

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292405 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.17

(51) Int. Cl. A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.21

(54) АГОНИСТЫ РГПП-1 И РГКГ, СОСТАВЫ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

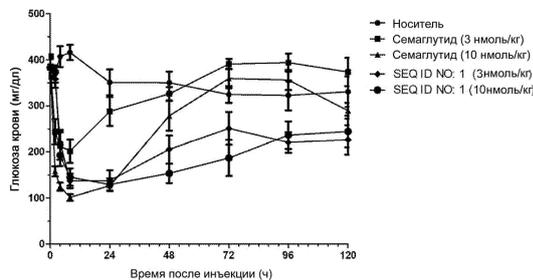
(31) 62/980,093; 63/122,108; 63/133,540
(32) 2020.02.21; 2020.12.07; 2021.01.04
(33) US
(86) PCT/US2021/018947
(87) WO 2021/168386 2021.08.26
(71) Заявитель:
СПИТФАЙР ФАРМА ЛЛК (US)

(72) Изобретатель:
Нестор Джон, Кришнан Виджаянти
(US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к агонистам РГПП-1 и РГКГ, составам и способам их применения, включая, без ограничения указанным, пептиды двойного агониста, выбранные из любой из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27, конъюгированные с неионогенным гликолипидным поверхностно-активным веществом.

Ответ глюкозы крови на п/к инъекцию семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши db/db)



202292405

A1

A1

202292405

АГОНИСТЫ РГПП-1 И РГКГ, СОСТАВЫ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предшествующей заявке США сер. № 62/980,093, поданной 21 февраля 2020 г.; заявке США сер. № 63/122,108 поданной 07 декабря 2020 г.; и заявке США сер. № 63/133,540, поданной 4 января 2021 г., каждая из которых полностью включена в настоящую заявку.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII через EFS-Web и, таким образом, полностью включен в данную заявку в качестве ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 19 февраля 2021 года, называется MED007PCT_ST25.TXT и имеет размер 24 576 байт.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к агонистам рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (РГПП-1) и рецептора глюкагона (РГКГ), составам и способам их применения.

Предшествующий уровень техники

Растущая распространенность ожирения, сахарного диабета, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и ее запущенной формы, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), представляет собой мировой кризис в области здравоохранения в масштабах эпидемии, который вносит основной вклад в заболеваемость и смертность пациентов, а также имеет серьезное экономическое бремя. Ожирение является важным фактором риска развития диабета 2 типа и НАСГ, и около 90% пациентов с диабетом 2 типа имеют избыточную массу или страдают ожирением. Ожирение является быстро растущей проблемой во всем мире и в настоящее время более 65% взрослых в США имеют избыточную массу (Hedley, A.A., et al. (2004) JAMA 291: 2847-2850). Ожидается, что в ближайшем будущем НАСГ станет основной причиной трансплантации печени. Существует потребность в разработке безопасных и эффективных фармацевтических средств лечения ожирения и сахарного диабета. В изобретении предлагаются улучшенные пептидные фармацевтические средства для лечения расстройств, связанных с ожирением и/или диабетом, таких как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) и синдром поликистозных яичников (СПКЯ).

В Соединенных Штатах (США) НАСГ стал ведущей причиной терминальной стадии заболевания печени или трансплантации печени. Ожирение является основной

причиной НАСГ, а потеря массы приводит к уменьшению жира в печени и улучшению состояния при НАСГ. Более 80% людей с НАСГ имеют избыточную массу или страдают ожирением и при отсутствии доступных в настоящее время одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (англ. Food and Drug Administration, FDA) фармакологических средств для индукции снижения массы терапия в значительной степени основывается на вмешательстве в образ жизни, направленном на снижение массы. Однако трудно достичь и поддерживать долгосрочную потерю массы только за счет изменения образа жизни.

Агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (АРГПП-1) связаны с умеренной степенью потери массы в утвержденных дозах, и эти агенты появились в качестве варианта лечения пациентов с НАСГ. В недавнем клиническом исследовании лираглутид, ежедневно принимаемый АРГПП-1, был связан с разрешением НАСГ с тенденцией к уменьшению фиброза печени. Однако пациенты потеряли только 5,5% массы тела. В одном исследовании для оптимального разрешения НАСГ требовалась потеря массы на 10% или более. Более высокие уровни потери массы также были связаны с более низкой частотой сердечно-сосудистых заболеваний и непеченочных злокачественных новообразований, которые представляют собой наиболее серьезные сопутствующие заболевания, с которыми сталкиваются пациенты с НАСГ.

АРГПП-1 оказывают центральное влияние на аппетит и потребление пищи, в то время как агонисты РГКГ (АРГКГ) вызывают повышенный расход энергии в моделях на животных и у людей. Было показано, что эффекты агониста РГКГ и АРГПП-1 проявляют синергизм в обеспечении большей степени потери массы по сравнению с одним АРГПП-1. РГКГ также усиливают липолиз и подавляют синтез жира в печени, обеспечивая дополнительный путь к уменьшению жира в печени и разрешению НАСГ.

Двойные агонисты сочетают АРГКГ с АРГПП-1 в одной молекуле. У приматов с ожирением, не относящихся к человеку, длительное введение двойного агониста РГПП-1/РГКГ снижало массу тела и улучшало толерантность к глюкозе в большей степени по сравнению с моноагонистом АРГПП-1. Клинические исследования котадутида, двойного агониста РГПП-1/РГКГ со смещением активности ГПП-1 в сторону глюкагона в соотношении 5:1, продемонстрировали впечатляющее снижение содержания жира в печени на 39% всего за 6 недель и большее улучшение снижения НАСГ-связанной аланинаминотрансферазы (АЛТ), чем при монотерапии лираглутидом. Тем не менее, степень потери массы в течение 26 недель приема котадутида была сравнима с лираглутидом (5,4% против 5,5%), что свидетельствует о том, что соотношение 5:1 было приемлемым для уменьшения жира в печени, но субоптимальным для снижения массы.

Было показано, что сбалансированный (1:1) агонизм связан с большей потерей массы и метаболическими эффектами, чем смещенные соотношения, которые отдают предпочтение одному агонисту по сравнению с другим. Недавнее исследование JNJ 64565111, сбалансированного двойного агониста, показало впечатляющее снижение массы тела на 8% всего за 12 недель (NCT03586830).

К сожалению, антагонисты рецептора ГПП-1 связаны с высокой частотой тошноты, рвоты и диареи. Эти агенты также необходимо титровать в течение длительного времени, чтобы уменьшить нежелательные явления, и необходимы агенты с улучшенной переносимостью и режимами дозирования. Соответственно, остается потребность в удобном дозировании (например, еженедельно вместо ежедневного) терапевтической дозы для контроля уровня глюкозы в крови и/или для индукции потери массы, которая не требует титрования для достижения терапевтического уровня при отсутствии нежелательных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении описаны пептиды двойного агониста и их продукты (например, составы), а также их применение для лечения заболеваний, связанных с функцией рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептора глюкагона (РГКГ), включая, без ограничения указанным, резистентность к инсулину или/и ожирение, таких как диабет 2 типа, метаболический синдром, сердечно-сосудистые заболевания (включая заболевания коронарных артерий, такие как атеросклероз и инфаркт миокарда), гипертония, НАСГ, хроническое заболевание почек и СПКЯ, а также для лечения состояний, связанных с такими заболеваниями. Такие пептиды двойного агониста обладают аффинностью как к РГПП-1, так и к РГКГ, что можно определить, например, с помощью клеточного анализа, как описано в настоящем изобретении, или с использованием другого анализа для проведения таких определений. В некоторых воплощениях пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 или их производные, такие как их консервативно замещенные производные, и/или их комбинации. В некоторых воплощениях пептид двойного агониста проявляет примерно одинаковую аффинность к РГПП-1 и РГКГ, что можно определить с помощью вышеуказанного клеточного анализа, причем такой пептид в предпочтительных воплощениях представляет собой SEQ ID NO: 1 или ее производное.

В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагается фармацевтический дозированный состав такого пептида(ов) двойного агониста, приготовленный для контроля уровня глюкозы в крови с уменьшением одного или нескольких нежелательных явлений по сравнению с агонистом с несбалансированной

аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, семаглутидом) или с чрезмерно большой максимальной концентрацией в крови после введения (C_{max}). В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предложен фармацевтический дозированный состав такого пептида(ов) двойного агониста, приготовленный для индукции потери массы с уменьшением одного или нескольких нежелательных явлений по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ. Нежелательные явления в некоторых воплощениях выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему. Эти нежелательные явления обычно наблюдаются после введения (двойного) агониста с быстрым попаданием в кровоток, что приводит к чрезмерно высокому C_{max} . Напротив, настоящий фармацевтический дозированный состав снижает или устраняет связанные с дозировкой нежелательные явления, такие как нежелательные явления со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), при этом обеспечивая терапевтическую дозу для контроля уровня глюкозы в крови и/или лечения ожирения путем индукции потери массы. В некоторых воплощениях введение пептида(ов) двойного агониста, описанного в настоящей заявке (например, имеющих SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 или их производных) может привести к улучшению других результатов (например, потеря массы, потеря жира, липидный профиль) и/или фармакокинетических (ФК) параметров по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, семаглутидом). Также рассматриваются другие аспекты настоящего изобретения, как это будет понятно специалистам в данной области.

Краткое описание чертежей

Прилагаемые чертежи, которые включены в настоящее описание и составляют его часть, иллюстрируют одно или несколько воплощений данного изобретения и вместе с подробным описанием и примерами служат для объяснения принципов и воплощений изобретения.

Фигура 1. Ответ уровня глюкозы в крови на подкожную (п/к) инъекцию семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши db/db).

Фигура 2. Ответ уровня глюкозы в крови на семаглутид или SEQ ID NO: 1 (мыши с ожирением, вызванным диетой (ОВД)).

Фигура 3. Уровень глюкозы в крови, ИПГТТ (интраперитонеальный глюкозотолерантный тест), для семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши с ОВД).

Фигура 4. Реакция массы тела (% день 0); Подкожная инъекция семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши db/db; мыши с дефицитом рецептора лептина).

Фигура 5. Влияние на потребление корма подкожной (п/к) инъекции семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши db/db).

Фигуры 6А и 6В. Реакция массы тела (% в день 0) (фиг. 6А) и реакция массы тела (г в день 0) (фиг. 6В). подкожная (п/к) инъекция семаглутида или SEQ ID NO: 1 (17) (мышь с ОВД).

Фигура 7. Дельта массы жира и дельта массы нежировых тканей после введения семаглутида или SEQ ID NO: 1.

Фигура 8. Концентрации лиганда семаглутида и SEQ ID NO:1, измеренные в течение 120 часов, для однократной дозы, введенной подкожно (п/к) мышам с ОВД.

Фигура 9. Концентрации лиганда семаглутида и SEQ ID NO:1 (ALT-801), измеренные в течение 96 часов, для однократной дозы, введенной подкожно (п/к) мышам C57BL/6J.

Фигура 10. Концентрации лиганда семаглутида и SEQ ID NO:1, измеренные в течение 144 часов, для однократной дозы (крысы).

Фигура 11. Концентрация лиганда SEQ ID NO:1, измеренная в течение 360 часов, для однократной дозы, введенной внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) юкатанским миниатюрным свиньям.

Фигуры 12А-Д. Концентрация лиганда SEQ ID NO: 1 в плазме (нг/мл), измеренная в течение 192 часов (фиг. 12А) после введения трех доз (10 нмоль/кг (фиг. 12В), 20 нмоль/кг (фиг. 12С), 40 нмоль/кг (фиг. 12Д)) подкожно (п/к) яванским макакам.

Фигура 13. Изменение массы тела у самцов яванского макака, получавших SEQ ID NO: 1 (от 0,03 мг/кг до 0,25 мг/кг).

Фигура 14. Изменение массы тела у самок яванского макака, получавших SEQ ID NO: 1 (от 0,03 мг/кг до 0,25 мг/кг).

Фигура 15. Масса тела мышей в группах (мышь с НАСГ), получавших SEQ ID NO: 1 (ALT-801) по сравнению с семаглутидом и элафибраном.

Фигура 16. Изменение показателя активности неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) при лечении с помощью SEQ ID NO: 1 (ALT-801) по сравнению с семаглутидом и элафибраном.

Фигура 17. Лечение с помощью SEQ ID NO: 1 (ALT-801) улучшало морфологию печени, массу печени, ПАН (показатель активности НАЖБП) и фиброз по сравнению с семаглутидом и элафибраном.

Фигура 18. Средние конечные значения триглицеридов (ТГ) печени, общего холестерина (ОХ) печени и АЛТ в плазме при лечении с помощью SEQ ID NO: 1 (ALT-801) по сравнению с семаглутидом и элафибраном.

Фигура 19. Модуляция экспрессии генов с помощью ALT-801 (SEQ ID NO: 1).

Фигура 20. Модуляция генов, влияющих на использование и транспорт жира, после

лечения с помощью SEQ ID NO: 1 (ALT-801) и семаглутида.

Фигура 21. Модуляция генов пути про-фиброза звездчатых клеток печени, клеточной смерти и воспаления после лечения с помощью SEQ ID NO: 1 (ALT-801) и семаглутида.

Фигура 22. Стабильность *in vitro* в плазме человека. См. Таблицу 14.

Фигура 23. Фармакокинетическое (ФК) поведение соединений *in vivo* после подкожного введения гёттингенским мини-свиньям.

Фигура 24. ФК поведение *in vivo* SEQ ID NO: 1 и семаглутида после подкожного (п/к) введения.

Фигура 25. ФК поведение *in vivo* SEQ ID NO: 1 после однократного подкожного (п/к) и внутривенного (в/в) введения самцам мини-свиней ($n = 4$; масса около 75 кг) в дозе 20 нмоль/кг.

Фигура 26. Дозозависимое поведение *in vivo* (SEQ ID NO:1) и литературного стандарта семаглутида после подкожного (п/к) введения однократной дозы самцам мышей db/db ($n = 9$).

Фигура 27. Масса тела самцов крыс с ОВД ($n = 9$) в течение 28 дней лечения (с последующим восстановлением) с помощью носителя, литературного стандарта семаглутида (12 нмоль/кг), SEQ ID NO: 1 (6 и 12 нмоль/кг) и в группах, получавших количество пищи, одинаковое с потребленным животными в группах, получавших 12 нмоль/кг семаглутида или SEQ ID NO: 1.

Фигура 28. Совокупное потребление корма крысами с ОВД в течение 27 дней лечения (с последующим восстановлением) с помощью носителя, литературного стандарта семаглутида ((12 нмоль/кг), SEQ ID NO: 1 (6 и 12 нмоль/кг)) и в группах, получавших количество пищи, одинаковое с потребленным животными в группах, получавших 12 нмоль/кг семаглутида или SEQ ID NO: 1.

Фигура 29. Ежедневное потребление пищи крысами с ОВД в течение 27 дней лечения в ответ на ежедневные подкожные (п/к) дозы носителя, литературного стандарта семаглутида ((12 нмоль/кг), SEQ ID NO: 1 (6 и 12 нмоль/кг)) и в группах, получавших количество пищи, одинаковое с потребленным животными в группах, получавших ежедневно п/к инъекции 12 нмоль/кг семаглутида или SEQ ID NO: 1.

Фигура 30. Данные о поверхностном натяжении для ALT-801 в чистой воде.

Подробное описание раскрытия

Настоящее изобретение относится к пептиду(ам) двойного агониста, а также к фармацевтическим дозированным составам, включающим их, и к способам их применения. Пептиды двойного агониста обладают аффинностью, а в предпочтительных

воплощениях примерно равной аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида-1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), что можно определить с помощью клеточного анализа. В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические дозированные составы, предназначенные для контроля уровня глюкозы в крови. В некоторых воплощениях уровень глюкозы в крови лучше контролируется (например, снижается и стабилизируется) после введения пептида двойного агониста по сравнению с селективным (например, семаглутидом) и/или несбалансированным агонистом. В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические дозированные составы, сконфигурированные для индукции потери массы. В некоторых воплощениях потеря массы улучшается (например, масса снижается и/или стабилизируется) после введения пептида двойного агониста по сравнению с введением селективного (например, семаглутида) и/или несбалансированного агониста. В некоторых воплощениях такие фармацевтические дозированные составы демонстрируют снижение нежелательных явлений по сравнению с введением агониста с селективной (например, семаглутида) и/или несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ. В некоторых воплощениях нежелательные явления могут включать тошноту, рвоту, диарею, боль в животе и/или запор, которые обычно наблюдаются после введения млекопитающему агониста с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, семаглутида). В некоторых воплощениях в данном изобретении предлагаются новые двойные агонисты рецептора ГПП-1/глюкагона на основе пептидов, предназначенные для лечения основной метаболической дисфункции, которая приводит к неалкогольному стеатогепатиту (НАСГ).

В некоторых воплощениях пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 или ее производное.

В предпочтительных воплощениях пептид двойного агониста представляет собой EU-A1873 (SEQ ID NO: 1), EU-A1588 (SEQ ID NO: 2), EU-A1871 (SEQ ID NO: 3), EU-A1872 (SEQ ID NO: 4), как показано в таблице 1:

Таблица 1

	SEQ ID. NO.	1			5				10			15			20			25			30										
семаглутид	11	H	Aib	Q	G	T	F	T	s	D	V	S	κ	Y	L	E	G	Q	A	A	Lys(EPPC17C02H)	E	F	I	A	W	L	V	R	G	R
EU-A1873	1	H	Aib	Q	G	T	F	T	s	D	Y	S	κ	Y	L	D	E*	Lys(Z17C02H)	A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	Q	T	NH ₂
EU-A1588	2	H	Aib	Q	G	T	F	T	s	D	Y	S	κ	Y	L	D	E*	Lys(Me15C02H)	A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	Q	T	NH ₂
EU-A1871	3	H	Aib	Q	G	T	F	T	s	D	Y	S	κ	Y	L	D	E*	Q	A	A	K*	E	F	I	Lys(Z15C02H)	W	L	L	Q	T	NH ₂
EU-A1872	4	H	Aib	Q	G	T	F	T	s	D	Y	S	κ	Y	L	D	E*	Q	A	A	K*	E	F	I	Lys(Z17C02H)	W	L	L	Q	T	NH ₂
EU-A1880	5	H	Aib	Q	G	T	F	T	s	D	Y	S	R	Y	L	D	E*	Lys(Z17C02H)	A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	Q	T	NH ₂

E* и K* указывают на наличие лактамной связи в боковой цепи между этими остатками.

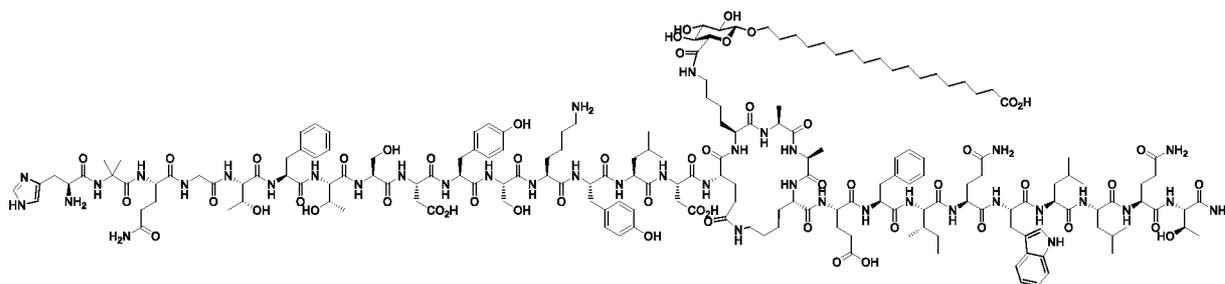
(EPC17C02H) = (17-карбоксихептадеканойл-(Y-Glu)-AEEA-AEEA); Z17CO2H = (бета-D-глюкуронон-1-ил)-1-окса) 17-карбоксихептадекан; Me15C02H = (бета-D-мелоблюоуранил-1-ил)-1-окса) 15-карбоксихептадекан

В таблице 1 числа 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 в верхнем ряду относятся к номерам аминокислотных остатков (всего 29 аминокислотных остатков присутствуют в каждой из SEQ ID NO: 1-5). Семаглутид, показанный в таблице 1, представляет собой SEQ ID NO: 11 (31 аминокислотный остаток). Как показано в Таблице 1, SEQ ID NO: 1 (EU-A1873 из Таблицы 1; причем ALT-801 представляет собой активный фармацевтический ингредиент (АФИ), присутствующий в фармацевтическом составе по изобретению, где АФИ представлен SEQ ID NO: 1) имеет следующую аминокислотную последовательность, конъюгированную по аминокислотному положению 17 (ак17) с неионогенным гликолипидным поверхностно-активным веществом:

¹His-²Aib-³Gln-⁴Gly-⁵Thr-⁶Phe-⁷Thr-⁸Ser-⁹Asp-¹⁰Tyr-¹¹Ser-¹²Lys-¹³Tyr-¹⁴Leu-¹⁵Asp-¹⁶Glu*-¹⁷Lys[#]-¹⁸Ala-¹⁹Ala-²⁰Lys*-²¹Glu-²²Phe-²³Ile-²⁴Gln-²⁵Trp-²⁶Leu-²⁷Leu-²⁸Gln-²⁹Thr-NH₂,

где * указывает на образование лактамного мостика между Glu16 и Lys 20, а 17Lys[#] указывает на сайт присоединения глюкуроновой кислоты C-18 (EuPort, Z17CO2H, также обозначаемой в данной заявке как GC18c).

Если проиллюстрировать по-другому, SEQ ID NO: 1 представляет собой пептидный амид, состоящий из 29 аминокислотных остатков и фрагмента глюкуроновой кислоты/C₁₈ дикислотной группы, присоединенной к 17Lys, в котором боковые цепи 16Glu и 20Lys образуют внутримолекулярное кольцо, как показано ниже:



В некоторых воплощениях пептид двойного агониста может представлять собой любой из:

His	Xaa1	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu
1				5					10					15	
Xaa2	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Gln	Trp	Leu	Leu	Gln	Thr	(SEQ ID NO: 6)		
			20					25							

где: Xaa1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Aib (α-аминоизомасляную кислоту (или 2-метилаланин, или Сальфа-метилаланин)); Xaa2

представляет собой Lys(N-омега(1-(17-карбоксихептадецилокси)бета-D-глюкуронил)) или Lys(Z17CO₂H), где Z17CO₂H (EuPort) представляет собой (бета-D-глюкурон-1-ил)-1-окса)17-карбоксихептадекан; и Glu16 и Lys20 циклизуются друг с другом через соответствующие боковые цепи с образованием лактамной связи; или их производное;

```

His Xaa1 Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1           5           10           15
Xaa2 Ala Ala Lys Glu Phe Ile Gln Trp Leu Leu Gln Thr (SEQ ID NO: 7)
           20           25

```

где: Xaa1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Aib (□-аминоизомаляную кислоту (или 2-метилаланин, или Сальфа-метилаланин)); Xaa2 представляет собой Me17CO₂H, который представляет собой бета-D-мелобиуранил-1-ил)-1-окса)17-карбоксихептадекан; и Glu16 и Lys20 циклизуются друг с другом через соответствующие боковые цепи с образованием лактамной связи; или их производное;

```

His Xaa1 Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Xaa3 Trp Leu Leu Gln Thr (SEQ ID NO: 8)
           20           25

```

где: Xaa1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Aib (□-аминоизомаляную кислоту (или 2-метилаланин, или Сальфа-метилаланин)); Glu16 и Lys20 циклизуются друг с другом через соответствующие боковые цепи с образованием лактамной связи; Xaa3 представляет собой Lys(Z15CO₂H) где Z15CO₂H представляет собой (бета-D-глюкурон-1-ил)-1-окса)15-карбоксихептадекан; или его производное;

```

His Xaa1 Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Xaa4 Trp Leu Leu Gln Thr (SEQ ID NO: 9)
           20           25

```

где: Xaa1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Aib (□-аминоизомаляную кислоту (или 2-метилаланин, или Сальфа-метилаланин)); Glu16 и Lys20 циклизуются друг с другом через соответствующие боковые цепи с образованием лактамной связи; Xaa3 представляет собой Lys(Z15CO₂H), где Z15CO₂H представляет собой (бета-D-глюкурон-1-ил)-1-окса)17-карбоксихептадекан; или его производное;

или,

```

His Xaa1 Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa5 Tyr Leu Asp Glu
1           5           10           15
Xaa2 Ala Ala Lys Glu Phe Ile Gln Trp Leu Leu Gln Thr (SEQ ID NO: 10)
           20           25

```

где: Хаа1 представляет собой любую аминокислоту, предпочтительно Aib (α -аминоизомасляную кислоту (или 2-метилаланин, или Сальфа-метилаланин)); Хаа2 представляет собой Lys(N-омега(1-(17-карбоксихептадецилокси)бета-D-глюкуронил)) или Lys(Z17CO₂H), где Z17CO₂H представляет собой (бета-D-глюкурол-1-ил)-1-окса)17-карбоксихептадекан; Хаа5 представляет собой Arg, а Glu16 и Lys20 циклизуются друг с другом через соответствующие боковые цепи с образованием лактамной связи; или его производное.

В некоторых воплощениях пептид двойного агониста выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 1 и 12-27, показанных ниже:

Cmpd#	1			5				10			15				20		7				25				30	SEQ ID NO.								
Ref27, сема	H	Aib	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q			A	A	X	E	F	I	A	W	L	V	R	G	R	G	11
ГПП-1 7-37	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	O			A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R	G	30
Глюкагон	H	S	0	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R			R	A	O	D	F	V	Q	W	L	M	N	T			31
Ref8, #32	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O			A	A	K*	E	F	I	C	W	L	M	N	T	NH ₂		32
1	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	Д	K*	E	F	I	Lys(GC8)	W	L	L	Q	T	NH ₂		12
2	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(GC10)	W	L	L	Q	T	NH ₂		13
3	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E'	Q			A	Д	K*	E	F	I	Ly3(GC12)	W	L	L	Q	T	NH ₂		14
4	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(GC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		15
5	H	Aib	G	3	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Ly3(GC16)	W	L	L	G	T	NH ₂		16
6	H	Aib	C	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O			A	A	K*	E	F	I	Lys(GC18)	W	L	L	G	T	NH ₂		17
7	H	Aib	G	3	T	F	T	S	:	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(MC12)	W	L	L	G	T	NH ₂		18
8	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O			A	A	K*	E	F	I	Lys(MeC12)	W	L	L	G	T	NH ₂		19
9	H	Aib	G	3	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Ly3(MeC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		20
10	H	Aib	0	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O			A	A	K*	E	F	I	Lys(MeC16)	W	L	L	G	T	NH ₂		21
11	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(MeC18)	W	L	L	G	T	NH ₂		22
12	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Lys(MeC14)			A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	G	T	NH ₂		23
13	H	Aib	G	3	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(S,GC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		24
14	H	Aib	G	3	T	F	T	S	C	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Ly3(S ₂ GC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		25
15	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(GC16c)	W	L	L	G	T	NH ₂		26
16	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q			A	A	K*	E	F	I	Lys(GC18c)	W	L	L	Q	T	NH ₂		27
17	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Lys(GC18c)			A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	G	T	NH ₂		1

Аналоги, отмеченные звездочкой, имеют лактам боковой цепи от Glu16 до Lys20; G, M, Me в скобках означают D-глюкозидные, D-мальтозидные, D-мелибиозидные связи, соответственно. S1 и S2 означают спейсер остатка α -Lys или γ -Glu, соответственно. Sn означает метиленовую цепь из n атомов углерода; c означает карбоксилат на конце цепи. X в семаглутиде означает остаток Lys, ацилированный модификатором удлинения γ Glu-2xOEG (см. ссылку 27), содержащим октадекандиовую кислоту на γ Glu/коротком-PEG спейсере. Соединение № 33 в ссылке 8 относится к соединению № 32, алкилированному

по Cys 24 с помощью 40 кДа ПЭГ через малеимидный линкер.

В предпочтительных воплощениях пептид двойного агониста представляет собой пептид, имеющий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27, или ее производного. В предпочтительных воплощениях пептид двойного агониста представляет собой SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях пептид двойного агониста приготовлен в виде раствора для инъекций, содержащего фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как агент или соль, регулирующие осмолярность, буферный агент, стабилизатор и/или поверхностно-активное вещество, регулятор pH и растворитель. В некоторых воплощениях агент, регулирующий осмолярность, представляет собой маннитол, сорбитол, глицерин и глицин, пропиленгликоль или хлорид натрия. В некоторых воплощениях буферный агент представляет собой гистидин, аргинин, лизин, фосфат, ацетат, карбонат, бикарбонат, цитрат, Меглумин или Трис. В некоторых воплощениях стабилизатор представляет собой гистидин, аргинин или лизин. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80. В некоторых воплощениях регулятор pH представляет собой соляную кислоту и/или гидроксид натрия. В предпочтительном воплощении агент, регулирующий осмолярность, представляет собой маннитол, буферный агент и стабилизатор представляют собой аргинин, а поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В некоторых воплощениях пептид двойного агониста может быть приготовлен в виде фармацевтического дозированного состава, содержащего около 0,025-0,15% (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина и около 3-6% (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде (pH $7,7 \pm 1,0$). В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав содержит «ALT-801», представленный SEQ ID NO:1, в составе, включающем, по существу состоящем или состоящем из около 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,35% (масс./масс.) аргинина и около 4,3% (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде (pH $7,7 \pm 1$). Используемый в данном изобретении состав тестируемого продукта также упоминается как состав F58. См. Пример 4. В предпочтительных воплощениях фармацевтический дозированный состав «ALT-801» содержит SEQ ID NO: 1 в составе, включающем, по существу состоящем или состоящем из около 0,35% (масс./масс.) аргинина и около 4,3% (масс./масс.) маннитола от 0,6 до 1,0 мг полисорбата 20 на мг «ALT-801» (SEQ ID NO:1) или от 1,0 до 1,5 мг полисорбата 80 на мг «ALT-801» (SEQ ID NO:1). См. Пример 8. В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав содержит «ALT-801» в диапазоне концентраций от 0,05 мг/мл до 20 мг/мл, предпочтительно от 0,1 мг/мл до 10 мг/мл или более предпочтительно от 0,5 мг/мл до 10 мг/мл. В некоторых воплощениях pH

фармацевтического дозированного состава, содержащего «ALT-801», составляет от 6 до 10, более предпочтительно от 6 до 8.

Синтез пептидов двойного агониста, включающих неионогенное гликолипидное поверхностно-активное вещество (например, SEQ ID NO:1-10 или 12-27, или их производных), описан в настоящей заявке (см., в частности, Пример 1) и в патенте США 9 856 306 B2, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых воплощениях пептиды двойного агониста могут включать одну или несколько консервативно замещенных аминокислот, как раскрыто в настоящем описании. В предпочтительных воплощениях SEQ ID NO:1 может включать одну или несколько консервативно замещенных аминокислот, но предпочтительно не по аминокислотным остаткам 16, 17 или 20. В предпочтительных воплощениях SEQ ID NO: 2 может включать одну или несколько консервативно замещенных аминокислот, но предпочтительно не по аминокислотным остаткам 16, 17 или 20. В предпочтительных воплощениях SEQ ID NO: 3 может включать одну или несколько консервативно замещенных аминокислот, но предпочтительно не по аминокислотным остаткам 16, 20 или 24. В предпочтительных воплощениях SEQ ID NO:4 может включать одну или несколько консервативно замещенных аминокислот, но предпочтительно не аминокислотные остатки 16, 20 или 24, SEQ ID NO:5 может включать одну или несколько консервативно замещенных аминокислот, но предпочтительно не аминокислотные остатки 12, 16, 17 или 20.

Пептиды с последовательностями SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 могут быть совместно названы в настоящем описании «пептидами двойного агониста» (или по отдельности «пептидом двойного агониста»), поскольку каждый из них является агонистом рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (РГПП-1) и рецептора глюкагона (РГКГ). В некоторых воплощениях пептид является двойным агонистом РГПП-1 и РГКГ, что можно определить с помощью клеточного анализа, такого как раскрытый в Примере 2 настоящего описания. Вкратце, в некоторых воплощениях клеточные анализы можно проводить путем измерения стимуляции цАМФ или активации аррестина в клетках СНО, в которых экспрессируются человеческий РГПП-1 или РГКГ ((анализы LeadHunter (DiscoverX)). Предпочтительно такие анализы проводят в присутствии 0,1% овальбумина по сравнению с 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), что обычно происходит, поскольку пептиды двойного агониста SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 могут очень сильно связываться с сывороточным альбумином (>99%) и искажать результаты анализа (см., в частности, Пример 2 в настоящей заявке). В некоторых воплощениях, как определено с помощью таких анализов, пептид двойного агониста может иметь аффинность как к РГПП-1, так и к РГКГ, а в предпочтительных воплощениях иметь примерно одинаковую

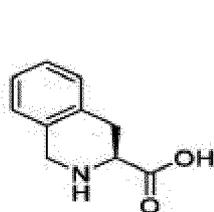
аффинность к РГПП-1 и РГКГ. «Примерно одинаковая аффинность» означает, что пептид двойного агониста имеет не более чем в два-три раза, предпочтительно не более чем в два раза, большую аффинность к РГПП-1 или РГКГ, чем к другому рецептору, что можно определить с помощью соответствующего клеточного анализа. Например, как показано в приведенных в данной заявке примерах, неожиданно было обнаружено, что пептид двойного агониста SEQ ID NO:1 (EU-A1873) представляет собой пептид двойного агониста с примерно равной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, EC_{50} составляет около 39 пкмоль (115% собственной активности) для РГПП-1 и 44 пкмоль (115% собственной активности) для РГКГ). Это отличается от «специфических» соединений ГПП-1, включая семаглутид и эксендин-4, которые демонстрируют аффинность, сильно смещенную к РГПП-1, или аффинность только к нему; или сильно зависящий от РГКГ гормон глюкагон, который не проявляет высокой или примерно равной аффинности как к РГПП-1, так и к РГКГ. Нативный гормон окситомодулин оказывает агонистическое действие как на рецепторы ГПП-1, так и на рецепторы глюкагона, но эта активность не является мощной и сбалансированной. Специалистам в данной области техники будет понятно, что аффинность к РГПП-1 и РГКГ можно определить другими способами и/или анализами, отличными от описанных в настоящем изобретении, а также то, что такие способы и/или анализы для определения аффинности рассматриваются в настоящем описании (например, определение примерно одинаковой аффинности можно осуществить такими другими способами и/или анализами).

В воплощениях изобретения термин «пептид двойного агониста с примерно одинаковой аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ)» в данном контексте означает пептид двойного агониста, который имеет не более чем двукратную аффинность к РГПП-1 или РГКГ, по отношению к другому рецептору, определенную соответствующим клеточным анализом. В воплощениях изобретения аффинность связывания настоящего пептида двойного агониста с одним рецептором по сравнению с другим не превышает различие более чем 1,9, 1,8, 1,6, 1,5, 1,4 или 1,2 раза, что можно определить с помощью известных клеточных анализов. В воплощениях изобретения «агонист с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ», используемый в данной заявке, означает пептид-агонист, который имеет по меньшей мере примерно в 1,5 раза большую аффинность к РГПП-1 или РГКГ, чем к другому рецептору, что может быть определено с помощью известных клеточных анализов. В воплощениях изобретения аффинность связывания агониста с несбалансированной аффинностью с РГПП-1 и РГКГ превышает по меньшей мере в 1,6, 1,8, 2, 2,5, 3, 5, 7,5, 10, 20 раз или более аффинность связывания с другим рецептором, что

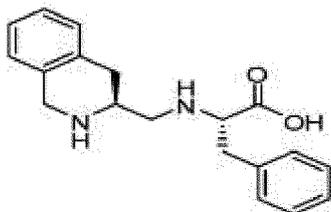
можно определить с помощью известных клеточных анализов.

«Пептид» (например, пептид двойного агониста) содержит два или более природных и/или неприродных аминокислотных остатка, обычно связанных пептидными связями. Такие аминокислоты могут включать встречающиеся в природе структурные варианты, встречающиеся в природе непотеиногенные аминокислоты или синтетические не встречающиеся в природе аналоги природных аминокислот. Термины «пептид» и «полипептид» используются в данной заявке взаимозаменяемо. Пептиды включают короткие пептиды (около 2–20 аминокислот), пептиды средней длины (около 21–50 аминокислот) и длинные пептиды (> около 50 аминокислот, которые также можно назвать «белками»). В некоторых воплощениях пептидный продукт содержит фрагмент поверхностно-активного вещества, ковалентно и стабильно присоединенный к пептиду, содержащему не более чем около 50, 40 или 30 аминокислот. Синтетические пептиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора пептидов. Пептиды могут также продуцироваться рекомбинантно в клетках, экспрессирующих последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют пептиды. Для описания пептидных последовательностей в настоящей заявке используются общепринятые обозначения: левый конец пептидной последовательности представляет собой амино-(N)-конец, а правый конец пептидной последовательности представляет собой карбоксильный (C)-конец. Для общих аминокислот в данной заявке используются стандартные однобуквенные и трехбуквенные сокращения. Хотя сокращения, используемые в раскрытых в данной заявке аминокислотных последовательностях, относятся к L-аминокислотам, если не приведены иные обозначения D- или DL-, или аминокислота является ахиральной, аналоговый D-изомер обычно можно использовать в любом положении (например, для устойчивости к протеолитической деградации). Аббревиатуры для других аминокислот, используемых в данной заявке, включают: Aib = α -аминоизомасляная кислота (или 2-метилаланин, или Ca-метилаланин); Хаа: любая аминокислота, обычно конкретно определенная в структурной формуле. Сокращения для других аминокислот, которые могут быть использованы, как описано в данной заявке, включают: Ac3c = 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота; Ac4c = 1-аминоциклобутан-1-карбоновая кислота; Ac5c = 1-аминоциклопентан-1-карбоновая кислота; Ac6c = 1-аминоциклогексан-1-карбоновая кислота; Aib = α -аминоизомасляная кислота (или 2-метилаланин или Сальфа-метилаланин); Bip = 3-(бифенил-4-ил)аланин; Bip2Et = 3-(2'-этилбифенил-4-ил)аланин; Bip2EtMeO = 3-(2'-этил-4'-метоксибифенил-4-ил)аланин; цит = цитруллин; Deg = 2,2-диэтилглицин; Dmt = (2,6-диметил)тирозин; 2FPhe = (2-фторфенил)аланин; 2FMePhe или 2FaMePhe = Ca-метил-(2-

фторфенил)аланин; hArg = гомоаргинин; MeLys или aMeLys = Ca-метиллизин; MePhe или aMePhe = Ca-метилфенилаланин; MePro или aMePro = Ca-метилпролин; Nal1 или Nal(1) = 3-(1-нафтил)аланин; Nal2 или Nal(2) = 3-(2-нафтил)аланин; Nle = норлейцин; Om = орнитин; и Tmp = (2,4,6-триметилфенил)аланин; 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота (Tic) и дипептидный фрагмент Tic-Phe с восстановленной амидной связью между остатками (обозначенный как Tic-Ψ[CF12-NF1]-Ψ-Phe), имеющий следующие структуры:



Tic



Tic-Ψ[CF12-NF1]-Ψ-Phe

Если специально не указано иное или из контекста явно не следует иное, изобретение охватывает любые и все формы пептида двойного агониста, которые могут быть получены независимо от того, получают ли пептид двойного агониста синтетическим путем (например, с использованием синтезатора пептидов) или с помощью клетки (например, путем рекомбинантного продуцирования). Такие формы пептида двойного агониста могут включать одну или несколько модификаций, которые могут быть сделаны в ходе синтетического или клеточного получения пептида, такие как одна или несколько посттрансляционных модификаций, независимо от того, являются ли одна или несколько модификаций заранее обдуманными. Пептид двойного агониста может иметь один и тот же тип модификации в двух или более различных местах и/или может иметь два или более различных типа модификаций. Модификации, которые могут быть сделаны в ходе синтетического или клеточного получения пептида двойного агониста, включая химические и посттрансляционные модификации, включают, без ограничения указанным, гликозилирование (например, N-связанное гликозилирование и O-связанное гликозилирование), липидирование, фосфорилирование, сульфатирование, ацетилирование (например, ацетилирование N-конца), амидирование (например, амидирование C-конца), гидроксирование, метилирование, образование внутримолекулярной или межмолекулярной дисульфидной связи, образование лактама между двумя боковыми цепями, образование пироглутамата и убиквитинирование. Пептид двойного агониста может иметь одну или несколько модификаций в любом участке, например, на N-конце, C-конце, в одной или нескольких аминокислотных боковых цепях, или в пептидном каркасе, или в любой их комбинации. В некоторых

воплощениях пептид двойного агониста ацетилован на N-конце и/или имеет карбоксамидную группу (-CONH₂) на C-конце, что может повышать стабильность пептида двойного агониста.

Потенциальные модификации пептида двойного агониста также включают делецию одной или нескольких аминокислот, добавление/вставку одной или нескольких природных и/или неприродных аминокислот или замену одной или несколькими природными и/или неприродными аминокислотами или модификации при использовании любой из указанных комбинацией или всех таких комбинаций. Замена может быть консервативной или неконсервативной. Такие модификации могут быть преднамеренными, такими как сайт-направленный мутагенез или химический синтез пептида двойного агониста, или могут быть случайными, такими как мутации, возникающие в клетке-хозяине, которая продуцирует пептид двойного агониста, или ошибки из-за амплификации ПЦР. Неприродная аминокислота может иметь такую же химическую структуру, что и аналогичная природная аминокислота, но иметь стереохимию D, или она может иметь другую химическую структуру и стереохимию D или L. Аминокислоты неприродного происхождения могут быть использованы, например, для стимуляции образования α -спирали и/или для повышения стабильности пептида двойного агониста (например, для сопротивления протеолитическому расщеплению). Пептид двойного агониста, имеющий одну или несколько модификаций по сравнению с референсным пептидом двойного агониста, может быть назван «аналогом» или «вариантом» референсного пептида двойного агониста в зависимости от ситуации. «Аналог» обычно сохраняет одно или несколько существенных свойств (например, связывание рецептора, активацию рецептора или фермента, ингибирование рецептора или фермента или другую биологическую активность) референсного пептида двойного агониста. «Вариант» может сохранять или не сохранять биологическую активность референсного пептида двойного агониста и/или может иметь другую биологическую активность. Предпочтительно, чтобы такой вариант сохранял свою способность действовать как агонист РГПП-1 и РГКГ и, в более предпочтительных воплощениях, имел примерно равную аффинность к РГПП-1 и РГКГ. В некоторых воплощениях аналог или вариант референсного пептида имеет аминокислотную последовательность, отличную от референсного пептида двойного агониста.

Термин «консервативная замена» относится к замене аминокислоты в пептиде двойного агониста функционально, структурно или химически сходной природной или неприродной аминокислотой. В некоторых воплощениях каждая из следующих групп содержит природные аминокислоты, которые представляют собой консервативные

замены друг друга: 1) глицин (Gly/G), аланин (Ala/A); 2) изолейцин (Ile/I), лейцин (Leu/L), метионин (Met/M), валин (Val/V); 3) фенилаланин (Phe/F), тирозин (Tyr/Y), триптофан (Trp/W); 4) серин (Ser/S), треонин (Thr/T), цистеин (Cys/C); 5) аспарагин (Asn/N), глутамин (Gln/Q); 6) аспарагиновая кислота (Asp/D), глутаминовая кислота (Glu/E); и 7) аргинин (Arg/R), лизин (Lys/K), гистидин (His/H). В дополнительных воплощениях каждая из следующих групп содержит природные аминокислоты, которые представляют собой консервативные замены друг друга: 1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro (пролин/P), Phe, Trp; 2) гидрофобные: Val, Leu, Ile, Phe, Trp; 3) алифатические: Ала, Вал, Леу, Иле; 4) ароматические: Phe, Tyr, Trp, His; 5) незаряженные полярные или гидрофильные: Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Tyr; 6) алифатические гидроксил- или сульфгидрилсодержащие: Ser, Thr, Cys; 7) амидосодержащие: Asn, Gln; 8) кислые: Asp, Glu; 9) основные: Lys, Arg, His; и 10) малые: Gly, Ala, Ser, Cys. В других воплощениях аминокислоты могут быть сгруппированы в виде консервативных замен, как указано ниже: 1) гидрофобные: Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp; 2) ароматические: Phe, Tyr, Trp, His; 3) нейтральные гидрофильные: Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln; 4) кислые: Asp, Glu; 5) основные: Lys, Arg, His; и 6) остатки, влияющие на ориентацию каркаса: Pro.

Примеры неприродных или непотеиногенных аминокислот включают, без ограничения указанным, аналоги аланина (например, α -этилGly [α -аминомасляная кислота или Abu], α -n-пропилGly [норвалин или Nva], α -трет-бутилGly [Tbg], α -винилGly [Vg или Vlg], α -аллилGly [Alg], α -пропаргилGly [Prg], 3-циклопропилAla [Cpa] и Aib), аналоги лейцина (например, нор-лейцин, Nle), аналоги пролина (например, α -MePro), аналоги фенилаланина (например, Phe(2-F), Phe(2-Me), Tmp, Bip, Bip(2'-Et-4'-OMe), Nal1, Nal2, Tic, α -MePhe, α -MePhe(2-F) и α -MePhe(2-Me)), аналоги тирозина (например, Dmt и \square -MeTyr), аналоги серина (например, гомосерин [изотреонин или hSer]), аналоги глутамина (например, Cit), аналоги аргинина (например, hArg, N,N'-g-диалкил-hArg), аналоги лизина (например, гомолизин [hLys], Orn и α -MeLys), α, α -дизамещенные аминокислоты (например, Aib, α, α -диэтилGly [Deg], α -циклогексилAla [2-Cha], Ac3c, Ac4c, Ac5c и Ac6c) и другие неприродные аминокислоты, описанные в A. Santoprete et al., *Pept. Sci.*, 17:270-280 (2011). α, α -Дизамещенные аминокислоты могут обеспечивать конформационное ограничение или стабилизацию α -спирали. Восстановленная амидная связь между двумя остатками (как, например, в Tic- Ψ [CFI2-NFI]- Ψ -Phe) повышает устойчивость к протеазам и может также, например, изменять связывание с рецептором. Настоящее изобретение охватывает все фармацевтически приемлемые соли пептидов двойного агониста, в том числе соли с положительным суммарным зарядом, соли с отрицательным суммарным зарядом и соли без суммарного заряда.

«Алкильная» группа относится к алифатической углеводородной группе. Алкильная группа может быть насыщенной или ненасыщенной и может быть неразветвленной (линейной), разветвленной или циклической. В некоторых воплощениях алкильная группа не является циклической. В некоторых воплощениях алкильная группа содержит 1-30, 6-30, 6-20 или 8-20 атомов углерода. «Замещенная» алкильная группа замещена одним или несколькими заместителями. В некоторых воплощениях один или несколько заместителей независимо выбраны из галогенов, нитро, циано, оксо, гидроксид, алкокси, галогеналкокси, арилокси, тиола, алкилтио, арилтио, алкилсульфоксида, арилсульфоксида, алкилсульфона, арилсульфона, амина, алкиламина, диалкиламина, ариламина, алкоила, карбоксила, карбоксилата, сложных эфиров, амидов, карбонатов, карбаматов, мочевины, алкила, галогеналкила, фторалкила, аралкила, алкильных цепей, содержащих ацильную группу, гетероалкила, гетероалицикла, арила, алкоксиарила, гетероарила, гидрофобных природных соединений (например, стероидов), и т.п. В некоторых воплощениях алкильная группа в качестве заместителя представляет собой линейный или разветвленный C-алкил, который можно назвать «низшим алкилом». Неограничивающие примеры низших алкильных групп включают метил, этил, пропил (включая н-пропил и изопропил), бутил (включая все изомерные формы, такие как н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил), пентил (включая все изомерные формы, такие как н-пентил) и гексил (включая все изомерные формы, такие как н-гексил). В некоторых воплощениях алкильная группа присоединена к атому N α остатка (например, Tug или Dmt) пептида. В некоторых воплощениях N-алкильная группа представляет собой прямой или разветвленный C1-C10-алкил или арилзамещенный алкил, такой как бензил, фенилэтил или т.п. Одна или две алкильные группы могут быть присоединены к N α -атому N-концевого остатка. В некоторых воплощениях алкильная группа представляет собой 1-алкильную группу, которая присоединена к положению C-1 сахара (например, глюкозы) через гликозидную связь (например, O-, S-, N- или C-гликозидную связь). В некоторых воплощениях такая 1-алкильная группа представляет собой незамещенную или замещенную C1-C30, C6-C30, C6-C20 или C8-C20 алкильную группу. В некоторых воплощениях алкильная группа (например, 1-алкильная группа) замещена одной или несколькими (например, 2 или 3) группами, независимо выбранными из арила, -OH, -OR¹, -SH, -SR¹, -NH₂, -NHR¹, -N(R¹)₂, оксо (=O), -C(=O)R₂, карбоксил (-CO₂H), карбоксилат (-CO₂⁻), -C(=O)OR¹, -OC(=O)R³, -C(=O)N(R¹)₂, -NR⁴C(=O)R³, -OC(=O)OR⁵, -OC(=O)N(R¹)₂, -NR⁴C(=O)OR⁵, and -NR⁴C(=O)N(R¹)₂ где: R¹ в каждом случае независимо представляет собой водород, алкил или арил, или оба варианта R¹ и атом азота, с которым они связаны, образуют гетероциклическое или гетероарильное кольцо; R² в каждом случае независимо

представляет собой алкил, гетероциклил, арил или гетероарил; R^3 в каждом случае независимо представляет собой водород, алкил, гетероциклил, арил или гетероарил; R^4 в каждом случае независимо представляет собой водород или алкил; и R^5 в каждом случае независимо представляет собой алкил или арил. В некоторых воплощениях алкильная группа (например, 1-алкильная группа) внутренне или/и по концу замещена карбоксильной/карбоксилатной группой, арильной группой или -О-арильной группой. В некоторых воплощениях алкильная группа (например, 1-алкильная группа) замещена карбоксильной или карбоксилатной группой на дистальном конце алкильной группы. В других воплощениях алкильная группа (например, 1-алкильная группа) замещена арильной группой на дистальном конце алкильной группы. В других воплощениях алкильная группа (например, 1-алкильная группа) замещена -О-арильной группой на дистальном конце алкильной группы. Термины «галоген», «галогенид» и «галоген» относятся к фториду, хлориду, бромиду и йодиду. Термин «ацил» относится к $-C(=O)R$, где R представляет собой алифатическую группу, которая может быть насыщенной или ненасыщенной и может быть линейной, разветвленной или циклической. В определенных воплощениях R содержит 1-20, 1-10 или 1-6 атомов углерода. Ацильная группа может быть необязательно замещена одной или несколькими группами, такими как галогены, оксо, гидроксил, алкокси, тиол, алкилтио, amino, алкиламино, диалкиламино, циклоалкил, арил, ацил, карбоксил, сложные эфиры, амиды, гидрофобные природные соединения (например, стероиды) и т.п. Термины «гетероциклил» и «гетероциклический» относятся к моноциклической неароматической группе или мультициклической группе, которая включает по меньшей мере одно неароматическое кольцо, где по меньшей мере одно неароматическое кольцо содержит один или несколько гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S. Неароматическое кольцо, содержащее один или несколько гетероатомов, может быть присоединено или конденсировано с одним или несколькими насыщенными, частично ненасыщенными или ароматическими кольцами. В некоторых воплощениях гетероциклильная или гетероциклическая группа имеет от 3 до 15, или от 3 до 12, или от 3 до 10, или от 3 до 8, или от 3 до 6 атомов в циклической структуре. Гетероциклильные или гетероциклические группы включают без ограничения указанным, азиридилил, азетидинил, пирролидинил, пиперидинил, морфолинил, пиперазинил, азепанил, азоканил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил (оксоланил), тетрагидропиранил, оксепанил и оксоканил. Термин «арил» относится к моноциклической ароматической углеводородной группе или мультициклической группе, которая включает по меньшей мере одно ароматическое углеводородное кольцо. В некоторых воплощениях арильная группа имеет от 6 до 15, или от 6 до 12, или от 6 до 10 атомов в циклической

структуре. Арильные группы включают без ограничения указанным, фенил, нафталинил (нафтил), флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил, бифенил и терфенил. Ароматическое углеводородное кольцо арильной группы может быть присоединено или конденсировано с одним или несколькими насыщенными, частично ненасыщенными или ароматическими кольцами, например, дигидронафтилом, инденилом, инданилом и тетрагидронафтилом (тетралинил). Арильная группа может быть необязательно замещена одним или несколькими (например, 2 или 3) заместителями, независимо выбранными из галогенов (включая -F и -Cl), циано, нитро, гидроксила, алкокси, тиола, алкилтио, алкилсульфоксида, алкилсульфон, амино, алкиламино, диалкиламино, алкила, галогеналкила (включая фторалкил, такой как трифторметил), ацила, карбоксила, сложных эфиров, амидов и т.п. Термин «гетероарил» относится к моноциклической ароматической группе или мультициклической группе, которая содержит по меньшей мере одно ароматическое кольцо, где по меньшей мере одно ароматическое кольцо содержит один или несколько гетероатомов, независимо выбранных из O, N и S. Гетероароматическое кольцо может быть присоединено или конденсировано с одним или несколькими насыщенными, частично ненасыщенными или ароматическими кольцами, которые могут содержать только атомы углерода или которые могут содержать один или несколько гетероатомов. В определенных воплощениях гетероарильная группа имеет от 5 до 15, или от 5 до 12, или от 5 до 10 атомов в циклической структуре. Моноциклические гетероарильные группы включают, без ограничения указанным, пирролил, пиразолил, пиразолинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, тиадиазолил, изотиазолил, фуранил, тиенил (тиофенил), оксадиазолил, триазолил, тетразолил, пиридил, пиридонил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил, пиридазинонил и триазинил. Неограничивающие примеры бициклических гетероарильных групп включают индолил, бензотиазолил, бензотиадиазолил, бензоксазолил, бензизоксазолил, бензотиенил (бензотиофенил), хинолинил, тетрагидроизохинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, бензотриазолил, индолизинил, бензофуранил, изобензофуранил, хромонил, кумаринил, циннолинил, хиназолинил, хиноксалинил, индазолил, нафтиридинил, фталазинил, хиназолинил, пуринил, пирролопиридинил, фуропиридинил, тиенопиридинил, дигидроизоиндолил и тетрагидрохинолинил.

В некоторых воплощениях, например, пептиды двойного агониста могут быть связаны с сахаридом, например, в составе фармацевтически приемлемой композиции или лиофилизата. Сахариды включают моносахариды, дисахариды и олигосахариды (например, трисахариды, тетрасахариды и так далее). Восстанавливающий сахарид существует в форме кольца и в форме с открытой цепью в равновесии, что обычно

благоприятствует форме кольца. Функционализированный сахарид поверхностно-активного остатка имеет функциональную группу, подходящую для образования ковалентной связи с аминокислотой пептида двойного агониста.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к веществу (например, активному ингредиенту или наполнителю), которое подходит для применения в контакте с тканями и органами субъекта без чрезмерного раздражения, аллергического ответа, иммуногенности и токсичности, соразмерно с разумным соотношением выгоды и риска, и является эффективным для его предполагаемого использования. «Фармацевтически приемлемый» эксципиент или носитель фармацевтической композиции также совместим с другими ингредиентами композиции. В одном воплощении фармацевтически приемлемая композиция, в которую может быть включен пептид двойного агониста, содержит полисорбат 20 (например, около 0,050% (масс./масс.)); необязательно метилпарабен (например, около 0,300% (масс./масс.)); аргинин (около 0,348% (масс./масс.)) и маннитол (например, около 4,260% (масс./масс.)) в дистиллированной (ДВ) воде.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству соединения, которое при введении субъекту является достаточным для предотвращения, снижения риска развития, задержки начала, замедления прогрессирования или возникновения регрессии медицинского состояния, подвергаемого лечению, или в некоторой степени способно облегчить состояние здоровья или один или несколько симптомов или осложнений этого состояния, по меньшей мере, у некоторой части субъектов, принимающих это соединение. Термин «терапевтически эффективное количество» также относится к количеству соединения, которое является достаточным для выявления биологического или медицинского ответа клетки, ткани, органа или человека, который необходим лечащему или клиническому врачу.

Термины «проводить лечение», «лечить» и «лечение» включают облегчение, улучшение, подавление прогрессирования, изменение или устранение медицинского состояния или одного или нескольких симптомов или осложнений, связанных с этим состоянием, и облегчение, улучшение или устранение одной или нескольких причин состояния. Ссылка на «лечение» медицинского состояния включает профилактику этого состояния. Термины «предотвратить», «предотвращать» и «предотвращение» включают исключение, снижение риска развития и отсрочки возникновения медицинского состояния или одного или нескольких симптомов или осложнений, связанных с этим состоянием. Термин «медицинские состояния» (или «состояния» для краткости) включает заболевания и расстройства. Термины «заболевания» и «расстройства» используются в данной заявке взаимозаменяемо.

В изобретении также предлагаются фармацевтические композиции, включающие пептидный продукт двойного агониста, раскрытый в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемую соль, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество пептидного продукта или его соответствующей фракции. Композиция может необязательно включать дополнительный терапевтический агент. В некоторых воплощениях пептидный продукт имеет чистоту, по меньшей мере, приблизительно 90%, 95% или 98%. Фармацевтически приемлемые эксципиенты и носители включают фармацевтически приемлемые вещества, материалы и носители. Неограничивающие примеры типов эксципиентов включают жидкие и твердые наполнители, разбавители, связующие, смазывающие вещества, глиданты, поверхностно-активные вещества, диспергирующие агенты, агенты, способствующие распадемости, эмульгирующие агенты, смачивающие агенты, суспендирующие агенты, загустители, растворители, изотонические агенты, буферы, регуляторы pH, агенты, задерживающие абсорбцию, стабилизаторы, антиоксиданты, консерванты, антимикробные агенты, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, хелатирующие агенты, адъюванты, подсластители, ароматизаторы, красители, инкапсулирующие материалы и материалы для покрытия. Применение таких эксципиентов в фармацевтических составах известно в данной области. Например, обычные несущие среды и носители включают без ограничения указанным, масла (например, растительные масла, такие как оливковое масло и кунжутное масло), водные растворители (например, солевой раствор, солевой буферный раствор (например, фосфатно-солевой буферный раствор [PBS]) и изотонические растворы (например, раствор Рингера)) и органические растворители (например, диметилсульфоксид и спирты [например, этанол, глицерин и пропиленгликоль]). За исключением случаев, когда какой-либо обычный эксципиент или носитель несовместим с пептидным продуктом, изобретение охватывает использование обычных эксципиентов и носителей в составах, содержащих пептидный продукт. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins (Philadelphia, Pennsylvania) (2005); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Ed., Rowe et al, Eds., The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association (2005); Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd Ed., Ash and Ash, Eds., Gower Publishing Co. (2007); и Pharmaceutical Pre-formulation and Formulation, Gibson, Ed., CRC Press (Boca Raton, Florida) (2004).

