

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21)

202293433

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.22

(22) Дата подачи заявки
2021.06.09

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

**(54) ПРОИЗВОДСТВО, ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ И ДОЗИРОВКА
АПРАГЛУТИДА**

(31) 63/036,507; 63/074,119; 63/157,083

(32) 2020.06.09; 2020.09.03; 2021.03.05

(33) US

(86) PCT/US2021/036655

(87) WO 2021/252659 2021.12.16

(71) Заявитель:
ВЕКТИВБИО АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Фелдман Глеб (GB), Болоньяни
Федерико (CH)**

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

(57) Изобретение относится к способам получения, составления лекарственной формы и введения аналогов GLP-2.

Позиция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Нативный GLP-2	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	C	H				
Пептид	H	G	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	C	H				
Пептид	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	C	H				
Апруглид	H	G	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	C	H				

GLP-2 исключает
функциональное
отделение
фрагмента DPP-4

Не содержащий серы № 10
исключает образование
примесей,
которые могут образовываться
при химическом синтезе за
счет окисления и
альтерирования атака серы
металла.

Замена двух аминокислот, Asn11 на D-Phe11 и
Asn15 на Leu 15, позволяет значительно снизить
связывание с белком плазмы и соответствующим
значительно снизить общий когеренс.

Изменение функциональности C-конца с карбоксильной кислотой на
аминогруппу замедляет абсорбцию из места инъекции в кровоток,
увеличивая конечный период полураспада. Считается, что
более низкий заряд из-за амидной группы приводит к более
ограниченной растворимости пептида и образованию
временного "бракета".

202293433

A1

A1

202293433

ПРОИЗВОДСТВО, ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ И ДОЗИРОВКА АПРАГЛУТИДА

СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/036,507, поданной 9 июня 2020 г., предварительной заявке США № 63/074,119, поданной 3 сентября 2020 г., и предварительной заявке США № 63/157,083, поданной 5 марта 2021 г. Содержание каждой из вышеупомянутых заявок на патент полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII посредством EFS-Web и полностью включен в настоящий документ путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 7 июня 2021 г., называется «VECT-002_001WO_SeqList.txt» и имеет размер около 2 КБ.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее описание относится к производству, приготовлению лекарственной формы и дозировке апраглутида.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Глюкагоноподобный пептид 2 (GLP-2) представляет собой пептид из 33 аминокислот, высвобождаемый в результате посттрансляционного процессинга проглюкагона в энтероэндокринных L-клетках кишечника.

[0005] Рассматривается возможность применения апраглутида для лечения кишечных заболеваний или дисфункции. В одном варианте осуществления рассматривается лечение синдрома короткой кишки. Синдром короткой кишки представляет собой мальабсорбционное состояние, характеризующееся экстремальным сокращением функциональной длины кишечника, чаще всего в результате хирургической резекции из-за мезентериальной ишемии или воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), хотя также присутствуют и другие этиологии. Синдром короткой кишки с кишечной недостаточностью (SBS-IF) определяется как снижение функции кишечника ниже минимума, необходимого для абсорбции макроэлементов и/или жидкостей и электролитов таким образом, что для поддержания здоровья и/или роста требуется внутривенное введение добавок. У пациентов с SBS-IF парентеральная поддержка (PS), выполняемая через центральный венозный катетер, необходима для поддержания адекватного баланса жидкости, энергии, электролитов, микроэлементов, витаминов и питательных веществ. Существует спектр пациентов с SBS-IF: от пациентов со стомой и нарушением

целостности толстой кишки (CIC), требующих больших объемов PS, до пациентов с CIC, которым требуются меньшие объемы PS. В результате этого спектра снижение зависимости от PS может быть продемонстрировано различными результатами в зависимости от анатомии, включая уменьшение объема PS, дни без получения PS или достижение энтеральной автономии. После хирургической резекции оставшаяся кишка проходит процесс, называемый кишечной адаптацией, в результате которого увеличивается ее всасывающая способность, чтобы компенсировать ее уменьшенную длину. Было показано, что этот процесс адаптации кишечника может быть улучшен путем введения глюканоподобного пептида 2 (GLP-2) или более стабильных аналогов с увеличенным периодом полувыведения, например тедуглутида и апраглутида. Из-за физиологической роли толстой кишки пациенты с CIC могут управлять балансом жидкости намного лучше, чем пациенты с нефункционирующей толстой кишкой, и нуждаются в меньших объемах парентеральной поддержки на исходном уровне по сравнению с пациентами со стомой. PS определяется как любая внутривенная инфузия, содержащая жидкости и электролиты, которая может включать или не включать парентеральное питание (PN). Парентеральное питание определяется как PS, включающая белки, углеводы, жиры, витамины и/или микроэлементы. Пациенты с хронической кишечной недостаточностью вследствие доброкачественного заболевания имеют высокую вероятность длительного выживания при PS.

[0006] GLP-2 привлек значительное внимание в качестве терапевтического агента при повреждении кишечника с момента его идентификации в качестве сильного стимулятора пролиферации эпителия слизистой оболочки. Предварительные исследования у пациентов с синдромом короткой кишки показали улучшение кишечной абсорбции как жидкости, так и питательных веществ. GLP-2 индуцирует значительный рост эпителия слизистой оболочки тонкой кишки. Это также замедляет кишечный транзит. Однако встречающийся в природе GLP-2 не является приемлемым лекарственным средством-кандидатом, поскольку он быстро расщепляется пептидазами (например, DPP IV). В результате GLP-2 имеет очень короткий период полувыведения ($t_{1/2} = 10$ мин у человека) и быстрое выведение (CL).

[0007] Необходим способ получения высокопродуктивного и по существу чистого пептида-аналога GLP-2 с улучшенными фармакокинетическими свойствами. Кроме того, существует потребность в пептидной композиции аналога GLP-2, которая была бы по существу чистой, т. е. по существу без примесей. Настоящее описание относится к удовлетворению этой потребности.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В одном аспекте описан новый синтез аналога GLP-2 высокой чистоты. В другом аспекте описана новая натриевая соль аналога GLP-2. Способ может включать проведение твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) на смоле, отщепление синтезированного пептида-аналога GLP-2 от смолы и снятие защиты с боковых цепей пептида путем обработки смолы раствором, содержащим трифторуксусную кислоту (TFA), воду и анизол, проведение двух очисток с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), и лиофилизацию и упаковку очищенного пептидного порошка, содержащего по существу чистый пептид-аналог GLP-2. В некоторых вариантах осуществления апраглутид имеет чистоту не менее 95%. В некоторых вариантах осуществления апраглутид имеет чистоту не менее 97%.

[0009] Другой аспект настоящего описания относится к пептиду-аналогу GLP-2, имеющему чистоту по меньшей мере 97%. В некоторых вариантах осуществления пептид-аналог GLP-2, такой как апраглутид, содержит менее 1% примеси Des-Gly⁴ апраглутида; и/или менее 3% суммы примесей аспартимида³ апраглутида, Asp³³-ОН апраглутида и Des-Ser⁷ апраглутида; и/или менее 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

[0010] Другой аспект настоящего описания относится к пептиду-аналогу GLP-2, имеющему чистоту по меньшей мере 97%. В некоторых вариантах осуществления пептид-аналог GLP-2, такой как апраглутид, содержит менее или ровно 1% примеси Des-Gly⁴ апраглутида; и/или менее или ровно 3% суммы примесей аспартимида³ апраглутида, Asp³³-ОН апраглутида и Des-Ser⁷ апраглутида; и/или менее или ровно 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

[0011] Другой аспект настоящего описания относится к пептиду-аналогу GLP-2, имеющему чистоту по меньшей мере 97%. В некоторых вариантах осуществления пептид-аналог GLP-2, такой как апраглутид, содержит менее 1% суммы примесей Des-Gly⁴ апраглутида и аспартимида³ апраглутида, менее 1% примеси D-аспартимида³ апраглутида, менее 1% примеси Asp³³-ОН апраглутида, менее 1% примесей Des-Ser⁷ апраглутида и/или менее 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

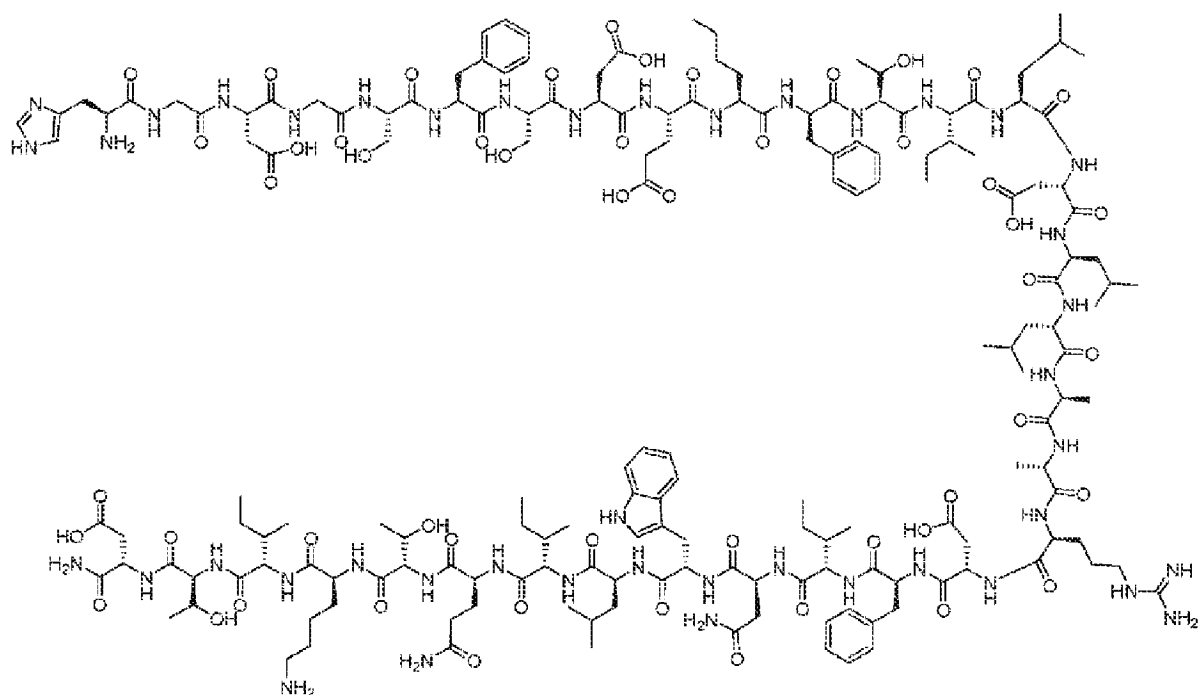
[0012] Другой аспект настоящего описания относится к пептиду-аналогу GLP-2, имеющему чистоту по меньшей мере 97%. В некоторых вариантах осуществления пептид-аналог GLP-2, такой как апраглутид, содержит меньше или ровно 1% суммы примесей Des-Gly⁴ апраглутида и аспартимида³ апраглутида, меньше или ровно 1% примеси D-аспартимида³ апраглутида, меньше или ровно 1% примеси Asp³³-ОН апраглутида, меньше

или ровно 1% примесей Des-Ser⁷ апраглутида и/или меньше или ровно 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

[0013] Авторы изобретения обнаружили, что:

- i) замена Fmoc-защищенных аминокислот: Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH и Fmoc-Gly-OH с Fmoc-Gln(Trt)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-OH и Fmoc-Tmb-Gly-OH во время снятия защиты Fmoc и циклы связывания улучшает эффективность реакции связывания и снижает образование аспартимида;
- ii) применение Охута вместо HOBT в качестве связывающей добавки во время циклов снятия защиты и связывания Fmoc сводит к минимуму окисление пептидов и образование примесей [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида; и
- iii) во время превращения натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ применение ацетонитрила (ACN) в композиции подвижной фазы, введение стадии доведения pH и удаление стадии титрования улучшают превращение натриевой соли апраглутида и качество очищенного апраглутида. В другом аспекте описаны новая лекарственная форма и соль апраглутида.

[0014] Согласно одному варианту осуществления пептид-аналог GLP-2 по настоящему описанию имеет химическую структуру:



[0015] В другом аспекте описан новый способ введения эффективного количества апраглутида пациентам, нуждающимся в этом. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет от 1 до 10 мг апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте осуществления апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 2,5 мг один раз в неделю пациентам с

массой тела менее 50 кг. В другом предпочтительном варианте осуществления апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве 5,0 мг один раз в неделю пациентам с массой тела 50 кг или больше. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли внутривенно. В других вариантах осуществления способ включает введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли подкожно.

[0016] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение соединения или его фармацевтически приемлемой соли с частотой от двух раз в день до двух раз в месяц, предпочтительно один раз в неделю.

[0017] Существует потребность в аналоге GLP-2 с более длительным периодом полувыведения, таком как апраглутид, дозу которого можно вводить реже, чем один раз в сутки, предпочтительно один раз в неделю.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0018] На ФИГ. 1 показана последовательность и структура пептида иллюстративного агониста GLP-2 (апраглутида), который можно применять в способах по настоящему описанию. Последовательности, показанные на ФИГ. 1, соответствуют SEQ ID NO: 1–4.

[0019] На ФИГ. 2А представлена блок-схема стадий 1–2 по первому аспекту настоящего описания, относящемуся к усовершенствованному способу получения пептида-аналога GLP-2, такого как апраглутид (далее именуемому как процесс В).

[0020] На ФИГ. 2В представлена блок-схема стадий 3–6 по первому аспекту настоящего описания, относящемуся к усовершенствованному способу получения пептида-аналога GLP-2, такого как апраглутид (далее именуемому как процесс В).

[0021] На ФИГ. 3 схематично представлена блок-схема производственного процесса по настоящему описанию, относящегося к производству фармацевтической композиции, содержащей апраглутид.

[0022] На ФИГ. 4 представлена схема дизайна испытания по настоящему описанию.

[0023] На ФИГ. 5 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения объема выделяемой мочи (мл/сутки) от исходного уровня до окончания лечения. Пунктирная линия обозначает среднее значение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0024] На ФИГ. 6 представлен график, показывающий изменения объема выделяемой мочи (мл/сутки) по сравнению с исходным уровнем, причем скорректированное среднее значение (точки) и 95% ДИ (черные линии) взяты из анализа частей А+В.

[0025] На ФИГ. 7 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения выделения натрия с мочой (ммоль/сутки) от исходного уровня до окончания лечения. Пунктирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0026] На ФИГ. 8 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения объема выделяемой мочи по сравнению с исходным уровнем сразу после первой инъекции. Пунктирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0027] На ФИГ. 9 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения экскреции натрия с мочой по сравнению с исходным уровнем сразу после первого лечения. Пунктирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0028] На ФИГ. 10А представлен график, показывающий индивидуальные изменения и среднее изменение комбинированного эффекта жидкости у пациентов, получающих лечение посредством плацебо. Комбинированный эффект жидкости, определяемый как сумма увеличения объема выделяемой мочи (сутки 27–29), уменьшения объема PS и снижения спонтанного перорального потребления жидкости (сутки 20–22).

[0029] На ФИГ. 2В представлен график, показывающий индивидуальные изменения и среднее изменение комбинированного эффекта жидкости у пациентов, получающих 5 мг апраглутида. Комбинированный эффект жидкости, определяемый как сумма увеличения объема выделяемой мочи (сутки 27–29), уменьшения объема PS и снижения спонтанного перорального потребления жидкости (сутки 20–22).

[0030] На ФИГ. 10С представлен график, показывающий индивидуальные изменения и среднее изменение комбинированного эффекта жидкости у пациентов, получающих 10 мг апраглутида. Комбинированный эффект жидкости, определяемый как сумма увеличения объема выделяемой мочи (сутки 27–29), уменьшения объема PS и снижения спонтанного перорального потребления жидкости (сутки 20–22).

[0031] На ФИГ. 11 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения от исходного уровня до окончания лечения абсолютных концентраций L-

цитруллина в плазме. Пунктирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0032] На ФИГ. 12 представлена схематическая диаграмма сводных стандартов отчетности об испытаниях (CONSORT).

[0033] На ФИГ. 13 представлена схематическая диаграмма сводных стандартов отчетности об испытаниях (CONSORT).

[0034] На ФИГ. 14 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения от исходного уровня до окончания лечения по потреблению сырой массы с пищей, массе выделенного кала, кишечной абсорбции и выработке мочи. Жирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Пунктирные линии показывают пациентов с SBS-II. Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0035] На ФИГ. 15 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения абсорбции калия, натрия, магния и кальция от исходного уровня до окончания лечения. Жирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Пунктирные линии показывают пациентов с SBS-II. Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0036] На ФИГ. 16 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения от исходного уровня до окончания лечения в потреблении энергии с пищей, массе выделенного кала и абсорбции. Жирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Пунктирные линии показывают пациентов с SBS-II. Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0037] На ФИГ. 17 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения абсорбции макроэлементов от исходного уровня до окончания лечения. Жирная линия обозначает среднее значение, В обозначает исходный уровень, Т обозначает лечение, Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем (стандартное отклонение). Пунктирные линии показывают пациентов с SBS-II. Разница в оттенках серого показывает отдельных пациентов.

[0038] На ФИГ. 18 представлен график, показывающий концентрацию цитруллина в плазме (мкг/мл) в зависимости от времени (сутки) после приема первой дозы апраглутида. SD — стандартное отклонение; п/к — подкожно. Данные представляют собой средние арифметические значения ($\pm$ SD). Ежедневные п/к введения 1, 5 или 10 мг апраглутида были запланированы в сутки 1, 8, 15, 22, 29 и 36.

[0039] На ФИГ. 19 представлен график, показывающий соответствующий график среднего значения по методу наименьших квадратов (LS) для изменения концентрации цитруллина в плазме (мкг/мл) по сравнению с исходным уровнем в зависимости от времени (сутки) после введения первой дозы апраглутида. ДИ — доверительный интервал; п/к — подкожно. Данные оцениваются методом наименьших квадратов (95% ДИ). Ежедневные п/к введения 1, 5 или 10 мг апраглутида были запланированы в сутки 1, 8, 15, 22, 29 и 36.

[0040] На ФИГ. 20А представлен график, показывающий концентрацию апраглутида в плазме (нг/мл) в зависимости от времени (сутки) после введения первой дозы апраглутида. п/к — подкожно; SD — стандартное отклонение. Ежедневные п/к введения 1, 5 или 10 мг апраглутида были запланированы в сутки 1, 8, 15, 22, 29 и 36. Значения ниже предела количественного определения (<1 нг/мл) были установлены на 0. Данные по уровню дозы представлены как среднее арифметическое $\pm$ SD на линейной шкале.

[0041] На ФИГ. 2В представлен график, показывающий концентрацию апраглутида в плазме (нг/мл) в зависимости от времени (сутки) после введения первой дозы апраглутида. п/к — подкожно; SD — стандартное отклонение. Ежедневные п/к введения 1, 5 или 10 мг апраглутида были запланированы в сутки 1, 8, 15, 22, 29 и 36. Значения ниже предела количественного определения (<1 нг/мл) были установлены на 0. Данные по уровню дозы представлены как среднее арифметическое $\pm$ SD по логарифмической шкале.

[0042] На ФИГ. 21 представлен график, показывающий индивидуальные значения $C_{\max}$ апраглутида и соответствующие значения $R_{\max}$ цитруллина (мкг/мл) в зависимости от уровня дозы на неделе 6. $C_{\max}$ — апраглутида (нг/мл); $C_{\max}$ — максимальная концентрация; $R_{\max}$ — максимальный ответ. Для регрессии отображаются линия регрессии, уравнение, р-значение наклона и значение R в квадрате.

[0043] На ФИГ. 22 представлен график, показывающий индивидуальные значения AUC_{τ} апраглутида и соответствующие значения $R_{\max}$ цитруллина (мкг/мл) в зависимости от уровня дозы на неделе 6. AUC_{τ} — площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени до конца периода лечения соответствующей дозировкой; $R_{\max}$ — максимальный ответ. Для регрессии отображаются линия регрессии, уравнение, р-значение наклона и значение R в квадрате.

[0044] На ФИГ. 23 представлен график корреляции индивидуальных значений AUC_{tau} апраглутида и соответствующих значений R_{max} цитруллина в зависимости от уровня дозы на неделе 6. Черная точка представляет оценку до последней дозы, а линия соединяет последующие оценки до 2 недель после последней дозы.

[0045] На ФИГ. 24 представлен график корреляции всех концентраций апраглутида и соответствующих концентраций цитруллина для каждого субъекта, получившего дозу 1 мг на неделе 6. Черная точка представляет оценку до последней дозы, а линия соединяет последующие оценки до 2 недель после последней дозы.

[0046] На ФИГ. 25 представлен график корреляции всех концентраций апраглутида и соответствующих концентраций цитруллина для каждого субъекта, получившего дозу 5 мг на неделе 6. Черная точка представляет оценку до последней дозы, а линия соединяет последующие оценки до 2 недель после последней дозы.

[0047] На ФИГ. 26А представлен график, показывающий прогнозируемые концентрации апраглутида в плазме (нг/мл) для индивидуума массой 70 кг, получающего подкожно еженедельные дозы апраглутида 2,5, 5 или 10 мг.

[0048] На ФИГ. 2В представлен график, показывающий прогнозируемые концентрации цитруллина в плазме (мкг/мл) для индивидуума массой 70 кг, получающего подкожно еженедельные дозы апраглутида 2,5, 5 или 10 мг.

[0049] На ФИГ. 27 представлен график, показывающий индивидуальные и средние изменения концентраций L-цитруллина в плазме от исходного уровня до завершения лечения. Среднее изменение по сравнению с исходным уровнем анализировали с помощью парного t-критерия. * $p < 0,05$ Сплошная черная линия представляет среднее изменение, цветные линии представляют отдельных пациентов. Пунктирная линия — SBS-II (с кишечной недостаточностью), сплошная линия — SBS-IF (с кишечным расстройством). Δ обозначает среднее изменение по сравнению с исходным уровнем.

[0050] На ФИГ. 28 представлен график, показывающий концентрации цитруллина в плазме (мкг/мл) после введения трех еженедельных доз апраглутида. Показано среднее значение $\pm$ стандартную ошибку среднего (SEM).

[0051] На ФИГ. 29 представлен график, показывающий концентрацию апраглутида в плазме (нг/мл) в зависимости от времени (часы) после однократной подкожной дозы 5 мг апраглутида.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0052] Синдром короткой кишки (SBS) представляет собой инвалидизирующее нарушение абсорбции, вызванное обширной хирургической резекцией кишечника.

Пациенты с обширными резекциями кишечника могут страдать от нарушений желудочно-кишечной нейроэндокринной обратной связи, которые регулируют абсорбцию жидкости и питательных веществ. Нарушения включают в себя расстройство постпрандиальной секреции GLP-2, нормально продуцируемого L-клетками терминального отдела подвздошной кишки и толстой кишки. Недостаток GLP-2 может привести к ускоренному опорожнению желудочно-кишечного тракта, гиперсекреции желудочно-кишечного тракта, уменьшению кишечного кровотока, нарушению иммунологической и барьерной функции и нарушению образования слизистой оболочки. Последующее отсутствие кишечной адаптации способствует патофизиологическим особенностям SBS, включая частые диареи или опорожнение стомы, недоедание, обезвоживание, дисбаланс электролитов и потерю веса. SBS также связан со значительной заболеваемостью и смертностью, а также ухудшением качества жизни. У пациентов с SBS и кишечной недостаточностью (SBS-IF) для поддержания здоровья и/или роста требуется парентеральная поддержка (PS), включающая любую комбинацию внутривенных жидкостей и/или парентерального питания.

[0053] Длительное применение PS может привести к серьезным осложнениям, таким как инфекции кровотока, связанные с катетером (CRBSI), и заболевание печени, связанное с кишечной недостаточностью (IFALD). В отличие от пациентов с SBS-IF, пациенты с SBS и кишечным расстройством (SBS-II) обходятся без PS из-за их способности компенсировать нарушение абсорбции за счет гиперфагии, метаболического регулирования и/или фармакологического лечения. Однако пациенты с SBS-II могут быть подвержены риску водно-электролитного дисбаланса, что требует повторной госпитализации для введения PS. В совокупности пациенты с SBS имеют низкое качество жизни, высокий уровень заболеваемости и смертности, а также требуются большие затраты на здравоохранение. Во всем мире SBS-IF представляет собой запущенную органную недостаточность с ограниченными возможностями лечения. Таким образом, определение новых методов лечения может улучшить осведомленность о болезни, снизить заболеваемость и смертность, облегчить изнурительные симптомы и уменьшить нагрузку лечения пациентов.

[0054] После хирургической резекции в остатках кишечника могут произойти структурные и функциональные изменения, направленные на повышение его абсорбирующей способности (обычно именуемой кишечной адаптацией). Этой адаптации способствует секреция нейроэндокринных пептидов по всему желудочно-кишечному тракту. Патофизиологические особенности SBS часто обусловлены нарушением механизмов нейроэндокринной обратной связи и недостаточной кишечной адаптацией.

Это включает в себя нарушение постпрандиальной секреции глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2), который продуцируется кишечными L-клетками, преимущественно расположенными в терминальном отделе подвздошной кишки и проксимальном отделе толстой кишки.

[0055] Нативный GLP-2 имеет короткий период полувыведения из-за расщепления дипептидилпептидазой-IV (DPP4). Апраглутид представляет собой синтетически полученный аналог GLP-2 нового поколения с молекулярной структурой, предназначенной для обеспечения длительного постоянного воздействия и увеличенным периодом полувыведения по меньшей мере 30 часов по сравнению с GLP-2 человека и другими аналогами GLP-2. Апраглутид отличается от GLP-2 человека четырьмя аминокислотными заменами и был идентифицирован в ходе изучения взаимосвязи химической структуры и активности липофильных аминокислотных замен в положениях 11 и 16 [Gly2] hGLP-2 (1–33). В моделях животных апраглутид способствовал увеличению длины и веса кишечника, высоты ворсинок и глубины крипт. Фармакокинетические (ФК) и фармакодинамические исследования на животных показали, что апраглутид может иметь низкий клиренс, длительный период полувыведения и высокое связывание с белками плазмы по сравнению с другими аналогами GLP-2. Таким образом, апраглутид может представлять собой кандидата для схемы применения один раз в неделю. Лечение апраглутидом потенциально может помочь пациентам восстановить энтеральную автономию или снизить потребность в PS, улучшить симптомы нарушения абсорбции, облегчить органную недостаточность, вторичную по отношению к II и IF, и предотвратить ухудшение состояния пациентов с SBS-II до состояния интермиттирующей или хронической IF.

[0056] В настоящем документе термин «аминокислота» включает в себя как встречающиеся в природе аминокислоты, так и не встречающиеся в природе аминокислоты. Если не указано иное, аминокислота представляет собой L-аминокислоту. Если не указано иное, аминокислотные последовательности представлены от N-конца к C-концу.

[0057] Используемый в настоящем документе термин «контроль», используемый отдельно или в отношении количества или уровня, может относиться к уровню, наблюдаемому у субъекта перед началом лечения (например, введением эффективной дозы агониста GLP-2), уровню, наблюдаемому у субъекта в контрольной группе или популяции субъектов (включая ранее наблюдаемые уровни). При использовании в отношении субъекта «контроль» может относиться к тому же субъекту до получения данного лечения (например, эффективной дозы агониста GLP-2), аналогичному субъекту, который не

получает никакого лечения по поводу данного состояния, или аналогичному субъекту, который получает лечение (например, хирургическое вмешательство, уход за раной и/или пищевую поддержку), которое не включает данное лечение (например, введение эффективной дозы агониста GLP-2).

[0058] Используемый в настоящем документе термин «агонист GLP-2» относится к аналогу встречающегося в природе GLP-2 у позвоночных, который проявляет аналогичную или сравнимую активность со встречающимся в природе GLP-2, но структурно изменен по сравнению с данным GLP-2 позвоночных путем добавления, делеции, замены, модификации по меньшей мере одной аминокислоты и/или включения одной или более аминокислот с блокирующей группой. Такие агонисты предпочтительно имеют аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичную последовательности либо GLP-2, либо фрагмента GLP-2, имеющего такое же количество аминокислотных остатков.

[0059] Используемые в настоящем документе термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту, которому требуется терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например человека или млекопитающее, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0060] Используемый в настоящем документе термин «лечение» (также «лечить» или «лечащий») относится к любому введению терапевтического средства (например, терапевтического соединения или композиции, как описано в настоящем документе), которое частично или полностью снижает потребность в парентеральной поддержке.

[0061] Используемый в настоящем документе термин «чистота» относится к чистоте, определяемой хроматографическими способами, более конкретно, способами сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ) и/или способами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

[0062] Используемый в настоящем документе термин «эквивалент» вещества (например, Охута) используется для обозначения молярного соотношения вещества, более конкретно, количества молей вещества, которое должно вступить в реакцию с одним молем другого вещества.

[0063] Любой из вариантов осуществления и/или аспектов, описанных в настоящем документе, может быть объединен с любым другим вариантом осуществления и/или

аспектом, описанным в настоящем документе, и может быть объединено любое количество вариантов осуществления и/или аспектов.

[0064] Агонисты GLP-2, которые можно применять в способах по настоящему описанию, включают в себя, например, агонисты, описанные в международной заявке на патент № W02006/117565 и патенте США № 8,589,918, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ путем ссылки. Агонисты GLP апраглутид и родственные соединения (см., например, патент США № 8,589,918) имеют превосходные фармакокинетические свойства и предпочтительны для применения в настоящих способах.

[0065] SEQ ID NO: Аминокислотная последовательность

SEQ ID NO: 1 (GLP2) His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-
Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-
Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-OH

SEQ ID NO: 2 (Апраглутид) **His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Nle-D-Phe-
Thr-Ile-Leu-Asp-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-
Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂**

[0066] В предпочтительных вариантах осуществления агонист GLP-2 представляет собой апраглутид, пептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где Nle представляет собой норлейцин, а D-Phe представляет собой фенилаланин D- аминокислоты.

СИНТЕЗ

[0067] Способы получения апраглутида описаны в данной области и включают в себя способы твердофазного пептидного синтеза. См., например, патент США № 8,580,918, в котором описаны способы получения агонистов GLP-2, включающих в себя апраглутид. В отличие от предыдущих способов синтеза апраглутида (например, способов, описанных в патенте США № 8,580,918), которые позволяли достичь чистоты только на 93%, настоящее описание предлагает способы получения апраглутида, имеющего чистоту по существу, например, $\geq 95\%$ или $\geq 97\%$, причем способ по-прежнему обеспечивает достаточно высокий выход для применения в коммерческих производственных процессах.

Кроме того, в US 8,580,918 описана соль аммония апраглутида. В настоящем документе описан синтез предпочтительной соли апраглутида, натриевой соли.

[0068] Процесс производства апраглутида основан на твердофазном пептидном синтезе (ТФПС) с применением стратегии Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонил).

Аминокислотная последовательность строится поэтапно от С-конца путем последовательных циклов снятия защиты Fmoc и связывания следующей аминокислоты Fmoc. Новый способ синтеза апраглутида имеет ряд улучшений, описанных ниже.

Применяют Fmoc-Rink-амид-MBHA (МетилБензГидриламин)-смолу, причем связь между пептидом и смолой осуществляется через линкер Kпогг. После снятия защиты Fmoc промывки пиперидином/DMF (N, N-диметилформамидом) проводят с применением Охута (этил[гидроксиамино]цианоацетата) для снижения уровня примесей окисления. Две добавки диизопропилкарбодиимида (DIC) применяют для уменьшения времени связывания. После каждой реакции связывания аминокислот полноту реакции контролируют с помощью полуколичественного теста Кайзера, основанного на выявлении не вступивших в реакцию аминов. После сборки и снятия защиты с последней Fmoc-группы пептидную смолу промывают изопропанолом (IPA) и сушат в вакууме. При применении нового процесса синтеза общее время связывания сокращается примерно на 25% по сравнению с начальными условиями без влияния на чистоту неочищенного пептида при ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и технологический выход.

[0069] После завершения синтеза пептида осуществляют отщепление пептида от смолы обработкой смесью TFA (трифторуксусная кислота)/H₂O/анизола при комнатной температуре в атмосфере азота. Отщепленный пептид отделяют от смолы фильтрованием и далее обрабатывают на усовершенствованных последующих стадиях очистки с получением натриевой соли апраглутида с чистотой по ВЭЖХ $\geq 97\%$.

[0070] Усовершенствованный вариант процесса синтеза апраглутида (процесс В; изображен на ФИГ. 2А и 2В) включает первичную очистку с помощью хроматографии ОФ-ВЭЖХ (C18) в подвижных фазах на основе TFA (H₂O/ацетонитрил) до чистоты $\geq 90\%$ с доведением pH фракций с помощью бикарбоната натрия (NaHCO₃) с последующей вторичной очисткой методом ОФ-ВЭЖХ (C18) в подвижных фазах NaHCO₃ (H₂O/ацетонитрил) до чистоты $\geq 97\%$, с последующим обессоливанием/заменой буфера с помощью ОФ-ВЭЖХ (C18) в подвижных фазах ацетата натрия (NaOAc)/H₂O/ацетонитрила. Фракции, содержащие продукт, объединяют и лиофилизируют с получением натриевой соли апраглутида с чистотой $\geq 97\%$.

Усовершенствованные версии процесса синтеза апраглутида, описанные в настоящем

документе, способны обеспечить апраглутид высокой степени чистоты (например, чистота $\geq 95\%$ или $\geq 97\%$), сохраняя при этом выход, приемлемый для крупномасштабного коммерческого производства апраглутида. Специалисту в данной области будет понятно, что способы получения сверхчистых соединений, как правило, имеют низкий выход, что делает их применение в коммерческом производстве нецелесообразным. Неожиданно было обнаружено, что способы синтеза апраглутида, описанные в настоящем документе, не только обеспечивают высокочистый апраглутид, но и демонстрируют выход, который является приемлемым для применения в коммерческих производственных условиях.

[0071] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий:

- a) проведение твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) для синтеза пептида-аналога GLP-2 на смоле;
- b) отщепление синтезированного пептида-аналога GLP-2 от смолы и снятие защиты с боковых цепей синтезированного пептида-аналога GLP-2 путем обработки смолы раствором, содержащим трифторуксусную кислоту (TFA), воду и анизол;
- c) очистку синтезированного аналога-аналога GLP-2 с применением препаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ);
- d) дополнительную очистку продукта стадии (c) с применением второй препаративной ОФ-ВЭЖХ с получением очищенного раствора пептида (и, необязательно, третьей препаративной ОФ-ВЭЖХ, при которой происходит обессоление и замена буфера);
- e) лиофилизацию очищенного пептидного раствора с получением очищенного пептидного порошка; и
- f) упаковку порошка очищенного пептида в атмосфере аргона.

[0072] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий: проведение ТФПС для синтеза пептида-аналога GLP-2 на смоле, причем смола представляет собой смолу 4-метилбензгидриламина (MBHA).

[0073] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий: проведение ТФПС для синтеза пептида-аналога GLP-2 на смоле, причем ТФПС включает промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охута.

[0074] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий: проведение ТФПС для синтеза пептида-аналога GLP-2 на смоле, причем ТФПС включает стадию связывания, осуществляемую путем приведения в контакт смолы с двумя количествами раствора, содержащего DIC и Охута, и причем количества приводят в контакт с интервалом в 30 минут.

[0075] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий: очистку синтезированного пептида-аналога GLP-2 путем приведения пептида в контакт с раствором, содержащим воду, ацетонитрил (ACN) и гидроксид аммония (NH₄OH) для экстракции неочищенного пептида из смеси расщепленной пептидной смолы и исключения последующей стадии подкисления.

[0076] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий очистку синтезированного пептида-аналога GLP-2 посредством ОФ-ВЭЖХ с применением раствора, содержащего 0,05% TFA, воду и ацетонитрил в качестве элюента, и доведение pH очищенных пептидных фракций до около pH 7,9 с применением 0,1% AcOH (уксусной кислоты) в воде.

[0077] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий: очистку синтезированного пептида-аналога GLP-2 со второй очисткой с помощью ОФ-ВЭЖХ с применением раствора, содержащего 0,05 М бикарбоната натрия (NaHCO₃), воду и ацетонитрил в качестве элюента.

[0078] В настоящем описании предложен способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий: выполнение очистки ВЭЖХ с применением раствора 1,5 mM NaOAc/H₂O/ACN в качестве подвижной фазы.

[0079] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (а) включает:

- i) получение смолы, на которой будет проводиться ТФПС;
- ii) выполнение начального снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания для добавления к смоле первой Fmoc-защищенной аминокислоты с образованием защищенного пептида на смоле;
- iii) выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания для присоединения по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислоты к защищенному пептиду;
- iv) повторение стадии iii до тех пор, пока пептид-аналог GLP-2 не будет синтезирован на смоле, причем Fmoc-защищенный и защищенный по боковой цепи пептид-аналог GLP-2 присоединен к смоле, и причем пептид содержит аминокислотную последовательность: Амид L-гистидил-глицил-L-аспартил-глицил-L-серил-L-фенилаланил-L-серил-L-аспартил-L-глутамил-L-норлейцил-D-фенилаланил-L-треонил-лизолейцил-L-лейцил-L-аспартил-L-лейцил-L-лейцил-L-аланил-L-аланил-L-аргинил-L-аспартил-L-фенилаланил-L-изолейцил-L-аспарагинил-L-триптофанил-L-лейцил-L-изолейцил-L-глутаминил-L-треонил-L-лизил-L-изолейцил-L-треонил-лапарагиновой кислоты.
- v) выполнение реакции снятия защиты Fmoc для получения защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой; и

vi) сушку защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой.

[0080] В некоторых аспектах способов по настоящему изобретению стадия

(a)(i) включает:

(a1) промывку смолы раствором, содержащим диметилформамид (DMF) и *N,N*-диизопропилэтиламин (DIEA) из расчета 5 мл раствора на грамм смолы в атмосфере N₂;

(b1) связывание амидного линкера Rink со смолой в растворе, содержащем гексафторфосфат 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий, гексафторфосфат бензотриазолтетраметилурионий (HBTU), DIEA и гидроксибензотриазол (HOBt) в DMF;

(c1) промывку продукта, образованного на стадии (b1), с помощью DMF;

(d1) выполнение реакции восстановления путем приведения смолы в контакт с раствором, содержащим уксусный ангидрид (Ac₂O) и DIEA в DMF; и

(e1) промывку продукта, образованного на стадии (d1), с помощью DMF.

[0081] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию смола представляет собой метилбензиламиновою смолу.

[0082] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию продукт на стадиях

(a)(i)(a1)–(a)(i)(e1) представляет собой смолу Fmoc-Rink-амид-MBHA.

[0083] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (c1) и/или стадия

(e1) включает промывку продукта три раза в соотношении 5 миллилитров DMF к каждому грамму смолы.

[0084] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию между стадиями (d1) и (e1) может быть проведено испытание связывания.

[0085] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию проводят тест Кайзера, чтобы определить, было ли достигнуто завершение реакции связывания.

[0086] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию продукт после

завершения стадии (a)(i)(e1) представляет собой: Fmoc-His(Trt)-Gly-Asp(OtBu)-TmbGly-

Ser(tBu)-Phe-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Nle-DPhe-Thr(tBu)-Ile- Leu-Asp(OtBu)-Leu-

Leu-Ala-Ala-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-Phe-Ile-Asn(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Ile-Gln(Trt)-Thr($\psi^{Me,Me}_{pro}$)-

Lys(Boc)-Ile-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Rink-амид-MBHA-смолу.

[0087] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания включает:

(a2) обработку смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF;

(b2) промывку смолы DMF;

(c2) приведение смолы в контакт с по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислотой и раствором, содержащим диизопропилкарбодиимид (DIC) и

этилцианогидроксииминацетатом (Охута) в DMF, таким образом связывая по меньшей мере одну Fmoc-защищенную аминокислоту; и

(d2) промывку продукта, образованного на стадии (c2), с помощью DMF.

[0088] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин в DMF, представляет собой 35% раствор пиперидина в DMF.

[0089] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию обработку смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF, осуществляют путем 3-минутной промывки смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF, с последующей второй 3-минутной промывкой смолы с помощью раствора, содержащего пиперидин в DMF, с последующей 10-минутной промывкой смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF.

[0090] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин в DMF, представляет собой 20% раствор пиперидина в DMF.

[0091] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию обработку смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF, осуществляют путем 15-минутной промывки смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF, с последующей второй 15-минутной промывкой смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF.

[0092] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию промывки выполняют в соотношении 5 миллилитров раствора, содержащего пиперидин в DMF, к каждому грамму смолы.

[0093] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию промывка смолы на стадии (b2) включает выполнение первой промывки DMF в соотношении 15 миллилитров DMF к каждому грамму смолы с последующей второй промывкой DMF в соотношении 5 миллилитров DMF к каждому грамму смолы.

[0094] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию промывка смолы на стадии (b2) включает:

- i) промывку смолы DMF; и
- ii) промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охута.

[0095] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий DMF и Охута, содержит 2 эквивалента Охута.

[0096] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию проведение реакции снятия защиты Fmoc с остатка Asp³ включает обработку смолы раствором, содержащим пиперидин и Охута, в DMF.

[0097] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин и Охута в DMF, представляет собой 10% пиперидин и 2% раствор Охута в DMF.

[0098] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин и Охута в DMF, представляет собой 5% пиперидин и 1% раствор Охута в DMF.

[0099] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин и Охута в DMF, представляет собой 15% пиперидин и 3% раствор Охута в DMF.

[0100] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин и Охута в DMF, представляет собой 20% пиперидин и 4% раствор Охута в DMF.

[0101] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин и Охута в DMF, представляет собой 25% пиперидин и 5% раствор Охута в DMF.

[0102] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий пиперидин и Охута в DMF, представляет собой 30% пиперидин и 6% раствор Охута в DMF.

[0103] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию обработку смолы раствором, содержащим пиперидин и Охута в DMF, проводят путем 15-минутной промывки смолы раствором, содержащим пиперидин и Охута в DMF, с последующей второй 30-минутной промывкой смолы раствором, содержащим пиперидин и Охута в DMF.

[0104] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (с2) включает:

- i) приведение смолы в контакт с по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислотой и раствором, содержащим DIC и Охута в DMF; и
- ii) приведение смолы в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC.

[0105] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию смолу приводят в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC в течение около 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 минут после приведения смолы в контакт с по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислотой.

[0106] В некоторых аспектах по меньшей мере одна защищенная аминокислота представляет собой дипептид, содержащий Boc-His(Trt)-Gly-OH.

[0107] В некоторых аспектах по меньшей мере одна защищенная аминокислота представляет собой дипептид, содержащий Fmoc-His(Trt)-Gly-OH.

[0108] В некоторых аспектах дипептид предварительно активируется в течение 10 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 2 часов, 3 часов или 4 часов перед связыванием дипептида.

[00109] В некоторых аспектах дипептид предварительно активируется при $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ перед связыванием дипептида.

