,5 (2,2)(5)	34,7 (3,6)(5)	54,2 (6,8)(5)	75,8 (10,3)(5)	100,2 (15,6)(5)	135,4 (22,9)(5)	166,5 (21,6)(5)

Данные, представленные в таблице 5, демонстрировали зависимое от дозы увеличение секреции инсулина.

Таблица 6: Секреция инсулина при проведении ivGTT, показанная с помощью следующих данных:

Секреция инсулина (ivGTT)	
Пример	(ED_{50}, нмоль/кг) (SEM, n)
3	17,1 (n = 1)
5	18,4 (n = 1)
6	12,9 (n = 1)

Данные, представленные в таблице 6, продемонстрировали зависимое от дозы увеличение секреции инсулина.

Оценка иммуногенности соединений согласно примерам 1, 2, 3, 5 и 6

Целью данного исследования являлось определение относительного потенциала клинической иммуногенности иллюстративных соединений 1, 2, 3, 5 и 6.

Способы:

Анализ CD4+ Т-клеток: Анализ CD4+ Т-клеток использовали для сравнения соединений согласно примерам 1, 2, 3, 5 и 6 с точки зрения способности индуцировать иммунный ответ *in vivo* в соответствии со способами, известными в данной области техники (См., например, Jones *et al.* (2004) *J. Interferon Cytokine Res.* 24:560-572; и Jones *et al.* (2005) *J. Thromb. Haemost.* 3:991-1000), при этом результаты оценки клинически исследованных моноклональных антител и пептидов показали некоторую степень корреляции между

пролиферацией Т-клеток, наблюдаемой *in vitro*, и иммуногенностью в клинической практике. Белковые терапевтические препараты, вызывающие менее 30% положительных ответов при анализе пролиферации CD4+ Т-клеток, связаны с низким риском иммуногенности. Вкратце, для проведения оценки способности к клиническому иммуногенному ответу на соединения согласно примерам 1, 2, 3, 5 и 6 из когорты из 10 здоровых доноров с различными гаплотипами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса II получали обедненные CD8+ Т-клетками мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), которые метили с помощью сукцинимидилового эфира диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE; Invitrogen). Каждого донора исследовали в трех параллельных испытаниях с применением 2,0 мл контрольной среды, гемоцианина лимфы улитки (KLH; 0,33 мкМ) и соединений согласно примерам 1, 2, 3, 5 и 6 (0,33 мкМ). Культуры инкубировали в течение 7 дней при 37 °C с применением 5% CO_2. На 7-й день образцы анализировали методом проточной цитометрии с применением BD LSR II Fortessa (Becton Dickinson; Франклин Лейкс, Нью-Джерси), оборудованного пробоотборником с высокой пропускной способностью (HTS). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo® (FlowJo, LLC/TreeStar; Ашленд, Орегон).

Результаты и обсуждение

Все доноры имели положительный Т-клеточный ответ против KLH (100%). Анализ частоты и величины CD4+ Т-клеточного ответа для иллюстративных соединений приведен в таблице 7.

Таблица 7: CD4+ Т-клеточные ответы для иллюстративных соединений и положительного контроля (KLH).

Иллюстративное соединение или компаратор	**Ответ донора, % (n=10)**	**Средняя сила ответа у положительных доноров (CDI)**
KLH	100%	164,285 (n=10)
Пример 1	0%	Нет данных (n=0)
Пример 2	10%	2,69 (n=1)
Пример 3	0%	Нет данных (n=0)
Пример 5	0%	Нет данных (n=0)
Пример 6	0%	Нет данных (n=0)

Индекс клеточного деления («CDI»): отношение деленных CD4+ Т-клеток к общему количеству CD4+ Т-клеток в стимулированных и нестимулированных образцах.

Полученные данные показывают, что для исследуемых иллюстративных соединений частота положительного CD4+ Т-клеточного ответа (CDI> 2,5) была низкой, при этом

величина ответа у одного положительного донора из группы примера 2 была низкой (CDI <3). Таким образом, согласно данному анализу указанные соединения обладают низким риском иммуногенности.

Аминокислотные последовательности

SEQ ID NO:1

GIP 1-42 (человеческий)

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO:2

GLP-1 (7-36) амид (человеческий)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH_2

SEQ ID NO:3

Глюкагон (человеческий)

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO:4

$Z_1X_1X_2EGTX_6ISDYSIX_{13}LDX_{16}X_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}X_{22}VX_{24}X_{25}X_{26}LX_{28}X_{29}$

$GPSSGAPPPSZ_2$

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы:

$Z_1X_1X_2EGTX_6ISDYSIX_{13}LDX_{16}X_{17}X_{18}QX_{20}X_{21}X_{22}VX_{24}X_{25}X_{26}L$

$X_{28}X_{29}GPSSGAPPPSZ_2$ (SEQ ID NO:4), где:

Z_1 представляет собой модификацию N-концевой аминогруппы, при этом указанная модификация выбрана из группы, состоящей из ацетила и отсутствия такой модификации;

X_1 выбран из группы, состоящей из Y и D-Tyr;

X_2 выбран из группы, состоящей из Aib, A и D-Ala.