Соответствующий или подходящий состав может зависеть от различных факторов, таких как выбранный путь введения. Потенциальные пути введения фармацевтической

композиции, содержащей пептидный продукт, включают без ограничения указанным, пероральный, парентеральный (в том числе внутрикожный, подкожный, внутримышечный, внутрисосудистый, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, внутриполостный и местный) и местный (включая трансдермальный, трансмукозальный, интраназальный) (например, с помощью назального спрея или капель), окулярный (например, с помощью глазных капель), легочный (например, путем орального или назального вдыхания), буккальный, сублингвальный, ректальный (например, с помощью суппозитория) и вагинальный (например, с помощью суппозитория)). В некоторых воплощениях настоящий пептидный продукт двойного агониста вводят парентерально (например, подкожно, внутривенно или внутримышечно). В других воплощениях пептидный продукт вводят путем оральной ингаляции или назальной ингаляции или инсуффляции. В некоторых воплощениях носитель представляет собой носитель на водной основе, такой как парентеральный (например, подкожный, внутривенный или внутримышечный) состав. В других воплощениях носитель представляет собой неводный носитель. В некоторых воплощениях носитель на неводной основе представляет собой гидрофторалкан (ГФА) или ГФА-подобный растворитель, который может содержать субмикронные безводные α -лактозу и/или другие эксципиенты, например, в составе для введения путем пероральной ингаляции или назальной ингаляции или инсуффляции.

В некоторых воплощениях пептидный продукт вводят парентерально (например, подкожно, внутривенно или внутримышечно) путем инъекции. Парентеральное введение позволяет обойти сильно кислую среду желудка, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и пресистемный метаболизм. Эксципиенты и носители, которые можно использовать для приготовления парентеральных составов, включают, без ограничения указанным, растворители (например, водные растворители, такие как вода, солевой раствор, физиологический раствор, солевой буферный раствор [например, PBS], сбалансированные солевые растворы [например, BSS Рингера] и водные растворы декстрозы), изотонические/изоосмотические агенты (например, соли [например, NaCl, KCl и CaCl₂] и сахара [например, сахароза]), буферные агенты и регуляторы pH (например, дигидрофосфат натрия [одноосновный фосфат натрия]/динатрий гидрофосфат [двухосновный фосфат натрия], лимонная кислота/цитрат натрия и L-гистидин/L-гистидин HCl) и эмульгаторы (например, неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты [например, полисорбат 20 и 80] и полуксамеры [например, полуксамер 188]). Пептидные составы и системы доставки обсуждаются, например, в A. J. Banga, *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, 3rd

Ed., CRC Press (Boca Raton, Florida) (2015). Наполнители могут необязательно включать одно или несколько веществ, которые увеличивают стабильность пептида, увеличивают растворимость пептида, ингибируют агрегацию пептида или уменьшают вязкость раствора, или любую комбинацию или все из них. Такие вещества включают без ограничения гидрофильные аминокислоты (например, аргинин и гистидин), полиолы (например, мио-инозитол, маннитол и сорбитол), сахараиды (например, глюкозу (включая D-глюкозу [декстрозу]), лактозу, сахарозу и трегалозу), осмолиты (например, трегалоза, таурин, аминокислоты [например, глицин, саркозин, аланин, пролин, серин, b-аланин и g-аминомасляная кислота] и бетаины [например, триметилглицин и N-оксид триметиламина]) и неионные поверхностно-активные вещества (например, алкилполигликозиды, алкилсахариды ProTek® (например, моносахарид [например, глюкоза] или дисахарид [например, мальтоза или сахароза], связанные с жирной кислотой с длинной цепью или соответствующим спиртом с длинной цепью), и блок-сополимеры полипропиленгликоля/полиэтиленгликоля (например, полуксамеры [например, Pluronic™ F-68] и Genapol® PF-10 и их варианты). Поскольку такие вещества увеличивают растворимость пептидов, их можно использовать для увеличения концентрации пептидов в составе. Более высокая концентрация пептида в составе особенно полезна для подкожного введения, которое имеет ограниченный объем болюсного введения (например, \leq около 1,5 мл). Кроме того, такие вещества можно использовать для стабилизации пептидов во время приготовления, хранения и восстановления лиофилизированных пептидов. Примерный парентеральный состав включает пептидный продукт, маннитол, метионин, тиогликолат натрия, полисорбат 20, регулятор pH (например, NaOH или/и HCl) и деионизированную воду. Эксцipientы парентеральных составов, которые подходят для применения с пептидами двойного агониста, описанными в настоящей заявке (например, различные комбинации вспомогательных веществ, включая NaCl и т.п.), хорошо известны и доступны специалистам в данной области.

Для парентерального (например, подкожного, внутривенного или внутримышечного) введения стерильный раствор или суспензия пептидного продукта в водном растворителе, содержащем один или несколько наполнителей, могут быть приготовлены заранее и могут быть предоставлены, например, в предварительно заполненном шприце одноразовой шприц-ручки или шприц-ручки со счетчиком дозы. В ином случае, пептидный продукт может быть растворен или суспендирован в водном растворителе, который может необязательно содержать один или несколько наполнителей до лиофилизации (сублимационной сушки). Незадолго до парентерального введения лиофилизированный пептидный продукт, хранящийся в подходящем контейнере

(например, флаконе), может быть восстановлен, например, стерильной водой, которая может необязательно содержать один или несколько наполнителей. В других воплощениях продукт пептид-агонист вводят интраназально. Слизистая оболочка носа обеспечивает большую площадь поверхности, пористый эндотелий, высокососудистый субэпителиальный слой и высокую скорость абсорбции и, следовательно, обеспечивает высокую биодоступность. Интраназальная композиция может содержать пептидный продукт вместе с эксципиентами, такими как усилитель растворимости (например, пропиленгликоль), увлажнитель (например, маннитол или сорбит), буфер и вода, и необязательно консервант (например, хлорид бензалкония), мукоадгезивный агент (например, гидроксиэтилцеллюлоза) или/и усилитель проникновения. Интраназальный раствор или суспензионный состав можно вводить в полость носа любым подходящим способом, включая капельницу, пипетку или спрей, без ограничения указанным, например, с помощью дозирующего распылительного насоса для опрыскивания. В таблице 2 приведены типичные эксципиенты композиций для назального спрея.

Таблица 2

Типичные эксципиенты и носители для назальных и легочных композиций

Дозированная форма	Ингредиенты в дополнение к пептидному продукту
Назальный спрей	микрористаллическая целлюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, декстроза, вода и, необязательно, регулятор pH (например, HCl)
Назальный спрей	микрористаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, декстроза, полисорбат 80, эдетат динатрия, сорбат калия, регулятор pH (например, HCl), вода и, необязательно, спирт (например, этанол)
Назальный спрей	микрористаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, декстроза, полисорбат 80, хлорид бензалкония, фенилэтиловый спирт, вода и, необязательно, спирт (например, этанол)
Назальный спрей	гипромеллоза, хлорид бензалкония, NaCl, ЭДТА, лимонная кислота, двухосновный фосфат натрия, вода и, необязательно, спирт (например, этанол)
Ингаляция (ДПИ)	маннитол, глицин, цитрат натрия и NaOH
Ингаляция (ДПИ)	лактоза, крахмал, производное крахмала (например, гидроксипропилметилцеллюлоза) или поливинилпирролидин и необязательно стеарат магния или/и лейцин
Ингаляция (ДАИ)	пропеллент (например, 1,1,1,2-тетрафторэтан), поверхностно-активное вещество (например, лецитин или олеиновая кислота) и соразтворитель (например, этанол)

Ингаляция (небулайзер)	полисорбат 80, эдетат динатрия, хлорид натрия, рН-буферные агенты (например, лимонная кислота/цитрат натрия) и вода
---------------------------	---

В дополнительных воплощениях пептидный продукт вводят легочным путем, например, путем пероральной ингаляции или назальной ингаляции. Легочное введение лекарственного средства может лечить заболевание легких и/или системное заболевание, поскольку легкие служат воротами в большой круг кровообращения. Преимущества доставки лекарственных средств через легкие включают, например: 1) предотвращение пресистемного метаболизма; 2) быстрое действие лекарственного средства; 3) большая площадь поверхности альвеолярной области для абсорбции, высокая проницаемость легких (тонкий воздушно-кровеный барьер) и обильная сосудистая сеть дыхательных путей; и 4) пониженные уровни внеклеточного фермента по сравнению с желудочно-кишечным трактом из-за большой площади альвеолярной поверхности. Преимущество пероральной ингаляции над назальной ингаляцией включает более глубокое проникновение лекарственного средства в легкие (отложение лекарственного средства в легких), хотя назальная ингаляция может доставлять лекарственное средство в системный кровоток через слизистую оболочку в полости носа, а также в легких. Пероральная или назальная ингаляция может быть достигнута, например, с помощью дозирующего аэрозольного ингалятора (ДАИ), небулайзера или дозирующего порошкового ингалятора (ДПИ). Например, пептидный продукт может быть приготовлен для аэрозольного введения в дыхательные пути путем оральной или назальной ингаляции. Лекарственное средство доставляется с небольшим размером частиц (например, от около 0,5 микрона до около 5 микрон), которое может быть получено путем микронизации, чтобы улучшить, например, отложение лекарственного средства в легких и стабильность суспензии лекарственного средства. Лекарственное средство может поставляться в упаковке под давлением с подходящим пропеллентом, таким как гидрофторалкан (ГФА, например, 1,1,1,2-тетрафторэтан [ГФА-134a]), хлорфторуглерод (ХФУ, например, дихлордифторметан, трихлорфторметан или дихлортetraфторэтан) или подходящий газ (например, кислород, сжатый воздух или диоксид углерода). Лекарственное средство в виде аэрозоля растворяется или чаще суспендируется в пропелленте для доставки в легкие. Аэрозоль может содержать эксципиенты, такие как поверхностно-активное вещество (которое улучшает проникновение в легкие за счет уменьшения сил высокого поверхностного натяжения на границе раздела воздух-вода внутри альвеол, может также эмульгировать, солюбилизировать и/или стабилизировать лекарственное средство и может, например, представлять собой фосфолипид, такой как лецитин) или/и

стабилизатор, хотя поверхностно-активная часть пептидного продукта может выполнять функции поверхностно-активного вещества. Например, состав ДАИ может содержать пептидный продукт, пропеллент (например, ГФА, такой как 1,1,1,2-тетрафторэтан) и соразтворитель (например, спирт, такой как этанол), и, необязательно, поверхностно-активное вещество (например, жирную кислоту, такую как олеиновая кислота). Состав ДАИ может необязательно содержать растворенный газ (например, CO_2). После срабатывания устройства взрыв пузырьков CO_2 внутри испускаемых капель аэрозоля разбивает капли на более мелкие капли, тем самым увеличивая вдыхаемую фракцию лекарственного средства. В качестве другого примера, композиция небулайзера может включать пептидный продукт, хелатор или консервант (например, эдетат динатрий), агент изотоничности (например, NaCl), буферные агенты pH (например, лимонная кислота/цитрат натрия) и воду и, необязательно, поверхностно-активное вещество (например, Tween®, такое как полисорбат 80). Лекарственное средство может быть доставлено с помощью, например, небулайзера или ДАИ со спейсером или без него, и доставляемая доза лекарственного средства может контролироваться дозирующей камерой (небулайзер) или дозирующим клапаном (ДАИ).

В таблице 2 приведены типичные составы ДАИ, небулайзера и ДПИ. Дозирующие аэрозольные ингаляторы (также называемые компрессорными дозирующими аэрозольными ингаляторами [кДАИ]) являются наиболее широко используемыми ингаляционными устройствами. Дозирующий клапан подает точное количество аэрозоля (например, около 20-100 мкл) при каждом срабатывании устройства. ДАИ обычно генерируют аэрозоль быстрее, чем пользователь может вдохнуть, что может привести к отложению значительной части аэрозоля во рту и в горле. Проблема плохой координации между приведением в действие устройства и его вдыханием может быть решена с помощью, например, ДАИ, приводимого в действие дыханием, или координационным устройством. Активируемый дыханием ДАИ (например, Easi breath®) активируется, когда устройство определяет вдох пользователя и в ответ выдает дозу лекарства. Скорость ингаляционного потока координируется через привод, и у пользователя есть время, чтобы надежно активировать устройство во время вдоха. В координационном устройстве спейсер (или клапанная удерживающая камера), которая представляет собой трубку, прикрепленную к концу мундштука ингалятора, служит резервуаром или камерой, в которой содержится лекарство, которое распыляется ингалятором, и снижает скорость, с которой аэрозоль попадает в рот, тем самым допуская испарение пропеллента из более крупных капель. Спейсер упрощает использование ингалятора и увеличивает количество лекарственного средства, откладываемого в легких, а не в верхних дыхательных путях.

Спейсер может быть изготовлен из антистатического полимера, чтобы минимизировать электростатическое прилипание испускаемых частиц лекарственного средства к внутренним стенкам спейсера. Небулайзеры генерируют аэрозольные капли размером около 1-5 микрон. Они не требуют пользовательской координации между включением устройства и вдыханием, что может значительно повлиять на количество лекарственного средства, откладываемого в легких. По сравнению с ДАИ и ДПИ, небулайзеры могут доставлять большие дозы лекарственного средства, хотя и в течение более длительного времени. Примеры небулайзеров включают, без ограничения указанным, небулайзеры, приводимые в движение мускульной силой человека, струйные небулайзеры (например, AeroEclipse® II BAN [приводимый в действие дыханием], CompAIR™NE-C801 [виртуальный клапан], PARI LC® Plus [усиленный дыханием] и SideStream Plus [усиленный дыханием]), ультразвуковые небулайзеры и небулайзеры с вибрирующей сеткой (например, Akita2® Apixneb, I-neb AAD System с дозирующими камерами, MicroAir® NE-U22, Omron U22 и PARI eFlow® Rapid). Например, импульсный ультразвуковой небулайзер может распылять фиксированное количество лекарственного средства на импульс и может содержать оптоакустический триггер, который позволяет пользователю синхронизировать каждое дыхание с каждым импульсом. Для оральной или назальной ингаляции с использованием ДПИ пептидный продукт может быть предоставлен в форме сухого микронизированного порошка, где частицы лекарственного средства имеют определенный небольшой размер (например, от около 0,5 микрона до около 5 микрон) для улучшения, например, аэродинамических свойств диспергированного порошка и отложения лекарственного средства в легких. Частицы размером от 0,5 до 5 микрон осаждаются путем седиментации в концевых бронхиолах и альвеолярных областях. Напротив, большинство более крупных частиц (> 5 микрон) не следуют за потоком воздуха во многие бифуркации дыхательных путей, а скорее оседают в результате ударов в верхних дыхательных путях, включая ротоглоточную область горла. Состав ДПИ может включать отдельные частицы лекарственного средства или смешанные с порошком подходящей более крупной основы/носителя, таких как лактоза, крахмал, производное крахмала (например, гидроксипропилметилцеллюлоза) или поливинилпирролидин. Частицы носителя улучшают течение, уменьшают агрегацию, улучшают однородность дозы и способствуют диспергированию частиц лекарственного средства. Композиция ДПИ может необязательно включать наполнитель, такой как стеарат магния или лейцин, который улучшает рабочие характеристики композиции, препятствуя связыванию между частицами (благодаря антиадгезионному действию). Порошковая композиция может быть предоставлена в форме единичной дозы, такой как

капсула (например, желатиновая капсула) или картридж в блистерной упаковке, который можно загружать вручную или предварительно загружать в ингалятор. Частицы лекарственного средства можно втянуть в легкие, поместив мундштук или носовую часть ингалятора в рот или нос, сделав резкий глубокий вдох для создания турбулентного воздушного потока и задерживая дыхание на некоторое время (например, около 5- 10 секунд), чтобы позволить частицам лекарственного средства осесть в бронхиолах и альвеолярных областях. Когда пользователь активирует ДПИ и вдыхает, поток воздуха через устройство создает сдвиг и турбулентность, вдыхаемый воздух вводится в слой порошка, а смесь статического порошка псевдооживается и попадает в дыхательные пути пользователя. Там частицы лекарственного средства отделяются от частиц носителя из-за турбулентности и переносятся глубоко в легкие, в то время как более крупные частицы носителя воздействуют на поверхности ротоглотки и очищаются. Таким образом, поток вдыхаемого воздуха пользователя обеспечивает деагломерацию и аэроионизацию порошка и определяет отложение лекарственного средства в легких. (В то время как пассивный ДПИ требует быстрого вдоха для деагломерации частиц лекарственного средства, быстрый вдох не рекомендуется при использовании ДАИ или небулайзера, поскольку он создает турбулентный воздушный поток и высокую скорость, которые увеличивают осаждение лекарственного средства за счет удара в верхних дыхательных путях.) По сравнению с ДАИ, ДПИ (включая ДПИ, активируемый дыханием) может быть способен доставлять в легкие большие дозы лекарства и лекарства большего размера (например, макромолекулы).

Лактоза (например, моногидрат альфа-лактозы) является наиболее часто используемым носителем в составах ДПИ. Примеры категорий/типов моногидрата лактозы для составов ДПИ включают без ограничения указанным, DCL 11, Flowlac® 100, Inhalac® 230, Lactohale® 300, Lactopress® SD 250 (лактоза, высушенная распылением), Respitose® SV003 и Sorbolac® 400. Композиция ДПИ может включать один сорт лактозы или комбинацию различных сортов лактозы. Например, тонко измельченная лактоза, такая как Lactohale® 300 или Sorbolac® 400, может быть не подходящим носителем ДПИ и может нуждаться в смешивании с грубо измельченной лактозой, такой как DCL 11, Flowlac® 100, Inhalac® 230 или Respitose® SV003 (например, в соотношении около 1: 9 тонко измельченной лактозы и грубо измельченной лактозы) для улучшения текучести.

В таблицах 3 и 4 приведены неограничивающие примеры градаций/типов лактозы, которые можно использовать в составах ДПИ. Распределение размеров частиц носителя влияет на фракцию/дозу мелкодисперсных частиц (ФМЧ или ДМЧ) лекарственного средства, причем для доставки лекарственного средства в легкие желательна высокая

ФМЧ. ФМЧ/ДМЧ представляет собой вдыхаемую массу фракции/дозы из устройства ДПИ с аэродинамическим размером частиц ≤ 5 микрон в воздухе вдоха. Высокая ФМЧ и, следовательно, хорошие характеристики ДПИ могут быть получены, например, в случае составов для ДПИ, имеющих соотношение 1: 9 тонко измельченной лактозы (например, Lactohale® 300) к грубо измельченной лактозе (например, Respitose® SV003) и около 20% масс./масс. превосходства для предотвращения осаждения лекарственного средства в оболочке капсулы или в устройстве ДПИ и для доставки по существу всего лекарственного средства в дыхательные пути.

Таблица 3

Продукт	Тип	Диапазон размеров частиц (мкм)		
		10%	50%	90%
Lactohale®	LH200	<9	<69	<141
InhaLac®	230	<35	<93	<138
Respitose®	ML001	<4	<43	<146
	ML003	<4	<35	<106
	SV003	<30	<59	<90
	SV004	<32	<61	<93

Таблица 4

Продукт	Тип	Диапазон размеров частиц			
		<45 um	< 100 um	<150 um	<250 um
Respitose®	ML003	65%	98%	100%	NA
Respitose®	ML002	65%	98%	NA	100%

Другие носители для составов ДПИ включают без ограничения указанным, глюкозу, маннитол (например, кристаллизованный маннитол [Pearlitol 110 C] и высушенный распылением маннитол [Pearlitol 100 SD]), мальтитол (например, кристаллизованный мальтитол [Maltisorb P90]), сорбитол и ксилитол. Большинство ДПИ активируются дыханием («пассивно»), полагаясь на вдыхание пользователя для генерации аэрозоля. Примеры пассивных ДПИ включают, без ограничения указанным, Airmax®, Novolizer® и Otsuka DPI (compact cake). Технология воздушной классификации (ТВК) представляет собой эффективный механизм пассивного диспергирования порошка, используемый в ДПИ. В ТВК несколько каналов подачи генерируют тангенциальный поток воздуха, что приводит к вихрю внутри устройства во время вдыхания. Существуют также ДПИ с усилителем («активные») (на основе, например, пневматики, силы удара или

вибрации), которые используют энергию для помощи, например, в деагломерации частиц. Например, активный механизм ингаляторов Exubera® использует механическую энергию, запасенную в источниках или камерах сжатого воздуха. Примеры активных ДПИ включают, без ограничения указанным, Actispire® (единичная стандартная доза), Aspirair® (многократная стандартная доза), Exubera® (единичная стандартная доза), MicroDose® (многократная стандартная доза и электронно-активированная), Omnihaler® (единичная стандартная доза), Pfeiffer DPI (единичная стандартная доза) и Spiros® (многократная стандартная доза). Пептидный продукт также можно вводить другими путями, например, перорально. Пероральный состав может содержать пептидный продукт и обычные эксципиенты, известные в данной области, и необязательно усилитель абсорбции, такой как натрий V-[8-(2-гидроксibenзоил)аминокаприлат] (SNAC). SNAC защищает от ферментативной дегградации за счет локального буферного действия и улучшает абсорбцию ЖКТ. Пероральная лекарственная форма (например, таблетка, капсула или пиллюля) может необязательно иметь энтеросолюбильное покрытие для защиты ее содержимого от сильных кислот и протеолитических ферментов желудка. В некоторых воплощениях пептидный продукт доставляется из композиции с замедленным высвобождением. Используемый в данной заявке термин «композиция с замедленным высвобождением» охватывает композиции, системы и устройства с замедленным высвобождением, пролонгированным высвобождением, расширенным высвобождением, отсроченным высвобождением, медленным высвобождением и контролируемым высвобождением. В некоторых воплощениях композиция с замедленным высвобождением доставляет пептидный продукт в течение периода, по меньшей мере, приблизительно 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяца или дольше. В некоторых воплощениях композицию с замедленным высвобождением приготавливают в виде наночастиц или микрочастиц, состоящих из биоразлагаемого полимера и включающих пептидный продукт. В некоторых воплощениях биоразлагаемый полимер включает молочную кислоту и/или гликолевую кислоту [например, сополимер на основе L-молочной кислоты, такой как поли (L-лактид-со-гликолид) или поли (L-молочная кислота-со-D, L-2-гидроксиоктановая кислота)]. В других воплощениях композиция с замедленным высвобождением находится в форме депо, которое образуется, когда смесь пептидного продукта и полимера вводят субъекту внутримышечно или подкожно. В некоторых воплощениях полимер представляет собой или содержит ПЭГ, полимолочную кислоту (ПМК) или полигликолевую кислоту (ПГК) или их сополимер (например, ПМК-ПЭГ или ПМК-ПЭГ).

Фармацевтическая композиция может быть представлена в единичной

дозированной форме в виде единичной дозы, в которой все активные и неактивные ингредиенты объединены в подходящей системе, и компоненты не нужно смешивать для образования композиции для введения. Стандартная лекарственная форма, как правило, содержит терапевтически эффективную дозу лекарственного средства, но может содержать ее соответствующую фракцию, так что при приеме нескольких стандартных лекарственных форм достигается терапевтически эффективная доза. Примеры стандартной лекарственной формы включают таблетку, капсулу или пилюлю для перорального приема; раствор в предварительно заполненной одноразовой ручке-шприце или ручке-шприце со счетчиком доз для парентерального (например, внутривенного, подкожного или внутримышечного) введения; а также капсулу, картридж или блистер, предварительно загруженные в ингалятор или загружаемые в него вручную. В ином случае, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде набора, в котором активный ингредиент, наполнители и носители (например, растворители) поставляются в двух или более отдельных контейнерах (например, ампулах, флаконах, пробирках, бутылках или шприцах) и должны быть объединены для формирования композиции для введения. Набор может включать инструкции по хранению, приготовлению и введению композиции (например, раствора для парентерального введения). Набор может включать все активные и неактивные ингредиенты в стандартной лекарственной форме или активный ингредиент и неактивные ингредиенты в двух или более отдельных контейнерах и может включать инструкции по введению или применению фармацевтической композиции для лечения медицинского состояния, раскрытого в данной заявке. Набор может дополнительно включать устройство для доставки композиции, такое как инъекционная ручка или ингалятор. В некоторых воплощениях набор содержит пептидный продукт или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию, содержащую его, и инструкции по введению или применению пептидного продукта или композиции для лечения раскрытого в данной заявке медицинского состояния, такого как инсулинорезистентность, диабет, ожирение, метаболический синдром или сердечно-сосудистое заболевание или состояние, связанное с ним (например, НАСГ или СПКЯ). В определенных воплощениях набор дополнительно содержит устройство для доставки пептидного продукта или композиции, такое как инъекционная ручка или ингалятор.

В изобретении дополнительно предложено применение пептидных продуктов двойного агониста, описанных в настоящем документе, для профилактики и/или лечения состояний, связанных с РГПП-1 и/или РГКГ, таких как, без ограничения указанным, резистентность к инсулину, диабет, ожирение, метаболический синдром и сердечно-

сосудистые заболевания, а также состояния, связанные с указанными, такие как НАСГ и СПКЯ. В некоторых воплощениях пептидные продукты двойного агониста можно применять для лечения гипергликемии, резистентности к инсулину, гиперинсулинемии, преддиабета, диабета (включая типы 1 и 2, гестационный и ювенильный диабет), диабетических осложнений, диабетической невропатии, диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, повышенного уровня свободных жирных кислот в крови, ожирения, метаболического синдрома, синдрома X, сердечно-сосудистых заболеваний (включая ишемическую болезнь сердца), атеросклероза, острого сердечно-сосудистого синдрома, ишемии (включая ишемию миокарда и церебральную ишемию/инсульт), ишемически-реперфузионного повреждения (включая миокардиальное и церебральное ИРИ), инфаркта (включая инфаркт миокарда и церебральный инфаркт), стенокардии, сердечной недостаточности (например, застойной сердечной недостаточности), заболевания периферических сосудов, тромбоза (например, тромбоза глубоких вен), эмболии (например, тромбоемболии легочной артерии), системного воспаления (например, характеризующегося повышенным уровнем С-реактивного белка в крови) и артериальной гипертензии. Пептидные продукты двойного агониста могут достигать своих терапевтических эффектов за счет различных механизмов, включая стимуляцию зависимой от глюкозы секреции инсулина в крови, повышение чувствительности к инсулину, стимуляцию сжигания жира и снижение массы тела. Пептидные продукты двойного агониста также могут способствовать, например, защите бета-клеток поджелудочной железы, кардиозащите и заживлению ран.

Описанные в данной заявке пептидные продукты можно использовать для лечения других состояний, связанных с инсулинорезистентностью и/или ожирением. Другие состояния, связанные с инсулинорезистентностью и/или ожирением, включают без ограничения указанным, артрит (например, остеоартрит), боль в пояснице, нарушения дыхания (например, астму, синдром гиповентиляции при ожирении [синдром Пиквикяна] и обструктивное апноэ во сне), дерматологические нарушения (например, диабетические язвы, черный акантоз, целлюлит, гирсутизм, опрелость и лимфедему), гастроэнтерологические расстройства (например, желчнокаменная болезнь [желчный камень], гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь [ГЭРБ] и гастропарез), подагру, гиперкортицизм (например, синдром Кушинга) заболевания почек (например, хроническое заболевание почек), заболевания печени (например, жировую болезнь печени [ЖБП], включая алкогольную и неалкогольную ЖБП), неврологические нарушения (например, синдром запястного канала, деменции [например, болезнь Альцгеймера и

сосудистая деменция), парестетическая миалгия, мигрени и рассеянный склероз), урологические нарушения (например, эректильная дисфункция, гипогонадизм и недержание мочи), синдром поликистозных яичников, бесплодие, нарушения менструального цикла, расстройства настроения (например, депрессия) и онкологические заболевания (например, рак эндометрия, пищевода, кишечника, желчного пузыря, почки, печени [например, гепатоцеллюлярная карцинома], поджелудочной железы и кожи [например, меланома] и лейкоз). В некоторых воплощениях пептидный продукт двойного агониста, описанный в настоящей заявке, применяется для лечения синдрома поликистозных яичников (СПКЯ). В других воплощениях пептидный продукт используют для лечения хронического заболевания почек (ХЗП), также известного как хроническая почечная/ренальная недостаточность (ХПН/ХРН). Наиболее распространенными причинами ХЗП являются диабет и длительная неконтролируемая гипертензия. В дополнительных воплощениях пептидный продукт двойного агониста, описанный в настоящем документе, используется для лечения жировой болезни печени (ЖБП). В некоторых воплощениях ЖБП представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП). В определенных воплощениях НАЖБП представляет собой неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). ЖБП, также известная как стеатоз печени, характеризуется чрезмерным накоплением жира в печени. ЖБП включает алкогольную жировую болезнь печени (АЖБП) и НАЖБП. Хронический алкоголизм вызывает ожирение печени из-за выработки токсических метаболитов, таких как альдегиды, при метаболизме алкоголя в печени. НАЖБП описана ниже. ЖБП связана с диабетом, ожирением и метаболическим синдромом. Ожирение печени может развиваться в цирроз или рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному [ГЦК]). Менее чем у 10% людей с цирротической АЖБП развивается ГЦК, но у вплоть до около 45% людей с НАСГ без цирроза может развиваться ГЦК. ГЦК является наиболее распространенным типом первичного рака печени у взрослых и возникает при хроническом воспалении печени. НАЖБП характеризуется ожирением печени, которая возникает, когда жир, в частности свободные жирные кислоты и триглицериды, накапливается в клетках печени (стеатоз печени) из-за причин, помимо чрезмерного потребления алкоголя, таких как перегрузка питательными веществами, высокое потребление калорий и метаболическая дисфункция (например, дислипидемия и нарушение контроля глюкозы). Ожирение печени может сохраняться, не нарушая функции печени, но ожирение печени может прогрессировать, превращаясь в НАСГ, состояние, при котором стеатоз сопровождается воспалением, вздутием гепатоцитов и повреждением клеток с фиброзом или без фиброза печени. Фиброз является самым сильным предиктором смертности от НАСГ. НАЖБП может

характеризоваться только стеатозом; стеатозом с лобулярным или портальным воспалением, но без вздутия; стеатозом с вздутием, но без воспаления или стеатозом с воспалением и вздутием. НАСГ - это самая экстремальная форма НАЖБП. НАСГ представляет собой прогрессирующее заболевание, приблизительно у 20% пациентов развивается цирроз печени и около 10% умирает от заболевания печени, такого как цирроз или рак печени (например, ГЦК). НАЖБП является наиболее распространенным заболеванием печени в развитых странах, и предполагается, что НАСГ вытеснит гепатит С как основную причину пересадки печени в США к 2020 году. Около 12-25% жителей США имеют НАЖБП, причем НАСГ затрагивает около 2-5% людей в США. НАЖБП, в том числе НАСГ, связана с инсулинорезистентностью, ожирением и метаболическим синдромом. Например, инсулинорезистентность способствует прогрессированию жировой дистрофии печени, воспалению и фиброзу печени и, следовательно, НАСГ. Кроме того, ожирение стимулирует и усугубляет НАСГ, а потеря массы может облегчить НАСГ. Поэтому описанные в данной заявке пептидные продукты, включая агонисты рецептора ГПП-1 (РГПП-1), агонисты рецептора глюкагона (РГКГ) и двойные агонисты РГПП-1/РГКГ, можно использовать для лечения НАЖБП, включая НАСГ. В некоторых воплощениях пептидные продукты двойного агониста, используемые для лечения состояния, связанного с инсулинорезистентностью и/или ожирением, описанного в настоящем изобретении, такого как НАЖБП (например, НАСГ) или СПКЯ, выбирают из пептидных продуктов двойного агониста SEQ ID NO:1-10 или 12-27, и/или их производных, и их фармацевтически приемлемых солей.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения пептид(ы) двойного агониста по настоящему изобретению можно использовать для контроля уровня глюкозы в крови с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов (т.е. неожиданных явлений, которые отрицательно влияют на благополучие пациента и/или животного) по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, семаглутидом). Примеры неограничивающих побочных эффектов могут включать тошноту, рвоту, диарею, боль в животе и/или запор. Побочные эффекты могут также включать любые известные специалистам в данной области, такие как явления, перечисленные в отраслевых ресурсах и/или иным образом известные специалистам в данной области (см., например, Медицинский словарь регуляторной деятельности (MedDRA) (см. Pharm., Med. Transl. Med. 2018) и/или Clark, M. J. Biomed. Inf., 54, April 2015, pp. 167-173). Такие нежелательные явления можно определить у человека с помощью стандартных методов, которые обычно используются в клинических испытаниях (например, посещение врача, опросы/анкетирование). По сравнению с

частотой и/или тяжестью такого нежелательного явления, возникающего при введении субъекту агониста с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, семаглутида), пептиды двойного агониста по настоящему изобретению (например, любой пептид с последовательностями SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 или с их производными) может снизить такую частоту и/или тяжесть, например, на 20%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и выше (до 100%). В некоторых воплощениях пептиды двойного агониста по данному описанию (например, с любой из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 или их производными) не вызывают побочных эффектов.

Настоящий пептидный продукт двойного агониста можно вводить любым подходящим путем для лечения описанного в данной заявке состояния. Потенциальные пути введения пептидного продукта включают, без ограничения указанным, пероральный, парентеральный (включая внутрикожный, подкожный, внутримышечный, внутрисосудистый, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, внутриполостной и местный) и локальный (включая чрескожный, чресслизистый, интраназальный (например, с помощью назального спрея или капель), глазной (например, с помощью глазных капель), легочный (например, с помощью пероральной или назальной ингаляции), трансбуккальный, подъязычный, ректальный (например, с помощью суппозитория) и вагинальный (например, с помощью суппозитория)). В некоторых воплощениях пептидный продукт вводят парентерально, например подкожно, внутривенно или внутримышечно. В других воплощениях пептидный продукт вводят путем пероральной ингаляции или назальной ингаляции или инфузии. Терапевтически эффективное количество и частота введения и продолжительность лечения пептидным продуктом для терапии состояния, раскрытого в данной заявке, могут зависеть от различных факторов, включая природу и тяжесть состояния, активность соединения, путь введения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион субъекта и реакции субъекта на лечение, и может быть определен лечащим врачом. В некоторых воплощениях пептидный продукт вводят парентерально (например, подкожно (п/к), внутривенно (в/в) или внутримышечно (в/м)) в дозе от около 0,01 мг до около 0,1, 1, 5 или 10 мг или около 0,1-0,1 мг. 1 мг или 1-27 мг в течение около одной недели для лечения описанного в данной заявке состояния (например, состояния, связанного с резистентностью к инсулину и/или ожирением, таким как НАСГ или СПКЯ). В других воплощениях пептидный продукт вводят парентерально (например, подкожно, внутривенно или внутримышечно) в дозе около 0,1-0,5 мг, 0,5-1 мг, 1-5 мг или 5-10 мг в течение периода около одной недели. В некоторых воплощениях пептидный продукт вводят парентерально (например, подкожно (п/к), внутривенно (в/в) или внутримышечно

(в/м)) в дозе около 0,1-1 мг, или около 0,1-0,5 мг, или 0,5-1 мг, в течение около одной недели. Специалисту в данной области техники понятно, что эффективная доза для мыши или другой доклинической животной модели может быть экстраполирована на человека. Таким образом, посредством аллометрического масштабирования (также называемого биологическим масштабированием) эквивалентная доза для более крупного животного может быть выведена из дозы для мыши на основе массы тела или площади поверхности тела животного.

Пептидный продукт можно вводить с любой подходящей частотой для лечения состояния, раскрытого в данной заявке (например, состояния, связанного с инсулинорезистентностью и/или ожирением, такого как НАСГ или СПКЯ). В некоторых воплощениях пептидный продукт двойного агониста вводят, например, подкожно или внутривенно один раз в день, один раз каждые два дня, один раз каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю или один раз каждые две недели. В некоторых воплощениях пептидный продукт вводят, например, подкожно, внутривенно или внутримышечно один раз в неделю. Пептидный продукт двойного агониста можно вводить в любое удобное для пациента время суток. Пептидный продукт двойного агониста можно принимать, по существу, во время еды (например, во время еды или в течение приблизительно 1 часа или 30 минут до или после еды) или, по существу, без еды (например, по меньшей мере приблизительно за 1 или 2 часа до или после еды). Продолжительность лечения медицинского состояния пептидным продуктом двойного агониста может основываться, например, на природе и серьезности состояния и реакции субъекта на лечение, и может определяться лечащим врачом. В некоторых воплощениях пептидный продукт двойного агониста вводят постоянно для лечения состояния, описанного в настоящей заявке, например, по меньшей мере около 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 3 года, 5 лет, 10 лет или дольше. Пептидный продукт двойного агониста также может приниматься пропорционально (при необходимости) до тех пор, пока не исчезнут клинические проявления состояния или не будут достигнуты клинические цели, такие как уровень глюкозы в крови, артериальное давление, уровень липидов в крови, масса тела или индекс массы тела, соотношение окружностей талии и бедер или процентное содержание телесного жира или любая их комбинация. Если клинические проявления состояния вновь появляются или клинические цели не поддерживаются, введение пептидного продукта двойного агониста может возобновиться. В изобретении предлагается способ лечения медицинского состояния, описанного в данной заявке, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества пептидного продукта, описанного в настоящей заявке, или его

фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей его. Изобретение дополнительно обеспечивает пептидный продукт, описанный в данной заявке, или его фармацевтически приемлемую соль, или композицию, содержащую его, для применения в качестве лекарственного средства. Кроме того, изобретение предусматривает использование описанного в данной заявке пептидного продукта или его фармацевтически приемлемой соли при приготовлении лекарственного средства. Лекарственное средство, содержащее пептидный продукт, может быть использовано для лечения любого медицинского состояния, описанного в данной заявке. Пептидный продукт необязательно можно использовать в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.

Описанный в данной заявке пептидный продукт двойного агониста необязательно можно использовать в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами для лечения любого расстройства, раскрытого в настоящей заявке, такого как инсулинорезистентность, диабет, ожирение, метаболический синдром или сердечно-сосудистое заболевание, или любого состояния, связанного с ним, например, НАСГ или СПКЯ. В некоторых воплощениях один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбирают из антидиабетических агентов, агентов против ожирения (включая липидснижающие агенты и агенты для устранения сытости), антиатеросклеротических агентов, противовоспалительных агентов, антиоксидантов, антифиброзных агентов, антигипертензивных агентов и их комбинаций. Противодиабетические средства включают, без ограничения: агонисты АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), включая бигуаниды (например, буформин и метформин); агонисты гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (АППР- γ), включая тиазолидиндионы (например, балаглитазон, циглитазон, дарглитазон, энглитазон, лобеглитазон, нетоглитазон, пиоглитазон, ривоглитазон, розиглитазон и троглитазон), MSDC-0602K и сароглитазар (двойной агонист АППР- α/γ); агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), включая эксендин-4, альбиглутид, дулаглутид, эксенатид, лираглутид, ликсисенатид, семаглутид, таспоглутид, CNT0736, CNT03649, HM11260C (LAPS-эксендин), NN9926 (OG9S7GT), TT401 и ZYOG1; ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (ДПП-4), включая алоглиптин, анаглиптин, дутоглиптин, эвоглиптин, гемиглиптин, госоглиптин, линаглиптин, омариглиптин, саксаглиптин, септаглиптин, ситаглиптин, тенелиглиптин, трелаглиптин и вилдаглиптин; ингибиторы натрий-глюкозного транспортного пептида 2 (НГТП2), включая канаглифлозин (также ингибирует НГТП1), дапаглифлозин, эмпаглифлозин, эртуглифлозин, ипраглифлозин, лусеоглифлозин, ремоглифлозин этабонат, сотаглифлозин

(также ингибирует НГТП1) и тофоглифлозин; блокаторы АТФ-зависимых K⁺ (КАТФ) каналов на бета-клетках поджелудочной железы, в том числе неглитинида (например, митиглинид, натеглинид и репаггинид) и сульфонилмочевины (включая первое поколение (например, ацетогексамид, карбутамид, хлорпропамид, глицикламид [толгексамид], метагексамид, толазамид и толбутамид) и второго поколения (например, глибенкламид, глибурид, глиборнурид, гликлазид, глимепирид, глипизид, гликвидон, глизоксепид и гликопирамид); инсулин и его аналоги, включая инсулин быстрого действия (например, инсулин аспари, инсулин глулизин и инсулин лизпро), инсулин среднего действия (например, инсулин НРН) и инсулин длительного действия (например, инсулин деглудек, инсулин детемир и инсулин гларгин) и/или их аналоги, производные и соли. В некоторых воплощениях антидиабетический агент представляет собой или включает бигуанид (например, метформин), тиазолидиндион (например, пиоглитазон или росиглитазон) или ингибитор НГТП2 (например, эмпаглифлозин или тофоглифлозин) или любую их комбинацию. Агенты против ожирения включают, без ограничения указанным: средства, подавляющие аппетит (аноректики), включая амфетамин, дексамфетамин, амфепрамон, клобензорекс, мазиндол, фентермин (с топираматом или без него) и лоркасерин; агенты, вызывающие чувство насыщения, включая цилиарный нейротрофический фактор (например, аксокин) и аналоги длительного действия амилина, кальцитонина, холецистокинина (ХЦК), ГПП-1, лептина, оксинтомодулина, панкреатического полипептида (ПП), пептида тирозин-тирозин (ПТТ) и нейропептида тирозин (НПТ); ингибиторы липазы, включая каулерпенин, цетилистат, эбелактон А и В, эстерастин, липстатин, орлистат, перцихинин, панкицин А-Е, валилактон и вибралактон; антигиперлипидемические агенты; и их аналоги, производные и соли. Антигиперлипидемические средства включают, помимо прочего: ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, включая статины (например, аторвастатин, церивастатин, флувастатин, мевастатин, монаколины (например, монаколин К (ловастатин), питавастатин, правастатин, розувастатин и симвастатин) и флаваноны (например, нарингенин) ингибиторы скваленсинтазы, включая лапаквистат, сарагозиновую кислоту и RPR-107393; ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы (АКК), включая антоцианы, авенациолиды, хлорацетилованный биотин, циклодим, диклофоп, галоксифоп, сорафены (например, сорафен Ала), 5-(тетрадецилокси)-2-фуранкарбоновую кислоту (ТОФУ), CP-640186, GS-0976, NDI-010976; 7-(4-пропилоксибензилэтил)-3,3-диметил-3,4-дигидро-2H-бензо[b][1,4]диоксепин; N-этил-N'-(3-{[4-(3,3-диметил-1-оксо-2-окса-7-азаспиро[4.5]дец-7-ил)пиперидин-1-ил]-карбонил}-1-бензотиен-2-ил)мочевину, 5-(3-ацетамидобут-1-инил)-2-(4-пропилоксифеноксиг)тиазол и 1-(3-{[4-(3,3-диметил-1-оксо-2-окса-7-

азаспиро[4.5]дец-7-ил)пиперидин-1-ил]карбонил}-5-(пиридин-2-ил)-2-тиенил)-3-этилмочевину; агонисты АППР- α , в том числе фибраты (например, безафибрат, ципрофибрат, клинофибрат, клофибриновая кислота, клофибрат, клофибрат алюминия [альфибрат], клофибрид, этофибрат, фенофибриновая кислота, фенофибрат, гемфиброзил, ронифибрат и симфибрат), изофлавоны (например, даидзеин и генистеин) и перфторалкановые кислоты (например, перфтороктановая кислота и перфторнонановая кислота); агонисты АППР- δ , включая элафибранор (двойной агонист АППР- α/γ), GFT505 (двойной агонист АППР- α/γ), GW0742, GW501516 (двойной агонист АППР- β/δ), содельглитазар (GW677954), MBX-8025 и изофлавоны (например, даидзеин и генистеин); агонисты АППР- γ , включая тиазолидиндионы (см. выше), сароглитазар (двойной агонист АППР- α/γ), 4-оксо-2-тиоксотиазолины (например, роданин), берберин, гонокиол, перфторнонановую кислоту, циклопентенон, простагландины (например, циклопентенон 15)-дезоксиде-А-простагландин J2 [15d-PGJ2]) и изофлавоны (например, даидзеин и генистеин); агонисты печёночного рецептора X (ПРХ), включая эндогенные лиганды (например, оксистеролы, такие как 22(i?)-гидроксистерин, 24(A)-гидроксистерин, 27-гидроксистерин и холестеновая кислота) и синтетические агонисты (например, ацетил-подокарпиновый димер, гипохоламид, А (X-диметил-3- β -гидрокси-холенамид [ДМГХА], GW3965 и T0901317); агонисты ретиноидного X-рецептора (PXR), включая эндогенные лиганды (например, 9-цис-ретиноевую кислоту) и синтетические агонисты (например, бексаротен, AGN 191659, AGN 191701, AGN 192849, BMS649, LG100268, LG100754 и LGD346); ингибиторы ацил-КоА-холестерин-ацилтрансферазы (АХАТ, также называемой стерол-О-ацилтрансферазой [COAT], включая АХАТ1 [COAT1] и АХАТ2, [COAT2]), включая авасимиб, пактимиб, пеллиторин, терпендол С и флаваноны (например, нарингенин); ингибиторы активности или экспрессии стеароил-КоА-десатуразы-1 (СКД-1, называемой также же стеароил-КоА-дельта-9-десатуразой), включая арамхол, CAU-10566, CVT-11127, SAR-224, SAR-707, XEN-103, 3-(2-гидроксиэтокси)-4-метокси-N-[5-(3-трифторметангилбензил)тиазол-2-ил]бензамид и 4-этиламино-3-(2-гидроксиэтокси)-N-[5-(3-трифторметилбензил)тиазол-2-ил]бензамид; 1'-{6-[5-(пиридин-3-илметил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил]пиридазин-3-ил}-5-(трифторметил)-3,4-дигидроспиро[хромен-2,4'-пиперидин]; 5-фтор-1'-{6-[5-(пиридин-3-илметил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил]пиридазин-3-ил}-3,4-дигидроспиро[хромен-2,4'-пиперидин]; 6-[5-(циклопропилметил)-4,5-дигидро-1'H,3H-спиро[1,5-бензоксазепин-2,4'-пиперидин]-1'-ил]-N-(2-гидрокси-2-пиридин-3-илэтил)пиридазин-3-карбоксамид; (2-гидрокси-2-пиридин-3-илэтил)амид 6-[4-(2-метилбензоил)пиперидин-1-ил]пиридазин-3-карбоновой кислоты; 4-(2-хлорфенокси)-N-[3-(метилкарбамоил)фенил]пиперидин-1-карбоксамид; цис-9, транс-11

изомер и транс-10, цис-12 изомер конъюгированной линолевой кислоты, замещенные гетероароматические соединения, раскрытые в WO 2009/129625 A1, антисмысловые полинуклеотиды и пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), нацеленные на мРНК СКД-1 и миРНК, нацеленные на СКД-1; ингибиторы белка-переносчика сложных эфиров холестерина (БПСЭХ), включая анацетрапиб, далцетрапиб, эвацетрапиб, торцетрапиб и AMG 899 (ТА-8995); ингибиторы активности или экспрессии микросомального белка-переносчика триглицеридов (МБПТ), включая имплитапид, ломитапид, дирлотапид, митратапид, СР-346086, JTT-130, SLx-4090, антисмысловые полинуклеотиды и ПНК, которые нацелены на мРНК МБПТ, микроРНК, нацеленные на МБПТ (например, miRNA-30c) и миРНК, нацеленные на МБПТ; агонисты рецептора ГПП-1; фактор роста фибробластов 21 (ФРФ21) и его аналоги и производные, включая BMS-986036 (ПЭГилированный FGF21); ингибиторы активности или экспрессии пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (ПКСК9), включая берберин (снижает уровень ПКСК9), аннексин А2 (ингибирует активность ПКСК9), антитела к ПКСК9 (например, алирокумаб, бокоцизумаб, элокумаб, LGT-209, LY3015014 и RG7652), пептиды, которые имитируют домен эпидермального фактора роста-А (ЭФР-А) рецептора ЛППП, который связывается с ПКСК9, ПКСК9-связывающие аднектины (например, BMS-962476), антисмысловые полинуклеотиды и ПНК, нацеленные на мРНК ПКСК9 и и миРНК, нацеленные на ПКСК9 (например, инклизиран [ALN-PCS] и ALN-PCS02); пептиды-миметики аполипопротеина, включая миметики апоА-I (например, 2F, 3F, 3F-1, 3F-2, 3F-14, 4F, 4F-P-4F, 4F-IHS-4F, 4F2, 5F, 6F, 7F, 18F, 5A, 5A-C1, 5A-CH1, 5A-CH2, 5A-H1, 18 A, 37pA [18A-P-18A], ELK, ELK-1A, ELK-1F, ELK-1K1A1E, ELK-1L1K, ELK-1W, ELK-2A, ELK-2A2K2E, ELK-2E2K, ELK-2F, ELK-3 E3EK, ELK-3E3K3A, ELK-3E3LK, ELK-PA, ELK-P2A, ELKA, ELKA-CH2, ATI-5261, CS-6253, ETC-642, FAMP, FREL и KRES) и миметики апоЕ (например, Ac-hE18A-NH2, AEM-28, Ac-[R]hE1 8 A-NH2, AEM-28-14, EpK, hEp, mR18L, COG-112, COG-133 и COG-1410); омега-3 жирные кислоты, включая докозагексаеновую кислоту (ДГК), докозапентаеновую кислоту (ДПК), эйкозапентаеновую кислоту (ЭПК), а-линоленовую кислоту (АЛК), рыбий жир (который содержит, например, ДГК и ЭПК) и их сложные эфиры (например, глицеридовые и этиловые эфиры) и их аналоги, производные и соли. В некоторых воплощениях агент против ожирения представляет собой или включает ингибитор липазы (например, орлистат) или/и антигиперлипидемический агент (например, статин, такой как аторвастатин, и/или фибрат, такой как фенофибрат). Антигипертензивные агенты включают, без ограничения указанным: антагонисты ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), включая ингибиторы ренина (например, алискирен), ингибиторы

ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (например, беназеприл, каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, мозексиприл, периндоприл, квинаприл, рамиприл и трандолаприл), антагонисты рецепторов ангиотензина II типа 1 (АТII) (например, азилсартан, кандесартан, эпросартан, фимасартан, ирбесартан, лозартан, олмесартан медоксомил, олмесартан, телмисартан и валсартан) и антагонисты рецепторов альдостерона (например, эплеренон и спиронолактон); диуретики, включая петлевые диуретики (например, буметанид, этакриновая кислота, фуросемид и торасемид), тиазидные диуретики (например, бендрофлуметиазид, хлортиазид, гидрохлортиазид, эпитизид, метиклотиазид и политиазид), тиазидоподобные диуретики (например, хлорталидон, индапамид и метолазон), циклетанин (ранний дистальный канальцевый диуретик), калийсберегающие диуретики (например, амилорид, эплеренон, спиронолактон и триамтерен) и теобромин; блокаторы кальциевых каналов, включая дигидропиридины (например, амлодипин, левамлодипин, цилнидипин, клевидипин, фелодипин, исрадипин, лерканидипин, никардипин, нифедипин, нимодипин, нисолдипин и нитрендипин) и недигидропиридины (например, дилтиазем и верапамил); агонисты α_2 -адренорецепторов, включая клонидин, гуанабенз, гуанфацин, метилдопу и моксонидин; антагонисты α_1 -адренорецепторов (альфа-блокаторы), включая доксазозин, индорамин, ницерголин, феноксифензамин, фентоламин, празозин, теразозин и толазолин; антагонисты β -адренорецепторов (β_1 или/и β_2) (бета-блокаторы), включая атенолол, бетаксоллол, бисопролол, картеолол, карведилол, лабеталол, метопролол, надолол, небиволол, окспренолол, пенбутолол, пиндоллол, пропранолол и тимолол; смешанные альфа/бета-блокаторы, включая буциндолол, карведилол и лабеталол; антагонисты рецептора эндотелина, включая селективные антагонисты рецептора эндотелина типа А (ЭТА) (например, амбризентан, атрасентан, эдонентан, ситаксентан, зиботентан и BQ-123) и двойные антагонисты ЭТА/ЭТВ (например, бозентан, мацитентан и тезосентан); другие сосудорасширяющие средства, в том числе гидралазин, миноксидил, теобромин, нитропруссид натрия, органические нитраты (например, изосорбида моонитрат, изосорбида динитрат и нитроглицерин, которые в организме превращаются в оксид азота), стимуляторы эндотелиальной синтазы оксида азота (ЭСОА) (например, циклетанин) активаторы растворимой гуанилатциклазы (например, цинацигуат и риоцигуат), ингибиторы фосфодиэстеразы типа 5 (ФДЭ-5) (например, аванафил, бензамиденафил, дасантафил, динафил, лоденафил, мироденафил, силденафил, тадалафил, уденафил, варденафил, дипиридамомл, папаверин, пропентофиллин, запринаст и T-1032), простагландин E₁ (алпростадил) и его аналоги (например, лимапрост и мизопростол), простагландин E₂ (бераппрост) и его аналоги (например, атапрост, бераппрост [например, эсуберапрост],

5,6,7-тринор-4,8 -интер-w-фенилен-9-фтор-PG12, карбациклин, изокарбациклин, клинпрост, ципростен, эпталопрост, цикапрост, илопрост, пимилпрост, SM-10906 (дезметил пимилпрост), наксапростен, тапростен, трепростинил, CS -570, OP-2507 и TY-11223), непростаноидные агонисты рецепторов простаглицина (например, L-фалазинол, ралинепаг, селексипаг, АСТ-333679 [MRE-269, активный метаболит селексипага] и TRA-418), ингибиторы фосфолипазы С (ФЛС) и ингибиторы протеинкиназы С (ПКС) (например, В1М-1, В1М-2, В1М-3, В1М-8, хелеритрин, циклетанин, госсипол, миябенол С, мирицитрин, рубоксистаурин и вербаскозид; минеральные вещества, включая магний и сульфат магния; и их аналоги, производные и соли. В некоторых воплощениях антигипертензивное средство представляет собой или включает тиазид или тиазидоподобный диуретик (например, гидрохлоротиазид или хлорталидон), блокатор кальциевых каналов (например, амлодипин или нифедипин), ингибитор АПФ (например, беназеприл, каптоприл или периндоприл) или антагонист рецептора ангиотензина II (например, олмесартана медоксомил, олмесартан, телмисартан или валсартан) или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях пептидный продукт, описанный в настоящем документе, используют в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами для лечения НАЖБП, например, НАСГ. В некоторых воплощениях один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбирают из антидиабетических агентов, агентов против ожирения, противовоспалительных агентов, антифиброзных агентов, антиоксидантов, антигипертензивных агентов и их комбинаций. Терапевтические агенты, которые можно использовать для лечения НАЖБП (например, НАСГ), включают, помимо прочего: агонисты АППР, включая агонисты АППР- δ (например, MBX-8025, элафибранор [двойной агонист АППР- α/δ] и GW501516 [двойной агонист АППР- β/δ]) и агонисты АППР- γ (например, тиазолидиндионы, такие как пиоглитазон и сароглитазар [двойной агонист АППР- α/γ]) - агонист АППР- δ и - γ повышает чувствительность к инсулину, агонист АППР- α уменьшает стеатоз печени и агонист АППР- δ ингибирует активацию макрофагов и клеток Купфера; агонисты фарнезоидного X-рецептора (ФХР), такие как обетихолева кислота, и нестероидные агонисты ФХР, такие как GS-9674, снижают глюконеогенез печени, липогенез, стеатоз и фиброз; фактор роста фибробластов 19 (ФРФ19) и его аналоги и производные, такие как аналоги NGM-282-FGF19, снижают глюконеогенез и стеатоз печени; фактор роста фибробластов 21 (ФРФ21) и его аналоги и производные, такие как BMS-986036 (ПЭГ-илированный ФРФ21) - аналоги ФРФ21 уменьшают стеатоз печени, повреждение клеток и фиброз; ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы), включая статины (например, розувастатин) - статины уменьшают

стеатогепатит и фиброз; ингибиторы АПФ, такие как NDI-010976 (воздействуют на печень) и GS-0976 - ингибиторы АПФ снижают липогенез de novo и стеатоз печени; Ингибиторы СКД-1, такие как арамхол - ингибиторы СКД-1 уменьшают стеатоз печени и повышают чувствительность к инсулину; ингибиторы НГТП2, такие как канаглифлозин, ипраглифлозин и лузеоглифлозин - ингибиторы НГТП2 снижают массу тела, уровень АЛТ в печени и фиброз; антагонисты хемокинового рецептора типа 2 и/или типа 5 (XP2 и/или XP5), такие как ценикривирок - антагонисты XP2 (связываются с лигандом хемокина типа 2 (LX2) [MXB1]) и антагонисты XP5 (связываются с лигандом хемокина типа 5 (LX5) [RANTES]) ингибируют активацию и миграцию воспалительных клеток (например, макрофагов) в печень и снижают фиброз печени; ингибиторы апоптоза, в том числе ингибиторы регулирующей сигнал апоптоза киназы 1 (РСАК1) (например, селонсертиб) и ингибиторы каспазы (например, эмрикасан [панкаспазный ингибитор]) - ингибиторы апоптоза уменьшают стеатоз и фиброз печени; ингибиторы лизил-подобной оксидазы типа 2 (ЛПО2), такие как симтузумаб – ЛПО2 является ключевым ферментом матрикса при образовании коллагена и в высокой степени экспрессируется в печени; ингибиторы галектина-3, такие как GR-MD-02 и TD139 - галектин-3 имеет решающее значение для развития фиброза печени; антиоксиданты, в том числе витамин Е (например, а-токоферол) и поглотители активных форм кислорода (АФК) и свободных радикалов (например, цистеамин, глутатион, мелатонин и пентоксифиллин [также противовоспалительные за счет ингибирования ФНО-а и фосфодиэстераз]) - витамин Е уменьшает стеатоз печени, баллонирование гепатоцитов и лобулярное воспаление; и их аналоги, производные и соли. В некоторых воплощениях пептидный продукт, описанный в настоящей заявке, используется в сочетании с агонистом АППР, например, агонистом АППР- δ , таким как элафибранор или/и агонист АППР- γ , таким как пиоглитазон), ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы (например, статин, такой как розувастатин), агонист ФХР (например, обетихоловая кислота) или антиоксидантом (например, витамин Е) или любой их комбинацией, для лечения НАЖБП (например, НАСГ). В определенных воплощениях один или несколько дополнительных терапевтических агентов для лечения НАЖБП (например, НАСГ) представляют собой или включают витамин Е и/или пиоглитазон. Другие комбинации также могут быть использованы, как это будет понятно специалистам в данной области техники.