[00110] В некоторых аспектах дипептид предварительно активирован в растворе, содержащем Boc-His (Trt)-Gly-OH/Охута/DIC 2,5 ммоль/2,5 ммоль/2,5 ммоль в 7 мл DMF перед связыванием дипептида.

[00111] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (с2) включает:

- i) приведение смолы в контакт с по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислотой и раствором, содержащим DIC и Охута в DMF; и
- ii) приведение смолы в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охута.

[00112] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию второе количество раствора, содержащего DIC и Охута, приводят в контакт со смолой через около 30 минут после приведения смолы в контакт с по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислотой.

[00113] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию на стадии (с2) по меньшей мере одна защищенная Fmoc аминокислота предложена в концентрации 1, 2, 3, 4 или 5 эквивалентов.

[00114] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию на стадии (с2), DIC предложена в концентрации 1, 2, 3, 4 или 5 эквивалентов, а Охута предложена в концентрации 1, 2, 3, 4 или 5 эквивалентов.

[00115] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию на стадии (с2) по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Fmoc-Gln(Trt)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-ОН.

[00116] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию на стадии (с2) Fmoc-Gln(Trt)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}_{\text{pro}}$)-ОН предложено в концентрации 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 эквивалентов.

[00117] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию способ дополнительно включает, между стадией (b2) и стадией (с2), проведение теста на остаточный пиперидин путем измерения количества пиперидина.

[00118] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию, если количество измеренного пиперидина составляет более 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 ч/млн, смолу снова промывают DMF и/или раствором, содержащим DMF и Охута.

[00119] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию между стадией (с) и стадией (d) проводят испытание связывания.

[00120] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию испытание связывания представляет собой нингидриновый анализ.

[00121] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия a(v) включает:

(a3) обработку смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF;

(b3) промывку смолы DMF;

(с3) промывку смолы изопропанолом.

[00122] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию промывка смолы на стадии (b3) включает:

i) промывку смолы DMF; и

ii) промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охума.

[00123] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию промывание смолы изопропанолом на стадии (с) включает промывание смолы пять раз изопропанолом, причем каждую промывку выполняют в соотношении 5 миллилитров изопропанола к каждому грамму смолы.

[00124] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию продукт после завершения стадии (a)(v) представляет собой защищенный пептид на смоле, содержащий: H-His(Trt)-Gly-Asp(OtBu)-TmbGly-Ser(tBu)-Phe-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Nle-DPhe-Thr(tBu)-Ile-Leu-Asp(OtBu)-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-Phe-Ile-Asn(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Ile-Gln(Trt)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-Lys(Boc)-Ile-Thr(tBu)-Asp(OtBu)-Rink-амид-МВНА-смоле.

[00125] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий TFA, воду и анизол, представляет собой раствор, содержащий TFA, воду и анизол, в соотношении TFA : вода : анизол 95 : 2,5 : 2,5.

[00126] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий TFA, воду и анизол, представляет собой раствор, содержащий TFA, воду и анизол, в соотношении TFA : вода : анизол 90 : 5 : 5.

[00127] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий TFA, воду и анизол, представляет собой раствор, содержащий TFA, воду и анизол, в соотношении TFA : вода : анизол 80 : 10 : 10.

[00128] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий TFA, воду и анизол, представляет собой раствор, содержащий TFA, воду и анизол, в соотношении TFA : вода : анизол 70 : 15 : 15.

[00129] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (b) дополнительно включает осаждение и промывку расщепленного и защищенного пептида-аналога GLP-2 с применением трет-бутилметилового эфира (MTBE).

[00130] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию продукт после завершения стадии (b) представляет собой: H-His-Gly-Asp-Gly-Ser⁵-Phe-Ser-Asp-Glu-NLe¹⁰-DPhe-Thr-Ile-Leu-Asp¹⁵-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg²⁰-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp²⁵-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys³⁰-Ile-Thr-Asp-NH₂.

[00131] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (c) включает:

- (i) приведение продукта стадии (b) в контакт с раствором, содержащим воду, ацетонитрил и NH₄OH;
- (ii) очистку синтезированного пептида-аналога GLP-2 с применением препаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

[00132] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, содержит смесь H₂O / ACN в соотношении 80 : 20 в буфере аммиака.

[00133] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, содержит смесь H₂O / ACN в соотношении 70 : 30 в буфере аммиака.

[00134] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, содержит смесь H₂O / ACN в соотношении 90 : 10, соотношении 80 : 20, соотношении 70 : 30, соотношении 60 : 40, соотношении 50 : 50 или соотношении 40 : 60 в буфере аммиака.

[00135] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, доводят до целевого pH 7, pH 8, pH 9, pH 10 или pH 11.

[00136] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, доводят до целевого pH ≥ 7 .

[00137] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, доводят до целевого pH $8,0 \pm 0,1$.

[00138] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, доводят до целевого pH $8,0 \pm 0,1, \pm 0,2, \pm 0,3, \pm 0,4, \pm 0,5, \pm 0,6, \pm 0,7, \pm 0,8$ или $\pm 0,9$.

[00139] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i), содержащий воду и ацетонитрил, доводят до около pH 10.

[00140] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию pH доводят с помощью 25% уксусной кислоты.

[00141] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию pH доводят с помощью 25% NH₄OH в H₂O.

[00142] В некоторых аспектах раствор стадии (c) (i) выдерживают при 0 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C или 80 °C.

[00143] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают при 50 °С.

[00144] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают при комнатной температуре.

[00145] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают в течение 10 минут, 20 минут, 30 минут, 40 минут, 50 минут, 55 минут, 60 минут, 65 минут, 70 минут, 75 минут, 80 минут, 90 минут, 100 минут, 110 минут, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 10 часов, 20 часов, 24 часов, 30 часов, 40 часов, 50 часов, 60 часов или 72 часов при температуре, описанной в настоящем документе.

[00146] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают в течение 65 минут при температуре, описанной в настоящем документе.

[00147] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают в течение 24 часов при температуре, описанной в настоящем документе.

[00148] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают в течение 65 минут при 50 °С.

[00149] В некоторых аспектах раствор стадии (с) (i) выдерживают в течение 24 часов при комнатной температуре.

[00150] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию ОФ-ВЭЖХ проводят с применением колонки C18.

[00151] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию ОФ-ВЭЖХ проводят с применением раствора, содержащего NaHCO_3 , воду и ацетонитрил в качестве элюента.

[00152] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий NaHCO_3 , воду и ацетонитрил, содержит 0,01 М, 0,05 М, 0,1 М, 0,2 М, 0,3 М, 0,4 М или 0,5 М NaHCO_3 .

[00153] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию ОФ-ВЭЖХ проводят с применением раствора, содержащего TFA, воду и ацетонитрил в качестве элюента.

[00154] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий TFA, воду и ацетонитрил, содержит 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% или 0,5% TFA.

[00155] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию ОФ-ВЭЖХ включает регулирование pH очищенных пептидных фракций.

[00156] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию на стадии (d) синтезированный пептид-аналог GLP-2 преобразуют в его форму катиона натрия.

[00157] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (d) включает доведение pH очищенного пептидного раствора до около pH 7,9 с применением 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% или 2% AcOH в воде.

[00158] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию стадия (d) включает доведение pH раствора очищенного пептида до около pH 7,9 с применением 0,1% AcOH в воде.

[00159] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию продукт из стадии (c) очищают с применением ВЭЖХ с получением дополнительно очищенного раствора пептида.

[00160] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию ВЭЖХ проводят с применением раствора, содержащего AcOH, воду и ацетонитрил.

[00161] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий AcOH, воду и ацетонитрил, представляет собой раствор AcOH с концентрацией 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% или 5%.

[00162] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию ВЭЖХ проводят с применением раствора, содержащего ацетат натрия (NaOAc), воду и ацетонитрил.

[00163] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию раствор, содержащий NaOAc, воду и ацетонитрил, представляет собой раствор NaOAc с концентрацией 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM или 3 mM.

[00164] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию после очистки ВЭЖХ pH дополнительно очищенного раствора пептида доводят до около pH 7,9 с применением 0,1% AcOH в воде.

[00165] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию после очистки ВЭЖХ pH дополнительного очищенного раствора пептида доводят до около pH 5, до около pH 6, до около pH 6,5, до около pH 7, до около pH 7,5, до около pH 7,9, до около pH 8, до около pH 8,5 или до около pH 9 с применением 0,1% AcOH в воде.

[00166] В некоторых аспектах исходные материалы, представленные в таблице 1, могут быть применены в способах по настоящему описанию. В некоторых аспектах исходные материалы, представленные в таблице 1, могут иметь чистоту, которая представлена в столбце «Чистота» в таблице 1:

Таблица 1

Сокращение	Материал	Чистота
Амидный линкер Fmoc-Rink	4-[(2,4-Диметоксифенил) (Fmoc-амино) метил]-феноксиуксусная кислота	$\geq 97\%$
Fmoc-Ala-OH, H ₂ O	N ^α -Fmoc-аланин моногидрат	$\geq 98\%$ $\leq 0,2\%$ D-энантиомера
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	N ^α -Fmoc-N ^ω -(2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил)-аргинин	$\geq 98\%$ $\leq 0,2\%$ D-энантиомера

Fmoc-Asn(Trt)-OH	N ^α -Fmoc-N ^γ -тритил-аспарагин	≥ 99% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	β-третбутиловый эфир N ^α -Fmoc-аспарагиновой кислоты	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Glu(OtBu)-OH.H ₂ O	γ-третбутиловый эфир N ^α -Fmoc-глутаминовой кислоты	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Gly-OH	N ^α -Fmoc-глицин	≥ 99%
Fmoc-Gly(Tmb)-OH	N ^α -Fmoc-N ^α -(2,4,6-триметоксбензил)глицин	≥ 98%
Fmoc-His(Trt)-OH	N ^α -Fmoc-N ^ε -гистидин	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Ile-OH	N ^α -Fmoc-изолейцин	≥ 98% ≤ 0,1% Fmoc-D-Ile-OH ≤ 0,1% Fmoc-L-Allo-Ile-OH ≤ 0,1% Fmoc-D-Allo-Ile-OH
Fmoc-Leu-OH	N ^α -Fmoc-лейцин	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Lys(Boc)-OH	N ^α -Fmoc-N ^ε -трет-бутоксикарбонилизин	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Nle-OH	N ^α -Fmoc-норлейцин	≥ 98% ≤ 0,5% D-энантиомера
Fmoc-Phe-OH	N ^α -Fmoc-фенилаланин	≥ 99% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-D-Phe-OH	N ^α -Fmoc-D-фенилаланин	≥ 98% ≤ 0,5% L-энантиомера
Fmoc-Ser(tBu)-OH	N ^α -Fmoc-O-трет-бутилсерин	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Thr(tBu)-OH	N ^α -Fmoc-O-трет-бутилтреонин	≥ 98% ≤ 0,1% Fmoc-D-Thr(tBu)-OH ≤ 0,1% Fmoc-L-Allo-Thr(tBu)-OH ≤ 0,1% Fmoc-D-Allo-Thr(tBu)-OH
Fmoc-Trp(Boc)-OH	N ^α -Fmoc-N ⁱⁿ -трет-бутоксикарбонил-триптофан	≥ 98% ≤ 0,2% D-энантиомера
Fmoc-Gln(Trt)-Thr(ψ ^{Me,Me} Pro)-OH	N ^α -Fmoc-N ^δ -тритил-глутаминил-2,2,5-триметилксазолидин-4-карбоновая кислота	≥ 98% ≤ 0,5% D-энантиомера

[00167] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию апраглутид имеет чистоту не менее 95 %.

[00168] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию апраглутид имеет чистоту не менее 97 %.

[00169] В некоторых аспектах концентрации и/или наличие примесей Des-Gly⁴ апраглутида, аспартимида³, Asp³³-ОН, Des-Ser⁷ апраглутида и [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] можно определить с помощью ОФ-ВЭЖХ. В таблице 2а показана чистота и основные примеси в двух вариантах описанного выше синтеза. В таблице 2b показана чистота и выход в трех вариантах процесса синтеза апраглутида, описанного в настоящем документе.

Таблица 2а

Испытание	Процесс А		Процесс В (ФИГ. 2А и 2В)	
	≥ 95%, спецификация чистоты API	≥ 95%, результаты испытания API	≥ 97%, спецификация чистоты API	≥ 97%, результаты испытания API
Чистота	≥ 95,0%	95,6%	≥ 97,0%	97,9%
Сумма связанных примесей	≤ 5,0%	4,4%	≤ 3,0%	2,12%
Des-Gly ⁴ и аспартимид ³ (две совместно элюирующиеся примеси)	≤ 1,0%	0,42%	≤ 1,0%	0,53%
Asp ³³	≤ 1,0%	0,45%	≤ 1,0%	0,59%
Des-Ser ⁷	≤ 1,0%	0,13%	≤ 1,0%	0,27%
Trp ²⁵ 2-(2'4'6-триметоксифенил)	≤ 2,0%	0,78%	≤ 1,0%	< 0,05%
D-Asp ³	≤ 2,0%	0,22%	≤ 1,0%	Не обнаружено
Содержание API	≥ 80,0%	85,7%	≥ 85,0%	91,2%

Таблица 2b

	Процесс А , цикл № 1	Процесс А , цикл № 2	Процесс А , цикл № 3	Процесс В , цикл № 1	Процесс В , цикл № 2	Процесс С , цикл № 1
Хроматографическая чистота	92,3%	91,5%	95,3%	97,9%	96,3%	98,5%
Выход	15%	22%	17%	20,7%	20,5%	22,4%

[00170] В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит какой-либо неидентифицированной примеси в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%,

0,5%, 1%, 1,5% или 2%. В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит какой-либо неидентифицированной примеси в концентрации более 1%.

[00171] В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит примеси, содержащей аналог GLP-2 Des-Gly⁴ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит аналог GLP-2 Des-Gly⁴ в концентрации более 3%.

[00172] В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит примеси, содержащей: сумму примесей аналога GLP-2 аспартимид³, Asp³³-ОН и Des-Ser⁷ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, или 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, или 5%. В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит сумму примесей аналога GLP-2 аспартимида³, Asp³³-ОН и Des-Ser⁷ в концентрации более 2%.

[00173] В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит примеси, содержащей: аналог GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления очищенный пептидный пул не содержит примеси аналога GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 2%.

[00174] В некоторых вариантах осуществления чистота натриевой соли пептида-аналога GLP-2, измеренная с помощью ОФ-ВЭЖХ, составляет более 95%, 97% или 99%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного пептидного пула, измеренная с помощью ОФ-ВЭЖХ, составляет более 95%.

[00175] В некоторых вариантах осуществления чистота натриевой соли пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо неидентифицированной примеси в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%. В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо неидентифицированной примеси в концентрации более 1%.

[00176] В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей аналог GLP-2 Des-Gly⁴ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 Des-Gly⁴ в концентрации более 3%.

[00177] В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей: сумму примесей аналога GLP-2 аспартимида³, Asp³³-ОН и Des-Ser⁷ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%,

4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит суммы примесей аналога GLP-2 аспартимида³, Asp³³-ОН и Des-Ser⁷ в концентрации более 2%.

[00178] В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей: аналог GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 2%.

[00179] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию способ может дополнительно включать внутрипроизводственный контроль после превращения пептида в форму натриевой соли, причем внутрипроизводственный контроль осуществляется с помощью ОФ-ВЭЖХ, а критерием приемлемости является чистота пептида $\geq 95,0\%$ и наличие не более чем следующих примесей: апраглутид Des-Gly⁴ составляет $\leq 3,0\%$, сумма примесей аспартимида³, Asp³³-ОН и Des-Ser⁷ апраглутида составляет $\leq 2,0\%$, [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутид составляет $\leq 2,0\%$ и любые другие неидентифицированные примеси составляют $\leq 1,0\%$.

[00180] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления применение Fmoc-Gln(Trt)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{Pro}$)-ОН и Fmoc-Tmb-Gly-ОН во время снятия защиты Fmoc и циклов связывания повышает эффективность связывания и уменьшает образование аспартимида.

[00181] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления применение Охута в качестве связывающей добавки во время циклов снятия защиты Fmoc и связывания сводит к минимуму образование примесей окисления и аналога GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)].

[00182] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, в некоторых вариантах осуществления применение ACN в композиции подвижной фазы во время превращения натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ улучшает превращение натриевой соли в композицию пептида-аналога GLP-2. В некоторых вариантах осуществления удаление стадии титрования во время превращения натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ улучшает превращение натриевой соли в композицию пептида-аналога GLP-2. В некоторых вариантах осуществления доведение pH во время превращения натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ улучшает превращение натриевой соли в композицию пептида-аналога GLP-2.

[00183] Примесь аналога GLP-2 Des-Gly⁴ содержит Gly⁴, отсутствующий в пептиде. Примесь аналога GLP-2 аспартамида³ включает образование аспартимида во время связывания Asp³. Примесь аналога GLP-2 Asp³³-OH включает С-концевой амидный гидролиз пептида. Примесь аналога GLP-2 Des-Ser⁷ содержит отсутствующий в пептиде Ser⁷. Примесь аналога GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] включает образование Fmoc-Gly(Tmb)-OH в процессе отщепления.

[00184] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо отдельной примеси в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5% или 4%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо отдельной примеси в концентрации более 1,5%.

[00185] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо примеси, содержащей аналог GLP-2 Des-Gly⁴ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо примеси аналога GLP-2 Des-Gly⁴ в концентрации более 3%.

[00186] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо примеси, содержащей аналог GLP-2 β-Asp³ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 β-Asp³ в концентрации более 1,5%. В некоторых вариантах осуществления натриевая соль пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 β-Asp³ в концентрации более 1%.

[00187] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит какой-либо примеси, содержащей аналог GLP-2 D-His в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 D-His в концентрации более 1,5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 D-His в концентрации более 1%.

[00188] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей: сумму примесей аналога GLP-2 аспартимида³, Asp³³-OH и Des-Ser⁷ в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не

содержит суммы примесей аналога GLP-2 аспартимида³, Asp³³-ОН и Des-Ser⁷ в концентрации более 2%.

[00189] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей: аналог GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси аналога GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 2%.

[00190] В некоторых вариантах осуществления пептид-аналог GLP-2 не содержит примеси, содержащей: аналог GLP-2 Des-Gly⁴, аналог GLP-2 аспартимид³, аналог GLP-2 Asp³³-ОН, аналог GLP-2 Des-Ser⁷ или аналог GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, или 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, или 5%.

[00191] В некоторых вариантах осуществления пептид-аналог GLP-2 не содержит примеси, содержащей: пептид-аналог GLP-2 Des-Gly⁴, пептид-аналог GLP-2 аспартамид³, пептид-аналог GLP-2 Asp³³-ОН, пептид-аналог GLP-2 Des-Ser⁷ или пептид-аналог GLP-2 [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] в концентрации более 0,5%.

[00192] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит общего количества примесей в концентрации более 1%, 3%, 5% или 7%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит общего количества примесей в концентрации более 5%.

[00193] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей ацетат, в концентрации более 1%, 2%, 3%, 4% или 5%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит ацетат в концентрации более 5%.

[00194] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей трифторуксусную кислоту, в концентрации более 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,07%, 0,1%, 0,2%, 0,5% или 1%. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит трифторуксусную кислоту в концентрации более 0,1%.

[00195] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 содержит примесь, содержащую ацетонитрил, в количестве менее 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 400, 300, 200 или 100 ч/млн. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 содержит ацетонитрил в количестве менее 450 ч/млн.

[00196] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей бактериальные эндотоксины, в концентрации более 0,1,

0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ЕЭ/мг. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит бактериальные эндотоксины в концентрации более 5,0 ЕЭ/мг.

[00197] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей аэробные микроорганизмы, в концентрации более 1, 10, 50, 100, 150 или 200 КОЕ/0,1 г. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит аэробные микроорганизмы в концентрации более 100 КОЕ/0,1 г.

[00198] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примеси, содержащей дрожжи и плесень, в общей концентрации более 0,1, 1, 5, 10, 15 или 20 КОЕ/0,1 г. В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит дрожжи и плесень в общей концентрации более 10 КОЕ/0,1 г.

[00199] В некоторых вариантах осуществления композиция пептида-аналога GLP-2 не содержит примесей, содержащих ацетат, трифторуксусную кислоту, ацетонитрил, бактериальные эндотоксины, аэробные микробы, дрожжи, плесень или любую их комбинацию.

[00200] После синтеза активный фармацевтический ингредиент (АФИ) апраглутид лиофилизируют и затем изготавливают в форме лекарственного препарата.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

[00201] Агонисты GLP-2 по настоящему описанию могут применяться отдельно в качестве лекарственного вещества или в фармацевтической композиции, содержащей один или более агонистов GLP-2 в качестве активного(-ых) ингредиента(-ов) и фармацевтически приемлемого адъюванта, вспомогательного вещества, разбавителя или носителя. Фармацевтические композиции также могут содержать другие активные ингредиенты.

[00202] Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают в себя те, которые обычно применяются с лекарственными средствами на основе пептидов. В отношении общего руководства по приготовлению лекарственных форм см., например, «Remington: The Science and Practice of Pharmacy», 22nd ed., Pharmaceutical Press, Philadelphia, PA, 2012. Не имеющие ограничительного характера примеры приемлемых вспомогательных веществ включают в себя глицин, L-гистидин, маннит и любую их комбинацию.

[00203] В предпочтительной лекарственной форме применяют глицин в качестве буферного агента. L-гистидин применяют в данной лекарственной форме в качестве физически стабилизирующего агента. L-гистидин также служит в качестве буфера, поддерживая целевой pH. Маннит применяют в данной лекарственной форме в качестве объемообразующего агента на стадии процесса лиофилизации. Вода для инъекции представляет собой растворитель данной лекарственной формы; воду для инъекции удаляют во время стадии лиофилизации. Гидроксид натрия применяют для доведения pH. Измеряют pH, который может быть доведен до $8,30 \pm 0,10$ с помощью раствора гидроксида натрия (NaOH).

[00204] В настоящем описании предложен устойчивый и воспроизводимый цикл лиофилизации для производства лекарственного препарата. С применением того же укупорочного элемента, который предназначался для применения при изготовлении клинической серии, были заполнены две установочные серии в уменьшенном масштабе. Цикл лиофилизации был оптимизирован для первичной сушки (первичный цикл сушки), чтобы определить процесс, который будет реализован в клиническом производстве лекарственного препарата. В результате оптимизированного цикла лиофилизации был получен лекарственный препарат с ожидаемыми характеристиками качества (т. е. анализ, уровни чистоты и примесей, время восстановления и содержание влаги), что было сочтено подходящим для клинической серии лекарственного препарата. Исследование стабильности, проведенное на второй установочной серии в уменьшенном масштабе, показало, что лекарственный препарат оставался неизменным при предполагаемой температуре хранения (от 2 до 8 °C) до 3 месяцев.

[00205] В некоторых аспектах композиция апраглутида для инъекции и восстановленного раствора, представленная в таблице 3, представляет собой иллюстративную композицию, которая может быть получена способами по настоящему описанию.

Таблица 3

Название ингредиента	Ссылка	Функция	Количество	
			Апраглутид для инъекций (мг/мл)	Восстановленный раствор (мг/мл)
Апраглутид	Внутрилабораторный	Лекарственное вещество	12,5 ^a	25
Глицин	Евр. Фарм. / Фарм.США	Буферный агент	1,88	3,75
L-гистидин	Евр. Фарм. / Фарм.США	Стабилизирующий агент	3,88	7,75
Маннит	Евр. Фарм. / Фарм.США	Наполнитель	57,5	115,0

Гидроксид натрия	Евр. Фарм. / Фарм.США	Доведение pH	q.s. до pH 8,3	--
Вода для инъекций (WFI) ^b	Евр. Фарм. / Фарм.США	Растворитель	1,25 мл	--
Азот ^b	NF	Инертная накладка	--	--
Стерильная вода для инъекций	Евр. Фарм. / Фарм.США	Восстановительный разбавитель	--	0,5 мл

^aКоличество применяемого лекарственного вещества рассчитывают на основе содержания апраглутида в соответствующей серии лекарственного вещества.

^bКомпоненты, применяемые при производстве лекарственного препарата, которых нет в готовом продукте.

[00206] В некоторых вариантах осуществления композиция апраглутида может включать в себя вспомогательные вещества, содержащие глицин, L-гистидин, маннит, воду для инъекций (WFI), стерильную воду для инъекций (sWFI), гидроксид натрия, сахарозу или любую их комбинацию.

[00207] В одном аспекте настоящего описания предложена фармацевтическая композиция, содержащая апраглутид по настоящему описанию, глицин, L-гистидин и маннит, растворенные в воде, причем концентрация апраглутида составляет 25 мг/мл, концентрация глицина составляет 3,75 мг/мл, концентрация L-гистидина составляет 7,75 мг/мл воды и концентрация маннита составляет 115,0 мг/мл. В некоторых аспектах объем воды может составлять 0,5 мл. В некоторых аспектах предыдущая фармацевтическая композиция может дополнительно содержать гидроксид натрия в таком количестве, что pH раствора составляет около pH 8,3.

[00208] В некоторых аспектах осмолярность фармацевтической композиции по настоящему описанию составляет от 290 до 780 мОсмоль/кг. В некоторых аспектах осмолярность фармацевтической композиции по настоящему описанию составляет около 780 мОсмоль/кг. В некоторых аспектах осмолярность фармацевтической композиции по настоящему описанию составляет около 780 ± 160 мОсмоль/кг.

[00209] Композиция пептида-аналога GLP-2 для инъекций может представлять собой асептически изготовленный лиофилизированный порошок для раствора для инъекций. Он может быть представлен в бесцветном стеклянном флаконе, приемлемом для лиофилизированного стерильного лекарственного препарата, закрытом резиновой пробкой и укупоренном алюминиевой крышкой. Перед введением пептид-аналог GLP-2 для инъекций может быть растворен в 0,5 мл стерильной воды для инъекции (sWFI). Восстановленный раствор можно вводить подкожно.

ВВЕДЕНИЕ

[00210] В некоторых вариантах осуществления агонисты GLP-2, например апраглутид, вводят парентерально, например путем инъекции. Лекарственные формы, приемлемые для парентерального введения, включают в себя водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать в себя суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Жидкие носители для инъекционных растворов включают в себя, в качестве примера и без ограничений, воду, солевой раствор, водный раствор декстрозы и гликоли.

[00211] В некоторых аспектах апраглутид вводят с помощью двухкамерного шприца или инжектора с двойным картриджем. Один пример такого шприца описан в РСТ/ЕР2012/000787, содержание которого включено в настоящий документ путем ссылки.

ДОЗИРОВКА

[00212] Количества, которые составляют эффективную дозу, могут зависеть от различных факторов, таких как заболевание и клиническое состояние пациента (например, вес) и путь введения. Дозы можно вводить, например, два раза в сутки, один раз в сутки, два раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, один или два раза в месяц и т. д. Дозы по существу находятся в диапазоне от около 1 мг до около 10 мг в неделю в течение периода от около 1 недели до около 100 недель. В некоторых вариантах осуществления еженедельная доза составляет от около 1 мг до 10 мг. В некоторых вариантах осуществления субъекты получают дозы от около 1 недели до около 100 недель, от около 1 недели до около 80 недель, от около 1 недели до около 60 недель, от около 1 недели до около 48 недель, от около 2 недель до около 24 недель, от около 2 недель до около 20 недель или от около 2 недель до около 16 недель. В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят дозу около одного раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят дозу около одного раза каждые две недели или около двух раз в месяц. Около одного раза каждые две недели или около двух раз в месяц.

[00213] Апраглутид увеличивает уровни цитруллина в зависимости от дозы. Цитруллин представляет собой маркер массы энтероцитов тонкой кишки. Дозировка апраглутида

1 мг, 5 мг и 10 мг вызывает длительное повышение концентрации цитруллина у пациентов.

[00214] В некоторых вариантах осуществления апраглутид вводят парентерально (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или перорально). В некоторых вариантах осуществления апраглутид вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления апраглутид вводят подкожно.

[00215] Из-за нелинейного увеличения площади под фармакокинетической кривой (AUC и C_{max}) по мере снижения массы тела желательнее назначать пациентам с массой тела менее 50 кг дозу 2,5 мг для предотвращения высокой концентрации. Пациенты с весом 50 кг или более могут получать дозы 5 мг и более.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

[00216] В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, нуждается в меньшей питательной поддержке по сравнению с контролем. Например, в некоторых вариантах осуществления субъекту, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, требуется по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% меньше питательной поддержки по сравнению с контролем. В одном варианте осуществления субъект, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, нуждается в на 100% меньшей питательной поддержке по сравнению с контролем (т. е. энтеральная автономия).

[00217] В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, нуждается в полной парентеральной поддержке в течение меньшего числа суток по сравнению с контролем. Например, в некоторых вариантах осуществления введение эффективной дозы агониста GLP-2 может уменьшать продолжительность времени, в течение которого требуется общая парентеральная поддержка, составляющая по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% по сравнению с контролем. В одном варианте осуществления введение эффективной дозы агониста GLP-2 уменьшает продолжительность времени, в течение которого требуется 100% общей парентеральной поддержки по сравнению с

контролем (т.е. энтеральная автономия). В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, нуждается в полной парентеральной поддержке менее 85 суток в год, менее 80 суток в год, менее 75 суток в год, менее 70 суток в год, менее 65 суток в год, менее 60 суток в год, менее 55 суток в год, менее 50 суток в год, менее 45 суток в год, менее 40 суток в год, менее 35 суток в год, менее 30 суток в год, менее 25 суток в год, менее 20 суток в год, менее 15 суток в год, менее 10 суток в год или менее 5 суток в год.

[00218] В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, не нуждается в полном парентеральном питании после лечения.

[00219] В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие апраглутид, включают в себя субъектов мужского пола и женского пола с кишечной недостаточностью, ассоциированной с синдромом короткой кишки (SBS-IF), получающих парентеральную поддержку, вторичную относительно хирургической резекции тонкой кишки, либо:

- a. с дальнейшим нарушением целостности толстой кишки (CIC) и без стомы (тонкая кишка < 200 см от двенадцатиперстно-тощекишечного изгиба, на основе имеющихся медицинских/хирургических записей) с последней резекцией кишечника, выполненной по меньшей мере за 12 месяцев до скрининга; ИЛИ
- b. энюстомией или илеостомией (< 200 см от двенадцатиперстно-тощекишечного изгиба, на основе имеющихся медицинских/хирургических записей) с последней резекцией кишечника, выполненной по меньшей мере за 6 месяцев до скрининга.

[00220] В некоторых вариантах осуществления введение эффективной дозы агониста GLP-2 приводит к снижению продолжительности пребывания на стационаре по сравнению с контролем. Например, в некоторых вариантах осуществления введение эффективной дозы агониста GLP-2 может уменьшать продолжительность времени пребывания на стационаре по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% по сравнению с контролем. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят эффективную дозу агониста GLP-2, пребывает на стационаре в течение менее 50 суток, менее 45 суток, менее 40 суток, менее 35 суток, менее 30 суток, менее 25 суток, менее 20 суток, менее 15 суток, менее 10 суток или менее 5 суток.

[00221] В некоторых вариантах осуществления введение эффективной дозы агониста GLP-2 популяции субъектов снижает уровень смертности по сравнению с популяцией субъектов, получающих стандартное лечение (например, хирургическое лечение, пищевую поддержку и уход за ранами), которое не включает введение эффективной дозы агониста GLP-2. Например, в некоторых вариантах осуществления уровень смертности снижается до менее 15%, менее 12%, менее 10%, менее 8%, менее 5%, менее 3%, менее 2% или менее 1%. П/к инъекцию, как правило, делают в брюшную полость или в бедро. Место инъекции следует менять таким образом, чтобы инъекция вводилась на расстоянии по меньшей мере 5 см от места введения последней инъекции.

[00222] Считается, что апраглутид может демонстрировать клиническую эффективность (уменьшение объема PS) у субъектов с SBS-IF либо с CIC, либо со стомой через 24 недели дозирования один раз в неделю. Соответственно, в одном варианте осуществления разовая доза 2,5 мг (для субъектов с массой тела менее 50 кг на момент последнего визита в рамках исследования) или доза 5 мг (для субъектов с массой тела 50 кг или более на момент последнего визита в рамках исследования) апраглутида или соответствующего плацебо будет вводиться путем подкожной (п/к) инъекции один раз в неделю в течение периода лечения 24 недели (стома) или 48 недель (CIC).

[00223] Апраглутид продемонстрировал превосходное воздействие на поглощение энергии при менее частом приеме (например, один раз в неделю) по сравнению с другими аналогами GLP-2. При дозе 5 мг один раз в неделю апраглутид вызывал изменение объема мочи на 140,1% (+ 15,8) по сравнению с исходным уровнем, изменение исходного уровня абсорбции сырой массы на 760,4 г/сутки (+ 236,1) и изменение исходного уровня абсорбции энергии на 1074 кДж/сутки (+ 377).

[00224] Апраглутид способствовал увеличению абсолютного объема выделяемой мочи на скорректированное среднее значение 711 мл/сутки (95% ДИ от 132 до 1289; $P = 0,021$) по сравнению с плацебо, что соответствует ежедневному увеличению на 48% (95% ДИ от 12 до 84; $P = 0,014$), как показано в таблице 9. Апраглутид способствовал увеличению абсолютного объема выделяемой мочи на скорректированное среднее значение 714 мл/сутки (95% ДИ от 490 до 939; $P = 0,002$), что соответствует ежедневному увеличению на 49% (95% ДИ от 4 до 94; $P = 0,041$), как показано в таблице 10. Лечение апраглутидом в дозе 10 мг способствовало увеличению выделения абсолютного объема мочи на скорректированное среднее значение 795 мл (95% ДИ от 195 до 1394; $P = 0,014$) по сравнению с плацебо. Соответствующее изменение выделения относительного объема выработанной мочи составило 34% (95% ДИ от -4 до 71; $P = 0,072$).

[00225] Апраглутид увеличивал выделение натрия с мочой по сравнению с плацебо на скорректированное среднее значение 56 ммоль/сутки (95% ДИ от -10 до 123; $P = 0,087$), как показано в таблице 9. 5 мг апраглутида увеличивали выделение натрия с мочой по сравнению с плацебо на скорректированное среднее значение 66 ммоль/сутки (95% ДИ от -69 до 201; $P = 0,171$), как показано в таблице 10. В группе с дозой 10 мг абсолютное выделение натрия с мочой увеличилось на скорректированное среднее значение 88 ммоль/сутки (95% ДИ от 20 до 156; $P = 0,017$) по сравнению с плацебо, как показано в таблице 9.

[00226] Апраглутид увеличивал абсорбцию энергии в кишечнике на 1095 кДж/сутки (95% ДИ от 196 до 1994; $P = 0,024$), как показано в таблице 19.

[00227] Напротив, тедуглутид, при приеме один раз в сутки, вызывал увеличение выделения с мочой на 139,3% по сравнению с исходным уровнем, изменение исходного уровня абсорбции сырой массы на 743 г/сутки (+ 119,25) и изменение исходного уровня абсорбции энергии на 792 кДж/сутки (+570), по сообщениям Jeppesen, Gut, 54, pp. 1224–1231 (2005).

[00228] Аналогично, напротив, глепаглутид, при приеме один раз в сутки, вызывал увеличение объема выделяемой мочи на 111 % (доза 0,1 мг), 140% (доза 1,0 мг) или 132% (доза 10 мг) по сравнению с исходным уровнем, изменение исходного уровня абсорбции сырой массы на - 211 г/сутки (доза 0,1 мг), 650 г/сутки (доза 1,0 мг) или 786 г/сутки (доза 10 мг) и изменение исходного уровня абсорбции энергии на - 377 кДж/сутки (доза 0,1 мг), 435 кДж/сутки (доза 1,0 мг) или 588 кДж/сутки (доза 10 мг), по сообщениям Maimi, Lancet Gastroenterol Hepatol, 4, pp. 354–363 (2019).

[00229] Любое применение гормона роста, глутамина или факторов роста, таких как нативные GLP-2, GLP-1 или аналоги GLP-2, GLP-1, кроме IMP, должно быть прекращено за 12 месяцев (субъекты с CIC) и за 6 месяцев (субъекты со стомой) до начала приема апраглутида.

[00230] В некоторых вариантах осуществления введение эффективной дозы агониста GLP-2 популяции субъектов снижает уровень заболеваемости по сравнению с популяцией субъектов, получающих стандартное лечение (например, хирургическое лечение, пищевую поддержку и уход за ранами), которое не включает введение эффективной дозы агониста GLP-2. Например, в некоторых вариантах осуществления частота заболеваемости снижается до менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или менее 10%.

[00231] В некоторых вариантах осуществления апраглутид применяют для восстановления послеоперационной автономии кишечника или для лечения кожно-кишечных свищей. В некоторых вариантах осуществления апраглутид применяют для лечения несостоятельности анастомоза, функциональной кишечной недостаточности, кишечной недостаточности, некротизирующего энтероколита, реакции «трансплантат против хозяина», болезни Крона или глютеновой болезни.

[00232] В настоящем описании предложен способ лечения синдрома короткой кишки у пациента, включающий введение по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию.

[00233] В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения при лечении синдрома короткой кишки у субъекта, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00234] В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для производства лекарственного средства для лечения синдрома короткой кишки у субъекта, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00235] В настоящем описании предложен способ повышения кишечной абсорбции сырой массы у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе повышения кишечной абсорбции сырой массы у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для повышения кишечной абсорбции сырой массы у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00236] В некоторых аспектах увеличение кишечной абсорбции сырой массы может составлять по меньшей мере около 100 г/сутки, или по меньшей мере около 200 г/сутки, или по меньшей мере около 300 г/сутки, или по меньшей мере около 400 г/сутки, или по

меньшей мере около 500 г/сутки, или по меньшей мере около 600 г/сутки, или по меньшей мере около 700 г/сутки, или по меньшей мере около 800 г/сутки, или по меньшей мере около 900 г/сутки, или по меньшей мере около 1000 г/сутки.

[00237] В настоящем описании предложен способ снижения массы выделяемого кала у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества пептидной композиции аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложен способ снижения массы выделяемого кала у субъекта со стомой, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе снижения массы выделяемого кала у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения пациенту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для снижения массы выделяемого кала у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00238] В некоторых аспектах снижения массы выделяемого кала у субъекта может составлять по меньшей мере около 100 г/сутки, или по меньшей мере около 200 г/сутки, или по меньшей мере около 300 г/сутки, или по меньшей мере около 400 г/сутки, или по меньшей мере около 500 г/сутки, или по меньшей мере около 600 г/сутки, или по меньшей мере около 700 г/сутки, или по меньшей мере около 800 г/сутки, или по меньшей мере около 900 г/сутки, или по меньшей мере около 1000 г/сутки.

[00239] В настоящем описании предложен способ увеличения объема вырабатываемой мочи у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе увеличения объема вырабатываемой мочи у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для увеличения

объема вырабатываемой мочи у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00240] В некоторых аспектах увеличения объема вырабатываемой мочи может составлять по меньшей мере около 100 г/сутки, или по меньшей мере около 200 г/сутки, или по меньшей мере около 300 г/сутки, или по меньшей мере около 400 г/сутки, или по меньшей мере около 500 г/сутки, или по меньшей мере около 600 г/сутки, или по меньшей мере около 700 г/сутки, или по меньшей мере около 800 г/сутки, или по меньшей мере около 900 г/сутки, или по меньшей мере около 1000 г/сутки.

[00241] В настоящем описании предложен способ повышения абсорбции натрия и/или калия у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе повышения абсорбции натрия и/или калия у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для повышения абсорбции натрия и/или калия у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00242] В некоторых аспектах увеличение абсорбции натрия и/или калия может составлять по меньшей мере около 5 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 10 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 15 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 20 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 25 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 30 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 35 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 40 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 45 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 50 ммоль/сутки.

[00243] В настоящем описании предложен способ повышения экскреции натрия и/или калия с мочой у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе повышения экскреции натрия и/или калия с мочой у субъекта с синдромом короткой кишки, причем

композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для повышения экскреции натрия и/или калия с мочой у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00244] В некоторых аспектах увеличение экскреции натрия и/или калия с мочой может составлять по меньшей мере около 5 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 10 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 15 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 20 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 25 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 30 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 35 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 40 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 45 ммоль/сутки, или по меньшей мере около 50 ммоль/сутки.

[00245] В настоящем описании предложен способ повышения кишечной абсорбции энергии у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе повышения кишечной абсорбции энергии у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для повышения кишечной абсорбции энергии у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00246] В некоторых аспектах увеличение кишечной абсорбции энергии может составлять по меньшей мере около 500 кДж/сутки, или по меньшей мере около 600 кДж/сутки, или по меньшей мере около 700 кДж/сутки, или по меньшей мере около 800 кДж/сутки, или по меньшей мере около 900 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1000 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1100 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1200 кДж/сутки.

[00247] В настоящем описании предложен способ снижения потери энергии с выделяемым калом у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества пептидной

композиции аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе снижения потери энергии с выделяемым калом у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для снижения потери энергии с выделяемым калом у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00248] В некоторых аспектах снижение потери энергии с выделяемым калом может составлять по меньшей мере около 500 кДж/сутки, или по меньшей мере около 600 кДж/сутки, или по меньшей мере около 700 кДж/сутки, или по меньшей мере около 800 кДж/сутки, или по меньшей мере около 900 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1000 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1100 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1200 кДж/сутки.

[00249] В настоящем описании предложен способ повышения абсорбции углеводов и/или липидов у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе повышения абсорбции углеводов и/или липидов у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для повышения абсорбции углеводов и/или липидов у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00250] В некоторых аспектах повышения абсорбции углеводов и/или липидов может составлять по меньшей мере около 100 кДж/сутки, или по меньшей мере около 200 кДж/сутки, или по меньшей мере около 300 кДж/сутки, или по меньшей мере около 400 кДж/сутки, или по меньшей мере около 500 кДж/сутки, или по меньшей мере около 600 кДж/сутки, или по меньшей мере около 700 кДж/сутки, или по меньшей мере около 800 кДж/сутки, или по меньшей мере около 900 кДж/сутки, или по меньшей мере около

1000 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1100 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1200 кДж/сутки.

[00251] В настоящем описании предложен способ повышения абсорбции белка у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе абсорбции белка у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для абсорбции белка у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00252] В некоторых аспектах увеличение абсорбции белка может составлять по меньшей мере около 100 кДж/сутки, или по меньшей мере около 200 кДж/сутки, или по меньшей мере около 300 кДж/сутки, или по меньшей мере около 400 кДж/сутки, или по меньшей мере около 500 кДж/сутки, или по меньшей мере около 600 кДж/сутки, или по меньшей мере около 700 кДж/сутки, или по меньшей мере около 800 кДж/сутки, или по меньшей мере около 900 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1000 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1100 кДж/сутки, или по меньшей мере около 1200 кДж/сутки.