X_6 выбран из группы, состоящей из F, αMeF, Iva, L, αMeL и αMeF(2F);

X_{13} выбран из группы, состоящей из αMeL, A, L и Aib;

X_{16} выбран из группы, состоящей из K, E и Orn;

X_{17} выбран из группы, состоящей из I и K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H;

X_{18} выбран из группы, состоящей из H, A и R;

X_{20} выбран из группы, состоящей из Aib и Q;

X_{21} выбран из группы, состоящей из D и E;

X_{22} выбран из группы, состоящей из F и αMeF;

X_{24} выбран из группы, состоящей из E, N, Q и D-Glu;

X_{25} выбран из группы, состоящей из Y, 4-Pal, W и αMeY;

X_{26} выбран из группы, состоящей из L и K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO2H;

X_{28} выбран из группы, состоящей из E и A;

X_{29} выбран из группы, состоящей из G, A, Q и T; q выбран из группы, состоящей из 16 и 18; и

Z_2 отсутствует или представляет собой модификацию C-концевой группы, при этом указанная модификация представляет собой амидирование;

при этом одна и только одна группа, выбранная из X_{17} и X_{26}, представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, отличающееся тем, что X_1 представляет собой Y, и Z_1 отсутствует.

3. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или 2,

отличающееся тем, что X_2 представляет собой Aib.

4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-3, отличающееся тем, что:

X_6 выбран из группы, состоящей из F и αMeF(2F).

5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-4, отличающееся тем, что:

X_{13} выбран из группы, состоящей из L и αMeL.

6. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-5, отличающееся тем, что X_{16} представляет собой K или Orn.

7. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 6, отличающееся тем, что X_{16} представляет собой K.

8. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-7, отличающееся тем, что X_{18} представляет собой H.

9. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-8, отличающееся тем, что X_{20} представляет собой Aib; и X_{22} представляет собой F.

10. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-9, отличающееся тем, что X_{21} представляет собой D.

11. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-10, отличающееся тем, что X_{25} представляет собой 4-Pal или Y.

12. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-10, отличающееся тем, что:

X_{17} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)q$-CO_2H; и X_{26} представляет собой L.

13. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-10,

отличающееся тем, что X_{17} представляет собой I; и X_{26} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-(CH_2)q-CO_2H.

14. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-12, отличающееся тем, что q равно 16.

15. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-12, отличающееся тем, что q равно 18.

16. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, отличающееся тем, что:

X_1 представляет собой Y и Z_1 отсутствует;

X_2 выбран из группы, состоящей из Aib и D-Ala; X_6 представляет собой F;

X_{13} выбран из группы, состоящей из αMeL и L;

X_{16} выбран из группы, состоящей из K и Orn;

X_{18} выбран из группы, состоящей из H и A; X_{20} представляет собой Aib;

X_{22} представляет собой F;

X_{24} выбран из группы, состоящей из E, N и D-Glu; X_{25} выбран из группы, состоящей из Y, 4-Pal и W;

X_{28} выбран из группы, состоящей из E и A;

X_{29} выбран из группы, состоящей из G, A и Q; q выбран из группы, состоящей из 16 и 18.

17. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 16, отличающееся тем, что:

X_2 представляет собой Aib;

X_{13} представляет собой αMeL;

X_{18} представляет собой H;

X_{24} выбран из группы, состоящей из E и D-Glu;

X_{25} выбран из группы, состоящей из Y и 4-Pal;

X_{28} представляет собой E;

X_{29} выбран из группы, состоящей из G и A.

18. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 17, отличающееся тем, что X_{17} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-

$(CH_2)q\text{-}CO_2H$; и X_{26} представляет собой L.

19. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 17, отличающееся тем, что X_{17} представляет собой I; и X_{26} представляет собой K(2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)q\text{-}CO_2H$.

20. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, отличающееся тем, что указанное соединение выбрано из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11.

21. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 20, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:7.

22. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 20, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:8.

23. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 20, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой SEQ ID NO:10.

24. Способ лечения патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из п.п. 1-22.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное патологическое состояние представляет собой ожирение.

26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное патологическое состояние представляет собой сахарный диабет 2 типа.

27. Способ лечения диабета у пациента, получающего инсулинотерапию, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из п.п. 1-22.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его

фармацевтически приемлемую соль по любому из п.п. 1-22 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

29. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из п.п. 1-22 для применения при лечении патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома.

30. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 29, отличающееся тем, что патологическое состояние представляет собой сахарный диабет 2 типа.