Фармакокинетические («ФК») параметры можно оценить с помощью Phoenix® WinNonlin® версии 8.1 или выше (Certara USA, Inc., Принстон, Нью-Джерси). Для оценки параметров можно использовать некомпартментный подход, соответствующий внесосудистому пути введения. Для фармакокинетических расчетов можно использовать

данные о концентрации в плазме в зависимости от времени. В дополнение к оценкам параметров для отдельных животных, при необходимости можно определить описательную статистику (например, среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент вариации, медиана, минимум, максимум). Значения концентрации, которые ниже предела количественного определения, могут рассматриваться как нулевые для определения описательной статистики и фармакокинетического анализа. Встроенные значения концентрации, которые ниже предела количественного определения, могут быть исключены из фармакокинетического анализа. Все параметры могут быть получены из индивидуальных концентраций пептида двойного агониста (или его производных и/или метаболитов) в плазме в группах, обработанных тестируемым изделием, в день введения дозы (день 1). Параметры могут быть оценены с использованием номинальных уровней доз, если только не получены результаты анализа состава доз, не соответствующие спецификации, и в этом случае можно использовать фактические уровни доз. Параметры можно оценить, используя номинальное время выборки; если документально подтверждены отклонения при сборе биоаналитических образцов, можно использовать фактическое время отбора проб в соответствующих временных точках. Биоаналитические данные могут быть использованы в том виде, в каком они были получены для фармакокинетического анализа, и могут быть представлены в таблицах и фигурах в предусмотренных единицах. Фармакокинетические параметры могут быть рассчитаны и представлены в единицах, предоставленных аналитической лабораторией (порядок величины может быть скорректирован соответствующим образом для представления в отчете, например, ч*нг/мл, преобразованные в ч*мкг/мл). Описательная статистика (например, среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент вариации, медиана, минимум, максимум) и фармакокинетические параметры могут быть определены с точностью до трех значащих цифр, если это необходимо. При необходимости можно документировать дополнительные элементы обработки данных. Подлежащие определению ФК-параметры, если позволяют данные, могут включать, без ограничения указанным, следующее: C_{max} : максимальная наблюдаемая концентрация; $DN C_{max}$: нормированная доза максимальная концентрация, рассчитанная как $C_{max}/\text{доза}$; T_{max} : время максимальной наблюдаемой концентрации; AUC_{0-t} : площадь под кривой от момента времени 0 до момента последней измеряемой концентрации, рассчитанная с использованием линейного правила трапеций; AUC_{0-96} : площадь под кривой от 0 до 96 часов, рассчитанная с использованием линейного правила трапеций; $DN AUC_{0-96}$: нормализованная доза AUC_{0-96} , рассчитанная как $AUC_{0-96}/\text{доза}$; $AUC_{0-\infty}$: площадь под кривой от момента времени 0 до бесконечности (только день 1), рассчитанная как $AUC_{0-\infty}$

$= AUC_{0-t} + C_t/\lambda_z$, где C_t — последняя наблюдаемая концентрация, поддающаяся количественному определению, а λ_z — константа скорости элиминации; $t_{1/2}$: период полувыведения, рассчитанный как $\ln(2)/\lambda_z$. Дополнительные параметры и сравнения (например, соотношение полов, отношения пропорциональности дозы и т. д.) также могут быть определены, как это будет понятно специалистам в данной области техники.

В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагается(ются) фармацевтический(ие) дозированный(ые) состав(ы), содержащий(ие) по меньшей мере один пептид двойного агониста с аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), где: пептид модифицирован гидрофобным поверхностно-активным веществом; дозировка подобрана так, чтобы контролировать уровень глюкозы в крови и/или индуцировать потерю массы, с уменьшением одного или нескольких нежелательных явлений по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, причем нежелательные явления выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боль в животе и запор при введении млекопитающему. В некоторых воплощениях пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27, или их производное, или их комбинацию. В некоторых воплощениях пептид двойного агониста имеет примерно одинаковую аффинность к РГПП-1 и РГКГ, и в еще более предпочтительных воплощениях пептид представляет собой SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях введение пептида двойного агониста млекопитающему по сравнению с введением приблизительно эквимоллярной дозы семаглутида приводит к: снижению уровня глюкозы в крови примерно через 48 или 96 часов после введения (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40 или 50%, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50%); снижение уровня глюкозы в крови примерно через 72 часа после введения (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 100%) и/или снижение уровня глюкозы в крови примерно через 120 часов после введения. В некоторых воплощениях введение пептида двойного агониста млекопитающему по сравнению с введением приблизительно эквимоллярной дозы семаглутида индуцирует снижение массы всего тела и/или снижение массы печени. В некоторых воплощениях введение пептида двойного агониста млекопитающему по сравнению с введением примерно эквимоллярной дозы семаглутида обеспечивает более низкую величину C_{max} (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50% ниже, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50% ниже); демонстрирует примерно равную или большую величину T_{max} (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100% больше, предпочтительно, по

меньшей мере, примерно на 100% больше); демонстрирует аналогичную $AUC_{(0-\infty)}$ (необязательно, по меньшей мере, примерно любую величину из 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%, предпочтительно, по меньшей мере, примерно 80-90%, в частности, примерно 85-93%); демонстрирует примерно равный или более высокий период полувыведения $T_{1/2}$ (ч) (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% выше, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50 или 75% выше, в частности, примерно на 50-75% выше); демонстрирует пролонгированное среднее время удержания (СВУ) (часы) (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40 или 50% более высокое, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 25% более высокое); проявляет длительный фармакокинетический/фармакодинамический профиль; проявляет равные или большие глюкорегуляторные эффекты; вызывает большую потерю массы всего тела, необязательно примерно в два раза; вызывает снижение жировой массы тела, необязательно примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 100%); и/или при введении для лечения НАСГ вызывает повышенное снижение массы всего тела, потерю массы печени, улучшение показателя NAS (шкала активности НАЖБП), улучшение гепатостеатоза, улучшение прекращения вздутия, улучшение окрашивания col1A1, улучшение АЛТ, улучшение ТГ/ОХ в печени и улучшение ТГ/ОХ в плазме. В некоторых воплощениях введение млекопитающему пептида двойного агониста по сравнению с введением приблизительно эквимолярной дозы семаглутида приводит к большей потере массы тела приблизительно через 14 дней после введения лекарственной формы (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, на 20, 30, 40 или 50% большей, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 15% большей) и/или большей потере массы тела приблизительно через 20-28 дней после введения лекарственной формы (необязательно, по меньшей мере, примерно на около 10, 20, 30, 40 или 50% большей, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 25% большей). В некоторых воплощениях введение млекопитающему пептида двойного агониста по сравнению с введением приблизительно эквимолярной дозы семаглутида приводит к потере массы тела млекопитающего с ожирением, достаточной для возвращения млекопитающему к нормальному диапазону массы нормального худощавого млекопитающего.

«Уменьшенные» нежелательные побочные эффекты или явления или «уменьшение» нежелательных побочных эффектов или явлений относится к уменьшению степени, продолжительности и/или частоты нежелательных побочных эффектов, проявляющихся у субъекта, и частоты их возникновения в группе субъектов после введения агониста с неполностью сбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ по

сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ. Такое снижение включает предотвращение некоторых нежелательных побочных эффектов, которые в противном случае возникли бы у субъекта в ответ на агонист с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ. Такое снижение также включает устранение нежелательных побочных эффектов, ранее испытываемых субъектом после введения агониста с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ. В некоторых воплощениях термин «уменьшение» или «уменьшение» нежелательных побочных эффектов или явлений включает их уменьшение со стороны желудочно-кишечного тракта, при этом нежелательные эффекты или явления снижаются до нуля или до неопределяемого уровня. В других воплощениях побочный эффект снижается до уровня, эквивалентного таковому у субъектов, не получавших лечение, но не устраняется полностью. Более того, введение млекопитающим аналогов с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 или РГКГ может привести к необходимости чрезмерно высокой дозы для максимальной активации рецептора с более слабой чувствительностью к лиганду, что может привести к превышению уровня биологически эффективной дозы для другого лиганда и вызывать дозозависимые нежелательные побочные эффекты.

В настоящем изобретении также предлагаются способы снижения и/или стабилизации уровня глюкозы в крови млекопитающего, причем способ включает введение фармацевтического дозированного состава, содержащего пептид двойного агониста SEQ ID NO: 1-10 или 12-27 (или их производное), предпочтительно пептид двойного агониста с примерно одинаковой аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (предпочтительно SEQ ID NO: 1), млекопитающему, при этом способ снижает частоту, или тяжесть одного из нескольких побочных явлений по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ (например, семаглутидом), при этом побочные явления выбирают из тошноты, рвоты, диареи, болей в животе и запоров при введении млекопитающему. В некоторых воплощениях такие способы, по сравнению со способом, при котором вводят приблизительно эквимолярную дозу семаглутида, приводят к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 48 или 96 часов после введения (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40 или 50%, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50%); снижению уровня глюкозы в крови примерно через 72 часа после введения (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 100%) и/или снижению уровня глюкозы в крови примерно через 120 часов после введения (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%,

предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 100%); индуцируют снижение массы всего тела и/или снижение массы печени; обеспечивают по сравнению с введением приблизительно эквимолярной дозы семаглутида более низкую величину S_{max} (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50% ниже, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50% ниже); обеспечивают примерно равную или большую величину T_{max} (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100% больше, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 100% больше); обеспечивают аналогичную $AUC(0-\infty)$ (необязательно, по меньшей мере, примерно любую величину из 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%, предпочтительно, по меньшей мере, примерно 80-90%, в частности, примерно 85-93%); обеспечивают примерно равный или более продолжительный период полувыведения $T_{1/2}$ (ч) (необязательно, по меньшей мере, примерно на любую величину из 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% более продолжительный, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 50 или 75% более продолжительный, в частности, примерно на 50-75% более продолжительный); обеспечивают пролонгированное среднее время удержания (СВУ) (часы) (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, 20, 30, 40 или 50% более длительное, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 25% более длительное); обеспечивают длительный фармакокинетический/фармакодинамический профиль; обеспечивают равные или большие глюкорегуляторные эффекты; индуцируют большее снижение массы всего тела, необязательно примерно в два раза; индуцируют снижение жировой массы тела (необязательно примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 100%); приводят к большему снижению массы тела приблизительно через 14 дней после введения лекарственной формы (необязательно, по меньшей мере, примерно на 10, на 20, 30, 40 или 50% большему, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 15% большему) и/или к большему снижению массы тела приблизительно через 20-28 дней после введения лекарственной формы (необязательно, по меньшей мере, примерно на около 10, 20, 30, 40 или 50% большему, предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 25% большему) и/или приводят к снижению массы тела млекопитающего с ожирением, достаточному для возвращения млекопитающему к стандартному диапазону массы нормального худощавого млекопитающего и/или, когда способы используются для лечения НАСГ, приводят к повышенному снижению массы всего тела, снижению массы печени, улучшению показателя ПАН (шкала активности НАЖБП), улучшению гепатостеатоза, улучшению прекращения вздутия, улучшению окрашивания col1A1, улучшению АЛТ, улучшению ТГ/ОХ в печени и улучшению ТГ/ОХ в плазме.

В некоторых воплощениях в данном изобретении предлагаются фармацевтические дозированные составы, содержащие продукт пептида-агониста (предпочтительно SEQ ID NO: 1) и около 0,025-0,075% (масс./масс.) полисорбата 20 (PS-20, Tween 20), около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде (pH $7,7 \pm 0,1$). В предпочтительных воплощениях фармацевтический дозированный состав представляет собой ALT-801, содержащий SEQ ID NO: 1, около 0,050 % (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,348 % (масс./масс.) аргинина и около 4,260 % (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде (pH $7,7 \pm 0,1$).

В некоторых воплощениях состав F58 (т.е. фармацевтический состав, содержащий ALT-801 в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ) может быть модифицирован для включения более высокой концентрации поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 20 (PS-20), для поддержания образования мицелл в составе. См. Пример 8. Эти результаты определяют минимальную концентрацию PS-20, которую следует использовать в диапазоне концентраций ALT-801 для достижения критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Концентрация PS-20 (т.е. 0,5 мг/мл) в составе F58 может быть повышена для достижения ККМ и предотвращения мутного вида (указывающего на более крупные агрегаты, осаждающиеся из раствора) раствора при хранении при $+2-8^{\circ}\text{C}$. Как показано в Примере 8 данной заявки, это может быть достигнуто путем модификации состава F58 для включения по меньшей мере около 0,66 мг PS-20 на мг пептида (предпочтительно SEQ ID NO: 1) для достижения ККМ. В некоторых воплощениях состав F58 может быть модифицирован для замены PS-20 полисорбатом 80 (PS-80, Tween 80) в количестве по меньшей мере около 1,03 мг полисорбата 80 (PS-80, Tween 80) на мг пептида (предпочтительно SEQ ID NO: 1) для достижения ККМ.

В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав содержит консервант. В некоторых воплощениях консерванты могут быть выбраны из метилпарабена, этилпарабена, пропилпарабена, бутилпарабена, бензилового спирта, хлорбутанола, фенола, метакрезола, хлоркрезола, бензойной кислоты, сорбиновой кислоты, тиомерсала, нитрата фенолртути, бронопола, пропиленгликоля, бензилкония хлорида или бензетония хлорида.

В некоторых воплощениях в данном изобретении предлагаются фармацевтические дозированные составы, приготовленные для введения млекопитающему продукта пептида-агониста (например, SEQ ID NO: 1) в количестве менее около 0,72 мг/кг/дозу, необязательно от около 0,001 до 0,72 мг/кг/дозу. В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав предназначен для введения млекопитающему

менее 0,36 мг/кг/дозу продукта пептида-агониста. В некоторых воплощениях способы включают введение от 0,001 до 0,3 мг/кг/дозу, необязательно около 0,007 мг/кг, или около 0,014 мг/кг, или около 0,03 мг/кг, или около 0,07 мг/кг, или около 0,18 мг/кг/дозу или около 0,25 мг/кг/дозу. В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав может быть приготовлен таким образом, чтобы вводить от около 0,05 до около 20 мг пептида-агониста в неделю, необязательно от 0,1 до около 10 мг в неделю, или необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю, или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю. В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав предназначен для введения млекопитающему один раз в неделю на срок вплоть до шести недель. В некоторых воплощениях в данном изобретении предлагаются фармацевтические дозированные составы, приготовленные таким образом, что время достижения терапевтической дозы составляет около четырех недель или менее. В некоторых воплощениях терапевтическая доза имеет значение C_{\max} от около 10 до около 2000 нг/мл; T_{\max} от около 10 до около 168 часов; и/или AUC_{0-168} от около 1000 до 100000 ч*нг/мл. В некоторых воплощениях ALT-801 можно вводить повторно для достижения концентрации в плазме от около 5 до 1000 нг/мл, или около 50 нг/мл, или около 150 нг/мл, или около 250 нг/мл, или около 500 нг/мл.

В некоторых воплощениях в данном изобретении предлагаются способы, описанные в настоящей заявке, которые включают введение млекопитающему продукта пептида-агониста в дозе менее чем около 0,72 мг/кг/дозу, необязательно от около 0,001 мг/кг/дозу до менее чем около 0,36 мг/кг/дозу или необязательно около 0,36 мг/кг/дозу. В предпочтительных воплощениях таких способов млекопитающему вводят менее чем около 0,36 мг/кг/дозу. В некоторых воплощениях каждую дозу вводят примерно один раз в неделю или один раз в две недели, необязательно в течение по меньшей мере одного месяца, необязательно, при этом каждая доза содержит примерно одинаковое количество продукта пептида-агониста. В некоторых воплощениях такие способы включают однократное введение около 0,72 мг/кг/дозу с последующим введением одной или нескольких последующих доз от около 0,001 мг/кг/дозу до около 0,36 мг/кг/дозу. В некоторых воплощениях способы включают введение 0,001-0,3 мг/кг/дозу, необязательно около 0,007 мг/кг, или около 0,014 мг/кг, или около 0,03 мг/кг, или около 0,07 мг/кг, или около 0,18 мг/кг/дозу или около 0,25 мг/кг/дозу. В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав может быть приготовлен таким образом, чтобы вводить от около 0,05 до около 20 мг в неделю, необязательно от 0,1 до около 10 мг в неделю, или необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю, или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю.

В предпочтительных воплощениях такие способы включают подкожное введение фармацевтического дозированного состава. В некоторых воплощениях такие способы, включающие введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава в количестве от около 0,03 до 0,25 мг/кг/дозу, обеспечивают значение C_{\max} от около 50 до около 1000 нг/мл, T_{\max} от около 10 до около 96 часов и/или AUC_{0-168} от около 5000 до 80000 ч*нг/мл. В некоторых таких способах время достижения терапевтической дозы составляет около четырех недель или меньше. В некоторых воплощениях терапевтическая доза имеет значение C_{\max} от около 50 до около 700 нг/мл, T_{\max} от около 10 до около 72 часов и/или AUC_{0-168} от около 6000 до 70000 ч*нг/мл.

В некоторых воплощениях способы, раскрытые в настоящей заявке, не включают фазу начала лечения. Другими словами, первая введенная доза является терапевтической без необходимости титрования во избежание побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта. Например, в некоторых воплощениях способ может включать введение одной первой дозы или нескольких первых доз (фаза начала лечения) пептида по настоящему изобретению, такого как SEQ ID NO: 1, с последующим введением одной второй или нескольких вторых и при этом более высоких доз пептида, причем каждую из первой и второй доз вводят в течение одной или более недель. В некоторых воплощениях за первой(ыми) дозой(ами) и второй(ыми) дозой(ами) может следовать одна или несколько третьих доз, которые могут быть выше, чем вторая(ые) доза(ы). Переход с первой дозы на вторую и третью дозы можно осуществлять еженедельно. Например, если выясняется, что первая доза не вызвала снижения уровня глюкозы в крови и/или снижения массы тела через одну или несколько недель, можно вводить вторую более высокую дозу в течение одной или нескольких недель с последующим анализом эффектов второй(ых) дозы(доз). Если наблюдаются положительные эффекты (например, снижение уровня глюкозы в крови и/или снижение массы тела), можно продолжать введение второй дозы. Если благоприятные эффекты не наблюдаются, третью дозу можно вводить в течение одной или нескольких недель с последующим определением благоприятных эффектов. Этот цикл дозирования и анализа можно повторять при необходимости при условии, что побочные явления не наблюдаются при каждой дозе. В некоторых воплощениях можно вводить последующие вторые одну или несколько более высоких доз пептида, поскольку гликемический контроль (например, снижение уровня глюкозы в крови) не достигается примерно через четыре недели после введения одной первой или нескольких первых доз. В некоторых воплощениях одну первую одну или несколько первых доз можно вводить без намерения вызвать терапевтический эффект (например, снижение уровня глюкозы в крови и/или снижение массы тела). Однако в некоторых

воплощениях способы могут осуществляться без включения фазы начала лечения.

В некоторых воплощениях способы могут представлять собой первую линию для контроля уровня глюкозы в крови и/или снижения массы тела человека, что означает, что они используют первый и единственный активный агент, вводимый пациенту с целью контроля уровня глюкозы в крови и/или снижения массы тела. В некоторых воплощениях раскрытые в данной заявке способы могут включать дополнительное лечение диетой и/или физические упражнения. В таких воплощениях человеку можно ввести фармацевтическую дозу и дать инструкции относительно диеты и/или физических упражнений, которые могут усилить благотворное действие фармацевтической дозы. В некоторых воплощениях человек, которому вводят фармацевтическую дозу, страдает сахарным диабетом 2 типа. В некоторых воплощениях у человека может быть диагностированное сердечно-сосудистое заболевание с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа или без него.

В некоторых воплощениях фармацевтическая доза вводится примерно раз в неделю. В некоторых воплощениях фармацевтическая доза вводится человеку примерно раз в неделю в течение от около 2 недель до около 8 недель или дольше. В некоторых воплощениях фармацевтическая доза, вводимая человеку в виде еженедельной дозы в течение от около 4 до около 8 недель, необязательно в течение около 6 недель, по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида, приводит к большей потере массы всего тела примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения человеку. В некоторых воплощениях фармацевтическая доза вводится примерно на 1, 8, 15, 22, 29 и 36 день. В некоторых воплощениях способы могут включать введение человеку разовой дозы по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения. В некоторых воплощениях способы могут включать введение человеку еженедельной дозы в течение от около 4 до около 8 недель, необязательно в течение около 6 недель, по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида, что приводит к большему снижению массы всего тела примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения. В некоторых воплощениях способы могут включать введение человеку однократной дозы по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы

семаглутида, обеспечивающей более низкое значение C_{\max} примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения. В некоторых воплощениях способы могут включать введение взрослому человеку фармацевтической дозы около 0,5 мг/дозу, около 1,0 мг/дозу, около 1,5 мг/дозу, около 2,0 мг/дозу, около 2,5 мг/дозу, около 3,0 мг/дозу, около 3,5 мг/дозу, около 4,0 мг/дозу, около 4,5 мг/дозу, около 5,0 мг/дозу или около 5,5 мг/дозу. В некоторых воплощениях фармацевтическую дозу можно вводить примерно один раз в неделю или один раз каждые две недели, необязательно в течение по меньшей мере одного месяца, необязательно, при этом каждая доза содержит приблизительно одинаковое количество продукта пептида-агониста. В некоторых воплощениях фармацевтическую дозу можно вводить подкожно. В некоторых воплощениях одну или несколько доз можно вводить первым путем (например, подкожно), а затем вводить другим путем (например, перорально). В некоторых воплощениях время достижения терапевтической дозы составляет около четырех недель или менее. В некоторых воплощениях введение фармацевтического дозированного состава характеризуется C_{\max} от около 400 до около 1300 нг/мл, T_{\max} от около 10 до около 36 часов и/или AUC_{0-48} от около 15000 до 45000 ч*нг/мл. В предпочтительных воплощениях снижение массы тела у человека составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%; или от около 1% до около 20%; или от около 5% до около 10% (масс./масс.). В некоторых воплощениях введение фармацевтически дозированного состава млекопитающему приводит к снижению массы тела млекопитающего с ожирением, достаточной для возвращения человека к стандартному диапазону массы нормального худощавого человека. В некоторых воплощениях введение состава человеку с индексом массы тела (ИМТ), указывающим на ожирение (например, около 30 или выше), приводит к снижению массы тела примерно на 5-20%, например, на около 15%, для соответствующего момента времени (например, после любой из около двух, четырех, восьми, 10, 20 или 30-100 недель, например, через любой период из около 50, 60 или 70 недель). В предпочтительных воплощениях снижение массы у таких людей значительна (например, $P < 0,001$, 95% доверительный интервал (ДИ)). В некоторых предпочтительных воплощениях введение состава человеку примерно в течение четырех недель приводит к снижению массы тела по меньшей мере на около 2-5%, а в некоторых воплощениях продолжается и/или стабилизируется до прекращения введения. В некоторых воплощениях, в дополнение к снижению массы тела, введение состава может также улучшать факторы сердечно-сосудистого риска, включая большее снижение окружности талии, ИМТ, систолического и диастолического артериального давления, HbA1c, уровня

глюкозы в плазме натощак, С-реактивного белка и/или уровней липидов натощак, а также, в некоторых воплощениях, показатели физического функционирования и качество жизни. В некоторых воплощениях фармацевтический дозированный состав представляет собой водную композицию, содержащую один или более из числа полисорбата 20, аргинина или маннитола.

Конкретные аспекты изобретения

Предпочтительные аспекты настоящего изобретения включают.

Фармацевтический дозированный состав, содержащий продукт пептид-агонист, обладающий аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептид модифицирован неионным гликолипидным поверхностно-активным веществом и дозировка подобрана таким образом, чтобы улучшить контроль уровня глюкозы в крови с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

Фармацевтический дозированный состав, содержащий пептид-агонист, обладающий аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептид модифицирован неионогенным гликолипидным поверхностно-активным веществом и дозировка подобрана таким образом, чтобы вызывать снижение массы тела с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении к млекопитающему.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что снижение массы тела составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, или от около 1% до около 20%, или от около 5% до около 10% (масс./масс.).

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что дозировка подобрана для еженедельного применения, необязательно для введения в течение от около 2 недель до около 8 недель.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что введение млекопитающему однократной дозы по сравнению с введением примерно эквимольной дозы семаглутида приводит к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно

через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что введение млекопитающему еженедельной дозы в течение от около 4 до около 8 недель, необязательно около 6 недель, по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида, приводит к увеличению снижения массы всего тела примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что введение млекопитающему однократной дозы по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида обеспечивает более низкое значение C_{\max} примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что пептид двойного агониста имеет примерно одинаковую аффинность к РГПП-1 и РГКГ, при этом указанный пептид двойного агониста необязательно представляет собой SEQ ID NO: 1.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой поверхностно-активное вещество класса 1-алкилгликозидов.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, который является водным составом, содержащим один или более из числа полисорбата 20, аргинина или маннитола.

Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что его введение млекопитающему по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида приводит к:

снижению уровня глюкозы в крови примерно через 48 или 96 часов после введения, необязательно при этом уровень глюкозы снижается на около 50%;

снижению уровня глюкозы в крови примерно через 72 часа после введения, необязательно при этом уровень глюкозы снижается на около 100%, и/или,

снижению уровня глюкозы в крови примерно через 120 часов после введения.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что:

a) введение фармацевтического состава млекопитающему:

вызывает снижение массы всего тела, и/или

вызывает снижение массы печени,

и/или

b) введение дозированного состава млекопитающему по сравнению с семаглутидом, вводимым примерно в эквимолярной дозе:

обеспечивает более низкое значение C_{max} , необязательно примерно на 50% ниже;

обеспечивает приблизительно равное или большее значение T_{max} , необязательно большее примерно на 100%;

обеспечивает аналогичную $AUC_{(0-\infty)}$, необязательно около 85-93%;

обеспечивает приблизительно равный или более продолжительный период полувыведения $T_{1/2}$ (ч), необязательно примерно на 25-75% более продолжительный;

обеспечивает пролонгированное среднее время удержания (СВУ) (ч), необязательно по меньшей мере на около 25% более длительное;

обеспечивает растянутый по времени фармакокинетический/фармакодинамический профиль;

обеспечивает примерно равные или более высокие глюкорегуляторные эффекты;

вызывает большее снижение массы всего тела, необязательно примерно в два раза;

вызывает снижение жировой массы тела, необязательно на около 50-100% и/или

при введении для лечения НАСГ вызывает повышенное снижение массы всего тела, снижение массы печени, улучшение показателя активности НАЖБП (ПАН), улучшение гепатостеатоза, снижение вздутия, улучшение окрашивания $collA1$, улучшение АЛТ, улучшение ТГ/ОХ в печени и улучшение ТГ/ОХ в плазме.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что его введение млекопитающему по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида приводит к большему снижению массы тела приблизительно через 14 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 15%, и/или приводит к большему снижению массы тела приблизительно через 20-28 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 25%.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что его введение млекопитающему

приводит к снижению массы тела млекопитающего с ожирением, достаточному для возвращения массы тела млекопитающего к диапазону стандартной массы худощавого нормального млекопитающего.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, выбранных из буфера или регулятора осмолярности.

Фармацевтический дозированный в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что концентрация пептида двойного агониста составляет от 0,05 до 20 мг/мл.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что концентрация пептида двойного агониста составляет от 0,1 до 10 мг/мл.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что рН пептида двойного агониста составляет от 6 до 10.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, содержащий около 0,025-0,15% (масс./масс.) полисорбата 20 или полисорбата 80, около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола в воде (рН $7,7 \pm 1,0$), необязательно около 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,35% (масс./масс.) аргинина, около 4,3% (масс./масс.) маннитола в воде (рН $7,7 \pm 1,0$).

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, содержащий около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола и от 0,6 до 1,0 мг полисорбата 20 или от 1,0 до 1,5 мг полисорбата 80 на мг ALT-801 (SEQ ID NO: 1) в воде (рН $7,7 \pm 1,0$).

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, приготовленный для введения млекопитающему от менее около 0,25 мг/кг/дозу, необязательно от более около 0,001 мг/кг/дозу до менее около 0,15 мг/кг/дозу продукта пептида-агониста.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, приготовленный для введения млекопитающему менее, чем 0,25 мг/кг/дозу

продукта пептида-агониста.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, приготовленный для введения в пределах 0,001-0,15 мг/кг/дозу, необязательно около 0,03 мг/кг/дозу или около 0,10 мг/кг/дозу продукта пептида-агониста.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, приготовленный для введения человеку от около 0,1 до около 15 мг в неделю, необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю продукта пептида-агониста.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, приготовленный для введения млекопитающему один раз в неделю в течение по меньшей мере шести или вплоть до шести недель.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, приготовленный таким образом, что время достижения терапевтической дозы составляет около четырех недель или менее.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что терапевтическая доза имеет значение C_{max} от около 10 до около 300 нг/мл, значение T_{max} от около 10 до около 36 часов и/или AUC_{0-168} от около 1000 до 100000 ч*нг/мл.

Способ снижения уровня глюкозы в крови млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава в соответствии с любым из предшествующих аспектов, причем указанный способ:

a) снижает частоту возникновения одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему;

b) по сравнению со способом, включающим введение примерно эквимольной дозы семаглутида, приводит к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 48 или 96 часов после введения приблизительно на 50%, к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 72 часа после введения приблизительно на 100% и/или к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 120 часов после введения;

c) обеспечивает снижение массы всего тела и/или снижение массы печени;

d) по сравнению со способом, включающим введение млекопитающему примерно эквимольной дозы семаглутида:

обеспечивает более низкое значение C_{max} , необязательно примерно на 50% ниже;

обеспечивает приблизительно равное или большее значение T_{max} , необязательно

большее примерно на 100%;

обеспечивает аналогичную $AUC_{(0-\infty)}$, необязательно около 85-93%;

обеспечивает приблизительно равный или более продолжительный период полувыведения $T_{1/2}$ (ч), необязательно примерно на 25-75% более продолжительный;

обеспечивает пролонгированное среднее время удержания (СВУ) (ч), необязательно по меньшей мере на около 25% более длительное;

обеспечивает растянутый по времени фармакокинетический/фармакодинамический профиль;

обеспечивает примерно равные или более высокие глюкорегуляторные эффекты;

вызывает большее снижение массы всего тела, необязательно примерно в два раза;

вызывает снижение жировой массы тела, необязательно примерно на 100% и/или

вызывает повышенное снижение массы всего тела, снижение массы печени, улучшение показателя активности НАЖБП (ПАН), улучшение гепатостеатоза, снижение вздутия, улучшение окрашивания col1A1, улучшение АЛТ, улучшение ТГ/ОХ в печени и улучшение ТГ/ОХ в плазме, когда способ используется для лечения НАСГ;

е) по сравнению со способом, включающим введение примерно эквимолярной дозы семаглутида, приводит к большему снижению массы тела примерно через 14 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 15%, и/или

к большему снижению массы тела примерно через 20-28 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 25%, и/или

f) приводит к снижению массы тела млекопитающего с ожирением, достаточному для возвращения массы тела млекопитающего к диапазону стандартной массы нормального худощавого млекопитающего.

Способ индуцирования снижения массы тела у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава в соответствии с любым из предшествующих аспектов, при этом способ снижает частоту возникновения одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

Способ в соответствии с предшествующими аспектами, отличающийся тем, что пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27.

Способ в соответствии с предшествующими аспектами, отличающийся тем, что пептид двойного агониста имеет примерно одинаковую аффинность к РГПП-1 и РГКГ, при этом указанный пептид двойного агониста необязательно представляет собой SEQ ID NO: 1.

Способ в соответствии с предшествующими аспектами, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят подкожно.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю в течение от около 2 недель до около 8 недель или дольше.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что введение фармацевтической дозы млекопитающему в виде еженедельной дозы в течение от около 4 до около 8 недель, необязательно около 6 недель, по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида обеспечивает большее снижение массы всего тела примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения млекопитающему.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, включающий введение млекопитающему продукта пептида-агониста в дозе менее около 0,25 мг/кг/дозу, необязательно от около 0,001 мг/кг/дозу до менее чем около 0,15 мг/кг/дозу.

Способ в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что млекопитающему вводят менее чем около 0,25 мг/кг/дозу.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, предназначенный для введения продукта пептида-агониста в количестве от 0,001 до 0,15 мг/кг/дозу, необязательно около 0,03 мг/кг/дозу или около 0,10 мг/кг/дозу.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что каждую дозу вводят примерно один раз в неделю или один раз в две недели, необязательно в течение по меньшей мере одного месяца и при этом необязательно каждая доза содержит приблизительно одинаковое количество продукта пептида-агониста.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, включающий однократное введение около менее 0,25 мг/кг/дозу с дальнейшим введением одной или нескольких последующих доз от около 0,03 мг/кг/дозу до около 0,10 мг/кг/дозу.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, включающий введение продукта пептида-агониста в количестве 0,001-0,15 мг/кг/дозу.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав содержит около 0,025-0,15% (масс./масс.) полисорбата 20 или полисорбата 80, около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6%

(масс./масс.) маннитола в воде (рН $7,7 \pm 1,0$), необязательно около 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,35% (масс./масс.) аргинина, около 4,3% (масс./масс.) маннитола в воде (рН $7,7 \pm 1,0$), где необязательно пептид двойного агониста представляет собой SEQ ID NO: 1.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что состав содержит около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола и от 0,6 до 1,0 мг полисорбата 20 или от 1,0 до 1,5 мг полисорбата 80 на мг ALT-801 (SEQ ID NO: 1) в воде (рН $7,7 \pm 1,0$).

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав приготовлен таким образом, чтобы обеспечить введение человеку от около 0,1 до около 15 мг в неделю, необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю.

Способ в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что время достижения терапевтической дозы составляет около четырех недель или меньше.

Фармацевтический дозированный состав, предназначенный для подкожного введения, содержащий продукт пептида-агониста с аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептидный продукт представлен как SEQ ID NO: 1 и дозировка подобрана таким образом, чтобы улучшить контроль уровня глюкозы в крови с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где нежелательные явления выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

Фармацевтический дозированный состав, предназначенный для подкожного введения, содержащий пептид-агонист с аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептидный продукт представлен как SEQ ID NO: 1 и дозировка подобрана таким образом, чтобы обеспечить снижение массы тела с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

Фармацевтический в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что снижение массы составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, или от около 1% до около 20%, или от около 5% до около 10% (масс./масс.).

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из

предшествующих аспектов, отличающийся тем, что доза представляет собой лекарственную форму для еженедельного применения, необязательно предназначенную для введения в течение от около 2 недель до около 8 недель.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что состав содержит около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола и от 0,6 до 1,0 мг полисорбата 20 или от 1,0 до 1,5 мг полисорбата 80 на мг ALT-801 (SEQ ID NO: 1) в воде (pH $7,7 \pm 1,0$).

Фармацевтический дозированный в соответствии с предшествующим аспектом, отличающийся тем, что введение млекопитающему однократной дозы по сравнению с введением примерно эквимоларной дозы семаглутида обеспечивает более низкое значение C_{\max} примерно через 1 день, примерно через 2 дня, примерно через 3 дня, примерно через 4 дня, примерно через 5 дней, примерно через 6 дней или примерно через 7 дней после введения.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что доза приготавливается таким образом, чтобы ввести человеку от около 0,1 до около 15 мг в неделю, необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, предназначенный для введения млекопитающему один раз в неделю в течение по меньшей мере или вплоть до шести недель.

Фармацевтический дозированный состав в соответствии с любым из предшествующих аспектов, отличающийся тем, что доза приготовлена таким образом, чтобы обеспечить достижение терапевтической дозы примерно через четыре недели или раньше после первого еженедельного введения.

Фармацевтический дозированный в соответствии с предыдущим аспектом, отличающийся тем, что терапевтическая доза имеет значение C_{\max} от около 10 до около 300 нг/мл, необязательно C_{\max} менее 200 нг/мл, значение T_{\max} от около 10 до около 36 часов и/или AUC_{0-168} от около 1000 до 100000 ч*нг/мл.

Способ индуцирования снижения массы тела у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава по любому из пунктов 48-57 формулы, при этом способ снижает частоту возникновения одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему в терапевтической дозе.

Способ в соответствии с предыдущим аспектом, отличающийся тем, что

фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю и при этом начальная доза представляет собой терапевтическую дозу.

Способ в соответствии с предыдущими аспектами, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю в течение от около 2 недель до около 8 недель или дольше.

Другие аспекты этого изобретения также рассматриваются, как будет понятно специалистам в данной области техники.

Если не указано иное или явно не указано иное при их использовании в настоящем описании, все технические и научные термины, приведенные в данной заявке, имеют такое же значение, как это обычно понимается специалистами в области техники, к которой относится настоящая заявка. Формы единственного числа в описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения следует рассматривать как охватывающие как единственное, так и множественное число. Используемое в данной заявке слово «другой» означает «второй» или более. Используемый в данной заявке термин «примерный» означает «служащий примером, образцом или иллюстрацией». Любое воплощение или признак, охарактеризованные в данной заявке как «примерный», не обязательно должен рассматриваться как предпочтительный или преимущественный по сравнению с другими воплощениями или признаками. В некоторых воплощениях термин «около» или «приблизительно» («примерно») означает величины в пределах 10% или 5% от указанного значения. Всякий раз, когда термин «около» или «приблизительно» предшествует первому числовому значению в серии из двух или более числовых значений или в серии из двух или более диапазонов числовых значений, термин «около» или «приблизительно» применяется к каждому из числовых значений в этой серии числовых значений или в этой серии диапазонов числовых значений. Диапазоны могут быть представлены в данной заявке от примерно одного конкретного значения и/или примерно до другого конкретного значения. Когда такой диапазон представлен, другой аспект включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Точно так же, когда значения выражены как приближения с использованием термина «около» или «приблизительно», будет понятно, что конкретное значение формирует другой аспект. Далее будет понятно, что конечные точки каждого из диапазонов являются значимыми как по отношению к другой конечной точке, так и независимо от другой конечной точки. Диапазоны (например, 90-100%) включают диапазон как таковой, а также каждое независимое значение в пределах диапазона, как если бы каждое значение было указано отдельно. Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что раскрытое впоследствии событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что

описание включает случаи, когда событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда они не происходят. Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в данном описании, включены в него в качестве ссылок во всей своей полноте так же, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны как включенные в описание в качестве ссылки.

Некоторые воплощения изобретения дополнительно описаны в следующих примерах. Эти воплощения представлены только в качестве иллюстраций и никоим образом не предназначены для ограничения объема формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Пептидный синтез

Существует множество стандартных защитных групп и связывающих агентов, которые можно успешно использовать для типичного синтеза пептидов на основе N-альфа-Fmoc. Типичные примеры перечислены в патенте США 9 856 306 B2, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. Дополнительные примеры можно найти во многих обзорах и протоколах, например, опубликованных и регулярно обновляемых в Интернете компанией Novabiochem, и более специализированных обзорах (например, Behrendt, R., et al. (2015) *J Peptide Sci* 22: 4-27 и ссылки в данном обзоре). Типичные коммерческие протоколы, используемые многими контрактными компаниями по синтезу пептидов, были применены для синтеза в настоящем изобретении. Более специализированные протоколы приведены ниже.

Получение аналогов C-концевых амидов – SEQ ID: NO. 1.

Образец Boc-His(Trt)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(tBu)-Glu*-Lys(ivDDE)-Ala-Ala-Lys*-Glu(tBu)-Phe-Ile-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Gln(Trt)-Thr(tBu)- на амидной смоле Ринка (SEQ ID NO:1) получали последовательным добавлением N-альфа-Fmoc-защищенных аминокислот, с использованием стандартных протоколов конденсации, например, конденсации диизопропилкарбодиимидом (ДИК)/гидроксибензотриазолом (ГБТ) с последующим стандартным снятием защиты с помощью пиперазина, связыванием на следующей стадии и т. д. (Glu* и Lys* указывают на циклическую лактамную связь боковой цепи, достигаемую за счет снятия защиты боковой цепи на основе аллила с использованием катализатора с Pd(PPh₃)₄/1,3-диметилбарбитуровая кислота, промывкой с помощью диизопропилэтиламина (ДИПЭА) в N-метилпирролидоне (МТП) и с помощью 0,5% тригидрата диэтилдитиокарбамата натрия и ДИПЭА, с последующей конденсацией с при использовании ДИК/Охума). При снятии защиты группы ivDDE в положении Lys-N-эпсилон по остатку 17 путем инкубации с 2% или более гидразингидрата в

диметилформамиде (ДМФ) с последующей промывкой ДМФ/CH₂Cl₂ боковая цепь Lys ацилируется трет-бутил 18-([бета -D-глюкурон-1-ил]окси)октадеcanoатом в ДМФА/CH₂Cl₂ с использованием ДИК/ГБТ или других связующих агентов. Завершение связывания проверяли нингидрином и продукт тщательно промывали CH₂Cl₂.

Далее окончательно снимали защиту с продукта на смоле и отщепляли продукт от смолы при обработке смесью для отщепления (94% трифторуксусной кислоты (ТФУ), 2% этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТ), 2% H₂O, 2% триизопропилсилана (ТИПС) в течение 240 минут при комнатной температуре. Смесь продукта со смолой обрабатывали этиленгликолем (ЭТГ) для осаждения продукта и интенсивно промывали ЭТГ с получением неочищенного сырого пептидного продукта (как указано выше в заголовке) после сушки в вакууме.

Очистку проводили порциями с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (C18). Неочищенный пептид наносили на колонку ВЭЖХ 4,1x25 см при скорости потока около 15 мл/мин (органический модификатор CH₃CN в водном растворе трифторуксусной кислоты 0,1%, буфер А; CH₃CN с 0,1% ТФУ, буфер В) и элюировали градиентом 40-70% буфера В. Фракцию продукта лиофилизировали с получением указанного выше пептидного продукта (SEQ ID NO: 1) с чистотой >94% по данным аналитической ВЭЖХ (10,5 мин; 40-70% CH₃CN в 0,1% ТФУ)/масс-спектрометрии (пик M+1 = 1937,44; найденная молекулярная масса 3872,88). Аналогичным образом, используя глюкуроновую или мелибиуроновую кислоты, полученные, как указано в примерах, были синтезированы другие аналоги согласно изобретению.

Аналитические данные представлены в таблице А:

Таблица А

SEQID NO:	Ожидаемая MW	Обнаруженная (M ⁺ 2)	k' значение; градиент ВЭЖХ	Колонка
1.	3873,34	3872,94	3,0; 40-70%В за 20 мин	Luna C-18 5μ
2.	3977,47	3977,67	3,8; 45-75%В за 20 мин	Luna C-18 5μ
3.	3845,28	3845,16	3,1; 40-70%В за 20 мин	Luna C-18 5μ
4.	3873,34	3873,46	6,5; 40-70%В за 20 мин	PLRP-S 8μ

Соединения анализировали с помощью ВЭЖХ/МС для получения данных о чистоте и данных об идентичности (обнаружение молекулярных ионов). В методе ВЭЖХ используются аналитические колонки, заполненные перечисленными материалами с

указанными размерами частиц, и данные представлены в настоящей заявке в виде значений k' ($k'=(T_1-T_0)/T_0$), которые, как ожидается, в значительной степени не зависят от конфигурации системы и мертвого объема, но зависят от градиента и сорбента. Сообщается, что все соединения имеют чистоту около 95%.

Соответствующие 1-метильные и 1-октильные аналоги указанного выше в заголовке соединения получали аналогичным образом, но с использованием реагентов 1'-метил- β -D-глюкуроновой кислоты и 1'-октил- β -D-глюкуроновой кислоты (Carbosynth). Соответствующие 1-децил, 1-додецил, 1-тетрадецил, 1-гексадецил, 1-октадецил, 1-эйкозил и более высокие аналоги синтезировали с использованием соответствующих моносахаридной и дисахаридной уроновых кислот, полученных как описано ниже. Альтернативно, 1-алкилглюкуронил или другие уроновые ацилированные аналоги могут быть получены путем первоначальной очистки незащищенного или частично незащищенного пептида с последующим ацилированием подходящим реагентом на основе уроновой кислоты. Альтернативно, 1-алкилглюкуронил или другие уроновые ацилированные аналоги могут быть получены путем первоначальной очистки рекомбинантно полученного пептида с последующим избирательным ацилированием аминокислотной боковой цепи подходящим реагентом на основе уроновой кислоты.

A. 1-Алкил- β -d-глюкуроновые кислоты. Общий способ окисления.

К раствору 1-додецил- β -d-глюкопиранозида [2,0 г, 5,74 ммоль] в 20 мл ацетонитрила и 20 мл деионизированной воды добавляли (диацетоксиiodo)бензол [4,4 г, 13,7 ммоль] и ТЕМПО [0,18 г, 1,15 ммоль]. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции (через 20 ч). Реакционную смесь разбавляли водой и лиофилизировали досуха с получением неочищенного продукта в виде белого порошка достаточной чистоты для непосредственного применения в связывании с боковой цепью Lys пептида (1,52 г, 73%). Подобным образом были получены другие 1-алкил β -d-глюкуроновая или мелибиуронозная кислоты, используемые для ацилирования других пептидных продуктов, описанных в данной заявке. Соответствующие 1-замещенные глюкозиды или мелибозиды были получены с использованием методик, описанных в настоящих примерах, но с заменой дикарбоксильных исходных материалов с соответствующей длиной цепи, используемых в методиках синтеза в примерах, для получения материалов с желаемой длиной цепи, например, гексадекандиоевой кислоты, додекандиоевой кислоты и т.п. вместо октадекандиоевой кислоты.

B. 18-(третбутокси)-18-оксооктадеканоная кислота

Суспензию октадекандиоевой кислоты (40 г, 127 ммоль) в толуоле (500 мл) нагревали при 95°C в атмосфере азота. К полученному раствору добавляли по каплям

N,N-диметилформаид ди-трет-бутилацеталь (98 г, 434 ммоль) в течение 3-4 часов. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при той же температуре, концентрировали досуха в вакууме и помещали в глубокий вакуум на ночь. Полученное твердое вещество суспендировали в CH_2Cl_2 (200 мл) при нагревании и обработке ультразвуком и фильтровали при комнатной температуре, промывая CH_2Cl_2 . Фильтрат (2) концентрировали с получением продукта в виде твердого вещества (45 г, 86%), которое использовали без дополнительной очистки.

С. Трет-бутил 18-гидроксиоктадеканоат

Раствор 18-(третбутокси)-18-оксооктадекановой кислоты (45 г, 121 ммоль) в тетрагидрофуране (ТГФ) охлаждали на бане со льдом в атмосфере азота и обрабатывали по каплям боран-диметилсульфидным комплексом (16 мл, 158 ммоль). Интенсивное выделение газа происходило в течение первых нескольких добавленных миллилитров. После добавления смеси медленно давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали на бане со льдом, гасили насыщенным раствором карбоната натрия, разбавляли этилацетатом и промывали насыщенным раствором карбоната натрия. Органический слой концентрировали в вакууме и помещали в глубокий вакуум на ночь. Остаток растворяют в теплом толуоле (200 мл) и оставляют на несколько часов при комнатной температуре. Осажденный диол удаляли фильтрованием через целит, осадок промывали толуолом. Раствор в толуоле наносили непосредственно на колонку с силикагелем и элюировали смесью 10 % этилацетата/гексана, затем 20 % этилацетата/гексана, затем 30 % этилацетата/гексана и концентрировали с получением продукта (24 г, 51 %) в виде масла, которое затвердевает при стоянии. ^1H ЯМР (500 МГц, d_4 -MeOH): $\delta = 3,64$ (m, 2H), 2,21 (t, 2H, $J = 9$), 1,44 (s, 9H), 1,50–1,62 (m, 4H), 1,20–1,40 (m, 27H)

Д. Трет-бутил 18-([1-бета-D-глюкозо-1-ил]окси)октадеканоат

Трет-бутил-18-гидроксиоктадеканоат (46 г, 129 ммоль) растворяли в толуоле (400 мл), концентрировали в вакууме около до 250 мл и довели до комнатной температуры в атмосфере азота. К этому раствору при интенсивном перемешивании добавляли HgO (желтый) (22,3 г, 103 ммоль), HgBr_2 (37 г, 103 ммоль) и ацетобромглюкозу. Перемешивание продолжали в течение ночи, пока спирт не израсходовался, и смесь фильтровали через целит. Фильтрат обрабатывали трифлатом меди (II) (1 г) и перемешивали в течение 1 часа до разложения ортоэфира (пятно над продуктом при тонкослойной хроматографии, ТСХ). Затем реакционную смесь промывали водой и органический слой концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в метаноле (500 мл) и обрабатывали метоксидом натрия (5,4 М в метаноле) порциями по 0,5 мл для доведения

pH до 9 (нанесение непосредственно на бумагу для определения pH). pH проверяли каждые 0,5 часа и при необходимости добавляли больше метоксида натрия для поддержания pH на уровне 9. Реакция завершилась через 4 часа. Добавляли по каплям уксусную кислоту, чтобы довести pH до 7, и смесь концентрировали в вакууме. Остаток наносили на силикагель и очищали хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 5% метанол/CH₂Cl₂, затем 10% метанол/CH₂Cl₂, с получением продукта в виде белого твердого вещества (55 г, 82%). ¹H ЯМР (400 МГц, d₄-MeOH): δ = 4,30 (d, 1H, J = 7,6), 3,84 (m, 1H), 3,77 (d, 1H, J = 9,6), 3,45-3,60 (m, 2H), 3,36 (t, 1H, J=9,2), 3,21 (t, 1H, J=8,4), 2,20 (t, 2H, J=7,2), 1,50-1,67 (m, 4H), 1,43 (s, 9H), 1,43-1,33 (m, 2H), 1,28 (br s, 24H)

Е. Трет-бутил 18-([β-D-глюкурон-1-ил]окси)октадеканоат

Трет-бутил 18-([1-β-D-глюкоз-1-ил]окси)октадеканоат (50 г, 96 ммоль) растворяли в диоксане (800 мл) в трехгорлой колбе на 2000 мл при механическом перемешивании и охлаждении до 10 °С. К раствору добавляли 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (ТЕМПО) (150 мг, 0,96 ммоль) и КВг (1,14 г, 9,6 ммоль). К колбе крепили капельные воронки, содержащие насыщенный раствор Na₂CO₃ (300 мл) и 13 % раствор NaOCl (120 мл). Раствор карбоната начинали подавать быстрыми каплями, а NaOCl добавляли медленными каплями (приблизительно 1 капля в секунду). После добавления 100 мл карбоната проверяли pH и при необходимости добавляли еще для поддержания pH около 10. Температуру поддерживали на уровне от 10°C до 15°C в течение всего времени. Через 3 часа исходный материал оставался, поэтому быстро добавляли еще NaOCl (10 мл). Через 0.5 часа реакцию гасили метанолом (10 мл). Смесь выливали в колбу Эрленмейера на 4000 мл, погружали в баню со льдом и доводили до pH 3 с помощью 6 н. HCl. Смесь разбавляли этилацетатом и промывали 1 н. HCl и 2 раза дистиллированной водой, позволяя слоям разделиться при последней промывке. Органический слой концентрировали в вакууме с получением продукта в виде белой пены (38 г, 74%).

Количественный ¹H ЯМР (500 МГц, d₄-MeOH) с использованием внутреннего стандарта 2,3,4,5-тетрахлорнитробензола (ТХНБ) относительно аномерного СН дает 94,8% от ожидаемой массы. Чистота по данным ТСХ >95% (20% MeOH/DCM/2 капли HOAc, окрашивание 20% H₂SO₄/EtOH + нагревание). ¹H ЯМР (500 МГц, d₄-MeOH): δ = 4,30 (d, 1H, J = 9,5), 3,85 (m, 1H), 3,77 (d, 1H, J = 7,5), 3,48-3,56 (m, 2H), 3,37 (t, 1H, J = 11,5), 3,21 (t, 1H, J = 9,5), 2,20 (t, 2H, J=9,5), 1,52-1,66 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,34-1,42 (br, 2H), 1,28 (s, 25H).

Пример 2. Двойные пептидные агонисты – исследования in vitro

Клеточные исследования проводили с использованием стандартных клеточных

		Овалб	Овалб	БСА	БСА		
EU-A1588	Мелибиуронил C16	124	250	23	43	5	6
EU-A1871	Глюкуронил 15C02H	38,8	65,6	162	461	4	1
EU-A1872	Глюкуронил 17C02H	42,5	86,4	1266	2624	30	30
EU-A1873	Глюкуронил 17C02H	38,7	43,5	1,116	1,680	29	39
Семаглутид	(PEG)2-17C02H	14,9	>0,01	181	N/A	12	

Эффект замены БСА овалбумином в клеточном анализе пептидов, прочно связывающихся с БСА

Здесь можно видеть, что пептиды, очень прочно связывающиеся с сывороточным альбумином (с CO₂H-содержащими заместителями, имитирующими головную группу жирных кислот) демонстрируют существенное кратное улучшение связывания при замене БСА овалбумином, который не связывает в значительной степени миметики жирных кислот. Кратность степени улучшения может свидетельствовать о прочности связывания с сайтами связывания жирных кислот на БСА. Таким образом, семаглутид улучшает связывание в 12 раз (прочное связывание), в то время как EU-A1873 улучшает связывание в 30-40 раз, что подразумевает существенное увеличение связывания сывороточного альбумина. Можно ожидать, что такая степень связывания сывороточного альбумина приведет к подавлению C_{max} и увеличению продолжительности действия, как видно из биоанализа SEQ ID NO: 1.

Данные, представленные в таблицах 5 и 6 выше, демонстрируют, что тестируемые соединения являются агонистами как РГПП-1, так и РГКГ («двойные агонисты»), в отличие от семаглутида, который демонстрирует высокую аффинность, смещенную в сторону ГПП-1. Эти данные также показывают, что SEQ ID NO: 1 представляет собой пептид двойного агониста с примерно одинаковой аффинностью к РГПП-1 и РГКГ.

Пример 3. Влияние in vivo на глюкозу, массу тела и потерю жира

А. Анализы in vivo с использованием мышей db/db. В этих исследованиях использовали около семидесяти пяти (75) мышей-самцов BKS.Cg-m ++ Leprddb/J (номенклатурный номер Jackson Labs 000642) ("db/db") в возрасте 7-9 недель, которых содержали с использованием стандартных процедур ухода за животными. Исследования начинали после недельной акклиматизации к условиям учреждения. Утром в день исследования 0 мышей взвешивали и не кормили в течение 4 часов. Глюкозу крови измеряли глюкометром по стандартной методике. По меньшей мере пятьдесят четыре (54)

мыши были отобраны на основе массы тела, а мыши с уровнем глюкозы в крови >300 мг/дл (т.е. с диабетом) были случайным образом разделены на 6 групп ($n=9$). Группы были следующими: группа 1, носитель; 2 группа — семаглутид 3 нмоль/кг; 3-я группа — семаглутид 10 нмоль/кг; группа 4, SEQ ID NO: 1, один (1) нмоль/кг; группа 5, SEQ ID NO: 1, три (3) нмоль/кг; группа 6, SEQ ID NO: 1, 10 нмоль/кг. Клинические наблюдения проводились при поступлении, до рандомизации и ежедневно с 1 по 5 день. Массу тела измеряли и регистрировали при получении, до рандомизации и ежедневно с 1 по 5 день. Потребление пищи измеряли и записывали ежедневно с 1 по 5 день. Образцы крови для анализа глюкозы собирали перед тестом (день -3) и через 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после однократной дозы указанного соединения (например, SEQ ID NO: 1) в День 1.

В. *Анализы in vivo с использованием мышей «JAX C OVD».* Восемьдесят один (81) 18-недельный самец мышей C57BL/6J, которых кормили диетой с высоким содержанием жиров (Research Diets D12492) с возраста 6 недель, перевели в исследовательскую лабораторию Джексона in vivo (Сакраменто, Калифорния). Мышам надрезали уши для идентификации и помещали в индивидуально вентилируемые поликарбонатные клетки с воздухом, отфильтрованным НЕРА, с плотностью до 3 мышей на клетку. Клетки меняли каждые две недели. Комната для животных полностью освещалась искусственным флуоресцентным освещением с контролируемым 12-часовым циклом свет/темнота (свет с 6 утра до 6 вечера). Нормальные диапазоны температуры и относительной влажности в помещениях для животных составляли $22 \pm 4^\circ\text{C}$ и $50 \pm 15\%$, соответственно. В помещениях для животных устанавливали 15 воздухообменов в час. Перед началом исследования все мыши продолжали соблюдать диету с высоким содержанием жиров (60% ккал; D12492) и акклиматизировались в течение четырех недель. Утром в день исследования 1 исходный уровень состава тканей тела определяли для каждой мыши с помощью ЯМР-анализа. Шестьдесят три (63) мыши были сгруппированы в семь групп ($n=9$). Оставшихся мышей, не включенных в группы, подвергли эвтаназии. Подкожное введение соединений производили через день. Утром в день исследования 0 измеряли уровень глюкозы в крови перед введением дозы с помощью глюкометра, и мышам вводили дозы в соответствии с приведенной ниже таблицей 7 с регистрацией времени введения дозы. Измерения уровня глюкозы в крови проводились через 1, 2, 4, 8, 10 и 24 часа после введения дозы. После 1 дня исследования уровень глюкозы в крови до введения дозы измеряли в дни 4, 7, 9, 11, 13, 17, 21 и 25. Массу тела и клинические наблюдения регистрировали каждые 2 дня. Потребление пищи во всех группах измеряли ежедневно после введения дозы. Первое измерение потребления пищи было проведено в день исследования -1. Группу 4 кормили в паре с группой 3, а группу 7

кормили в паре с группой 6. Количество пищи для групп 4 и 7 зависело от среднего количества пищи, потребленной в течение предыдущего 24-часового окна группами 3 и 6, соответственно. Потребление пищи для групп 1, 2, 3, 5 и 6 обеспечивалось произвольно и измерялось ежедневно. На 27 день исследования мышей не кормили в течение 5 часов и проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ). Всем мышам внутрибрюшинно вводили болюсную дозу глюкозы (2 г/кг), а уровень глюкозы в крови оценивали перед введением дозы и через 15, 30, 60, 90 и 120 минут после введения дозы. Все значения уровня глюкозы в крови были занесены в журнал «ГТТ, Log Глюкозы Крови».

Таблица 7

Группа	Обработка	N	Путь введения дозы	Частота введения дозы
1	Носитель	9	п/к	Каждые 2 дня; 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 и 26
2	Семаглутид (6 нмоль/кг)	9	п/к	Каждые 2 дня; 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 и 26
3	Семаглутид (12 нмоль/кг)	9	п/к	Каждые 2 дня; 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 и 26
4	Без введения дозы, кормление как в группе 3	9	N/A	N/A
5	MD-1373 (6* нмоль/кг)	9	п/к	Каждые 2 дня; 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 и 26
6	MD-1373 (12* нмоль/кг)	9	п/к	Каждые 2 дня; 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 и 26
7	Без введения дозы, кормление как в группе 6	9	N/A	N/A

Примечание 1* - Мышам в группах 5 и 6 вводили дозы 3 нмоль/кг и 6 нмоль/кг в дни 0, 2 и 4. Начиная с 8 дня, мышам в этих группах вводили дозы 6 нмоль/кг и 12 нмоль/кг, соответственно, как указано в Таблице 1.

Примечание 2: SEQ ID NO:1 обозначается как MD-1373 в Таблице 7.

С. Контроль уровня глюкозы и толерантность

Используя мышиную модель db/db, было показано, что уровни глюкозы для высокой дозы семаглутида подавлялись в течение 24 часов, возвращаясь к уровням до введения семаглутида к 48 часам, в то время как агонист SEQ ID NO:1 подавлял уровень глюкозы в крови, начиная с 4 часов и продолжая, по меньшей мере, до 96 часов, и даже до 120 часов (Фиг. 1). Таким образом, было обнаружено, что SEQ ID NO: 1 проявляет повышенную реакцию на глюкозу в крови и пролонгированное действие по сравнению с эквивалентными количествами семаглутида у мышей db/db. Специалистам в данной

области будет понятно, что начало действия SEQ ID NO: 1 свидетельствует о вероятном уменьшении побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) по сравнению с применением семаглутида. Специалистам в данной области также следует понимать, что начало действия SEQ ID NO: 1 свидетельствует о вероятном снижении острых побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), наблюдаемом при более низкой дозе по сравнению с применением семаглутида.

Исследования на мышах JAX с ОВД также показали, что уровни глюкозы в крови при низкой (6 нмоль/кг) и высокой (12 нмоль/кг) дозах семаглутида снижались до нормогликемического диапазона через два часа после введения дозы и оставались подавленными в нормогликемическом диапазоне спустя первый (1) день после введения дозы, но вернулись к уровню гипергликемии ко второму (2) дню после введения дозы. Низкие и высокие дозы (6 нмоль/кг и 12 нмоль/кг, соответственно) SEQ ID NO:1 («MD-1373») снижали уровень глюкозы в крови до нормогликемического диапазона через четыре (4) часа после введения дозы, низкая доза оставалась подавленной в течение 2 дней после введения дозы и возвращалась к гипергликемическому диапазону только к четвертому (4) дню после введения дозы. Уровни глюкозы в крови у животных, которым вводили высокие дозы (12 нмоль/кг) SEQ ID NO: 1, снижались до нормогликемического диапазона с седьмого (7) дня до последнего измерения на 26 день (Фиг. 2). В других группах наблюдалось небольшое снижение, но уровень глюкозы в крови оставался в пределах высокого гипергликемического диапазона на протяжении оставшейся части анализа. Эти данные указывают на более низкую дозу SEQ ID NO: 1 (по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1/РГКГ) для достижения желаемых биологических эффектов с уменьшением нежелательных явлений после введения млекопитающему.