[00253] В настоящем описании предложен способ увеличения массы тела у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе увеличения массы тела у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для увеличения массы тела у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00254] В некоторых аспектах увеличение массы тела может составлять по меньшей мере около 0,5 кг, или по меньшей мере около 1,0 кг, или по меньшей мере около 1,5 кг, или по меньшей мере около 2,0 кг, или по меньшей мере около 2,5 кг, или по меньшей мере около 3,0 кг, или по меньшей мере около 3,5 кг, или по меньшей мере около 4,0 кг, или по меньшей мере около 4,5 кг, или по меньшей мере около 5,0 кг.

[00255] В настоящем описании предложен способ увеличения безжировой массы тела у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе увеличения безжировой массы тела у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для увеличения безжировой массы тела у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00256] В некоторых аспектах увеличения безжировой массы тела может составлять по меньшей мере около 0,5 кг, или по меньшей мере около 1,0 кг, или по меньшей мере около 1,5 кг, или по меньшей мере около 2,0 кг, или по меньшей мере около 2,5 кг, или по меньшей мере около 3,0 кг, или по меньшей мере около 3,5 кг, или по меньшей мере около 4,0 кг, или по меньшей мере около 4,5 кг, или по меньшей мере около 5,0 кг.

[00257] В настоящем описании предложен способ снижения жировой массы у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества пептидной композиции аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе снижения жировой массы у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для снижения жировой массы у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию

предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00258] В некоторых аспектах снижения жировой массы может составлять по меньшей мере около 0,5 кг, или по меньшей мере около 1,0 кг, или по меньшей мере около 1,5 кг, или по меньшей мере около 2,0 кг, или по меньшей мере около 2,5 кг, или по меньшей мере около 3,0 кг, или по меньшей мере около 3,5 кг, или по меньшей мере около 4,0 кг, или по меньшей мере около 4,5 кг, или по меньшей мере около 5,0 кг.

[00259] В настоящем описании предложен способ повышения концентрации L-цитруллина в плазме у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе повышения концентрации L-цитруллина в плазме у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для повышения концентрации L-цитруллина в плазме у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00260] В некоторых аспектах повышение концентрации L-цитруллина в плазме может составлять по меньшей мере около 5 мкмоль/л, или по меньшей мере около 10 мкмоль/л, или по меньшей мере около 15 мкмоль/л, или по меньшей мере около 20 мкмоль/л.

[00261] В настоящем описании предложен способ увеличения объема выделяемой мочи у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества пептидной композиции аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе увеличения объема выделяемой мочи у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для увеличения объема выделяемой мочи у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-

2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00262] В некоторых аспектах увеличение объема выделяемой мочи может составлять по меньшей мере около 400 мл/сутки, или по меньшей мере около 500 мл/сутки, или по меньшей мере около 600 мл/сутки, или по меньшей мере около 700 мл/сутки, или по меньшей мере около 800 мл/сутки, или по меньшей мере около 900 мл/сутки, или по меньшей мере около 1000 мл/сутки.

[00263] В настоящем описании предложен способ уменьшения перорального потребления жидкости у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества пептидной композиции аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе уменьшение перорального потребления жидкости субъектом с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для уменьшение перорального потребления жидкости субъектом с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00264] В некоторых аспектах уменьшение перорального потребления жидкости может составлять по меньшей мере около 400 мл/сутки, или по меньшей мере около 500 мл/сутки, или по меньшей мере около 600 мл/сутки, или по меньшей мере около 700 мл/сутки, или по меньшей мере около 800 мл/сутки, или по меньшей мере около 900 мл/сутки, или по меньшей мере около 1000 мл/сутки.

[00265] В настоящем описании предложен способ снижения объема парентеральной поддержки у субъекта с синдромом короткой кишки, включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе снижения объема парентеральной поддержки у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для снижения объема

парентеральной поддержки у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00266] В некоторых аспектах снижение объема парентеральной поддержки может составлять по меньшей мере около 400 мл/сутки, или по меньшей мере около 500 мл/сутки, или по меньшей мере около 600 мл/сутки, или по меньшей мере около 700 мл/сутки, или по меньшей мере около 800 мл/сутки, или по меньшей мере около 900 мл/сутки, или по меньшей мере около 1000 мл/сутки.

[00267] В настоящем изобретении предложен способ снижения концентрации альдостерона в плазме у субъекта с синдромом короткой кишки включающий введение субъекту по меньшей мере одного терапевтически эффективного количества композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в способе снижения концентрации альдостерона в плазме у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве. В настоящем описании предложена композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию для применения в производстве лекарственного средства для снижения концентрации альдостерона в плазме у субъекта с синдромом короткой кишки, причем композиция пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию предназначена для введения субъекту по меньшей мере в одном терапевтически эффективном количестве.

[00268] В некоторых аспектах снижение концентрации альдостерона в плазме может составлять по меньшей мере около 500 пмоль/л, или по меньшей мере около 750 пмоль/л, или по меньшей мере около 1000 пмоль/л, или по меньшей мере около 1250 пмоль/л, или по меньшей мере около 1500 пмоль/л, или по меньшей мере около 1750 пмоль/л, или по меньшей мере около 2000 пмоль/л, или по меньшей мере около 2250 пмоль/л, или по меньшей мере около 2500 пмоль/л, или по меньшей мере около 2750 пмоль/л, или по меньшей мере около 3000 пмоль/л.

[00269] В некоторых аспектах предыдущих способов увеличение может представлять собой увеличение на по меньшей мере около 5%, или по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 15%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 25%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 35%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 45%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 55%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 65%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 75%, или по

меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 99% по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых аспектах контрольный уровень представляет собой количество перед введением композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию.

[00270] В некоторых аспектах предыдущих способов снижение может представлять собой снижение на по меньшей мере около 5%, или по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 15%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 25%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 35%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 45%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 55%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 65%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 75%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 99% по сравнению с контрольным уровнем. В некоторых аспектах контрольный уровень представляет собой количество перед введением композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию.

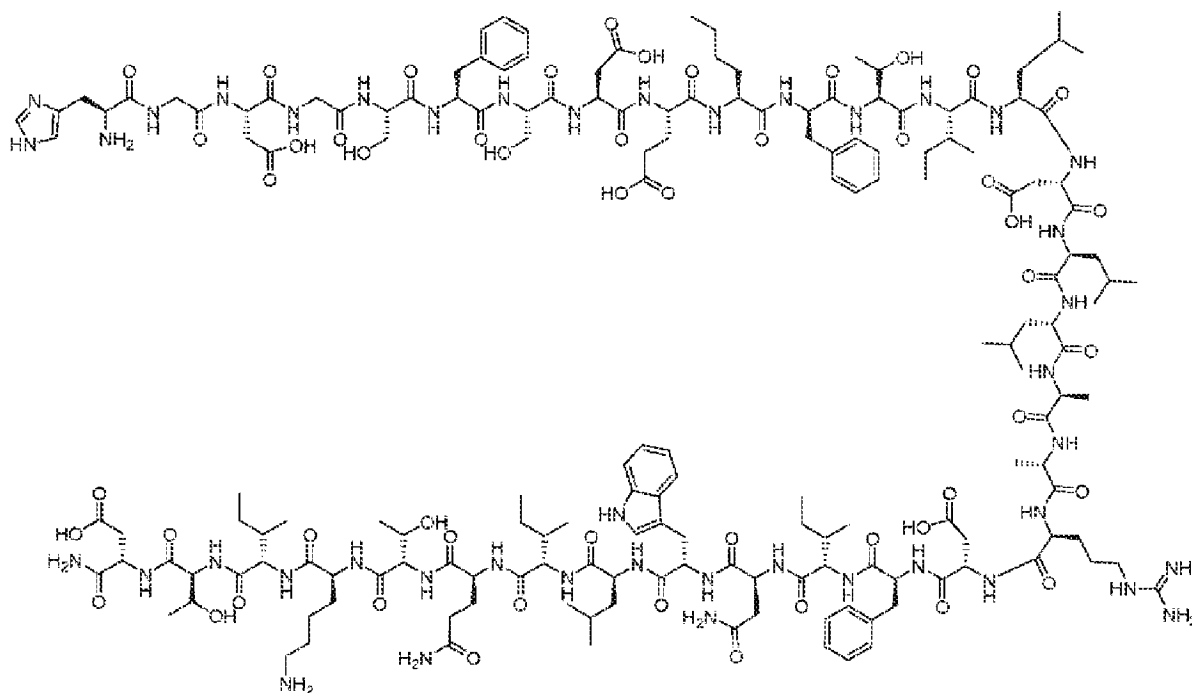
[00271] В некоторых аспектах приведенное увеличение или снижение по предшествующим способам происходит после по меньшей мере около четырех недель применения композиции пептида-аналога GLP-2 по настоящему описанию.

[00272] В некоторых аспектах синдром короткой кишки может представлять собой синдром короткой кишки с кишечной недостаточностью (SBS-II). В некоторых аспектах синдром короткой кишки может представлять собой синдром короткой кишки с кишечным расстройством.

[00273] Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в него путем ссылки.

[00274] Иллюстративные варианты осуществления

[00275] Вариант осуществления 1. Композиция, содержащая натриевую соль апраглутида, в которой натриевая соль апраглутида имеет чистоту не менее 95%, причем апраглутид имеет следующую структуру:



[00276] Вариант осуществления 2. Композиция по варианту осуществления 1, в которой натриевая соль апраглутида имеет чистоту не менее 97%.

[00277] Вариант осуществления 3. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 3% примеси Des-Gly⁴ апраглутида.

[00278] Вариант осуществления 4. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, в которой сумма примесей аспартимида³ апраглутида, Asp³³-ОН апраглутида и Des-Ser⁷ апраглутида в композиции составляет не более 2%.

[00279] Вариант осуществления 5. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 2% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

[00280] Вариант осуществления 6. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 1,5% примеси β-Asp³ апраглутида.

[00281] Вариант осуществления 7. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 1% примеси β-Asp³ апраглутида.

[00282] Вариант осуществления 8. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 1% примеси D-His апраглутида.

[00283] Вариант осуществления 9. Композиция по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, содержащая:

не более 1% примеси Asp³³-ОН апраглутида,

не более 1% примеси Des-Ser⁷ апраглутида,

не более 1% примеси D-аспартамид³ апраглутида,

не более 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида, и причем сумма примесей Des-Gly⁴ апраглутида и аспартимида³ апраглутида в композиции составляет не более 1%.

[00284] Вариант осуществления 10. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, в которой натриевая соль апраглутида предложена в виде лиофилизированного порошка.

[00285] Вариант осуществления 11. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому одному из предшествующих вариантов осуществления.

[00286] Вариант осуществления 12. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 11, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из глицина, L-гистидина или маннита.

[00287] Вариант осуществления 13. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 10, которая содержит:

около 12,5 мг апраглутида (натриевая соль);

около 1,88 мг глицина;

около 3,88 мг L-гистидина;

около 57,5 мг маннита.

[00288] Вариант осуществления 14. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 12, которая предложена в виде лиофилизированного порошка.

[00289] Вариант осуществления 15. Двухкамерный шприц для порошка, содержащий композицию по любому одному из вариантов осуществления 1–10 или фармацевтическую композицию по любому одному из вариантов осуществления 11–14.

[00290] Вариант осуществления 16. Способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий:

а) проведение твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) для синтеза пептида-аналога GLP-2 на смоле Fmoc-Rink-амид-метил-бензгидроамида (MBHA);

б) отщепление синтезированного пептида-аналога GLP-2 от смолы и снятие защиты с боковых цепей синтезированного пептида-аналога GLP-2 путем обработки смолы раствором, содержащим трифторуксусную кислоту (TFA), воду и анизол;

с) очистку синтезированного пептида-аналога GLP-2 стадии (б) путем проведения первой очистки препаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ-ВЭЖХ) с применением подвижных фаз на основе TFA с

последующим получением раствора, содержащего пептид-аналог GLP-2 с чистотой не менее 90%;

d) очистку продукта стадии (с) путем проведения второй очистки ОФ-ВЭЖХ с применением подвижных фаз на основе NaHCO_3 с последующим получением раствора, содержащего пептид-аналог GLP-2 с чистотой не менее 97%.

[00291] Вариант осуществления 17. Способ по варианту осуществления 16, дополнительно включающий:

e) дополнительную очистку продукта стадии (d) путем проведения третьей очистки ОФ-ВЭЖХ с применением подвижных фаз на основе NaOAc с последующим получением раствора, содержащего натриевую соль пептида-аналога GLP-2 с чистотой не менее 97%.

[00292] Вариант осуществления 18. Способ по варианту осуществления 17, дополнительно включающий:

f) доведение pH раствора, содержащего натриевую соль пептида-аналога GLP-2, до около pH 7,9 с применением 0,1% AcOH в воде;

g) пропускание продукта стадии (f) через фильтр с размером пор 0,2 мкм;

h) лиофилизацию продукта стадии (g) с получением лиофилизированной натриевой соли пептида-аналога GLP-2 с чистотой не менее 97%.

[00293] Вариант осуществления 19. Способ по варианту осуществления 16, дополнительно включающий:

[00294] c)(i) проведение декарбоксилирования синтезированного пептида-аналога GLP-2 путем солюбилизации пептида в растворе, содержащем воду и ацетонитрил в буфере аммиака.

[00295] Вариант осуществления 20. Способ по варианту осуществления 19, в котором pH раствора, содержащего воду и ацетонитрил в буфере аммиака, доводят до около pH 8,0.

[00296] Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 16–20, в котором стадия (a) включает:

i) получение смолы MBHA, на которой будет проводиться ТФПС;

ii) выполнение начальной реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания для добавления к смоле первой Fmoc-защищенной аминокислоты с образованием защищенного пептида на смоле;

iii) выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания для присоединения по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислоты к защищенному пептиду;

iv) повторение стадии iii до тех пор, пока пептид-аналог GLP-2 не будет синтезирован на смоле с получением Fmoc-защищенного и защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой;

v) выполнение реакции снятия защиты Fmoc для получения защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой; и

vi) сушку защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой.

[00297] Вариант осуществления 22. Способ по варианту осуществления 21, в котором стадия (a)(i) включает:

(a1) промывку смолы раствором, содержащим диметилформамид (DMF) и N,N-диизопропилэтиламин (DIEA) из расчета 5 мл раствора на грамм смолы в атмосфере N₂;

(b1) связывание амидного линкера Rink со смолой в растворе, содержащем гексафторфосфат 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония, Гексафторфосфат бензотриазолтетраметилуроний (HBTU), DIEA и гидроксibenзотриазол (HOBt) в DMF;

(c1) промывку продукта, образованного на стадии (b1), с помощью DMF;

(d1) выполнение реакции восстановления путем приведения смолы в контакт с раствором, содержащим уксусный ангидрид (Ac₂O) и DIEA в DMF; и

(e1) промывку продукта, образованного на стадии (d1), с помощью DMF.

[00298] Вариант осуществления 23. Способ по варианту осуществления 21 или варианту осуществления 22, в котором выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания включает:

(a2) обработку смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF;

(b2) промывку смолы DMF;

(c2) промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охума;

(d2) приведение смолы в контакт по меньшей мере с одной Fmoc-защищенной аминокислотой и первым количеством раствора, содержащего диизопропилкарбодиимид (DIC) и этилцианогидроксииминоацетат (Охума);

(e2) приведение смолы в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охума; и

(f2) промывку продукта, образованного на стадии (e2), с помощью DMF.

[00299] Вариант осуществления 24. Способ по варианту осуществления 23, в котором смолу приводят в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охума, через около 30 минут после приведения смолы в контакт с первым количеством раствора, содержащего DIC и Охума.

[00300] Вариант осуществления 25. Способ по варианту осуществления 21 или варианту осуществления 22, в котором выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания включает:

(a2) обработку смолы раствором, содержащим пиперидин и Охума в DMF;

(b2) промывку смолы DMF;

(c2) промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охума;

(d2) приведение смолы в контакт по меньшей мере с одной Fmoc-защищенной аминокислотой и первым количеством раствора, содержащего диизопропилкарбодиимид (DIC) и этилцианогидроксииминоацетат (Охума);

(e2) приведение смолы в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охума; и

(f2) промывку продукта, образованного на стадии (e2), с помощью DMF.

[00301] Вариант осуществления 26. Способ по варианту осуществления 25, в котором смолу приводят в контакт с первым количеством раствора, содержащего пиперидин и Охума, в DMF в течение 15 минут с последующим контактированием смолы со вторым количеством раствора, содержащего пиперидин и Охума, в DMF в течение 30 минут.

[00302] Вариант осуществления 27. Способ по любому одному из вариантов осуществления 23–26, в котором по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Fmoc-Gln(Trt)-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH.

[00303] Вариант осуществления 28. Способ по любому одному из вариантов осуществления 23–26, в котором по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Fmoc-Gly(Tmb)-OH.

[00304] Вариант осуществления 29. Способ по любому одному из вариантов осуществления 23–26, в котором по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Boc-His(Trt)-Gly-OH.

[00305] Вариант осуществления 30. Способ по любому одному из вариантов осуществления 23–29, в котором способ дополнительно включает между стадиями (e2) и (f2) выполнение испытания реакции связывания, причем испытание реакции связывания представляет собой тест Кайзера.

[00306] Вариант осуществления 31. Способы по любому из вариантов осуществления 16–30, в которых пептид-аналог GLP-2 представляет собой апраглутид.

[00307] Вариант осуществления 32. Композиция, содержащая пептид-аналог GLP-2, полученный способом по любому из вариантов осуществления 16–31.

[00308] Вариант осуществления 33. Способ лечения синдрома короткой кишки с кишечным расстройством (SBS-IF) или синдрома короткой кишки с кишечной

недостаточностью (SBS-II) у субъекта, включающий введение субъекту апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли,

причем апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе около 2,5 мг/неделю, когда субъект имеет массу тела менее 50 кг, или

причем апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе около 5 мг/неделю, когда субъект имеет массу тела более или равную 50 кг.

[00309] Вариант осуществления 34. Способ по варианту осуществления 33, в котором апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят путем подкожной инъекции.

[00310] Вариант осуществления 35. Способ по варианту осуществления 33 или варианту осуществления 34, в котором у субъекта имеется нарушение целостности толстой кишки, и причем апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в течение около 48 недель.

[00311] Вариант осуществления 36. Способ по варианту осуществления 35, в котором субъект имеет более 50% нарушения целостности толстой кишки.

[00312] Вариант осуществления 37. Способ по варианту осуществления 33 или варианту осуществления 34, в котором у субъекта имеется по меньшей мере одна стома, и причем апраглутид вводят в течение около 24 недель.

[00313] Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию сырой массы, потребляемой с пищей, у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00314] Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли снижает у субъекта объем выделяемого кала по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00315] Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает абсолютный объем выделяемой мочи у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00316] Вариант осуществления 41. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию натрия и калия у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00317] Вариант осуществления 42. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает экскрецию натрия и калия с мочой у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

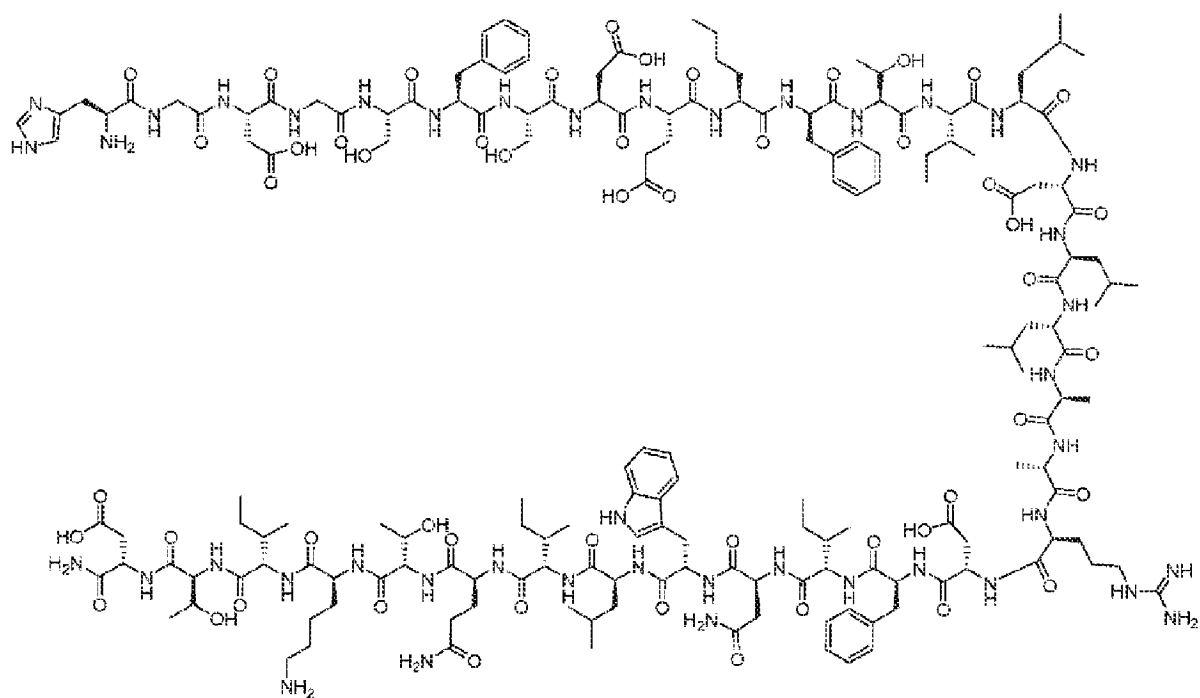
[00318] Вариант осуществления 43. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию энергии у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00319] Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли снижает у субъекта содержание энергии в выделяемом кале по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00320] Вариант осуществления 45. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию углеводов, белков и жиров у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00321] Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает концентрацию цитруллина у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

[00322] Вариант осуществления 47. Натриевая соль апраглутида, имеющая чистоту не менее 95%, причем апраглутид имеет следующую структуру:



[00323] Вариант осуществления 48. Натриевая соль апраглутида по варианту осуществления 47, которая имеет чистоту не менее 97%.

[00324] Вариант осуществления 49. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 3% примеси Des-Gly⁴ апраглутида.

[00325] Вариант осуществления 50. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, в которой сумма примесей аспартимида³ апраглутида, Asp³³-ОН апраглутида и Des-Ser⁷ апраглутида в натриевой соли апраглутида составляет не более 2%.

[00326] Вариант осуществления 51. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 2% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

[00327] Вариант осуществления 52. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 1,5% примеси β-Asp³ апраглутида.

[00328] Вариант осуществления 53. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 1% примеси β-Asp³ апраглутида.

[00329] Вариант осуществления 54. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит не более 1% примеси D-His апраглутида.

[00330] Вариант осуществления 55. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая содержит:

не более 1% примеси Asp³³-ОН апраглутида,

не более 1% примеси Des-Ser⁷ апраглутида,

не более 1% примеси D-аспартамид³ апраглутида,

[00331] не более 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида, и

[00332] причем сумма примесей Des-Gly⁴ апраглутида и аспартимида³ апраглутида в натриевой соли апраглутида составляет не более 1%.

[00333] Вариант осуществления 56. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, которая предложена в виде лиофилизированного порошка.

[00334] Вариант осуществления 57. Фармацевтическая композиция, содержащая натриевую соль апраглутида по любому одному из предшествующих вариантов осуществления.

[00335] Вариант осуществления 58. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 57, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из глицина, L-гистидина или маннита.

[00336] Вариант осуществления 59. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 58, которая содержит:

около 12,5 мг апраглутида (натриевая соль);

около 1,88 мг глицина;

около 3,88 мг L-гистидина;

около 57,5 мг маннита.

[00337] Вариант осуществления 60. Фармацевтическая композиция по любому одному из вариантов осуществления 57–59, которая предложена в виде лиофилизированного порошка.

[00338] Вариант осуществления 61. Двухкамерный шприц для порошка, содержащий композицию по любому одному из вариантов осуществления 47–56 или фармацевтическую композицию по любому одному из вариантов осуществления 57–60.

ПРИМЕРЫ

[00339] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области описание того, как композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть применены, получены и оценены, и предназначены только для иллюстрации изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что считается изобретением.

Пример 1. Процесс производства апраглутида (I)

Твердофазный пептидный синтез (стадия I)

[00340] Ниже приведен иллюстративный способ по настоящему изобретению производства апраглутида с повышенным уровнем чистоты по сравнению с ранее описанными путями синтеза (например, патент США № 8,580,918). ТФПС представляет

собой последовательный синтез пептидной цепи, закрепленной на твердом носителе, путем повторения цикла, включающего следующие стадии:

1. Удаление защитной группы Fmoc N-конца пептидной смолы
2. Промывки DMF
3. Связывания Fmoc-AA-OH
4. Испытание реакции связывания
5. Промывки DMF

[00341] Этот цикл повторяется до тех пор, пока пептидная последовательность не будет завершена.

[00342] α -Аминогруппы аминокислот защищены чувствительной к основаниям 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой; функциональные группы боковой цепи защищены кислотолабильными группами. Все производные аминокислот, применяемые в процессе, имеются в продаже.

[00343] ТФПС представляет собой последовательный синтез пептидной цепи, закрепленной на твердом носителе. В синтезе можно применять смолу MBHA для сборки пептидной последовательности. После набухания и промывки смолы DMF, а затем DMF/DIEA в атмосфере азота линкер Fmoc-Rink-амид может быть связан с применением HBTU/DIPEA/HOBt в DMF. После связывания смолу можно промыть DMF и затем ацетилировать с применением Ac₂O/DIPEA. Для проверки завершения связывания можно проводить тест Кайзера.

[00344] После промывки смолы с помощью DMF каждая из Fmoc-защищенных аминокислот связана со связанным со смолой пептидом в соответствии со следующим циклом:

1. Fmoc-защитную группу удаляют пиперидином в DMF, и смолу тщательно промывают DMF.
2. Связывание осуществляют в DMF с переменными аминокислотными эквивалентами с применением DIC/Охума для активации.
3. Связывание аминокислот контролируют с помощью нингидринового анализа, который проводят во время каждого цикла синтеза.

[00345] В конце сборки, после связывания и снятия защиты с последней аминокислоты, смолу промывают DMF и изопропанолом и сушат в вакууме.

Отщепление пептида и смолы и снятие защиты (стадия 2)

[00346] Защищенный пептид можно одновременно отщепить от смолы и снять защиту путем обработки смесью TFA/вода/анизол. Затем к суспензии пептид/TFA добавляют

МТВЕ для осаждения неочищенного пептида в присутствии отщепленной смолы.

Полученный неочищенный пептид фильтруют, промывают МТВЕ и сушат в вакууме до постоянной массы.

Реакция декарбоксилирования (стадия 3a)

[00347] Неочищенный пептид солюбилизируют в смеси $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (соотношение 80:20) в аммиачном буфере. Раствор доводят до целевого $\text{pH} \geq 7$ с применением 25% NH_4OH в H_2O . Реакцию декарбоксилирования поддерживают при комнатной температуре в течение 24 часов. Неочищенный пептид промывают раствором $\text{H}_2\text{O} / \text{ACN}$ (соотношение 80 : 20) в аммиачном буфере при pH около 10 и хранят при комнатной температуре.

Очистка с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (стадия 3b)

[00348] Неочищенный пептид растворяют в смеси вода/ацетонитрил/ NH_4OH . Этот раствор разбавляют уксусной кислотой и затем фильтруют.

[00349] Первичную очистку проводят с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ с $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ в качестве элюента. Элюирование в колонке контролируют с помощью УФ-излучения, а полученные фракции анализируют с помощью ОФ-ВЭЖХ. Фракции, отвечающие критериям контроля, смешивают в объединенном пуле. Фракции, не отвечающие критериям контроля, могут быть переработаны путем повторения стадии очистки. Чистоту пула контролируют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ.

Преобразование натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (стадия 4)

[00350] Эта стадия может быть проведена для замены противоиона пептида с аниона TFA на катион натрия посредством изменения pH и для дополнительной очистки пептида. Объединенный пул стадии 3 разбавляют водой и повторно очищают с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ с применением элюента NaOAc .

[00351] Впоследствии очищенный раствор пептида подвергают выпариванию в вакууме для уменьшения содержания ацетонитрила в растворе. Затем раствор очищенного пептида доводят до целевого pH 7,9 с помощью 0,1% AcOH .

[00352] Чистый пул можно концентрировать и лиофилизировать. Чистоту пула анализируют с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Лиофилизация и упаковка (стадия 5)

[00353] Перед лиофилизацией раствор очищенного пептида фильтруют через мембрану 0,2 мкм. Лиофилизацию проводят при низком давлении. Полученный лиофилизированный

конечный пептид упаковывают в атмосфере аргона. Лиофилизированный апраглутид контролируют в соответствии со спецификацией апраглутида.

Переработка

[00354] Лиофилизированный апраглутид, который не соответствует критериям, установленным в спецификации апраглутида, может быть подвергнут повторной очистке.

[00355] Повторную очистку можно проводить после восстановления пептида путем повторения стадии(-й) очистки и стадии превращения противоионов, как описано выше.

[00356] После повторной очистки материал лиофилизируют в соответствии с описанной выше процедурой.

[00357] Лиофилизированный апраглутид, который не соответствует критериям, установленным в спецификации апраглутида, может быть подвергнут повторной лиофилизации.

[00358] Повторную лиофилизацию можно проводить после восстановления пептида путем повторения стадии лиофилизации, как описано выше.

Примеси

[00359] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию апраглутид по существу не содержит органических примесей, включая, без ограничений, остатки реагентов и материалов (включая побочные продукты), применяемых в производственном процессе.

[00360] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию апраглутид по существу не содержит непептидных примесей.

[00361] В некоторых аспектах способов по настоящему описанию апраглутид по существу не содержит остаточных растворителей.

[00362] В композиции апраглутида могут наблюдаться пептидные примеси, включая, без ограничений, Des-Gly⁴ апраглутид, аспартимид³ апраглутид, Asp³³-ОН апраглутид, Des-Ser⁷ апраглутид и [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутид.

[00363] Апраглутид для инъекций может представлять собой лиофилизированный порошок, хранящийся в условиях длительного хранения (5 ± 3 °C). Предоставленные в данном случае результаты стабильности (таблица 5) демонстрируют, что в условиях длительного хранения не наблюдалось распада.

[00364] Испытание на бактериальные эндотоксины может быть предпочтительным для обеспечения микробиологического качества после изготовления, упаковки, хранения и распространения композиции апраглутида, как это требуется для композиции апраглутида

для парентерального введения. Испытание проводят в соответствии с Евр. Фарм. 2.6.14/ Фарм.США <85>.

Химические характеристики продукта

[00365] Соединение по настоящему описанию представляет собой синтетический пептидный аналог глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2), состоящий из 33 аминокислот, который действует как селективный полный агонист рецептора GLP-2 с активностью и селективностью, сравнимыми с нативным GLP-2.

[00366] Пептид по настоящему описанию представляет собой линейный пептид. Последовательность пептида содержит одну D-стереоизомерную аминокислоту (D-фенилаланин), одну неприродную аминокислоту (норлейцин) и две ахиральные аминокислоты (глицин); все остальные аминокислоты имеют L-подобную конфигурацию. Пептид по настоящему описанию синтезируют в виде отдельного энантиомера со всеми стереоцентрами определенной хиральности. Его могут выделить в форме натриевой соли с небольшим количеством остаточной воды в качестве природного компонента.

[00367] Внешний вид описанного пептида представляет собой однородный порошок от белого до почти белого цвета. Его могут выделить очисткой с помощью обращенно-фазовой хроматографии и затем лиофилизировать; кристаллические или полиморфные формы неизвестны.

[00368] Растворимость описанного пептида в очищенной воде составляет более 100 мг/мл.

[00369] pH раствора описанного пептида в воде при концентрации 100 мг/мл составляет от 7,6 до 8,4. Расчетная изоэлектрическая точка равна 4,3а.

[00370] Оптимальная растворимость и химическая стабильность апраглутида наблюдались в диапазоне pH от 8,0 до 8,5.

Параметры внутрипроизводственного контроля

[00371] В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного пептидного пула, измеренная с помощью ОФ-ВЭЖХ, составляет более 95%, 97% или 99%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного пептидного пула, измеренная с помощью ОФ-ВЭЖХ, составляет более 95%.

[00372] В некоторых аспектах параметры внутрипроизводственного контроля, представленные в таблице 4, могут быть применены в способах по настоящему изобретению. В некоторых аспектах чистота как параметр внутрипроизводственного контроля, приведенный в таблице 4, представлена в столбце «Критерии приемлемости» таблицы 4:

Таблица 4

Испытание параметров внутрипроизводственного контроля	Стадии процесса	Аналитический принцип	Критерии приемлемости
Чистота неочищенного пептида	Стадия 2: Отщепление пептида от смолы и снятие защиты с боковой цепи	ОФ-ВЭЖХ	Общая чистота $\geq 50,0\%$ (площадь)
Чистота очищенного пула пептида с помощью ОФ-ВЭЖХ	Стадия 3: Очистка с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ	ОФ-ВЭЖХ	Чистота $\geq 95\%$ Сумма Des-Gly ⁴ апраглутида и аспартимида ³ апраглутида $\leq 1,0\%$ Asp33-ОН апраглутид $\leq 1,0\%$ Des-Ser7 апраглутид $\leq 1,0\%$ [Trp25, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутид $\leq 2,0\%$ D-аспартимид ³ апраглутид $\leq 2,0\%$
Чистота натриевой соли пептида	Стадия 4: Превращение натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ	ОФ-ВЭЖХ	Чистота $\geq 95\%$ Сумма Des-Gly ⁴ апраглутида и аспартимида ³ апраглутида $\leq 1,0\%$ Asp33-ОН апраглутид $\leq 1,0\%$ Des-Ser7 апраглутид $\leq 1,0\%$ [Trp25, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутид $\leq 2,0\%$ D-аспартимид ³ апраглутид $\leq 2,0\%$

[00373] Процесс производства, описанный в этом примере, упоминается в данном случае как процесс А. В таблице 2а показана чистота лекарственного препарата апраглутида, полученного с применением процесса А, а также уровень содержания основных примесей. Как показано в таблице 2а и таблице 2b, процесс А может давать апраглутид с чистотой не менее 95% и низким уровнем содержания примесей. Более того, процесс А дает технологический выход лекарственного препарата в диапазоне от 15% до 22%.

Пример 2. Измерение *in vitro* активности агониста GLP-2

[00374] Для определения активности агонистов GLP-2 по настоящему описанию в отношении рецептора hGLP-2 применяют транскрипционный репортерный генный анализ. Два конструкта временно трансфицировали в линию клеток почки эмбриона человека (HEK-293): конструкт ДНК, экспрессирующий рецептор hGLP-2, и конструкт репортерной ДНК, содержащий внутриклеточные промоторные элементы, чувствительные к цАМФ, регулирующие экспрессию люциферазы светлячка. (Для дальнейших указаний по данному анализу см., например, HimmLer et al., J. Recept. Res., (1993), 13, 79–74.)

[00375] Клетки подвергают в течение 5 часов серийным полулогарифмическим разбавлениям соединений на дозу. После воздействия соединений клетки лизируют, определяют активность люциферазы и определяют эффективность соединений и значения EC50 с помощью нелинейного регрессионного анализа. hGLP-2, встречающийся в природе пептидный лиганд из 33 аминокислот, применяют в качестве внутрипроизводственного контроля в каждом эксперименте.

Пример 3. Приготовление лекарственной формы

[00376] Для создания лекарственной формы для подкожного введения асептически изготавливают апраглутид и лиофилизируют в порошок вместе с фармацевтическими наполнителями глицином, L-гистидином и маннитом. Лيوфилизированный порошок восстанавливают стерильной водой или буфером для инъекций.

[00377] Для разработки лиофилизированной лекарственной формы было проведено скрининговое исследование для оценки оптимального наполнителя и наполнителей для достижения требуемой физической стабильности апраглутида в жидкой фазе.

Первоначальные испытания наполнителей сахарозы и маннита показали, что оба они подходят для процесса лиофилизации с точки зрения времени восстановления, содержания воды и визуального осмотра лиофилизированных продуктов. Исследовали влияние концентраций и комбинации стабилизаторов с двумя наполнителями, сахарозой и маннитом. Глицин и трис испытывали в качестве буферных агентов в концентрациях 20 мМ (1,50 мг/мл для глицина и 2,4 мг/мл для трис) и 40 мМ (3,0 мг/мл для глицина и 4,8 мг/мл для трис), pH от 8,2 до 8,5. Все лекарственные формы испытывали в присутствии или без присутствия L-гистидина в концентрации 20 мМ (3,10 мг/мл) и либо с маннитом, либо с сахарозой в качестве наполнителя. Всего было приготовлено одиннадцать лекарственных форм с применением факториального дизайна. Лекарственные формы проходили испытание физических характеристик путем

помещения на вращающийся стол при температуре ускоренного хранения 40 °С в течение 3 суток. Физическую стабильность лекарственных форм оценивали методом эксклюзионной хроматографии, измеряли оптическую плотность и вязкость; химическую стабильность апраглутида оценивали с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Химическая и физическая стабильность лекарственных форм, содержащих глицин в сочетании с гистидином, превосходила лекарственные формы, содержащие трис-буфер. И маннит, и сахароза были приемлемыми в качестве наполнителей; однако маннит был выбран ввиду лучшей технологичности при лиофилизации.

[00378] Поскольку в результате скринингового исследования нельзя было сделать вывод о влиянии концентрации глицина, было проведено исследование стабильности в лабораторном масштабе с двумя лекарственными формами, содержащими глицин в концентрациях 20 мМ (1,50 мг/мл) и 40 мМ (3,0 мг/мл) соответственно. Обе лекарственные формы содержали L-гистидин, маннит, апраглутид и pH, доведенный до 8,3. Лекарственные формы лиофилизировали и выдерживали в течение 3 месяцев при –20 °С, 5 °С, 25 °С и 40 °С. Сделали вывод о том, что при –20 °С, 5 °С и 25 °С обе лекарственные формы были химически и физически стабильны в течение всего периода испытаний, составляющего 3 месяца. При 40 °С обе композиции показали признаки снижения физической стабильности через 3 месяца. Лекарственная форма, содержащая более низкую концентрацию 20 мМ глицина, имела предпочтительную более высокую степень кристалличности маннита по результатам рентгеновской порошковой дифрактометрии. Следовательно, для лекарственной формы выбрали 20 мМ глицина.

Пример 4. Цитруллин в качестве маркера действия апраглутида

[00379] Цитруллин плазмы применяли в качестве фармакодинамического (ФД) маркера для описания действия апраглутида. Аналогично разработке фармакокинетической (ФК) модели, модель ФК/ФД была разработана для здоровых индивидуумов только на основе исследований GLY-101-2015 и TA799-002. Для разработки модели ФД наблюдения за ФД были сопоставлены с наблюдениями за ФК с применением готовой модели ФК с ее структурой, остаточными ошибками, независимыми переменными и моделями со случайными эффектами. Исходной моделью была модель оборота, в которой цитруллин плазмы постоянно синтезировался и разлагался со скоростью синтеза k_{syn} и скоростью разложения k_{deg} . Плазменный апраглутид стимулировал синтез цитруллина посредством сигмоидальной зависимости E_{max} от исходного уровня цитруллина R_0 ,

полумаксимального действия при концентрации EC_{50} , максимального эффекта E_{max} и коэффициента Хилла γ . Предполагалось, что оборот цитруллина находится в устойчивом состоянии таким образом, что синтез цитруллина определяется исключительно исходным уровнем цитруллина и его распадом. Популяционная ФК/ФД апраглутида в плазме была установлена на основе данных двух исследований с участием здоровых добровольцев и двух исследований с участием пациентов с SBS, у которых испытывали дозы от 2,5 до 50 мг п/к. Концентрация апраглутида следовала двухкомпонентной и дозо-нелинейной кинетике. Клиренс апраглутида составил 16,8 л/сут, центральный объем распределения – 31,5 л у индивидуума с массой тела 70 кг, получавшего п/к дозу 5 мг. Период полувыведения оценивали до 1,3 суток. Объем распределения и клиренс зависели от массы тела с коэффициентами $\beta_{V1/F,IMT} = 1,94$ и $\beta_{CL/F,IMT} = 1,8$. Эти коэффициенты указывали на сильную зависимость от массы тела. Длительность абсорбции нулевого порядка зависела от дозы с коэффициентом $\beta_{T_{k0},доза} = 0,249$.

[00380] Было обнаружено, что эффект апраглутида в плазме на уровень цитруллина в плазме является сигмоидальным с насыщением цитруллином, появляющимся при дозах 5 мг. Это явление было описано с помощью модели оборота цитруллина, синтез которого стимулировался апраглутидом в соответствии с моделью E_{max} . Было установлено, что исходный уровень цитруллина составляет 5,12 мкг/мл, максимальный эффект составляет 0,626, а полумаксимальная эффективная концентрация апраглутида составляет 13,7 нг/мл.

[00381] Популяционную ФК/ФД модель применяли для прогнозирования воздействия апраглутида в плазме и профилей минимальной концентрации цитруллина в плазме от времени с индивидуальной вариабельностью и без нее для индивидуумов с массой тела от 40 до 120 кг, получающих еженедельные дозы 2,5, 5 или 10 мг п/к. Прогнозы без индивидуальной вариабельности показали, что эффект апраглутида на цитруллин начинает приводит к насыщению у индивидуума с массой тела 40 кг, получающего еженедельно 5 мг апраглутида п/к, т. е. с уменьшением массы тела одна, и та же доза апраглутида приводила к уменьшению эффекта на цитруллин. Этот эффект насыщения оказался еще более выраженным у индивидуумов, получавших еженедельно 10 мг апраглутида п/к. Прогнозы с индивидуальной вариабельностью показали большую вариабельность профилей зависимости концентрации цитруллина в плазме от времени и минимальных уровней цитруллина в плазме. Воздействие апраглутида при массе тела от 40 до 120 кг и п/к дозах апраглутида 2,5, 5 или 10 мг сравнивали с апостериорными оценками воздействия на пациентов с SBS. Моделировали выбор крайних вариантов при массе тела 50 кг между дозами 2,5 и 5 мг. Этот вариант привел к концентрации

апраглутида в пределах диапазона апостериорных оценок AUC у пациентов с SBS, получавших 5 мг апраглутида п/к еженедельно. Как биомаркер клинической эффективности, объем выделяемой мочи коррелировал с постериорными оценками концентрации апраглутида в плазме и остаточной концентрацией цитруллина в плазме крови у пациентов с SBS. Было обнаружено, что концентрация апраглутида и минимальные уровни цитруллина слабо коррелируют только с объемом выделяемой мочи.

[00382] Цитруллин в плазме, биомаркер энтероцитарной массы, увеличивается после введения аналога GLP-2 в клинических исследованиях людей.

[00383] Фармакокинетическая/фармакодинамическая (ФК/ФД) взаимосвязь между апраглутидом, новым аналогом GLP-2 длительного действия, разрабатываемым для лечения синдрома короткой кишки, и цитруллин оценивали в рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом исследовании многократных доз в параллельных группах. 23 здоровых взрослых добровольца получали 6 еженедельных подкожных доз апраглутида (1, 5 или 10 мг) или плацебо и наблюдались еще в течение 6 недель после последней дозы. Проводили анализ крови на предмет диеты, образа жизни и суточного объема мочи. L-цитруллин количественно определяли с применением валидированного способа ЖХ-МС. Данные ФК подвергали некомпартментальному анализу, а данные ФД проанализировали с помощью ANCOVA.

[00384] Фармакокинетические параметры показали период полувыведения 72 часа. Повышение уровня цитруллина наблюдалось через 2 суток после приема первой дозы апраглутида, а максимальная концентрация у большинства пациентов достигалась через 4 или 7 суток. Средние уровни цитруллина были повышены по сравнению с исходным уровнем во всех группах апраглутида и оставались повышенными в течение 6-недельного периода лечения. Повышение уровня цитруллина было значительно больше при приеме апраглутида 5 мг и 10 мг, чем при приеме апраглутида 1 мг по сравнению с плацебо (таблица 5). Не было статистически значимых различий между уровнями доз апраглутида 5 и 10 мг. Уровни цитруллина в плазме оставались повышенными в течение 10–17 суток после приема последней дозы апраглутида. Апраглутид был безопасным и хорошо переносимым, без серьезных НЯ.

Таблица 5

Доза апраглутида (мг)	Разница в уровне цитруллина (мкг/мл) по сравнению с плацебо	P-значение
1	0,31 [95% ДИ: -0,4371; 1,0663]	0,3910
5	1,26 [95% ДИ: 0,5037; 2,0112]	0,0025
10	1,63 [95% ДИ: 0,8809; 2,3878]	0,0002

[00385] Апраглутид был безопасным и хорошо переносимым и демонстрировал ФД ответ больше концентрации в плазме. Эти данные ФК и ФД подтверждают потенциал подкожного введения апраглутида один раз в неделю.

Пример 5. Результаты фазы II клинических исследований введения композиций апраглутида по настоящему описанию

[00386] В следующем не имеющем ограничительного характера примере описаны результаты клинического исследования фазы 2, в котором субъектов с SBS-IF лечили препаратами апраглутида по настоящему описанию. В этом исследовании фазы 2 изучали безопасность и эффективность апраглутида в дозах 5 и 10 мг у пациентов с SBS-IF.

[00387] Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, благоприятные эффекты аналогов GLP-2 у пациентов с SBS могут включать динамические изменения гомеостаза жидкости в организме, которые можно учитывать при оценке результатов лечения.

Улучшение кишечной абсорбции приводит к уменьшению массы выделяемого кала. Поскольку большое количество абсорбируемой в кишечнике воды и натрия выводится почками через системный кровоток, повышенная абсорбция у пациентов с SBS может привести к увеличению объема производимой мочи и экскреции натрия. Поэтому, как правило, состояние гидратации пациента с SBS можно контролировать, измеряя объем мочи и содержание натрия в моче.

[00388] Восемь взрослых пациентов с SBS-IF получали лечение композициями апраглутида по настоящему описанию в соответствии с таблицей 6. Кратко, пациентам с SBS-IF вводили 5 мг апраглутида по настоящему описанию или плацебо один раз в неделю в течение четырех недель. Затем пациентам вводили 10 мг апраглутида по настоящему описанию один раз в неделю в течение четырех недель. Кроме того, между курсами лечения был период вымывания продолжительностью 6–10 недель.

Таблица 6

Часть А: Период лечения 1 (4 недели) рандомизированное	Период вымывания 1 (6–10 недель после последней дозы)	Часть А: Период лечения 2 (4 недели) рандомизированное	Период вымывания 2 (6–10 недель после последней дозы)	Часть В: Период лечения 3 (4 недели) Открытое
Плацебо или 5 мг апраглутида подкожно один раз в неделю		Плацебо или 5 мг апраглутида подкожно один раз в неделю		10 мг апраглутида подкожно один раз в неделю

Результаты

[00389] В рамках исследования было обследовано в общей сложности 12 пациентов, из них 8 были рандомизировано выбраны для лечения. Все 8 пациентов продолжали дополнительный период лечения по открытой схеме с 10 мг апраглутида (часть В). Один пациент прекратил исследование после первого введения препарата в период лечения по части В из-за истощения от процедур исследования и предполагаемого отсутствия эффекта. Пациент предоставил данные для немедленных измерений, но не предоставил данных последующего наблюдения. Восемь пациентов составили популяцию для анализа безопасности и всю анализируемую выборку. Демографические и исходные характеристики пациентов приведены в таблице 7. Данные в таблице 7 представляют собой среднее значение (SD) или N (%), а парентеральную поддержку (PS) планировали как PS в начале исследования на основе среднего значения за неделю.

[00390] Три пациента ранее получали лечение аналогом GLP-2 в рамках клинических исследований (≥ 6 месяцев назад). Графики результатов отдельных пациентов показали, что все эффекты вернулись к исходному уровню после периода вымывания; таким образом, влияние предшествующей терапии не наблюдалось.

Таблица 7

Возраст (лет)	59,1 (13,8)
Пол	
Женский	4 (50%)
Мужской	4 (50%)
Масса тела на исходном уровне	75,6 (15,5)
Индекс массы тела (кг/м ²)	24,8 (3,9)
Раса, европеоидная	8 (100%)
Объем парентеральной поддержки (мл/сутки)	3309 (1903)

Энергия парентеральной поддержки (кДж/сутки)	4665 (3852)
Объем выделяемой мочи (мл/сутки)	2031 (1112)
Объем перорального потребления жидкости (мл/сутки)	2799 (1289)
Выделение натрия с мочой	73 (94)
Уровни цитруллина в плазме (мкмоль/л)	33 (30)
Причина резекции	
Болезнь Крона	2 (25%)
Мезентерическое сосудистое заболевание	3 (37,5%)
Послеоперационные осложнения в связи с язвенным колитом	1 (12,5%)
Послеоперационные осложнения	2 (25%)
Характеристики заболевания	
Длина тонкой кишки (см)	109 (127)
Концевая еюностомия	6 (75%)
Илеостомия	2 (25%)
Нарушение целостности толстой кишки	0
Сопутствующее лечение	
Ингибитор протонного насоса	7 (87,5%)
Опиоиды или агонисты опиоидов	4 (50%)
Лоперамид	3 (37,5%)
Всего (N = 8)	

Результаты анализа безопасности

[00391] Распространенные нежелательные явления представлены в таблице 8 (данные представлены как N или N (%)). Нежелательные явления, которые наблюдались у > 2 пациентов и включали полиурию (n = 7), осложнения стомы (n = 6), осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта (n = 5), снижение желудочно-кишечного выделения через стому (n = 6), нарушение желудочно-кишечного выделения через стому (n = 6), уменьшение жажды (n = 5), отеки (n = 4), повышение массы тела (n = 3) и снижение аппетита (n = 3). У трех пациентов наблюдались реакции в месте инъекции. Все реакции в месте инъекции возникали при лечении активным препаратом; у одного пациента была реакция в месте инъекции в группе с дозой 5 мг, и у трех пациентов была реакция в месте инъекции в группе с дозой 10 мг. В общей сложности 5 пациентов сообщили о 8 случаях серьезных нежелательных явлений. Ни одно из них не сочли связанным с исследуемым препаратом. Два серьезных нежелательных явления были связаны с механическими осложнениями, связанными с туннельным центральным венозным катетером, применяемым пациентами для введения PS, и обоим требовалась госпитализация для замены катетера. Шесть серьезных нежелательных явлений были связаны с инфекциями кровотока, связанными с катетером (CRBSI). У одного пациента было четыре повторных явления CRBSI. Серьезные нежелательные явления были равномерно распределены между периодами приема плацебо и лечения. У большинства пациентов было по меньшей

мере одно нежелательное явление, связанное с лечением, все они были легкими или умеренными, без очевидной разницы между уровнями доз активного препарата.

Таблица 8

	Плацебо	5 мг	10 мг	Всего
	(N=8)	(N=8)	(N=8)	(N=8)
Любые связанные нежелательные явления	8	8	8	8 (100%)
Полиурия	1	4	6	7 (88%)
Снижение желудочно-кишечного выделения через стому	0	3	6	6 (75%)
Осложнения со стомой	0	6	6	6 (75%)
Осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта в связи со стомой	0	5	5	5 (63%)
Затруднения выхода из желудочно-кишечного тракта в стому	0	4	4	5 (63%)
Снижение жажды	0	3	4	5 (63%)
Отечность	0	2	2	4 (50%)
Увеличение массы тела	0	1	2	3 (38%)
Уменьшение аппетита	0	1	2	3 (38%)

[00392] Не было прекращения или сокращения участия в исследовании из-за связанных с лечением нежелательных явлений. Один пациент пропустил третью дозу апраглутида в период приема плацебо из-за периферических отеков. Никаких опасений по поводу безопасности в отношении основных показателей жизнедеятельности, образцов крови, ЭКГ, анализа мочи или массы тела не возникало. Летальных исходов не было.

[00393] В ходе исследования у трех пациентов выработались антитела к апраглутиду. Два пациента дали положительный результат на антитела к апраглутиду в конце периода лечения 5 мг и один в конце периода лечения 10 мг. У одного пациента, у которого были положительные антитела в конце периода лечения 5 мг, также были положительные антитела в конце периода лечения 10 мг. У двух пациентов, у которых развились положительные антитела в течение периода лечения 5 мг, они были отрицательными после 6–10-недельного периода вымывания. У обоих пациентов с положительными антителами в конце лечения 10 мг оба результата оставались положительными после 4–6-недельного периода вымывания, но титры были ниже, чем в конце периода лечения 10 мг. Не было обнаружено эффектов антител к апраглутиду на ФК профиль, фармакодинамический ответ на апраглутид, а также на количество или продолжительность нежелательных явлений.

Объем выделяемой мочи и выделение натрия с мочой: изменения от исходного уровня до окончания лечения (сутки 27–29)

[00394] Индивидуальные изменения абсолютного объема выделяемой мочи от исходного уровня до конца каждой дозы показаны на ФИГ. 5, включая среднее изменение для каждой дозы. Среднее изменение отличалось от скорректированного среднего, рассчитанного при статистическом анализе, который сравнивает варианты лечения с плацебо. При статистическом анализе частей А + В апраглутид в дозе 5 мг способствовал увеличению выделения абсолютного объема мочи на скорректированное среднее значение 711 мл/сутки (95% ДИ от 132 до 1289; $P = 0,021$) по сравнению с плацебо, что соответствует ежедневному увеличению на 48% (95% ДИ от 12 до 84; $P = 0,014$), как показано в таблице 9. При статистическом анализе частей А апраглутид в дозе 5 мг способствовал увеличению выделения абсолютного объема мочи на скорректированное среднее значение 714 мл/сутки (95% ДИ от 490 до 939; $P = 0,002$), что соответствует ежедневному увеличению на 49% (95% ДИ от 4 до 94; $P = 0,041$), как показано в таблице 10. Лечение апраглутидом в дозе 10 мг способствовало увеличению выделения абсолютного объема выделяемой мочи на скорректированное среднее значение 795 мл (95% ДИ от 195 до 1394; $P = 0,014$) по сравнению с плацебо. Соответствующее изменение выделения относительного объема выработанной мочи составило 34% (95% ДИ от -4 до 71; $P = 0,072$). Различия не наблюдались между группами доз 5 мг и 10 мг, как показано в таблице 9. В таблице 9 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до конца лечения или ближе к концу лечения для групп с индивидуальными дозами, и N обозначает количество пациентов в полной выборке для анализа. Результаты статистического анализа частей А + В представлены графически на ФИГ. 6.

Таблица 9

	Анализ частей А + В		
	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)	10 мг по сравнению с плацебо (N=8)	5 мг по сравнению с 10 мг (N=8)
Абсолютный объем выделяемой мочи (мл/сутки)	711 (от 132 до 1289); $P=0,021$	795 (от 195 до 1394); $P=0,014$	84 (от -514 до 682); $P=0,761$
Относительный объем выделяемой мочи (%)	48 (от 12 до 84); $P=0,014$	34 (от -4 до 71); $P=0,072$	-14 (от -51 до 23); $P=0,420$
Выделение натрия с мочой (ммоль/сутки)	56 (от -10 до 123); $P=0,087$	88 (от 20 до 156); $P=0,017$	32 (от -37 до 101); $P=0,325$

	Анализ частей А + В		
	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)	10 мг по сравнению с плацебо (N=8)	5 мг по сравнению с 10 мг (N=8)
Выделение натрия с мочой (%)	166 (от -342 до 675); $P=0,478$	432 (от -87 до 951); $P=0,092$	266 (от -266 до 798); $P=0,287$
Объем PS (мл/сутки)	-89 (от -543 до 366); $P=0,676$	-469 (от -941 до 4); $P=0,052$	-380 (от -851 до 91); $P=0,103$
Относительный объем PS (%)	-13 (от -36 до 9); $P=0,225$	-28 (от -51 до -4); $P=0,025$	-15 (от -38 до 9); $P=0,195$
Объем перорального потребления жидкости (мл/сутки)	-244 (от -512 до 23); $P=0,070$	-363 (от -641 до -86); $P=0,015$	-119 (от -396 до 157); $P=0,362$
Относительный объем перорального потребления жидкости (%)	-9 (от -18 до 1); $P=0,072$	-15 (от -25 до -5); $P=0,006$	-7 (от -17 до 3); $P=0,169$

[00395] Индивидуальные изменения от исходного уровня до конца каждого лечения в абсолютной экскреции натрия с мочой представлены на ФИГ. 7. При статистическом анализе частей А + В 5 мг апраглутида увеличивали выведение натрия с мочой по сравнению с плацебо на скорректированное среднее значение 56 ммоль/сутки (95% ДИ от -10 до 123; $P = 0,087$), как показано в таблице 9. При статистическом анализе части А 5 мг апраглутида увеличивали экскрецию натрия с мочой по сравнению с плацебо на скорректированное среднее значение 66 ммоль/сутки (95% ДИ от -69 до 201; $P = 0,171$), как показано в таблице 10. В таблице 10 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до конца лечения для групп с индивидуальными дозами, и N обозначает количество пациентов в полной выборке для анализа. В группе с дозой 10 мг абсолютное выделение натрия с мочой увеличилось на скорректированное среднее значение 88 ммоль/сутки (95% ДИ от 20 до 156; $P = 0,017$) по сравнению с плацебо, как показано в таблице 9. Как показано в таблицах 9 и 10, относительная экскреция натрия с мочой не изменилась после лечения апраглутидом. Как дополнительно показано в таблице 9, между группами доз 5 мг и 10 мг не было обнаружено различий.

Таблица 10

	Анализ 5 мг по сравнению с плацебо части А (N=8)
Абсолютный объем выделяемой мочи (мл/сутки)	714 (от 490 до 939); $P=0,002$
Относительный объем выделяемой мочи (%)	49 (от 4 до 94); $P=0,041$
Выделение натрия с мочой (ммоль/сутки)	66 (от -69 до 201); $P=0,171$
Выделение натрия с мочой (%)	189 (от -350 до 729); $P=0,270$
Объем PS (мл/сутки)	-94 (от -344 до 156); $P=0,356$
Относительный объем PS (%)	-13(от -41 до 15); $P=0,276$
Объем перорального потребления жидкости (мл/сутки)	-242 (от -560 до 76); $P=0,103$
Относительный объем перорального потребления жидкости (%)	-9 (от -18 до 1); $P=0,068$

Объем выделяемой мочи и экскреция натрия с мочой: изменения от исходного уровня до момента сразу после первой инъекции в рамках лечения (сутки 1–3)

[00396] Индивидуальные изменения от исходного уровня до момента сразу после первой инъекции в рамках лечения в показателях абсолютного объема выделяемой мочи и экскреции натрия с мочой представлены на ФИГ. 8 и 9 соответственно. Никаких немедленных изменений не наблюдалось для групп с дозой 5 мг или 10 мг по сравнению с плацебо, и не было различий между группами с дозой активного препарата, как показано в таблице 11. В таблице 11 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до момента сразу после первой инъекции в рамках лечения для групп с индивидуальными дозами, и N обозначает количество пациентов в полной выборке для анализа.

Таблица 11

		Анализ частей А + В		Анализ части А
	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)	10 мг по сравнению с плацебо (N=8)	5 мг по сравнению с 10 мг (N=8)	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)
Абсолютный объем выделяемой мочи (мл/сутки)	-38 (от -456 до 381); $P=0,845$	-64 (от -500 до 372); $P=0,751$	-26 (от -462 до 409); $P=0,896$	-48 (от -696 до 601); $P=0,831$

Относительный объем выделяемой мочи (%)	6 (от -24 до 35); $P=0,678$	-6 (от -37 до 24); $P=0,655$	-12 (от -43 до 19); $P=0,402$	5 (от -38 до 48); $P=0,729$
Выделение натрия с мочой (ммоль/сутки)	3 (от -17 до 23); $P=0,705$	3 (от -17 до 22); $P=0,768$	-1 (от -22 до 20); $P=0,930$	3 (от -146 до 152); $P=0,823$
Выделение натрия с мочой (%)	65(от -36 до 166); $P=0,176$	22 (от -75 до 119); $P=0,617$	-43(от -149 до 63); $P=0,375$	64 (от -306 до 433); $P=0,272$

Объем перорального потребления жидкости: изменения от исходного уровня до почти конца лечения (сутки 20–22)

[00397] В сутки 20–22 лечение 10 мг апраглютида уменьшало абсолютное и относительное пероральное потребление жидкости на скорректированное среднее, составляющее 363 мл/сутки (95% ДИ от -641 до -86; $P = 0,015$) и -15% (95% ДИ от -25 до -5; $P = 0,006$) соответственно. При анализе частей А + В аналогичная тенденция наблюдалась для группы с дозой 5 мг со скорректированным средним снижением на 244 мл/сутки (95% ДИ от -512 до 23; $P = 0,070$), как показано в таблице 9, и при анализе части А со средним снижением 242 мл/сутки (95% ДИ от -560 до 76; $P = 0,103$), как показано в таблице 10. Как дополнительно показано в таблице 9, между группами активного препарата не было обнаружено различий.

Объем PS: изменения от исходного уровня до почти конца лечения (сутки 20–22)

[00398] В сутки 20–22 апраглютид в дозе 10 мг снижал относительный суточный объем PS на -28% (от -51 до -4; $P = 0,014$) по сравнению с плацебо. Наблюдалась аналогичная тенденция для абсолютного изменения суточного объема PS, которое уменьшалось на 469 мл/сутки (от -941 до 4; $P = 0,052$), как показано в таблице 9. Как показано в таблицах 9 и 10, изменений в объеме PS не наблюдалось в группе с дозой 5 мг, и не наблюдалось различий между группами с дозой 5 мг и 10 мг, как показано в таблице 9.

Комбинированный эффект жидкости: изменения от исходного уровня до почти конца лечения (сутки 20–22)

[00399] Выполнили апостериорный анализ частей А + В для расчета комбинированного эффекта жидкости, определяемого как сумма увеличения объема выделяемой мочи (сутки 27–29), снижения объема PS и снижения спонтанного перорального потребления жидкости (сутки 20–22). Спонтанное пероральное потребление жидкости и снижение объема PS оценивали ближе к концу периода лечения, так как эти показатели оставались

неизменными во время сбора мочи. Введение 5 мг и 10 мг апраглутита увеличивало комбинированный эффект жидкости по сравнению с плацебо на 1036 мл/сутки (95% ДИ от 262 до 1810; $P = 0,014$) и 1630 мл/сутки (95% ДИ от 827 до 2433; $P = 0,001$) соответственно. Разница между двумя дозами отсутствовала; расчетная разница составляла 594 (95% ДИ от -207 до 1396; $P = 0,129$). Отдельные графики комбинированного эффекта жидкости вместе с объемом выделяемой мочи в конце лечения показаны на ФИГ. 10А–В.

Параметры состояния гидратации

[00400] В апостериорном анализе частей А + В доз апраглутита 5 мг и 10 мг снижали уровень альдостерона в плазме на 2894 пмоль/л (95% ДИ от -6247 до 458; $P = 0,083$) и 3045 пмоль/л (95% ДИ от -6460 до 370; $P = 0,075$) соответственно. Апраглутид не изменял другие параметры гидратации, включая креатинин, мочевины, гематокрит, альбумин, белок и общий CO_2 , как показано в таблице 12. В таблице 12 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до конца лечения для групп с индивидуальными дозами, и N обозначает количество пациентов в полной выборке для анализа.

Таблица 12

	Анализ частей А + В		
	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)	10 мг по сравнению с плацебо (N=8)	5 мг по сравнению с 10 мг (N=8)
Альдостерон (пмоль/л)	-2894 (от -6247 до 458); $P=0,083$	-3045 (от -6460 до 370); $P=0,075$	-151 (от -3570 до 3268); $P=0,924$
Креатинин (мкмоль/л)	-9,7 (от -25,8 до 6,4); $P=0,214$	-5,1 (от -22,1 до 11,9); $P=0,525$	4,6 (от -12,3 до 21,5); $P=0,567$
Мочевина (ммоль/л)	-0,9 (от -2,4 до 0,6); $P=0,217$	-0,6 (от -2,2 до 1,0); $P=0,425$	0,3 (от -1,3 до 1,9); $P=0,691$
Гематокрит (об./фр)	0,6 (от -0,2 до 1,4); $P=0,151$	0,2 (от -0,7 до 1,0); $P=0,675$	-0,4 (от -1,2 до 0,4); $P=0,326$
Альбумин (г/л)	-0,0 (от -1,8 до 1,8); $P=0,996$	1,0 (от -0,9 до 2,9); $P=0,260$	1,0 (от -0,8 до 2,9); $P=0,248$
Белок (г/л)	-0,4 (от -4,2 до 3,4); $P=0,824$	-0,7 (от -4,7 до 3,3); $P=0,704$	-0,3 (от -4,5 до 3,9); $P=0,874$
Всего CO_2 (ммоль/л)	0,3 (от -2,0 до 2,6); $P=0,788$	1,3 (от -1,1 до 3,7); $P=0,272$	1,0 (от -1,4 до 3,4); $P=0,393$

L-цитруллин в плазме

[00401] При статистическом анализе частей А + В апраглутид в дозе 5 мг способствовал увеличению абсолютного уровня L-цитруллина в плазме на скорректированное среднее значение 17,6 пмоль/л (95% ДИ от 2,0 до 33,2; $P = 0,031$), что соответствует увеличению на 65% (95% ДИ от 15 до 115; $P = 0,015$). При статистическом анализе части А апраглутид в дозе 5 мг способствовал увеличению абсолютного уровня L-цитруллина в плазме на скорректированное среднее значение 17,7 мкмоль/л (95% ДИ от –6,3 до 41,7; $P = 0,100$), что соответствует относительному увеличению на 66% (95% ДИ от –13 до 145; $P = 0,077$). Различия в изменении от исходного уровня для дозы 10 мг по сравнению с плацебо были меньше, как показано в таблице 13. В таблице 13 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до конца лечения для групп с индивидуальными дозами, и N обозначает количество пациентов в полной выборке для анализа. Отдельные изменения от исходного уровня в абсолютной концентрации L-цитруллина в плазме представлены на ФИГ. 11. Средние изменения и индивидуальные изменения уровней L-цитруллина в плазме пациента с исходного уровня представлены на ФИГ. 27. Доза-зависимые повышения уровней цитруллина в плазме наблюдались с апраглутидом начиная со 2 суток после первой дозы. Как показано на ФИГ. 28, после трех еженедельных доз апраглутида уровни цитруллина значительно увеличились по сравнению с плацебо.

Таблица 13

	Анализ частей А+В			Анализ части А
	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)	10 мг по сравнению с плацебо (N=8)	5 мг по сравнению с 10 мг (N=8)	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)
L-цитруллин в плазме (мкмоль/л)	17,6 (от 2,0 до 33,2); $P=0,031$	14,0 (от –2,3 до 30,3); $P=0,084$	–3,6 (от –19,8 до 12,6); $P=0,632$	17,7 (от –6,3 до 41,7); $P=0,100$
Относительное содержание L-цитруллина в плазме (%)	65 (от 15 до 115); $P=0,015$	42 (от –10 до 94); $P=0,100$	–23 (от –74 до 29); $P=0,344$	66 (от –13 до 145); $P=0,077$

Масса тела и композиционный состав тканей

[00402] При анализе частей А + В апраглутид в дозе 5 мг значительно увеличивал абсолютную и относительную жировую массу на 1,77 кг (95% ДИ от 0,29 до 3,24; $P =$

0,024) и 10% (95% ДИ от 1 до 18; $P = 0,035$) соответственно. В соответствии с увеличением жировой массы апраглутид в дозе 5 мг увеличивал массу тела на 1,9 кг (95% ДИ от 0,1 до 3,7; $P = 0,043$). Никаких изменений в безжировой массе тела или содержании минералов в костях не было обнаружено ни для одной из групп доз по сравнению с плацебо. При статистическом анализе части А тенденция к увеличению жировой массы и массы тела наблюдалась для 5 мг апраглутида, как показано в таблице 14. В таблице 14 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до конца лечения для групп с индивидуальными дозами, и N обозначает количество пациентов в полной выборке для анализа.

Таблица 14

		Анализ частей А+В		Анализ части А
	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)	10 мг по сравнению с плацебо (N=8)	5 мг по сравнению с 10 мг (N=8)	5 мг по сравнению с плацебо (N=8)
Масса тела (кг)	1,9 (от 0,1 до 3,7); $P=0,043$	1,3 (от -0,6 до 3,2); $P=0,151$	-0,6 (от -2,4 до 1,3); $P=0,517$	1,9 (от -0,8 до 4,5); $P=0,128$
Относительная масса тела (%)	3 (от 0 до 6); $P=0,042$	2 (от -1 до 5); $P=0,159$	-1 (от -4 до 2); $P=0,487$	3 (от -1 до 7); $P=0,117$
Безжировая масса тела (кг)	0,64 (от -2,49 до -3,77); $P=0,656$	0,76 (от -2,47 до 3,99); $P=0,608$	0,12 (от -3,00 до 3,24); $P=0,932$	0,49 (от -4,65 до 5,64); $P=0,721$
Относительная безжировая масса тела (%)	2 (от -5 до 9); $P=0,521$	2 (от -6 до 9); $P=0,613$	-0 (от -8 до 7); $P=0,900$	2 (от -11 до 15); $P=0,547$
Масса жировой ткани (кг)	1,77 (от 0,29 до 3,24); $P=0,024$	0,33 (от -1,20 до 1,85); $P=0,641$	-1,44 (от -2,92 до 0,04); $P=0,055$	1,74 (от -0,36 до 3,83); $P=0,071$
Относительная масса жировой ткани (%)	10 (от 1 до 18); $P=0,035$	2 (от -7 до 11); $P=0,608$	-7 (от -16 до 1); $P=0,086$	9 (от -5 до 24); $P=0,110$
Содержание минералов в костной ткани (г)	-4 (от -73 до 66); $P=0,905$	8 (от -64 до 81); $P=0,799$	12 (от -57 до 82); $P=0,700$	-4 (от -132 до 123); $P=0,896$

Относительное содержание минералов в костной ткани (%)	0 (от -3 до 3); $P=0,916$	0 (от -3 до 3); $P=0,891$	0 (от -3 до 3); $P=0,967$	0 (от -6 до 6); $P=0,927$
--	------------------------------	------------------------------	------------------------------	------------------------------

Фармакокинетика

[00403] Концентрация апраглутида в плазме повышалась после приема дозы, причем максимальная средняя концентрация была измерена через 72 часа после приема дозы. Средняя концентрация апраглутида в плазме перед введением второй дозы (C_{trough}) составляла 4,5 нг/мл и 8,9 нг/мл в периоды лечения 5 мг и 10 мг соответственно.

Краткое описание примера 5

Результаты, описанные в примере 5, демонстрируют, что введение субъектам композиций апраглутида по настоящему описанию было безопасным, хорошо переносимым и вызывало полезные изменения в кишечной абсорбции жидкости, включая, без ограничений, увеличение объема мочи.

[00404] Нежелательные явления, связанные с лечением, были легкими или умеренными и соответствовали физиологическому эффекту GLP-2. Дозозависимости нежелательных явлений не было. Реакций в месте инъекции было немного, что отражало режим дозирования всего один раз в неделю. Случаев боли в животе или вздутия живота, связанных с лечением, не было.

[00405] Лечение апраглутидом в дозах 5 и 10 мг один раз в неделю увеличивало объем выделяемой мочи по сравнению с плацебо. 10 мг апраглутида значительно повышали экскрецию натрия с мочой в конце лечения и снижали пероральное потребление жидкости, а также объем PS (оценивался ближе к концу лечения). Аналогичные тенденции наблюдались для дозы 5 мг в отношении выделения натрия с мочой и перорального потребления жидкости.

[00406] В совокупности это увеличение объема выделяемой мочи отражает увеличение кишечной абсорбции жидкости и натрия. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, это важный эффект для пациентов с SBS, которые подвержены высокому риску обезвоживания, истощения запасов натрия и почечной недостаточности. Нарушения водно-электролитного баланса также могут быть причиной заболеваемости и госпитализации.

[00407] Из-за относительно короткого периода лечения, составляющего 4 недели, при наличии клинических признаков задержки жидкости снижали объем PS. Предполагается, что при длительном лечении апраглутидом увеличение объема выделяемой мочи может

привести к дальнейшему снижению объема PS, о чем также свидетельствует более выраженный комбинированный эффект жидкости. Лечение апраглутидом в дозе 5 мг увеличивало относительный объем выделяемой мочи у 6 из 8 пациентов по сравнению с плацебо и превышало повышение в 10%, которое могло бы привести к снижению объема PS.

[00408] Концентрация L-цитруллина в плазме повышалась в течение обоих периодов лечения активным препаратом. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, это указывает на повышенную клеточную массу энтероцитов и согласуется с интестинотрофическим действием апраглутида на эпителий кишечника. У двух пациентов, у которых наблюдалось клинически значимое увеличение объема выделяемой мочи (оценка в сутки 27–29) в период лечения 5 мг, наблюдалось ослабление эффекта дозы 10 мг. Однако у этих пациентов наблюдалось сопутствующее снижение объема PS и перорального потребления жидкости (оценка в сутки 20–22) в течение периода лечения дозой 10 мг, что приводило к положительному комбинированному эффекту жидкости, определяемому как сумма положительных эффектов, включая увеличение выработки мочи, уменьшение потребности в PS и снижении перорального потребления жидкости.

[00409] Как должно быть понятно специалисту в данной области, пациенты с SBS могут страдать вторичным гиперальдостеронизмом из-за чрезмерных потерь натрия с калом и хронического истощения запасов натрия. В испытании, описанном в примере 5, было обнаружено, что введение апраглутида имело тенденцию к снижению уровней альдостерона в обеих группах доз по сравнению с плацебо. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, это указывает на то, что апраглутид облегчает вторичный гиперальдостеронизм за счет улучшения абсорбции жидкости и натрия.

[00410] Лечение апраглутидом в дозе 5 мг было связано с увеличением массы жировой ткани и массы тела. Увеличение массы жировой ткани у субъекта после лечения GLP-2 или t аналогом GLP-2 наблюдалось впервые. Увеличение массы тела хорошо коррелирует с соответствующими изменениями жировой массы и/или мышечной ткани.

[00411] Статистический анализ, описанный в примере 5, проводили в двух вариантах: в части A сравнивали 5 мг с плацебо, тогда как часть A+B включала плацебо, 5 мг и 10 мг для оценки контрастов между тремя видами лечения. Результаты анализа части A и части A+B были по существу одинаковыми.

[00412] Таким образом, результаты, описанные в примере 5, демонстрируют, что дозы 5 и 10 мг апраглутида один раз в неделю в течение четырех недель хорошо переносятся и безопасны. Результаты также продемонстрировали клиническую эффективность аналога GLP-2 при еженедельном приеме. Прием апраглутида один раз в неделю увеличивал

объем выделяемой мочи и улучшал другие маркеры кишечной реабилитации у пациентов с SBS в обеих испытанных дозах (5 и 10 мг), хотя различий в реакции не наблюдалось. Предполагается, что композиции апраглутида по настоящему описанию могут облегчать уход за пациентом и способствовать соблюдению режима, позволяя вводить препарат один раз в неделю, а не ежедневно, что, в свою очередь, может улучшить качество жизни. Уменьшение частоты инъекций может повысить переносимость препарата пациентами и снизить риск реакций в месте инъекции. Эти результаты показывают, что лечение апраглутидом приводит к увеличению кишечной абсорбции за счет содействия кишечной адаптации. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, эти результаты показывают, что лечение апраглутидом *in vivo* может улучшить абсорбцию сырой массы кишечника у пациента с SBS-IF и, следовательно, может применяться в терапевтических условиях.

Способы

Дизайн исследования и участники

[00413] Исследование, описанное в примере 5, было двойным слепым, перекрестным, рандомизированным, плацебо-контролируемым фазы 2, за которым следовал дополнительный период лечения в открытом режиме. В исследование были включены восемь взрослых пациентов (в возрасте от ≥ 18 до ≤ 80 лет) с SBS-IF. Приемлемость пациентов оценивалась во время скринингового визита. Основные критерии включения включали следующее: Пациенты с SBS, вторичным по отношению к хирургической резекции тонкой кишки с еюно- или илеостомией, по меньшей мере 6 месяцев после последней резекции кишки, выделение фекалий по меньшей мере 1500 г/сутки, зарегистрированный в течение последних 18 месяцев, и инфузии PS ≥ 3 раз в неделю в течение ≥ 12 месяцев в соответствии с медицинской картой пациента. Пациенты были исключены, если у них были клинические признаки активности воспалительного заболевания кишечника, рак в анамнезе в течение ≤ 5 лет или неадекватная функция печени, почек или сердца. Также исключались пациенты, получавшие нативный GLP-2 или аналог GLP-2 в течение последних 3 месяцев.

[00414] Как показано на ФИГ. 4, клиническое исследование состояло из двух частей: частей A и B. Часть A представляла собой двойное слепое перекрестное рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. В части A пациенты получали 5 мг апраглутида или плацебо один раз в неделю в течение 4 недель. После периода вымывания в течение 6–10 недель проводилось альтернативное лечение. За частью A следовал второй период вымывания продолжительностью 6–10 недель, прежде

чем пациенты переходили к части В. Часть В представляла собой открытый режим дозирования с применением 10 мг апраглутида один раз в неделю в течение 4 недель. Дополнительный открытый период лечения (часть В) был включен для изучения безопасности и переносимости дозы 10 мг. Процедуры в течение каждого периода лечения были последовательными. Исследуемый препарат был предоставлен в виде лиофилизированного порошка для восстановления и вводился в виде подкожных инъекций в область живота.

Процедуры

[00415] Оценки безопасности проводили для каждого периода лечения и включали наблюдение за реакциями в месте инъекции, жизненно важными показателями, образцами крови, электрокардиограммой (ЭКГ), анализом мочи с помощью индикаторных полосок, массы тела и ферментов печени. Они проводились на исходном уровне, во время каждой инъекции исследуемого препарата (предварительная доза и в последовательные моменты времени), через четверо суток после первой инъекции активного препарата, в конце каждого периода лечения и через 4–6 недель после последней дозы в конце исследования, как показано в таблице 15. Кроме того, перед каждым введением препарата измеряли ферменты печени.

Таблица 15

	Местная переносимость	Показатели жизненно важных функций	Образцы крови	ЭКГ	Анализ мочи с помощью индикаторных полосок	Масса тела
Визит а исходном уровне		X	X	X	X	X
1-е введение апраглутида						
Предварительная доза		X	X	X	X	X
Через 0,5 ч после введения	X					
Через 1 ч после введения	X	X		X		
Через 2 ч после введения		X	X		X	
Через 3 ч после введения	X					
Через 4 ч после введения		X				
Через 6 ч после введения		X	X	X	X	

Через 4 суток после 1-го введения апраглутида		X	X	X	X	X
2-е введение апраглутида						
Предварительная доза		X	X	X	X	X
Через 0,5 ч после введения	X					
Через 1 ч после введения	X					
Через 3 ч после введения	X					
Через 4 ч после введения		X	X	X	X	
Завершение лечения		X	X	X	X	X
Последующее наблюдение для оценки безопасности (4–6 недель после последнего введения в конце исследования)		X	X	X	X	X

[00416] Оценку эффективности проводили для каждого периода лечения продолжительностью 29 суток. Пациенты получали бумажный дневник для записи объема PS, собранной мочи и перорально принятой жидкости в определенные моменты времени. Пациенты выполняли дома сбор мочи за 48 часов в начале исследования (сутки от –2 до 1), сразу после первой инъекции препарата (сутки 1–3) и в конце периода лечения (сутки 27–29, через 5 суток после четвертого введения исследуемого препарата). Моча собиралась пациентом в контейнер для мочи с маркировкой объема, и 48-часовые объемы мочи регистрировались в дневнике. После завершения 48-часового сбора пациенты переливали приблизительно 100 мл мочи из контейнера в тару для образца и доставляли при следующем своем визите. Затем рассчитывали количество натрия, выделяемого за 48 часов, как концентрацию натрия в образце, умноженную на общий объем собранной мочи. Во время каждого сбора мочи еженедельный объем и содержание PS и суточное пероральное потребление жидкости сохранялись постоянными. Поскольку эти показатели оставались постоянными, увеличение объема мочи было признаком повышенной абсорбции жидкости. Пациентов проинформировали о необходимости составить 24-часовое питьевое меню на основе их обычного перорального потребления жидкости во время исходного визита (сутки –3). Пациенты должны были придерживаться своего

питьевого меню в каждый период сбора мочи, а сопутствующее 48-часовое пероральное потребление жидкости регистрировалось в дневнике во время каждого сбора мочи.

[00417] Пациенты были проинформированы о необходимости регистрации спонтанного перорального приема жидкости в сутки 20–22 в течение 48 часов. Это измерение было включено, чтобы выяснить, связано ли повышение кишечной абсорбции со снижением спонтанного перорального потребления жидкости.

[00418] В сутки 4 и 24 снижение объема PS было разрешено исследователем, если это было клинически необходимым. Из-за относительно короткого периода лечения, составляющего 4 недели, объем PS уменьшался только в том случае, если у пациентов были клинические признаки задержки жидкости (такие как отеки и чрезмерное непреднамеренное увеличение веса). Уменьшение объема PS оценивали в течение суток 20–22. Пациенты возвращались к своему исходному объему и содержанию PS в конце периода сбора мочи (сутки 27–29). Прием сопутствующих препаратов, включая ингибиторы протонной помпы, лоперамид и опиаты, оставался неизменным на протяжении всего исследования. При необходимости можно было внести коррективы в питьевое меню и объем и содержание PS между периодами лечения после обсуждения между пациентом и исследователем.

[00419] Массу тела измеряли с помощью напольных весов. Композиционный состав тканей измеряли с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (денситометр Norland XR-36 DXA, Форд Аткинсон, Висконсин, США) в начале лечения и в конце лечения.

[00420] Образцы крови для анализа концентрации апраглутида в плазме и L-цитруллина в плазме натошак, маркера массы эритроцитов, собирали на исходном уровне, во время первой и второй лечебной инъекции, через четверо суток после первой лечебной инъекции и в конце лечения. Образец крови анализа содержания L-цитруллина в плазме также собирали через 4–6 недель после последней дозы натошак в конце исследования. Образец крови на антитела к апраглутиду собирали в начале исследования, в конце лечения и через 4–6 недель после последней дозы в конце исследования.

Анализ концентрации натрия в моче

[00421] Натрий в моче измеряли с помощью модульного анализатора серии COBAS 8000 с применением системы ион-специфических электродов (Roche Diagnostics, Индианаполис, Индиана) с нижним пределом количественного определения 10 ммоль/л. Если содержание натрия в моче было ниже нижнего предела количественного определения, образцы анализировали методом пламенной фотометрии.

Анализ концентрации апраглутида и L-цитруллина в плазме

[00422] Количественное определение апраглутида и L-цитруллина проводили с применением валидированного способа на основе ЖХ-МС. Для апраглутида аналитический способ включал очистку твердофазной экстракцией интактной молекулы апраглутида и его внутреннего стандарта. Соединения идентифицировали и количественно определяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с обнаружением МС/МС с применением квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex API 5000. Для образцов ниже количественного определения 5,00 нг/мл соединения идентифицировали и количественно определяли с помощью СВЭЖХ с обращенной фазой с обнаружением МС/МС с применением квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex API 5500. Для L-цитруллина аналитический способ включал захват и экстракцию белка L-цитруллина и его внутреннего стандарта. Соединения идентифицировали и количественно определяли с помощью ВЭЖХ гидрофильных взаимодействий с обнаружением МС/МС с применением квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex API 5000.

Анализ на наличие антител к апраглутиду

[00423] Для обнаружения антител к апраглутиду в сыворотке использовали полностью валидированную методику ELISA в соответствии с трехуровневым подходом. На первом уровне антитела против апраглутида, присутствующие в образцах и контролях, связаны с апраглутидом, обездвиженным на планшете для микротитрования. Затем связанные антитела к апраглутиду обнаруживали с помощью протеина A/G и белка L. Образец с сигналом выше валидированного порога скрининга считался потенциально положительным и затем тестировался на втором уровне в подтверждающем анализе. Для этого образцы предварительно обрабатывали избытком апраглутида перед их тестированием в описанном выше анализе. Ингибирование сигнала, равное или превышающее валидированную подтверждающую точку отсечения, подтверждало наличие антител. Образцы затем были зарегистрированы как положительные на антитела к апраглутиду. Затем определяли титры путем серийного разведения всех подтвержденных положительных образцов.

Статистический анализ

[00424] Был применен перекрестный дизайн, в котором каждый пациент выступал в качестве своего собственного контроля, чтобы исключить вариабельность между субъектами и уменьшить влияние смещения независимых переменных.

[00425] Безопасность оценивали у всех пациентов, получивших по меньшей мере одну дозу исследуемого препарата (активного или плацебо). Эффективность оценивали в соответствии с модифицированным принципом «все пациенты, рандомизированные для анализа», включая всех рандомизированных пациентов с по меньшей мере одним достоверным измерением эффективности после исходного уровня (полная выборка для анализа).

[00426] Были проведены два различных статистических анализа: версия только для части A и полная версия для частей A + B. Версия для части A была основана на перекрестном дизайне 2×2, тогда как версия частей A + B предполагала отсутствие эффекта периода, чтобы оценить контрасты между тремя различными видами лечения (плацебо, 5 мг и 10 мг). В результаты были включены как версия для части A, так и версия частей A + B статистического анализа. Анализ части A проводили в рандомизированном и слепом режиме. Анализ частей A + B включили для сравнения плацебо, 5 мг и 10 мг.

Ковариационный анализ был применен для оценки эффектов апраглутида. В анализ включили специфические для периода исходные значения зависимой переменной, объема перорального потребления жидкости и объема PS. Все статистические тесты проводили с применением двустороннего критерия с уровнем значимости 5%. Оценки были представлены с приблизительными 95% доверительными интервалами и р-значениями. Для анализа применяли SAS версии 9.4.