Кроме того, у мышей JAX с ОВД наблюдался значительный скачок уровня глюкозы в ответ на внутрибрюшинное введение глюкозы двумя (2) г/кг (интраперитонеальный глюкозотолерантный тест (ИПГТТ)). Как в группах с низкой, так и с высокой дозой SEQ ID NO: 1 наблюдался притупленный скачок уровня глюкозы, что указывает на хороший глюкорегуляторный эффект. Например, как показано на Фиг. 3, было обнаружено, что толерантность к глюкозе одинакова для SEQ ID NO: 1 и семаглутида при использовании ИПГТТ на мышинной модели JAX С ОВД. Как раскрыто в данной заявке, анализ ИПГТТ на 27 день показал аналогичные результаты для высокой дозы SEQ ID NO: 1 и семаглутида.

D. Масса тела и потеря жира

Было обнаружено, что SEQ ID NO: 1 приводит к большему снижению массы по

сравнению с семаглутидом у мышей BKS.Cg-m +/- Leprdb/J (номенклатурный номер Jackson Labs 000642) (db/db). Значительные изменения массы тела были отмечены по сравнению с носителем для семаглутида и SEQ ID NO: 1 в день 1 после введения дозы и для средней и высокой дозы SEQ ID NO: 1 в дни со 2 по 4 (Фиг. 4). При анализе потребления пищи высокая доза семаглутида значительно подавляла прием пищи только в 1 день после введения дозы, в то время как агонист SEQ ID NO: 1, как было обнаружено, подавлял прием пищи между 1-м и 4-м днями (Фиг. 5).

Было обнаружено, что совместный агонизм SEQ ID NO: 1 в случае глюкагона вызывает очень сильное, стабильное снижение массы более чем на 25% (доза 12 нмоль/кг) у мышей JAX C ОВД, т.е. более чем в два раза по сравнению с наблюдаемой после введения семаглутида (например, 8-10%), несмотря на сходство в потреблении пищи между группами (Фиг. 6). Неожиданно эти данные свидетельствуют о том, что SEQ ID NO: 1 действует работает второму механизму действия (например, действует на обе стороны «энергетического уравнения», вызывая как снижение потребления пищи, так и увеличение выхода энергии). Отмечается, что на 8 день группы мышей JAX с ОВД, получавших SEQ ID NO: 1, были переведены с режима 6 на режим 12 нмоль/кг, чтобы скорректировать фармакодинамические (ФД) различия между этой популяцией мышей JAX с ОВД и мышами db/db, на которых было осуществлено более раннее обнаружение дозы.

Кроме того, как показано на фиг. 7, агонист SEQ ID NO: 1 почти удвоил потерю жира, наблюдаемую после введения семаглутида (51% против 28%, соответственно (-6% для контрольной группы, получавшей носитель)). Наблюдаемое снижение мышечной массы составила около 12% для SEQ ID NO: 1 по сравнению с 6% для семаглутида (-3% для контрольной группы, получавшей носитель).

Пример 4. Фармакокинетика

А. Исследования мышей

Прижизненная фаза исследования была проведена в лаборатории Джексона (Сакраменто, Калифорния) на шестидесяти семи самцах мышей C57BL6/J (возраст 7-9 недель) (мышь JAX с ожирением, вызванным диетой (ОВД)). У мышей надрезали уши для идентификации и помещали в индивидуально вентилируемые поликарбонатные клетки с воздухом, отфильтрованным через HEPA, с плотностью до 4 мышей на клетку. Комната для животных полностью освещалась искусственным флуоресцентным освещением с контролируемым 12-часовым циклом свет/темнота (свет с 6 утра до 6 вечера). Нормальные диапазоны температуры и относительной влажности в помещениях для животных составляли $22 \pm 4^\circ\text{C}$ и $50 \pm 15\%$, соответственно. В помещениях для животных

проводили замену воздуха минимум 15 объемов в час. Отфильтрованная водопроводная вода, подкисленная до pH от 2,5 до 3,0, и стандартный корм для грызунов предоставляли без ограничений.

И агонист SEQ ID NO: 1, и семаглутид были приготовлены в виде 0,02 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,05% tween 80, при pH ~8. Объем дозы составлял 1,9365 и 5,8095 мл/кг для SEQ ID NO: 1 при 10 и 30 нмоль/кг, соответственно, и 2,057 мл/кг для семаглутида при 10 нмоль/кг. У трех мышей из группы 1, не получавшей дозы, брали кровь только в начале отсчета времени. В группе 2 (семаглутид; 10 нмоль/кг подкожно), группе 3 (SEQ ID NO: 1; 10 нмоль/кг подкожно), группе 4 (SEQ ID NO: 1; 10 нмоль/кг внутривенно) и группе 5 (SEQ ID NO: 1; 30 нмоль/кг подкожно), образцы крови собирали в течение 120 часов после введения дозы (n = 4 на момент времени). Концентрации SEQ ID NO: 1 и семаглутида в плазме определяли с помощью жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), а фармакокинетические параметры определяли с помощью некомпартментного анализа с использованием WinNonlin.

Образцы крови собирали через 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения дозы. Для групп со 2 по 5 у четырех мышей брали кровь в 2 момента времени, причем второй момент времени был терминальным. В каждый момент времени с помощью ретроорбитального забора крови или пункции сердца собирали минимум ~200 мкл цельной крови. Образцы крови собирали в антикоагулянте K2EDTA и центрифугировали. Плазму (минимум 100 мкл) переносили в пробирку и хранили в замороженном виде до отправки в биоаналитическую лабораторию для анализа методом ЖХ-МС/МС.

Определение концентраций SEQ ID NO: 1 и семаглутида в плазме проводили в Climax Laboratories (Сан-Хосе, Калифорния). Аликвоту 100 мкл плазмы смешивали с 10 мкл внутреннего стандарта (стандарт 20 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере), а затем с 300 мкл ацетонитрила. Образцы встряхивали и центрифугировали. Надосадочную жидкость переносили в чистый 96-луночный планшет для анализа ЖХ-МС/МС. Данные представлены в наглядном виде на фиг. 8 с табличным представлением в Таблице 8.

Таблица 8

Фармакокинетические параметры без учета компартментов для SEQ ID NO: 1 и семаглутида после подкожного или внутривенного введения самцам мышей (n = 4 на момент времени)

Соединение	SEQ ID NO: 1			Семаглутид
	10	10	30	
Доза (нмоль/кг)	10	10	30	10
путь	в/в	п/к	п/к	п/к

C_{\max} (нМ)	79,5	23,7	76,9	44,2
T_{\max} (ч)	8	8	8	4
$AUC_{(0-t)}$ (нМ.ч)	1500	687	1930	727
$AUC_{(0-\infty)}$ (нМ.ч)	1530	695	1950	755
$T_{1/2}$ (ч)	14,7	15,4	10,0	20,0
СВУ (ч)	14,8	22,2	18,3	15,5

После подкожного введения, как показано на фиг. 9, уровни SEQ ID NO: 1 в плазме достигают пика позже, чем у семаглутида, при этом T_{\max} составляет 8 и 4 часа, соответственно. При 10 нмоль/кг AUC для SEQ ID NO: 1 была сравнима с таковой для семаглутида, в то время как C_{\max} для SEQ ID NO: 1 составляла 54% от таковой для семаглутида. Пониженное значение C_{\max} с аналогичной AUC, продемонстрированной SEQ ID NO: 1, считается более благоприятным профилем, поскольку предполагает возможность снижения нежелательных явлений, поскольку уровни в крови выше терапевтических и отношения пиковой концентрации к минимальной концентрации сведены к минимуму.

В целом SEQ ID NO: 1 характеризовался немного более длительным СВУ, чем семаглутид, от 18,3 до 22,2 часов и 15,5 часов, соответственно. После подкожного введения концентрации SEQ ID NO: 1 в плазме увеличивались примерно пропорционально дозе с 3-кратным увеличением дозы, что приводило к увеличению C_{\max} и AUC в 3,2 и 2,8 раза, соответственно. После внутривенного введения, концентрации SEQ ID NO: 1 в плазме увеличивались со временем, при этом T_{\max} составляло 8 часов после введения дозы. Поскольку профиль зависимости концентрации в плазме от времени позволяет предположить, что внутривенная доза могла быть введена периваскулярно вместо предполагаемой внутрисосудистой инъекции, биодоступность SEQ ID NO: 1 после подкожной инъекции не рассчитывалась.

Аналогичный тест был проведен с использованием самцов мышей C57BL6/J в The Jackson Laboratory-JAX West (Сакраменто, Калифорния). Оценивали фармакокинетические (ФК) параметры после однократного подкожного введения (п/к) ALT801 (SEQ ID NO: 1) или семаглутида (оба в дозе 10 нмоль/кг). Оба соединения были приготовлены в концентрации 0,02 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере, 0,05% Tween 80 при pH ~8. Дозируемый объем составлял приблизительно 2 мл/кг. Образцы крови (~200 мкл) собирали через 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения дозы (n=4 на момент

времени). У каждой мыши забирали кровь в двух временных точках, и вторая временная точка представляла собой терминальную точку. Концентрации ALT-801 и семаглутида в плазме определяли с помощью ЖХ-МС/МС с пределом количественного определения 1,00 и 2,00 нг/мл для семаглутида и ALT-801, соответственно. Некомпаративный ФК-анализ с использованием WinNonlin выполняли с применением средних концентраций в каждый момент времени отбора проб, чтобы определить максимальную концентрацию (C_{max}), время наблюдения C_{max} (T_{max}), площадь под кривой концентрации в плазме от нулевого времени до последней временной точки с измеримой концентрацией (AUC_{0-t}), кривой зависимости концентрации в плазме от времени от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), конечный период полувыведения ($T_{1/2}$) и среднее время удержания (СВУ). Наблюдаемые фармакокинетические параметры для ALT-801 и семаглутида, вводимых подкожным путем в дозе 10 нмоль/кг указаны на Фиг. 9 ($T_{max} = 8$ и 4 ч, $C_{max} = 92$ и 182 нг/мл, СВУ = 22 и 16 ч, соответственно) и предполагают более размеренное и отсроченное достижение C_{max} у мышей, получавших ALT-801, по сравнению с семаглутидом. ALT-801 имел C_{max} 50 %, но $AUC > 86$ % от значений литературного стандарта семаглутида. ФК-параметры элафибранора не оценивались, так как он требовал перорального введения и, следовательно, его нельзя сравнивать с ALT-801 или семаглутидом, назначаемых подкожным путем.

В. Исследования на мини-свиньях

Подопытными животными были в общей сложности четыре ненаивных самца юкатанской мини-свиньи (*Sus scrofa*), которых содержали поодиночке. Масса тела от 73 до 75 кг. Комнаты содержания были настроены на поддержание комнатной температуры от 16 до 27°C (от 61 до 81°F). Регистрировали относительную влажность. Поддерживали фотопериод 12 часов света/12 часов темноты. Во время темного цикла в комнате могло быть включено освещение, чтобы облегчить сбор образцов и/или другие жизненные действия. Животных кормили поддерживающим количеством корма для свиней «Purina S-9». Чистая свежая вода из глубоководной скважины была доступна вволю. Общие наблюдения в клетке проводили не менее двух раз в день (утром и вечером) в течение периода исследования для оценки общего состояния здоровья, для оценки умирающих животных или для оценки смертности.

После периода акклиматизации в течение двадцати двух дней каждой мини-свинье подкожно (за щеку) вводили SEQ ID NO: 1 в дозе 20 нмоль/кг, и собирали фармакокинетические образцы крови в момент времени -0,25, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 216, 264, 312 и 360 часов после введения дозы. После двухнедельного периода отмывки тем же животным внутривенно вводили SEQ ID NO: 1 и собирали

фармакокинетические образцы крови в момент времени -0,25, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96., 120, 168, 192, 216, 264, 312 и 360 часов после введения дозы. Концентрация дозы составляла 5,5 мг/мл (объем дозы 0,015 мл/кг) для обоих типов введения.

Образцы цельной крови для фармакокинетического анализа (~3 мл/момент времени) в пробирках, содержащих K2EDTA, собирали через порты сосудистого доступа (ПСД). Образцы хранили на влажном льду до обработки, ~30 минут или меньше после сбора. Все образцы центрифугировали в течение ~15 минут при ~3000 об/мин и ~4°C. Полученную плазму равномерно переносили в две криопробирки (основную и резервную) и помещали на сухой лед. Образцы плазмы хранили в замороженном виде при ~-70°C до отправки первичных образцов на анализ.

Во время проведения исследования аномальных клинических наблюдений отмечено не было. Концентрации испытуемых образцов показаны на фиг. 11.

Также наблюдали, что после подкожного введения SEQ ID NO: 1 уровни SEQ ID NO: 1 в плазме повышались до C_{max} 887 нг/мл при T_{max} = 52 часа с СВУ 86 часов. Для семаглутида, напротив, СВУ у мини-свиней составляет 64 часа (Lau, J., et al. (2015) J Med Chem 58: 7370-80). Это низкое значение C_{max} и пролонгированное СВУ снова иллюстрируют более продолжительное действие по сравнению с семаглутидом, указывая на более длительный ФД-профиль для SEQ ID NO: 1.

С. Исследования на крысах

1. Протокол однократной дозы

Шестнадцать (+2 запасных) самцов крыс CRL:CD(SD), приблизительно 250-300 г в начале исследования, были получены из стабильной колонии, содержащейся в Charles River Labs. Животных содержали на стандартной диете (Lab Diet C504). Потребление корма контролировали в дни исследования с -1 по 7 путем совместного взвешивания корма и дозатора. Пищу и питьевую воду давали вволю на протяжении всего исследования, за исключением ночных периодов голодания перед введением дозы в День исследования -1. При поступлении всех животных распределяли по группам.

В 1 день исследования всем животным вводили болюсную дозу зависимо от группы испытуемого образа (ИО) посредством подкожной инъекции меж(средне)лопаточной инъекции. Индивидуальную массу тела животного регистрировали, начиная с дня -1. Во время введения дозы и во все моменты времени сбора образцов животных наблюдали на предмет любых клинически значимых отклонений. Эта исследовательская деятельность более подробно описана в Таблице 9.

Таблица 9

Исследовательская деятельность

Исследовательская деятельность	Временная шкала				
Массы тела	Предварительная доза и дни 2, 3, 4, 5, 6, 7				
Прием пищи	Ежедневно (Дни, -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)				
Сбор крови (Цельная кровь перерабатывается в плазму)	День 1 (2, 4, 8 часов) День 2 (24 часа) День 3 (48 часов) День 4 (72 часа) День 6 (120 часов) День 7 (144 часа) Максимально доступный → *ч = постдоза				
<table border="1"> <tr> <td>Антикоагулянт</td> <td>K2EDTA</td> </tr> <tr> <td>Объем/временная точка</td> <td>300 мкл</td> </tr> </table>	Антикоагулянт	K2EDTA	Объем/временная точка	300 мкл	
Антикоагулянт	K2EDTA				
Объем/временная точка	300 мкл				

После введения ИО в 1 день исследования 300 мкл образца цельной крови собирали в пробирки с K2EDTA через постоянный катетер яремной вены (КЯВ) в указанные моменты времени. Максимально доступный объем крови собирали путем пункции сердца в последний момент времени (через 144 часа после введения дозы) после эвтаназии посредством CO₂. Образцы цельной крови хранили на влажном льду не более 30 минут перед центрифугированием при 2200 g в течение 10 минут при 5°C+3°C. Затем полученную плазму пипеткой переливали в полипропиленовые пробирки и хранили в морозильной камере, в которой поддерживалась температура -80°C до передачи в Clímax Laboratories (Сан-Хосе, Калифорния) для фармакокинетического анализа. SEQ ID NO: 1 вводили в буфере состава (0,050 % (масс./масс.) полисорбата 20, 0,300 % (масс./масс.) метилпарабена, 0,348 % (масс./масс.) аргинина, 4,260 % (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде) при целевых уровнях доз 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг или 0,2 мг/кг.

После подкожного введения, как показано на фиг. 10, уровни SEQ ID NO: 1 и семаглутида в плазме у крыс быстро возрастали. Семаглутид достиг пика с T_{max} примерно через 8 часов, в то время как концентрация SEQ ID NO: 1 все еще повышалась через 8 часов, что позволяет предположить, что истинное T_{max} будет в более поздний момент времени. К следующему моменту времени, через 24 часа, значение достигло пика и несколько снизилось, но все еще было выше, чем у семаглутида. При 10 нмоль/кг AUC SEQ ID NO: 1 (2350 нг·ч/мл) была сравнима (93%) с AUC семаглутида (2530 нг·ч/мл), в то время как C_{max} SEQ ID NO: 1 составляла 54% по сравнению с семаглутидом. Пониженное значение C_{max} с аналогичной AUC, продемонстрированной SEQ ID NO: 1, считается более благоприятным профилем, поскольку предполагает возможность уменьшения нежелательных явлений, поскольку уровни в крови выше терапевтических и отношения пиковой концентрации к минимальной концентрации сведены к минимуму. В целом SEQ

ID NO: 1 характеризовалось более длительным СВУ, чем семаглутид, 20,6 часов против 15,4 часов для семаглутида, соответственно.

2. Протокол повторной дозы на крысах

Цель этого исследования заключалась в оценке токсичности и токсикокинетики (ТК) испытуемого образца ALT-801 при его ежедневном подкожном введении крысам в течение не менее 6 недель, а также в оценке обратимости, стойкости или отсроченного возникновения каких-либо эффектов после 4-недельной фазы восстановления. Животных, получавших 0,03 мг/кг/день ALT-801, обрабатывали в течение всего периода исследования без каких-либо проблем. Напротив, животные, получавшие дозы > 0,09 мг/кг/дозу, были переведены на значительные перерывы в дозировании в течение первых 3 недель исследования из-за значительного зависимо от дозы ALT-801 потребления пищи и связанного с этим снижения массы тела в течение этого периода времени. Анализ дозированных составов показал, что существенные результаты, выходящие за пределы спецификации для всех дозированных составов ALT-801, вероятно, были основной причиной преувеличенных эффектов, наблюдаемых в течение первых 3 недель исследования в группах 3 и 4. Проблемы с анализом состава дозы были решены к концу 3 недели, и лечение было возобновлено, начиная с 22 дня, для животных в группах 3 и 4, а продолжительность исследования впоследствии была продлена еще на 2 недели обработки (терминальная некропсия на 57 день). Животным группы 3 вводили 0,03 мг/кг/день ALT-801 на 22 и 23 дни, а затем они получали целевую дозу 0,09 мг/кг/дозу один раз через день (Q2D) до конца исследования. Животным группы 4 вводили 0,09 мг/кг/сутки на 22 и 23 дни, а затем они получали целевую дозу 0,15 мг/кг/дозу в виде 3 дней приема/4 дней перерыва до конца исследования. Соответственно, ALT-801 в целом вводили в дозе 0,03 мг/кг/день ежедневно в течение 8 недель подряд (группа 2), в дозе 0,09 мг/кг/дозу один раз через день (Q2D) в течение 5 недель подряд (группа 3) или вводили 0,15 мг/кг/дозу 3 дня приема/4 дня перерыва в течение 5 недель подряд.

Таблица 10

Группа	No. (ТК) животных		Уровень дозы (мг/кг/дозу)
	Самец	Самка	
1 (Контроль) ^a	3	3	0
2 (низкий)	6	6	0,03
3 (средний)	6	6	0,03 ^c /0,09 ^{c, e}
4 (Высокий)	6	6	0,09 ^b /0,15 ^{b, d}

^aГруппе 1 вводили только контрольный образец носителя.

^bЖивотным группы 4 вводили 0,15 мг/кг/дозу. Начиная с 14 дня, животным группы 4 вводили 0,09 мг/кг/дозу. Начиная с 16 дня, животным группы 4 увеличивали дозу до

0,15 мг/кг/дозу. Начиная с 22 дня фазы дозирования, животным группы 4 вводили 0,09 мг/кг/дозу. Начиная с 24 дня фазы дозирования, животным группы 4 увеличивали дозу до 0,15 мг/кг/дозу до конца фазы дозирования.

^вВ группе 3 животным вводили 0,09 мг/кг/дозу. Начиная с 22 дня фазы дозирования, животным группы 3 вводили 0,03 мг/кг/дозу. Начиная с 24 дня фазы дозирования, животным группы 3 увеличивали дозу до 0,09 мг/кг/дозу до 35 дня фазы дозирования. Животным группы 3 не вводили дозу на 36 день фазы дозирования.

^дНачиная с 32 дня фазы дозирования, животным группы 4 вводили дозы в течение трех дней (дозы в дни 32-34), а затем переводили на перерыв в дозировании на четыре дня. Этот режим дозирования продолжался до конца фазы дозирования (дозы в дни 39-41, 46-48, 53-55).

^еНачиная с 37 дня фазы дозирования, животным группы 3 вводили 0,09 мг/кг/дозу один раз через день (дни 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 и 55) на протяжении всей фазы дозирования.

Образцы крови собирали у трех токсикокинетических животных/пол/группа/момент времени в группах 2-4 в день 1, в группах 3 и 4 на 55 день и в группе 2 на 56 день до введения дозы и приблизительно через 1,5, 3, 6, 12, 24, 48 (только дни 55 и 56) и 72 (только дни 55 и 56) часов после введения дозы. Образцы крови также собирали у трех токсикокинетических животных/пол/группа/момент времени в контрольной группе, получавшей носитель, в 1 и 56 дни до введения дозы и через около 3, 12, 24 (только в 1 день) и 48 (только в 56 день) часов после введения дозы. Образцы крови были преобразованы в плазму и проанализированы на ALT-801 в Covance-Madison, и результаты были использованы для создания этого токсикокинетического отчета.

Таблица 11

Резюме токсикокинетических параметров ALT-801 в плазме крыс

День	Доза группа	Уровень дозы ^а (мг/кг/дозу)	Пол	C _{max} (нг/мл)	T _{max} (ч)	AUC ₀₋₂₄ (ч*нг/мл)	AUC ₀₋₇₂ (ч*нг/мл)	AUC ₀₋₁₆₈ (ч*нг/мл)	T _{1/2} (ч)
1	2	0,03	M	47,2	24,0	734	NR ^b	NR ^c	NR
			F	50,1	24,0	828	NR ^b	NR ^c	NR
			MF	48,7	24,0	781	NR ^b	NR ^c	NR
	3	0,09	M	134	12,0	2430	NR ^b	NR ^c	NR
			F	79,5	12,0	1430	NR ^b	NR ^c	NR
			MF	107	12,0	1930	NR ^b	NR ^c	NR
	4	0,15	M	250	12,0	4400	NR ^b	NR ^c	NR
			F	275	12,0	4920	NR ^b	NR ^c	NR
			MF	263	12,0	4660	NR ^b	NR ^c	NR

55	3	0,09	M	182	24,0	3100	6820	NR ^c	NR
			F	115	24,0	2130	4400	NR ^c	NR
			MF	148	24,0	2620	5610	NR ^c	NR
	4	0,15	M	496	24,0	10400	21500	NR ^c	NR
			F	490	24,0	10500	22200	NR ^c	NR
			MF	493	24,0	10400	21800	NR ^c	NR
56	2	0,03	M	86,7	12,0	1770	3180	3330	15,1
			F	108	12,0	2090	3540	3600	11,2
			MF	97,1	12,0	1930	3360	3460	13,1

NR Не сообщается из-за невозможности охарактеризовать фазу элиминации.

NR^b Не сообщается из-за отсутствия измеримой концентрации через 72 часа после приема.

NR^c Не сообщается из-за отсутствия измеримой концентрации через 168 часов после приема.

Примечания: AUC₀₋₁₆₈ была рассчитана с использованием экстраполяции и должна интерпретироваться с осторожностью.

Комбинированные параметры самцов и самок (MF) рассчитывали путем объединения данных о концентрации для всех животных (самцов и самок) при каждом уровне дозы в каждом интервале и использования этих данных в качестве отдельного составного профиля для ТК-анализа. Эти параметры не являются средними значениями, рассчитанными для самцов и самок отдельно.

а Животным вводили дозу один раз в день в течение по меньшей мере 8 недель (фаза дозирования). Животным группы 3 дозу не вводили на 36 день. Начиная с 37 дня, животным группы 3 вводили дозы через день (дозы в дни 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 и 55) на протяжении всей фазы дозирования. Начиная с 32 дня фазы дозирования, животным группы 4 вводили дозы в течение трех дней (дозы в дни 32-34), а затем переводили на перерыв дозирования на четыре дня. Этот режим дозирования продолжался до конца фазы дозирования (дозы в дни 39-41, 46-48, 53-55).

Половые различия значений ALT-801 C_{max}, AUC₀₋₂₄, AUC₀₋₇₂ или AUC₀₋₁₆₈ были менее чем в 2 раза. Воздействие, оцениваемое по значениям C_{max} ALT-801 и AUC₀₋₂₄, увеличивалось с увеличением уровня дозы с 0,03 до 0,15 мг/кг/дозу в 1 день. Повышение значений C_{max} ALT-801 и значений AUC₀₋₂₄, как правило, было пропорциональным дозе в 1 день. Потенциальное накопление ALT-801 наблюдалось после многократных доз у крыс.

D. Исследования однократной дозы на яванских макаках

Цель этого исследования заключалась в определении фармакокинетики SEQ ID NO: 1 после однократного подкожного введения яванским макакам (три (3) обезьяны на

дозовую группу). Серьезных нежелательных явлений у животных в течение всего периода исследования отмечено не было.

Как показано в Таблице 13 ниже и на Фиг. 12, увеличивающиеся дозы SEQ ID NO: 1 в буфере состава (0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, 0,300% (масс./масс.) метилпарабена, 0,348% (масс./масс.) аргинина, 4,260% (мас./мас.) маннитола в деионизированной воде) демонстрируют фармакокинетические параметры, показанные в таблице 10, при тестировании на модели яванских макак (п/к введение), измеренные в течение 192 часов после введения дозы.

Таблица 13

SEQ ID NO: 1 доза (мг/кг)	0,039	0,078	0,154
C_{\max} (нг/мл)	95,1	173	467
T_{\max} (ч)	32	24	20
AUC (0-192) ч*нг/мл	9340	17800	42200
$T_{1/2}$ (ч)	59,1	55,6	52,3

На фиг. 12B показана концентрация SEQ ID NO: 1 в плазме крови на 9 день после введения ALT-801 животным (обозначенным 1215, 1216 и 1217 на фиг. 12B), которым вводили 10 нмоль/кг SEQ ID NO: 1 (ALT-801). Было обнаружено, что у животного 1215 на 9 день после лечения наблюдался слегка неоформленный стул (поэтому маловероятно, что это связано с ALT-801), а значение C_{\max} составляло 126 нг/мл (33 нМ) по сравнению со средним значением 80 нг/мл у двух других животных (1216 и 1217) в этом исследовании. Эти данные указывают на то, что биологически эффективный уровень ALT-801, вероятно, составляет <5 нМ SEQ ID NO: 1. В группе с низкой дозой (10 нмоль/кг) не было признаков рвоты (0/3); неясно, связан ли «жидкий стул, необильный» с соединением. C_{\max} для животного с жидким стулом составляет 158% от среднего значения для двух других животных. Все животные показывают уровни в крови > 5 нМ в течение 120 часов.

На фиг. 12C показана концентрация SEQ ID NO: 1 на 9 день после введения ALT-801 животным (обозначенным 2215, 2216 и 2217 на фиг. 12C), которым вводили 20 нмоль/кг SEQ ID NO: 1 (как ALT-801). У животного 2217 наблюдалась рвота на 2 день после введения, а C_{\max} составляла 225 нг/мл (58 нМ) по сравнению со средним значением 147 нг/мл у двух других животных в этом исследовании. Эти данные также указывают на то, что биологически эффективный уровень ALT-801, вероятно, составляет <5 нМ SEQ ID

NO: 1. Эта группа со средней дозой (20 нмоль/кг) демонстрирует незначительные признаки (1/3) рвоты. C_{max} при рвоте животного составляет 153% от среднего значения для двух других животных. У всех животных уровни в крови >5 нМ в течение 192 часов.

На фиг. 12D показана концентрация SEQ ID NO: 1 на 9 день после введения ALT-801 животным (обозначенным 3215, 3216 и 3217 на фиг. 12D), которым вводили 40 нмоль/кг SEQ ID NO: 1 (как ALT-801). У всех трех животных наблюдалась рвота, которая может быть связана с ALT-801 и C_{max} . Средняя C_{max} для этой группы составила 467 нг/мл (121 нМ). Эти данные также указывают на то, что биологически эффективный уровень ALT-801, вероятно, составляет <5 нМ SEQ ID NO: 1. Эта группа с высокой дозой (40 нмоль/кг) демонстрирует убедительные доказательства (3/3) рвоты. C_{max} для этой относительно однородной группы составляет 467 нг/мл (121 нМ). Все животные показывают уровни в крови >10 нМ на протяжении всего анализа (192 часа).

Доказательства побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта подтверждают наше предположение о том, что это связано с C_{max} , по меньшей мере, у НЧП (нечеловекообразных приматов). Если биологически эффективный уровень в крови <5 нМ, 10 нмоль/кг может быть более высокой дозой, чем необходимо. При введении ALT-801 ожидается накопление дозы. В воплощениях изобретения предлагается фармацевтический состав, содержащий ALT-801 в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ), приготовленный для подкожного введения, обеспечивающий C_{max} 150-200 нг/мл, при этом неблагоприятные побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта уменьшаются или устраняются, но ALT-801 эффективен в снижении уровня глюкозы в крови и /или для лечения ожирения.

Е. Исследования многократной дозы на яванских макаках

1. 6-Недельные исследования повторного дозирования на яванских макаках

Цели исследования

Цель этого исследования заключалась в оценке токсичности и токсикокинетики ALT-801 (содержащей SEQ ID NO: 1) при введении один раз в неделю в течение по меньшей мере 6 недель (всего шесть доз) путем подкожной инъекции яванским макакам и оценке обратимости, персистенции или отсроченного появления каких-либо эффектов после 4-недельной фазы восстановления. Исследование было проведено компанией Covance.

Животные

Самцы и самки яванских макак (28 особей/пол; *Macaca fascicularis*) азиатского происхождения были получены от Envigo Global Services Inc. (ранее Covance Research

Products) в Алисе, Техас. Животных акклиматизировали к испытательному помещению в течение по меньшей мере 30 дней до начала.

В начале введения дозы животные были в возрасте от 31 до 54 месяцев. За день до начала введения дозы масса тела колебалась от 2,2 до 4,2 кг у самцов и от 2,2 до 3,2 кг у самок.

Дизайн исследования

Самцов и самок яванских макак разделили на пять групп и дозы вводили, как указано в следующей таблице. Животным вводили дозу посредством подкожной инъекции в спинную область в дни 1, 8, 15, 22, 29 и 36 фазы дозирования в объеме 2,0 мл/кг. Контролем-носителем был буфер состава F58, который состоял из 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, 0,348% (масс./масс.) аргинина, 4,260% (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде (pH $7,7 \pm 0,1$).

Группа	№. животных (b)		Уровень дозы (мг/кг)	Предварительное дозирование ≥ 30 дней акклиматизации	Фаза дозирования							Фаза восстановления (b) 28 дней
	Самец	Самка			День 1	День 8	День 15	День 22	День 29	День 36	День 48	
1 (контроль) (a)	5	5	0	E	D	D	D	D	D	D	E	E
2 (ALT-801 0,03 мг/кг)	5	5	0,03	E	D	D	D	D	D	D	E	E
3 (ALT-801 0,06 мг/кг)	5	5	0,06	E	D	D	D	D	D	D	E	E
4 (ALT-801 0,18 мг/кг)	5	5	0,18	E	D	D	D	D	D	D	E	E
5 (ALT-801 0,25 мг/кг)	5	5	0,25	E	D	D	D	D	D	D	E	E

(a) Контроль = только контрольное вещество носителя.

(b) Два животных, предназначенных для оценки восстановления, прошли 4 недели восстановления после завершения фазы дозирования.

D = введение дозы; E = оценка

Оценка токсичности основывалась на смертности, клинических наблюдениях, массе тела, качественном потреблении пищи, офтальмологических наблюдениях, электрокардиографических (ЭКГ) измерениях, неврологических обследованиях, качественной частоте дыхания и клинической и анатомической патологии. Образцы крови были собраны для токсикокинетических оценок.

Описание испытываемого образца

Испытываемый образец	Хранение	Лот	Дата повторного тестирования ^b	Чистота ^a
ALT-801	Замороженный (от -10 до -30°C), защищенный от света осушителем	S548	19 Ноябрь 2020	95,22%

a Чистоту определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией на безводной основе. Был применен корректирующий фактор 1,192.

b Назначается в соответствии с Covance SOP в течение 365 дней с момента получения

Описание контрольного вещества-носителя

Контрольным веществом-носителем был буфер состава F58, который состоял из 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, 0,348 % (масс./масс.) аргинина, 4,260 % (масс./масс.) маннитола в деионизированной воде (рН $7,7 \pm 0,1$).

Состав испытуемого образца

Составы испытуемого образца готовили в контрольном веществе-носителе по меньшей мере один раз в неделю в соответствии с процедурой смешивания и распределяли для применения. Концентрации доз были скорректированы с учетом чистоты партии с использованием корректирующего фактора 1,192. рН состава каждого тестируемого состава при необходимости доводили до рН $7,7 \pm 0,1$ с использованием разбавленной соляной кислоты или гидроксида натрия. Приготовленные составы испытуемого образца стерильно фильтровали с использованием поливинилидендифторидных фильтров (ПВДФ) 0,2 мкм; постфильтрационная обработка проводилась в асептических условиях.

Состав контрольного вещества-носителя

Составы контрольного вещества-носителя готовили в Covance не реже одного раза в неделю в соответствии с процедурой смешивания и распределяли для применения. Приготовленные составы контрольного вещества-носителя стерильно фильтровали с использованием 0,2 мкм ПВДФ; обработку после фильтрации проводили с использованием асептической техники, а отфильтрованный раствор распределяли по дозирующим аликвотам для группы 1. Все значения концентрации ALT-801 в контрольной группе, получавшей носитель, были ниже нижнего предела количественного определения (<4,00 нг/мл).

Дозирование

Места введения дозы находились в дорсальной области лопатки каждого животного. Дозы чередовались между местами введения. Места введения дозы были

следующими: место введения дозы А: верхняя левая область лопатки, место дозы В: верхняя правая область лопатки, место дозы С: нижняя левая область лопатки, место введения дозы D: нижняя правая область лопатки. Следующие животные не получали дозу из-за снижения массы тела, результатов оценки состояния тела и ветеринарных рекомендаций в дни, указанные в следующей таблице.

Животное	Группа/Пол	День (дни) без дозы		Животное	Группа/Пол	День (дни) без дозы
P0302	4/М	8		P0803	4/Ф	8
P0605	2/Ф	22		P0804	4/Ф	8 и 22
P0701	3/Ф	8		P0805	4/Ф	8
P0702	3/Ф	8 и 22		P0901	5/Ф	8
P0703	3/Ф	8		P0902	5/Ф	8
P0704	3/Ф	8		P0903	5/Ф	8
P0705	3/Ф	8, 15 и 22		P0904	5/Ф	8
P0801	4/Ф	8		P0905	5/Ф	8
P0802	4/Ф	8				
F = самка; M = самец.				F = самка; M = самец.		

Токсикокинетический анализ

Токсикокинетический анализ включал параметры, перечисленные в следующей таблице.

Параметр	Описание
C_{max}	Максимальная наблюдаемая концентрация
T_{max}	Время максимальной наблюдаемой концентрации
AUC_{0-t}	Площадь под кривой от времени 0 до времени последней измеряемой концентрации, рассчитанная по линейному правилу трапеций
AUC_{0-168}	Площадь под кривой от 0 до 168 часов, рассчитанная по линейному правилу трапеций
AUC_{0-312}	Площадь под кривой от 0 до 312 часов, рассчитанная по линейному правилу трапеций (только для восстанавливающихся животных)
$T_{1/2}$	Период полувыведения, рассчитанный как $\ln(2)/\lambda_z$

Сводка средних токсикокинетических параметров ALT-801 в плазме обезьян представлена в таблице ниже. Все значения концентрации ALT-801 в контрольной группе, получавшей носитель, были ниже нижнего предела количественного определения (<4,00 нг/мл).

День	Доза группа	Уровень дозы (мг/кг)	Пол	C_{max} (нг/мл)	T_{max} (ч)	AUC_{0-t} ^a (ч*нг/мл)	AUC_{0-168} (ч*нг/мл)	AUC_{0-312} (ч*нг/мл)	$T_{1/2}$ (ч)
1	2	0,03	M	59,9	48	6070	6070	NA	56,9
			F	61,8	48	6140	6140	NA	56,1
			MF	60,9	48	6100	6100	NA	56,5
	3	0,06	M	91,9	48	8990	8990	NA	51,0
			F	107	48	11600	11600	NA	55,9
			MF	99,5	48	10300	10300	NA	53,7
	4	0,18	M	302	48	32300	32300	NA	60,4

			F	323	48	32300	32300	NA	62,3
			MF	312	48	32300	32300	NA	61,6
	5	0,25	M	290	24,0	32000	32000	NA	69,0
			F	342	48	32800	32800	NA	59,4
			MF	316	36,0	32400	32400	NA	63,0
36	2	0,03	M	64,1	48	7890	6520	8080	50,9
			F	65,9	30,0	7110	5970	7210	60,4
			MF	64,9	48	7500	6280	7640	54,5
	3	0,06	M	137	24,0	14500	12600	14700	58,4
			F	143	48	16100	14200	16100	62,2
			MF	140	36,0	15300	13400	15400	60,3
	4	0,18	M	401	24,0	39500	38900	39500	63,4
			F	383	48	34700	34900	34700	61,2
			MF	392	36,0	37100	36900	37100	62,3
	5	0,25	M	505	48	59300	47400	59300	60,7
			F	619	48	65400	61400	65400	63,2
			MF	562	48	62300	54400	62300	61,8

M = самцы, F = самки, MF = самцы и самки

Ветеринарные обработки и осмотры

Никаких ветеринарных проблем, связанных с ALT-801, отмечено не было. Никаких заметных офтальмологических нарушений на фазе дозирования отмечено не было. На основании этих результатов никаких офтальмологических обследований в фазе восстановления не проводилось. Во время фазы дозирования или восстановления не было отмечено каких-либо значительных неврологических нарушений. Электрокардиографические исследования не выявили связанных с ALT-801 изменений интервала PR, продолжительности QRS, интервала QT, интервала QTc или частоты сердечных сокращений через около 24 часа после введения дозы в 1 или 36 день фазы дозирования. Во время качественной оценки ЭКГ не наблюдалось аномальных кривых ЭКГ или аритмий.

Клинические лабораторные оценки

Никаких измененных результатов, связанных с ALT-801, не наблюдалось в гематологии, коагулограмме, клинической химии или результатах анализов мочи. Никаких связанных с ALT-801 изменений массы органов не было отмечено при терминальной или восстановительной аутопсии. Никаких макроскопических изменений, связанных с ALT-801, не наблюдалось при умерщвлении животных на терминальной стадии или стадии восстановления.

Изменение массы тела

Массу тела регистрировали для животных четыре раза в течение фазы перед

введением дозы, в день -1 фазы введения дозы (за день до начала введения дозы) и далее еженедельно (на основании дня -1) до дня 14 фазы введения дозы. Начиная с 14 дня фазы дозирования, массу тела измеряли два раза в неделю (на основе 14 дня) до конца фазы дозирования. Массу тела измеряли в дни 1, 8, 15, 22 и 28 фазы восстановления. Данные, представленные на Фигуре 13 и Фигуре 14, представляют собой изменение массы тела в % от дня 1 у самцов и самок, соответственно. При двух самых высоких дозах ALT-801 (0,18 мг/кг и 0,25 мг/кг) наблюдалось значительное снижение массы до 10% в течение периода дозирования как у самцов, так и у самок.

Клинические наблюдения

Во время дозирования или фазы восстановления не наблюдалось летальных исходов или эффектов, связанных с ALT-801 в отношении неврологических наблюдений, ЭКГ, клинической патологии, массы органов или макроскопических или микроскопических исследований.

Клинические наблюдения, связанные с ALT-801, у самок, которым вводили $\geq 0,03$ мг/кг/дозу, включали низкое потребление пищи. Никаких клинических наблюдений, связанных с ALT-801, не было отмечено у самцов, которым вводили $\geq 0,03$ мг/кг/дозу. Связанное с ALT-801 более низкое потребление пищи наблюдалось у самок, которым вводили $\geq 0,03$ мг/кг/дозу. Никаких связанных с ALT-801 изменений в потреблении пищи не наблюдалось у самцов, которым вводили $\geq 0,03$ мг/кг/дозу. Более низкое потребление пищи наблюдалось на 19 и 36 дни фазы дозирования у самок, получавших $\geq 0,03$ мг/кг/дозу ALT-801, с дозозависимым увеличением воздействия.

Рвота наблюдалась один раз на 2 день фазы дозирования у одной самки (животное P0701), которой вводили 0,18 мг/кг/дозу, и у одной самки (животное P0901), которой вводили 0,25 мг/кг/дозу. Это наблюдение не сохранялось и не отражало дозозависимого увеличения воздействия. Поскольку дозозависимого увеличения возникновения рвоты не наблюдалось, и эти наблюдения не сохранялись, это не считалось клиническим наблюдением, связанным с ALT-801.

Никаких клинических наблюдений, связанных с ALT-801, не было отмечено в фазе восстановления.

Одну самку (животное P0604), которой вводили 0,03 мг/кг, умертвили с незапланированным интервалом на 26 день фазы восстановления. Клинические наблюдения, отмеченные для этого животного, включали гипоактивность и сгорбленность, бледность слизистых оболочек, грубую шерсть, истощенный внешний вид и темные засохшие фекалии на хвосте, с жидкими фекалиями в кювете, которые не смешивались. Это незапланированное умерщвление не имело отношения к ALT-801,

поскольку животное P0604 находилось в фазе восстановления, и клинические проявления, наблюдаемые у этого животного, не наблюдались у других животных, которым вводили ALT-801.

Другие клинические наблюдения включали опухший хвост, струпья, аномальный цвет кожи, жидкие/несформированные фекалии, аномальный цвет волосяного покрова, истончение волосяного покрова и красные выделения из вульвы. Они появлялись довольно редко, были преходящими или встречались с частотой, сравнимой с контрольной группой, и поэтому они не считались связанными с ALT-801.

Вывод

В заключение необходимо отметить, что самцам и самкам обезьян вводили контрольное вещество-носитель или 0,03, 0,06, 0,18 или 0,25 мг/кг/дозу ALT-801 посредством подкожной инъекции один раз в неделю.

Как показано на фигурах 13 и 14, две самые высокие дозы ALT-801, испытанные в исследовании (0,18 мг/кг и 0,25 мг/кг), приводят к значительной потере массы до 10% в течение периода дозирования как у самцов, так и у самок. Этот эффект не был связан с какой-либо смертностью или желудочно-кишечными явлениями, которые считались связанными с введением всех протестированных доз.

Никаких побочных эффектов, связанных с ALT-801, не наблюдалось во время дозирования или периода восстановления, а уровень, при котором не наблюдалось вредного воздействия, составляет 0,25 мг/кг/дозу. Этот уровень дозы соответствовал значениям средней пиковой концентрации (C_{max}) и площади под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) 562 нг/мл и 62300 ч*нг/мл, соответственно.

Г. Резюме данных примера 4 на крысах и обезьянах: эти исследования с многократным введением не показали значительных побочных эффектов у крыс или яванских макак. Снижение потребления пищи и снижение массы тела, которые были ожидаемыми фармакологическими свойствами ALT-801, были отмечены при средних и высоких дозах, но рвоты, связанной с ALT-801, не наблюдалось. Высокие дозы 0,45 мг/кг/неделю и 0,25 мг/кг/неделю были установлены как уровни, при которых не наблюдалось вредного воздействия, у крыс и обезьян, соответственно. Оценки фармакологической безопасности, которые были включены в общие токсикологические исследования, были лишены неврологических, сердечных или респираторных нарушений. Как уже отмечалось, снижение потребления пищи и наблюдения за снижением массы были ожидаемыми целевыми эффектами ГПП-1 и агонизма глюкагона. Эти эффекты были более выражены у крыс по сравнению с обезьянами, что, возможно, связано с более частым циклом дозирования (первоначально QD), соответствующим более короткому

периоду полувыведения у крыс. С точки зрения воздействия, как C_{max} , так и площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC_{0-168} ч) (т.е. в течение интервала дозирования) были удивительно схожими у крыс, которым вводили дозу 0,15 мг/кг в течение 3 дней и 4 дня в течение недели (еженедельная доза 0,45 мг/кг/неделю) и обезьянам дозу 0,25 мг/кг/неделю один раз в неделю. У крыс C_{max} и AUC_{0-168} достигали около 500 нг/мл и 42 600 нг*ч/мл, соответственно. Аналогично, воздействие на обезьян составляло 5560 нг/мл и 54 400 нг*ч/мл, соответственно.

Пример 5. Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) мышей

В исследовании на мышах ОВД-НАСГ в общей сложности 5 групп ОВД-НАСГ (n = 12) самцов мышей C57BL/6J получали диету Amylin с высоким содержанием жиров, содержащую 40 % жира (включая трансжиры), 18 % фруктозы, 2 % холестерина, в течение 29+ недель. Все мыши, участвующие в эксперименте, были предварительно подвергнуты биопсии, стратифицированы на основе биопсии печени (включены только животные с фиброзом 1 или выше и стеатозом 2 или выше) и стратифицированные животные были разделены на группы на основе иммуноокрашивания Colla1. В общей сложности в течение 12 недель группы животных с ежедневным введением дозы были следующими: 1) носитель, 2) SEQ ID NO: 1, 5 нмоль/кг (п/к, ежедневно), 3) SEQ ID NO: 1, 10 нмоль/кг (п/к, ежедневно), 4) Элафибранор, 78 мкмоль/кг (п/о, ежедневно), 5) Семаглутид, 10 нмоль/кг (п/к, ежедневно). Массу тела (МТ) измеряли ежедневно в течение всего периода исследования, потребление пищи ежедневно в течение первых 14 дней, затем еженедельно до конца исследования. В терминальной плазме измеряли уровни АЛТ/АСТ/ТГ/ОХ. Терминальное удаление печени и забор образцов проводили до и после оценки активности НАЖБП (ПАН; окрашивание гематоксилином), включая стадию фиброза (Пикросириус красный, ПСК). Терминальную гистологию выполняли для выявления стеатоза, количественного определения Colla1 и галектина-3. Терминальное обследование печени включало ТГ + ОХ (извлечение и измерение). Терминальные биоптаты печени были подготовлены: 1) 4% PFA для гистологии, 2) свежемороженая печень для биохимии, 3) свежемороженая печень для выделения РНК и секвенирования РНК.

Было показано, что введение ALT-801 (фармацевтический состав, содержащий SEQ ID NO: 1) снижает массу тела у модельных мышей с НАСГ, введение ALT-801 и семаглутида вызывало быстрое и дозозависимое снижение массы тела, которое стабилизировалось в остальной части исследования (Фиг. 15). Введение ALT-801 (5 нмоль/кг и 10 нмоль/кг), а также элафибранора (78 мкмоль/кг) и семаглутида (10 нмоль/кг) приводила к статистически значимому снижению массы тела по сравнению

с контролем НАСГ ($p \leq 0,001$). Снижение массы, достигнутое у животных, получавших ALT-801, зависело от дозы и достигало -25% в течение 4 недель после введения, что примерно вдвое превышает снижение массы, вызванное семаглутидом в эквивалентной дозе. Важно отметить, что ALT-801 (10 нмоль/кг) снижал массу тела в группе до диапазона массы тела худощавого нормального животного для этой линии мышей (~ 30 г), а затем поддерживал этот диапазон. На 63 день (9-я неделя лечения) группе, получавшей носитель, случайно дали однократную дозу 10 нмоль/кг ALT-801, что привело к быстрому снижению массы и последующему восстановлению к показателю носителя в течение ~ 10 дней.

Было также обнаружено, что SEQ ID NO: 1 демонстрирует превосходное снижение показателя активности НАЖБП (ПАН) по сравнению с элафибранором и семаглутидом. См. фиг. 16. Как показано на фиг. 16, доза 5 нмоль/кг SEQ ID NO: 1 демонстрировала снижение на 32%, а доза 10 нмоль/кг SEQ ID NO: 1 демонстрировала снижение на 61% по сравнению с 42% для элафибранора и 18% для семаглутида по сравнению с началом введения (день 0). В контрольной группе наблюдалось увеличение на 6%. Показатель ПАН улучшился во всех группах, получавших лечение, в конце периода лечения (Фиг. 15). Процентное изменение показателя ПАН, достигнутое в группах, получавших лечение элафибранором и семаглутидом, было значительно меньше, чем процентное изменение, достигнутое в группе, получавшей 10 нмоль/кг ALT-801 (оба значения $p < 0,0001$). Все животные в группе, получавшей ALT-801 в дозе 10 нмоль/кг, достигли балла по шкале ПАН ≤ 3 .

Как раскрыто в настоящем изобретении, затем в конце периода лечения наблюдалось снижение содержания жира в печени мышей, получавших низкие и высокие дозы ALT-801, до содержания жира в нормальном диапазоне (фиг. 17). Введение низких и высоких доз ALT-801 приводило к значительному снижению массы печени по сравнению с контролем-носителем для НАСГ, семаглутидом и элафибранором ($p < 0,01$; фиг. 17). Средняя масса печени мышей, получавших элафибранор и семаглутид, была статистически значимо выше, чем масса печени у мышей, получавших высокие дозы (10 нмоль/кг) ALT-801 ($p < 0,0001$ и $p < 0,01$, соответственно). Масса печени обеих групп, получавших ALT-801, была аналогична массе печени худощавых нормальных мышей, которых кормили стандартным кормом.

Было также обнаружено, что введение ALT-801 (фармацевтический состав, содержащий SEQ ID NO:1) приводит к более выраженному положительному влиянию на фиброз, что измеряется по содержанию в печени Col1A1 и галектина-3, по сравнению с элафибранором, семаглутидом или контрольным носителем НАСГ. Введение низких и

высоких доз ALT-801 приводила к значительному снижению терминальных уровней Col1A1 и галектина-3 в печени по сравнению с контрольным носителем НАСГ, элафибраном и семаглутидом ($p < 0,0001$; Фиг. 17). Средний уровень Col1A1 в печени мышей, получавших элафибран, был статистически значимо выше, чем уровень Col1A1 в печени у мышей, получавших высокие дозы (10 нмоль/кг) ALT-801 ($p < 0,0001$). Средние уровни галектина-3 в печени мышей, получавших элафибран и семаглутид, были статистически значимо выше, чем уровни галектина-3 в печени у мышей, получавших высокие дозы (10 нмоль/кг) ALT-801 (оба значения $p < 0,0001$).

Также было обнаружено, что введение ALT-801 (фармацевтический состав, содержащий SEQ ID NO: 1) нормализует триглицериды печени (ТГ), общий холестерин (ОХ) и АЛТ плазмы. Введение низких и высоких доз ALT-801 приводило к значительно более низким уровням ТГ ($p < 0,01$) и ОХ ($p < 0,0001$) в печени по сравнению с контрольным носителем НАСГ, семаглутидом и элафибраном (фиг. 18). Средние уровни ТГ в печени мышей, получавших элафибран и семаглутид, были статистически значимо выше, чем уровни ТГ в печени у мышей, получавших высокие дозы (10 нмоль/кг) ALT-801 ($p \leq 0,01$ и $p \leq 0,0001$, соответственно; односторонний дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Даннетта на кратность). Точно так же средние уровни ОХ в печени мышей, получавших элафибран и семаглутид, были статистически значимо выше, чем уровни ОХ в печени у мышей, получавших высокие дозы (10 нмоль/кг) ALT-801 (оба значения $p < 0,0001$).

Введение низких и высоких доз ALT-801 приводило к значительно более низким конечным уровням АСТ в плазме по сравнению с контролем, получавшим контрольный носитель НАСГ ($p < 0,001$), а также к значительно более низким конечным уровням АЛТ в плазме по сравнению с контрольным носителем НАСГ, элафибраном и семаглутидом ($p < 0,01$; Фиг. 18). Средний уровень АЛТ в печени мышей, получавших элафибран и семаглутид, был статистически значимо выше, чем уровень АЛТ в плазме у мышей, получавших высокие дозы (10 нмоль/кг) ALT-801 ($p < 0,0001$ и $p < 0,01$, соответственно), что находилось в пределах нормального диапазона для этой линии.

Секвенирование РНК показало, что лечение с помощью SEQ ID NO:1 превосходило лечение элафибраном или семаглутидом, что приводило к глубокому подавлению экспрессии воспалительных и профибротических генов, особенно в пути звездчатых клеток, ответственном за развитие фиброзного поражения.

В группе лечения, получавшей высокую дозу ALT-801 (фармацевтический состав, содержащий SEQ ID NO: 1), наблюдалось наибольшее количество дифференциально экспрессируемых генов (~8000) по сравнению с элафибраном (~5800) или семаглутидом (~2800) (фиг. 19). Был проведен анализ основных компонентов 500 наиболее изменчивых

генов печени, что привело к четкой группировке образцов, связанных с лечением (Фиг. 19). PC1 объяснил 52% изменчивости, а PC2 объяснил 21% изменчивости.

Лечение мышей с НАСГ 10 нмоль/кг ALT-801 приводило к модуляции генов, влияющих на использование и транспорт жира, включая статистически значимое увеличение уровня экспрессии карнитинпальмитоил-трансферазы 1a (CPT-1) ($p < 0,05$), глицерин-3-фосфатацилтрансферазы 4 (GPAT-4) ($p < 0,001$) и фактора транскрипции, связывающий стеринный регуляторный элемент-1 (ФТССРЭ-1) ($p < 0,05$), по сравнению с контрольным носителем НАСГ после коррекции генетического множественного тестирования (фиг. 20). Лечение мышей с НАСГ более низкой дозой ALT-801 (5 нмоль/кг) также приводило к повышению экспрессии CPT-1 ($p < 0,05$) и GPAT-4 ($p < 0,001$) (фиг. 18). Экспрессия синтазы жирных кислот (FASN) ($p < 0,05$), глицерин-3-фосфатацилтрансферазы 2 (GPAT2) ($p < 0,001$), стеароил-кофермента А-десатуразы 1 (SCT-1) ($p < 0,05$) и антигена CD36 (CD36) ($p < 0,001$) была снижена у мышей, получавших ALT-801 в дозе 10 нмоль/кг, по сравнению с контролем, получавшим контрольный носитель НАСГ, после коррекции генетического множественного тестирования (фиг. 20). Экспрессия CD36 также была значительно ниже у мышей, получавших 5 нмоль/кг ALT-801 ($p < 0,05$) (фиг. 20). Изменения экспрессии генов, наблюдаемые у мышей после лечения семаглутидом, не были статистически значимыми, однако группа, получавшая элафибранор, имела значительно более низкие уровни GPAT2 ($p < 0,001$) и GPAT4 ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой, получавшей контрольный носитель НАСГ.

Лечение мышей с НАСГ с помощью ALT-801 приводило к супрессии профиброзных генов пути звездчатых клеток. Пролиферация миофибробластов и маркеры звездчатых клеток А-SMA (ACTA2), фактор роста тромбоцитов (PDGFB) и трансформирующий фактор роста-бета (TGFB1) (Фиг. 20) были статистически значимо снижены в группах лечения, получавших ALT-801 в низких или высоких дозах по сравнению с контрольным носителем НАСГ (все $p < 0,01$, после коррекции генетического множественного тестирования). Экспрессия А-SMA ($p < 0,001$) и TGFB1 ($p < 0,05$) также статистически значимо снижалась у мышей с НАСГ, получавших семаглутид, в то время как экспрессия PDGF ($p < 0,01$) статистически значимо снижалась у мышей с НАСГ, получавших элафибранор.

Лечение мышей с НАСГ с помощью ALT-801 приводило к супрессии генов гибели клеток. Маркеры гибели гепатоцеллюлярных клеток и маркеры пироптоза, отсутствующие при меланоме (AIM2), фактор активации протеазы ICE (IPAF) и киназа, взаимодействующая с рецептором 3 (RIPK3) (Фиг. 20), были статистически значимо снижены в группах лечения, получавших ALT-801 в низкой или высокой дозе по

сравнению с контрольным носителем НАСГ (все $p < 0,01$, после коррекции генетического множественного тестирования). Экспрессия TLR4 ($p < 0,01$) также статистически значимо снижалась у мышей с НАСГ, получавших семаглутид. При обработке элафибранором не было отмечено статистических различий в генах гибели клеток.

Лечение мышей с НАСГ с помощью ALT-801 приводило к подавлению генов воспаления печени. Провоспалительные сигнальные маркеры c-Jun (JUN), c-FOS (FOSB) и толл-подобный рецептор 4 (TLR4) (Фиг. 20) были статистически значимо снижены в группах лечения, получавших ALT-801 в низкой или высокой дозе, по сравнению с контрольным носителем НАСГ, за исключением c-FOS в группе с низкой дозой ALT-801 (все $p < 0,01$, после поправки на множественное тестирование генов). Экспрессия TLR4 ($p < 0,01$) также статистически значимо снижалась у мышей с НАСГ, получавших семаглутид. У мышей с НАСГ, получавших элафибранор, не было отмечено статистически значимых изменений в генах FOSB, JUN или TLR4.