Пример 6. Клиническое исследование метаболического баланса фазы 2

[00427] В следующем не имеющего ограничительного характера примере описаны результаты клинического исследования фазы 2, в котором субъектов с синдромом короткой кишки с кишечной недостаточностью и с синдромом короткой кишки с кишечным расстройством лечили с применением лекарственных форм апраглутида по настоящему описанию. В этом исследовании фазы 2 изучали безопасность и эффективность лекарственных форм апраглутида по настоящему описанию.

[00428] Лечение аналогами глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2) способствует адаптации кишечника у пациентов с синдромом короткой кишки (SBS). Апраглутид представляет собой новый аналог GLP-2 длительного действия, предназначенный для приема один раз в неделю. В этом исследовании фазы 2 изучали безопасность и эффективность апраглутида в дозе 5 мг один раз в неделю у пациентов с синдромом короткой кишки с кишечным расстройством (SBS-IF) и с синдромом короткой кишки с кишечной недостаточностью (SBS-II). В этом открытом исследовании 8 взрослых пациентов с SBS-IF (n = 4) или SBS-II (n = 4) и массой выделяемого кала во влажном

состоянии ≥ 1500 г/сутки получали апраглутид один раз в неделю подкожно в дозе 5 мг в течение 4 недель. Безопасность была основной конечной точкой. В качестве вторичных конечных точек были изучены изменения по сравнению с исходным уровнем кишечной абсорбции сырой массы, энергии (измеренной методом бомбовой калориметрии) и электролитов, а также масса выделяемого кала во влажном состоянии и объем выделяемой мочи с помощью 72-часовых исследований метаболического баланса. Распространенные нежелательные явления, связанные с лечением, соответствовали физиологическому действию GLP-2 и включали в себя снижение выделения через стому ($n = 6$), осложнения стомы ($n = 6$), тошноту ($n=5$), метеоризм ($n=4$), полиурию ($n=3$) и боль в животе ($n=3$). Прием апраглутида один раз в неделю значительно повышал абсорбцию энергии, сырой массы и электролитов, снижал массу выделяемого кала во влажном состоянии и увеличивал выработку мочи (таблица 16).

Таблица 16

	Расчетное абсолютное изменение среднего относительно исходного уровня (95% ПИ и р-)
Абсорбция сырой массы	741 (от 194 до 1287; $p<0,05$)
Абсорбция энергии (кДж/сутки)	1095 (от 196 до 1994; $p<0,05$)
Масса выделяемого кала во влажном состоянии (г/сутки)	-680 (от -1200 до -159; $p<0,05$)
Вырабатываемая моча	560 (от 72 до 1048; $p<0,05$)
Абсорбция натрия	38 (от 3 до 74; $p<0,05$)
Абсорбция калия	18 (от 4 до 32; $p<0,05$)

Результаты

[00429] Девять пациентов проходили скриннинг. Один пациент не соответствовал критериям включения по критерию массы выделяемого кала ≥ 1500 г/сутки и объема мочи < 2000 мл/сутки (по оценке в ходе базового исследования метаболического баланса). Восемь пациентов получили дозу в ходе исследования. Все восемь пациентов завершили исследование и составили полную выборку для анализа и выборку для анализа безопасности, как показано на ФИГ. 13. Демографические и исходные характеристики пациентов приведены в таблице 17. Данные в таблице 17 представляют собой среднее значение (SD) или N (%), а парентеральную поддержку (PS) планировали как PS в начале исследования на основе среднего значения за неделю.

Таблица 17

	SBS-II (N=4)	SBS-IF (N=4)	Всего (N=8)
Возраст (лет)	64,5 (3,4)	57,5 (20,0)	61,0 (13,8)
Пол			
Женский	2 (50%)	3 (75%)	5 (62,5%)
Мужской	2 (50%)	1 (25%)	3 (37,5%)
Масса тела на исходном уровне	83,2 (18,5)	62,5 (11,2)	72,8 (18,0)
Индекс массы тела (кг/м ²)	28,6 (5,1)	22,7 (4,2)	25,6 (5,4)
Раса, европеоидная	4 (100%)	4 (100%)	8 (100%)
Объем парентеральной поддержки (мл/сутки)		2230 (889)	
Энергия парентеральной поддержки (кДж/сутки)		2823 (3579)	
Вырабатываемая моча (г/сутки)	1423 (212)	1370 (284)	1397 (234)
Потребление пищи (г/сутки)	5710 (1519)	3255 (1006)	4482 (1773)
Масса выделяемого кала (г/сутки)	3419 (2015)	3243 (1339)	3331 (1587)
Причина резекции			
Болезнь Крона	3 (75%)	0	3 (37,5%)
Мезентерическое сосудистое заболевание	1 (25%)	1 (25%)	2 (25%)
Послеоперационные осложнения в связи с язвенным колитом	0	3 (75%)	3 (37,5%)
Характеристики заболевания			
Длина тонкой кишки (см)	180 (42)	155 (125)	168 (87)
Концевая еюностомия	2 (50%)	2 (50%)	4 (50%)
илеостомия	2 (50%)	2 (50%)	4 (50%)
Нарушение целостности толстой кишки	0	0	0
Сопутствующее лечение			
Ингибитор протонного насоса	4 (100%)	3 (75%)	7 (87,5%)
Опиоиды или агонисты опиоидов	3 (75%)	3 (75%)	6 (75%)
Лоперамид	2 (50%)	1 (25%)	3 (37,5%)

Результаты анализа безопасности

[00430] Все пациенты испытали по меньшей мере одно нежелательное явление, связанное с лечением. Нежелательные явления были легкой или умеренной степени.

Распространенные нежелательные явления обобщены в таблице 18 (данные представлены как N или N (%)). Нежелательные явления, которые наблюдались у > 2 пациентов и включали в себя снижение желудочно-кишечного выделения через стому (n = 6), осложнения стомы (n = 6), осложнения стомы со стороны желудочно-кишечного тракта (n = 5), тошноту (n = 5), нарушение желудочно-кишечного выделения через стому (n = 4), метеоризм (n = 4), полиурию (n = 3) и боль в животе (n = 3). У одного пациента развились преходящие реакции в месте инъекции (местная эритема и зуд) после одной инъекции, которые не были связаны с наличием антител к апраглутиду. Три пациента ранее получали нативный GLP-2 или другой аналог GLP-2 в рамках клинического исследования

(минимум за 16 месяцев до включения в исследование). Всего у двух пациентов произошло три серьезных нежелательных явления (СНЯ). Одно СНЯ, связанное с болью в животе, требующей госпитализации, было расценено как связанное с исследуемым препаратом. Боли в животе лечили консервативно, и пациент был выписан менее чем через 24 часа. Временное прекращение и повторное введение сниженной дозы позволило пациенту завершить исследование. Оставшиеся два СНЯ не считались связанными с апраглутидом. Они включали в себя один случай острого повреждения почек из-за обезвоживания у пациента с SBS-II и один случай CRBSI у пациента с SBS-IF. Двум дополнительным пациентам потребовалось снижение дозы для завершения исследования. У одного пациента с SBS-II были признаки задержки жидкости после первого введения препарата, поэтому второе и третье введения были выполнены в уменьшенной дозе. Четвертое/последнее введение было проведено в полной дозе (5 мг) без дальнейших осложнений. У одного пациента возник запор после первого введения препарата, и, следовательно, второе введение было выполнено в уменьшенной дозе. Полная доза была повторно введена в третье и четвертое/последнее введение без дальнейших осложнений.

Таблица 18

	SBS-II (N=4)	SBS-IF (N=4)	Всего (N=8)
Любое нежелательное явление	4	4	8 (100%)
Снижение желудочно-кишечного выделения через стому	3	3	6 (75%)
Осложнения со стомой	3	3	6 (75%)
Осложнение со стороны желудочно-кишечного тракта в связи со стомой	3	2	5 (62,5%)
Тошнота	1	4	5 (62,5%)
Затруднение выхода из желудочно-кишечного тракта в стому	3	1	4 (50%)
Метеоризм	3	1	4 (50%)
Полиурия	2	1	3 (37,5%)
Боль в животе	1	2	3 (37,5%)
Увеличение массы	2	0	2 (25%)
Задержка жидкости	1	1	2 (25%)

[00431] Никаких опасений по поводу безопасности в отношении основных показателей жизнедеятельности, образцов крови, ЭКГ, анализа мочи или массы тела не возникало. В ходе исследования у одного пациента с SBS-IF выработались антитела к апраглутиду.

Результаты анализа на антитела были отрицательными после периода вымывания 4–6 недель. Пациент ранее получал лечение аналогом GLP-2 в рамках клинических исследований в 2016 году. Не было обнаружено эффектов антител к апраглутиду на фармакокинетический профиль, фармакодинамический ответ на апраглутид, а также на количество или продолжительность нежелательных явлений. Ни один из пациентов не прекратил участие в исследовании из-за нежелательных явлений, и летальных исходов не было.

Конечные точки анализа эффективности

Сырая масса

[00432] Индивидуальные изменения по сравнению с исходным уровнем после лечения апраглутидом показателей сырой массы потребляемой пищи, массы выделяемого кала, мочи и абсорбции показаны на ФИГ. 14. Как показано в таблице 19, применение апраглутида не имело влияния на показатель сырой массы потребляемой пищи. В таблице 19 данные представлены как скорректированное среднее (95% ДИ), а расчеты основаны на изменениях от исходного уровня до конца лечения. Апраглутид увеличивал кишечную абсорбцию сырой массы на 741 г/сутки (95% ДИ от 194 до 1287; $P = 0,015$), как показано в таблице 19. Апраглутид значительно уменьшал массу выделяемого кала на 680 г/сутки (95% ДИ от –1200 до –159; $P = 0,018$) и повышал объем выделяемой мочи на 560 г/сутки (95% ДИ от 72 до 1048; $P = 0,030$), как показано в таблице 19.

Таблица 19

	Потребление пищи	Масса выделяемого кала	Моча	Абсорбция
Сырая масса (г/сутки)	61 (от –84,0 до 207); $P=0,352$	–680 (от –1200 до –159); $P=0,018$	560 (от 72 до 1048); $P=0,030$	741 (от 194 до 1287); $P=0,015$
Энергия (кДж/сутки)	154 (от –1006 до 1314); $P=0,763$	–941 (от –2438 до 556); $P=0,181$	-	1 095 (от 196 до 1994); $P=0,024$
Углеводы (кДж/сутки)	154 (от –268 до 575); $P=0,418$	–365 (от –772 до 43); $P=0,072$	-	518 (от 112 до 924); $P=0,019$
Жиры (кДж/сутки)	67 (от –638 до 771); $P=0,830$	–309 (от –969 до 351); $P=0,304$	-	376 (от 61 до 691); $P=0,026$

Белки (кДж/сутки)	-41 (от -274 до 191); $P=0,688$	-145 (от -497 до 207); $P=0,362$	-	104 (от -205 до 412); $P=0,453$
Натрий (ммоль/сутки)	-5 (от -30 до 21); $P=0,680$	-43 (от -92 до 6); $P=0,077$	27 (от 5 до 49); $P=0,024$	38 (от 3 до 74); $P=0,039$
Калий (ммоль/сутки)	4 (от -5 до 12); $P=0,337$	-15 (от -32 до 3); $P=0,086$	13 (от 6 до 20); $P=0,003$	18 (от 4 до 32); $P=0,020$
Магний (ммоль/сутки)	1 (от -2 до 3); $P=0,561$	0 (от -9 до 9); $P=0,961$	1 (от -1 до 2); $P=0,411$	0 (от -9 до 9); $P=0,930$
Кальций (ммоль/сутки)	-2 (от -5 до 2); $P=0,367$	-13 (от -36 до 11); $P=0,255$	0 (от -1 до 1); $P=0,419$	11 (от -13 до 35); $P=0,313$

Электролиты

[00433] Апраглутид увеличивал абсорбцию натрия и калия на 38 ммоль/сутки (95% ДИ от 3 до 74; $P = 0,039$) и 18 ммоль/сутки (95% ДИ от 4 до 32; $P = 0,020$), как показано в таблице 19. Экскреция натрия и калия с мочой увеличилась на 27 ммоль/сутки (от 5 до 49; $P = 0,024$) и 13 ммоль/сутки (95% ДИ от 6 до 20; $P = 0,003$) соответственно, как показано в таблице 19. Как показано в таблице 19, изменений в абсорбции или экскреции с мочой магния и кальция не наблюдалось. Как показано в таблице 19, содержание электролитов в потребляемой пище и массе выделяемого кала не изменилось. Отдельные изменения абсорбции электролитов по сравнению с исходным уровнем показаны на ФИГ. 15.

Энергия и макроэлементы

[00434] На ФИГ. 16 показаны отдельные изменения по сравнению с исходным уровнем содержания энергии в потребляемой пище, выделяемом кале и абсорбции. Как показано в таблице 19, апраглутид не изменял общее потребление энергии с пищей или какого-либо отдельного макроэлемента. По сравнению с исходным уровнем апраглутид увеличивал абсорбцию энергии кишечником на 1095 кДж/сутки (95% ДИ от 196 до 1994; $P = 0,024$), как показано в таблице 19. Предположение об улучшении абсорбции энергии подтвердилось: содержание энергии в выделяемом кале снизилось на 941 кДж/сутки (95% ДИ от -2438 до 556 $P = 0,181$), как показано в таблице 19. Абсорбция углеводов и жиров значительно увеличилось на 518 кДж/сутки (95% ДИ от 112 до 924; $P = 0,019$) и 376 кДж/сутки (95% ДИ от 61 до 691; $P = 0,026$), как показано в таблице 19. Абсорбция белка увеличилась на 104 кДж/сутки (95% ДИ от -205 до 412; $P = 0,453$), как показано в

таблице 19. Отдельные изменения в абсорбции макроэлементов нанесены на график на ФИГ. 17.

Масса тела и композиционный состав тканей

[00435] Масса тела увеличивалась на 1,8 кг (95% ДИ от 0,4 до 3,1; $P = 0,016$) через четыре недели лечения апраглутидом. Безжировая масса тела значительно увеличилась на 1,7 кг (95% ДИ от 0,8 до 2,6; $P = 0,003$), а масса жировой ткани уменьшилась на 1,1 кг (95% ДИ от -2,1 до -0,0; $P = 0,044$). Не наблюдалось значительного изменения содержания минералов в костной ткани, которое изменилось на -20 г (95% ДИ от -58 до 19; $P = 0,268$).

Цитруллин

[00436] По сравнению с исходным уровнем апраглутид повышал абсолютную и относительную концентрацию L-цитруллина в плазме на 15,2 мкмоль/л (95% ДИ от 3,3 до 27,1; $P = 0,019$) и 66% (95% ДИ от 3 до 128; $P = 0,043$) соответственно.

Фармакокинетика

[00437] Концентрация апраглутида в плазме быстро увеличивалась после введения дозы, причем максимальная средняя концентрация 118,0 нг/мл достигалась в среднем через 29,5 часа. Средний период полувыведения составил 27,0 часов, а средний клиренс — 0,9 л/ч. W

Краткое описание примера 6

[00438] Результаты, описанные в примере 6, демонстрируют, что апраглутид в дозе 5 мг, вводимый один раз в неделю, был безопасным и хорошо переносимым пациентами с SBS-II и SBS-IF после четырех недель лечения и продемонстрировал положительное влияние на абсорбцию в кишечнике, что в клинических условиях устранило бы или снизило бы потребность в PS.

[00439] Побочные эффекты соответствовали известным физиологическим эффектам GLP-2. По сообщениям, сопутствующие нежелательные явления были желудочно-кишечного происхождения, но по существу были легкими и краткосрочными.

[00440] Апраглутид значительно увеличивал абсорбцию кишечника сырой массы, энергии и электролитов (натрия и калия). Улучшение абсорбции сопровождалось значительным снижением массы выделяемого кала во влажном состоянии и увеличением выработки мочи и экскреции электролитов с мочой (натрия и калия). Изменения в выработке мочи, обнаруженные в этом исследовании, считаются клинически значимыми, поскольку они могут способствовать снижению PS или восстановлению энтеральной

автономии у пациентов с SBS-IF. Предполагается, что эти улучшения могут в конечном итоге также снизить риск развития интермиттирующего или хронического IF у пациентов с SBS-II и облегчить тяжесть симптомов нарушения абсорбции.

[00441] Фармакокинетический профиль апраглутида поддерживал режим дозирования один раз в неделю.

[00442] Апраглутид представляет собой первый аналог GLP-2, улучшающий абсорбцию энергии у всех пациентов с SBS при измерении методом бомбовой калориметрии, который считается золотым стандартом лабораторного способа количественной оценки абсорбции энергии кишечником. Для отдельных макроэлементов апраглутид увеличивал абсорбцию углеводов и жиров, в то время как абсорбция белков оставалась неизменной. Как должно быть понятно специалисту в данной области, на более поздних этапах клинической разработки отказ от PS при снижении потребности в энергии считается свидетельством улучшенной абсорбции энергии.

[00443] Фармакокинетический профиль апраглутида допускал поддержку постоянной концентрации, что может объяснить улучшение абсорбции энергии.

[00444] Апраглутид значительно увеличивал массу тела и безжировую массу тела, а также уменьшал массу жировой ткани, что, как должно быть понятно специалистам в данной области, указывает на возможное улучшение состояния гидратации.

[00445] Апраглутид не изменял сырую массу или энергетическую ценность потребляемой пищи. Хотя пероральное потребление жидкости было фиксированным, потребление твердой пищи не ограничивалось. GLP-2 не оказывал существенного влияния на аппетит или чувство сытости после приема пищи у здоровых людей. Снижение потребления пищи может быть нежелательным побочным эффектом у пациентов с SBS, которые зависят от гиперфагии для компенсации потерь при кишечной абсорбции. Длительное лечение GLP-2 позволило пациентам снизить потребление пищи при сохранении той же степени абсорбции. Таким образом, предполагается, что введение апраглутида может облегчить потребность в тяжелой гиперфагии, которая является преобладающим симптомом, особенно у пациентов с тяжелым SBS-II.

[00446] Апраглутид значительно повышал уровень L-цитруллина в плазме, маркер массы энтероцитов, подтверждая ожидаемые проадаптивные эффекты. GLP-2 также ингибировал моторику желудочно-кишечного тракта и снижал секрецию желудочного сока и, таким образом, мог увеличивать воздействие энтероцитов на содержимое кишечника. Мезентерический кровоток также может стимулироваться GLP-2, что может увеличить абсорбцию питательных веществ. GLP-2 может также активировать транспортные белки, как показано в исследованиях на животных.

[00447] Результаты, описанные в примере 6, показывают, что лечение апраглутидом в дозе 5 мг еженедельно в течение четырех недель безопасно и хорошо переносится пациентами с SBS-IF и SBS-II. Эти результаты впервые демонстрируют, что аналог GLP-2 один раз в неделю значительно улучшает абсорбцию сырой массы, энергии, электролитов и увеличивает выработку мочи. Для апраглутида требуются инъекции всего лишь раз в неделю, что может уменьшить количество инъекций и способствовать уходу за пациентом и соблюдению графика. Уменьшение частоты инъекций также может повысить переносимость препарата пациентами и снизить риск реакций в месте инъекции.

[00448] Прием апраглутида один раз в неделю увеличивал кишечную абсорбцию жидкости, электролитов и энергии. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, эти результаты показывают, что лечение пациентов композицией апраглутида по настоящему описанию может улучшить кишечную абсорбцию сырой массы и энергии у пациента с SBS-IF и, следовательно, может применяться в терапевтических условиях.

Способы

Дизайн исследования и участники

[00449] Всего было обследовано девять взрослых пациентов (в возрасте от ≥ 18 до ≤ 80 лет) с SBS, восемь из которых были включены в исследование: четыре пациента с SBS-II и четыре пациента с SBS-IF. Обе подгруппы пациентов были включены для изучения безопасности и эффективности апраглутида при различных заболеваниях. Приемлемость пациентов оценивалась во время скринингового визита. Основными критериями включения были следующие: SBS, вторичный по отношению к хирургической резекции тонкой кишки с толстой кишкой или без нее; по меньшей мере шесть месяцев после последней хирургической резекции кишечника; и тяжелая степень нарушения абсорбции, определяемая как масса выделяемого кала во влажном состоянии ≥ 1500 г/сутки и объем вырабатываемой мочи < 2000 мл/сутки. Масса выделяемого кала и объем вырабатываемой мочи были подтверждены во время осмотров на исходном уровне. Пациенты были исключены, если у них были клинические признаки активности воспалительного заболевания кишечника, рак в анамнезе в течение пяти лет или неадекватная функция печени, почек или сердца. Пациентов также исключали, если они были беременны или кормили грудью, имели положительный тест на ВИЧ, гепатит В или С, были госпитализированы в течение одного месяца до визита для скрининга или получали нативный GLP-2 или аналог GLP-2 в течение последних трех месяцев.

Процедуры

[00450] Пациентов лечили апраглутидом в дозе 5 мг один раз в неделю в течение четырех недель. Апраглутид поставлялся в виде лиофилизированного порошка для восстановления в стерильной воде перед инъекцией, а лечебные дозы вводили в виде подкожных инъекций в область живота. На исходном уровне и в конце периода лечения (через одни сутки после четвертой и последней инъекции апраглутида) проводили 72-часовое исследование метаболического баланса. Каждое 72-часовое исследование метаболического баланса проводили во время пятидневной госпитализации. В день поступления пациентов попросили составить 24-часовое питьевое меню на основе их привычного перорального потребления жидкости. Питьевое меню должно было соблюдаться во время каждого исследования баланса. На вторые сутки госпитализации, сразу после того, как пациенты помочились и опорожнили мешочки стомы или испражнились, было начато исследование баланса. Пациентов попросили собирать свои выделения кала, мочу и точную копию потребляемой ими пищи (жидкости и твердые вещества отдельно) в соответствующие ведра, которые заменяли через 24 часа. Пациенты имели свободный доступ к пище, но ежедневный PS (объем и содержание) и пероральное потребление жидкости оставались постоянными в течение исходного периода и периодов исследования метаболического баланса после лечения. Ежедневно прием PS и пероральное потребление жидкости оставались постоянными, что позволило сопоставить показатели исходного уровня и последующего лечения с точки зрения измерения эффекта лечения. При поступлении документировали ежедневный PS и соблюдение заранее определенного питьевого меню. Прием сопутствующих препаратов, включая ингибиторы протонной помпы, лоперамид и опиаты, оставался неизменным на протяжении всего исследования.

[00451] Содержимое ведер взвешивали, обрабатывали сухим веществом и анализировали, как описано ранее: энергию — методом бомбовой калориметрии, азот — по методу Кьельдаля, жиры — по модифицированному методу титрования Ван-де-Камера, углеводы — способом Энглиста, натрий и калий — по методу пламенной фотометрии и кальций и магний — с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии. Среднее значение за 24 часа рассчитывали на основе трех 24-часовых периодов. Абсолютные изменения рассчитывали как разницу между исходным уровнем и значением после лечения. Относительные изменения рассчитывали как абсолютные изменения, деленные на исходные значения, умноженные на 100.

[00452] Массу тела измеряли с помощью напольных весов. Композиционный состав тканей измеряли с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии

(денситометр Norland XR-36 DXA, Норлэнд, Форд Аткинсон, Висконсин, США) на исходном уровне и в период после лечения.

[00453] В больнице были выполнены первая, вторая и четвертая инъекции апраглутида. Оценка безопасности включала в себя наблюдение за реакциями в месте инъекции, жизненно важными показателями, образцы крови, электрокардиограмму (ЭКГ), анализ мочи и массу тела. Они проводились на исходном уровне, во время каждой инъекции исследуемого препарата, через четверо суток после первой инъекции активного препарата, в конце лечения и через 4–6 недель после последней дозы в конце исследования, как показано в таблице 20. Перед каждым введением препарата измеряли ферменты печени.

Таблица 20

	Местная переносимость	Показатели жизненно важных функций	Образцы крови	ЭКГ	Анализ мочи с помощью индикаторных полосок	Масса тела
Визит а исходном уровне			X	X	X	X
1-е введение апраглутида						
Предварительная доза		X	X	X	X	X
Через 0,5 ч после введения	X					
Через 1 ч после введения	X	X		X		
Через 2 ч после введения			X		X	
Через 3 ч после введения	X					
Через 4 ч после введения		X				
Через 6 ч после введения			X	X	X	
Через 4 суток после 1-го введения апраглутида				X	X	X
2-е введение апраглутида						
Предварительная доза			X	X	X	X
Через 0,5 ч после введения	X					

Через 1 ч после введения	X					
Через 3 ч после введения	X					
Через 4 ч после введения		X	X	X	X	
4-е введение апраглутида						
Предварительная доза		X		X		X
Через 0,5 ч после введения	X					
Через 1 ч после введения	X					
Через 3 ч после введения	X					
Завершение лечения			X		X	X
Последующее наблюдение для оценки безопасности (4–6 недель после последнего введения в конце исследования)			X	X	X	X

[00454] Образцы крови для анализа концентрации апраглутида в плазме и L-цитруллина в плазме натошак, маркер массы эритроцитов собирали на исходном уровне, во время первой и второй инъекции (предварительная доза и в последовательные моменты времени), через четверо суток после первой инъекции и в конце лечения. Отбор образцов крови для анализа фармакокинетики апраглутида также проводили после четвертой и последней инъекции в течение периода 96 часов. Образец крови анализа содержания L-цитруллина в плазме также собирали через 4–6 недель после последней дозы натошак в конце исследования. Образцы крови на антитела к апраглутиду собирали на исходном уровне, в конце лечения и во время последующего визита через 4–6 недель. Все восемь пациентов дали отрицательный результат на антитела к апраглутиду на исходном уровне.

Результаты

[00455] Первичной конечной точкой этого исследования была безопасность. Вторичными конечными точками были абсолютные и относительные изменения по сравнению с исходным уровнем потребления пищи, выделения с калом и абсорбции сырой массы, энергии, макроэлементов и электролитов, выработки мочи, выделения электролитов с

мочой, массы тела, состава тканей, содержания минералов в костной ткани, L-цитруллина в плазме, а также фармакокинетические профили. В настоящем описании представлены только абсолютные изменения, за исключением изменений L-цитруллина в плазме по сравнению с исходным уровнем.

Анализ концентрации апраглутида и L-цитруллина в плазме

[00456] Количественное определение апраглутида и L-цитруллина проводили с применением валидированного способа на основе ЖХ-МС. Для апраглутида аналитический способ включал очистку твердофазной экстракцией интактной молекулы апраглутида и его внутреннего стандарта. Соединения идентифицировали и количественно определяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с обнаружением МС/МС с применением квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex API 5000. Для образцов ниже количественного определения 5,00 нг/мл соединения идентифицировали и количественно определяли с помощью СВЭЖХ с обращенной фазой с обнаружением МС/МС с применением квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex API 5500. Для L-цитруллина аналитический способ включал захват и экстракцию белка L-цитруллина и его внутреннего стандарта. Соединения идентифицировали и количественно определяли с помощью ВЭЖХ гидрофильных взаимодействий с обнаружением МС/МС с применением квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex API 5000.

Анализ на наличие антител к апраглутиду

[00457] Для обнаружения антител к апраглутиду в сыворотке использовали полностью валидированную методику ELISA в соответствии с трехуровневым подходом. На первом уровне антитела против апраглутида, присутствующие в образцах и контролях, связаны с апраглутидом, обездвиженным на планшете для микротитрования. Затем связанные антитела к апраглутиду обнаруживали с помощью протеина A/G и протеина L. Образец с сигналом выше валидированного порога скрининга считался потенциально положительным и затем тестировался на втором уровне в подтверждающем анализе. Для этого образцы предварительно обрабатывали избытком апраглутида перед их тестированием в описанном выше анализе. Ингибирование сигнала, равное или превышающее валидированную подтверждающую точку отсечения, подтверждало наличие антител. Образцы затем были зарегистрированы как положительные на антитела к апраглутиду. Затем определяли титры путем серийного разведения всех подтвержденных положительных образцов.

Статистический анализ

[00458] Статистический тест скорректированного среднего изменения от исходного уровня до конца лечения был проведен с применением парного t-критерия. Все статистические тесты проводили с применением двустороннего критерия с уровнем значимости 5%. Оценки были представлены с приблизительными 95% доверительными интервалами и р-значениями. Для анализа использовали SAS версии 9.4.

Пример 7. Фармакокинетическая/фармакодинамическая оценка

Демографические и другие характеристики на исходном уровне

[00459] В исследовании приняли участие 11 женщин и 13 мужчин. Демографические и исходные данные обобщены в таблице 21. Ни о какой соответствующей истории болезни не сообщалось. Наиболее частые сообщения о предшествующем сопутствующем лечении относились к противозачаточным средствам. После первого приема наиболее частым сопутствующим препаратом был парацетамол. Значимых различий в сопутствующей терапии между группами лечения отмечено не было.

Таблица 21

	1 мг апраглутида (N=6)	5 мг апраглутида (N=6)	10 мг апраглутида (N=6)	Плаци- бо (N=6)	Всего (N=24)
Количество субъектов женского/ мужского пола	3/3	3/3	2/4	3/3	11/13
Возраст в годах (среднее ± SD)	26,7 ± 6,3	24,5 ± 4,0	27,7 ± 7,8	29,2 ± 7,5	27,0 ± 6,4
Высота в см (среднее ± SD)	178,02 ± 8,11	178,52 ± 11,39	175,48 ± 8,29	175,67 ± 11,19	176,92 ± 9,31
Вес в кг (среднее ± SD)	75,683 ± 12,544	67,550 ± 11,070	72,150 ± 14,237	71,233 ± 12,382	71,654 ± 12,123
ИМТ в кг/м² (средняя ± SD)	23,72 ± 2,02	21,13 ± 2,41	23,22 ± 2,22	22,98 ± 2,30	22,76 ± 2,32
Количество американских индейцев или коренных жителей Аляски/азиатов/ смешанной расы/европеоидной расы среди субъектов	0/0/1/5	1/1/0/4	0/1/0/5	0/0/0/6	1/2/1/20

ИМТ — индекс массы тела; SD — стандартное отклонение.

Измерения соответствия режиму лечения

[00460] Лекарственный препарат вводился субъектам подкожно (п/к) медицинским персоналом, соблюдение режима лечения было полным.

Результаты фармакодинамических исследований и эффективности

[00461] Концентрации цитруллина в плазме в зависимости от времени после введения первой дозы апраглутида в зависимости от уровня дозы представлены на ФИГ. 18.

Соответствующий график средних значений, полученных методом наименьших квадратов (LS) для определения изменения по сравнению с исходным уровнем предоставлен на ФИГ. 19. Сводные фармакокинетические параметры цитруллина предоставлены в таблице 22.

[00462] Эндогенный маркер цитруллин был выбран для оценки фармакодинамического эффекта апраглутида. Цитруллин был обнаружен во всех образцах на исходном уровне и после завершения периода лечения. Три образца для измерения цитруллина на исходном уровне были получены во время двух визитов на исходном уровне между скринингом и первыми сутками получения препарата и перед введением препарата в первые сутки лечения. Тринадцать из 24 субъектов имели разницу $< 0,5$ мкг/мл по сравнению с тремя исходными образцами, причем наименьшая разница 0,061 мкг/мл наблюдалась у субъекта, получившего дозу 10 мг. Еще пять и четыре субъекта имели разницу от 0,5–1 до 1–2 мкг/мл по оценке в сравнении с исходным уровнем соответственно. У оставшихся двух субъектов разница была > 2 мкг/мл, причем наибольшая разница 2,762 мкг/мл наблюдалась у субъекта, получившего дозу 1 мг. На исходном уровне средний диапазон концентрации цитруллина составлял 5,3825–5,6207 мкг/мл для плацебо, 5,3900–6,2028 мкг/мл для 1 мг апраглутида, 4,8983–5,3023 мкг/мл для 5 мг апраглутида и 5,0730–5,4690 мкг/мл для 10 мг апраглутида. В группе плацебо средняя концентрация цитруллина оставалась относительно стабильной на протяжении всего исследования в диапазоне от 4,9735 до 5,8253 мкг/мл.

[00463] После первой еженедельной подкожной дозы апраглутида уровень цитруллина увеличивался в зависимости от дозы, причем самые высокие уровни цитруллина фиксировали через четверо или семь суток, за исключением одного субъекта в группе 1 мг, у которого максимальная концентрация цитруллина была достигнута через двое суток. Максимальное среднее значение цитруллина составило 6,3920 мкг/мл (через четверо суток), 7,1933 мкг/мл (через четверо суток) и 7,8487 мкг/мл (через 7 суток) для 1,

5 и 10 мг соответственно, в то время как для плацебо оно составило 5,8325 мкг/мл (через одни сутки).

[00464] Концентрация в конце каждого интервала дозирования, $R_{пред.доза}$, оценивалась для каждой дозы и показала, что в целом уровни цитруллина были одинаковыми на протяжении всего периода лечения (таблица 22).

[00465] После шестой и последней еженедельной п/к дозы апраглутида увеличение наблюдалось при всех уровнях доз и, в частности, при самых высоких дозах. Среднее значение R_{max} составляло 7,1702, 8,1577 и 8,7254 мкг/мл и достигалось через 2,0, 3,9 и 3,9 суток после последней дозы 1, 5 и 10 мг соответственно (таблица 22). Соответствующий уровень в группе плацебо составил 6,3707 мкг/мл через 16,9 суток после последней дозы. Эти значения R_{max} были лишь немного ниже среднего значения R_{max} , оцененного в течение всего исследования, с различиями в диапазоне от 0,0362, 0,0973 и 0,1016 мкг/мл для 10, 5 и 1 мг соответственно. Для группы плацебо разница составила 0,2586 мкг/мл. Среднее значение R_{max} наблюдалось примерно в одно и то же время во всех группах апраглутида и варьировалось от 35,9 до 38,9 суток после первой дозы 1 и 5 мг соответственно, тогда как пик в группе плацебо достигался через 50,4 суток после первой дозы.

[00466] Среднее увеличение концентрации цитруллина, наблюдаемое после последней дозы, по-видимому, снижалось быстрее для самых низких доз по сравнению с 10 мг. Цитруллин оценивали до суток 77. Самый низкий средний уровень цитруллина после последней дозы был достигнут через 17 суток как для 1, так и для 10 мг. Для 5 мг самый низкий средний уровень цитруллина был достигнут после дополнительной недели. $R_{t1/2}$ оценивали у двух субъектов, оба получали дозу 10 мг, и показатель составил 6,5 и 11,0 суток (таблица 22).

Таблица 22

		Уровень дозы апраглутида			
		Плацебо	1 мг	5 мг	10 мг
Последняя доза		<i>Среднее арифметическое ± стандартное отклонение</i>			
1	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,2028 ± 1,1888	5,8075 ± 1,3328	6,7695 ± 1,5288	7,8487 ± 2,7273
2	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,1740 ± 1,0442	6,2605 ± 1,2331	7,0082 ± 1,1330	7,6058 ± 2,3210
3	R _{пред.доза} (мкг/мл)	4,9735 ± 1,3734	6,4913 ± 1,8297	6,6155 ± 1,2790	7,5180 ± 2,1369
4	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,4545 ± 0,8906	6,0050 ± 1,5790	6,6227 ± 1,2247	7,2060 ± 2,5488*
5	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,4278 ± 1,3130	6,4128 ± 1,8032	6,8307 ± 1,2369	7,1994 ± 2,5111*
6	R _{max} (мкг/мл)	6,3707 ± 1,6653	7,1702 ± 1,6611	8,1577 ± 1,7108	8,7254 ± 3,0145*
	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,2883 ± 1,5281	6,3120 ± 1,6694	7,2498 ± 1,2461	8,0714 ± 3,0514*
НП	R _{max} (мкг/мл)	6,6293 ± 1,4010	7,2718 ± 1,6959	8,2550 ± 1,7807	8,7616 ± 2,9900*
		<i>Медиана (минимальное, максимальное)</i>			
6	Rt _{max} (д)	16,9 (0,9, 41,9)	2,0 (0,0, 34,9)	3,9 (0,0, 6,9)	3,9 (1,9, 7,0)*
	Rt _{1/2} (д)	НД	НД	НД	8,8 (6,5, 11,0)**
НП	Rt _{max} (д)	50,4 (0,9, 77,0)	35,9 (0,0, 70,0)	38,9 (4,0, 41,9)	36,9 (7,0, 39,0)*
		<i>Геометрическое среднее (геометрический коэффициент вариации %)</i>			
1	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,0803 (24,9)	5,6723 (24,6)	6,5967 (26,7)	7,4048 (40,7)
2	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,0802 (21,7)	6,1526 (21,0)	6,9208 (18,1)	7,2438 (37,6)
3	R _{пред.доза} (мкг/мл)	4,8114 (29,1)	6,2752 (29,2)	6,5109 (19,9)	7,2331 (32,4)
4	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,3963 (16,0)	5,8213 (28,4)	6,5313 (18,3)	6,8103 (40,3)*
5	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,2867 (26,1)	6,2097 (28,2)	6,7248 (20,3)	6,7908 (41,8)*
6	R _{max} (мкг/мл)	6,1904 (26,7)	7,0069 (24,0)	8,0024 (22,0)	8,2533 (40,4)*
	R _{пред.доза} (мкг/мл)	5,0890 (31,9)	6,1166 (28,5)	7,1475 (19,3)	7,5618 (44,0)*
НП	R _{max} (мкг/мл)	6,5079 (21,3)	7,1036 (24,2)	8,0870 (22,9)	8,2953 (40,1)*

НП — не применимо, оценивали в течение всего периода испытания; НД — нет данных; R_{max} — максимальный ответ; R_{пред.доза} — ответ непосредственно перед введением препарат; Rt_{max} — время достижения максимального ответа; Rt_{1/2} = период полувыведения.

Количество субъектов (N) составляло 6, если не указано иное.

*Отсутствует 1 субъект (N=5) и **Отсутствуют 4 субъекта (N=2).

[00467] Вариабельность значений $R_{\text{пред.доза}}$ и R_{max} (как после последней дозы, так и на протяжении всего исследования), выраженная в виде коэффициента вариации (%CV), варьировалась для плацебо от 16,0 до 31,9% (таблица 22). Это соответствовало диапазону %CV, наблюдаемому для 1 и 5 мг в диапазоне от 18,1 до 29,2%. %CV для 10 мг был немного выше, от 32,4 до 44,0%.

[00468] Статистический анализ устойчивого режима для каждого уровня дозы был выполнен с применением подхода Гельмерта. Кратко, в первом испытанном контрасте сравнили среднее значение $R_{\text{пред.доза}}$ в первый момент времени (неделя 1) с объединенным средним значением $R_{\text{пред.доза}}$ во все остальные моменты времени (недели 2–6). Во втором контрасте сравнивали среднее значение в неделю 2 с объединенным средним за период недель 3–6 и т. д. Тестирование продолжалось до тех пор, пока контраст не переставал быть статистически значимым. Среднее $R_{\text{пред.доза}}$ в неделю 6 для 10 мг по сравнению со средним $R_{\text{пред.доза}}$ в неделю 5 (0,8720, 95% ДИ: 0,1590; 1,5850 и $p=0,0172$) было статистически значимым. Визуальный анализ данных свидетельствует о том, что концентрации устойчивого режима были достигнуты после первого введения при всех исследованных уровнях доз.

[00469] Данные по цитруллину анализировали с применением смешанной модели дисперсионного анализа. Сводка результатов анализа предоставлена в таблице 23. Статистический анализ четко показал значительное общее лечебное действие апраглутида на цитруллин ($p=0,0007$). В группах всех доз наблюдалось увеличение концентрации по сравнению с плацебо, хотя разница между группами плацебо и 1 мг не была статистически значимой. Увеличение концентрации по сравнению с группой плацебо стало более выраженным и значимым при увеличении дозы, а именно увеличение на 1,2574 мкг/мл для дозы 5 мг ($p=0,0025$) и 1,6343 мкг/мл для 10 мг ($p=0,0002$) (таблица 23). Кроме того, при сравнении уровней доз друг с другом дозы 5 и 10 мг индуцировали значительно более высокие уровни цитруллина по сравнению с дозой 1 мг (на 0,9429 мкг/мл выше [$p=0,0186$] и на 1,3198 мкг/мл выше [$p=0,0018$], соответственно). Разница между дозами 5 и 10 мг не была статистически значимой, хотя эффект после 10 мг оказался немного выше, чем после 5 мг.

Таблица 23

Параметр	Р-значение для дозы	Плацебо — 1 мг	Плацебо — 5 мг	Плацебо — 10 мг	1 мг — 5 мг	1 мг — 10 мг	5 мг — 10 мг
Цитруллин (мкг/мл)	0,0007	0,3146 (-0,4371, 1,0663) $P=0,3910$	1,2574 (0,5037, 2,0112) $P=0,0025$	1,6343 (0,8809, 2,3878) $P=0,0002$	0,9429 (0,1768, 1,7089) $P=0,0186$	1,3198 (0,5586, 2,0810) $P=0,0018$	0,3769 (-0,3766, 1,1304) $P=0,3078$
Бристольская шкала стула	0,0189	-0,9 (-1,6, -0,3) $P=0,0092$	-1,0 (-1,7, 0,4) $P=0,0046$	-0,6 (-1,3, 0,1) $P=0,0961$	-0,1 (-0,8, 0,6) $P=0,7531$	0,3 (-0,3, 1,0) $P=0,3020$	0,5 (-0,2, 1,1) $P=0,1928$
Бристольская шкала стула с нулевыми как отсутствующими значениями	0,3031	-0,6 (-1,3, 0,1) $P=0,0808$	-0,4 (-1,1, 0,3) $P=0,2018$	-0,5 (-1,2, 0,2) $P=0,1648$	0,2 (-0,5, 0,9) $P=0,6208$	0,1 (-0,6, 0,8) $P=0,7282$	-0,0 (-0,8, 0,7) $P=0,8876$
Вес (кг)	0,7104	-0,750 (-2,497, 0,997) $P=0,3800$	-0,865 (-2,598, 0,868) $P=0,3092$	-0,331 (-2,065, 1,402) $P=0,6941$	-0,115 (-1,896, 1,666) $P=0,8939$	0,419 (-1,324, 2,162) $P=0,6210$	0,534 (-1,215, 2,283) $P=0,5309$

Показаны общее для всех групп лечения р-значение (все группы доз по сравнению с плацебо) и последующие сравнения групп лечения. Оценки разницы с 95% доверительными интервалами и р-значениями показаны для каждого сравнения.

[00470] Помимо уровня цитрулина, в качестве конечных точек для оценки фармакодинамики применяли значения по Бристольской шкале стула и массы тела. В отличие от уровня цитрулина и массы тела значение по Бристольской шкале стула представляет собой дискретную переменную. Субъекты оценивали свой стул за последние 24 часа с применением Бристольской шкалы стула в диапазоне от запора (тип 1) до диареи (тип 7). Отсутствие стула за последние 24 часа регистрировалось как ноль. Поскольку два субъекта (получавшие дозы либо 1, либо 5 мг) сообщили об отсутствии стула перед введением первой дозы, оценка балла по Бристольской шкале стула также была принята во внимание и на исходном уровне.