Пример 6. Фармакодинамический (ФД) и фармакокинетический (ФК) профили и еженедельное дозирование

Этот пример относится к исследованию серии аналогов пептидов с различным балансом агонистической активности в отношении рецепторов РГПП-1 и РГКГ человека, а также к аналогам, имеющим продолжительность действия, предполагающую пригодность для введения пациентам один раз в неделю (QW), включая, без ограничения указанным, SEQ ID NO. 1 (ALT-801). Ниже показано сравнение некоторых пептидных аналогов данного изобретения с ГПП-1 и глюкагоном:

Пептид		SEQ ID No.
	1 5 10 15 20 25 30	
ГПП-1	H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R G	30
глюкагон	H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T	
Аналоги	H <u>Alb</u> Q G T F T S D Y S K Y L D E* <u>Z1</u> A A K* E F I <u>Z2</u> W L L Q T NH ₂	31
		33

Неприродные аминокислоты в аналогах подчеркнуты и выделены курсивом; E* и K* указывают на наличие лактамной связи в боковой цепи между Glu16 и Lys20 для всех аналогов и Z1 и Z2 представляют собой остаток Lys, конъюгированный ацилированием с различными гликолипидами, происходящими из поверхностно-активных веществ, модификаторами продолжительности действия (т.е. поверхностно-активными веществами, обсуждаемыми ниже). Когда в аналогах отсутствует Z1 или Z2, его заменяют на Q (Gln). Пептидные аналоги, изученные в этом Примере, показаны в таблице 14 ниже:

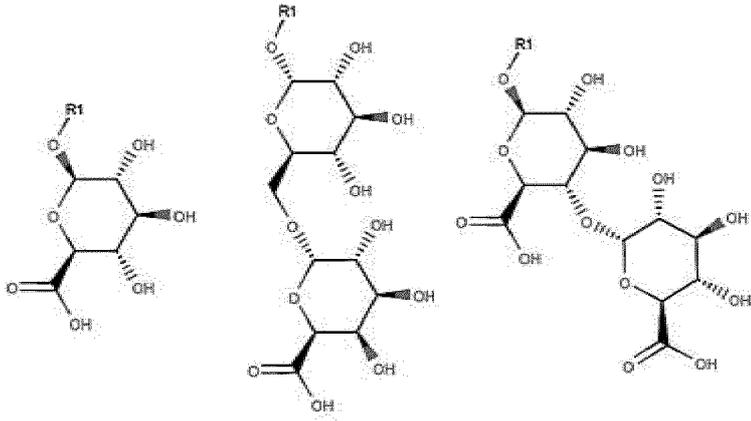
Таблица 14

Cmpd#	1			5				10			15			20		7		25			30	SEQ ID NO.											
Ref27, сема	H	Aib	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q		A	A	X	E	F	I	A	W	L	V	R	G	R	G	11
ГПП-1 7-37	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	O		A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R	G	30
Глюкагон	H	S	0	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	S	R		R	A	O	D	F	V	Q	W	L	M	N	T			31
Ref8, #32	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O		A	A	K*	E	F	I	C	W	L	M	N	T	NH ₂		32
1	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	Д	K*	E	F	I	Lys(GC8)	W	L	L	Q	T	NH ₂		12
2	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(GC10)	W	L	L	Q	T	NH ₂		13
3	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E'	Q		A	Д	K*	E	F	I	Ly3(GC12)	W	L	L	Q	T	NH ₂		14
4	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(GC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		15
5	H	Aib	G	3	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Ly3(GC16)	W	L	L	G	T	NH ₂		16
6	H	Aib	C	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O		A	A	K*	E	F	I	Lys(GC18)	W	L	L	G	T	NH ₂		17
7	H	Aib	G	3	T	F	T	S	:	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(MC12)	W	L	L	G	T	NH ₂		18
8	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O		A	A	K*	E	F	I	Lys(MeC12)	W	L	L	G	T	NH ₂		19
9	H	Aib	G	3	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Ly3(MeC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		20
10	H	Aib	0	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	O		A	A	K*	E	F	I	Lys(MeC16)	W	L	L	G	T	NH ₂		21
11	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(MeC18)	W	L	L	G	T	NH ₂		22
12	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Lys(MeC14)		A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	G	T	NH ₂		23
13	H	Aib	G	3	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(S,GC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		24
14	H	Aib	G	3	T	F	T	S	C	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Ly3(S ₂ GC14)	W	L	L	G	T	NH ₂		25
15	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(GC16c)	W	L	L	G	T	NH ₂		26
16	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Q		A	A	K*	E	F	I	Lys(GC18c)	W	L	L	Q	T	NH ₂		27
17	H	Aib	G	G	T	F	T	S	D	Y	S	K	Y	L	D	E*	Lys(GC18c)		A	A	K*	E	F	I	Q	W	L	L	G	T	NH ₂		1

Аналоги, отмеченные звездочкой, имеют лактам боковой цепи от Glu16 до Lys20; G, M, Me в скобках означают D-глюкозидные, D-мальтозидные, D-мелибиозидные связи, соответственно. S1 и S2 означают спейсер остатка α -Lys или γ -Glu, соответственно. Sn означает метиленовую цепь из n атомов углерода; c означает карбоксилат на конце цепи. X в семаглутиде означает остаток Lys, ацилированный модификатором пролонгации γ Glu-2xOEG (см. ссылку 27), содержащим октадекандиовую кислоту на γ Glu/коротком-PEG спейсере. Соединение № 33 в ссылке 8 относится к соединению # 32, алкилированному по Cys 24 с помощью 40 кДа ПЭГ через малеимидный линкер.

В Таблице 1 «Cmpd #» обозначает аналоги 1-17.

Структуры используемых в данной заявке иллюстративных реагентов на основе гликолипидных поверхностно-активных веществ: 1-O-алкил β -D-глюкопиранозидуруновая кислота, 1'-O-алкил [β -(α -D-галактопиранозидуруновая кислота-(1 \rightarrow 6'))]-D-глюкозид или 1-O-алкил β -[β -D-глюкопиранозидуруновая кислота-(1 \rightarrow 4)]-D-глюкопиранозидуруновая кислота, соответственно, показаны ниже:



Реагенты получают из соответствующего 1-О-алкил β-D-глюкозида, 1-О-алкил β-D-мелибиозида или 1-О-алкил β-D-маннозида путем химически селективного окисления первичных ОН-групп. Алкильные группы R1 могут быть прямыми, разветвленными, насыщенными, ненасыщенными, нормальными или модифицированными функциональными группами. Известно, что физические свойства и мицеллярный характер поверхностно-активных веществ зависят от конкретных комбинаций головной и хвостовой групп. В этом описании длина алкильной цепи R1 варьирует от C8 до C18. Связывание модификатора гликолипидов осуществляется через 6- или 6'-(дистальную) карбоновую кислоту, обычно путем образования амида с ε-аминофункцией остатка Lys в пептиде. Например, такие поверхностно-активные реагенты обычно получают в компании CS Bio Co (Менло-Парк, Калифорния) из коммерчески доступных неионогенных поверхностно-активных веществ (Anatrace, Моми, Огайо) путем химически селективного окисления первичных спиртовых групп таких поверхностно-активных веществ с использованием 2,2,6,6-тетраметилпиперидинилокси (ТЕМПО)-опосредованного окисления в присутствии воды с использованием [бис(ацетокси)-иод]бензола (БАИБ) в качестве окислителя. Эта реакция завершается с высокой химической селективностью, обеспечивая практически количественный выход желаемой первичной карбоновой кислоты с НОАс и Ph-I в качестве летучих, единственных побочных продуктов. Простая лиофилизация водного раствора с рН 3 обеспечивает желаемую свободную карбоновую кислоту, готовую для активации и связывания со свободной аминогруппой в качестве предпоследней стадии твердофазного синтеза перед расщеплением. При желании можно применить дополнительную очистку путем растирания с Et₂O для удаления следов ТЕМПО, но это не обязательно для используемых в данной заявке процедур твердофазного синтеза. Для более масштабного окисления можно использовать альтернативные стехиометрические окислители (например, гипохлорит натрия). Связывание реагентов EuPort происходит медленнее, чем обычное связывание аминокислот, обычно для его завершения требуется ≥ 8 часов при низком молярном

избытке. Дополнительные гликолипидные поверхностно-активные вещества получают реакцией гликозилирования Кёнигса-Кнорра/Хелфериха на соответствующем алкиловом спирте и защищенном гликозилбромиде.

В твердофазном пептидном синтезе, используемом для получения аналогов пептидов этого примера, использовали стандартные протоколы $N\alpha$ -Fmoc (защита трет-бутилоксикарбонильной и N-тримитильной боковых цепей; плюс Arg(Pbf); $N\alpha$ -Boc-His(Trt)) на амидной смоле Ринка в CS Bio Co (Менло-Парк, Калифорния), ортогональную защиту в положениях Glu¹⁶ и Lys²⁰ (аллиловый эфир и N ϵ -аллилоксикарбонил, соответственно). Положение Lys, подлежащее модификации с помощью конъюгации EuPort, защищали N ϵ -1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутилом (iv-Dde), селективно удаляя защиту на предпоследней стадии с помощью 4% гидразина в диметилформамиде (ДМФ) и в сочетании с соответствующим реагентом EuPort (в виде карбоновой кислоты) с использованием диизопропилкарбодиимида (ДИК) и гидроксibenзотриазола (ГБТ) (или другой связующей добавки, по желанию). Конечные пептиды расщепляли и снимали защиту с использованием трифторуксусной кислоты (ТФУ)/воды/триизопропилсилана (95:2,5:2,5), осаждали эфиром, промывали эфиром, сушили и очищали с помощью соответствующей обращенно-фазовой (C-18) ВЭЖХ с использованием ацетонитрила в буферных градиентах ТФУ (0,1%). Соединения характеризовали с помощью аналитической ВЭЖХ/масс-спектрометрии с использованием аналогичных буферов на аналитических колонках, и все протестированные аналоги имели чистоту $\geq 95\%$ (таблица 15).

Таблица 15

№ аналога (SEQ ID NO.)	Ожидаемая молекулярная масса (Да)	Фактическая молекулярная масса (Да)	^[a] Чистота (%)	^[b] Удержание ВЭЖХ к' (способ)
1 (12)	3703,15	3702,42	98	3,6 (a)
2 (13)	3731,15	3731,42	99	2,7 (b)
3 (14)	3759,22	3769,04	96	2,6 (c)
4 (15)	3787,22	3786,88	95	2,8 (c)
5 (16)	3815,22	3815,52	96	4,8 (d)
6 (17)	3843,22	3843,12	96	3,9 (d)
7 (18)	3935,35	3934,66	96	4,1 (b)
8 (19)	3921,35	3921,15	95	3,4 (b)
9 (20)	3949,42	3950,22	98	1,5 (d)
10 (21)	3977,47	3976,84	99	3,0 (d)

11 (22)	4005,55	4004,64	96	4,1 (d)
12 (23)	3977,47	3977,67	95	3,8 (c)
13 (24)	3915,39	3915,72	99	3,9 (b)
14 (25)	3916,33	3916,98	95	4,2 (e)
15 (26)	3845,28	3845,16	95	2,9 (b)
16 (27)	3873,34	3873,46	95	5,9 (b)*
17 (1)	3873,34	3872,94	95	3,4 (b)

^aЧистоту оценивали путем интеграции аномальных пиков после инъекции.

^bk' представляет собой независимую от системы ВЭЖХ меру удержания, $k' = (t_r - t_0)/t_0$. Анализы проводили на колонках Phenomenex Luna 5 μ C-18 250x4,6 мм со скоростью 1 мл/мин; *16 аналогично анализировали на колонке Polymer Labs PLRP-S 100A 8 мкм 250x4,6 мм. Градиенты элюирования составляют от низкого % В до высокого % В (В представляет собой % CH₃CN в 0,1%ТФУ) за мин.: a = от 35 до 65% за 20; b = от 40 до 70% за 20; c = от 45 до 75% за 20; d = от 50 до 80 за 20; e = от 30 до 90 за 20.

A. Анализ активации рецепторов *in vitro*

Анализы активации рецепторов проводили в лабораториях DiscoverX (Фремонт, Калифорния) с использованием человеческого РГПП-1 и РГКГ, клонированных в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (LeadHunter Discovery Services; продукт анализа 86-0007D cAMP Hunter™ с использованием РГПП1 и РГКГ человека; анализы накопления цАМФ в целой клетке); использовались клеточные линии: cAMP Hunter™ CHO-K1 GCGR Gs, каталожный номер 95-0042C2 и cAMP Hunter™ CHO-K1 GLP1 Gs, каталожный номер 95-0062C2; считывание накопленного цАМФ производили с помощью данных анализа HitHunter cAMP XS+). Клеточные линии поддерживали в DiscoverX и инкубировали с тестируемыми агентами в течение 30 минут при 37°C для накопления цАМФ. Результаты оценивали в DiscoverX с использованием внутренних параметров и характеристик литературных стандартов (экзендин-4 и глюкагон, для РГПП-1 и РГКГ, соответственно) параллельно для того, чтобы привести их в подлежащий сообщению вид. Описанные в данной заявке результаты получены из отдельных анализов, проведенных на клетках в двух повторах, и данные были заново нанесены на график в Prism 5 для получения данных pEC₅₀ (SE). Случаи цитотоксичности наблюдались в любом из данных анализов. Большинство анализов проводили в присутствии 0,1% БСА, чтобы свести к минимуму неспецифическое связывание, но анализы на 15-17 также тестировали в присутствии 0,1% куриного овальбумина (ОВА). Для этих соединений, которые очень прочно связываются с БСА (>99%; данные не показаны), его присутствие может исказить результаты, делая соединения менее эффективными.

В. Стабильность в плазме *in vitro*

Тест на стабильность проводился в Climax Laboratories, Inc. (Сан-Хосе, Калифорния). Образцы испытуемых продуктов (около 0,5 мг, амид ГПП-1 7-36, Bachem; аналог 3; аналог 5) растворяли в объединенной плазме человека (Bioreclamation LLC, партия - BRH 392992) в концентрации от 1 до 10 мкМ, и уровни соединений, остающиеся в указанные моменты времени, количественно определяли, как описано в биоаналитическом методе (2.54). Динамика времени/концентрации (Фиг. 22) показала, что амид ГПП-1 7-36 быстро разрушался до уровня ниже предела количественного определения (BQL; около 2 нг/мл) через 4 часа инкубации, в то время как количества аналогов 3 и 5 оставались неизменными к 8 часу, что указывает на их превосходную интактную стабильность в присутствии объединенной человеческой плазмы.

Также исследовали стабильность аналога 17 (SEQ ID NO: 1, ALT-801) в плазме, в частности, его связывание с белком плазмы альбумином. Предполагается, что такое нековалентное связывание с альбумином замедляет расщепление пептида в плазме и приводит к снижению почечного клиренса. Связывание ALT-801 (15000 нг/мл) с белками плазмы крысы, собаки, обезьяны и человека оценивали с помощью ультрацентрифугирования в течение шести часов. Объединенную плазму получали, по меньшей мере, от трех крыс Sprague Dawley, биглей и яванских макаков. Объединенную человеческую плазму получали от трех человек мужского пола (которые, как сообщается, не принимали никаких лекарств в предыдущие 7 дней до сбора). В качестве антикоагулянта использовали K2EDTA. pH каждого пула плазмы при необходимости доводили около до pH 7,4 с помощью соляной кислоты или гидроксида натрия. Ультрацентрифугирование проводили с использованием поликарбонатной пробирки для ультрацентрифугирования, помещенной в ротор S80 AT2, при 37°C и 357000 g в течение 6 часов для отделения PUC (надосадочной жидкости) от белков плазмы. После центрифугирования PUC анализировали с помощью ЖХ-МС для расчета связывания с белками. Связывание с белками оценивали как процент несвязанного = $(C_u / C_o) \times 100$ и процент связанного = $100 - \text{процент несвязанного}$, где C_o представляет собой концентрацию испытуемого образца в плазме до ультрацентрифугирования (нг/мл), а C_u - концентрацию испытуемого вещества в плазме в ультрацентрифугате (нг/мл). Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16

Процент связанного и несвязанного ALT-801 (15000 нг/мл) в плазме крыс, собак, обезьян и человека после ультрацентрифугирования при 37°C в течение 6 часов

Вид	Начальная концентрация (нг/мл)		Процент теоретического	ультрацентрифугата (нг/мл)			Процент ALT-801				
	Пов	Среднее		Пов	Среднее	СО	Несвязанный	Среднее	Связанный	Среднее	СО ^a
Крыса	6000	5980	39,9	11,0	14,4	4,89	0,184	0,241	99,8	99,8	0,0817
	5960			20,0			0,334		99,7		
	6200			12,2			0,204		99,8		
Собака	5950	6070	40,4	16,1	12,4	4,34	0,265	0,205	99,7	99,8	0,0716
	6180			13,5			0,223		99,8		
	7270			7,62 ^b			0,126		99,9		
Обезьяна	15600	14500	96,4	7,39	7,05	0,257	0,0511	0,0487	100	100	0,00178
	14500			6,86			0,0474		100		
	13300			7,10			0,0491		100		
				6,84			0,0473		100		
Человек	7580	7610	50,7	НПКО	16,2	NA	NA	0,213	NA	99,8	NA
	7630			8,87 ^b			0,117		99,9		
	7780			23,5			0,309		99,7		

НПКО Ниже предела количественного определения.
 Конц. Концентрация.
 Пов Повтор
 СО Стандартное отклонение
^a Стандартное отклонение применяется как к связанным, так и к несвязанным процентам.
^b Значение НПКО, показано экстраполированное значение.

Средний процент связывания ALT-801 с белками составил 99,8% в плазме крыс, 99,8% в плазме собак, 100% в плазме обезьян и 99,8% в плазме человека. Эти результаты показали, что ALT-801 имеет мощное связывание с белками ($\geq 99,8\%$) в плазме крыс, собак, обезьян и человека.

С. Фармакокинетика

Анализы ФК и ФД проводили в соответствии со стандартными протоколами на крысах в Charles River Laboratories (Шрусбери, Массачусетс) и на мышах db/db в JAX Laboratories (Сакраменто, Калифорния). ФК-исследования также проводились на геттингенских мини-свиньях в MPI Research (Маттаван, Мичиган) или на юкатанских мини-свиньях. В месте инъекции не наблюдалось реакций, связанных с соединением, для каких-либо протестированных соединений. Биоаналитический анализ с помощью ЖХ/МС/МС проводили в Climax Laboratories, Inc. (Сан-Хосе, Калифорния) или, для

исследования юкатанских мини-свиней, в Frontage Laboratories, Inc. (Экстон, Пенсильвания).

D. Фармакокинетика у крыс

ФК-поведение 17 (ALT-801) и семаглутида, после однократного подкожного введения дозы 10 нмоль/кг оценивали в Charles River Laboratories на самцах крыс CRL:CD(SD) (250–300 г). И ALT-801, и семаглутид были приготовлены в концентрации 0,1 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,05% tween 80, при pH ~8. Образцы крови (~300 мкл) собирали через 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 и 144 ч после введения дозы (n = 4 на момент времени) в охлаждаемые льдом пробирки с K2EDTA и хранили на льду до отделения плазмы центрифугированием при 2200 об/мин в течение 10 мин при 5°C. Концентрации ALT-801 и семаглутида в плазме определяли, как указано в биоаналитическом методе (2.5.3) ниже.

1. Фармакокинетика у геттингенских мини-свиней

В этом исследовании используется дозирование кассетного типа, чтобы свести к минимуму использование крупных животных, но с подкожной инъекцией в отдельные места, чтобы исключить влияние каждого соединения на поглощение другого соединения. Всего для исследования были отобраны два самца геттингенских мини-свиней. Животных содержали парой в клетках с фальшполом. Масса животных составляла приблизительно 11-15 кг при переводе и возраст животных составлял около 5-8 месяцев. Одних и тех же животных нужно было использовать для нескольких фаз после минимального 1-недельного периода отмывки. Для облегчения дозирования и обеспечения безопасности животных во время процедуры дозирования животным перед дозой вводили успокоительное телазол (в/м, 4-6 мг/кг). Дозирование осуществляли подкожно болюсной инъекцией между кожей и нижележащими слоями ткани в вентральной области животного. В общей сложности для каждой фазы использовали 3-4 участка с различными дозами соединений на каждом из 4 участков. Соединения готовили в солевом растворе, содержащем 0,2% БСА (около 0,4 мг/мл) при pH 3,5. Каждый исходный раствор разбавляли физиологическим раствором (pH 7,4) до требуемой конечной концентрации и стерильно фильтровали. Дозировка составляет 20 нмоль/кг. Образцы крови собирали перед введением дозы и через 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 и 96 часов после введения дозы. В каждый момент времени сбора крови образец объемом 1 мл забирали из яремной вены в пробирки с K2EDTA на льду перед отделением плазмы центрифугированием. Образцы плазмы, содержащие 4 тестируемых соединения, отправляли в Clіmax Labs для разделения и количественного определения с помощью ЖХ-МС/МС, как указано ниже (2.5.3).

2. Фармакокинетика у юкатанских мини-свиней

Подопытными животными были в общей сложности четыре ненаивных самца юкатанской мини-свиньи (*Sus scrofa*; масса тела 73-81 кг), содержащихся поодиночке. Животных кормили поддерживающим количеством корма для свиней «Purina S-9». Общие наблюдения в клетке проводили не менее двух раз в день (утром и вечером) в течение периода исследования для оценки общего состояния здоровья, для оценки умирающих животных или для оценки смертности.

После периода акклиматизации в течение двадцати двух дней каждой мини-свинье вводили подкожно (за брыли щеки) 17 в дозе 20 нмоль/кг (0,2 мл/кг), а образцы крови для ФК собирали в момент времени -0, 25, 2, 4, 6., 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 216, 264, 312 и 360 ч после введения дозы. После двухнедельного периода отмывки тем же животным вводили 17 внутривенно и образцы крови для ФК собирали в момент времени - 0,25, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 216, 264, 312 и 360 часов после введения дозы. Концентрация дозы составляла 5,5 мг/мл (объем дозы 0,015 мл/кг) для обоих видов обработки. Образцы цельной крови для фармакокинетического анализа (~3 мл/момент времени) собирали через порты доступа к сосудам в пробирки, содержащие K2EDTA. Образцы хранили на влажном льду до обработки, ~30 минут или меньше после сбора. Все образцы центрифугировали в течение ~15 минут при ~3000 об/мин и ~4°C. Образцы плазмы хранили в замороженном виде при -70°C до тех пор, пока первичные образцы не были отправлены в Frontage Laboratories (Экстон, Пенсильвания) для биоанализа с помощью ЖХ-МС/МС, как описано ниже. Во время проведения исследования не было отмечено никаких аномальных клинических наблюдений.

Е. Фармакодинамика

1. Влияние на уровень глюкозы в крови — мыши db/db

В этих исследованиях использовали около семидесяти пяти (75) мышей-самцов BKS.Cg-m +/+ Leprdb/J (номенклатурный номер Jackson Labs 000642) («db/db») в возрасте 7-9 недель, которых содержали с использованием стандартных процедур ухода за животными. Исследования начинали после недельной акклиматизации к условиям учреждения. Утром в день исследования 0 мышей взвешивали и не кормили в течение 4 ч. Глюкозу крови измеряли с помощью глюкометра, используя стандартные процедуры. По меньшей мере пятьдесят четыре (54) мыши были отобраны на основе массы тела, а мыши с уровнем глюкозы в крови >300 мг/дл (т.е. с диабетом) были случайным образом разделены на 6 групп (n=9). Группы были следующими: группа 1, носитель; 2 группа — семаглутид 3 нмоль/кг; 3-я группа — семаглутид 10 нмоль/кг; группа 4, 17, 1 нмоль/кг; группа 5, 17, 3 нмоль/кг; группа 6, 17, 10 нмоль/кг. Массу тела измеряли и регистрировали

при получении, до рандомизации и ежедневно с 1 по 5 день. Потребление пищи измеряли и записывали ежедневно с 1 по 5 день. Образцы крови для анализа на глюкозу отбирали перед тестом (день -3) и через 0, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после однократной дозы указанного соединения.

2. Масса тела - крысы «DIO CRL:CD(SD)»

Пятьдесят четыре самца крыс DIO CRL:CD (прим. DIO = ОВД, ожирение, вызванное диетой) в возрасте приблизительно 14-15 недель на момент начала исследования были включены в исследование в Charles River Laboratories (Шрусбери, Массачусетс). Животных содержали на диете с высоким содержанием жиров (Research Diets 12492, 60% ккал, % жира) в течение 11 недель до прибытия в испытательный центр. По прибытии животных содержали на диете с высоким содержанием жиров в течение 7 дней во время акклиматизации и на протяжении всего исследования. Потребление пищи контролировали в дни исследования с -1 по дни исследования 27 (основное исследование) или сутки 41 (восстановление) путем совместного взвешивания корма и дозатора. Среднее значение потребления пищи для группы 2 определяло количество пищи, доступной для группы 3 в последующем сеансе кормления. Точно так же среднее количество пищи, потребленной для группы 5, определяло количество пищи, доступной для группы 6 в последующем сеансе кормления. Пищу и питьевую воду предоставляли вволю на протяжении всего исследования, за исключением 5-часовых периодов голодания в дни исследования 1, 28 и 42. Животных рандомизировали в группы на основе массы тела и данных уровня глюкозы в крови (ГК) не натощак, собранных в день исследования -1. В дни исследования с 1 по 27 (основное исследование) или 42 (восстановление) всем животным вводили болюсную дозу носителя, стандарта семаглутида (12 нмоль/кг) или 17 (6, 12 нмоль/кг) посредством подкожной межлопаточной инъекции. Общий объем дозы, зависящий от группы (мл/кг), был основан на самой последней зарегистрированной массе тела. Индивидуальную массу тела животного регистрировали, начиная с дня -1. Во время введения дозы и во все моменты времени сбора образцов животных наблюдали на предмет любых клинически значимых отклонений. В дни исследования -1, 1, 3-27, 29 и 36 каплю цельной крови объемом 3 мкл собирали с помощью хвостового надреза для оценки уровня глюкозы в крови с использованием ручного глюкометра (Alpha Trak 2, Abbot). За исключением дня 1, в течение которого измеряли уровень глюкозы в крови перед введением дозы, через 2, 4, 8 и 24 часа после введения дозы, показания измеряли около в одно и то же время ежедневно. Кроме того, на 28 день исследования после 5-часового голодания животным вводили дозу глюкозы 10 мл/кг (2 г/кг) посредством внутрибрюшинной инъекции. Образец крови объемом 3 мкл отбирали с помощью

хвостового надреза и анализировали на уровень глюкозы в следующие моменты времени (относительно введения глюкозы): 0, 15, 30, 60, 90, 120 и 180 минут после введения дозы. Образцы на глюкозу считывали с помощью ручного глюкометра.

Ф. Биоаналитический метод

Анализ проводили в Climax Laboratories (Сан-Хосе, Калифорния) на масс-спектрометре API-4000, положительный ESI, сканирование MRM. Образцы загружали в автосэмплер Shimadzu HPLC/CTC с колонкой ACE C4 (2,1x50 мм, 5 мкм). Элюцию проводили градиентом от водного раствора 0,5% муравьиной кислоты, 5 мМ NH₄OAc, до 0,5% муравьиной кислоты в CH₃CN/H₂O (9:1). Образцы плазмы (100 мкл) высевали (96 лунок) и добавляли 30 мкл внутреннего стандарта пептидов (10 мкг/мл в PBS). Добавляли аликвоту 300 мкл CH₃CN, образец встряхивали и центрифугировали для осаждения белков плазмы. После переноса в 96-луночный планшет вводили 40 мкл образца и количественно определяли пики отдельных соединений с помощью стандартных кривых. Некомпаративный фармакокинетический анализ с использованием WinNonlin выполняли с использованием средней концентрации в каждый момент времени отбора образцов, чтобы получить данные о максимальной концентрации (C_{max}), времени наблюдения C_{max} (T_{max}), площади под кривой концентрации плазмы от нулевого времени до последней временной точки с измеримой концентрацией (AUC_{0-t}), кривой концентрации в плазме от времени от нуля до бесконечности (AUC_{0-∞}), конечном периоде полувыведения (T_{1/2}) и СВУ. Предел количественного определения составляет 1–2 нг/мл в зависимости от структуры аналога.

Г. Статистический анализ

Данные *in vitro* представлены в виде pEC₅₀ (SE), определенного в Prism 5 с помощью нелинейного регрессионного анализа необработанных данных флуоресценции, нормализованных по соответствующему ответу на внутренние стандарты (см. вспомогательную информацию для графиков данных). Для анализов, в которых указана статистическая значимость, для проведения статистического анализа данных использовали программное обеспечение GraphPad Prism (версия 5), в котором осуществлялся дисперсионный анализ (ANOVA, тип 2 с несколькими измерениями), а затем тесты Бонферрони с $p < 0,05$ в качестве минимального уровня значимости.

Н. Пролонгирование пептида

Подход авторов к увеличению периода полувыведения пептидных агонистов РГПП-1/РГКГ в сыворотке был сосредоточен на новом подходе – использовании ковалентно связанных модификаторов на основе гликолипидных поверхностно-активных веществ. Реагенты были получены преимущественно из неионогенных поверхностно-

активных веществ коммерческого типа, которые широко используются в косметической и фармацевтической промышленности и в целом признаны безопасными, например, 1-октил β -D-глюкоза и 1-додецил β -D-мальтоза (Anatrace, Моми, Огайо). Дополнительные структуры поверхностно-активных веществ доступны путем гликозилирования Кёнигса-Кнорра/Хелфериха (например, катализ HgO (желтый) / HgBr_2) ацетобром-глюкозы (или аналогичных активированных углеводов) с соответствующим спиртом и снятия защиты с помощью NaOMe / MeOH для получения свободного поверхностно-активного вещества. Желаемые реагенты легко доступны посредством химически селективного ТЕМПО-опосредованного окисления в присутствии воды группы (групп) первичного спирта таких поверхностно-активных веществ. Таким образом, типичная структура включает 1-О-алкил β -D-глюкопиранозидуроновые кислоты (также известные как аддукты 1-О-алкил β -D-глюкуроновой кислоты), тип структуры, часто образующейся в печени (метаболизм фазы II) при солубилизации/детоксикации гидрофобных молекул, в данной заявке ацилированных до остатка Lys. В твердофазном пептидном синтезе желаемых пептидов использовались стандартные протоколы Fmoc с ортогональной защитой в положениях Glu¹⁶ и Lys²⁰ (аллиловый эфир и Alloc, соответственно), используемые для обеспечения образования лактама в боковой цепи и модификации N- ϵ -ivDde в положении Lys с помощью конъюгации гликолипид-поверхностно-активное средство. Пептиды были получены с высокой чистотой (>95%, аналитическая ОФ-ВЭЖХ) и с хорошими выходами.

I. Фармакокинетическое поведение

Основной целью этих исследований было изучение эффектов нового подхода конъюгации с гликолипидным поверхностно-активным веществом для увеличения продолжительности действия, стабильности, эффективности и биодоступности пептида. Предварительное исследование стабильности *in vitro* в объединенной плазме человека продемонстрировало быстрое разрушение амида ГПП-1 7-36 (через 4 часа), в то время как концентрации аналогов 3 и 8 полностью не изменились через 8 часов, что указывает на превосходную стабильность этих репрезентативных аналогов, конъюгированных с поверхностно-активным веществом, в присутствии плазмы.

Продолжительность действия аналогов оценивали на моделях грызунов и мини-свиней. Серия соединений (аналогов) с 1 по 6 (таблица 15) была разработана для изучения влияния на эффективность и продолжительность действия гомологичного увеличения длины цепи и гидрофобности (от октила до гексадецила) алкильной цепи в 1-м положении модификатора 1-О-алкил β -D-глюкопиранозидуроновой кислоты. Как видно на фиг. 23, взаимосвязь между длиной цепи и продолжительностью действия в исследовании фармакокинетики на геттингенских мини-свиньях не была строго пропорциональной.

Можно представить несколько переменных, потенциально влияющих на измеренные ФК и ФД по мере увеличения длины цепи. Например, для увеличения длины цепи: образование депо (увеличение), растворимость (уменьшение), аффинность к сывороточному альбумину (СА) (увеличение), аффинность к гормональным рецепторам (увеличение, затем уменьшение), способность к активации рецептора (увеличение, затем уменьшение). Для этой группы профили C_{max} и ФК кажутся оптимальными для 4 (С14) и 5 (С16), возможно, из-за оптимальной растворимости и СА-ассоциации, обеспечивающих хорошее распределение. Поведение лираглутида в качестве стандарта в этом анализе (ацилированного пальмитиновой кислотой, С16, на спейсере γ Glu) наиболее близко соответствовало поведению аналога 3 (С12), содержащего более короткую боковую цепь. Изучали фармакокинетическое поведение соединений *in vivo* после подкожного введения геттингенским мини-свиньям в дозе 20 нмоль/кг для каждого аналога. Все данные одного анализа, за исключением 4 и 5, которые были получены из параллельных анализов на геттингенских мини-свиньях, также сопоставлены с лираглутидом в качестве литературного стандарта. Значительно более высокие уровни в плазме измеряются для аналога 2 через 4 часа (**); для аналога 4 через 2 и 4 ч (**), 6 и 8 ч (***) и 12 ч (*); для аналога 5 через 2 и 12 ч (***) и через 24 ч (*), все по сравнению с лираглутидом: *, $P < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

J. Анализ активности структуры (ААС) *in vitro*

Авторы искали сильнодействующие аналоги с равномерно сбалансированной агонистической активностью как в отношении РГПП-1, так и в отношении РГКГ, в сочетании с хорошей биодоступностью *in vivo* и очень длительной продолжительностью действия. Другой целью было понимание влияния новой модификации гликолипидного поверхностно-активного вещества на эффективность и продолжительность действия. Соответственно, структура пептида идентична для большинства исследованных аналогов. Первоначальные исследования ААС были направлены на оценку активности аналогов в отношении активации клонированных рецепторов человека *in vitro* (таблица 17). Значения EC_{50} для соединений 1-4 (модификации боковой цепи от 1-О-октил β -d-глюкопиранозидуронила до 1-О-тетрадецил β -d-глюкопиранозидуронила) показали высокую эффективность и вариабельно сбалансированную активацию со значениями EC_{50} в диапазоне 10–30 рМ и коэффициент селективности ($SR = \text{РГКГ } EC_{50} / \text{РГПП-1 } EC_{50}$) от 2 до 3. РГКГ, по-видимому, более чувствителен к стерическим эффектам в том, что от 5 до 6 (С16, С18) демонстрируют быстрое повышение значений EC_{50} для него (от 163 до 884 пМ) с возрастающим смещением в сторону активации РГПП-1 ($SR = 4x$ и $17x$, соответственно). Детальная оптимизация анализа для таких гидрофобных аналогов не проводилась, но

значения EC₅₀ для РГПП-1 не росли так быстро.

Таблица 17

Структуры аналогов и оценка биологической активности in vitro на соответствующих клонированных рецепторах человека

Аналог (SEQ ID No.)	Модификация поверхностно-активного вещества[a]	pEC ₅₀ (SE) ^[b]		EC ₅₀ (пМ)		Коэффициент селективности ^[c] РГПП-1 по сравнению с РГКГ
		huGCGR	hu GLP-1	чРГКГ	чРГПП-1	
1 (12)	Lys24 (GC8)	10,70 (0,03)	11,07 (0,03)	20	8	3
2 (13)	Lys24 (GC10)	10,70 (0,03)	10,90 (0,03)	20	13	2
3 (14)	Lys24 (GC12)	10,54 (0,02)	10,74 (0,03)	29	18	2
4 (15)	Lys24 (GC14)	10,52 (0,05)	10,80 (0,03)	30	16	2
5 (16)	Lys24 (GC16)	9,79 (0,03)	10,40 (0,04)	163	40	4
6 (17)	Lys24 (GC18)	9,05 (0,02)	10,28 (0,02)	884	52	17
7 (18)	Lys24(MC12)	10,83 (0,12)	10,30 (0,02)	15	50	0,3
8 (19)	Lys24(MeC12)	10,42 (0,02)	10,49 (0,03)	32	32	1
9 (20)	Lys24 (MeC14)	10,45 (0,01)	11,31 (0,04)	35	5	7
10 (21)	Lys24 (MeC16)	9,65 (0,03)	11,10 (0,02)	225	8	28
11 (22)	Lys24 (MeC18)	9,31 (0,02)	10,47 (0,04)	486	34	14
12 (23)	Lys17 (MeC14)	10,35 (0,02)	10,64 (0,03)	45	23	2
13 (24)	Lys24 (S1GC14)	9,76 (0,02)	10,43 (0,02)	174	37	5
14 (25)	Lys24(S2GC14)	10,01 (0,02)	10,37 (0,05)	97	43	2
15 (26)	Lys24 (GC16c)	10,19 (0,02)	10,42 (0,02)	65[d]	38[d]	2
16 (27)	Lys24(GC18c)	10,06 (0,02)	10,36 (0,02)	86[d]	44[d]	2
17 (1)	Lys ¹⁷ (GC18c)	10,38 (0,02)	10,41 (0,02)	42[d]	39[d]	1

^[a] Все структуры содержат лактам боковой цепи от Glu16 до Lys20; G, M, Me означают D-глюкозидную, D-мальтозидную, D-мелибиозидную связи, соответственно. S1 и S2 означают спейсер из остатка α-Lys или γ-Glu, соответственно, между Lys и поверхностно-активным веществом. Sn означает метиленовую цепь из n атомов углерода; c означает карбоксилат на конце цепи.

^[b] Все данные скрининга, полученные в DiscoverX, на основе накопленного ответа цАМФ в клетках CHO (в повторях), экспрессирующих чРГКГ и чРГПП-1, с использованием нелинейного регрессионного анализа с R², как правило, >>90%. Данные наносили на график и проанализированы в Prism 5, чтобы определить значения pEC₅₀ (SE), и кривые отображены в разделе «Вспомогательная информация».

^[c] Коэффициент селективности, полученный на основе данных EC₅₀ в пМ (SR = РГКГ EC₅₀/ГПП-1 EC₅₀).

^[d] Данные для соединений 15, 16, 17 были получены в присутствии буферов, содержащих 0,1% ОВА. Для всех остальных использовали буферы, содержащие 0,1% БСА.

Можно ожидать, что физические свойства таких пептидов, модифицированных поверхностно-активным веществом, будут широко варьировать и регулироваться за счет использования различных алкильных цепей (различная гидрофобность, растворимость, аффинность к СА, критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), размер мицелл), а также за счет использования различных головных углеводных групп, таких как дисахариды (разная растворимость, размер мицелл, гидрофильно-липофильный баланс), в предшественниках гликолипидных поверхностно-активных веществ. Таким образом, «додецилмальтозид» является широко используемым коммерческим поверхностно-активным веществом, и его использование в данной заявке обеспечивает получение 7, сильнодействующего, но предпочитающего РГКГ двойного агониста. Это поверхностно-активное вещество менее удобно, чем глюкоза, поскольку оно имеет две первичные ОН-группы и, следовательно, приводит к двум карбоксильным функциональностям при окислении, хотя одна более стерически затруднена, чем другая.

В качестве головной группы дисахарида более полезна мелибиоза, имеющая только один сайт гликозилирования и одну первичную функцию ОН для окисления до урановой кислоты. Использование мелибиозы дает промежуточные соединения 1'-О-алкил [β -(α -D-галактопиранозидуроновая кислота-(1 \rightarrow 6'))]-D-глюкозида (MeC12-MeC18) и приводит к аналогам 8-12. Этот ряд дисахаридов обеспечивает очень сильнодействующие (7) и хорошо сбалансированные (8) двойные агонисты, однако также демонстрирует доказательства, свидетельствующие о стерических препятствиях для активации РГКГ (9-11).

В то время как модификация производного 1-О-додецил- β -D-мальтозида способствовала активации РГКГ (7; SR 0,3), аналог производного 1-додецил- β -D-мелибиозида, 8, обладал почти сбалансированной селективностью в отношении активности рецептора (SR \sim 1). Дальнейшее увеличение размера модификации на основе мелибиозида (C14, C16, C18; 9-11) быстро снижало активность РГКГ (SR для 7, 28, 14, соответственно). Увеличенный размер боковой цепи лиганда (или гидрофобность) также, по-видимому, препятствует активации РГКГ.

Все вышеперечисленные модификации были расположены в остатке 24 по направлению к С-концу лактамной связи боковой цепи (от Glu16 до Lys20). Модификацию боковой цепи в лактамном кольце также изучали путем размещения остатка Lys(Me14) в положении 17 (соединение 12), и также была обнаружена высокая

эффективность с лишь умеренным смещением в сторону активации РГПП-1 (SR 2). Напротив, такая же модификация в положении 24 показала сильное смещение в сторону РГПП-1 (SR 7). Возможно, конформация в области прикрепления 12 внутри лактамного кольца неблагоприятна для активации РГПП-1 для этой комбинации головной группы и длины цепи.

Модификации гликолипидных поверхностно-активных веществ средней длины давали сильнодействующие и относительно сбалансированные аналоги, поэтому далее авторы исследовали влияние спейсерной связи на модификацию гидрофобной боковой цепи, наблюдаемое с лираглутидом, семаглутидом и другими подобными соединениями. Было обнаружено, что такое присоединение линкера имеет решающее значение для эффективности в истории разработки лекарственного средства семаглутида, при этом исследовались 15 линкеров с широкими вариациями эффективности, прежде чем остановиться на линкере с короткой последовательностью γ Glu PEG. Таким образом, соединение 14 имеет Glu(γ CO), связанный с положением Lys²⁴, с модификацией 1-О-тетрадецил β -D-глюкопиранозидуронила, связанной с функцией Glu(α -NH₂) (S2GC14), и эта модификация значительно ослабила эффективность активации РГКГ (по сравнению с 4). Использование связи Lys(α -CO) с Lys²⁴ в качестве спейсера и связывание модификации 1-О-тетрадецил β -D-глюкопиранозидуронила с ϵ -аминофункцией спейсера дало 13, молекулу, очень неблагоприятную для взаимодействия с РГКГ (SR 5). В дополнение к дополнительной массе линкер Glu(γ CO) добавляет отрицательный заряд к положению связи, в то время как связь Lys(α -CO) добавляет положительный заряд к этому линкеру боковой цепи. Важно отметить, что авторская модификация гликолипидного поверхностно-активного вещества, по-видимому, не требует каких-либо спейсеров или взаимодействий спейсер-рецептор, как это наблюдается для других модификаторов боковой цепи, для получения высокоэффективных молекул.

В то время как ранее авторы изучали главным образом замену пептидных последовательностей гидрофобными аминокислотами в качестве пути к сильному связыванию с СА человека, в данной заявке структуры 15-17 являются аналогами, разработанными для проверки эффекта имитации головной группы жирных кислот путем включения функции карбоновой кислоты в конец алкильной цепи поверхностно-активного вещества, аналогичный используемому в семаглутиде. Соответственно, 15 включает 1-О-[(15-карбокситептадецил)окси] β -D-глюкопиранозидуроновую кислоту в амидной связи с группой ϵ -NH на Lys²⁴ (Lys²⁴GC16c), тогда как 16 содержит 1-О-[(17-карбокситептадецил)окси] β -D-глюкопиранозидуроновую кислоту, аналогичным образом присоединенную к Lys²⁴ (Lys²⁴GC18c). Точно так же 17 содержит 1-О-[(17-

карбокситептадецил)окси] β -D-глюкопиранозидуроновую кислоту, но конъюгат гликолипида и поверхностно-активного вещества находится в Lys¹⁷ (Lys¹⁷GC18c), как и в случае 12, и таким образом, связан внутри лактамного кольца, образованного между боковыми цепями Glu¹⁶ и Lys²⁰. Аналог 17 проявлял высокую эффективность, убедительные доказательства очень высокого связывания сывороточного альбумина (СА) и равномерно сбалансированную активность активации двойного рецептора (SR = ~1; таблица 16). Соответственно, аналог 17 был выбран для более подробных характеристических исследований.

Хорошо известно, что сильное связывание СА может приводить к снижению эффективности *in vitro* и *in vivo*, и это задокументировано в отношении связывания семаглутида с РГПП-1, где соотношение связывания в присутствии 2% СА человека приводит к заметное снижение измеренной аффинности в 940 раз по сравнению со связыванием в отсутствие СА человека. Тем не менее, манипуляции с пептидами в растворе без присутствия какого-либо белка для блокирования неспецифического связывания также могут вызвать снижение кажущейся активности из-за потери лиганда. Полезной альтернативой является использование ОВА, который не эволюционировал в белок-носитель жирных кислот и обладает минимальными свойствами связывания жирных кислот. Проводили сравнение данных EC₅₀ для активации человеческого РГПП-1 и РГКГ, клонированных в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (DiscoverX), соединениями 15-17 и семаглутидом. Отношение EC₅₀, измеренное в присутствии БСА, к ОВА можно рассматривать как качественную меру аффинности БСА. Здесь видно, что улучшение при замене даже низкой концентрации БСА (0,1%) на ОВА (0,1%) было незначительным для стандартов анализа эксендина-4 и глюкагона, в то время как эффект для боковой цепи C16 аналога 15 был умеренным (кратное улучшение в 4-9 раз). Напротив, для 16 или 17, которые имеют C18 алкильные цепи, эффект замены БСА на ОВА был глубоким (кратное улучшение в 29-47 раз). Улучшение для 16 и 17 даже больше, чем для семаглутида (13x), что позволяет предположить, что можно ожидать еще более прочного связывания и даже большей продолжительности действия для 17, чем для семаглутида. Эти данные представлены в таблице 18.

Таблица 18

Преимущество замены БСА на ОВА в буфере для анализа активации рецепторов

<u>Аналог</u>	<u>pEC₅₀ (SE)</u> 0,1% БСА		<u>pEC₅₀ (SE)</u> 0,1% ОВА	
	ГПП-1	глюкагона	ГПП-1	глюкагона
Рецептор 15	9,71 (0,05)	9,25 (0,15)	10,42 (0,02)	10,19 (0,02)

16	8,90 (0,06)	8,53 (0,08)	10,36 (0,02)	10,06 (0,02)		
17	8,95 (0,04)	8,71 (0,12)	10,41 (0,02)	10,38 (0,02)		
семаглутид	9,72 (0,09)	N/A	10,82 (0,03)	N/A		
Аналог	EC₅₀ (пМ) 0,1% БСА		EC₅₀ (пМ) 0,1% ОВА		Улучшение фолдинга[a]	
Рецептор глюкагон	РГПП-1	РГКГ	РГПП-1	РГКГ	РГПП-1	РГКГ
Эксендин-4	18	49	15	68	1	0,7
15	194	564	38	65	5	9
16	1268	2929	44	86	29	34
17	1117	1957	39	42	29	47
семаглутид	192	N/A	15		13	

^aКратное улучшение = (EC₅₀ в присутствии БСА/EC₅₀ в присутствии ОВА) и, как предполагается, указывает на степень связывания с БСА, поскольку его замена несвязывающим ОВА увеличивает наблюдаемую активность (снижение EC₅₀). Как обсуждается в данной заявке, исключительно сильное связывание БСА искажает фактическую эффективность активации рецептора семаглутида и его аналогов.

К. Характеризация *in vivo*

Фармакокинетический профиль соединения 17 первоначально определяли по сравнению с семаглутидом у крыс после подкожного введения в дозе 10 нмоль/кг. T_{max}, измеренная для соединения 17 и семаглутида, составляет 8 часов (Фиг. 24), хотя уровни соединения 17 в плазме, по-видимому, все еще резко возрастают, что указывает на истинное T_{max} >8 часов. C_{max} для соединения 17 составляла 62% от таковой семаглутида (76 против 122 нг/мл), но AUC была сопоставимой (2350 против 2530 нг·ч/мл, соответственно). В целом аналог 17 имел СВУ несколько большее, чем у семаглутида, 21 час и 15 часов, соответственно. После подкожного введения концентрация аналога 17 в плазме увеличивалась пропорционально дозе при 3-кратном увеличении дозы (30 нмоль/кг), что приводило к 2,8- и 3-кратному увеличению C_{max} и AUC, соответственно (данные не представлены). Такой профиль с более низкой и более поздней C_{max} также наблюдался у мышей (данные не показаны) и, как ожидается, обеспечивает более низкое отношение пика к минимуму, чем у семаглутида, с возможностью снижения нежелательных явлений. В/в доза 10 нмоль/кг (данные не представлены) обеспечила T_{1/2} 10 ч и показала биодоступность 29% для той же дозы, введенной подкожно, хотя и с ограничением очевидной неточности T_{max} и AUC (см. F% для мини-свиней). Фиг. 24 иллюстрирует фармакокинетическое поведение *in vivo* аналога 17 и литературного стандарта семаглутида после подкожного введения крысам CRL: CD (SD) в дозе 10 нмоль/кг. Аналог 17 показывает значительно более низкие концентрации в плазме (***) при t = 2 и 4 ч; * при t = 8 ч) и более поздний фармакокинетический профиль в этом и других анализах, что может привести к уменьшению отношения пик/минимум. По

сравнению с семаглутидом: *, $P < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

ФК-поведение аналога 17 у более крупного животного исследовали путем внутривенной и подкожной инъекции однократной дозы 20 нмоль/кг юкатанским мини-свиньям (фиг. 25). Наблюдалась очень продолжительная фармакокинетическая кривая (п/к, $T_{1/2} = 52$ ч; СВУ = 84 ч) с низкой C_{max} (890 нг/мл). Биодоступность подкожно введенного аналога 17 по сравнению с внутривенным (в/в) введением составила 73%. ФК поведение аналога 17 было аналогично опубликованным отчетам по семаглутиду (п/к, СВУ = 64 ч) у геттингенских мини-свиней, и ожидается, что 17 также будет подходящим для QW-введения пациентам (один раз в неделю). Во время этого исследования на взрослых мини-свиньях не сообщалось о клинических наблюдениях (например, о тошноте, рвоте или снижении аппетита). На фиг. 25 показано фармакокинетическое поведение 17 *in vivo* после однократного подкожного и внутривенного (в/в) введения самцам мини-свиней ($n = 4$; масса около 75 кг) в дозе 20 нмоль/кг. Аналог 17 демонстрирует очень длительный ФК-профиль, несколько более длительный, чем у семаглутида (СВУ 86 ч против 64 ч, соответственно), что указывает на то, что аналог 17 подходит для QW-введения пациентам.

Снижающая уровень глюкозы активность аналога 17 была первоначально изучена в исследовании по подбору дозы на мышах db/db по сравнению со стандартными данными по семаглутиду, опубликованными в литературе (Фиг. 26). Семаглутид не был полностью эффективен при дозе 3 нмоль/кг, в то время как при дозе 10 нмоль/кг он вызывал резкое падение уровня глюкозы в крови до уровня несколько ниже (105 мг/дл) референсного уровня для нормальной мыши C57BL/6J (126 мг/дл) в момент времени 8 ч. Уровень глюкозы в крови поддерживался в диапазоне, близком к норме, для высоких доз семаглутида через 24 часа и возвращался к повышенному уровню (280 мг/дл) через 48 часов. Таким образом, 10 нмоль/кг, по-видимому, является полностью эффективной дозой ежедневного семаглутида в этой мышинной модели. Эффекты 3 и 10 нмоль/кг аналога 17 были похожи друг на друга сразу, снижая уровень глюкозы в крови до 129 мг/дл, что близко к нормальному диапазону для мышей, с максимальным эффектом, наблюдаемым через 24 часа. Более высокая доза аналога 17 (10 нмоль/кг) поддерживает уровень глюкозы в крови в сниженном диапазоне (153 и 187 мг/дл) через 48 и 72 часа после введения дозы. Уровень глюкозы в крови был значительно выше, чем у семаглутида через 2 и 4 часа ($p < 0,0001$ и $< 0,02$, соответственно), и ниже такового для семаглутида через 48, 72 и 96 часов ($p < 0,01$ для каждого). Таким образом, в этом анализе подбора дозы у мышей db/db аналог 17 оказывается более мощным и более длительно действующим, чем семаглутид, в отношении глюкорегуляторных эффектов, при этом максимальное

снижение уровня глюкозы достигается более постепенным образом. На фиг. 25 показана зависимость реакции на дозу *in vivo* аналога 17 и литературного стандарта семаглутида после подкожного введения однократной дозы самцам мышей db/db ($n = 9$). Аналог 17, по-видимому, обладает более сильным, более измеренным и более продолжительным действием на ФД по сравнению с семаглутидом, который вызывает резкое снижение уровня глюкозы в крови до уровня ниже уровня, наблюдаемого у нормальных мышей C57BL/6J. Для эквивалентных доз аналога 17 (10 нмоль/кг) по сравнению с семаглутидом (10 нмоль/кг) уровни глюкозы в крови значительно различаются при $t = 2, 48, 72$ и 96 ч; * $= p < 0,05$, ** $= p < 0,01$, *** $= p < 0,001$.

Фармакодинамический профиль аналога 17 исследовали на 28-дневной крысиной модели ожирения, вызванного диетой (ОВД), по сравнению с семаглутидом в качестве литературного стандарта (фиг. 27). Группам крыс DIO CD:SD (Sprague-Dawley) ($n=9$) вводили один раз в день подкожно носитель, 12 нмоль/кг семаглутида, 6 или 12 нмоль/кг аналога 17 и группы также парно кормили количеством пищи, которое потребляется группами, получающими 12 нмоль/кг семаглутида или аналога 17. Группы, получавшие любое соединение, быстро достигли уменьшенной массы, которая оставалась стабильной на протяжении всего анализа. Важно отметить, что введение аналога 17 дозозависимо возвращала животных к диапазону мышечной массы, обычно наблюдаемому при умеренных или выраженных диетических ограничениях (около от 350 до 500 г, что свидетельствует о более длительной выживаемости), а затем поддерживала эту массу. Известно, что у крыс SD, которых кормили вволю, развивается диабет с укороченной продолжительностью жизни, не подходящей для длительных исследований (спонтанные опухоли, дегенеративные заболевания), в то время как ограниченная диета приводит к снижению общей массы с неизменно более длительной выживаемостью. Гипергликемии не отмечалось, и все животные доживали до завершения исследования. Во время 2-недельной фазы восстановления животные (по 4 в группе) во всех обработанных группах быстро восстанавливали массу, потерянную во время лечения. На фиг. 27 показана масса тела самцов крыс с ОВД ($n = 9$) в течение 28 дней лечения (с последующим восстановлением) носителем, литературным стандартным семаглутидом (12 нмоль/кг), аналогом 17 (6 и 12 нмоль/кг) и в группах парного вскармливания количеством пищи, потребляемой животными в группах, получавших 12 нмоль/кг семаглутида и аналога 17. Группы, получавшие лечение, быстро достигают и поддерживают стабильную массу тела, а затем быстро набирают массу во время восстановления ($n=4$). Введение аналога 17 привело к большему снижению массы тела (-24% и -40%; 6 и 12 нмоль/кг, соответственно), чем введение семаглутида (-13%). Животные, получавшие низкую дозу

аналога 17 (6 нмоль/кг), продемонстрировали значительно более низкую массу тела по сравнению с семаглутидом (12 нмоль/кг) на 14-17 дни (*); 23-25 дни (*), 26-28 дни (**). Животные, получавшие эквимолярное количество аналога 17 (12 нмоль/кг), продемонстрировали значительное снижение массы по сравнению с семаглутидом на 9 (*), 10 (**), и 11-28 дни (***); * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Как можно видеть на фиг. 28, животные, получавшие низкую дозу аналога 17 (6 нмоль/кг), продемонстрировали очень похожее подавление питания, как и животные, получавшие семаглутид в двойной молярной эквивалентной дозе, но показали примерно двойное снижение массы (-24% против -13%, аналог 17 по сравнению с семаглутидом, соответственно). Это различие указывает на второй механизм действия, способствующий снижению массы, активацию РГКГ. В то время как у животных, получавших семаглутид, наблюдалось значительное, но временное подавление питания, у животных, получавших эквимолярное количество аналога 17, наблюдались более устойчивое подавление питания на протяжении большей части анализа (Фиг. 29) и значительно большая потеря массы тела (-40% против -13%, аналог 17 по сравнению с семаглутидом, соответственно). На фиг. 28 показано кумулятивное потребление корма крысами ОВД в течение 27 дней лечения (с последующим восстановлением) носителем, литературным стандартным семаглутидом (12 нмоль/кг), аналогом 17 (6 и 12 нмоль/кг) и группами парного вскармливания количеством пищи, потребляемой животными в группах, получавших 12 нмоль/кг семаглутида и аналога 17. Обратите внимание, что низкая доза аналога 17 и семаглутида обеспечивают аналогичную степень подавления питания на ранней стадии, в то время как аналог 17 в дозе, эквимолярной дозе семаглутида (12 нмоль/кг), демонстрирует подавление питания на протяжении большей части анализа. Обе группы животных, получавшие аналог 17, достигли существенно большего снижения массы тела по сравнению с группой, получавшей семаглутид (Фигура 27). По сравнению с носителем, все группы, получавшие лечение, продемонстрировали значительное снижение потребления пищи после 8 дня, со статистической значимостью для семаглутида (12 нмоль/кг) в начале 7 дня и для аналога 17 (12 нмоль/кг) на 6 день. Обработка эквимолярным аналогом 17 и семаглутидом (12 нмоль/кг) продемонстрировала, что аналог 17 вызывает снижение потребления пищи по сравнению с семаглутидом на 14 день ($p < 0,05$), 15 ($p < 0,01$) и 16–28 день ($p < 0,001$). Группы, которые кормили так же, как группы, получавшие семаглутид и аналог 17, точно соответствовали предполагаемому снижению потребления пищи, но соответствующие группы, получавшие лечение, продемонстрировали большее снижение массы (-6% против -13% и -18% против -40%; парное вскармливание против лечения семаглутидом и аналогом 17,

соответственно), что еще раз подтверждает дополнительные механизмы действия как семаглутида, так и аналога 17. Дополнительный эффект на снижение массы был умеренным для аналога ГПП-1 семаглутида и очень существенным для двойного агониста РГПП-1/РГКГ, аналога 17. Исследования с другими аналогами ГПП-1/РГКГ выявили повышенную скорость метаболизма, потемнение белой жировой ткани и термогенез при повышенном снижении массы, наблюдаемом при использовании таких аналогов, но такие исследования дали разные результаты и не проводились с соединением 17.

Важным аспектом в оценке модельных крыс с ОВД является влияние на массу печени, поскольку считается, что ожирение приводит к увеличению печени, стеатозу и воспалению при заболеваниях НАЖБП/НАСГ. В этом исследовании масса печени (и в % от массы тела) через 28 дней была следующей: носитель (18,6 г, 2,9%), семаглутид (14,9 г, 2,8%), кормление, такое же как с семаглутидом (16,5 г, 2,9%), низкая доза аналог 17 (11,5 г, 2,5%), высокая доза аналога 17 (8,9 г, 2,4%), кормление, такое же как с высокой дозой аналога 17 (14,3 г, 2,8%). Снижение массы печени в группе, получавшей 12 нмоль/кг аналога, 17 статистически отличалось ($p < 0,01$) как от групп, получавших носитель, так и от групп, получавших эквимолярное количество семаглутида. Ввиду значительно большего снижения массы печени при приеме аналога 17 интересно, что хотя исследования с тщательно проверенными антителами демонстрируют присутствие РГКГ в печени, РГПП-1 не наблюдается. В то время как благотворное влияние агонистов РГКГ на печень, вероятно, является прямым, благотворное влияние агонистов РГПП-1 на массу печени и гистологию, по-видимому, связано с косвенным воздействием на массу тела и уровень липидов.

Л. Выводы из примера 6

Быстро растущая во всем мире эпидемия ожирения приводит к ряду заболеваний, связанных с метаболическим синдромом, примером которых являются диабет 2 типа и НАСГ. Существующие лекарственные средства, в том числе аналоги ГПП-1 и ранее изученные двойные агонисты ГПП-1/РГКГ, не удовлетворяют потребности в очень существенном снижении массы ($> 10\%$) в утвержденных дозах, и авторы искали значительно более эффективное и хорошо переносимое лекарственное средство с возможностью приема людьми раз в неделю. Основываясь на более ранних исследованиях, показывающих существенное увеличение продолжительности действия пептидов за счет временного связывания с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), авторы изучили модификацию относительно равномерно сбалансированного пептидного каркаса двойного агониста РГПП-1/РГКГ с помощью нового подхода, конъюгации с функционализированными неионогенными гликолипидными поверхностно-

активными веществами, называемые реагентами EuPort. Интересно сравнить активность и селективность аналога 17 по сравнению с пептидным каркасом, выбранным для исследования структурной активности этого нового класса пептидных модификаторов. Такую пептидную последовательность (соединение 32 в Day, et al. A new glucagon and ГПП-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. Nat Chem Biol 2009, 5, 749-757) модифицировали широко используемым подходом с полиэтиленгликолем (40 кДа; ПЭГилирование) с получением ПЭГилированной молекулы длительного действия (соединение 33). Однако ПЭГилирование обычно вызывает очень существенные потери активности (для 33 12-кратная потеря активности РГКГ и 5-кратная потеря активности ГПП-1 по сравнению с 32), что приводит в этом случае к потере баланса селективности (соотношение активностей уменьшилось с 0,45 до 0,17, что благоприятствует РГПП-1 и больше не является сбалансированным). Представленные в данной заявке исследования также выявили чувствительность активации РГКГ к стерическому объему (аналоги 9-11). ПЭГилирование также вызывает проблемы в отношении характеристики (оболочка молекул с различной молекулярной массой), а также проблемы в отношении иммуногенности ПЭГ и замедленного клиренса. Напротив, конъюгация с гликолипидными поверхностно-активными веществами в данной заявке и в серии РТН дает пролонгированную регулируемую продолжительность действия с высокой эффективностью и селективностью без необходимости использования дополнительных линкеров. Таким образом, относительно жесткое представление в растворителе липидного хвоста углеводной кольцевой системы, по-видимому, является благоприятным новым подходом, по меньшей мере, в двух сериях аналогов гормонов. Детальная оценка физических свойств пептидов, модифицированных аналогичным образом гликолипидом-поверхностно-активным веществом, представляет значительный интерес.