[00471] Наблюдался значительный общий лечебный эффект апраглутида по Бристольской шкале стула с р-значением 0,0189 (таблица 23). Конкретные контрасты плацебо и уровня

дозы показали значительное снижение в группах 1 и 5 мг по сравнению с плацебо ($-0,9$, $p = 0,0092$ и $-1,0$, $p = 0,0046$); снижение в группе 10 мг по сравнению с плацебо не было статистически значимым. Эта тенденция, по-видимому, была вызвана тем, что несколько субъектов иногда сообщали об отсутствии стула. После первой дозы оценку по Бристольской шкале стула планировали провести при 11 визитах и при завершении исследования. Из данных этих визитов, об отсутствии стула за последние 24 часа сообщалось 6 раз (2 субъекта), 13 раз (4 субъекта) и 1 раз (1 субъект) в группе 1 мг, 5 мг, 10 мг соответственно. В группе плацебо все субъекты сообщали о наличии стула за последние 24 часа при каждом визите. Об отсутствии стула сообщалось 9 раз в течение 6 недель лечения и 11 раз в последующие 6 недель, что указывает на отсутствие связи с лечением.

[00472] Принимая во внимание потенциальное влияние оценки отсутствия стула как 0, когда субъект мог нормально не испражняться каждые 24 часа (подтверждается наблюдением, что 2 из 24 субъектов сообщили о 0 до первой дозы), анализ был повторен как анализ чувствительности, где при отсутствии стула указывали отсутствие данных. При таком скорректированном анализе не было обнаружено значительного эффекта лечения ни в целом, ни для какого-либо из конкретных контрастов лечения (таблица 23).

[00473] Масса тела оказалась довольно постоянной в течение всего периода исследования, без статистически значимого эффекта лечения апраглутидом на массу тела в целом или для какого-либо из конкретных контрастов лечения (таблица 23). При рассмотрении отдельных значений массы тела у субъекта 1007, получавшего плацебо, наблюдалось увеличение веса с 92,90 кг при скрининге до 99,30 кг при визите завершения исследования.

[00474] Данные о цитруллине, BSS и весе анализируют с помощью дисперсионного анализа смешанной модели с фиксированными факторами доз, времени и лечения по времени, случайным фактором субъекта и средним предзначением в качестве независимой переменной. Среднее предзначение рассчитывали из всех предзначений после скрининга и до введения дозы, за исключением BSS, причем значение скрининга также применяли для расчета среднего значения на исходном уровне.

Анализ методом множественных сравнений — моделирование (MCP-MOD)

[00475] Применяли процедуру MCP-MOD. Эта методика статистического анализа состояла из 2 стадий: стадии множественных сравнений и стадии моделирования. Первая стадия процедуры (MCP) применяют для проверки значимой реакции на дозу путем оценки предварительно заданных моделей-кандидатов. После установления доза-реакция

вторую стадию (MOD) применяют для оценки кривой доза-реакция и оценки представляющих интерес целевых доз. Были указаны пять моделей-кандидатов:

- Линейная модель с максимальным эффектом для дозы 10 мг
- Лог.-линейная модель с максимальным эффектом для дозы 10 мг
- Модель с дозой, которая индуцировала максимальный эффект ($E_{\max}$) с ED_{50} 5 мг
- Сигмоидальная модель $E_{\max}$ с ED_{50} 1 мг и коэффициентом Хилла (HILL) 2
- Сигмоидальная модель $E_{\max}$ с ED_{50} 5 мг и коэффициентом Хилла (HILL) 5

[00476] Результаты стадии MCP показали, что все 5 моделей-кандидатов доза-эффект давали значительные контрасты с p -значением $<0,0001$ (таблица 24). Оценки различий немного отличались и дали набор моделей с лучшим соответствием и набор с несколько худшим соответствием. Моделями-кандидатами доза-эффект, дающими наибольшую оценку разницы, были 1) модель $E_{\max}$ с $ED_{50} = 5$ мг, 2) логарифмически-линейная модель и 3) сигмоидальная модель $E_{\max}$ с ED_{50} 1 мг и HILL 2 (таблица 24). Поскольку эти оценки разницы были очень похожи, все 3 модели были включены в состав MOD. Модели обозначаются как 1) $E_{\max}$, 2) лог.-линейная и 3) сигмоидальная модель $E_{\max}$ соответственно.

Таблица 24

Модель кандидат-доза-ответ	Статистика испытания	р- значение	Оценка разницы	95% ДИ	
				Нижний	Верхний
Линейная	5,704	$<0,0001$	2,0781	1,3127	2,8435
Лог.-линейная	6,168	$<0,0001$	2,2125	1,4588	2,9661
$E_{\max}$ с $ED_{50} = 5$ мг	6,172	$<0,0001$	2,2150	1,4610	2,9689
Сигмоидальная $E_{\max}$ с $ED_{50} = 1$ мг и $H=2$	6,144	$<0,0001$	2,1663	1,4256	2,9071
Сигмоидальная $E_{\max}$ с $ED_{50} = 5$ мг и $H=5$	5,687	$<0,0001$	2,0713	1,3061	2,8365

ДИ — доверительный интервал; ED_{50} — доза, индуцирующая 50% максимального эффекта; $E_{\max}$ — максимальный эффект; H — коэффициент Хилла; MCP-MOD — процедура множественного сравнения – моделирование. Дозы содержали 0 (плацебо), 1, 5 и 10 мг апраглутида. Данные об ответе цитруллина включали среднее значение на исходном уровне и данные в сутки 35–42 (=неделя 6). Для модели-кандидата доза-эффект результат анализа характеризуется тестовой статистикой, p -значением контраста и оценкой разницы с 95% ДИ.

[00477] Подмножество данных по цитруллину было получено со средним предзначением и в сутки с 35 по 42 = данные недели 6. Коэффициенты применили в смешанной модели

дисперсионного анализа с фиксированными факторами доз, времени и лечения по времени, случайным фактором субъекта и средним предзначением в качестве независимой переменной. Среднее предзначение рассчитывали по всем предзначениям после скрининга и до введения дозы.

[00478] В модели рассчитывают следующие контрасты:

- Линейный с коэффициентами $-0,508 \ -0,381 \ 0,127 \ 0,762$
- Лин.-лог. с коэффициентами $-0,654 \ -0,283 \ 0,306 \ 0,631$
- $E_{\max}$ с коэффициентами $-0,632 \ -0,316 \ 0,316 \ 0,632$
- Сигмоидальный $E_{\max}$ Хилла = 2 $ED_{50} = 1$ с коэффициентами $-0,759 \ -0,140 \ 0,432 \ 0,467$
- Сигмоидальный $E_{\max}$ Хилла = 5 $ED_{50} = 5$ с коэффициентами $-0,456 \ -0,455 \ 0,164 \ 0,747$

[00479] Стадия MOD показала, что прогнозируемое изменение цитруллина по сравнению с плацебо для доз 1, 5 и 10 мг было довольно схожим для всех 3 моделей (таблица 25).

При дозе 1 мг прогнозируемое скорректированное изменение цитруллина для плацебо и исходного уровня в трех моделях варьировалось от 0,7125 до 0,8712 мкг/мл со значительными результатами для $E_{\max}$ ($p = 0,0184$) и логарифмической ($p = 0,0238$) моделей. Для сигмоидальной модели $E_{\max}$ p -значение составило 0,0645. При увеличении дозы до 5 мг прогнозируемое изменение по сравнению с плацебо увеличилось до диапазона от 2,1652 до 2,3327 мкг/мл. Для дозы 10 мг прогнозируемое изменение по сравнению с плацебо было несколько выше и находилось в диапазоне от 2,6946 до 2,8604 мкг/мл. Прогнозируемый ответ по сравнению с плацебо как для 5, так и для 10 мг был статистически значимым для всех моделей с p -значением $< 0,0001$.

[00480] Прогнозировали уровни доз апраглутида, необходимые для исходного и скорректированного с помощью плацебо повышения цитруллина на 1, 2 и 3 мкг/мл (таблица 25). $E_{\max}$ сигмоидальной модели $E_{\max}$ составлял < 3 мкг/мл, поэтому для данной модели в качестве максимального ответа было выбрано изменение 2,5 мкг/мл.

Прогнозируемая доза апраглутида для повышения концентрации цитруллина на 1 мкг/мл составила 1,2333 мг, 1,2249 мг и 1,3606 мг для моделей $E_{\max}$, лог.-линейная и сигмоидальная $E_{\max}$ соответственно. Чтобы вызвать повышение концентрации цитруллина на 2 мкг/мл, прогнозируемые дозы апраглутида составляли 3,8471 мг, 4,2011 мг и 3,4042 мг для моделей $E_{\max}$, лог.-линейная и сигмоидальная $E_{\max}$ соответственно. Наконец, прогнозируемые дозы апраглутида для изменения по сравнению с плацебо на 2,5 или 3 мкг/мл составили 13,1053 мг, 11,4325 мг и 6,4619 мг с применением моделей $E_{\max}$, лог.-линейная и сигмоидальная $E_{\max}$ соответственно. Следует отметить, что неопределенность

прогнозируемых доз апраглутида достаточно велика, особенно для достижения эффекта 2,5 или 3 мкг/мл.

Таблица 25

Прогнозирование	$E_{\max}$	Лог.-линейная	Сигмоидальная $E_{\max}$
Прогнозируемое изменение эффекта в сравнении с плацебо для дозы 1 мг	0,8535 (0,11584, 1,5486) $p=0,0184$	0,8712 (0,1273, 1,6151) $p=0,0238$	0,7125 (-0,0466, 11,4716) $p=0,0645$
Прогнозируемое изменение эффекта в сравнении с плацебо для дозы 5 мг	2,2442 (1,4239, 3,0644) $p<0,0001$	2,1652 (1,3805, 2,9499) $p<0,0001$	2,3327 (1,5737, 3,0916) $p<0,0001$
Прогнозируемое изменение эффекта в сравнении с плацебо для дозы 10 мг	2,8182 (1,9820, 3,6544) $p<0,0001$	2,8604 (2,0011, 3,7197) $p<0,0001$	2,6946 (1,8761, 3,5131) $p<0,0001$
Прогнозируемая доза для изменения в сравнении с плацебо на 1 мкг/мл	1,2333 (-0,04246, 2,5091) $p=0,0574$	1,2249 (-0,2169, 2,6667) $p=0,0920$	1,3606 (0,2680, 2,4532) $p=0,0170$
Прогнозируемая доза для изменения в сравнении с плацебо на 2 мкг/мл	3,8471 (0,3534, 7,3409) $p=0,0324$	4,2011 (0,6406, 7,7617) $p=0,0229$	3,4042 (-0,1290, 6,9374) $p=0,0582$
Прогнозируемая доза для изменения в сравнении с плацебо на 2,5 мкг/мл*	НД	НД	6,4619 (-0,5521, 13,4759) $p=0,0692$
Прогнозируемая доза для изменения в сравнении с плацебо на 3 мкг/мл*	13,1053 (-6,3068, 32,5173) $p=0,1754$	11,4325 (1,5808, 21,2843) $p=0,0249$	НД

ДИ — доверительный интервал; $E_{\max}$ — максимальный эффект; НД — нет данных. * $E_{\max}$ сигмоидальной $E_{\max}$ модели составляло <3 мкг/мл, таким образом максимальный ответ был зафиксирована на 2,5 мкг/мл. Прогнозы были сделаны на основе доз 0 (плацебо), 1, 5 и 10 мг апраглутида и данных ответа на цитруллин, состоящие из среднего исходного значения и данных в сутки 35–42 (=неделя 6). Расчетное изменение/доза с 95% ДИ и p -значения показаны для каждого прогноза.

Корректировки для независимых переменных

[00481] Для всех фармакодинамических конечных точек (цитруллин, Бристольская шкала стула и вес) предзначение применяли в качестве независимой переменной. Среднее предзначение рассчитывали из всех предзначений после скрининга и до введения дозы, за

исключением Бристольской шкалы стула, причем значение скрининга также применяли для расчета среднего значения на исходном уровне. Среднее предзначение цитруллина также применяли в качестве независимой переменной в MCP-MOD, за исключением сигмоидальной $E_{\max}$ модели. Ее решили путем вычитания предзначения, умноженного на наклон линейной модели части MCP, на основе значений недели 6.

Доза препарата, концентрация препарата и взаимосвязь с ответом

[00482] Концентрация апраглутида в плазме в зависимости от времени после введения первой дозы апраглутида в зависимости от уровня дозы представлена на ФИГ. 20А – ФИГ. 2В. Сводные фармакокинетические параметры апраглутида предоставлены в таблице 26.

[00483] Средний кажущийся общий клиренс (CL/F) оказался постоянным для 3 уровней доз и находился в диапазоне от 16,480 (5 мг) до 20,747 л/сут (10 мг) (таблица 26). Средний кажущийся объем распределения в фазе конечной элиминации (V_z/F) после последней дозы оказался дозозависимым со значениями 55,426 и 105,021 л для 5 и 10 мг соответственно. Недостаточно точек данных для определения V_z/F для группы с дозой 1 мг (недостаточное количество образцов превышало нижний предел количественного определения в течение периода отбора образцов после последней дозы).

[00484] После первой еженедельной подкожной дозы апраглутида концентрации апраглутида в плазме увеличивались без явного запаздывания у всех субъектов (за исключением субъекта 1002, принимавшего 1 мг, у которого не было определяемых концентраций до следующей дозы). $C_{\max}$ была достигнута в сутки 1 у четырех, четырех субъектов и одного субъекта, получавших 1 мг, 5 мг и 10 мг апраглутида соответственно (ФИГ. 20). Остальные субъекты достигли $C_{\max}$ в сутки 2. Субъекты, принимавшие 1 мг, демонстрировали концентрацию ниже предела количественного определения (LOQ) в сутки 4 или 7, в то время как у субъектов, принимавших 5 и 10 мг, концентрация оставалась выше уровня количественного определения до следующей дозы. Концентрация после первой дозы зависела от дозы со средним значением $C_{\max}$ $13,918 \pm 11,2$, $94,088 \pm 50,5$ и $136,855 \pm 55,0$ нг/мл для групп доз 1, 5 и 10 мг, соответственно, и значениями AUC_{τ} 35,214, 300,269 и 476,937 сут*нг/мл соответственно (таблица 26). Период полувыведения (ч), измеренный после дозы 6 в группе дозирования 5 мг, составил $72,7 \pm 23,0$, а период полувыведения, измеренный после дозы 6 в группе дозы 10 мг, составил $76,3 \pm 27,6$.

[00485] При C_{trough} следующих 5 доз у 5 субъектов (все получили дозу 1 мг) один или несколько образцов не обнаруживались для апраглутида. Все остальные субъекты

показали измеримые концентрации апраглутида. Среднее значение C_{trough} для 6 доз варьировалось от 0,000 (неделя 1) до 0,873 нг/мл (неделя 4) для 1 мг апраглутида, от 7,605 (неделя 5) до 10,163 нг/мл (неделя 4) для 5 мг апраглутида и от 13,710 нг/мл (неделя 6) до 18,460 нг/мл (неделя 2) для 10 мг апраглутида (таблица 26).

[00486] После шестой и последней еженедельной п/к дозы апраглутида у всех субъектов (субъект 3004 был исключен из-за прекращения лечения) наблюдалось повышение концентрации апраглутида без явного запаздывания. Субъекты достигли C_{max} через 1 сутки после последней дозы, за исключением 2 и 3 субъектов, принимавших 5 и 10 мг соответственно, которые достигли C_{max} через 2 суток. Фармакокинетические параметры оценивали в течение 2 недель после приема последней дозы. Все субъекты, принимавшие 1 мг, и 1 субъект, принимавший 5 мг, имели не поддающиеся количественному определению концентрации в последних 2 или 3 образцах. Остальные субъекты, включая всех субъектов, принимавших 10 мг, все еще имели поддающиеся количественному определению концентрации до 4,46 нг/мл в последнем образце для анализа фармакокинетики.

Таблица 26

Параметр	1 мг апраглутида		5 мг апраглутида		10 мг апраглутида	
Последняя доза	№ 1–5	№ 6	№ 1–5	№ 6	№ 1–5	№ 6
Среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение						
C_{max} (нг/мл)	13,918 $\pm$ 11,236	24,238 $\pm$ 9,225	94,088 $\pm$ 50,467	124,818 $\pm$ 72,126	136,855 $\pm$ 55,403	182,374 $\pm$ 97,626
1/6 C_{trough} (нг/мл)	0,000 $\pm$ 0,000	0,678 $\pm$ 0,799	7,912 $\pm$ 3,548	7,623 $\pm$ 3,367	14,543 $\pm$ 5,476	13,710 $\pm$ 4,806
AUC _{tau} (сут*нг/мл)	35,214 $\pm$ 27,387	59,437 $\pm$ 14,060	300,269 $\pm$ 121,212	357,651 $\pm$ 153,604	476,937 $\pm$ 208,314	582,409 $\pm$ 284,359
AUC _{tau} /дозу (сут*нг/мл/мкг)	0,03426 $\pm$ 0,02069	0,05944 $\pm$ 0,01406	0,05860 $\pm$ 0,02505	0,07153 $\pm$ 0,03072	0,04679 $\pm$ 0,02177	0,05824 $\pm$ 0,02844
C_{max} /дозу (нг/мл/мкг)	0,01351 $\pm$ 0,01087	0,02424 $\pm$ 0,00922	0,01842 $\pm$ 0,01033	0,02496 $\pm$ 0,01443	0,01340 $\pm$ 0,00580	0,01824 $\pm$ 0,00976
2 C_{trough} (нг/мл)	0,655 $\pm$ 0,742	-	9,845 $\pm$ 4,818	-	18,460 $\pm$ 8,728	-
3 C_{trough} (нг/мл)	0,440 $\pm$ 0,685	-	8,737 $\pm$ 6,674	-	16,307 $\pm$ 8,960	-
4 C_{trough} (нг/мл)	0,873 $\pm$ 0,683	-	10,163 $\pm$ 6,318	-	14,764 $\pm$ 8,343	-

Параметр	1 мг апраглутида		5 мг апраглутида		10 мг апраглутида	
Последняя доза	№ 1–5	№ 6	№ 1–5	№ 6	№ 1–5	№ 6
Среднее арифметическое ± стандартное отклонение						
5 C _{trough} (нг/мл)	0,542 ± 0,867	-	7,605 ± 3,944	-	13,872 ± 6,968	-
AUC _{послед.} (сут*нг/мл)	-	56,534 ± 15,945	-	382,086 ± 155,201	-	623,231 ± 282,722
t _½ (д)	-	***	-	3,04 ± 0,94	-	3,18 ± 1,15
Lambda_Z (л/сут)	-	***	-	0,25078 ± 0,09871**	-	0,24632 ± 0,09975
CL/F (л/сут)	-	17,565 ± 3,818	-	16,480 ± 7,341	-	20,747 ± 9,540
V _z /F (л)	-	***	-	55,426 ± 23,760**	-	105,021 ± 76,365
Медиана (минимальное, максимальное)						
t _{max} (сут)	1 (0,9, 1,9)*	0,9 (0,9, 1,0)	1 (0,9, 2,0)	1 (0,9, 2,0)	1,9 (1,0, 2,0)	1,9 (0,9, 2,0)
Геометрическое среднее (геометрический коэффициент вариации%)						
C _{max} (нг/мл)	12,314 ± 145,5	22,802 ± 39,9	84,086 ± 55,1	108,238 ± 64,6	128,474 ± 39,9	161,910 ± 59,4*
1/6 C _{trough} (нг/мл)	-	1,308 ± 33,2	7,232 ± 51,1	6,831 ± 60,0	13,612 ± 42,7	13,024 ± 37,5*
AUC _{tau} (сут*нг/мл)	31,555 ± 145,3	58,135 ± 23,1	279,057 ± 45,0	329,729 ± 47,2	442,982 ± 43,3	528,826 ± 52,4*
AUC _{tau/дозу} (сут*нг/мл/мкг)	0,03037 ± 152,1	0,05813 ± 23,1	0,05407 ± 47,1	0,06595 ± 47,2	0,04291 ± 47,6	0,05288 ± 52,4*
C _{max/дозу} (нг/мл/мкг)	0,01185 ± 151,5	0,02280 ± 39,9	0,01629 ± 57,8	0,02165 ± 64,6	0,01245 ± 43,8	0,01619 ± 59,4*
2 C _{trough} (нг/мл)	1,289 ± 22,11	-	8,960 ± 50,4	-	16,775 ± 51,6	-
3 C _{trough} (нг/мл)	1,315 ± 11,9	-	6,595 ± 103,8	-	13,993 ± 71,8	-
4 C _{trough} (нг/мл)	1,306 ± 9,2	-	8,531 ± 75,1	-	12,461 ± 80,8*	-
5 C _{trough} (нг/мл)	1,588 ± 31,2	-	6,601 ± 69,1	-	11,886 ± 79,3*	-
AUC _{послед.} (сут*нг/мл)	-	54,708 ± 28,7	-	353,984 ± 46,4	-	574,308 ± 47,5*
t _½ (д)	-	***	-	2,91 ± 36,6**	-	3,00 ± 41,3*
Lambda_Z (л/сут)	-	***	-	0,23840 ± 36,6**	-	0,23103 ± 41,3*
CL/F (л/сут)	-	17,201 ± 23,1	-	15,164 ± 47,2	-	18,910 ± 52,4*
V _z /F (л)	-	***	-	50,202 ± 61,0**	-	81,852 ± 98,6*

$AUC_{\text{послед.}}$ — площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от нулевого времени до последней измеримой концентрации; AUC_{tau} — площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени до конца периода лечения соответствующей дозировкой; CL/F — кажущийся общий клиренс; C_{max} — максимальная концентрация; C_{trough} — концентрация в плазме непосредственно перед следующим приемом дозы; λ_z — константа скорости конечной элиминации; ΦK — фармакокинетика; $t_{1/2}$ — конечный период полувыведения; t_{max} — время до достижения максимальной концентрации в плазме; V_z/F — кажущийся объем распределения в фазе конечной элиминации.

*1 субъект отсутствует ($N=5$); **2 субъекта отсутствуют ($N = 4$) и ***3 субъекта отсутствуют ($N = 3$, параметр ΦK не рассчитан). Значения ниже предела количественного определения (<1 нг/мл) были установлены на 0. Количество субъектов равно 6, если не указано иное.

[00487] Профиль концентрации, наблюдаемый после шестой дозы, оказался сравнимым с первой дозой, хотя концентрация была несколько выше (ФИГ. 20). Концентрация указывает на пропорциональность дозы со средним значением $C_{\text{max}}/\text{дозу}$ 0,02424, 0,02496 и 0,01824 нг/мл/мкг и $AUC_{\text{tau}}/\text{дозу}$ 0,05944, 0,07153 и 0,05824 сут*нг/мл/мкг для групп доз 1, 5 и 10 мг, соответственно (таблица 26).

[00488] У 3 из 6 субъектов, получавших дозу 1 мг, было недостаточно данных для определения константы скорости конечной элиминации (недостаточное количество образцов значение превышало нижний предел количественного определения в течение периода отбора образцов после последней дозы). Впоследствии средний период полувыведения был определен только для групп с дозами 5 и 10 мг и был сопоставим между двумя группами (3,04 и 3,18 суток соответственно).

[00489] Вариабельность C_{max} и AUC_{tau} была заметна после первой дозы 1 мг с %CV 145,5 и 145,3% соответственно (таблица 26). После последней дозы 1 мг, а также первой и последней дозы уровней доз 5 и 10 мг вариабельность была ниже; %CV для C_{max} находилась в диапазоне от 39,9 до 64,6%, а соответствующий диапазон %CV для AUC_{tau} составлял от 23,1 до 52,4%.

[00490] Визуальный осмотр нормированных по дозе фармакокинетических параметров C_{max} и значений AUC_{tau} показал, что в диапазоне доз от 1 до 10 мг апраглутид имеет линейную кинетику. Это соответствует сопутствующей постоянной CL/F .

[00491] Как и в случае с цитруллином, для апраглутида был проведен статистический анализ устойчивого режима для каждого уровня дозы с применением подхода Гельмерта. Этот анализ устойчивого режима показал, что ни один из контрастов не был статистически значимым, за исключением среднего C_{trough} в недели с 3 по 6 для 10 мг по сравнению со средним C_{trough} в неделю 2 ($-3,616$, 95% ДИ: $-5,893$; $-1,399$, и $p = 0,0023$). Визуальный анализ данных свидетельствует о том, что устойчивый режим был достигнут после первого введения при всех исследованных уровнях доз.

[00492] Графический анализ был проведен для оценки зависимости концентрации апраглутида от эффекта цитруллина. Несколько отдельных параметров цитруллина ($R_{\max}$ и $R_{\text{пред.доза}}$) были нанесены на график в зависимости от фармакокинетических параметров апраглутида ($C_{\max}$, C_{trough} и AUC_{tau}). Для параметров, оцениваемых при дозе 6, была построена линия регрессии. r -значение наклона почти достигло значимости для $C_{\max}$ по сравнению с $R_{\max}$ со значением 0,0608 (ФИГ. 21). Оказалось, что AUC_{tau} положительно коррелирует с $R_{\max}$ с r -значением 0,0377 (ФИГ. 22). Согласно линии регрессии, на каждые 100 сут*нг/мл увеличения AUC_{tau} в неделю 6 соответствующий максимальный ответ на цитруллин увеличивался на 0,39 мкг/мл. Величина достоверности аппроксимации показала, что 26% вариабельности $R_{\max}$ объяснялось AUC_{tau} . Как показано на ФИГ. 23, 24 и 25, графики корреляции всех концентраций апраглутида и цитруллина, оцененных в неделю 6 в зависимости от уровня дозы, выявили гистерезис против часовой стрелки, поскольку существовала временная задержка между измеренной концентрацией апраглутида и эффектом цитруллина.

Фармакокинетика

[00493] Среднее значение CL/F было постоянным для 3 уровней доз и находилось в диапазоне от 16,480 (5 мг) до 20,747 л/сут (10 мг). Среднее значение V_z/F было определено только для групп с дозами 5 и 10 мг и зависело от дозы со значениями 55,426 и 105,021 л для доз 5 и 10 мг соответственно. Среднее значение $t_{1/2}$ можно было определить только для групп, получавших 5 и 10 мг апраглутида, и оно было сопоставимо для этих групп (3,04 и 3,18 суток соответственно).

[00494] Концентрация после первой еженедельной п/к дозы апраглутида показала пропорциональность дозы со средним значением $C_{\max}$ 13,918, 94,088 и 136,855 нг/мл для групп доз 1, 5 и 10 мг соответственно и значения AUC_{tau} 35,214, 300,269 и 476,937 сут*нг/мл соответственно. Профиль концентрации, наблюдаемый после шестой дозы, был сравним с профилем после первой дозы, хотя концентрация была численно выше. Концентрация указывает на пропорциональность дозы со средним значением $C_{\max}/\text{дозу}$ 0,02424, 0,02496 и 0,01824 нг/мл/мкг и $AUC_{\text{tau}}/\text{дозу}$ 0,05944, 0,07153 и 0,05824 сут*нг/мл/мкг для групп доз 1, 5 и 10 мг соответственно. При дозах 1 и 5 $t_{\max}$ составляло приблизительно 1 сутки для доз апраглутида 1 мг и 5 мг и 2 суток для дозы 10 мг.

[00495] Визуальный осмотр нормированных по дозе фармакокинетических параметров $C_{\max}$ и значений AUC_{tau} показал, что в диапазоне доз от 1 до 10 мг апраглутид имеет линейную кинетику. Визуальный анализ данных свидетельствует о том, что устойчивый режим был достигнут после первого введения при всех исследованных уровнях доз.

Фармакодинамика

[00496] После первого и последнего приема апраглутида концентрация цитруллина увеличивалась в зависимости от дозы. Среднее увеличение цитруллина, наблюдаемое после последней дозы, по-видимому, снижалось быстрее для доз 1 мг и 5 мг по сравнению с дозой 10 мг. $R_{t1/2}$ можно было оценить только у 2 субъектов, принимавших по 10 мг, и было установлено, что оно составляет 6,5 и 11,0 суток.

[00497] При дозе 6 среднее значение R_{max} составило 7,1702, 8,1577 и 8,7254 мкг/мл после последней дозы 1, 5 и 10 мг соответственно и достигалось через 2,0, 3,9 и 3,9 суток. Соответствующее значение в группе плацебо составило 6,3707 мкг/мл через 16,9 суток после последней дозы. Эти значения R_{max} были сопоставимы со средним значением R_{max} за весь период исследования. Визуальный анализ данных свидетельствует о том, что устойчивый режим был достигнут после первого введения при всех исследованных уровнях доз.

[00498] Значительный эффект лечения апраглутидом наблюдался для цитруллина ($p = 0,0007$). Апраглутид индуцировал повышение уровня цитруллина. Этот ответ был статистически значимым с увеличением на 1,2574 мкг/мл для 5 мг апраглутида (95% ДИ: 0,5037; 2,0112; $p=0,0025$) и 1,6343 мкг/мл для 10 мг апраглутида (95% ДИ: 0,8809; 2,3878; $p=0,0002$) по сравнению с плацебо; для 1 мг апраглутида увеличение по сравнению с плацебо не было статистически значимым (0,3146 мкг/мл, 95% ДИ: -0,4371; 1,0663; $p = 0,3910$). Контраст между группами доз показал, что дозы 5 и 10 мг индуцировали значительно более высокие уровни цитруллина по сравнению с дозой 1 мг (0,9429 мкг/мл, 95% ДИ: 0,1768; 1,7089; $p = 0,0186$ и 1,3198 мкг/мл, 95% ДИ: 0,5586; 2,0810; $p = 0,0018$ соответственно). Важно отметить, что разница между 5 и 10 мг апраглутида не была статистически значимой, хотя эффект после 10 мг оказался немного выше, чем после 5 мг.

[00499] Значительный лечебный эффект апраглутида по Бристольской шкале стула наблюдался при p -значении 0,0189 (все группы дозирования по сравнению с плацебо). Этот эффект не зависел от дозы, поскольку в группах доз 1 и 5 мг наблюдалось только значительное снижение по сравнению с плацебо (-0,9, 95% ДИ: -1,6; -0,3; $p = 0,0092$ и -1,0, 95% ДИ -1,7; -0,4; $p = 0,0046$ соответственно).

[00500] Поисковый графический анализ показал, что наклон линии регрессии для C_{max} по сравнению с R_{max} при дозе 6 почти достиг значимости с p -значением 0,0608. Оказалось, что AUC_{tau} положительно коррелирует с R_{max} с p -значением 0,0377. Согласно линии регрессии, на каждые 100 сут*нг/мл увеличения AUC_{tau} в неделю 6 соответствующий максимальный ответ на цитруллин увеличивался на 0,39 мкг/мл. Величина достоверности

аппроксимации показала, что 26% вариабельности $R_{\max}$ объяснялось $AUC_{\text{таб}}$. График корреляции всех концентраций апраглутида и цитруллина, оцененных в неделю 6, выявил гистерезис против часовой стрелки.

[00501] Процедура MCP-MOD показала, что 3 предварительно заданные модели-кандидаты дали аналогичные результаты для наилучшей подгонки доза-ответ в части MCP; 1) $E_{\max}$, 2) лог.-линейная и 3) сигмовидная $E_{\max}$ модель. Все эти 3 модели были применены в части MOD и прогнозировали аналогичные изменения концентрации цитруллина по сравнению с плацебо для дозы апраглутида 1, 5 и 10 мг. При дозе 1 мг прогнозируемое скорректированное изменение цитруллина для плацебо и исходного уровня в 3 моделях варьировалось от 0,7125 до 0,8712 мкг/мл со значительными результатами для $E_{\max}$ ($p = 0,0184$) и лог.-линейной ($p = 0,0238$) моделей. Для сигмоидальной модели $E_{\max}$ p -значение составило 0,0645. Для дозы 5 мг ответ находился в диапазоне от 2,1652 до 2,3327 мкг/мл. Немного более сильный ответ был получен для дозы 10 мг в диапазоне от 2,6946 до 2,8604 мкг/мл. Прогнозируемый ответ по сравнению с плацебо как для 5, так и для 10 мг был статистически значимым для всех моделей с p -значением $< 0,0001$.

[00502] Прогнозировали уровни доз апраглутида, необходимые для исходного и скорректированного с помощью плацебо повышения цитруллина на 1, 2 и 3 мкг/мл. $E_{\max}$ сигмоидальной модели $E_{\max}$ составлял < 3 мкг/мл, поэтому для этой модели в качестве максимального ответа было установлено изменение 2,5 мкг/мл. Прогнозируемая доза апраглутида для повышения концентрации цитруллина на 1 мкг/мл составляла 1,2333 мг (95% ДИ: -0,04246; 2,5091), 1,2249 мг (95% ДИ: -0,2169; 2,6667) и 1,3606 мг (95% ДИ: 0,2680; 2,4532), для $E_{\max}$, лог.-линейной и сигмоидальной $E_{\max}$ моделей соответственно. Чтобы вызвать увеличение концентрации цитруллина на 2 мкг/мл, прогнозируемые дозы апраглутида составляли 3,8471 мг (95% ДИ: 0,3534; 7,3409), 4,2011 мг (95% ДИ: 0,6406; 7,7617) и 3,4042 мг (95% ДИ: -0,1290; 6,9374), для $E_{\max}$, лог.-линейной и сигмоидальной $E_{\max}$ моделей соответственно. Прогнозируемые дозы апраглутида для изменения по сравнению с плацебо 2,5 или 3 мкг/мл составляли 13,1053 мг (95% ДИ: -6,3068; 32,5173), 11,4325 мг (95% ДИ: 1,5808; 21,2843) и 6,4619 мг (95% ДИ: -0,5521; 13,4759), с применением $E_{\max}$, лог.-линейной и сигмоидальной $E_{\max}$ моделей соответственно.

Модель ФД/ФК

[00503] Клинические наблюдения по фармакокинетике лучше всего соответствовали модели с корреляцией между $V1/F$ и Cl/F и независимой переменной дозы в зависимости от продолжительности абсорбции, а также независимыми переменными массы тела в

зависимости от $V1/F$ и Cl/F . Затем к этой модели были добавлены фармакодинамические наблюдения для создания модели ФК/ФД. Цитруллин в плазме был описан моделью оборота и моделью максимального эффекта ФД.

[00504] Популяционная фармакокинетическая/фармакодинамическая модель показала, что у индивидуума с массой тела 70 кг, получившего 5 мг апраглутида подкожно, объем распределения достигнет 31,3 л, а пиковая концентрация в плазме (C_{max}) будет достигнута через 1,39 суток. Моделированные профили концентрации апраглутида и цитруллина в плазме крови с еженедельной подкожной инъекцией апраглутида 2,5, 5 или 10 мг показаны на ФИГ. 26.

[00505] Модель ФК/ФД не указывала на какое-либо накопление апраглутида с течением времени. Хотя накопление цитруллина было очевидным в течение первых трех недель лечения, впоследствии была достигнута концентрация в устойчивом режиме.

Моделированные профили зависимости концентрации апраглутида от времени по массе тела имели меньшую площадь под кривой (AUC) и C_{max} в устойчивом режиме с увеличением массы тела.

Пример 8. Процесс производства апраглутида — (II)

[00506] Ниже приведен иллюстративный способ по настоящему описанию производства апраглутида с повышенным уровнем чистоты по сравнению с ранее описанными путями синтеза (например, патент США № 8,580,918).

Твердофазный пептидный синтез (стадия 1)

[00507] ТФПС представляет собой последовательный синтез пептидной цепи, закрепленной на твердом носителе, путем повторения цикла, включающего следующие стадии:

1. Удаление защитной группы Fmoc N-конца пептидной смолы
 - 1a. В некоторых аспектах реакция снятия защиты Fmoc с примеси Asp³ включает обработку смолы раствором 10% пиперидина и 2% Охута в DMF. Реакцию снятия защиты проводят в два цикла, первый в течение 15 минут и второй в течение 30 минут.
2. Промывки DMF
3. Связывания Fmoc-AA-OH
4. Испытание реакции связывания
5. Промывки DMF

[00508] Этот цикл повторяется до тех пор, пока пептидная последовательность не будет завершена.

[00509] α -аминогруппы аминокислот защищены чувствительной к основаниям 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группой; функциональные группы боковой цепи защищены кислотолабильными группами. Все производные аминокислот, используемые в процессе, коммерчески доступны.

[00510] ТФПС представляет собой последовательный синтез пептидной цепи, закрепленной на твердом носителе. В синтезе можно использовать смолу MBHA для сборки пептидной последовательности. После набухания и промывки смолы DMF, а затем DMF/DIEA в атмосфере азота линкер Fmoc-Rink-амид может быть связан с применением HBTU/DIPEA/HOBt в DMF. После реакции связывания смолу можно промыть DMF и затем ацетилировать с применением $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}$. Для проверки завершения связывания можно проводить тест Кайзера.

[00511] После промывки смолы с DMF, каждая из Fmoc-защищенных аминокислот соединена с пептидом смолы в соответствии со следующим циклом:

1. Fmoc-защитную группу удаляют пиперидином в DMF, и смолу тщательно промывают DMF.
2. Связывание осуществляют в DMF с переменными аминокислотными эквивалентами с применением DIC/Охума для активации.

2а. В некоторых аспектах дипептид Boc-His(Trt)-Gly-OH соединяют со смолой вместо последовательной сборки аминокислот Gly и His. Дипептид предварительно активируют в течение 1 часа при $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ с применением Boc-His (Trt)-Gly-OH/Охума/DIC (2,5 ммоль/2,5 ммоль/2,5 ммоль) в 7 мл DMF, после чего добавляют к реакции связывания. Для проверки завершения связывания можно проводить тест Кайзера.

3. Связывание аминокислот отслеживают с помощью нингидринового анализа, который проводят во время каждого цикла синтеза.

[00512] В конце сборки, после присоединения и снятия защиты с последней аминокислоты, смолу промывают DMF и изопропанолом и сушат в вакууме.

Расщепление пептида и смолы и снятие защиты (стадия 2)

[00513] Защищенный пептид можно одновременно отщепить от смолы и снять защиту путем обработки смесью ТФУ/вода/анизол. Затем к суспензии пептид/ТФА добавляют МТВЕ для осаждения неочищенного пептида в присутствии расщепленной смолы.

Полученный неочищенный пептид фильтруют, промывают МТВЕ и сушат в вакууме до постоянного веса.

Реакция декарбоксилирования (стадия 3a)

[00514] Неочищенный пептид солюбилизируют в смеси H_2O / ACN (соотношение 70 : 30) в аммиачном буфере. Раствор доводят до целевого $\text{pH } 8,0 \pm 0,1$ с применением 25% уксусной кислоты или 25% NH_4OH в H_2O . Реакцию декарбоксилирования поддерживают при 50°C в течение 65 минут. Неочищенный пептид промывают раствором H_2O / ACN (соотношение 70 : 30) в аммиачном буфере при $\text{pH } 8,0 \pm 0,1$ и хранят при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

Очистка с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (стадия 3b)

[00515] Неочищенный пептид растворяют в смеси вода/ацетонитрил/ NH_4OH . Этот раствор разбавляют уксусной кислотой и затем фильтруют.

[00516] Первичную очистку проводят с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ с $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ в качестве элюента. Элюирование в колонке контролируют с помощью УФ-излучения, а полученные фракции анализируют с помощью ОФ-ВЭЖХ. Фракции, отвечающие критериям контроля, смешивают в объединенном пуле. Фракции, не отвечающие критериям контроля, могут быть переработаны путем повторения этапа очистки. Чистоту пула контролируют с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ.

Превращение натриевой соли с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (стадия 4)

[00517] Эта стадия может быть проведена для замены противоиона пептида с аниона ТФА на катион натрия посредством изменения pH и для дополнительной очистки пептида. Объединенный пул стадии 3 разбавляют водой и повторно очищают с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ с использованием NaOAc в качестве элюента.

[00518] Очищенный раствор пептида затем подвергают выпариванию в вакууме для уменьшения содержания ацетонитрила в растворе. Затем раствор очищенного пептида доводят до целевого $\text{pH } 7,9$ с помощью 0,1% AcOH .

[00519] Чистый пул можно концентрировать и лиофилизировать. Чистоту пула анализируют с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Лиофилизация и упаковка (этап 5)

[00520] Перед лиофилизацией раствор очищенного пептида фильтруют через мембрану 0,2 мкм. Лиофилизацию проводят при низком давлении. Полученный лиофилизированный

конечный пептид упаковывают в атмосфере аргона. Лиофилизированный апраглутид контролируется в соответствии со спецификацией апраглутида.

Переработка

[00521] Лиофилизированный апраглутид, который не соответствует критериям, установленным в спецификации апраглутида, может быть подвергнут повторной очистке.

[00522] Повторную очистку можно проводить после восстановления пептида путем повторения стадии(-й) очистки и стадии превращения противоионов, как описано выше.

[00523] После повторной очистки материал лиофилизирован в соответствии с описанной выше процедурой.

[00524] Лиофилизированный апраглутид, который не соответствует критериям, установленным в спецификации апраглутида, может быть подвергнут повторной лиофилизации.

[00525] Повторную лиофилизацию можно проводить после восстановления пептида путем повторения стадии лиофилизации, как описано выше.

Примеси

[00526] Процесс производства апраглутида, как описано в примере 8, выполняли для снижения уровня примеси изомера пептида β -Asp³ в апраглутиде ниже 1,5%. В некоторых вариантах осуществления процесс производства апраглутида, как описано в примере 8, снижает уровень примеси изомера пептида β -Asp³ в апраглутиде ниже 1%.

[00527] Образованию примеси β -Asp³ способствуют высокие значения pH и наличие последовательности Asp³-Gly⁴. Последовательность Asp-Gly особенно склонна к образованию аспартимида в результате замыкания кольца (атака азота из α -карбоксамидной связи на β -карбоксылную боковую цепь). Аспартимиды восприимчивы к эпимеризации, катализируемой основанием, и могут подвергаться реакциям раскрытия кольца, что может привести к образованию множества побочных продуктов. Атака водой может привести к образованию пептида β -аспартила.

[00528] Образование примеси β -Asp³ на стадии декарбоксилирования/экстракции (стадия 3а) при отщеплении пептида от смолы может достигать уровня >1%, чему способствует длительное воздействие экстремальных значений pH, в частности раствора аммиака с сильным основанием в H₂O / ACN 80 : 20, pH около 10 при комнатной температуре. В процессе производства апраглутида, как описано в примере 8, pH снизили с 10 до 8, сократили время реакции декарбоксилирования с 24 часов до 65 минут, поменяли температуру реакции с комнатной температуры на 50 °C и снизили температуру хранения

с комнатной температуры до 5 °С. Эти изменения привели к снижению содержания примеси β -Asp³ ниже 1,5%. В некоторых вариантах осуществления эти изменения привели к снижению содержания примеси β -Asp³ ниже 1%.