В поисках продолжительности действия, подходящей для доставки пациентам раз в неделю, авторы разрабатывают аналог 17, который продемонстрировал желаемую очень высокую и равномерно сбалансированную эффективность для активации клонированных человеческих РГПП-1 и РГКГ *in vitro*, возвращения грызунов модели ОВД к массе тела, соответствующей массе худощавого животного при ограниченной диете, стандартном питании, и очень высокое связывание СА. Последний аспект приводит к очень длительной продолжительности действия у грызунов и мини-свиней ($T_{1/2} = 52$ часа; СВУ = 84 часа), профиль, предполагающий пригодность для введения людям один раз в неделю. Сравнительный анализ с литературным стандартным семаглутидом, агонистом РГПП-1 для приема один раз в неделю, показывает, что двойной агонист 17 является более мощным, более длительно действующим и более эффективным в снижении массы тела у

грызунов модели ОВД, возвращая их к фенотипу худощавого животного. Соответственно, аналог 17 (в виде состава ALT-801, ранее известного как SP-1373) в настоящее время завершает исследования для оценки его терапевтического потенциала в лечении метаболических заболеваний, таких как ожирение и НАСГ.

Пример 7. Клинические испытания для определения безопасности и переносимости однократных и повторных подкожных доз ALT-801 у здоровых субъектов с избыточной массой тела и ожирением, а также для характеристики диапазона эффективных доз на основе взаимосвязей ФК-ФД.

Это исследование предназначено для оценки безопасности и переносимости однократных и повторных подкожных доз ALT-801 здоровыми субъектами с избыточной массой тела и ожирением (ИМТ 25,0–40,0 кг/м²), а также для характеристики диапазона эффективных доз на основе фармакокинетических-фармакодинамических (ФК-ФД) взаимосвязей. Изучаются здоровые добровольцы с избыточной массой и ожирением, так как ФК профиль у таких субъектов может отличаться от такового у людей с нормальной массой. Кроме того, эти субъекты способны лучше переносить спрогнозированный ФД-эффект снижения массы и даже могут получить пользу от лечения. Были приняты соответствующие меры контрацепции, чтобы свести к минимуму шансы на беременность, и были приняты меры предосторожности для исключения ранее существовавших состояний, которые могли бы подвергнуть субъектов риску лечения аналогами ГПП-1 или глюкагона. Субъекты с диабетом были исключены до тех пор, пока влияние ALT-801 на гомеостаз глюкозы не будет лучше охарактеризовано в недиабетической популяции. Поскольку ожидается, что субъекты с избыточной массой и ожирением будут иметь различные уровни резистентности к инсулину, наблюдения, сделанные в этих исследованиях, вместе с данными по другим соединениям этого класса должны предсказывать эффекты, наблюдаемые при изучении субъектов с диабетом. Были введены исключения, которые в противном случае могли бы повлиять на точную оценку воздействия ALT-801 на безопасность, ФК или ФД. Анализ проводится для оценки влияния диапазона ИМТ, использованного в этом исследовании, на параметры ФК и ФД. Исследование покажет влияние ALT-801 на массу тела, обеспечив поддержку его применения в качестве основного средства лечения ожирения.

Основной целью исследования является оценка безопасности и переносимости ALT-801 у здоровых субъектов с избыточной массой тела и ожирением после однократного и многократного подкожного (п/к) введения восходящей дозы путем оценки побочных эффектов, основных показателей жизнедеятельности, безопасности, анализа мочи, физикального обследования и изучения реакции в месте инъекции, оценки

гомеостаза глюкозы, кровяного давления, электрокардиограммы (ЭКГ), проведения холтеровского мониторинга и т.п. Второстепенными задачами исследования являются оценка: 1) фармакокинетики ALТ-801 после однократного и многократного подкожного введения восходящей дозы; и 2) ФД-эффекты ALТ-801 после однократного и многократного введения дозы. Поисквые цели исследования включают оценку: 1) расширенного ФД-эффекта ALТ-801 после многократного введения дозы; и 2) влияния ALТ-801 на удлинение интервала QT с поправкой на частоту сердечных сокращений (QTc). Оценки исследования, в том числе протонной плотности жировой фракции печени, измеряемой с помощью МРТ (МРТ-ППЖФП), массы тела, состава тканей тела с помощью МРТ всего организма, резистентности к инсулину, системного воспаления, а также взаимодействия с мишенями ГПП-1 и глюкагона, основаны на ожидаемых ФД-свойствах ALТ-801, которые включают снижение массы и изменение состава тела. Измерения гомеостаза глюкозы основаны на потенциальном влиянии аналогов ГПП-1 и глюкагона на контроль уровня глюкозы. Амбулаторный мониторинг кровяного давления (АМКД) и мониторинг по Холтеру были включены, поскольку ГПП-1 и агонисты глюкагона ассоциировались с клинически незначительными изменениями кровяного давления и частоты сердечных сокращений. Мониторинг по Холтеру также было включен для получения информации о любых потенциальных эффектах ALТ-801 на удлинение интервала QT. Основываясь на фармакологии и опыте безопасности при применении двойных агонистов ГПП-1 и ГПП-1/глюкагона, может возникать дозозависимая частота побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, включая тошноту и рвоту. Также будет оцениваться гомеостаз глюкозы, включая частоту и тяжесть гипергликемии и гипогликемии. Поскольку снижение массы является желательным свойством этого соединения, контролируют его эффективность, а не безопасность. Однако, если снижение массы считается чрезмерной, доза в последующих когортах может быть скорректирована. Исследуемое лечение может быть приостановлено или прекращено у отдельных субъектов, если уровень снижения массы считается небезопасным или чрезмерным. Субъекты также будут контролироваться на предмет повреждения печени, вызванного лекарствами. Образец крови у субъектов, давших отдельное согласие, берется до и после последней дозы исследуемого лекарственного средства для внесения в биобанк. Эти образцы используются для обнаружения и/или проверки биомаркеров НАСГ и связанных с ним заболеваний, включая потенциальный генетический анализ.

Это исследование, описанное в настоящем изобретении, представляет собой проведенное впервые на человеке исследование фазы 1, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование из двух частей однократных нарастающих

доз (ОНД) и многократных нарастающих доз (МНД) ALT-801 у здоровых субъектов с избыточной массой тела и ожирением. В исследование включаются субъекты с избыточной массой тела или ожирением (индекс массы тела [ИМТ] 25,0–40,0 кг/м²). В части 1, фазе однократной нарастающей дозы (ОНД), субъекты проходят период скрининга продолжительностью до 28 дней. Субъекты с избыточной массой тела или ожирением, которые соответствуют критериям включения и не соответствуют критериям исключения, будут рандомизированы в соотношении 3:1 в когорты из 8 субъектов, из которых 6 субъектов получают ALT-801, а 2 субъекта получают плацебо. Исследуемое лекарство (SEQ ID NO: 1, ALT-801 для подкожного (п/к) введения) вводят подкожно (п/к) в области живота во всех когортах ОНД. Субъектов помещают в исследовательское отделение приблизительно за 1 день до введения исследуемого лекарственного средства (день -1) и выписывают на 8 день. Субъекты получают 1 подкожную дозу ALT-801 или плацебо в 1 день. Для Части 1 запланировано шесть когорт с двумя дополнительными необязательными когортами. Планируются следующие уровни доз: 0,4, 1,2, 2,4, 4,8, 7,2 и 9,4 мг в виде еженедельной дозы, вводимой один раз в неделю (QW) из расчета на человека массой 60 кг. Эти дозы могут быть изменены на основании клинических наблюдений или, при наличии, фармакокинетических данных. Первые 2 субъекта (1 ALT-801 и 1 плацебо) в каждой когорте ОНД получают дозу контрольным образом по меньшей мере за 48 часов до остальных субъектов. Субъекты проходят ночное голодание в течение как минимум 10 часов до оценки в дни с -1 по 5 и до оценки в день 8, и питание будет стандартизировано. Субъекты проходят оценку исследования для оценки безопасности, включая ЭКГ, непрерывный мониторинг глюкозы (НМГ) и АМКД, и у них будут взяты образцы крови для ФК, как описано в схеме оценок ниже. После выписки из исследовательского блока субъекты будут возвращаться для амбулаторных визитов для ФК и оценки безопасности каждые 3 дня до 26 дня и для последующего визита на 35 день или по меньшей мере через 5 периодов полувыведения, как определено в ходе дозирования. Если прогнозируемые эффективные дозы и воздействия, основанные на фармакометрическом моделировании, не достигаются и/или если максимально переносимая доза (МПД) для однократной дозы не определяется после завершения 6 запланированных когорт, до 2 дополнительных когорт с однократной дозой зачисляются в часть 1. Часть 2, фаза многократной нарастающей дозы (МНД) начинается после завершения 8 дня ОНД-когорты 3 и оценки безопасности этой когорты. Начальная доза в части 2 составляет половину дозы для ОНД-когорты 3.

После предоставления информированного согласия субъекты с избыточной массой тела и ожирением проходят период скрининга до 28 дней. Субъектов инструктируют

поддерживать свою нормальную диету и активность во время скрининга и не начинать какие-либо новые диеты, добавки или программы упражнений в любое время во время участия в исследовании. Субъекты допускаются в исследовательский блок примерно за 4 дня до введения исследуемого препарата (день -4) для диеты и подготовительного периода акклиматизации с физическими упражнениями, в течение которого они будут получать стандартное питание. Стандартизированная диета предусматривает ежедневные калории, индивидуализированные с использованием прогнозируемой основной скорости метаболизма (BMR) $\times 1,5$ для учета различий между субъектами в зависимости от массы тела, роста, возраста и пола. Уровень активности участников исследования также стандартизирован. Субъекты, которые соответствуют критериям включения и не соответствуют критериям исключения, рандомизируются в день -1 в соотношении 5:1 в когорты из 12 субъектов, при этом 10 субъектов получают ALT-801 один раз в неделю и 2 субъекта получают плацебо один раз в неделю в течение 6 недель. Исследуемое лекарство вводят подкожно (п/к) в области живота во всех МНД-когортах.

Субъекты получают первую дозу исследуемого медикамента в день 1 и остаются в исследовательском отделении до тех пор, пока не получают вторую дозу в день 8. Затем субъекты возвращаются для 3 амбулаторных визитов для дозирования с недельными интервалами (дни 15, 22 и 29) и повторно госпитализируются с 32 по 43 день. Субъекты получают последнюю дозу исследуемого медикамента на 36 день. После выписки на 43 день субъекты возвращаются для последующего визита на 70 день или через 5 периодов полувыведения после введения дозы, в зависимости от того, что наступит раньше. Субъекты проходят несколько исследований для оценки безопасности, ФД и ФК ALT-801, как описано в настоящем изобретении. Оценки безопасности будут включать ЭКГ, НМГ и АМКД. Оценки ФД включают антропоморфные измерения, диетические оценки, визуализацию и сбор крови на биомаркеры. Определение индекса тяжести симптомов желудочно-кишечных расстройств (PAGI-SYM) у пациентов проводится для оценки влияния лечения на симптомы желудочно-кишечного тракта. Образцы крови собирают для фармакокинетики и иммуногенности. Субъекты проходят ночное голодание в течение как минимум 10 часов до дня -1 по день 5 и до дня 7, 8, 36, 37, 42 и 43. Кроме того, субъекты получают стандартный завтрак для тестов на переносимость смешанной пищи в дни -1, 7 и 42.

Дозы для МНД будут выбираться на основе клинических данных и, при наличии, данных фармакокинетики из ранее завершенных когорт ОНД и МНД. Планируется три МНД-когорты и до 2 дополнительных когорт, если это необходимо, для достижения прогнозируемых эффективных доз и экспозиций на основе фармакометрического

моделирования, для расширения ранее изученного уровня дозы, для продолжения повышения дозы, если МПД для этой фазы не определена, или изучения схемы титрования дозы, если непереносимость ЖКТ наблюдается до достижения максимально эффективной дозы, основанной на фармакометрическом моделировании.

Максимальная рекомендуемая начальная доза (МРНД) в Части 1 основана на одной десятой эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ) при уровне ненаблюдаемого побочного эффекта (УННПЭ), определенном у животных (крыс и обезьян) в основном токсикологическом исследовании надлежащей лабораторной практики. Считалось, что и крысы, и обезьяны имеют схожий клинический ответ на ALT-801 (см. пример 4), но воздействие при УННПЭ у крыс была несколько ниже, что привело к более консервативной начальной дозе для человека. УННПЭ для крыс представлял собой высокую дозу, 0,45 мг/кг/неделю, что эквивалентно 0,44 мг/нед для человека массой 60 кг на основе масштабирования площади поверхности тела. Примечательно, что УННПЭ для обезьян также был высокой дозой, 0,25 мг/кг, что эквивалентно 0,49 мг/неделю для человека массой 60 кг, исходя из масштабирования площади поверхности тела. Используя 10-кратный коэффициент масштабирования для безопасности, была выбрана начальная доза в 0,40 мг/нед для человека массой 60 кг. Кроме того, экстраполированное воздействие на человека при максимальной рекомендуемой начальной дозе (МРНД) значительно ниже воздействия при УННПЭ у обезьян, что, в частности, сравнимо с воздействием при УННПЭ у крыс. Это особенно актуально, потому что обезьяны, хотя и не самый чувствительный вид, являются биологически более значимыми видами для наиболее клинически значимых токсических эффектов (т. е. снижение потребления пищи и рвота). Клинические наблюдения и фармакокинетика в Части 1 в конечном итоге будут определять дозировку в Части 2.

Основными результатами исследований ALT-801 на крысах и обезьянах было снижение массы (см., например, пример 4). Изменение схемы у крыс, которым вводили соединение ежедневно, до 3 дней в неделю, улучшило переносимость за счет уменьшения влияния ALT-801 на потребление пищи и снижение массы тела, что согласуется с механизмом действия (см. Пример 4). Токсичность ГПП-1 и агонистов глюкагона также хорошо изучена в исследованиях на людях. Доклинические данные о безопасности подтверждают 3-кратное увеличение дозы для ОНД-когорты 2. Последующие эскалации не превышают 2-кратной в любой части исследования. При необходимости можно изучить схемы титрования дозы для улучшения переносимости. В дополнение к достоверности этих прогнозов, предполагается, что зависимость доза-воздействие на людей будет линейной на основе популяционной ФК-модели нескольких доклинических

видов (мышей, крыс, мини-свиней и обезьян), как описано в Примере 4. Модель обновляется данными, полученными на людях, по мере продолжения исследования. Спрогнозированный $T_{1/2}$ ALT-801 у человека находится в диапазоне 100 часов, предположение, которое также будет подтверждено в Части 1. Основываясь на дозировании один раз в неделю (QW), расчетное накопление при повторном приеме в равновесном состоянии не превышает 2-кратного. Чтобы подтвердить, что многократное воздействие доз останется в рамках однократного воздействия, планируется, что начальная доза в части 2 будет составлять половину дозы для части 1 когорты 3. Однако последующие когорты Части 2 могут быть скорректированы на основе данных о безопасности и фармакокинетике. Решение о повышении дозы до каждого последующего уровня основано на оценке безопасности и переносимости в течение 8 дней (7 дней после однократной дозы) в части 1 и 15 дней (7 дней после второй дозы) в части 2. Решение об увеличении дозы после завершения второй недели основано на наблюдении из более ранних исследований ГПП-1 и двойных агонистов ГПП-1/глюкагона, что побочные эффекты, которые, как ожидается, будут преимущественно тошнотой или рвотой, будут возникать в первые 2 недели дозирования. Кроме того, ожидается, что C_{max} и AUC_{tau} на последней неделе дозирования не превысят C_{max} или AUC_{inf} дозы в ранее завершенной и оцененной по безопасности ОНД-когорте. Целевая доза для максимальной эффективности, соответствующая ED80–ED90, для взрослого человека оценивается в пределах от 1 до 5 мг, а целевые концентрации в плазме - от 50 до 100 нг/мл, исходя из воздействий у животных при эффективных дозах и фармакометрическом моделировании ФК-параметров у животных для прогнозирования ФК у человека. Таким образом, предполагаемая начальная доза около в 2,5 раза ниже, чем самая низкая предполагаемая эффективная доза, и ожидается, что она будет неактивной.

В целях обеспечения максимальной безопасности однократная нарастающая доза (ОНД) и многократная нарастающая доза (МНД) планируется не превышать воздействия УННПЭ для крыс. Однако, если ФД и переносимость предполагают, что субъекты с избыточной массой тела и ожирением получают пользу от доз, которые, как ожидается, превысят воздействие при УННПЭ для крыс, подтверждающие данные по безопасности и эффективности представляются в ИЕК, и достигается согласие до продолжения эскалации ОНД и МНД.

Для повышения дозы в Части 1 требуется минимум 6 субъектов, а в Части 2 - 8 субъектов, при этом по меньшей мере 1 субъект в каждой группе получает плацебо. Предлагаемые следующие уровни доз могут быть скорректированы в сторону уменьшения на основе оценки данных по безопасности и переносимости, наблюдаемых в предыдущих

когортах лечения, если наблюдения показывают, что повышение дозы превышает МПД. Дозирование может продолжаться до тех пор, пока не будет определена МПД, которая устанавливается отдельно для каждой части исследования. Имеющиеся фармакокинетические данные могут использоваться для принятия решений и учитываются, если ожидается, что воздействие превысит УННПЭ для крыс. В целях обеспечения максимальной безопасности планируемая эскалация ОНД и МНД не будет превышать уровни УННПЭ для крыс.

После завершения действий по скринингу субъекты, которые соответствуют всем критериям включения (например, и ни одному из критериев исключения, рандомизируются с помощью интерактивной веб-системы ответа (ИВСО). В Части 1 2 субъекта в каждой когорте случайным образом распределяются 1:1 в группы лечения ALT-801 или плацебо для контрольного дозирования. Остальные 6 субъектов в каждой когорте из 8 субъектов случайным образом распределяются в группы лечения ALT-801 или плацебо, при этом 5 субъектов назначаются в группу ALT-801 и 1 субъект назначается в группу плацебо для общего соотношения 3:1 ALT-801 и плацебо в каждой группе. В Части 2 когорты из 12 субъектов случайным образом распределяются в соотношении 5:1 в группы лечения ALT-801 или плацебо, при этом 10 назначаются в группу ALT-801, а 2- в группу плацебо.

ALT-801 готовят в стеклянных флаконах в стерильном забуференном водном растворе с конечной концентрацией 2,5 мг/мл и общим объемом заполнения 1,2 мл и вводят путем подкожной (п/к) инъекции. В части 1 однократная доза исследуемого лекарственного средства вводится в день 1. Первые 2 субъекта (1 ALT-801 и 1 плацебо) в каждой когорте ОНД получают дозу контрольным образом по меньшей мере за 48 часов до остальных субъектов. В Части 2 исследуемое лекарственное средство вводят один раз в неделю в течение 6 недель. Дозы вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29 и 36. Начальная доза в Части 1 составляет 0,40 мг, что соответствует одной десятой дозы, эквивалентной дозе для человека, на уровне, при котором не наблюдается побочный эффект у крыс (округлено в меньшую сторону от 0,44 мг/нед для безопасности), и затем доза будет повышаться по модифицированной схеме Фибоначчи и составит дозу с 3-кратным или меньшим увеличением по сравнению с запланированными уровнями доз 0,40, 1,2, 2,4, 4,8, 7,2 и 9,4 мг (эквивалентно еженедельной дозе, вводимой один раз каждые 7 дней). Планируется, что начальная доза в части 2 составит половину дозы для части 1 когорты 3. Однако последующие когорты Части 2 могут быть скорректированы на основе данных о безопасности и фармакокинетике. Решение о повышении до каждого последующего уровня дозы основано на оценке безопасности и переносимости через 8 дней в части 1 (7

дней после однократной дозы) и 15 дней (7 дней после второй дозы) в части 2. Увеличение дозы может быть изменено, а схемы титрования дозы могут быть изменены в зависимости от обстоятельств или как описано в настоящем изобретении. Каждая доза ALT-801 или плацебо вводится п/к в брюшную полость специально обученным медицинским персоналом. Объем введения основан на выбранной дозе и концентрации 2,5 мг/мл для конечного лекарственного продукта. Солевой раствор плацебо соответствует объему в зависимости от дозы и объема ALT-801, введенного в этой когорте. Поскольку снижение массы является желательным свойством этого соединения, контролируют его эффективность, а не безопасность. Однако, если снижение массы считается чрезмерным, доза в последующих когортах может быть скорректирована. Исследование лекарственного средства может быть приостановлено или прекращено у отдельных субъектов, если уровень снижения массы считается чрезмерным. Исследование лекарственного средства может быть приостановлено или прекращено у отдельных субъектов, если уровень побочных эффектов со стороны ЖК-тракта считается чрезмерным и непереносимым, несмотря на лечение противорвотными средствами (например, тяжелые побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта наблюдаются в течение более 24 часов). При непрекращающейся рвоте субъекту можно дать противорвотное средство. В этой ситуации предпочтительнее использовать антагонист 5HT₃-рецепторов (например, ондансетрон). Предлагаемые последующие уровни доз могут быть скорректированы в сторону уменьшения на основе оценки данных по безопасности и переносимости, наблюдаемых в предыдущих когортах лечения, если наблюдения показывают, что повышение дозы превышает МПД. Дозирование может продолжаться до тех пор, пока не будет определена МПД, которая устанавливается отдельно для каждой части исследования. Доступные ФК-данные могут использоваться для принятия решений.

Образцы крови для оценки фармакокинетики берут в нулевой час и в 1, 4, 6, 8, 12 и 16 часов в дни -1, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 и 26 для части 1 исследования и в нулевой час и в 1, 4, 6, 8, 12 и 16 часов в дни -1, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 15, 22, 29 и 36-38 для части 2. Оставшуюся плазму из ФК-образцов можно хранить в замороженном виде без ограничения времени и использовать для разработки биоаналитического метода ALT-801 или для исследования метаболитов ALT-801. Показания ЭКГ соответствуют времени забора образцов для ФК. Когда несколько действий происходят в один и тот же момент времени, ЭКГ должны быть сняты в первую очередь, а забор крови для ФК должен проводиться в номинальное время. Оценки ФД выполняются только в Части 2.

Рост измеряется в сантиметрах с помощью настенного ростомера или ростомера,

установленного на медицинских механических весах, в зависимости от того, что доступно. Субъекты должны быть в носках или босиком. За исключением посещений для скрининга, масса измеряется в килограммах с использованием калиброванных весов приблизительно в одно и то же время суток в каждый номинальный момент времени. Измерения следует проводить с субъектами, одетыми в халат (или другую стандартную одежду, предоставленную отделом клинических исследований), нижнее белье и носки (без обуви), натошак и после того, как субъекта попросили опорожнить мочевой пузырь (т. е. с пустым мочевым пузырем). Окружность талии должна быть измерена, когда субъект одет в халат. Измерение проводят на уровне посередине между верхней частью гребня подвздошной кости и нижним латеральным краем ребер. Измерение не обязательно должно быть на уровне пупка. Сантиметровую ленту держат горизонтально. Измеряют рост, массу и окружность талии, а также рассчитывают и записывают ИМТ в соответствии с таблицами, приведенными в Части 1 и Части 2. Измерение роста требуется только при скрининге. Окружность талии измеряется только для участников Части 2.

FibroScan® — это ультразвуковой прибор, способный одновременно измерять жесткость печени и стеатоз с помощью вибрационно-контролируемой транзистентной эластографии (ВКТЭ) и параметра контролируемого затухания ультразвука (ПКЗУ), соответственно. Для субъектов в Части 2 ПКЗУ на FibroScan® измеряется во время скрининга после ночного голодания продолжительностью не менее 10 часов. ПКЗУ на FibroScan® измеряется перед МРТ-ППЖФП. МРТ-ППЖФП - это количественный биомаркер визуализации, который обеспечивает точную, повторяемую и воспроизводимую количественную оценку жировой фракции во всей печени. Для субъектов в Части 2 МРТ-ППЖФП проводится во время скрининга (происходит только в том случае, если ПКЗУ составляет ≥ 300 дБ/м) и во время посещения EOS после минимального 10-часового голодания. Процентное содержание жира в печени корректируется на общий объем печени, который измеряется одновременно с содержанием жира в печени. МРТ всего тела — это признанный метод визуализации, который используется для композиционного анализа состава тела, включая безжировую массу тела. Для субъектов в Части 2 МРТ всего тела выполняется во время скрининга и визита EOS в сочетании с МРТ-ППЖФП.

В частях 1 и 2 испытуемым предоставляется стандартизированная диета во время стационарных периодов в исследовательском отделении. Ежедневные калории индивидуализированы с использованием прогнозируемой BMR, умноженной на коэффициент активности 1,5, а состав макронутриентов стандартизирован на уровне 40-50% углеводов, 15-25% белков и 30-40% жиров. В Части 2 одни и те же

стандартизированные блюда предоставляются с -4 по -2 день и с 39 по 41 день до оценки ФД в -1 и 42 дни. Время и характер питания также будут специфичными для оценок ЭКГ, МРТ-ППЖФП и ТПСП (тест на переносимость смешанной пищи), как описано в каждом из соответствующих руководств.

Потребление пищи и аппетит оцениваются с помощью теста приема пищи *ad libitum* и опросника ВАШ (визуальная аналоговая шкала). Опросники ВАШ являются стандартными методами исследования аппетита, которые регистрируют чувство голода, сытости, сытости и желание есть пищу с определенным вкусом, например, сладкую, соленую, острую и жирную [Flint 2000]. Субъекты будут заполнять анкету ВАШ до и после неограниченного приема пищи в дни, указанные в графике оценок. Количество пищи *ad libitum* превысит ожидаемое потребление здоровых добровольцев с избыточной массой тела и ожирением. Во время пробного приема пищи испытуемые изолируются, а сигналы окружающей среды сводятся к минимуму (например, никакого телевизора, мобильных телефонов, компьютеров и т. д.). Субъектов проинструктировали, что у них есть 30 минут, чтобы съесть столько, сколько они хотят, и они должны есть до комфортного насыщения. Масса до и после еды регистрируется, чтобы зафиксировать потребление пищи, и определяется потребление калорий.

Прогнозируемая основная скорость метаболизма (BMR) и затраты энергии в покое (ЗЭП) оценивали утром натощак и после периода голодания не менее 10 часов. Измерение затрат энергии в покое следует проводить в дни -1 и 42. BMR и ЗЭП определяли способом вентилируемого колпака (непрямая калориметрия). Поскольку BMR обычно является основным компонентом суточного расхода энергии, изменения BMR могут иметь клиническое значение в контексте программы разработки метаболических лекарственных средств, направленных на затраты энергии.

После минимального 10-часового голодания испытуемый пройдет тест на переносимость смешанной пищи (ТПСП), который будет включать потребление стандартизированной жидкой пищи (6 жидких унций «Susure Plus» [700 ккал], пищевая добавка, содержащая компоненты жиров, углеводов и белков, составляющих стандартный ТПСП) в течение 5 минут. Образец $t=0$ минут (т.е. до стандартизированной жидкой еды) является последним образцом крови НОМА IR 2 (см. выше). Гормональные маркеры будут включать глюкозу, инсулин и С-пептид. Образцы собирают с интервалом в 5 минут в течение первых 15 минут и 30 минут после этого в течение 240 минут после приема стандартизированной жидкой пищи (без дополнительного приема пищи в течение этого времени). Процедуры ТПСП проводятся в дни, указанные в графике обследований. В целях стандартизации теста и снижения вариабельности каждому тесту предшествует 3-

дневная стандартизированная диета и стандартизированный подготовительный период физической активности после поступления в клиническое исследовательское отделение.

Образцы крови собирают для оценки кетоновых тел после того, как субъект голодал в течение ночи в течение по меньшей мере 10 часов, за 1 день до первой и второй доз и через 6 дней после последней дозы. Образцы крови для оценки афактора роста фибробластов 21 (ФРФ-21) и адипонектина собирают после того, как субъект голодал в течение ночи в течение не менее 10 дней. После минимального 10-часового голодания кровь собирают для оценки липидов, включая холестерин (общий, ЛПВП, ЛПНП), Апо А и В, липопротеин (а), ТГ и трипальмитин, до первой дозы и через 6 дней после последней дозы исследуемого медикамента, как указано в Таблице 4. Кровь собирают для оценки маркеров воспаления, включая ФНО- α , С-реактивный белок человека (чСРБ), лептин, моноцитарный хемотаксический белок 1 (МХБ-1) и ИЛ-6 до первой дозы и через 6 дней после последней дозы исследуемого лекарственного средства, как указано в таблице 4. Гомеостаз глюкозы оценивали с помощью 24-часового непрерывного мониторинга глюкозы (НМГ) с использованием Dexcom G6 CGM в течение периодов, указанных в Части 1 и Части 2.

Группа безопасности включает всех рандомизированных субъектов, получивших по меньшей мере 1 дозу исследуемого лекарственного средства. Субъекты анализируются в соответствии с лечением, которое они получают. ФК-популяция включает всех рандомизированных субъектов, получивших по меньшей мере 1 дозу ALT-801 и имеющих достаточно данных о фармакокинетике для анализа. QT-популяция включает всех субъектов в ФК-популяции, которые имеют по меньшей мере 1 синхронизированную по времени ЭКГ на исходном уровне и соответствующую синхронизированную по времени ФК-ЭКГ после введения дозы. ФД-популяция включает всех рандомизированных субъектов, которые получили по меньшей мере 1 дозу исследуемого лекарственного средства и у которых есть результаты исходной и по меньшей мере 1 оценки ФД после исходного уровня.

В используемых статистических методах описательная статистика используется для оценки различий в демографических и базовых характеристиках. История болезни кодируется с использованием самой последней версии Медицинского словаря нормативно-правовой деятельности (MedDRA) и перечисляется по темам. Непрерывные данные о безопасности суммируются с описательной статистикой (среднее арифметическое, стандартное отклонение [CO], медиана, минимум и максимум) по уровню дозы и лечению (активное или плацебо). Категориальные данные о безопасности обобщаются с подсчетом частоты и процентным соотношением по части исследования,

уровню дозы, лечению и дню, где это применимо.

Побочные эффекты (ПЭ) кодируются с использованием самой последней версии MedDRA. Предоставляется список данных о ПЭ по субъектам, включая дословный термин, предпочтительный термин, SOC, лечение, тяжесть и связь с исследуемым лекарственным средством. Количество субъектов, испытывающих ПЭ, возникшие во время лечения (ПЭВВЛ), и количество отдельных ПЭВВЛ и реакций в месте инъекции суммируются по группам обработки, SOC и предпочтительному термину. ПЭВВЛ также будут обобщены по степени тяжести (степень 1–4) и по связи с исследуемым лекарственным средством (маловероятно, возможно, вероятно). Взаимосвязи для правил прекращения участия в исследовании определяются как возможно или вероятно связанные. Лабораторные оценки, оценки основных показателей жизнедеятельности, непрерывный кардиомониторинг, параметры ЭКГ (за исключением холтеровского мониторирования), измерения НМГ, измерения АМКД и параметры теста на переносимость смешанной пищи суммируются по части исследования, группе лечения, уровню дозы и моменту сбора, указанному в протоколе. Также будет представлена сводка изменений по сравнению с исходным уровнем в каждый момент времени, указанный в протоколе, по группам лечения. Изменения в физических осмотрах перечислены для каждого субъекта. Анализ PAGI-SYM подробно описан в плане статистического анализа (ПСА). Сопутствующие лекарственные средства перечислены по темам и закодированы с использованием самого актуального словаря лекарственных средств ВОЗ.

Фармакокинетика включает отдельные данные о концентрации ALT-801, перечисленные и обобщенные по когортам с описательной статистикой (размер выборки [N], среднее арифметическое, CO, коэффициент вариации [KB%], медиана, минимум и максимум). Индивидуальные и средние \pm CO профили зависимости концентрации ALT-801 от времени для каждой когорты также будут представлены графически. Некомпаратментные (НКА) ФК-параметры ALT-801 в плазме C_{max} , время достижения максимальной концентрации в плазме (T_{max}), AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, константа скорости выведения (Kel), $T_{1/2}$, кажущийся общий клиренс из организма (CL/F), и кажущийся объем распределения в терминальной фазе (Vz/F) (где данных достаточно для определения параметра) оценивается для ОНД-части. Для МНД-части T_{max} , C_{max} и AUC_{tau} ФК-параметры оцениваются после введения первой и последней дозы (неделя 1 и неделя 6). Если позволяют данные, Kel , $T_{1/2}$, кажущийся общий клиренс из организма в равновесном состоянии ($CLSS/F$) и кажущийся объем распределения в равновесном состоянии (VSS/F) оцениваются после введения дозы на 6 неделе. Фармакокинетические параметры перечислены для каждого индивидуума и суммированы по когортам с использованием

описательной статистики (N, среднее арифметическое, CO, KB%, медиана, минимум, максимум, среднее геометрическое и геометрический KB%). Влияние исходного ИМТ на ФК-параметры оцениваются с помощью корреляционного анализа. Пропорциональность дозы оценивается с использованием подхода силовой модели, в зависимости от ситуации. Накопление оценивают как отношение C_{\max} и $AUC_{0-\tau}$ на неделе 6 к неделе 1. Устойчивое состояние оценивают путем сравнения минимальных концентраций от первой до последней дозы.

ЭКГ, извлеченные из холтеровских мониторов, анализируются центральной лабораторией ЭКГ с выбранной группой квалифицированных считывателей, не имеющих информации о предмете, посещении, лечении и номинальном моменте времени. Один считыватель просматривает ЭКГ отдельного субъекта, если не требуется второй просмотр, основанный на контроле качества или доступности. Все ЭКГ анализируются с использованием одного и того же отведения для отдельного субъекта. Первичным отведением анализа является отведение II, если оно не поддается анализу, тогда V2 или V5 используются для всего набора данных отдельного субъекта.

Первичный анализ представляет собой среднее изменение и односторонний верхний 95% доверительный интервал для плацебо-скорректированного изменения по сравнению с исходным уровнем после введения дозы с использованием скорректированного по Фридеричиа интервала QT ($\Delta\Delta QTcF$). Другие способы коррекции, такие как по формуле Базетта ($QTcB$), индивидуальная коррекция ($QTcI$) или популяционная коррекция ($QTcP$), могут быть изучены и сравнены. Как минимум, анализируются и представляются коррекции по формуле Фридеричиа и по формуле Базетта. Вторичный анализ будет включать взаимосвязь между согласованными по времени концентрациями в плазме и $\Delta\Delta QTcF$ с использованием линейного моделирования смешанных эффектов. Иммуногенность повторного введения дозы ALT-801 оценивают путем оценки образцов сыворотки с использованием анализа на основе ELISA, собранных во время последнего события фазы МНД. Если образцы в конце исследования положительны, образцы в середине исследования также будут проанализированы. Иммуногенность может быть связана с безопасностью и ФК, если применимо.

Фармакодинамические исследования, включающие изменение содержания жира в печени, антропоморфные параметры, взаимодействие с ГПП-1 и резистентность к инсулину, взаимодействие с глюкагоном, маркеры липидов и воспаления, перечислены и обобщены по группам лечения с описательной статистикой (размер выборки [N], среднее арифметическое, CO, медиана, минимум, максимум, среднее геометрическое и геометрический KB%). Логическая статистика используется, если применимо. Влияние

исходного ИМТ на ФД-параметры оценивается с помощью ковариативного анализа.

Промежуточный анализ может быть проведен после завершения введения 2 или более доз в МНД-когорте 3. Целью этого анализа является обеспечение выбора дозы для последующих испытаний. Для этого анализа исследование останется слепым, с безопасностью на уровне субъекта, ФД и доступные ФК-данные деидентифицируются для анализа. Приводятся сводные данные по части исследования, уровню дозы, группе лечения (активная или плацебо) и по дням, где это применимо. Проведение промежуточного анализа подробно описано в ПСА.

Пример 8. Исследования состава

Чтобы поддержать клиническую разработку и будущую коммерциализацию, необходимо разработать состав ALT-801 для достижения долгосрочной стабильности в идеале при +2-8°C или выше. Кроме того, состав ALT-801 может быть оптимизирован для улучшения фармакокинетических параметров.

Исходный состав ALT-801 (F58), описанный выше и содержащий 2,5 мг/мл ALT-801 в качестве АФИ, 3,48 мг/мл аргинина, 0,5 мг/мл полисорбата 20 (PS-20) и 42,6 мг/мл маннитола, рН, доведенный до ~ 7,75 с помощью соляной кислоты, был создан для поддержки ранней клинической разработки. F58 хранится при температуре -20°C. Было обнаружено, что состав F58 становится мутным при +2-8°C, что указывает на то, что из раствора осаждались более крупные агрегаты. При анализе с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой было обнаружено, что чистота и содержание ALT-801 не изменились, что подтверждает гипотезу о том, что указанный мутный вид связан с физической нестабильностью надмолекулярных структур, образованных ALT-801 в растворе. ALT-801 представляет собой пептидный амфифил, образованный ковалентным присоединением гидрофобной алкильной цепи EuPort (например, функционализированного неионного гликолипидного поверхностно-активного вещества) к гидрофильной пептидной части. Таким образом, ALT-801 предназначен для самосборки в надмолекулярные структуры, такие как мицеллы. Было показано, что ALT-801 в воде образует мицеллы при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) 1,33 мг/мл, измеренной с помощью поверхностного тензиометра (см. Фигуру 30). Ожидается, что ККМ ALT-801 будет такой же в буфере F58 (без PS-20).

Чтобы улучшить рецептуру ALT-801 для подкожного введения, эксперименты по критической концентрации мицеллообразования (ККМ) оценивали с помощью поверхностной тензиометрии как для полисорбата 20, так и для полисорбата 80, каждый в приготовленном буфере F58 при рН = 7,7, в четырех условиях: отдельно, с добавлением 2,5 мг/мл ALT-801, с добавлением 5,0 мг/мл ALT-801 и с добавлением 10,0 мг/мл ALT-

801. Значения ККМ и, следовательно, сдвиги из-за ALT-801, а также степень взаимодействия между полисорбатом 20 или полисорбатом 80 и ALT-801 определяли, как представлено в таблицах 19 и 20, соответственно. Сдвиги ККМ просто рассчитываются как ККМ в присутствии ALT-801 за вычетом ККМ для одного поверхностно-активного вещества в растворе. Степень взаимодействия в пересчете на массу или моль рассчитывают как сдвиг ККМ, деленный на концентрацию ALT-801, вызывающую сдвиг.

Таблица 19

ККМ и сдвиг ККМ и степень взаимодействия между PS-20 и ALT-801

Тест#	Полисорбат 20	Полисорбат 20	Полисорбат 20	Полисорбат 20
	Значение ККМ	Значение ККМ	Значение ККМ	Значение ККМ
	нет	2.5 мг/мл	5.0 мг/мл	10.0 мг/мл
	ALT-801	ALT-801	ALT-801	ALT-801
	(мг/мл)	(мг/мл)	(мг/мл)	(мг/мл)
1	0,722	2,37	4,02	7,29
2	0,721	2,36	4,00	7,30
Среднее	0,722	2,37	4,01	7,30
Сдвиг ККМ из-за ALT-801	NA	1,65 мг/мл	3,29 мг/мл	6,58 мг/мл
Степень взаимодействия мг PS20/мг ALT-801	NA	0,660 мг/мг	0,658 мг/мг	0,658 мг/мг
Степень взаимодействия моль PS20 / моль ALT-801	NA	2,08 моль/моль	2,08 моль/моль	2,08 моль/моль

Таблица 20

ККМ и сдвиг ККМ и степень взаимодействия между PS-80 и ALT-801.

Тест#	Полисорбат 80	Полисорбат 80	Полисорбат 80	Полисорбат 80
	Значение ККМ	Значение ККМ	Значение ККМ	Значение ККМ
	нет	2,5 мг/мл	5,0 мг/мл	10,0 мг/мл
	ALT-801	ALT-801	ALT-801	ALT-801
	(мг/мл)	(мг/мл)	(мг/мл)	(мг/мл)
1	0,183	2,76	5,33	10,50
2	0,182	2,75	5,35	10,49
Среднее	0,183	2,76	5,34	10,50

Сдвиг ККМ из-за ALT-801	NA	2,58 мг/мл	5,16 мг/мл	10,32 мг/мл
Степень взаимодействия мг PS20/мг ALT-801	NA	1,03 мг/мг	1,03 мг/мг	1,03 мг/мг
Степень взаимодействия моль PS20 / моль ALT- 801	NA	3,05 МОЛЬ/МОЛЬ	3,05 МОЛЬ/МОЛЬ	3,05 МОЛЬ/МОЛЬ

Эти результаты определяют минимальную концентрацию PS-20 или PS-80, которую следует использовать в диапазоне концентраций ALT-801 для достижения ККМ. Также было установлено, что концентрация PS-20 (0,5 мг/мл) в составе F58 слишком низка для достижения ККМ и может объяснить мутный вид раствора при хранении при +2-8°C. Результаты показывают, что для достижения ККМ требуется по меньшей мере 0,66 мг PS-20 на мг ALT-801. Точно так же для достижения ККМ требуется не менее 1,03 мг PS-80 на мг ALT-801.

Также в настоящем изобретении представлены другие преимущества реагентов и способов их применения, как это будет понятно специалистам в данной области. Хотя некоторые варианты изобретения были описаны в терминах предпочтительных воплощений, специалистам в данной области техники будут понятны и другие варианты и модификации. Поэтому предполагается, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные варианты, которые входят в объем представленной ниже формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический дозированный состав, содержащий продукт пептид-агонист, обладающий аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептид модифицирован неионным гликолипидным поверхностно-активным веществом и дозировка подобрана таким образом, чтобы улучшить контроль уровня глюкозы в крови с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

2. Фармацевтический дозированный состав, содержащий пептид-агонист, обладающий аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептид модифицирован неионогенным гликолипидным поверхностно-активным веществом и дозировка подобрана таким образом, чтобы вызывать снижение массы тела с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

3. Фармацевтический дозированный состав по п. 2, отличающийся тем, что снижение массы тела составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, или от около 1% до около 20%, или от около 5% до около 10% (масс./масс.).

4. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что дозировка подобрана для еженедельного применения, необязательно для введения в течение от около 2 недель до около 8 недель.

5. Фармацевтический дозированный состав по п. 4, отличающийся тем, что введение млекопитающему однократной дозы по сравнению с введением примерно эквимольной дозы семаглутида приводит к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения.

6. Фармацевтический дозированный состав по п. 4, отличающийся тем, что введение млекопитающему еженедельной дозы в течение от около 4 до около 8 недель, необязательно около 6 недель, по сравнению с введением примерно эквимольной дозы семаглутида, приводит к увеличению снижения массы всего тела примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после

введения.

7. Фармацевтический дозированный состав по п.4, отличающийся тем, что введение млекопитающему однократной дозы по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида обеспечивает более низкое значение C_{\max} примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения.

8. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27.

9. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что пептид двойного агониста имеет примерно одинаковую аффинность к РГПП-1 и РГКГ, при этом указанный пептид двойного агониста необязательно представляет собой SEQ ID NO: 1.

10. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой поверхностно-активное вещество класса 1-алкилгликозидов.

11. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что представляет собой водный состав, содержащий один или более из числа полисорбата 20, аргинина или маннитола.

12. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что введение млекопитающему дозированного состава по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида приводит к:

снижению уровня глюкозы в крови примерно через 48 или 96 часов после введения, необязательно при этом уровень глюкозы снижается на около 50%;

снижению уровня глюкозы в крови примерно через 72 часа после введения, необязательно при этом уровень глюкозы снижается на около 100%, и/или,

снижению уровня глюкозы в крови примерно через 120 часов после введения.

13. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что:

a) введение дозированного состава млекопитающему:

вызывает снижение массы всего тела, и/или

вызывает снижение массы печени,

и/или

b) введение дозированного состава млекопитающему по сравнению с

введением примерно эквимолярной дозы семаглутида:

обеспечивает более низкое значение C_{\max} , необязательно примерно на 50% ниже;

обеспечивает приблизительно равное или большее значение T_{\max} , необязательно большее примерно на 100%;

обеспечивает аналогичную $AUC_{(0-\infty)}$, необязательно около 85-93%;

обеспечивает приблизительно равный или более продолжительный период полувыведения $T_{1/2}$ (ч), необязательно примерно на 25-75% более продолжительный;

обеспечивает пролонгированное среднее время удержания (СВУ) (ч), необязательно по меньшей мере на около 25% более длительное;

обеспечивает растянутый по времени фармакокинетический/фармакодинамический профиль;

обеспечивает примерно равные или более высокие глюкорегуляторные эффекты;

вызывает большее снижение массы всего тела, необязательно примерно в два раза;

вызывает снижение жировой массы тела, необязательно на около 50-100% и/или

при введении для лечения НАСГ вызывает повышенное снижение массы всего тела, снижение массы печени, улучшение показателя активности НАЖБП (ПАН), улучшение гепатостеатоза, снижение вздутия, улучшение окрашивания collA1, улучшение АЛТ, улучшение ТГ/ОХ в печени и улучшение ТГ/ОХ в плазме.

14. Фармацевтический дозированный состав по п. 13, отличающийся тем, что введение дозированного состава млекопитающему по сравнению с введением примерно эквимолярной дозы семаглутида приводит к:

большему снижению массы тела примерно через 14 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 15%, и/или

к большему снижению массы тела примерно через 20-28 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 25%.

15. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что его введение млекопитающему приводит к снижению массы тела млекопитающего с ожирением, достаточному для возвращения массы тела млекопитающего к диапазону стандартной массы нормального худощавого млекопитающего.

16. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, выбранных из буфера или регулятора осмолярности.

17. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих

пунктов, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

18. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что концентрация пептида двойного агониста составляет от 0,05 до 20 мг/мл.

19. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что концентрация пептида двойного агониста составляет от 0,1 до 10 мг/мл.

20. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что рН пептида двойного агониста составляет от 6 до 10.

21. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, содержащий около 0,025-0,15% (масс./масс.) полисорбата 20 или полисорбата 80, около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола в воде (рН 7,7 ± 1,0), необязательно около 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,35% (масс./масс.) аргинина и около 4,3% (масс./масс.) маннитола в воде (рН 7,7±1,0).

22. Фармацевтический дозированный состав по пп. 1-20, содержащий около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола и от 0,6 до 1,0 мг полисорбата 20 или от 1,0 до 1,5 мг полисорбата 80 на мг ALT-801 (SEQ ID NO: 1) в воде (рН 7,7±1,0).

23. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, приготовленный таким образом, чтобы ввести млекопитающему от менее чем около 0,25 мг/кг/дозу, необязательно от более чем около 0,001 мг/кг/дозу до менее чем около 0,15 мг/кг/дозу продукта пептида-агониста.

24. Фармацевтический дозированный состав по п. 23, приготовленный таким образом, чтобы ввести млекопитающему менее 0,25 мг/кг/дозу продукта пептида-агониста.

25. Фармацевтический дозированный состав по п. 23, приготовленный таким образом, чтобы ввести млекопитающему 0,001 - 0,15 мг/кг/дозу, необязательно около 0,03 мг/кг/дозу или около 0,10 мг/кг/дозу продукта пептида-агониста.

26. Фармацевтический дозированный состав по любому из пунктов 1-25, приготовленный таким образом, чтобы ввести человеку от около 0,1 до около 15 мг в неделю, необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю продукта пептида-агониста.

27. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов, приготовленный для введения млекопитающему один раз в неделю в течение по

меньшей мере или вплоть до шести недель.

28. Фармацевтический дозированный состав по любому из предшествующих пунктов приготовленный таким образом, чтобы время достижения терапевтической дозы составляло около четырех недель или менее.

29. Фармацевтический дозированный состав по п. 28, отличающийся тем, что терапевтическая доза имеет значение C_{\max} от около 10 до около 300 нг/мл; T_{\max} от около 10 до около 36 часов; и/или AUC_{0-168} от около 1000 до 100000 ч*нг/мл.

30. Способ снижения уровня глюкозы в крови млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что способ:

a) снижает частоту возникновения одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с введением агониста с несбалансированной аффинностью к РПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему;

b) по сравнению со способом, включающим введение млекопитающему примерно эквимолярной дозы семаглутида, приводит к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 48 или 96 часов после введения приблизительно на 50%, к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 72 часа после введения приблизительно на 100% и/или к снижению уровня глюкозы в крови примерно через 120 часов после введения;

c) вызывает снижение массы всего тела, и/или снижение массы печени;

d) по сравнению со способом, включающим введение млекопитающему примерно эквимолярной дозы семаглутида:

обеспечивает более низкое значение C_{\max} , необязательно примерно на 50% ниже;

обеспечивает приблизительно равное или большее значение T_{\max} , необязательно большее примерно на 100%;

обеспечивает аналогичную $AUC_{(0-\infty)}$, необязательно около 85-93%;

обеспечивает приблизительно равный или более продолжительный период полувыведения $T_{1/2}$ (ч), необязательно примерно на 25-75% более продолжительный;

обеспечивает пролонгированное среднее время удержания (СВУ) (ч), необязательно по меньшей мере на около 25% более длительное;

обеспечивает растянутый по времени фармакокинетический/фармакодинамический профиль;

обеспечивает примерно равные или более высокие глюкорегуляторные эффекты;

вызывает большее снижение массы всего тела, необязательно примерно в два раза;

вызывает снижение жировой массы тела, необязательно примерно на 100% и/или вызывает повышенное снижение массы всего тела, снижение массы печени, улучшение показателя активности НАЖБП (ПАН), улучшение гепатостеатоза, снижение вздутия, улучшение окрашивания col1A1, улучшение АЛТ, улучшение ТГ/ОХ в печени и улучшение ТГ/ОХ в плазме, когда способ используется для лечения НАСГ;

е) по сравнению со способом, включающим введение примерно эквимольной дозы семаглутида, приводит к большему снижению массы тела примерно через 14 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 15%, и/или

к большему снижению массы тела примерно через 20-28 дней после введения дозированного состава, необязательно большему примерно на 25%, и/или

ф) приводит к снижению массы тела млекопитающего с ожирением, достаточному для возвращения массы тела млекопитающего к диапазону стандартной массы нормального худощавого млекопитающего.

31. Способ индуцирования снижения массы тела у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава по любому из предшествующих пунктов, при этом способ снижает частоту возникновения одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с введением агониста с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

32. Способ по п. 30 или 31, отличающийся тем, что пептид двойного агониста представляет собой любую из SEQ ID NO: 1-10 или 12-27.

33. Способ по п. 30 или 31, отличающийся тем, что пептид двойного агониста имеет примерно равную аффинность к РГПП-1 и РГКГ и при этом указанный пептид двойного агониста необязательно представляет собой SEQ ID NO: 1.

34. Способ по п. 30 или 31, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю.

35. Способ по любому из пунктов 30-34, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят подкожно.

36. Способ по любому из пунктов 30-35, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю в течение от около 2 недель до около 8 недель или дольше.

37. Способ по любому из пунктов 30-36, отличающийся тем, что введение фармацевтической дозы млекопитающему в виде еженедельной дозы в течение от около 4 до около 8 недель, необязательно около 6 недель, по сравнению с введением примерно эквимольной дозы семаглутида, приводит к большему снижению массы всего тела

примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель, примерно через 6 недель или примерно через 7 недель после введения млекопитающему.

38. Способ по любому из пунктов 30-37, включающий введение млекопитающему продукта пептида-агониста в дозе от менее чем около 0,25 мг/кг/дозу, необязательно от более чем около 0,001 мг/кг/дозу до менее чем около 0,15 мг/кг/дозу.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что млекопитающему вводят менее чем около 0,25 мг/кг/дозу.

40. Способ по пп. 30-39, предусматривающий введение продукта пептида-агониста в количестве 0,001 - 0,15 мг/кг/дозу, необязательно около 0,03 мг/кг/дозу или около 0,10 мг/кг/дозу.

41. Способ по любому из пунктов 30-40, отличающийся тем, что каждую дозу вводят примерно один раз в неделю или один раз в две недели, необязательно в течение по меньшей мере одного месяца, необязательно, при этом каждая доза содержит примерно одинаковое количество продукта пептида-агониста.

42. Способ по любому из пунктов 30-41, включающий однократное введение менее чем около 0,25 мг/кг/дозу с дальнейшим введением одной или нескольких последующих доз от около 0,03 мг/кг/дозу до около 0,10 мг/кг/дозу.

43. Способ по любому из пунктов 30-42, включающий введение продукта пептида-агониста в количестве 0,001 - 0,15 мг/кг/дозу.

44. Способ по любому из пунктов 30-43, отличающийся тем, что фармацевтический дозированный состав содержит около 0,025-0,15% (масс./масс.) полисорбата 20 или полисорбата 80, около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола в воде (pH $7,7 \pm 1,0$), необязательно около 0,050% (масс./масс.) полисорбата 20, около 0,35% (масс./масс.) аргинина, около 4,3% (масс./масс.) маннитола в воде (pH $7,7 \pm 1,0$), где необязательно пептид двойного агониста представляет собой SEQ ID NO: 1.

45. Способ по любому из пунктов 30-44, отличающийся тем, что состав содержит около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола и 0,6 - 1,0 мг полисорбата 20 или 1,0 - 1,5 мг полисорбата 80 на мг ALT-801 (SEQ ID NO: 1) в воде (pH $7,7 \pm 1,0$).

46. Способ по любому из пунктов 30-45, отличающийся тем, что введение фармацевтического дозированного состава осуществляется таким образом, чтобы обеспечить возможность введения человеку от около 0,1 до около 15 мг в неделю, необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю или необязательно от около 1 до 5 мг в

неделю.

47. Способ по любому из пунктов 30-46, отличающийся тем, что время достижения терапевтической дозы составляет около четырех недель или менее.

48. Фармацевтический дозированный состав, предназначенный для подкожного введения, содержащий продукт пептида-агониста с аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептидный продукт представляет собой SEQ ID NO: 1 и дозировка подобрана таким образом, чтобы улучшить контроль уровня глюкозы в крови с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

49. Фармацевтический дозированный состав, предназначенная для подкожного введения, содержащий пептид-агонист с аффинностью к рецептору глюкагоноподобного пептида 1 (РГПП-1) и рецептору глюкагона (РГКГ), причем пептидный продукт представляет собой SEQ ID NO: 1 и дозировка подобрана таким образом, чтобы вызывать снижение массы тела с уменьшением одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с агонистом с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему.

50. Фармацевтический дозированный состав по п. 49, отличающийся тем, что снижение массы составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10% или от около 1% до около 20%, или от около 5% до около 10% (масс./масс.).

51. Фармацевтический дозированный состав по любому из пунктов 48-50, отличающийся тем, что доза представляет собой лекарственную форму для еженедельного приема, необязательно предназначенную для введения в течение от около 2 недель до около 8 недель.

52. Фармацевтический дозированный состав по любому из пунктов 48-51, отличающийся тем, что состав содержит около 0,2-0,5% (масс./масс.) аргинина, около 3-6% (масс./масс.) маннитола и от 0,6 до 1,0 мг полисорбата 20 или от 1,0 до 1,5 мг полисорбата 80 на мг ALT-801 (SEQ ID NO: 1) в воде (pH 7,7±1,0).

53. Фармацевтический дозированный состав по п. 51, отличающийся тем, что введение млекопитающему однократной дозы по сравнению с введением примерно эквивалентной дозы семаглутида обеспечивает более низкое значение C_{max} примерно через 1 день, примерно через 2 дня, примерно через 3 дня, примерно через 4 дня., примерно через 5 дней, примерно через 6 дней или примерно через 7 дней после введения.

54. Фармацевтический дозированный состав по любому из пунктов 48-53, отличающийся тем, что доза приготовлена таким образом, чтобы ввести человеку от около 0,1 до около 15 мг в неделю, необязательно от около 1 до около 7 мг в неделю или необязательно от около 1 до 5 мг в неделю.

55. Фармацевтический дозированный состав по любому из пунктов 48-54, предназначенный для введения млекопитающему один раз в неделю в течение по меньшей мере или вплоть до шести недель.

56. Фармацевтический дозированный состав по любому из пунктов 48-55, отличающийся тем, что доза приготовлена таким образом, чтобы обеспечить достижение терапевтической дозы примерно через четыре недели или раньше после первого еженедельного введения.

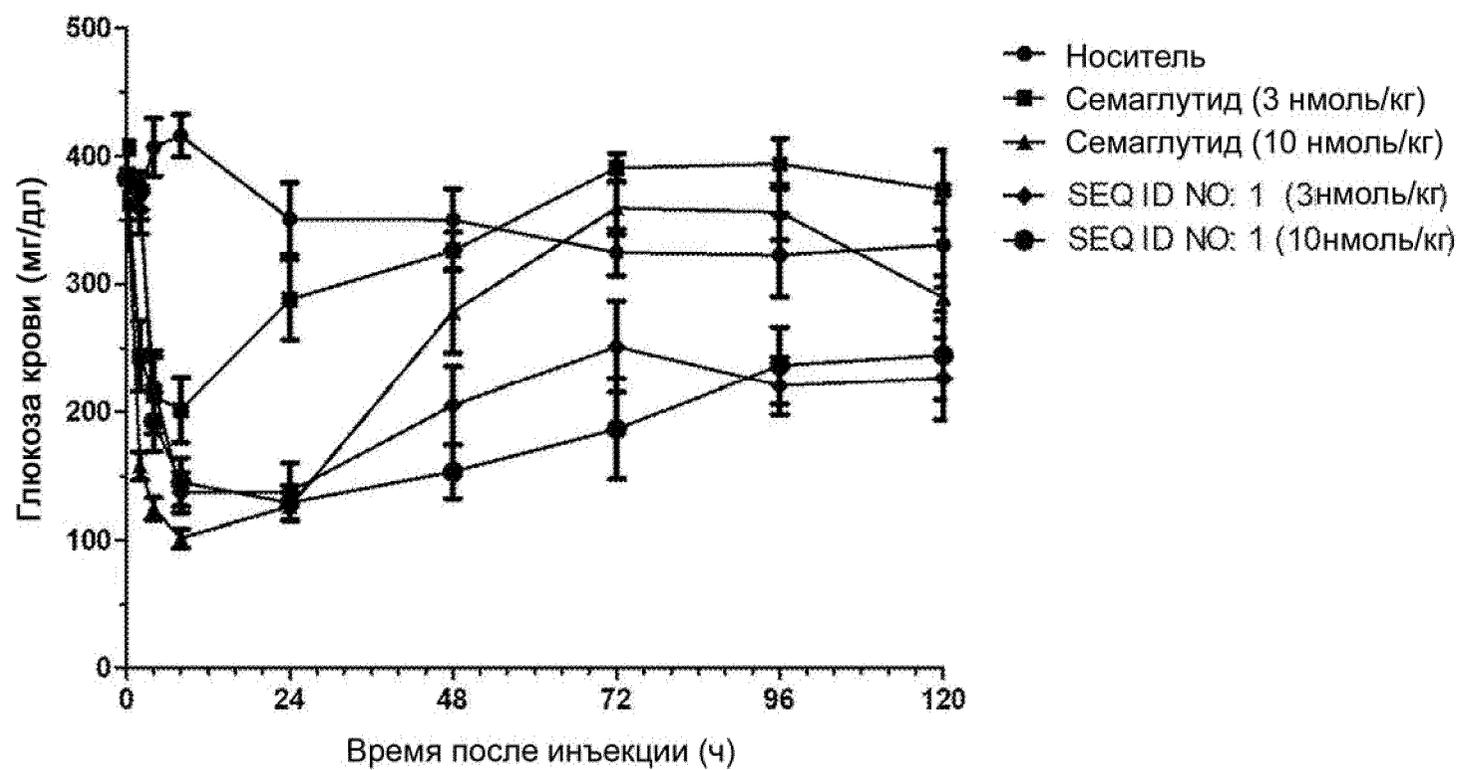
57. Фармацевтический дозированный состав по п. 56, отличающийся тем, что терапевтическая доза имеет значение C_{\max} от около 10 до около 300 нг/мл, необязательно C_{\max} менее 200 нг/мл, значение T_{\max} от около 10 до около 36 часов и/или AUC_{0-168} от около 1000 до 100000 ч*нг/мл.