[00529] В процессе производства апраглутида, как описано в примере 8, изменили реакцию снятия защиты Fmoc с примеси Asp³, чтобы применять раствор 10% пиперидина и 2% Охута в DMF с двумя циклами снятия защиты, первым на 15 минут и вторым на 30 минут. Эти более мягкие основные условия позволили полностью снять защиту с Asp³ и уменьшить образование аспартимида и последующее образование побочного продукта β -Asp³.

[00530] Образование примеси D-His может происходить из-за рацемизации аминокислоты во время реакции связывания с применением DIC/Охута. Процесс последовательной сборки отдельных аминокислот Gly и His показал вариабельность уровней примеси D-His от 0,3% до 1,2%, иногда с неполным связыванием. Включение Fmoc-His(Trt)-ОН с применением связывающих реагентов DIC/Охута может способствовать рацемизации в D-форму His.

[00531] В процессе производства апраглутида, как описано в примере 8, в качестве исходного материала для этой реакции применяли дипептид Boc-His(Trt)-Gly-ОН вместо последовательной сборки аминокислот Gly и His. Это позволяет снизить уровень рацемизации His до уровня ниже 1% (0,3% в одной изготовленной серии) и приводит конечный уровень D-His в соответствие со спецификациями дипептида (Boc-D-His(Trt)-Gly-ОН). Это также позволяет сократить количество стадий снятия защиты, таким образом сводя к минимуму влияние условий снятия защиты (высокий pH) на образование примеси β -Asp³, как описано выше.

Пример 9. Клиническое исследование человека фазы III введения композиций апраглутида по настоящему описанию

[00532] В следующем не имеющем ограничительного характера примере описано клиническое исследование фазы 3, в котором субъектов с SBS-IF лечат препаратами апраглутида по настоящему описанию. Это клиническое исследование фазы 2 исследует эффективность еженедельного подкожного введения апраглутида в снижении зависимости от парентеральной поддержки у пациентов с SBS-IF.

[00533] 144 взрослых пациента с SBS-IF будут лечить композициями апраглутида по настоящему описанию или плацебо. Пациентам с SBS-IF будут вводить 2,5 мг апраглутида по настоящему описанию, если субъект имеет массу тела менее 50 кг, или

5 мг апраглутида по настоящему описанию, если субъект имеет массу тела более или равную 50 кг, или плацебо один раз в неделю в течение 48 недель.

[00534] Исследование представляет собой многоцентровое двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование фазы 3. Рандомизация участников заключается в рандомизации пациентов со стомой и пациентов с нарушением целостности толстой кишки в зависимости от анатомических особенностей.

[00535] Оценка эффективности первичной конечной точки будет проводиться через 24 недели. В первичной конечной точке оценят относительное изменение фактического еженедельного объема PS по сравнению с исходным уровнем. Оценка эффективности вторичной конечной точки будет проводиться через 24 недели и 48 недель. Будут оцениваться специфические для анатомии вторичные конечные точки, а также вторичные конечные точки, общие для всех пациентов.

[00536] Во вторичные конечные точки, подлежащие оценке, включаются, без ограничений:

1. Субъекты, достигшие снижения PS по меньшей мере на 1 сутки в неделю в недели 24/48.
2. Относительное изменение фактического недельного объема PS по сравнению с исходным уровнем в недели 12/24/48.
3. Пациенты с SBS-IF, достигшие энтеральной автономии в недели 24/48.
4. По меньшей мере 20% снижение объема PS по сравнению с исходным уровнем в недели 20/24.
5. Снижение калорийности парентерального питания (PN) в неделю 24.
6. Изменение общего впечатления пациента о тяжести состояния (PGIS) по сравнению с исходным уровнем.
7. Изменение по сравнению с исходным уровнем по Питтсбургскому опроснику качества ночного сна (PSQI).
8. Изменение общего впечатления пациента об изменении состояния (PGIC) по сравнению с исходным уровнем.
9. Постоянная скорости абсорбции (ka) апраглутида на основе анализа данных ФК популяции.
10. Кажущийся клиренс (CL/F) апраглутида посредством анализа данных ФК популяции.
11. Кажущийся объем распределения (Vz/F) апраглутида посредством анализа данных ФК популяции.

Пример 10. Клиническое исследование человека фазы I введения композиций апраглутида по настоящему описанию

[00537] В следующем не имеющем ограничительного характера примере описано клиническое исследование фазы I, в котором субъектов с нормальной функцией почек и с нарушением функции почек лечили препаратами апраглутида по настоящему описанию. В данном клиническом исследовании фазы I исследуются фармакокинетика и безопасность однократного подкожного введения 5 мг апраглутида у субъектов с различной степенью нарушения функции почек. Функция почек рассчитывается по расчетной скорости клубочковой фильтрации (eGFR) в соответствии с формулой для расчета креатинина Рабочей группы по исследованию эпидемиологии хронической болезни почек (CKD-EPI).

[00538] Исследование представляет собой двухстадийное открытое многоцентровое нерандомизированное исследование фазы I. В части 1 исследования 8 субъектам с тяжелым нарушением функции почек (когорты 1) и 6 субъектам с нормальной функцией почек (когорты 2) будут вводить разовую дозу 5 мг апраглутида по настоящему описанию. В части 2 исследования 8 субъектам с умеренным нарушением функции почек (когорты 3) и 8 субъектам с легким нарушением функции почек (когорты 4) будут вводить разовую дозу 5 мг апраглутида по настоящему описанию. Субъекты будут включены в исследование, если отношение среднего геометрического (GMR) AUC_{inf} или AUC_{last} для группы с тяжелым нарушением функции почек по сравнению с контрольной группой составит ≥ 2 .

[00539] Приемлемость пациентов оценивают во время скринингового визита. Основные критерии включения включают следующее:

1. Все участники

- a. Возраст от 18 до 75 лет включительно.
- b. Субъекты, которые желают и могут соблюдать процедуры исследования.
- c. Субъекты, способные понять и желающие подписать информированное согласие.
- d. Индекс массы тела (ИМТ) от $\geq 17,5$ до ≤ 40 кг/м². и общая масса тела > 50 кг (110 фунтов).
- e. Женщины детородного возраста (WOCBP), пользующиеся высокоэффективным методом контрацепции, во время визита исследования и в течение 1 месяца после завершения исследования (ЕОТ). Стерилизованные или бесплодные женщины или женщины, имеющие постменопаузу.

- f. Субъекты мужского пола с партнершей детородного возраста: высокоэффективные методы контрацепции и отсутствие донорства спермы во время исследования и в течение 1 месяца после визита (ЕОТ).
2. Здоровые участники
 - a. Отсутствие клинически значимых аномалий (анамнез, показатели жизнедеятельности, ЭКГ, анализы безопасности).
 - b. eGFR, измеренная по формуле СКД-EPI ≥ 90 мл/мин/1,73 м² при двух визитах для скрининга.
 - c. Демографически сопоставимы с группой лиц с нарушением функции почек.
 3. Участники с нарушением функции почек
 - a. Тяжелое нарушение функции почек: eGFR < 30 мл/мин/1,73 м², но не требуется гемодиализ.
 - b. Умеренное нарушение функции почек: eGFR ≥ 30 мл/мин/1,73 м² и < 60 мл/мин/1,73 м².
 - c. Легкое нарушение функции почек: eGFR ≥ 60 и < 90 мл/мин/1,73 м².

[00540] Оценки эффективности первичной конечной точки будут проводиться через 240 часов после однократной дозы. Первичная конечная точка будет оценивать максимальную концентрацию в плазме (C_{max}), площадь под кривой концентрация-время от 0 до бесконечности (AUC_{inf}) и площадь под кривой концентрация-время до последней измеримой концентрации (AUC_{last}) в период от 0 до 240 часов. Оценка эффективности вторичной конечной точки будет проводиться через 240 часов, 7 суток, 14 суток и 28 суток. Первичные и вторичные конечные точки будут оцениваться у всех субъектов.

[00541] Вторичные конечные точки, подлежащие оценке, включают в себя, без ограничений:

1. Площадь под кривой зависимости концентрации от времени до последней измеримой концентрации в сутки от 0 до 7 (AUC_{сутки0-7}). Образцы, собранные в течение 168 часов после однократной дозы.
2. Время достижения максимальной концентрации (T_{max}). Образцы, собранные в течение 240 часов после однократной дозы.
3. Скорость конечной элиминации постоянна. Образцы, собранные в течение 240 часов после однократной дозы.
4. Период полувыведения конечной элиминации. Образцы, собранные в течение 240 часов после однократной дозы.

5. Кажущийся клиренс после внесосудистого введения (CL/F). Образцы, собранные в течение 240 часов после однократной дозы.
6. Кажущийся объем распределения после внесосудистого введения (Vz/F). Образцы, собранные в течение 240 часов после однократной дозы.
7. Количество участников с нежелательными явлениями или нежелательными явлениями, представляющими особый интерес, в сутки 14–28.
8. Клинически значимое изменение по сравнению с исходным уровнем показателей жизненно важных функций в сутки 14–28.
9. Клинически значимое изменение по сравнению с исходным уровнем на записанной в трех повторах ЭКГ в 12 отведениях в сутки 14–28.
10. Количество участников, у которых наблюдается клинически значимое изменение по сравнению с исходным уровнем в клинико-лабораторных оценках, в сутки 14–28.

[00542] Как должно быть понятно специалисту в данной области, пациентам с нарушением функции почек обычно требуется коррекция дозы препарата, поскольку нарушение функции почек может неблагоприятно влиять на некоторые пути метаболизма препарата в печени/кишечном тракте, а также связано с другими изменениями, такими как абсорбция, связывание с белками плазмы, транспорт и распределение в тканях. Даже если фармакокинетические данные указывают на то, что почечная экскреция не является основным путем выведения апраглутида, другие аналоги GLP-2 (например, тедуглутид) требуют снижения дозы у пациентов с умеренным и тяжелым нарушением функции почек и конечной стадией нарушения функции почек. В исследовании, описанном в примере 10, было обнаружено, что пациентам с тяжелой СКД безопасно вводить 5 мг апраглутида без риска передозировки в этой популяции. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, это указывает на то, что апраглутид можно вводить пациентам с нарушениями функции почек без адаптации дозы.

Фармакокинетика

[00543] Концентрацию апраглутида в плазме после введения однократной подкожной дозы 5 мг апраглутида контролировали в течение 240 часов как у здоровых субъектов (когорты 2), так и у субъектов с тяжелой СКД (когорты 1), результаты представлены на ФИГ. 29.

[00544] Сводные фармакокинетические параметры апраглутида предоставлены в таблице 27. При анализе отдельных кривых концентрации апраглутида в плазме были выявлены два отклонения (по одному в каждой когорте). Отклонение в когорте 1 было у субъекта с самыми высокими показателями массы тела и индекса массы тела (ИМТ) в группе, в то время как отклонение в когорте 2 было у субъекта с самыми низкими показателями массы

тела и ИМТ. Средние геометрические соотношения были рассчитаны с учетом и без учета отклонений.

Таблица 27

Однократная доза 5 мг апраглутида			
	Вся когорта		
Параметр	90% ДИ, нижняя граница	Среднее геометрическое отношение	90% ДИ, верхняя граница
$C_{\max}$ (нг/мл)	0,370	0,572	0,885
$AUC_{\inf}$ (ч*нг/мл)	0,388	0,614	0,972
	Когорта без двух отклонений		
$C_{\max}$ (нг/мл)	0,556	0,774	1,077
$AUC_{\inf}$ (ч*нг/мл)	0,657	0,849	1,098

$C_{\max}$ — максимальная концентрация в плазме; $AUC_{\inf}$ — площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до бесконечности.

[00545] Для всей популяции субъектов отношение среднего геометрического для $C_{\max}$ составило 0,572 при 90% ДИ 0,37–0,885, а для $AUC_{\inf}$ — 0,614 при 90% ДИ 0,388–0,972. Принимая во внимание, что при удалении отклоняющихся данных субъектов отношение среднего геометрического для $C_{\max}$ составило 0,774 при 90% ДИ 0,556–1,077, а для $AUC_{\inf}$ — 0,849 при 90% ДИ 0,657–1,098. Как должно быть понятно специалисту в данной области, пациенты с тяжелым нарушением функции почек имеют более высокую массу тела и индекс массы тела, чем здоровые субъекты. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, это может указывать на то, что действие апраглутида на субъектов в когорте 1 было меньшим из-за более низких концентраций в плазме.

Пример 11. Процесс производства апраглутида – (III)

[00546] На ФИГ. 2А и ФИГ. 2В схематически представлен иллюстративный способ по настоящему описанию производства апраглутида с повышенным уровнем чистоты по сравнению с ранее описанными путями синтеза (например, патент США № 8,580,918). Производственный процесс, представленный на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, именуемый в настоящем документе как процесс В, включает первичную очистку с помощью хроматографии ОФ-ВЭЖХ (C18) в подвижных фазах на основе TFA (H₂O/ацетонитрил) до чистоты $\geq 90\%$ с доведением pH фракций с помощью бикарбоната натрия (NaHCO₃) с последующей вторичной очисткой методом ОФ-ВЭЖХ (C18) в подвижных фазах NaHCO₃ (H₂O/ацетонитрил) до чистоты $\geq 97\%$, с последующим обессоливанием / заменой буфера с помощью ОФ-ВЭЖХ (C18) в подвижных фазах ацетата натрия

(NaOAc) / H₂O / ацетонитрила. В таблице 2а показана чистота лекарственного препарата апраглутида, полученного с применением процесса В, а также уровень содержания основных примесей. В таблице 2а показана чистота лекарственного препарата апраглутида, полученного с применением процесса В, а также общий технологический выход препарата для процесса. Как показано в таблице 2а и таблице 2b, процесс В может давать апраглутид с чистотой не менее 97% и низким уровнем содержания примесей. Более того, процесс В демонстрирует технологический выход препарата около 20%.

Примеси

[00547] Процесс производства апраглутида, представленный на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, можно дополнительно модифицировать для снижения уровня примеси изомера пептида β-Asp³ в апраглутиде ниже 1,5%. В некоторых вариантах осуществления процесс производства апраглутида, как описано в примере 8, снижает уровень примеси изомера пептида β-Asp³ в апраглутиде ниже 1%.

[00548] Образованию примеси β-Asp³ способствуют высокие значения pH и наличие последовательности Asp³-Gly⁴. Последовательность Asp-Gly особенно склонна к образованию аспартимида в результате замыкания кольца (атака азота из α-карбоксиамидной связи на β-карбоксильную боковую цепь). Аспартимиды восприимчивы к эпимеризации, катализируемой основанием, и могут подвергаться реакциям раскрытия кольца, что может привести к образованию множества побочных продуктов. Атака водой может привести к образованию пептида β-аспартила.

[00549] Образование примеси β-Asp³ на стадии декарбоксилирования/экстракции (стадия 3(1), ФИГ. 2В) при отщеплении пептида от смолы может достигать уровня > 1%, чему способствует длительное воздействие экстремальных значений pH, в частности раствора аммиака с сильным основанием в H₂O / ACN 80 : 20, pH около 10 при комнатной температуре. Процесс производства апраглутида, как представлено на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, может быть модифицирован для снижения pH с 10 до 8, сокращения время реакции декарбоксилирования с 24 часов до 65 минут, изменения температуры реакции с комнатной температуры на 50 °C и снижения температуры хранения с комнатной температуры до 5 °C. Эти изменения могут привести к снижению содержания примеси β-Asp³ ниже 1,5%. В некоторых вариантах осуществления эти изменения приводили к снижению содержания примеси β-Asp³ ниже 1%.

[00550] Процесс производства апраглутида, как представлено на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, может быть также модифицирован, в частности, в реакции снятия защиты Fmoc с примеси Asp³, чтобы применять раствор 10% пиперидина и 2% Охута в DMF с двумя циклами

снятия защиты, первым на 15 минут и вторым на 30 минут. Эти более мягкие основные условия позволяют полностью снять защиту с Asp³ и уменьшить образование аспартимида и последующее образование побочного продукта β-Asp³.

[00551] Образование примеси D-His может происходить из-за рацемизации аминокислоты во время реакции связывания с применением DIC/Охума. Процесс последовательной сборки отдельных аминокислот Gly и His показал вариабельность уровней примеси D-His от 0,3% до 1,2%, иногда с неполным сочетанием. Включение Fmoc-His(Trt)-ОН с использованием реагентов сочетания DIC/Охума может способствовать рацемизации в D-форму His.

[00552] Процесс производства апраглутида, как представлено на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, может быть также модифицирован таким образом, чтобы в качестве исходного материала для этой реакции применять дипептид Boc-His(Trt)-Gly-ОН вместо последовательной сборки аминокислот Gly и His. Это позволяет снизить уровень рацемизации His до уровня ниже 1% (0,3% в одной изготовленной серии) и приводит конечный уровень D-His в соответствие со спецификациями дипептида (Boc-D-His(Trt)-Gly-ОН). Это также позволяет сократить количество этапов снятия защиты, тем самым сводя к минимуму влияние условий снятия защиты (высокий pH) на образование примеси β-Asp³, как описано выше.

[00553] Процесс производства апраглутида, как представлено на ФИГ. 2А и ФИГ. 2В, и модифицированный, как описано выше, в настоящем документе называется «процесс С». Как показано в таблице 2b, процесс С может давать апраглутид с чистотой не менее 97% и имеет технологический выход продукта около 22 %.

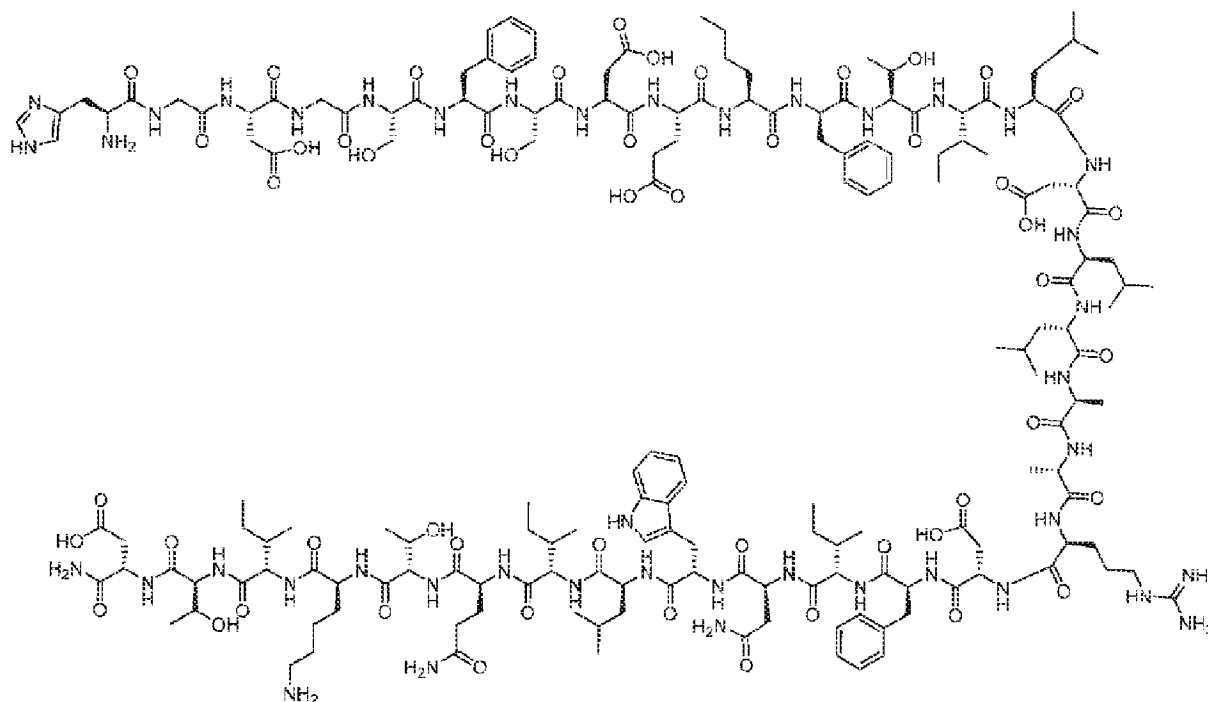
ЭКВИВАЛЕНТЫ

[00554] Предшествующее описание было представлено только в целях иллюстрации и не предназначено для ограничения изобретения точной описанной формой. Подробности одного или более вариантов осуществления и/или аспектов настоящего описания изложены в сопроводительном описании выше. Любой из вариантов осуществления и/или аспектов, описанных в настоящем документе, может быть объединен с любым другим вариантом осуществления и/или аспектом, описанным в настоящем документе, и может быть объединено любое количество вариантов осуществления и/или аспектов. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут быть применены на практике или при испытании по настоящему описанию, в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы. Другие признаки, объекты и преимущества по настоящему описанию будут

очевидны из описания и формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается средним специалистом в области, к которой относится данное описание. Все патенты и публикации, приведенные в настоящем описании, включены путем ссылки.

Формула изобретения

1. Натриевая соль апраглутида, имеющая чистоту не менее 95%, причем апраглутид имеет следующую структуру:



2. Натриевая соль апраглутида по п. 1, которая имеет чистоту не менее 97%.

3. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая содержит не более 3% примеси Des-Gly⁴ апраглутида.

4. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, в которой сумма примесей аспартимида³ апраглутида, Asp³³-ОН апраглутида и Des-Ser⁷ апраглутида в натриевой соли апраглутида составляет не более 2%.

5. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая содержит не более 2% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида.

6. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая содержит не более 1,5% примеси β-Asp³ апраглутида.

7. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая содержит не более 1% примеси β-Asp³ апраглутида.

8. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая содержит не более 1% примеси D-His апраглутида.

9. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая содержит:

не более 1% примеси Asp³³-ОН апраглутида,
не более 1% примеси Des-Ser⁷ апраглутида,
не более 1% примеси D-аспартамитид³ апраглутида,
не более 1% примеси [Trp²⁵, 2-(2,4,6-триметоксифенил)] апраглутида, и
причем сумма примесей Des-Gly⁴ апраглутида и аспартимида³ апраглутида в
натриевой соли апраглутида составляет не более 1%.

10. Натриевая соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов, которая предложена в виде лиофилизированного порошка.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая натриевую соль апраглутида по любому одному из предшествующих пунктов.

12. Фармацевтическая композиция по п. 11, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из глицина, L-гистидина или маннита.

13. Фармацевтическая композиция по п. 12, которая содержит:

около 12,5 мг апраглутида (натриевая соль);

около 1,88 мг глицина;

около 3,88 мг L-гистидина;

около 57,5 мг маннита.

14. Фармацевтическая композиция по п. 12 или п. 13, которая предложена в виде лиофилизированного порошка.

15. Двухкамерный шприц для порошка, содержащий натриевую соль апраглутида по любому одному из пп. 1–10 или фармацевтическую композицию по любому одному из пп. 11–14.

16. Способ получения пептида-аналога GLP-2, включающий:

а) проведение твердофазного пептидного синтеза (ТФПС) для синтеза пептида-аналога GLP-2 на смоле Fmoc-Rink-амид-метил-бензгидроамина (MBHA);

б) отщепление синтезированного пептида-аналога GLP-2 от смолы и снятие защиты с боковых цепей синтезированного пептида-аналога GLP-2 путем обработки смолы раствором, содержащим трифторуксусную кислоту (TFA), воду и анизол;

с) очистку синтезированного пептида-аналога GLP-2 стадии (б) путем проведения первой препаративной очистки высокоэффективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) с применением подвижных фаз на основе TFA с последующим получением раствора, содержащего пептид-аналог GLP-2 с чистотой не менее 90%;

d) очистку продукта с этапа (с) путем проведения второй очистки ОФ-ВЭЖХ с применением подвижных фаз на основе NaHCO_3 с последующим получением раствора, содержащего пептид-аналог GLP-2 с чистотой не менее 97%.

17. Способ по п. 16, дополнительно включающий:

е) дополнительную очистку продукта стадии (d) путем проведения третьей очистки ОФ-ВЭЖХ с применением подвижных фаз на основе NaOAc с последующим получением раствора, содержащего натриевую соль пептида-аналога GLP-2 с чистотой не менее 97%.

18. Способ по п. 17, дополнительно включающий:

ф) доведение pH раствора, содержащего натриевую соль пептида-аналога GLP-2, до около pH 7,9 с применением 0,1% AcOH в воде;

г) пропускание продукта стадии (f) через фильтр с размером пор 0,2 мкм;

h) лиофилизация продукта стадии (g) с получением лиофилизированной натриевой соли пептида-аналога GLP-2 с чистотой не менее 97%.

19. Способ по п. 16, дополнительно включающий:

с)(i) проведение декарбоксилирования синтезированного пептида-аналога GLP-2 путем солюбилизации пептида в растворе, содержащем воду и ацетонитрил в буфере аммиака.

20. Способ по п. 19, в котором pH раствора, содержащего воду и ацетонитрил в буфере аммиака, доводят до около pH 8,0.

21. Способ по любому одному из пп. 16–20, в котором стадия (a) включает:

i) получение смолы MBHA, на которой будет проводиться ТФПС;

ii) выполнение начальной реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания для добавления к смоле первой Fmoc-защищенной аминокислоты с образованием защищенного пептида на смоле;

iii) выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания для присоединения по меньшей мере одной Fmoc-защищенной аминокислоты к защищенному пептиду;

iv) повторение стадии iii до тех пор, пока пептид-аналог GLP-2 не будет синтезирован на смоле с получением Fmoc-защищенного и защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой;

v) выполнение реакции снятия защиты Fmoc для получения защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой; и

vi) сушку защищенного по боковой цепи пептида-аналога GLP-2, связанного со смолой.

22. Способ по п. 21, в котором стадия (a)(i) включает:

(a1) промывку смолы раствором, содержащим диметилформамид (DMF) и *N,N*-диизопропилэтиламин (DIEA) из расчета 5 мл раствора на грамм смолы в атмосфере N_2 ;

(b1) связывание амидного линкера Rink со смолой в растворе, содержащем гексафторфосфат 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония, Гексафторфосфат бензотриазолтетраметилуроний (HBTU), DIEA и гидроксibenзотриазол (HOBt) в DMF;

(c1) промывку продукта, образованного на стадии (b1), с помощью DMF;

(d1) выполнение реакции восстановления путем приведения смолы в контакт с раствором, содержащим уксусный ангидрид (Ac_2O) и DIEA в DMF; и

(e1) промывку продукта, образованного на стадии (d1), с помощью DMF.

23. Способ по п. 21 или п. 22, в котором выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания включает:

(a2) обработку смолы раствором, содержащим пиперидин в DMF;

(b2) промывку смолы DMF;

(c2) промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охута.

(d2) приведение смолы в контакт по меньшей мере с одной Fmoc-защищенной аминокислотой и первым количеством раствора, содержащим диизопропилкарбодиимид (DIC) и этилцианогидроксииминоацетат (охута);

(e2) приведение смолы в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охута. и

(f2) промывку продукта, образованного на стадии (e2), с помощью DMF.

24. Способ по п. 23, в котором смолу приводят в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охута, через около 30 минут после приведения смолы в контакт с первым количеством раствора, содержащего DIC и Охута.

25. Способ по п. 21 или п. 22, в котором выполнение реакции снятия защиты Fmoc с последующей реакцией связывания включает:

(a2) обработку смолы раствором, содержащим пиперидин и Охута в DMF;

(b2) промывку смолы DMF;

(c2) промывку смолы раствором, содержащим DMF и Охута.

(d2) приведение смолы в контакт по меньшей мере с одной Fmoc-защищенной аминокислотой и первым количеством раствора, содержащим диизопропилкарбодиимид (DIC) и этилцианогидроксииминоацетат (охута);

(e2) приведение смолы в контакт со вторым количеством раствора, содержащего DIC и Охута. и

(f2) промывку продукта, образованного на стадии (e2), с помощью DMF.

26. Способ по п. 25, в котором смолу приводят в контакт с первым количеством раствора, содержащего пиперидин и Охута, в DMF в течение 15 минут с последующим контактированием смолы со вторым количеством раствора, содержащего пиперидин и Охута, в DMF в течение 30 минут.

27. Способ по любому одному из пп. 23–26, в котором по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Fmoc-Gln(Trt)-Thr($\psi^{Me,Me}pro$)-OH.

28. Способ по любому одному из пп. 23–26, в котором по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Fmoc-Gly(Tmb)-OH.

29. Способ по любому одному из пп. 23–26, в котором по меньшей мере одна Fmoc-защищенная аминокислота представляет собой Boc-His(Trt)-Gly-OH.

30. Способ по любому одному из пп. 23–29, в котором способ дополнительно включает между стадиями (e2) и (f2) выполнение испытания реакции связывания, причем испытание реакции связывания представляет собой тест Кайзера.

31. Способы по любому одному из пп. 16–30, в котором пептид-аналог GLP-2 представляет собой апраглутид.

32. Композиция, содержащая пептид-аналог GLP-2, полученный способом по любому одному из пп. 16–31.

33. Способ лечения синдрома короткой кишки с кишечным расстройством (SBS-IF) или синдрома короткой кишки с кишечной недостаточностью (SBS-II) у субъекта, включающий введение субъекту апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли,

причем апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе около 2,5 мг/неделю, когда субъект имеет массу тела менее 50 кг, или

причем апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе около 5 мг/неделю, когда субъект имеет массу тела более или равную 50 кг.

34. Способ по п. 33, в котором апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят путем подкожной инъекции.

35. Способ по п. 33 или п. 34, в котором у субъекта имеется нарушение целостности толстой кишки, и причем апраглутид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в течение около 48 недель.

36. Способ по п. 35, в котором субъект имеет более 50% нарушения целостности толстой кишки.

37. Способ по п. 33 или п. 34, в котором у субъекта имеется по меньшей мере одна стома, и причем апраглутид вводят в течение около 24 недель.

38. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию сырой массы, потребляемой с пищей, у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

39. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли снижает у субъекта объем выделяемого кала по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

40. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает абсолютный объем выделяемой мочи у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

41. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию натрия и калия у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

42. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает экскрецию натрия и калия с мочой у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

43. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию энергии у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

44. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли снижает у субъекта содержание энергии в выделяемом кале по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

45. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает кишечную абсорбцию углеводов, белков и жиров у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

46. Способ по п. 33, в котором введение апраглутида или его фармацевтически приемлемой соли увеличивает концентрацию цитруллина у субъекта по сравнению с субъектом, не получавшим лечение или получавшим плацебо.

Поз. AA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Нативный GLP-2	H	A	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	OH					
Тедуглутид	H	G	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	OH					
Глепаглутид	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K	K	K	K	K	NH ₂
Апраглутид	H	G	D	G	S	F	S	D	E	Nle	D-Phe	T	I	L	D	L	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	NH ₂					

Gly2 исключает ферментативное отщепление ферментом DPP-IV

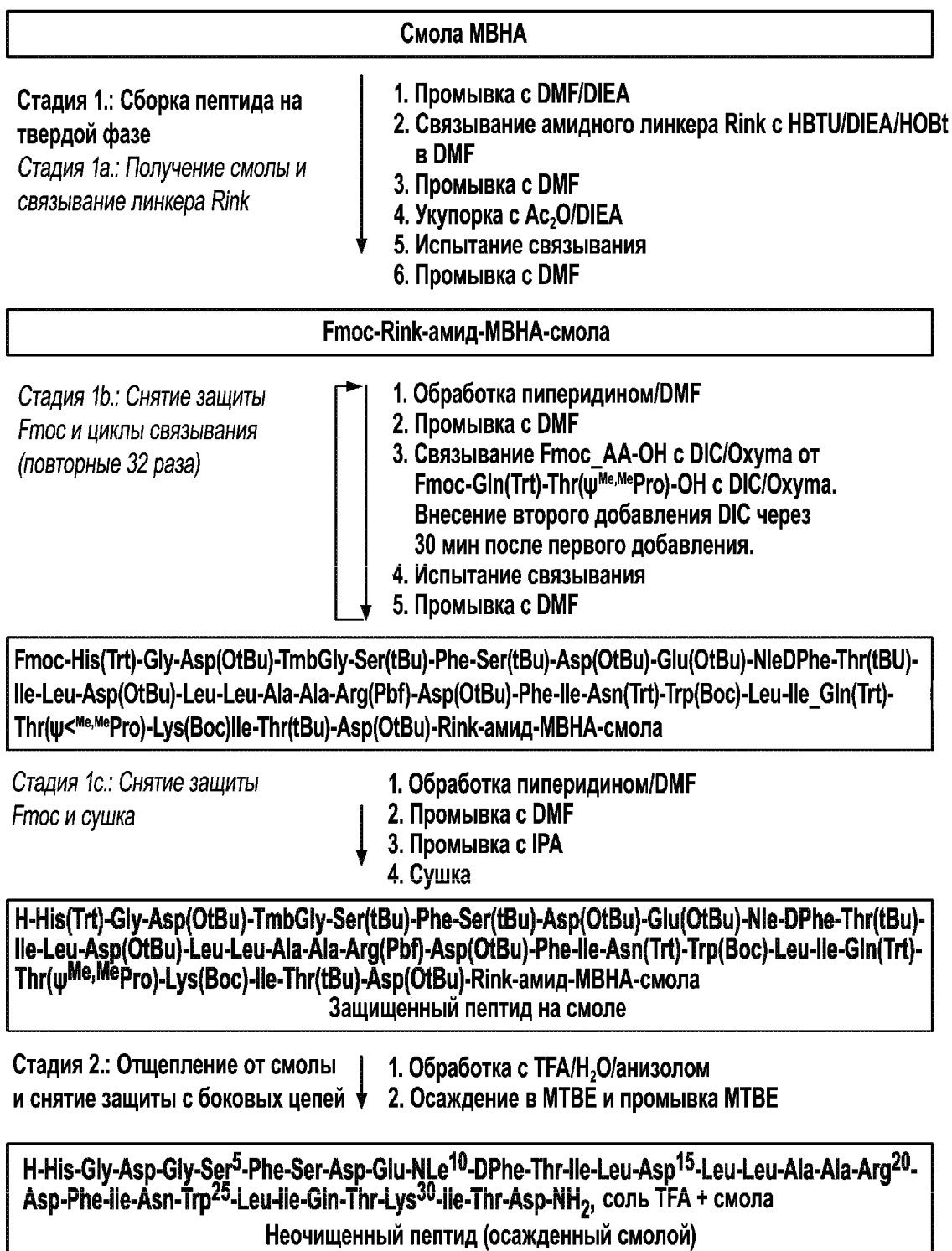
Не содержащий серы Nle 10 вместо Met10 исключает образование примесей, которые могут образовываться при химическом синтезе за счет окисления и алкилирования атома серы метионина.

Замена двух аспарагинов, Asn11 на D-Phe11 и Asn16 на Leu 16, вызывает значительное изменение связывания с белком плазмы и соответствующее значительное снижение общего клиренса.

Изменение функциональности С-конца с карбоновой кислоты на амидную замедляет абсорбцию из места п/к инъекции в кровоток, увеличивая конечный период полувыведения. Считается, что более низкий заряд из-за амидной группы приводит к более ограниченной растворимости пептида и образованию временного "хранилища".

ФИГ. 1

Блок-схема процесса производства апраглутида



ФИГ. 2А

Стадия 3.: Первая очистка с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ

1. Экстракция неочищенного пептида из смеси отщепленных пептидных смол $H_2O/CH_3CN/NH_4OH$ и фильтрация
2. Очистка с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ в 0,05% TFA (H_2O /ацетонитрил)
3. Доведение pH фракции с помощью 0,6M $NaHCO_3$
4. Объединение в пул
5. IPC: чистота пула с помощью ОФ-ВЭЖХ $\geq 90\%$

H-His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-NLe-DPhe-Thr-Ile-Leu-Asp-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂

Полученный методом ОФ-ВЭЖХ пептид в растворе

Стадия 4.: Вторая очистка с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ

1. Разбавление предыдущего раствора с помощью H_2O
2. Очистка методом ОФ-ВЭЖХ в 0,05M $NaHCO_3/H_2O$ /ацетонитрила
3. Объединение в пул
4. IPC: чистота пула $\geq 97\%$ с помощью ОФ-ВЭЖХ

H-His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-NLe-DPhe-Thr-Ile-Leu-Asp-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂

Очищенный методом ОФ-ВЭЖХ пептид в растворе

Стадия 5.: Обессоливание/частичный ионный обмен с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ

1. Разбавление предыдущего раствора с помощью H_2O
2. Солевой обмен методом ОФ-ВЭЖХ с 1,5 mM NaOAc/воды/ацетонитрила
3. Объединение в пул
4. IPC: чистота пула $\geq 97\%$ с помощью ОФ-ВЭЖХ
5. Уменьшение объема пула путем выпаривания
6. Добавление 0,1% AcOH в воду для достижения pH 7,85–7,90

H-His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-NLe-DPhe-Thr-Ile-Leu-Asp-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂, натриевая соль

Очищенный методом ОФ-ВЭЖХ пептид в растворе

Стадия 6.: Лиофилизация и упаковка

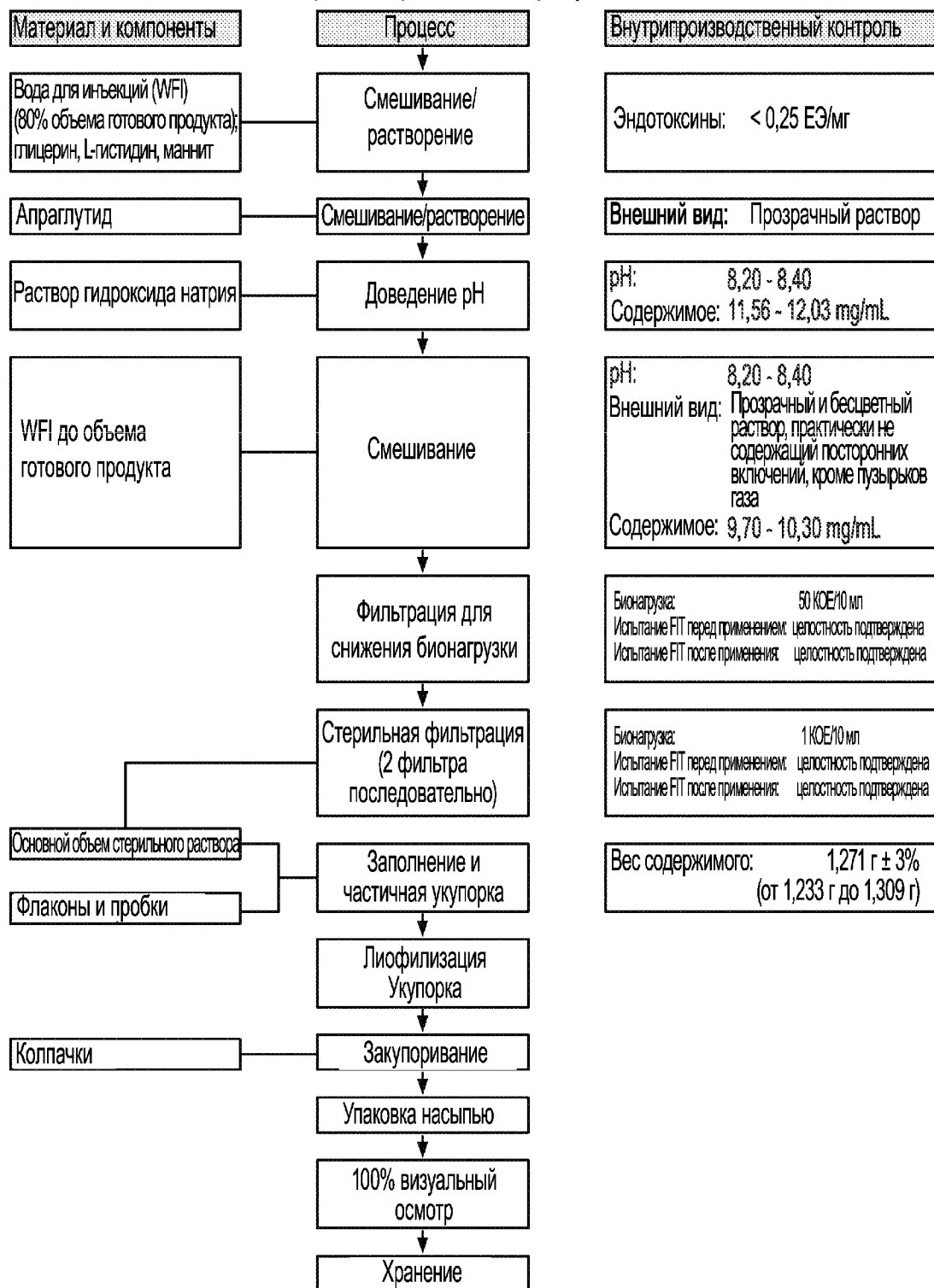
1. Фильтрация через стерильный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм
2. Лиофилизация
3. Упаковка в среде аргона

H-His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-NLe-DPhe-Thr-Ile-Leu-Asp-Leu-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH₂, 3Na