58. Способ индуцирования снижения массы тела у млекопитающего, включающий введение млекопитающему фармацевтического дозированного состава по любому из пп. 48-57, при этом способ снижает частоту возникновения одного или нескольких побочных эффектов по сравнению с введением агониста с несбалансированной аффинностью к РГПП-1 и РГКГ, где побочные эффекты выбраны из тошноты, рвоты, диареи, боли в животе и запора при введении млекопитающему терапевтической дозы.

59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю, при этом начальная доза представляет собой терапевтическую дозу.

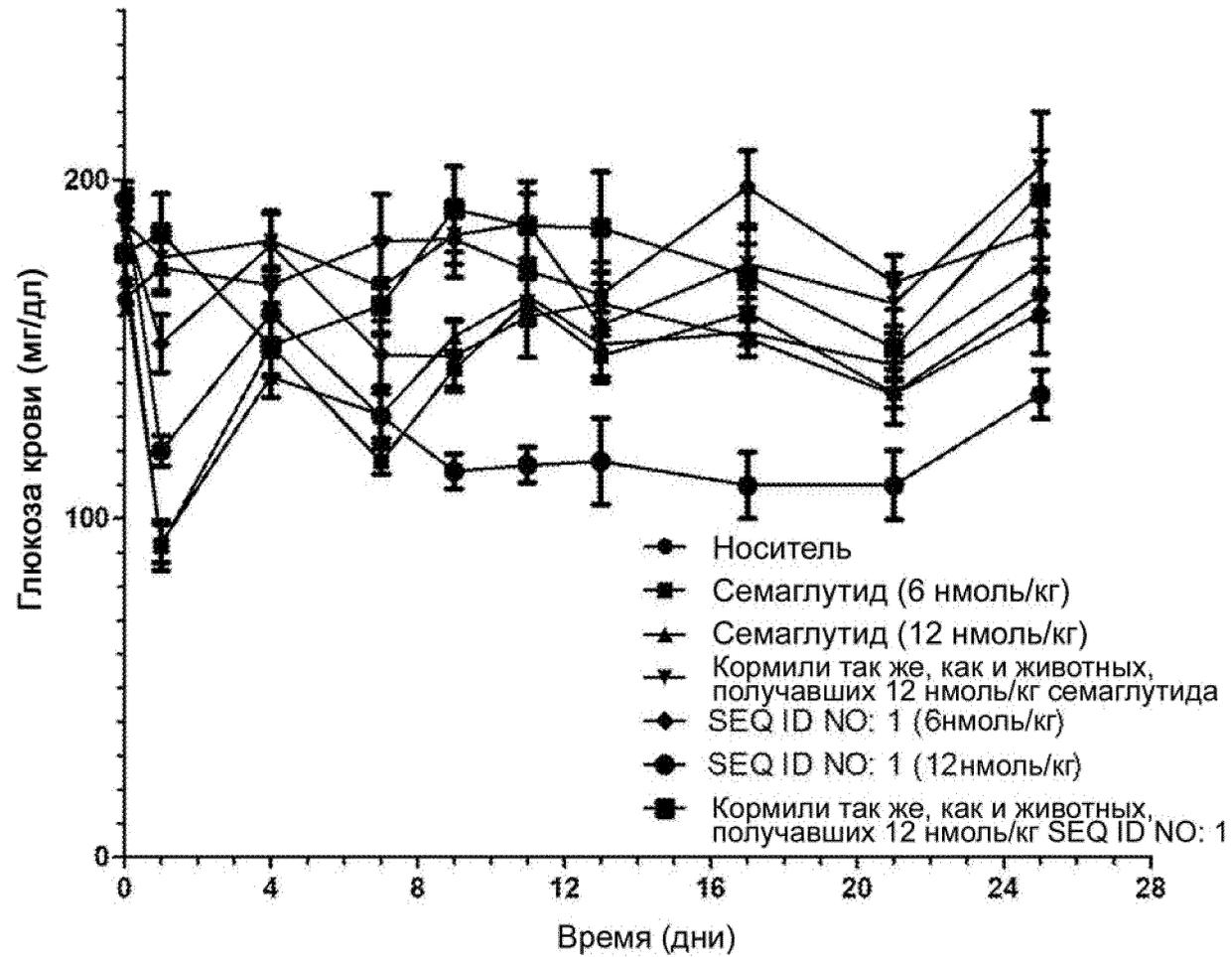
60. Способ по любому из пунктов 58 или 59, отличающийся тем, что фармацевтическую дозу вводят примерно раз в неделю в течение от около 2 недель до около 8 недель или дольше.

Ответ глюкозы крови на п/к инъекцию семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши db/db)



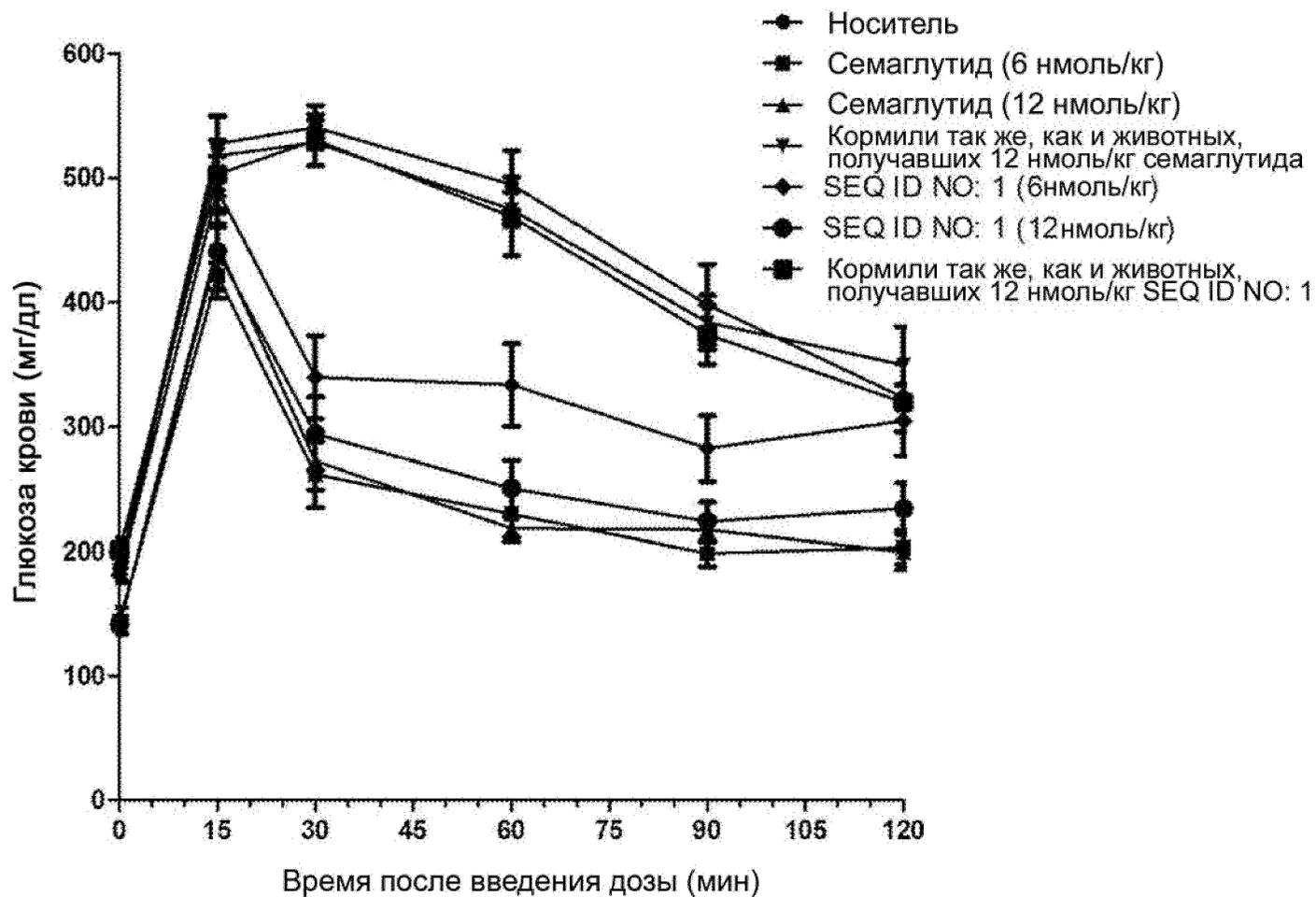
Фиг. 1

Ответ глюкозы в крови на семаглутид или SEQ ID NO: 1 (мыши с ОВД)



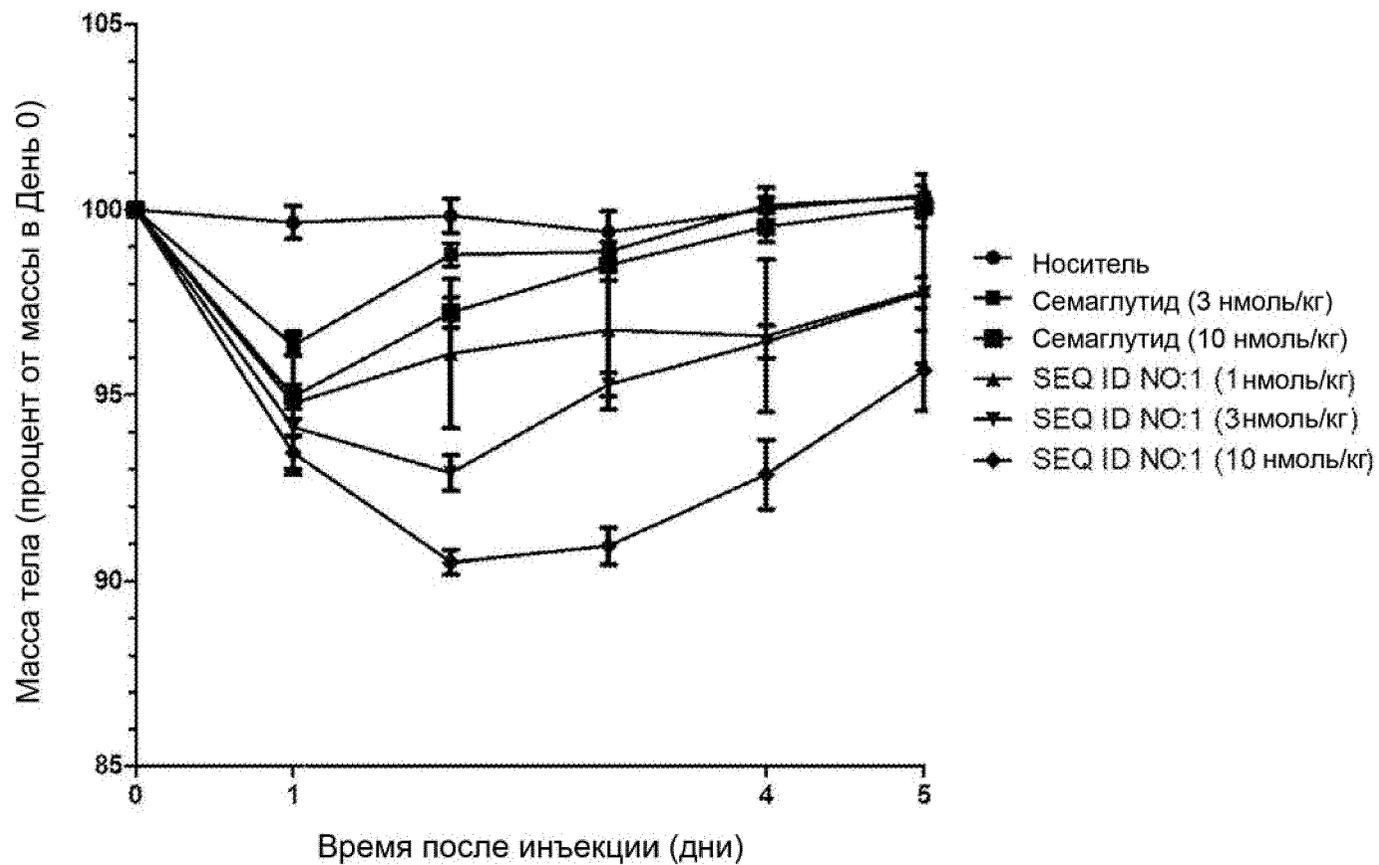
Фиг. 2

Ответ глюкозы в ИПГТТ на семаглутид или SEQ ID NO: 1 (мыши с ОВД)



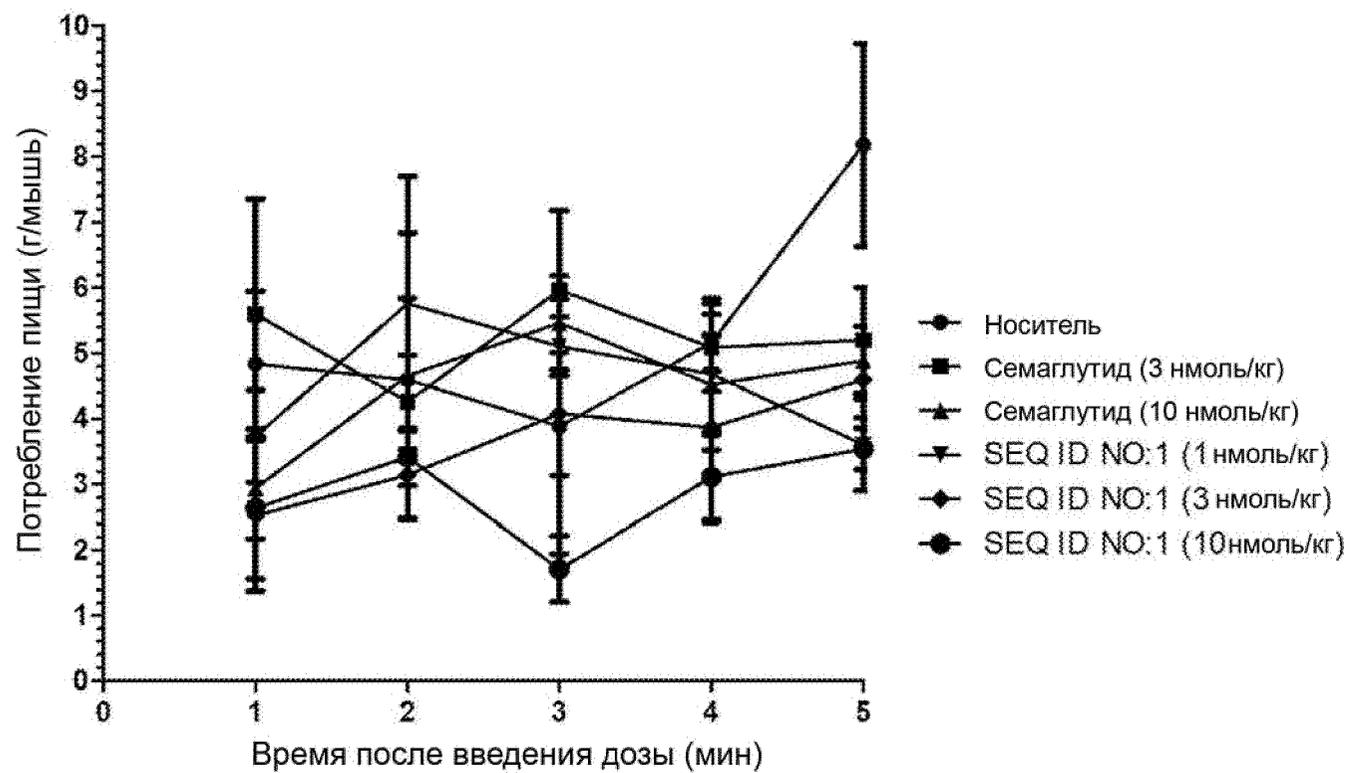
Фиг. 3

Ответ массы тела (% от Дня 0). П/к инъекция семаглутида или SEQ ID NO: 1
(мыши db/db)



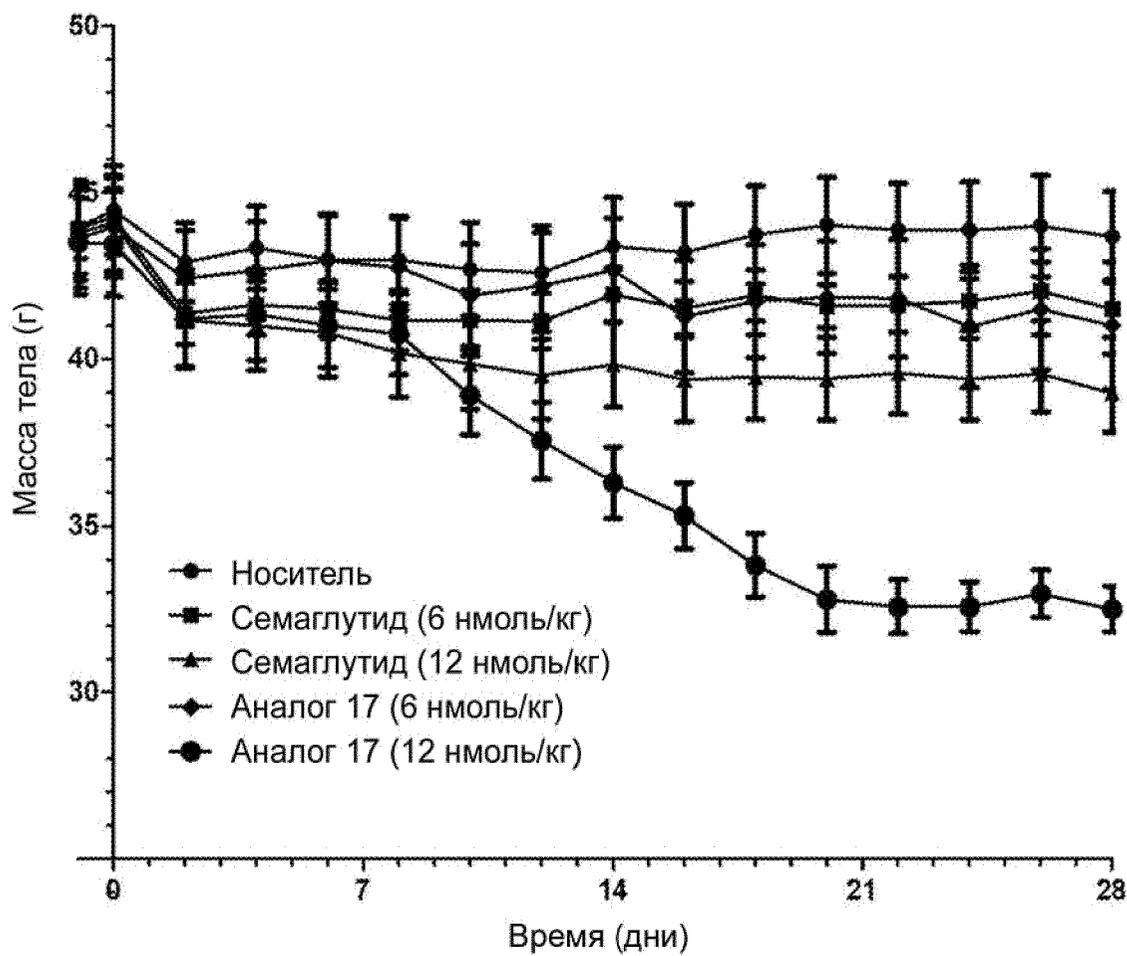
Фиг. 4

Влияние на потребление корма п/к инъекции семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши db/db)



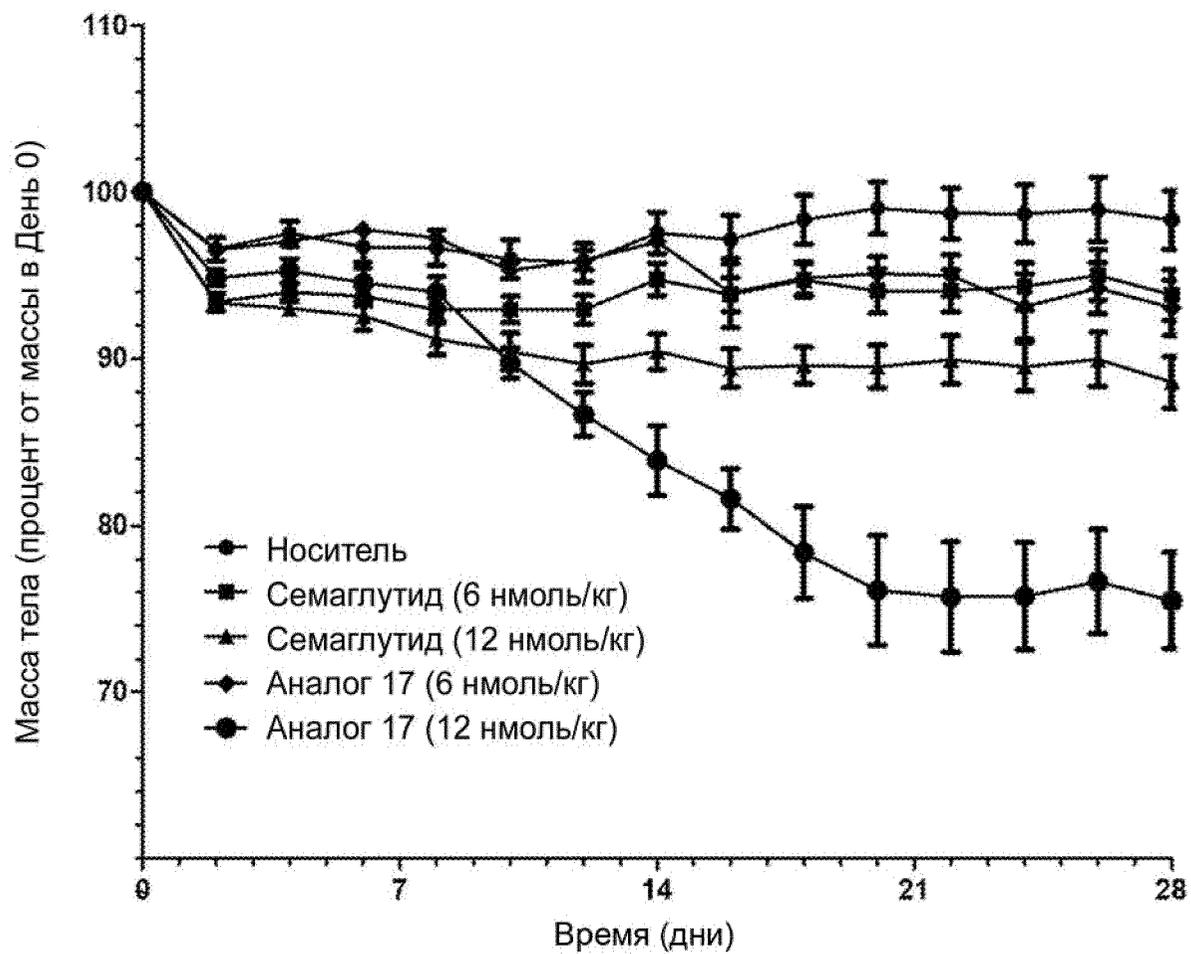
Фиг. 5

Ответ массы тела (г). П/к инъекция семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши с ОВД)



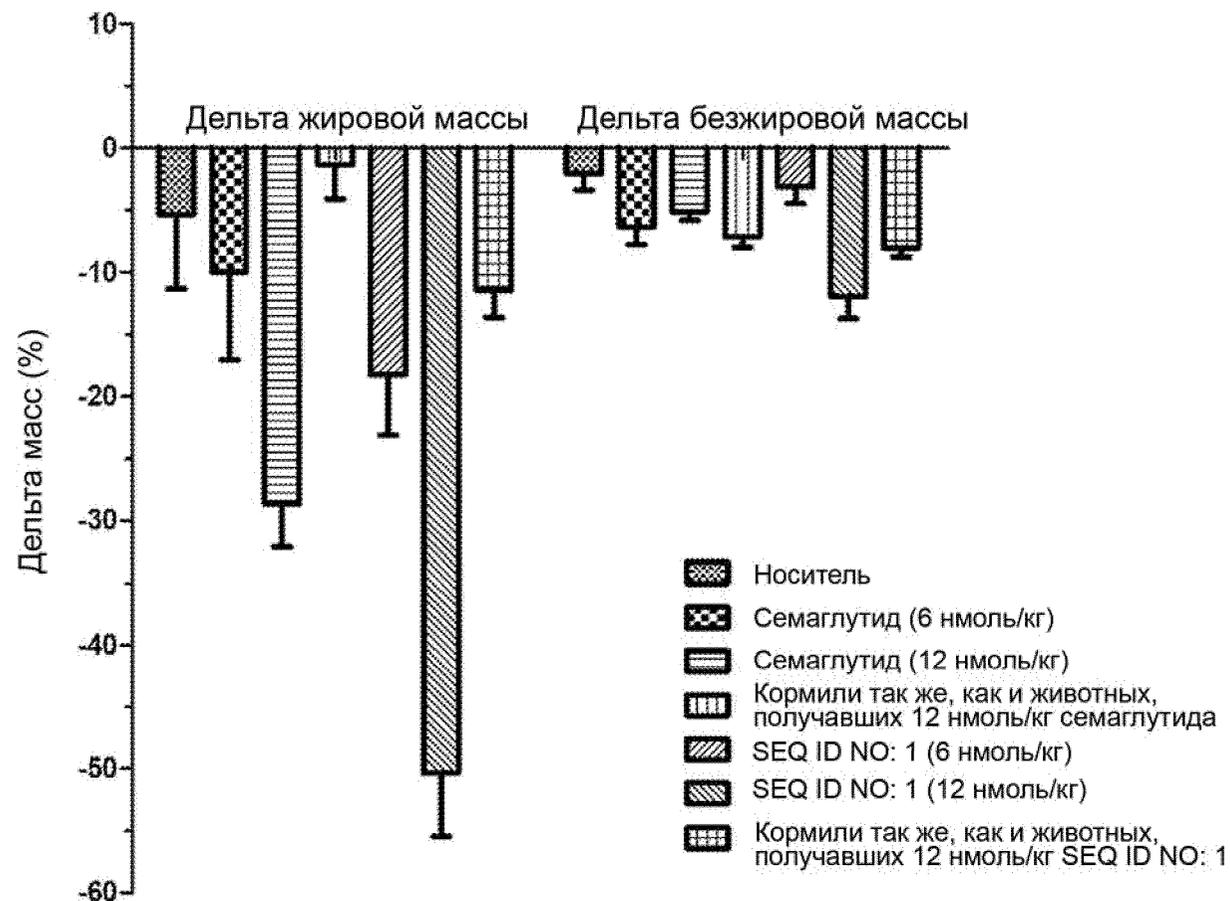
Фиг. 6А

Ответ массы тела (% от Дня 0). П/к инъекция семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши с ОВД).



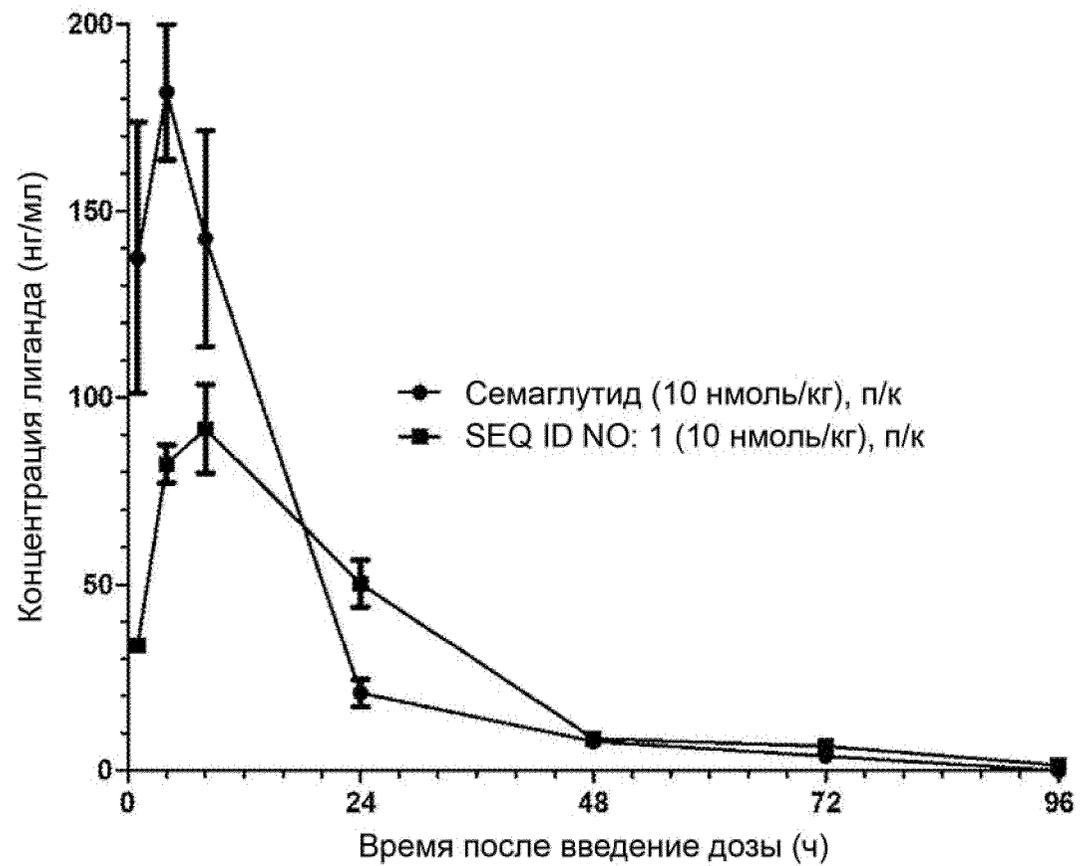
Фиг. 6В

Композиция тела (% изменения в детектируемой массе относительно Дня 0). П/к инъекция семаглутида или SEQ ID NO: 1 (мыши JAX с ОВД).



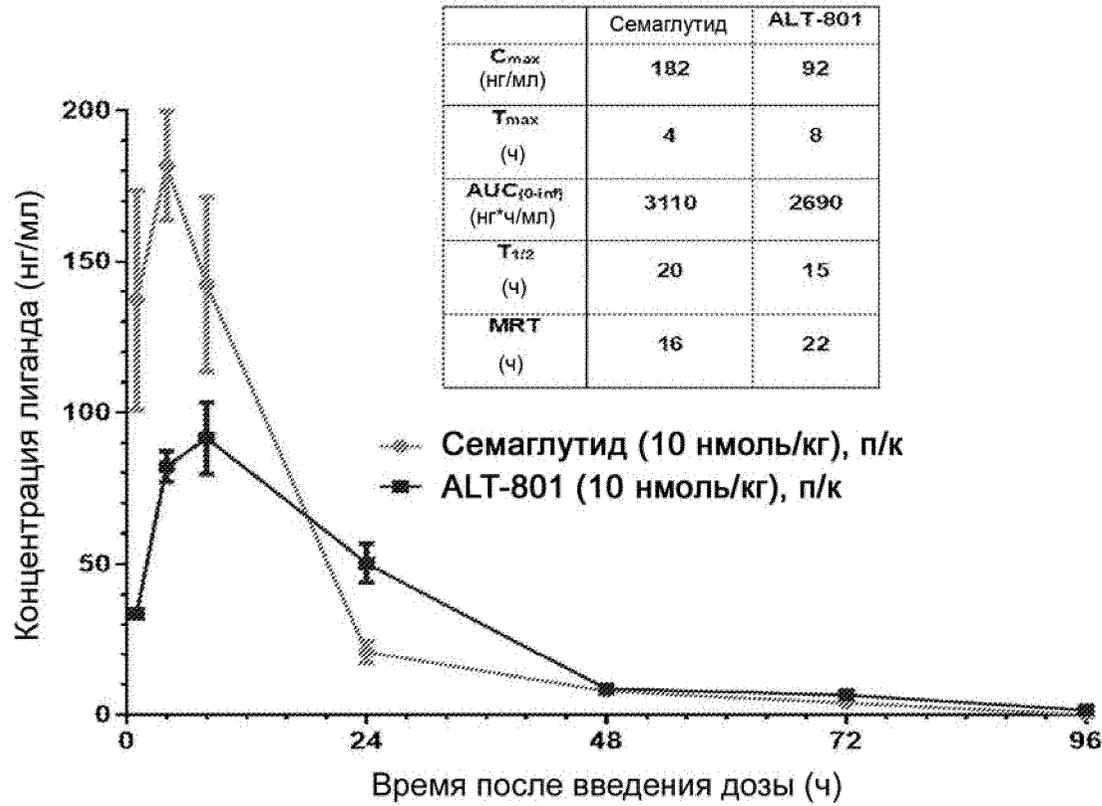
Фиг. 7

Концентрации лиганда, одиночная доза, мыши C57BL/6J



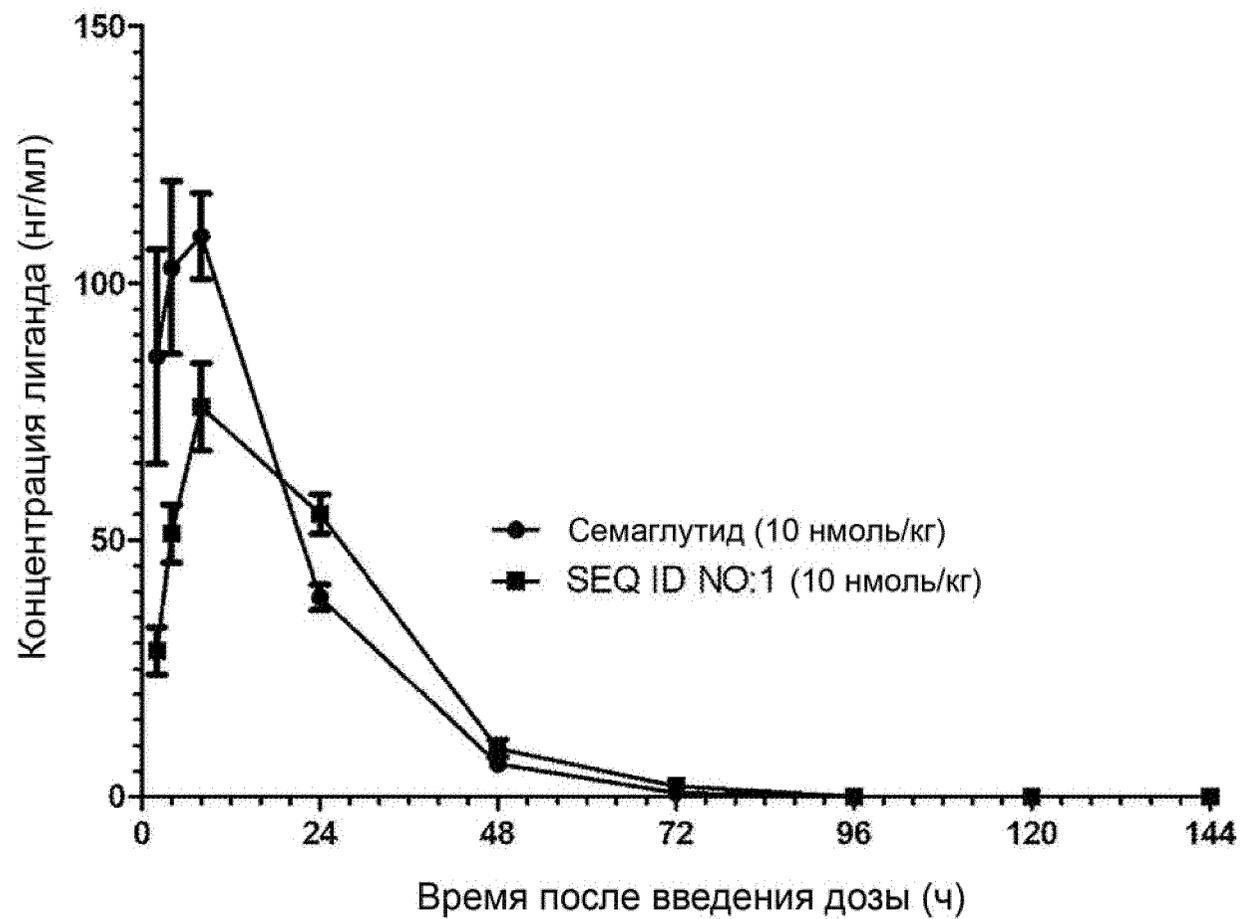
Фиг. 8

Концентрации лиганда, одиночная доза, мыши C57BL/6J



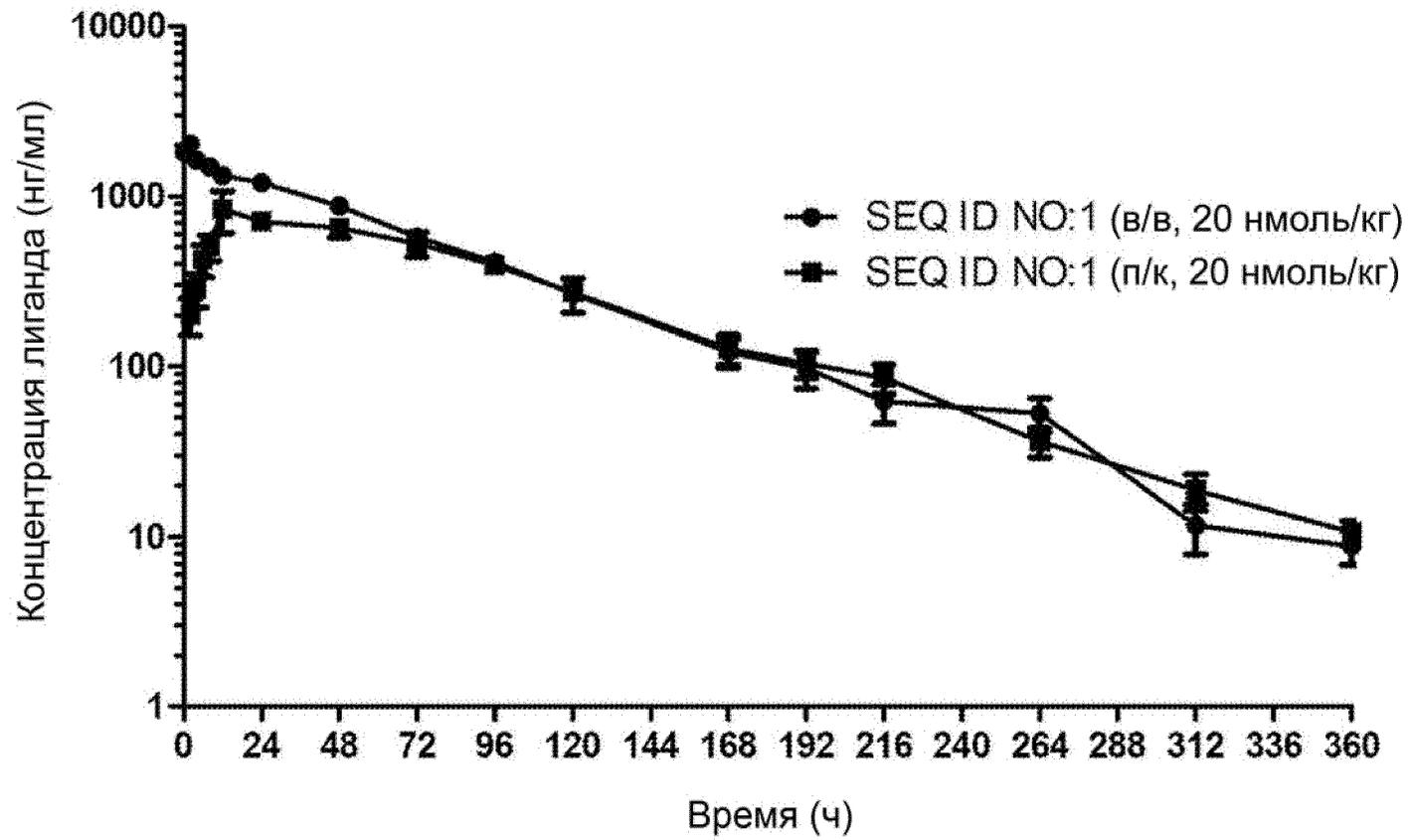
Фиг. 9

Концентрации лиганда, одиночная доза, крысы SD



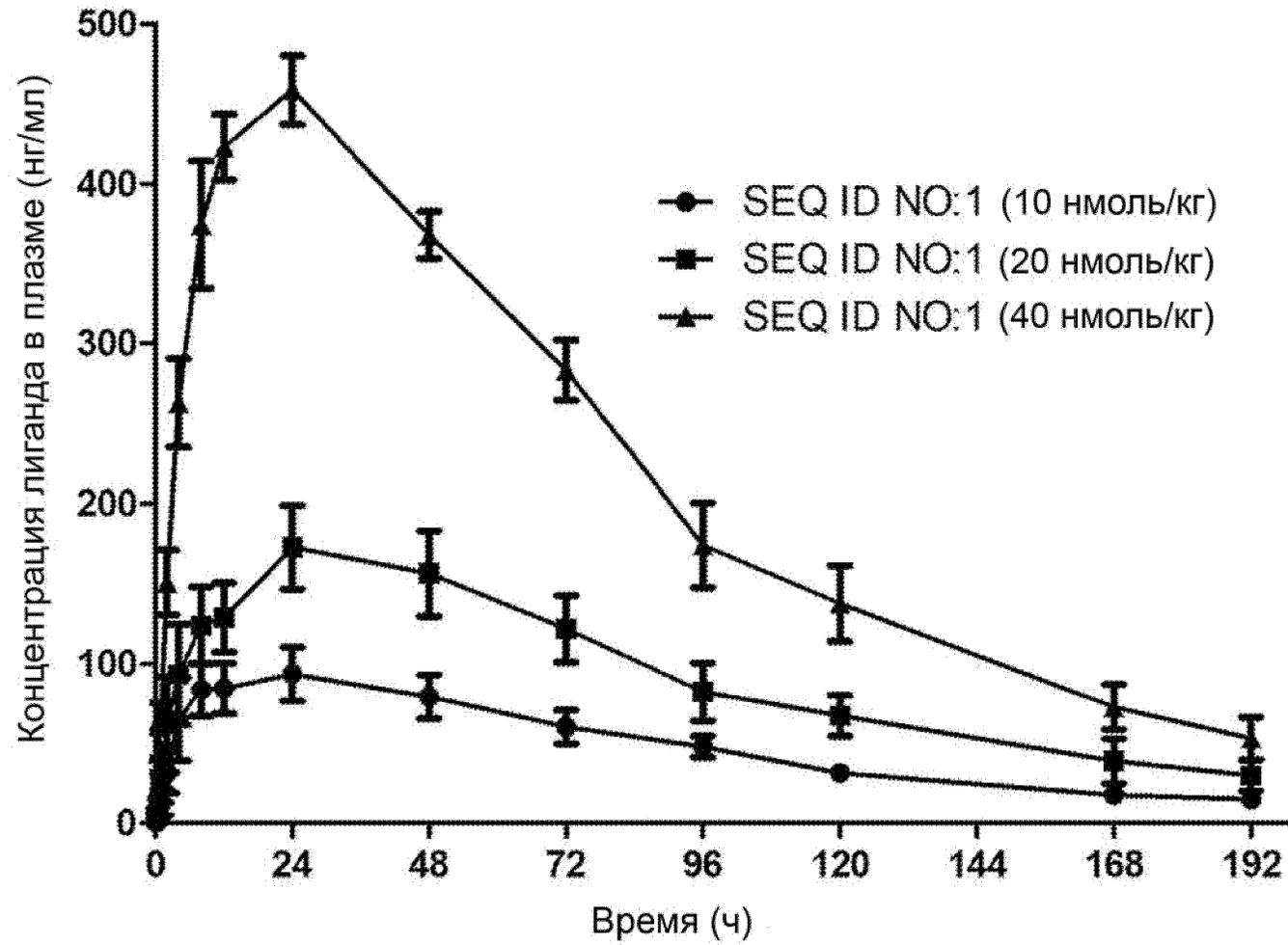
Фиг. 10

Фармакокинетика, юкатанские миниатюрные свиньи



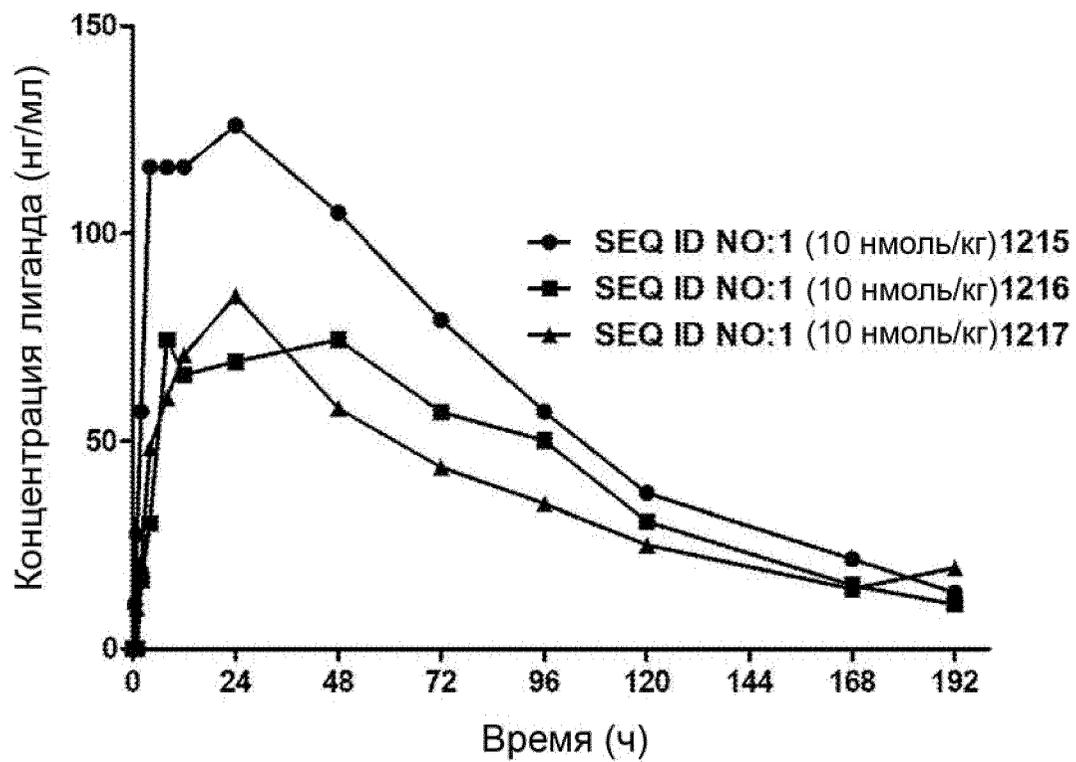
Фиг. 11

Фармакокинетика, яванские макаки



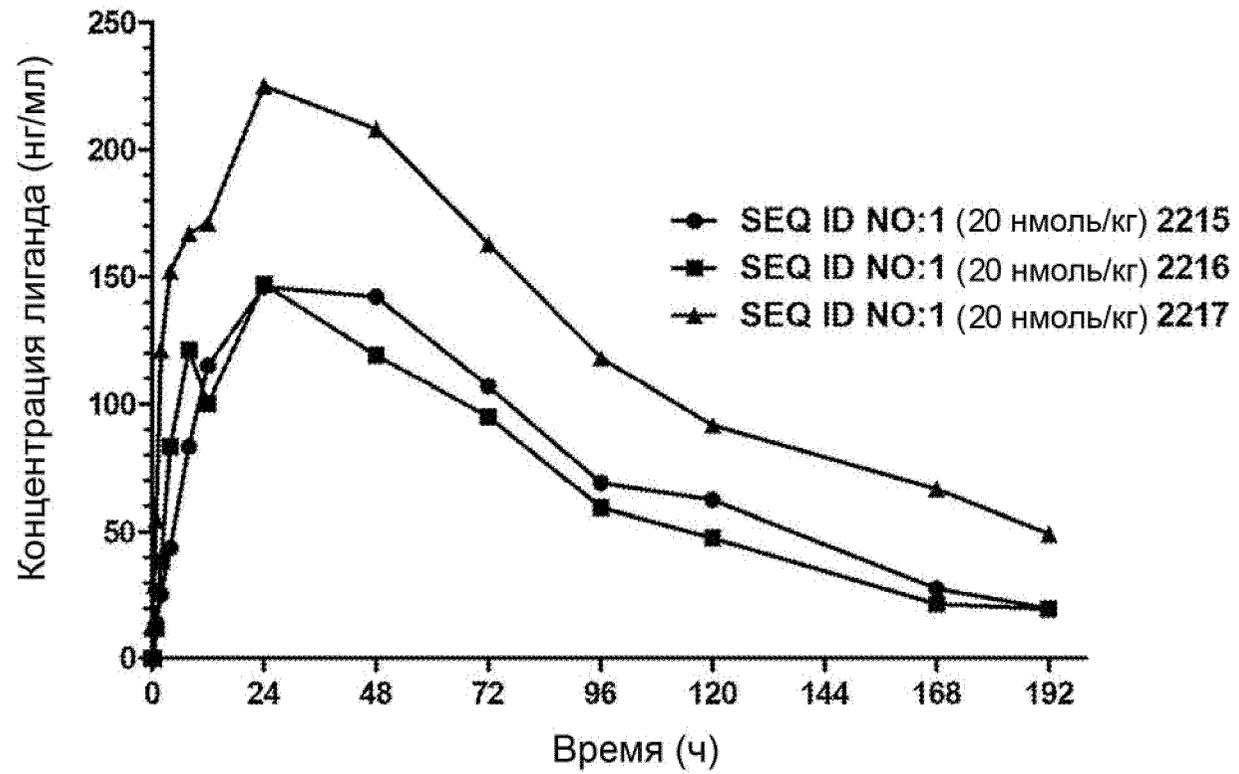
Фиг. 12А

Фармакокинетика, яванские макаки



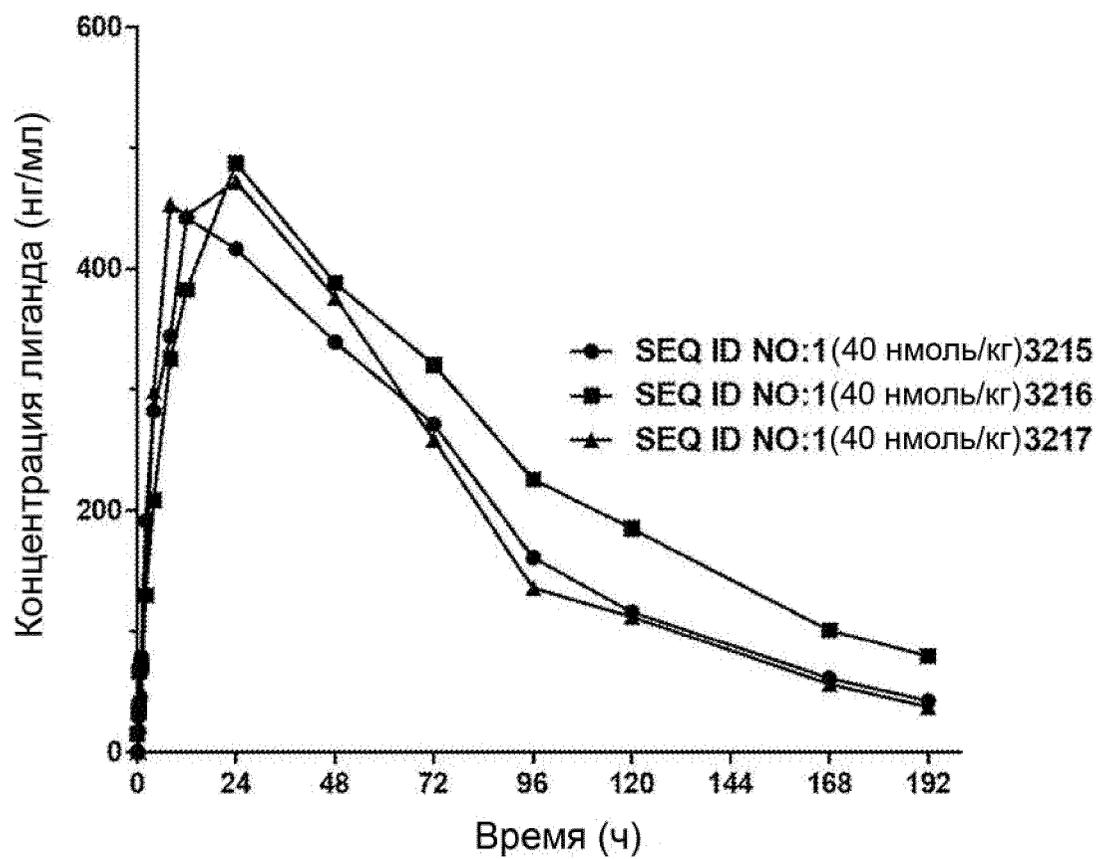
Фиг. 12В

Фармакокинетика, яванские макаки



Фиг. 12С

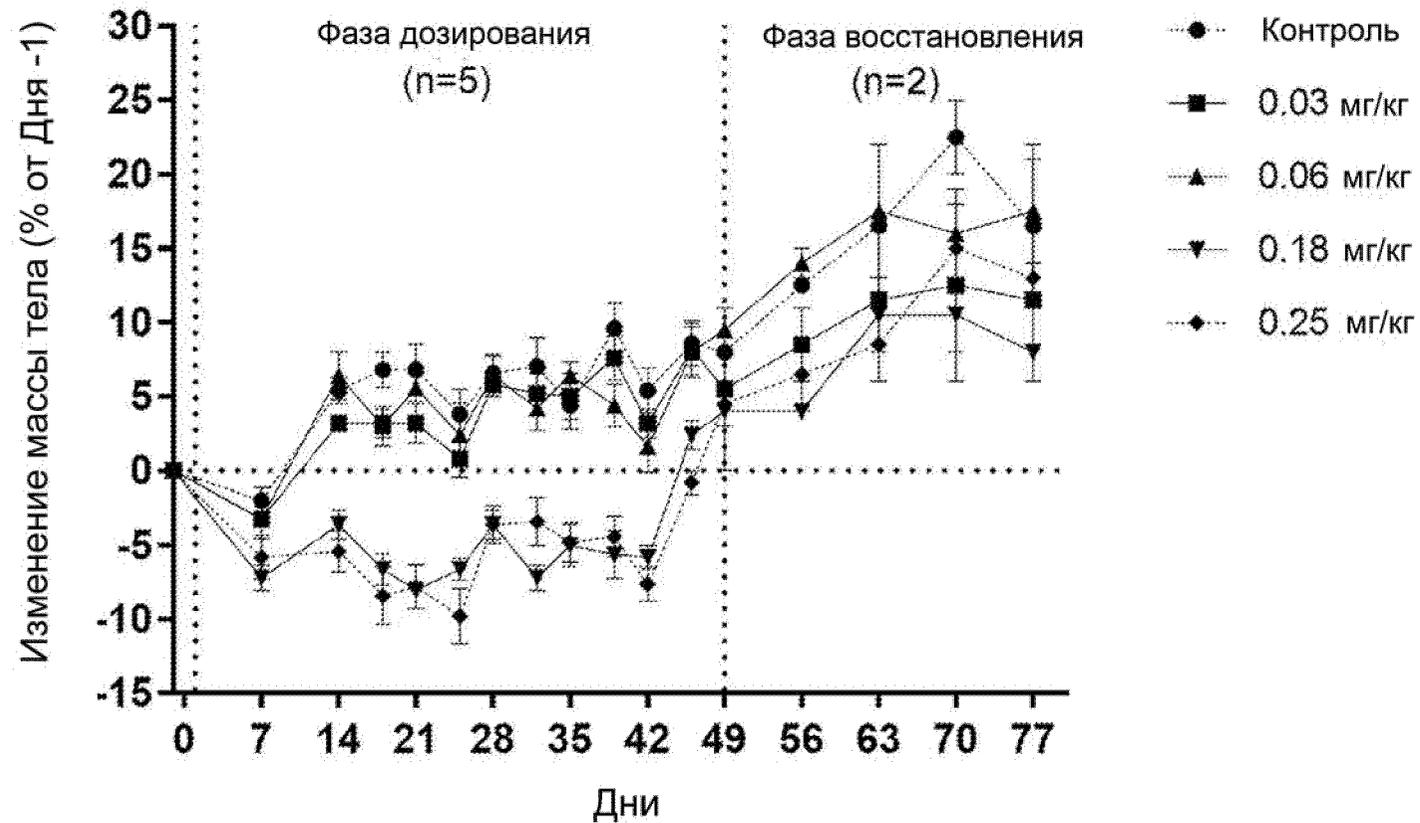
Фармакокинетика, яванские макаки



Фиг. 12D

Изменение массы тела у самцов яванского макака

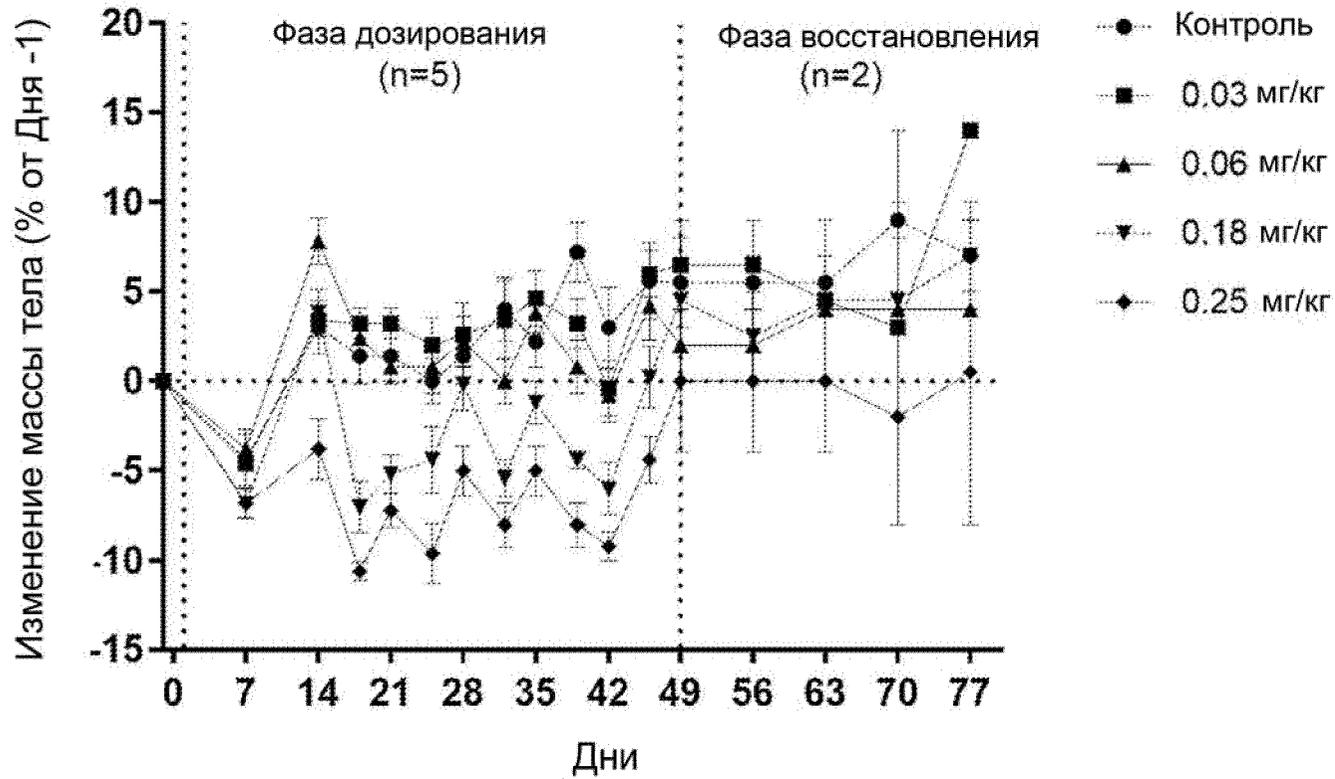
Самец яванского макака



Фиг. 13

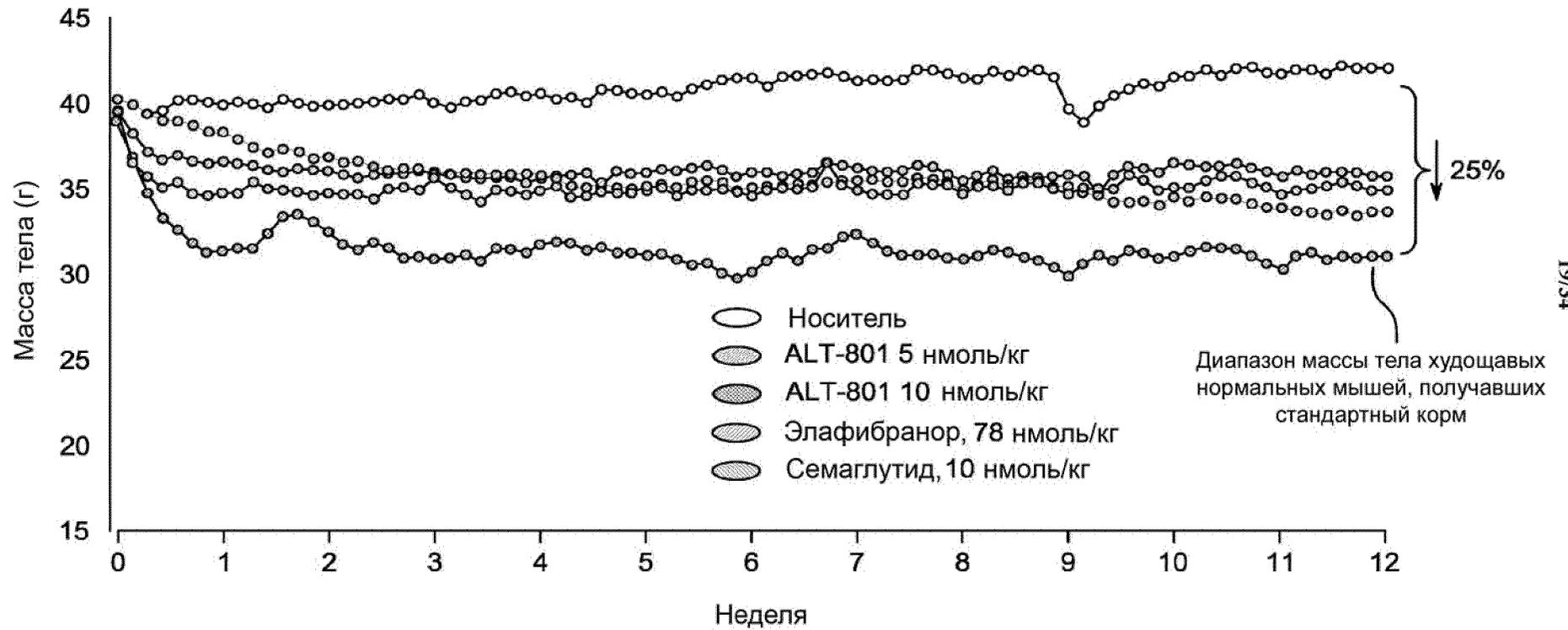
Изменение массы тела у самок яванского макака

Самка яванского макака



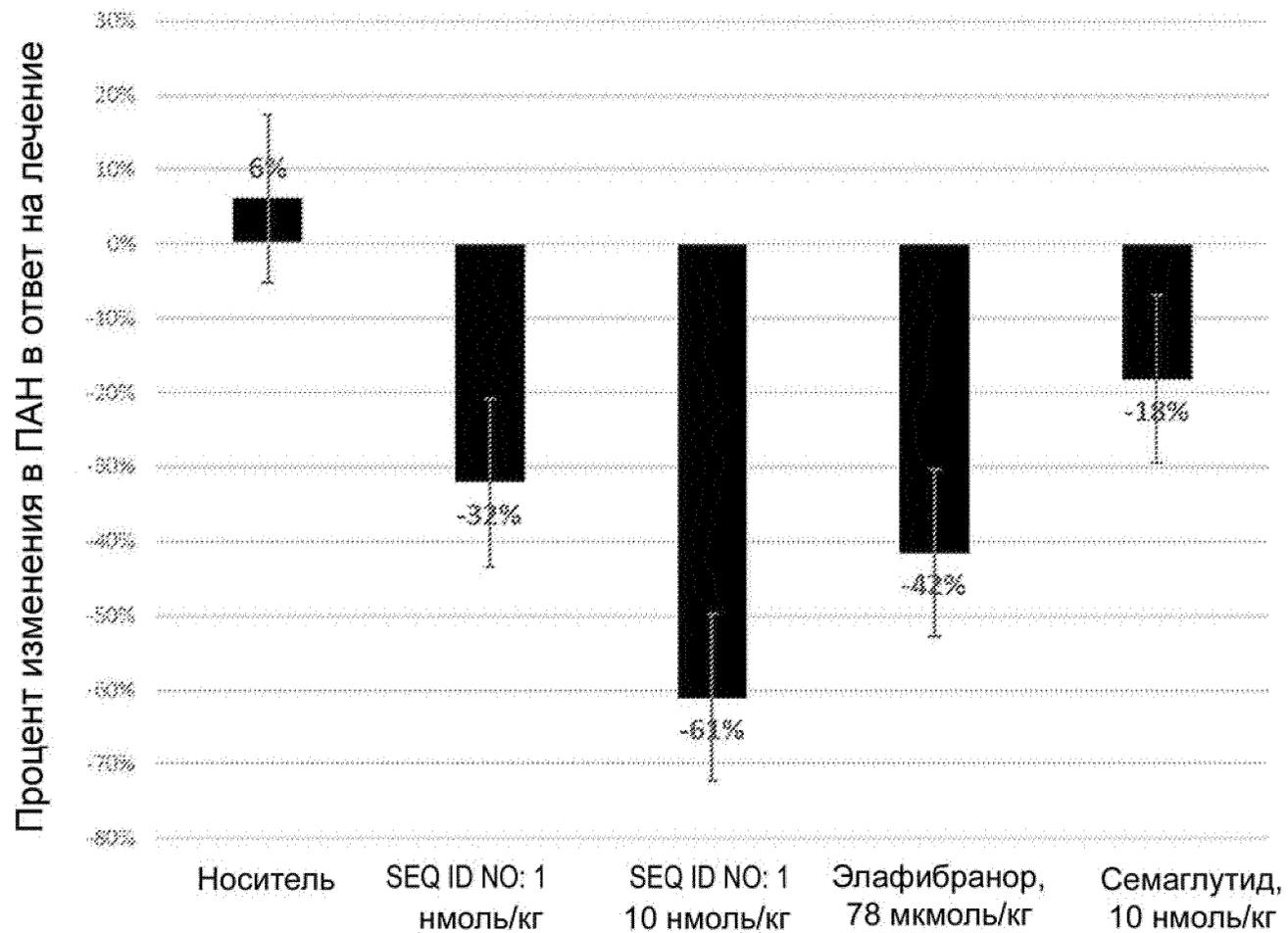
Фиг. 14

Масса тела в группах лечения (мыши с НАСГ)



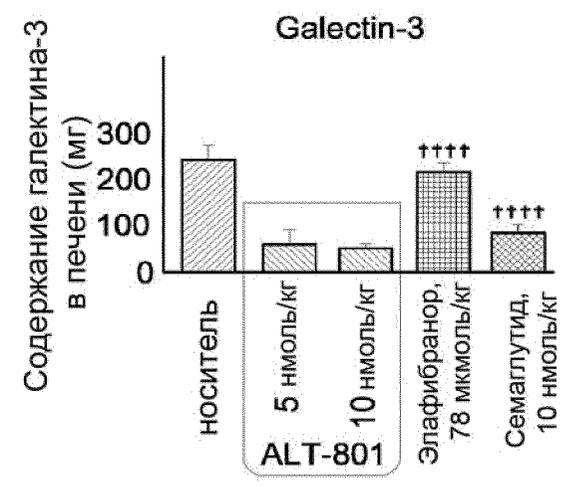
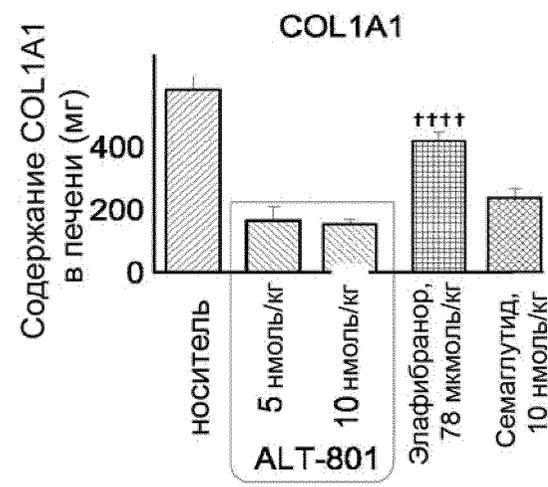
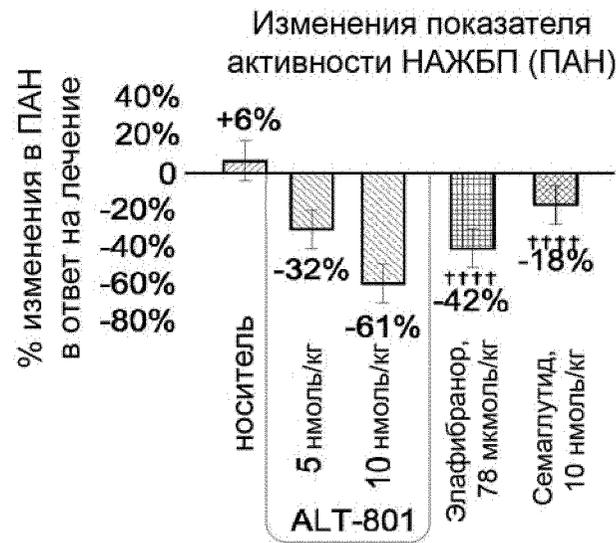
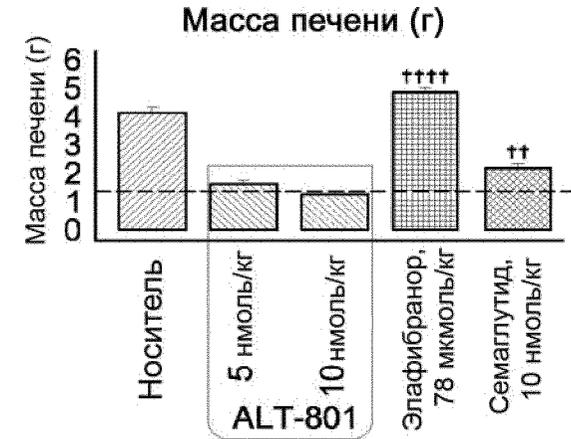
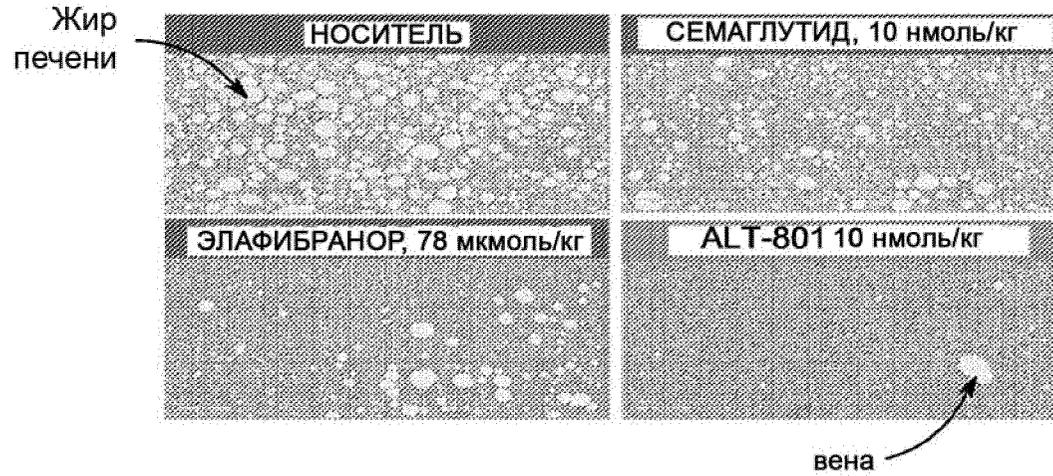
Фиг. 15

Изменение показателя активности НАЖБП (ПАН) при лечении



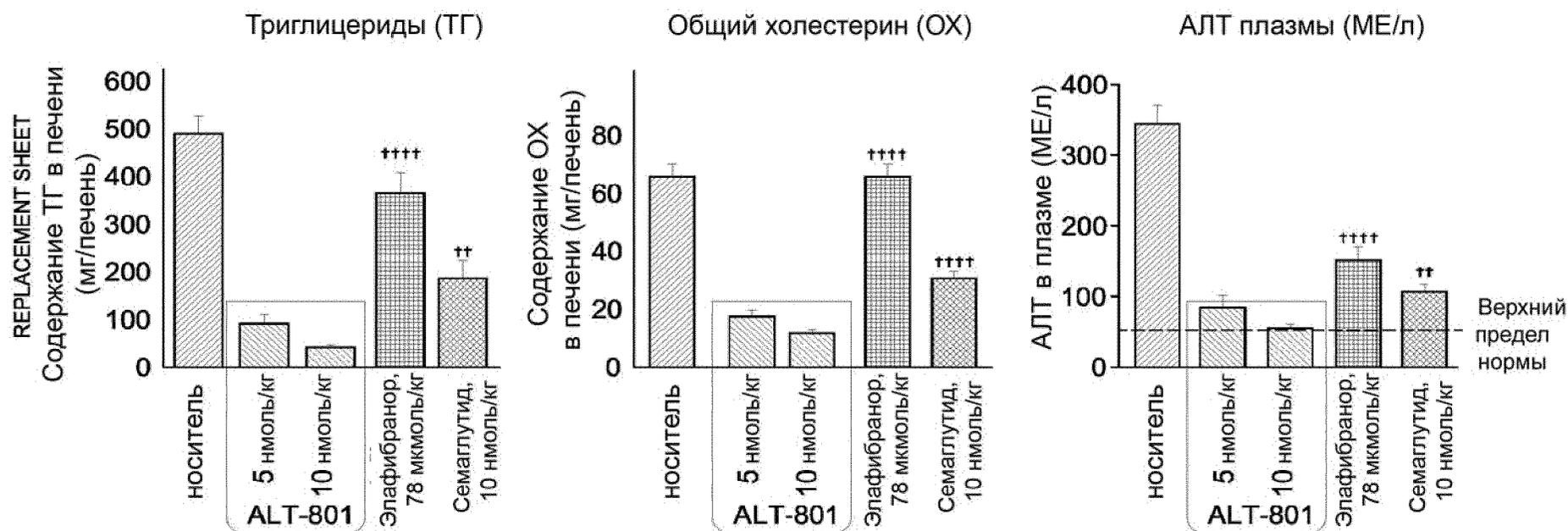
Фиг. 16

Лечение улучшило морфологию печени, массу печени, ПАН и фиброз



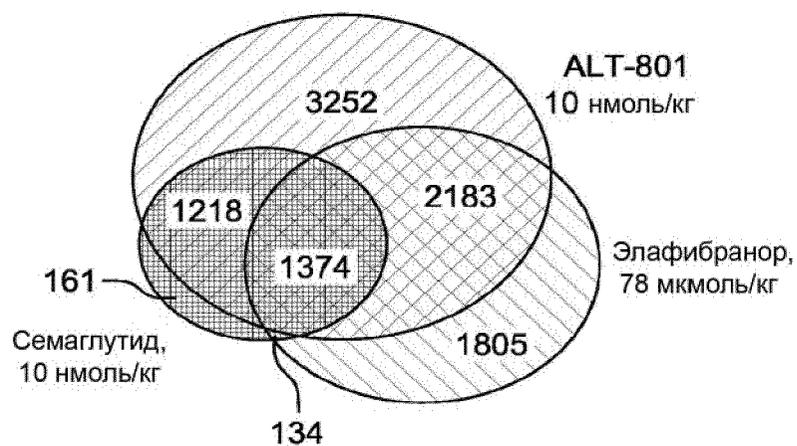
Фиг. 17

Средние терминальные значения ТГ печени, ОХ печени и АЛТ в плазме

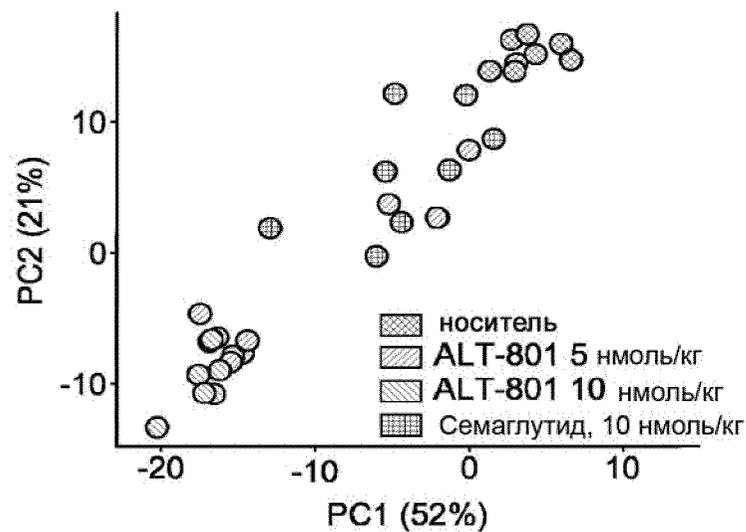


Фиг. 18

Модуляция экспрессии генов с помощью ALT-801 (SEQ ID NO: 1)

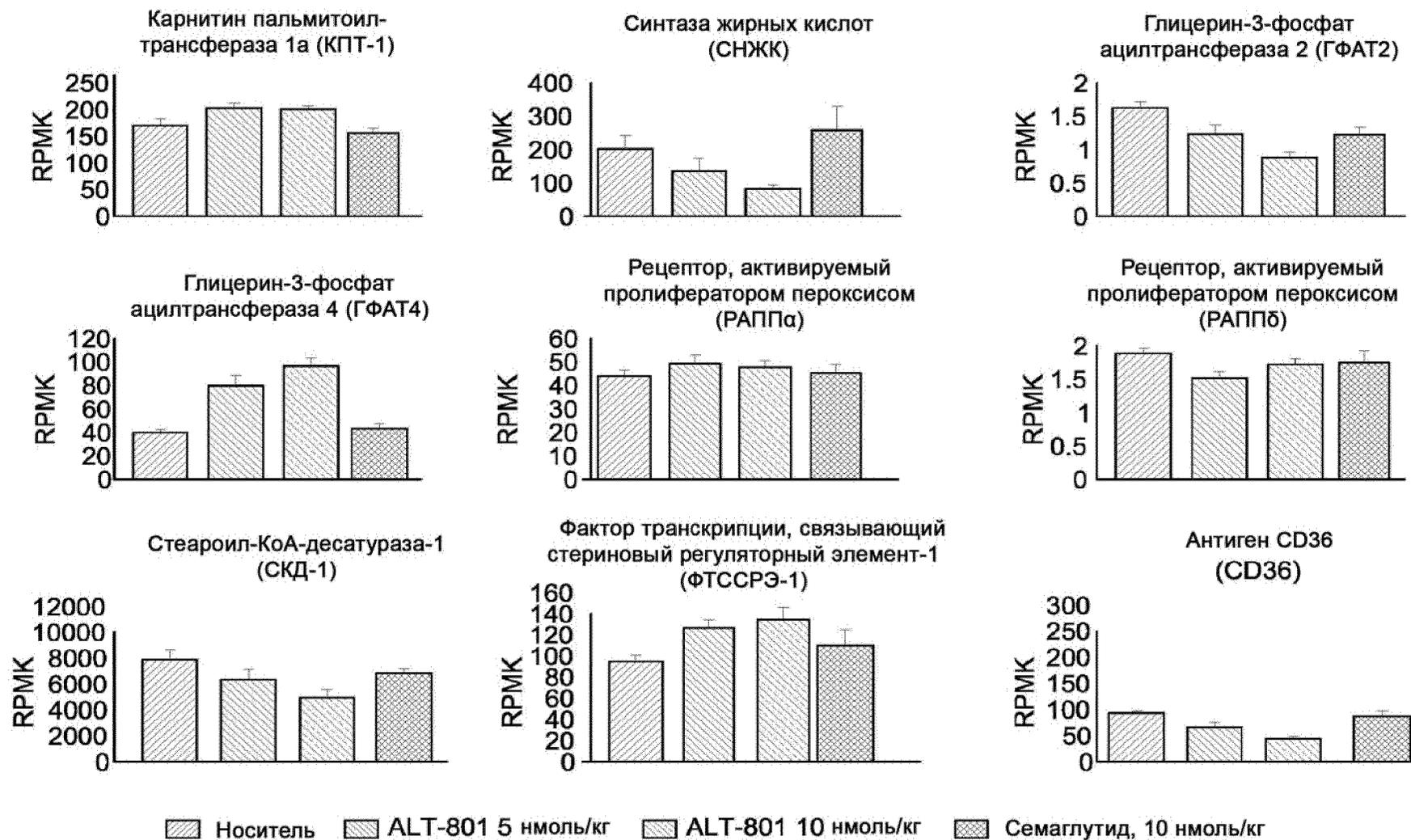


Общее количество регулируемых генов
 ALT-801 10 нмоль/кг ~ 8,000
 Семаглутид, 10 нмоль/кг ~ 2,800
 Элафибранор, 78 мкмоль/кг ~ 5,800



Фиг. 19

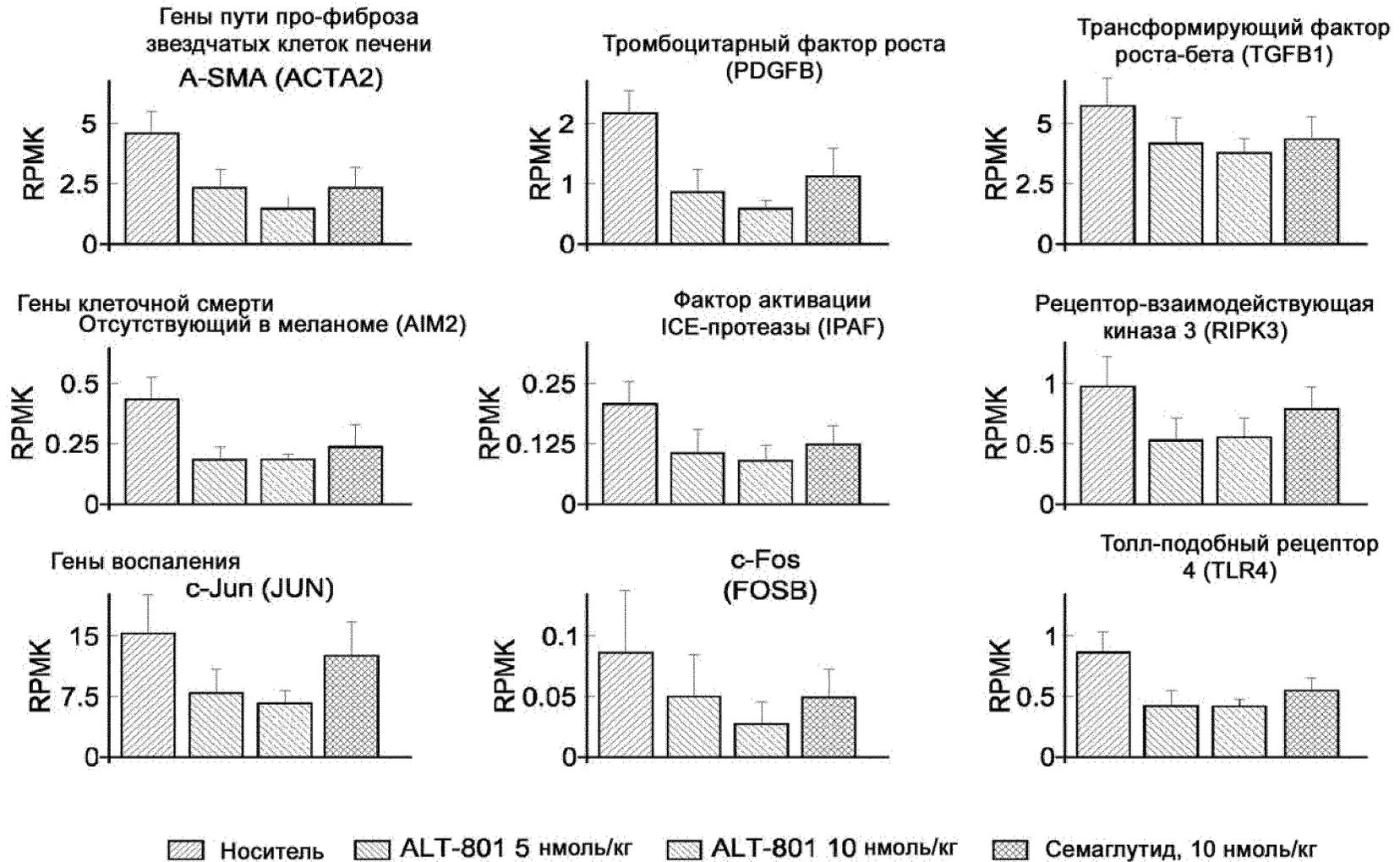
Модуляция генов, вовлеченных в использование и транспорт жира



24/34

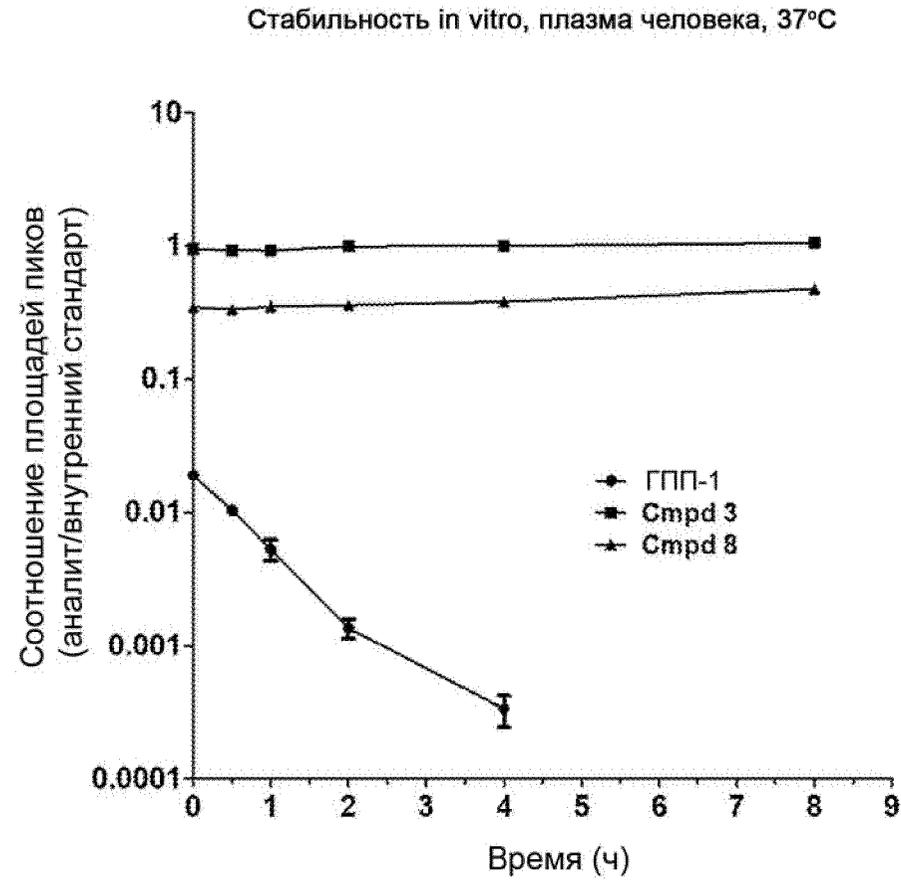
Фиг. 20

Модуляция генов пути про-фиброза звездчатых клеток печени,
клеточной смерти и воспаления

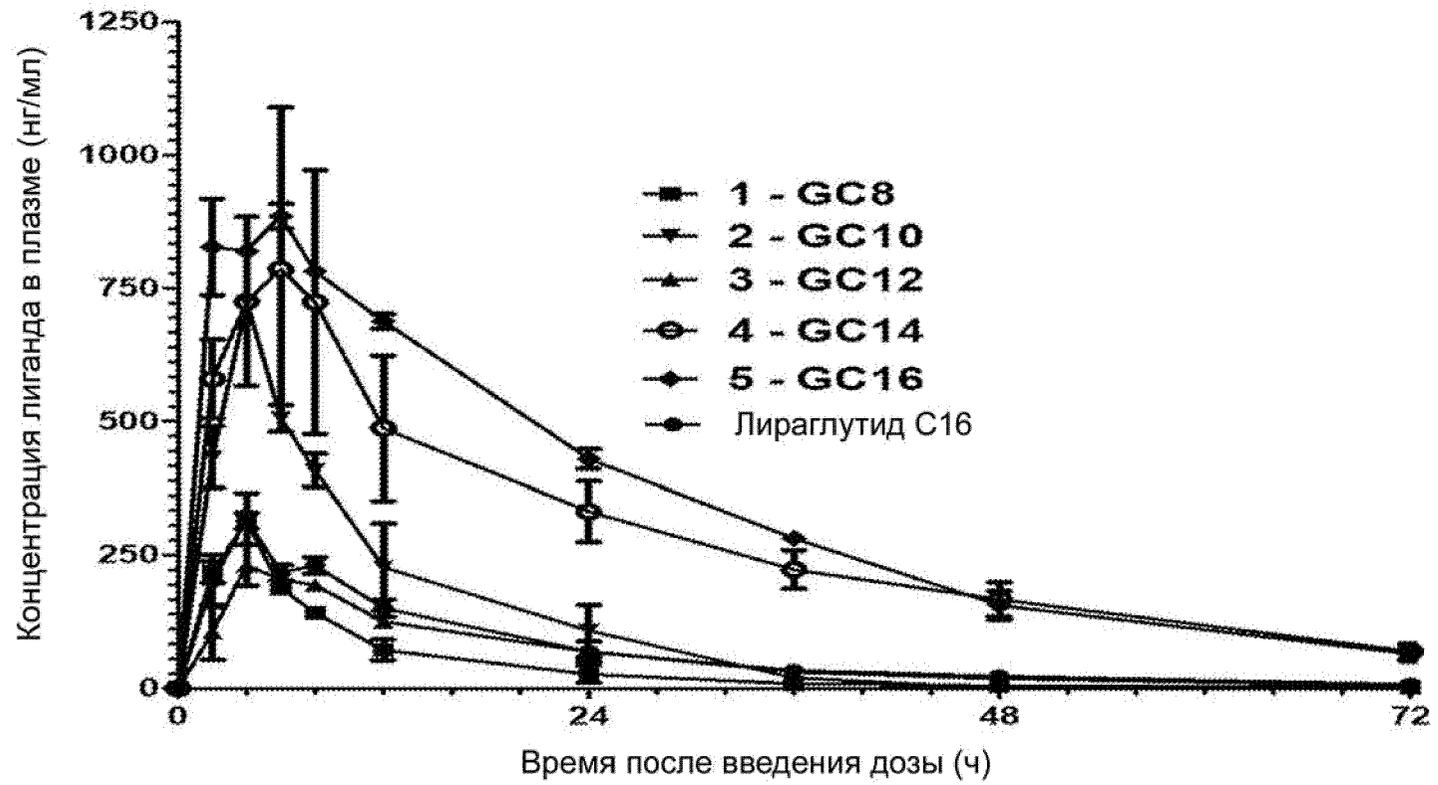


Фиг. 21

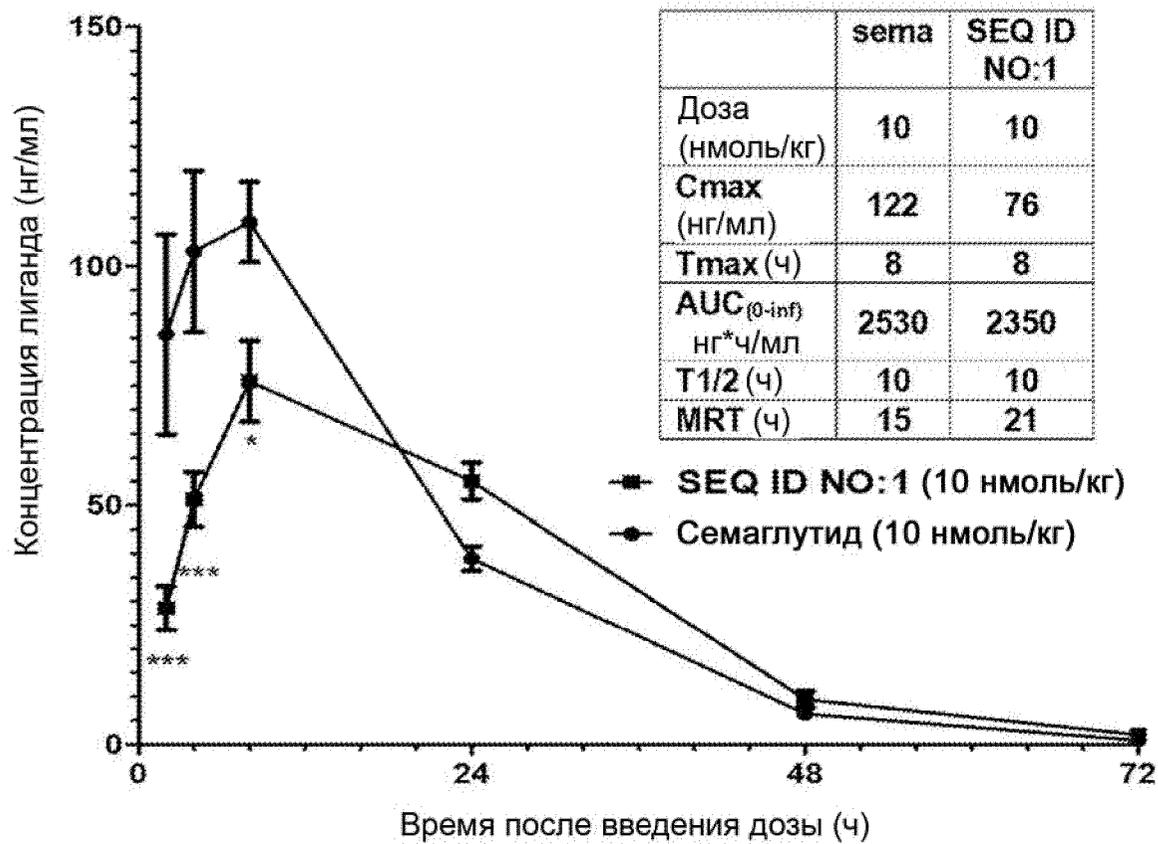
Стабильность *in vitro*, плазма человека, 37°C, ГПП-1



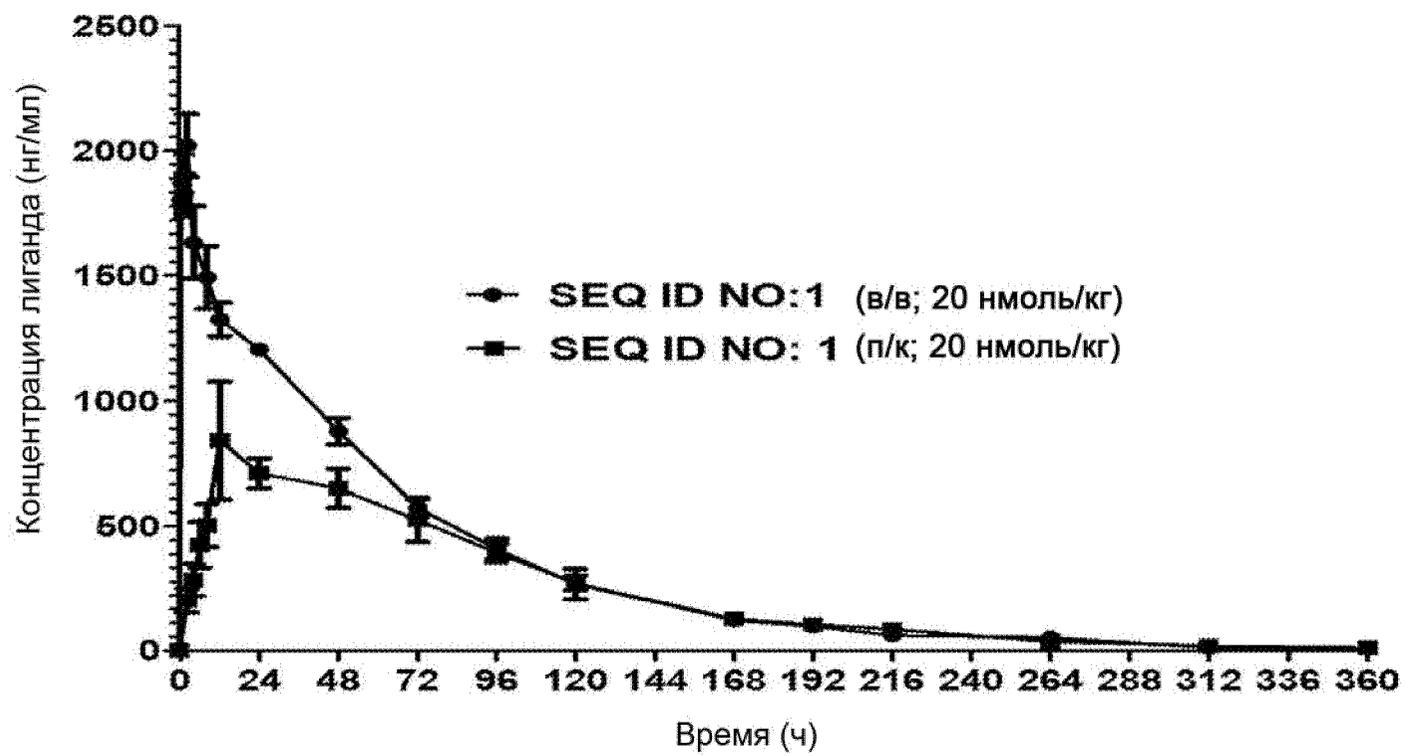
Фиг. 22



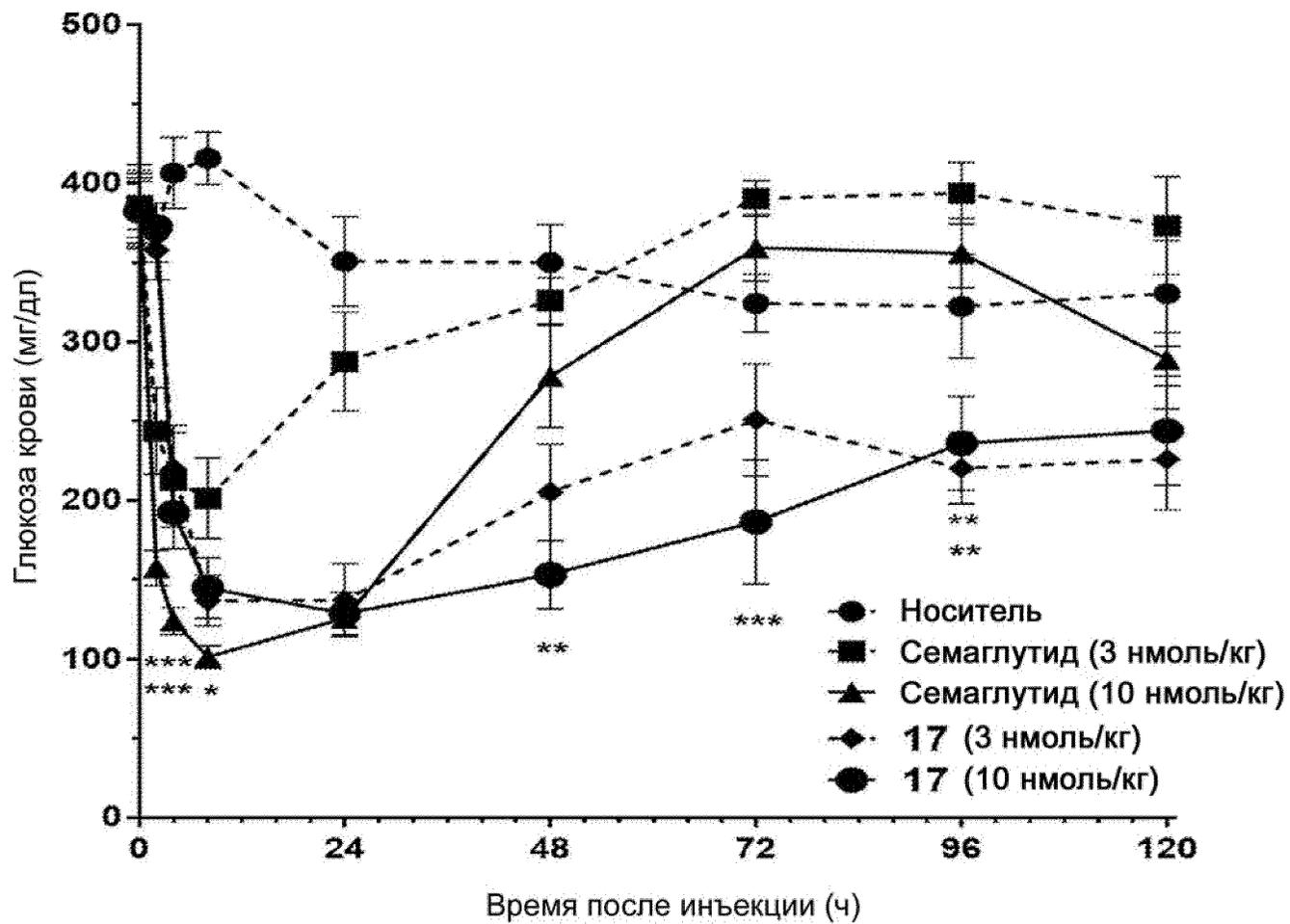
Фиг. 23



Фиг. 24

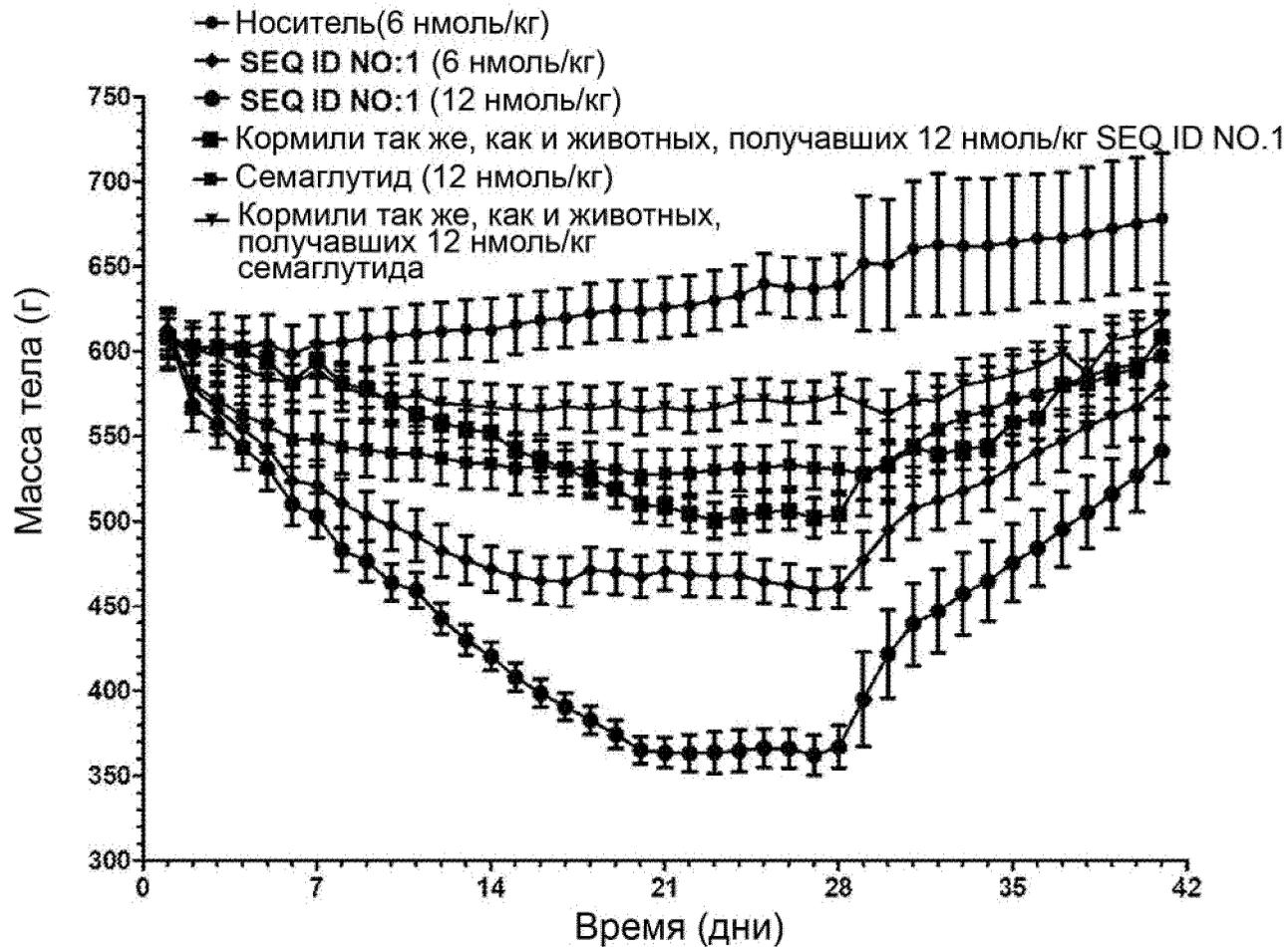


Фиг. 25



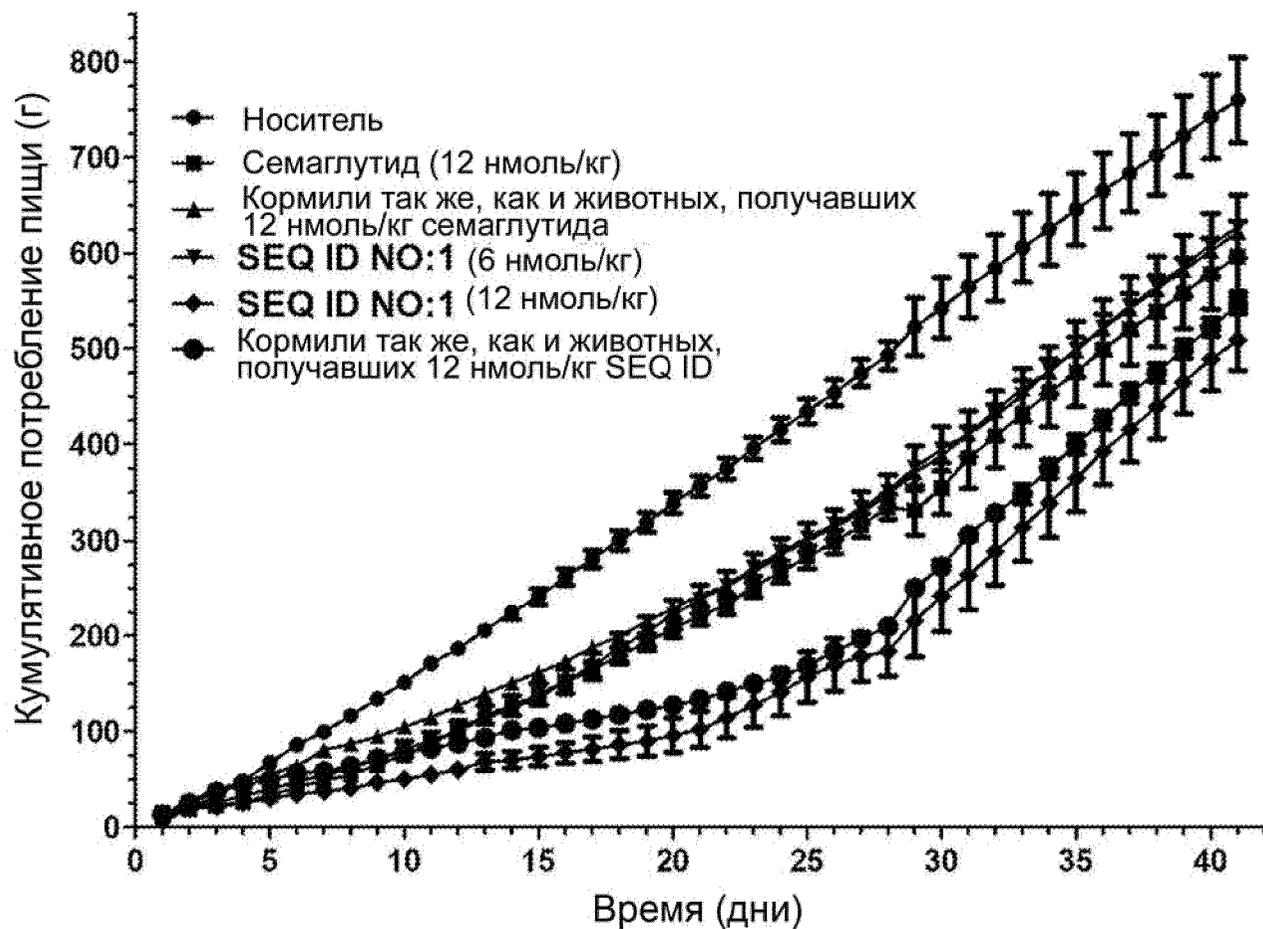
Фиг. 26

Реакция массы тела (г) у крыс с ОВД на ежедневную п/к дозу семаглутида (12 нмоль/кг) или SEQ ID NO.1 (6 или 12 нмоль/кг); или парное кормление в соответствии с количеством корма, потребленным животными, получавшими ежедневную подкожную дозу семаглутида или SEQ ID NO.1, составляющую 12 нмоль/кг. Восстановление начинается на 29 день для выбранных животных



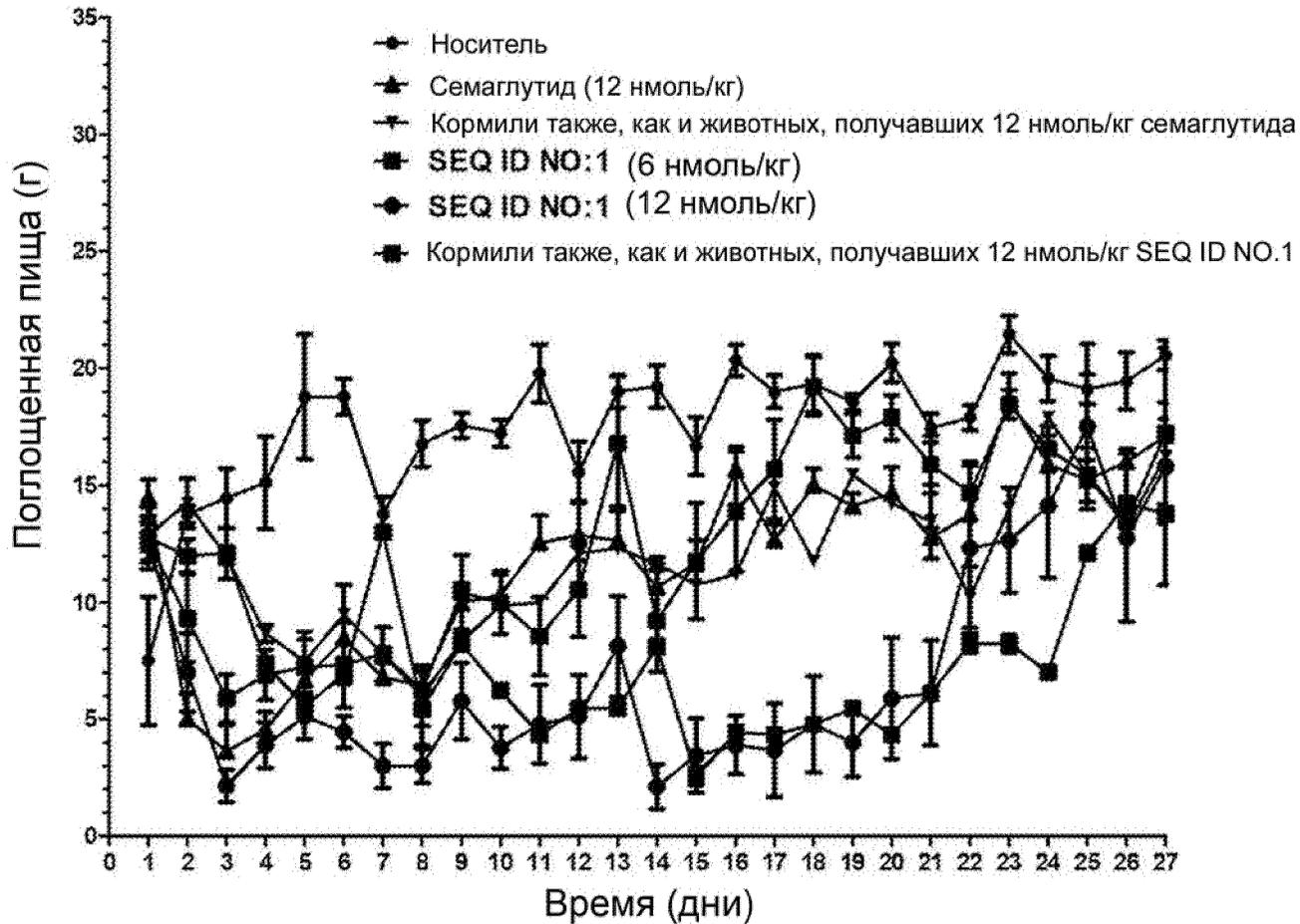
Фиг. 27

Кумулятивное потребление пищи (г) у крыс с ОВД в ответ на ежедневную п/к дозу семаглутида (12 нмоль/кг) или SEQ ID NO.1 (6 или 12 нмоль/кг); или парное кормление в соответствии с количеством корма, потребленным животными, получавшими ежедневную п/к дозу семаглутида или SEQ ID NO.1, составляющую 12 нмоль/кг. Восстановление начинается на 29 день для выбранных животных

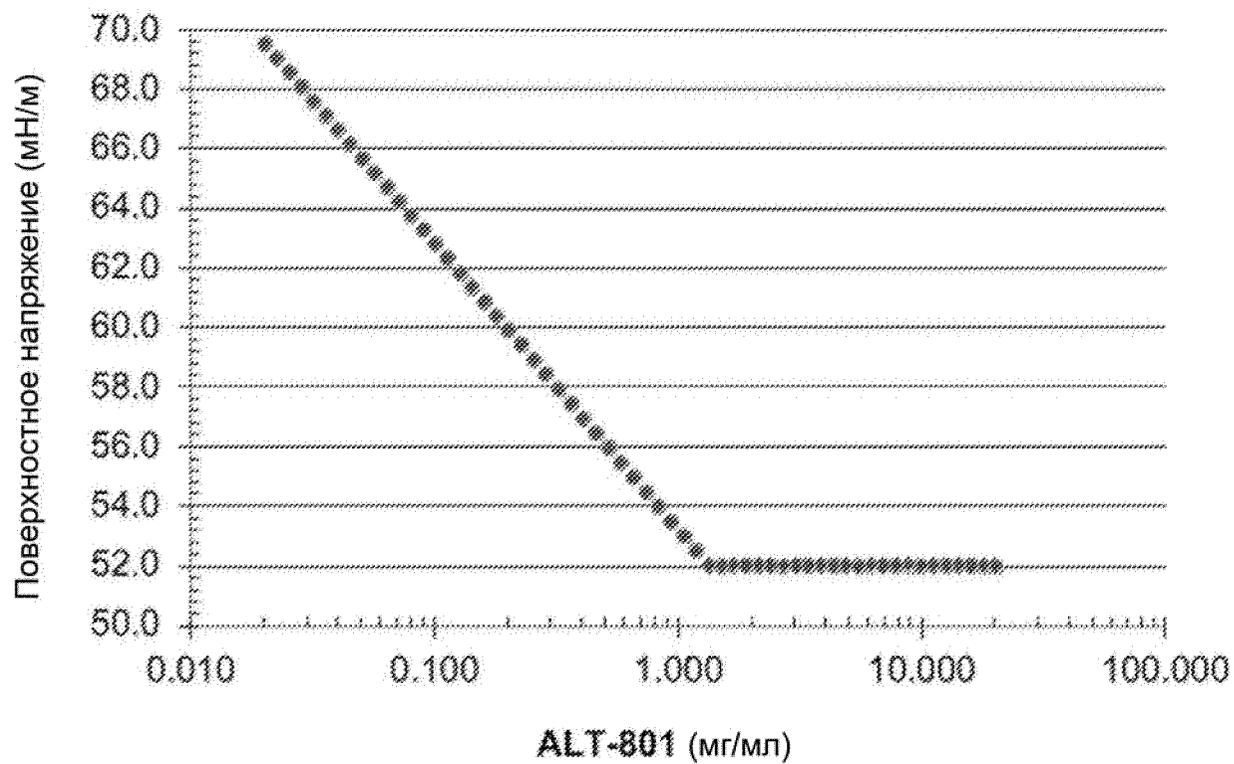


Фиг. 28

Ежедневное потребление пищи (г) у крыс с ОВД в ответ на ежедневную п/к дозу семаглутида (12 нмоль/кг) или SEQ ID NO:1 (6 или 12 нмоль/кг); или парное кормление в соответствии с количеством корма, потребленным животными, получавшими ежедневную п/к дозу семаглутида или SEQ ID NO:1, составляющую 12 нмоль/кг



Фиг. 29



Фиг. 30