Лиофилизированный API: Апраглутид

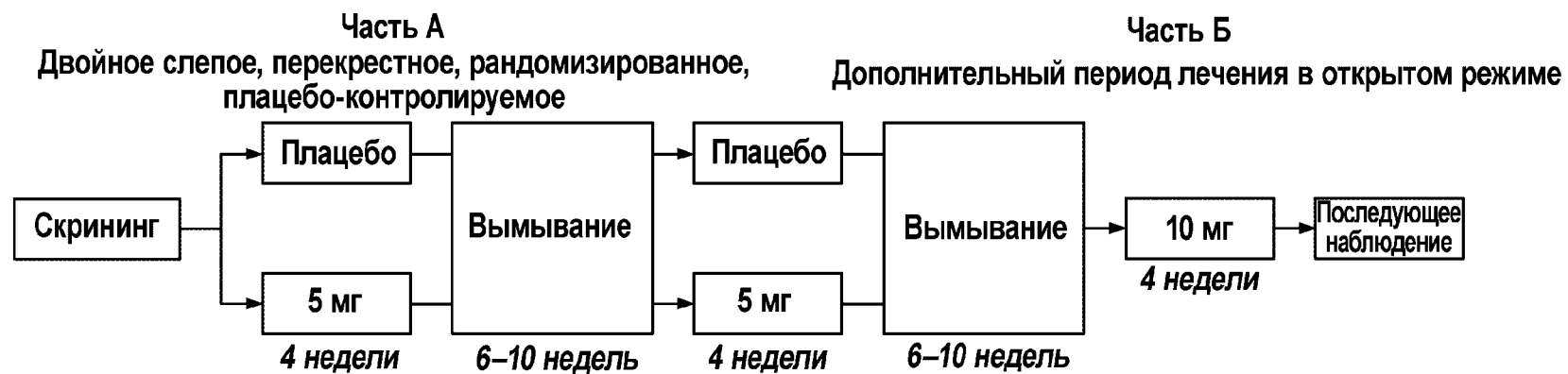
ФИГ. 2В

Блок-схема процесса производства апраглутида для инъекций

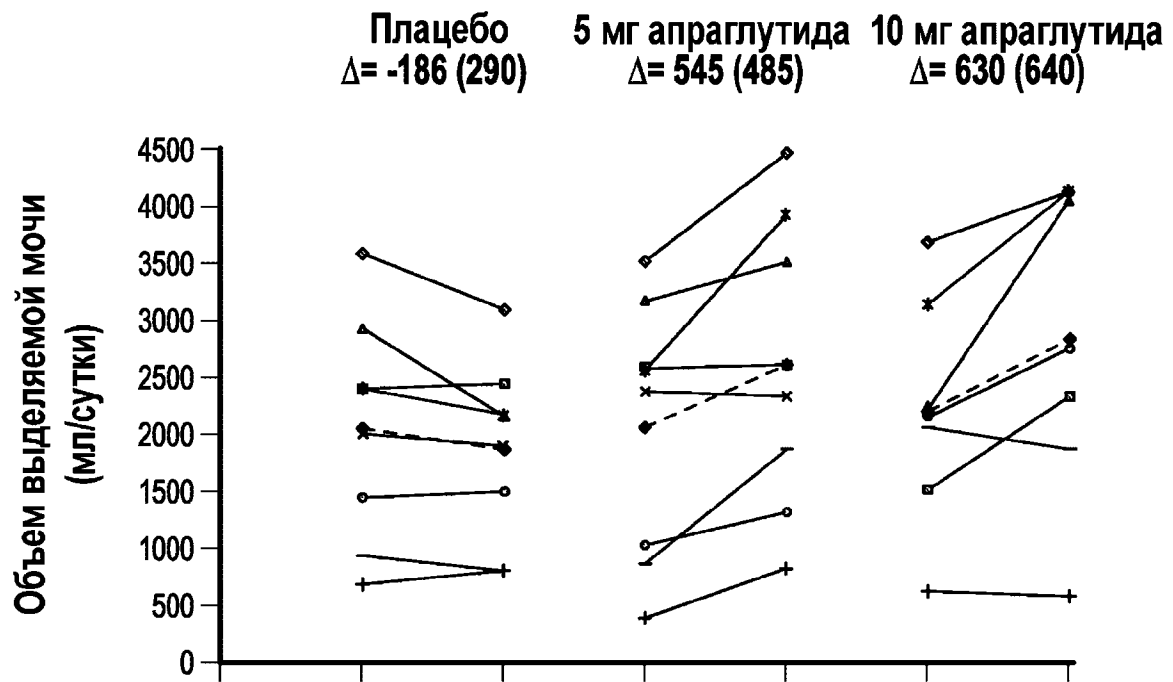


Испытание целостности фильтра — FTT

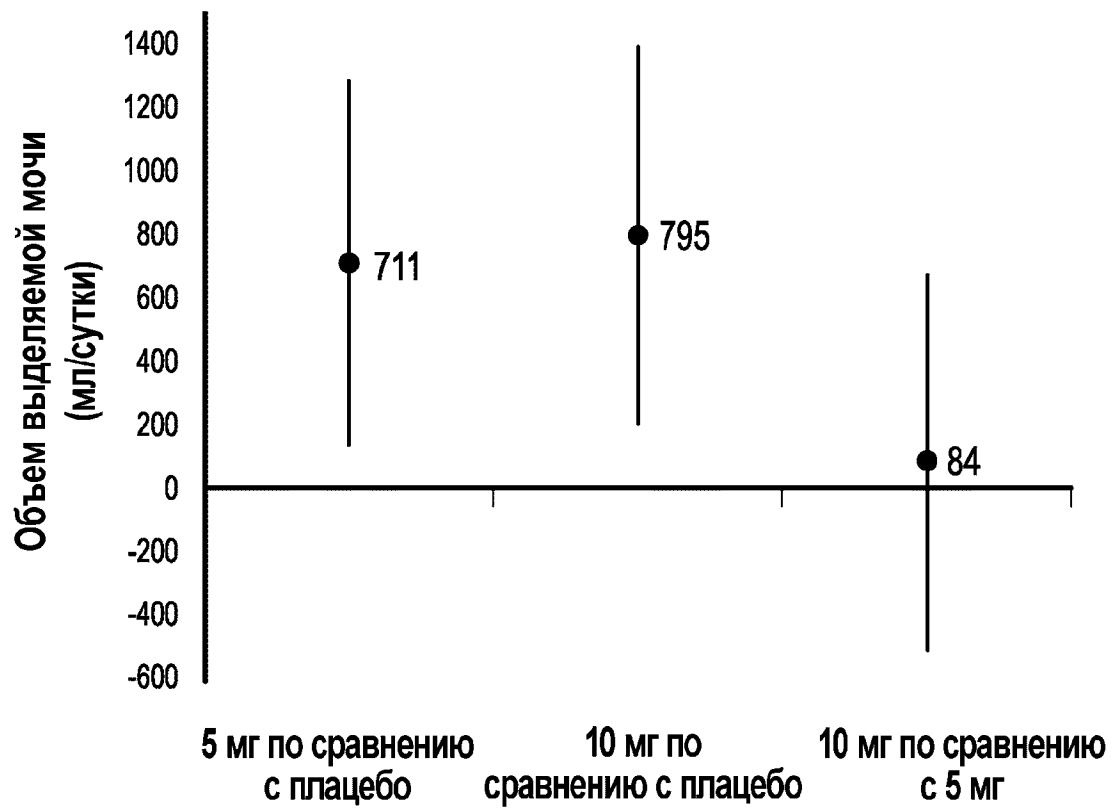
ФИГ. 3

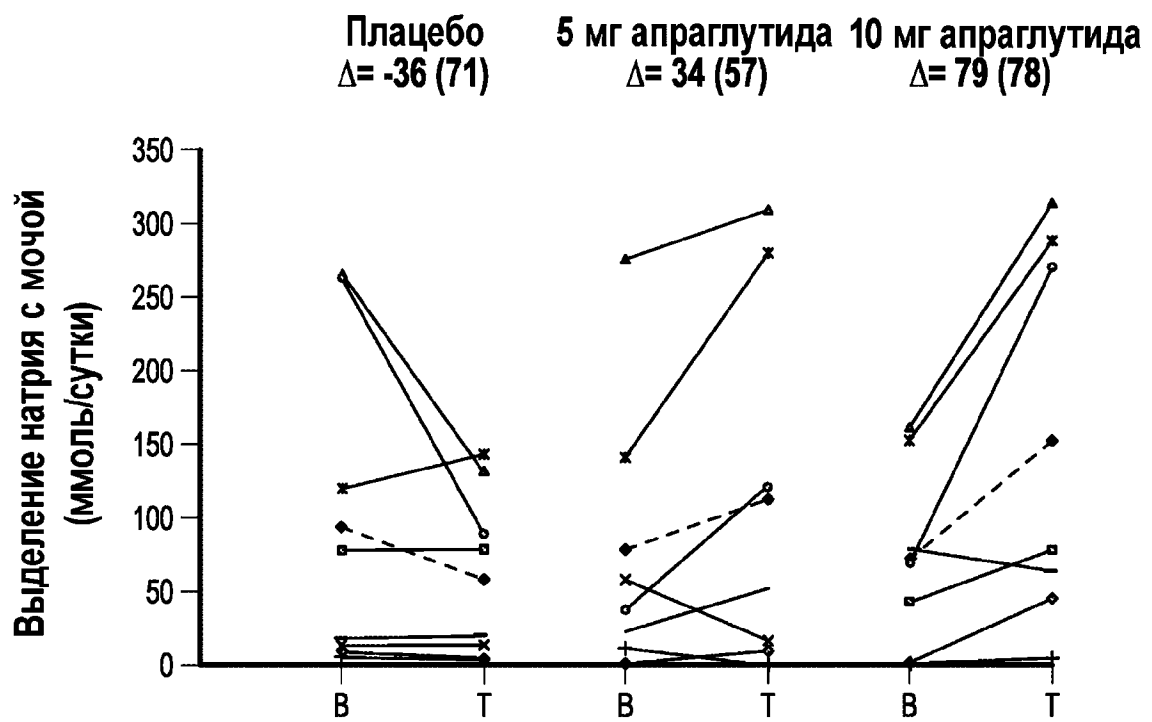


ФИГ. 4

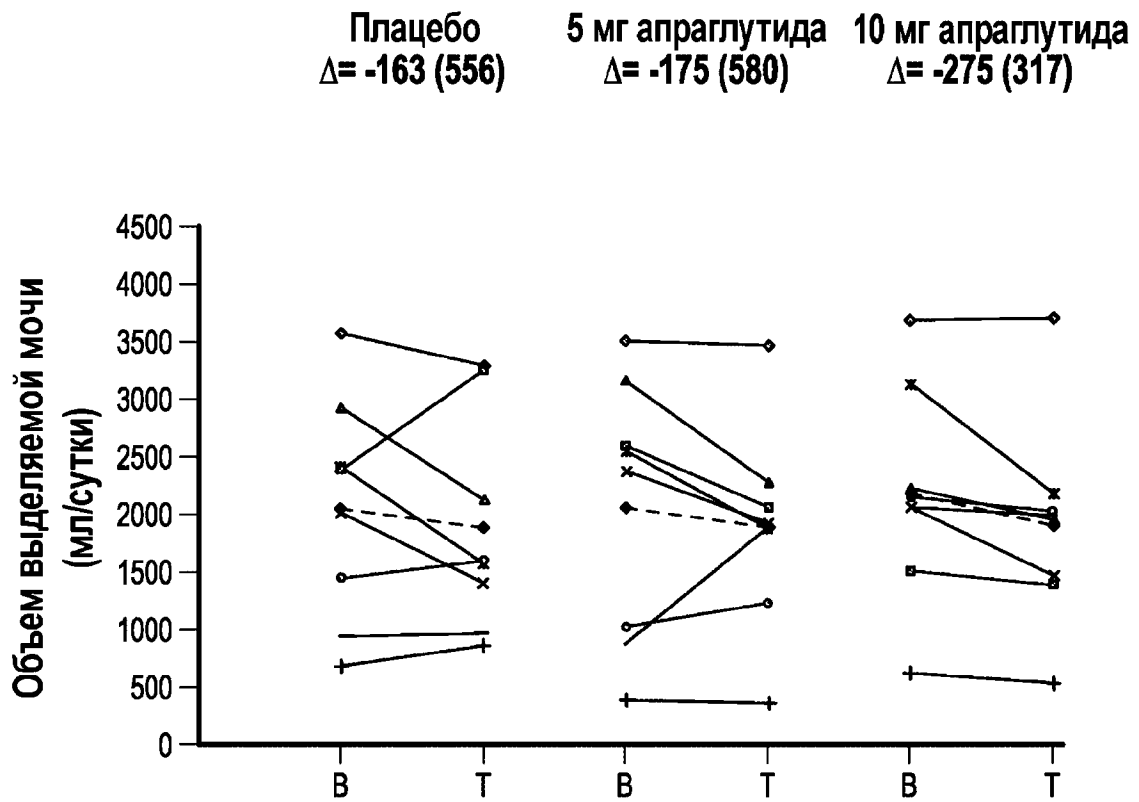


ФИГ. 5

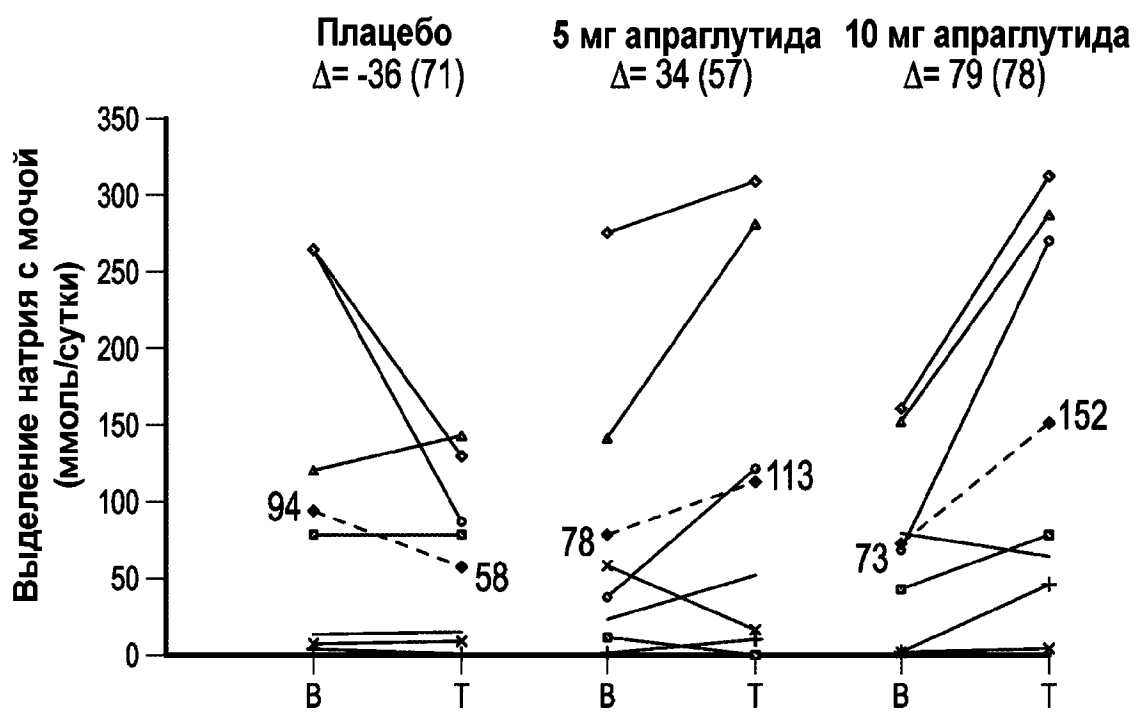
**ФИГ. 6**



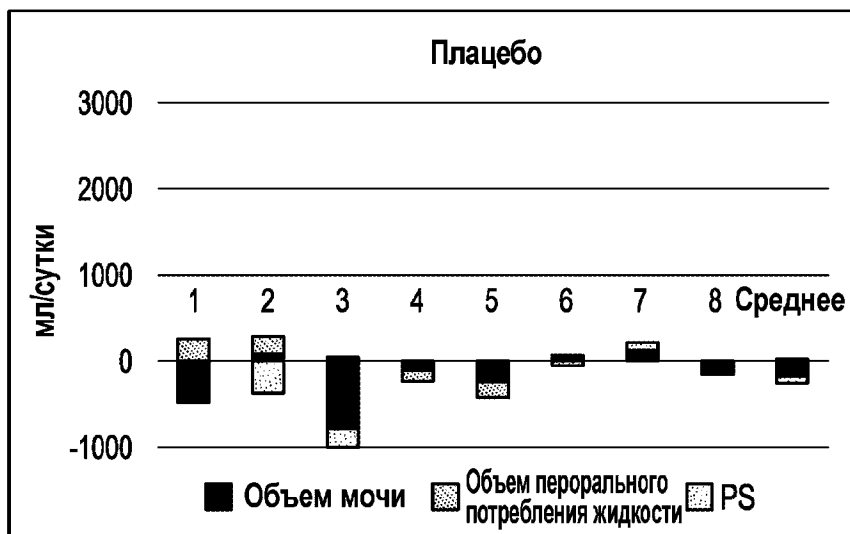
ФИГ. 7



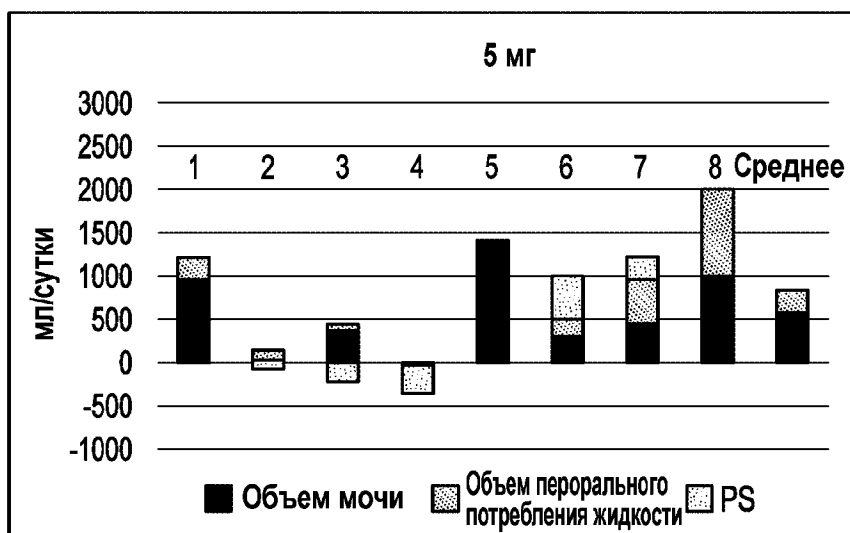
ФИГ. 8



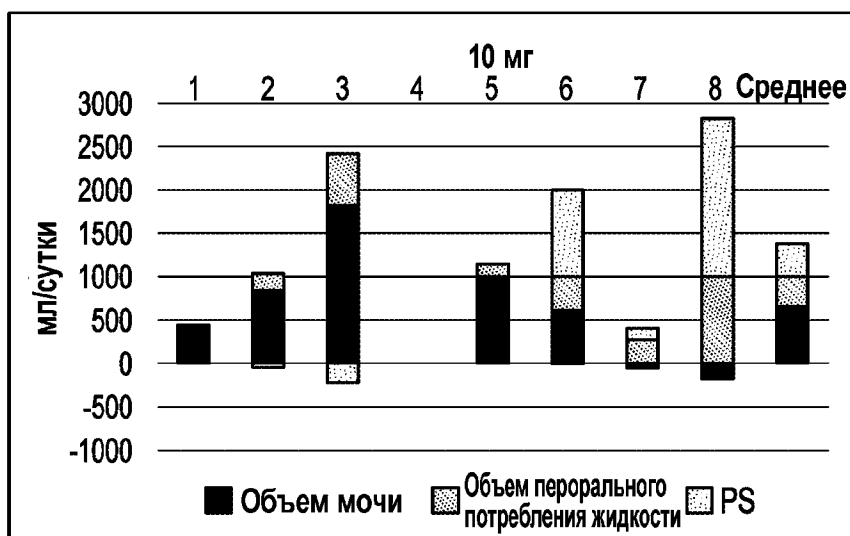
ФИГ. 9



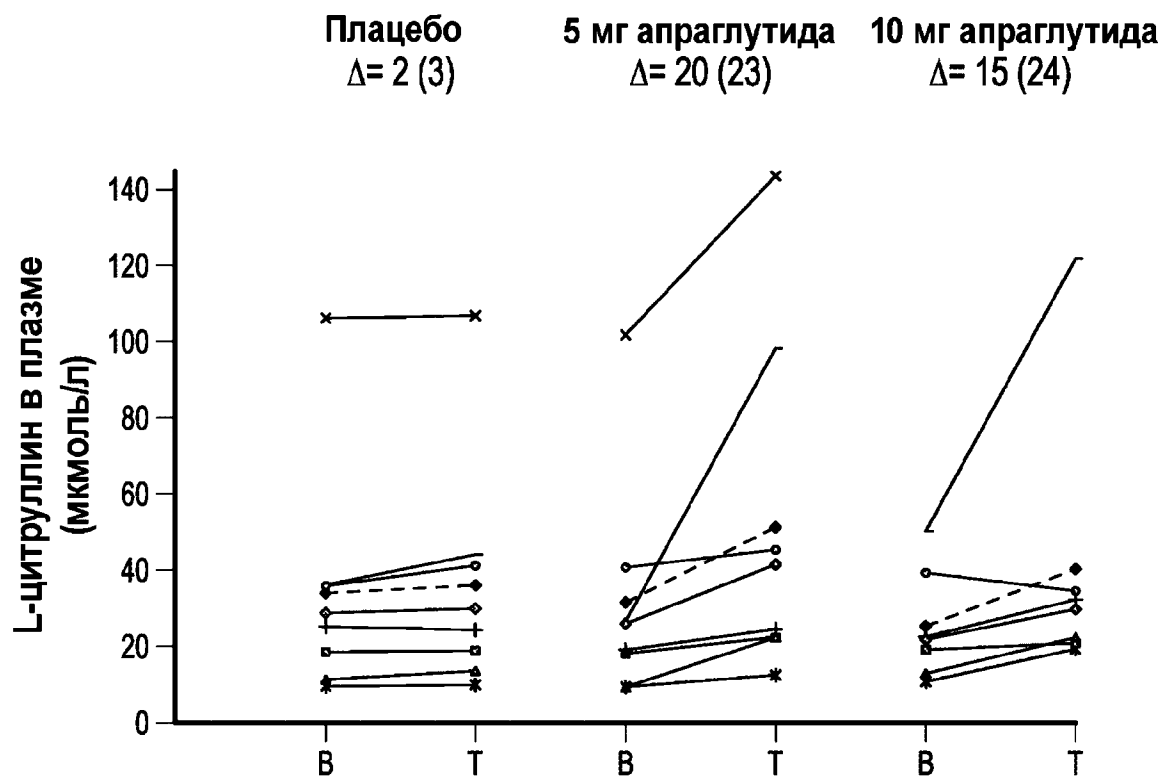
ФИГ. 10А



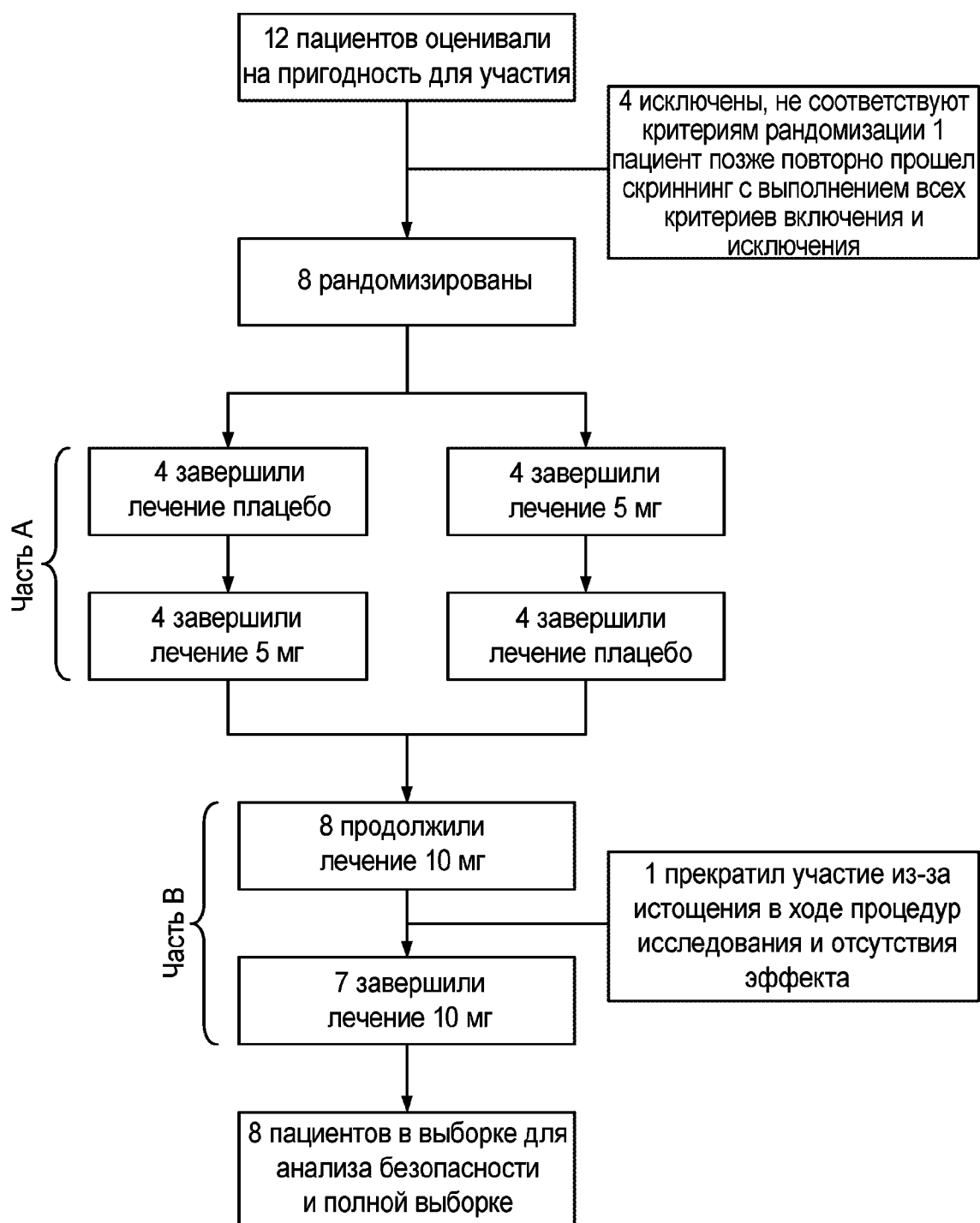
ФИГ. 10В

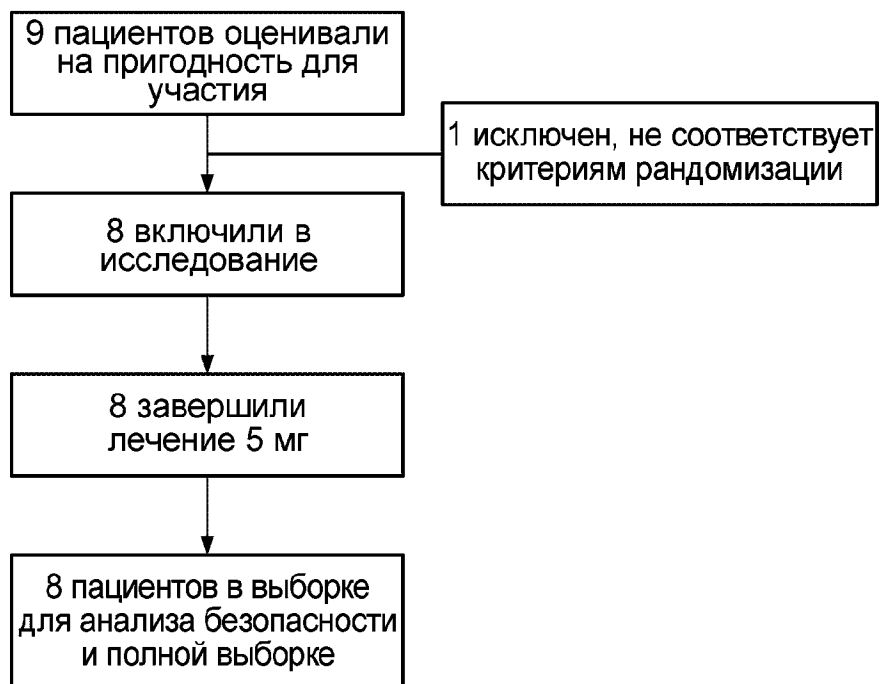


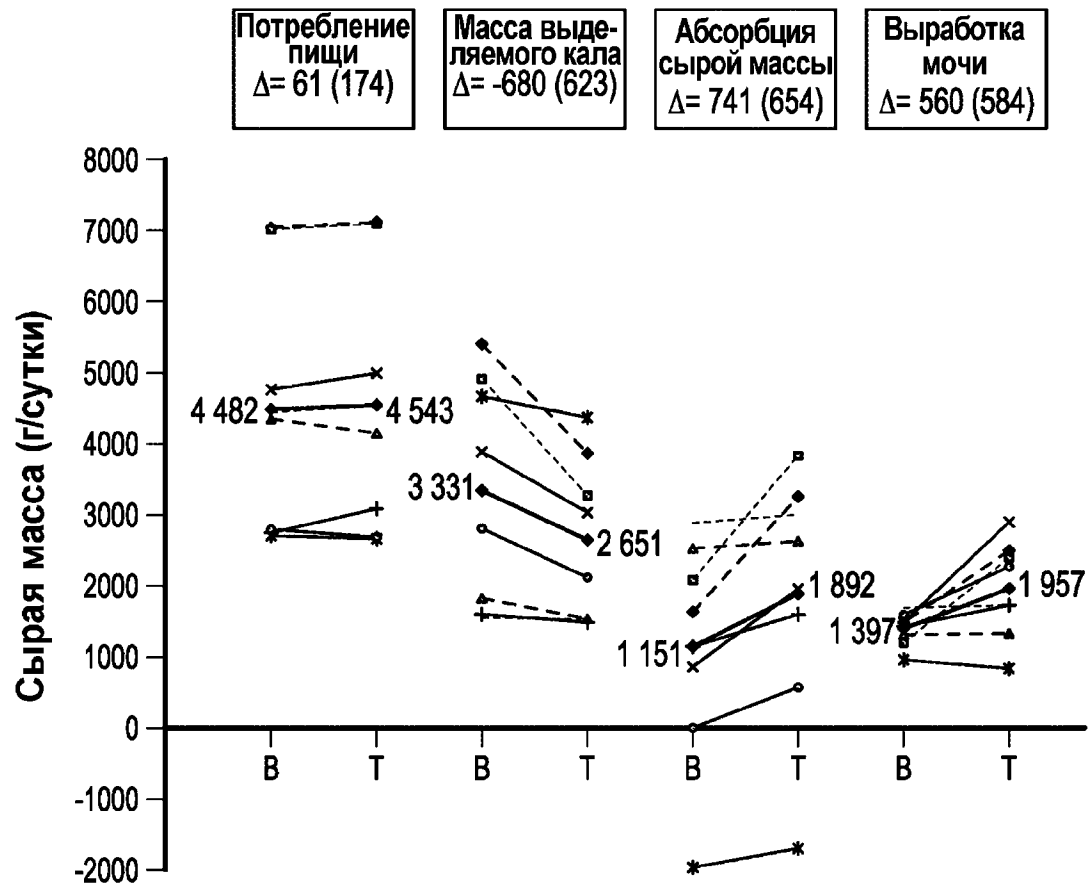
ФИГ. 10С



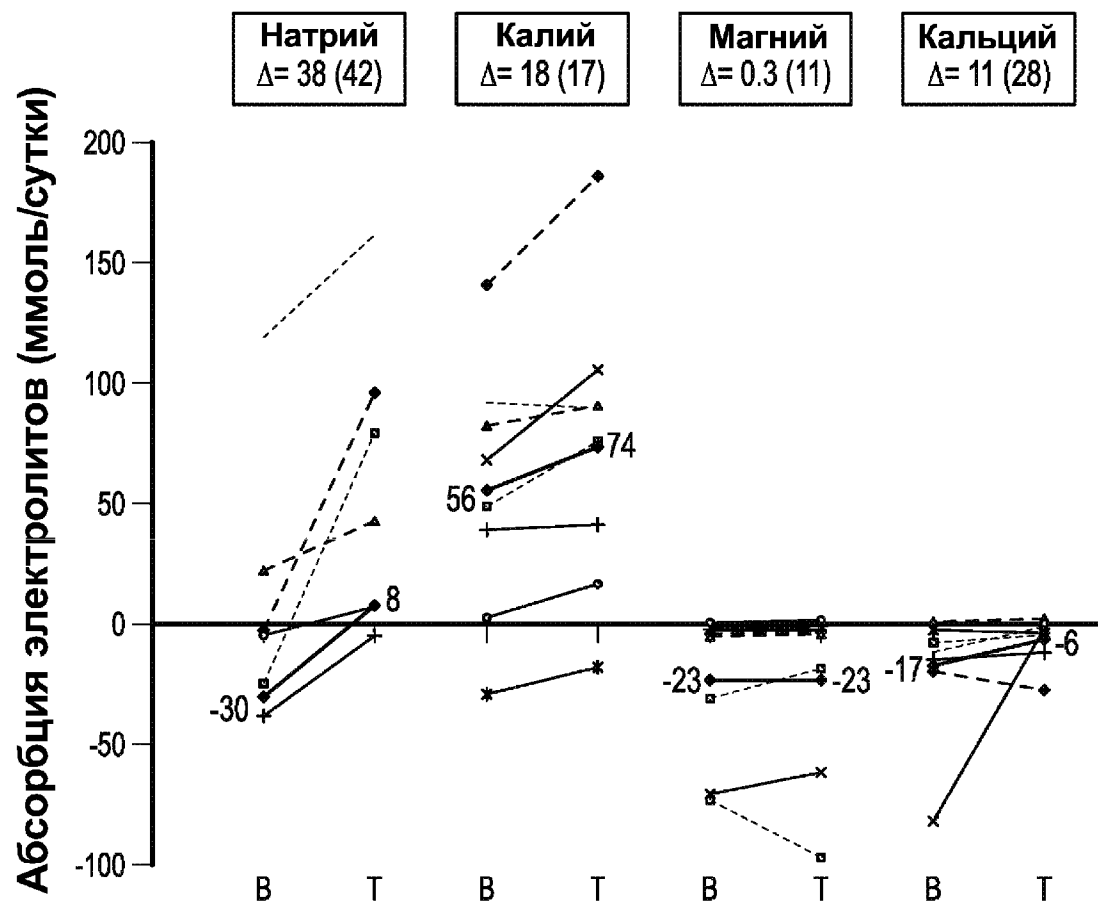
ФИГ. 11

**ФИГ. 12**

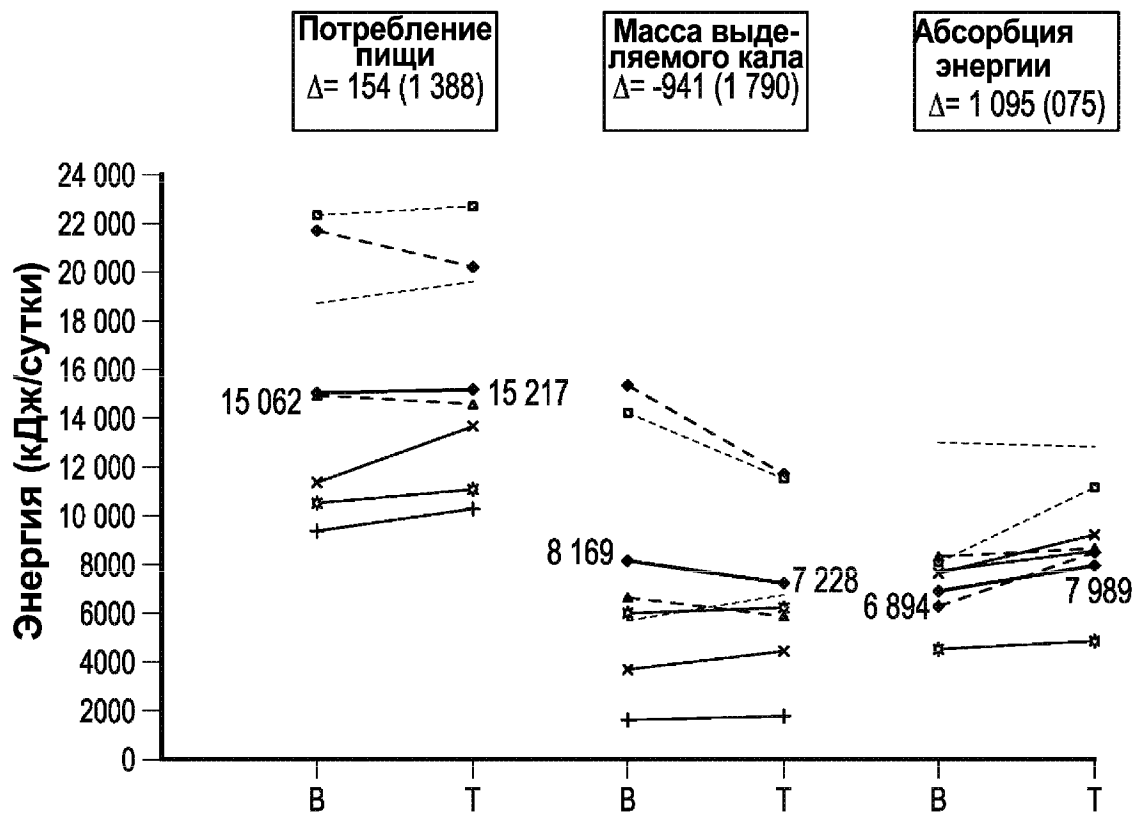
**ФИГ. 13**



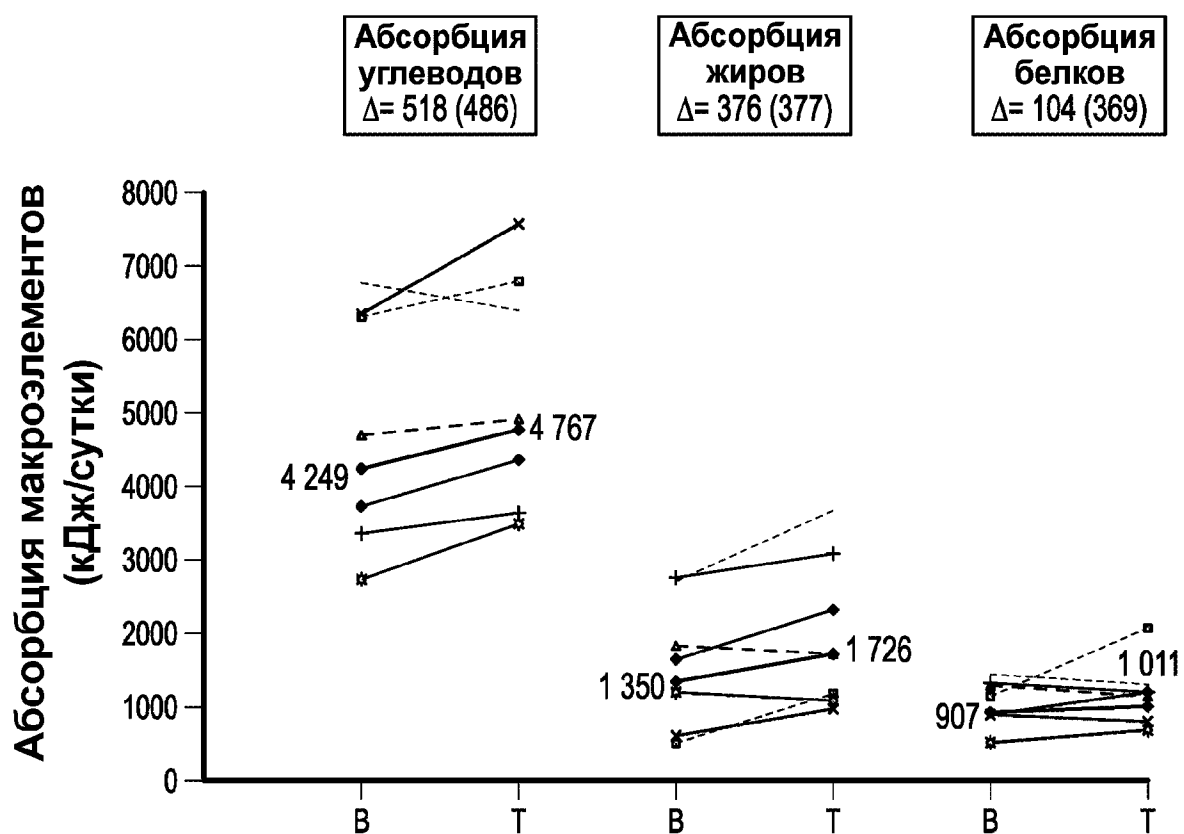
ФИГ. 14



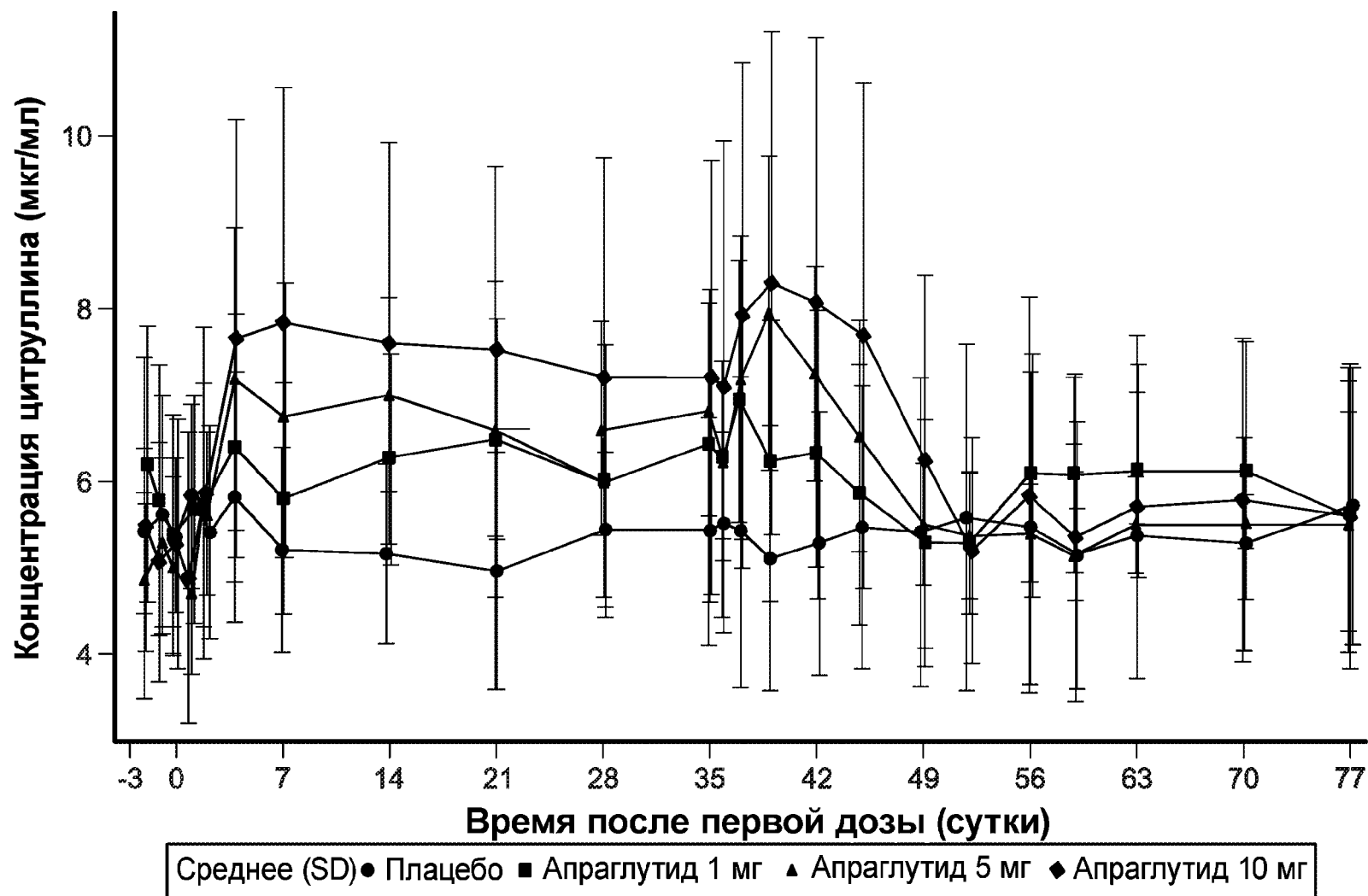
ФИГ. 15



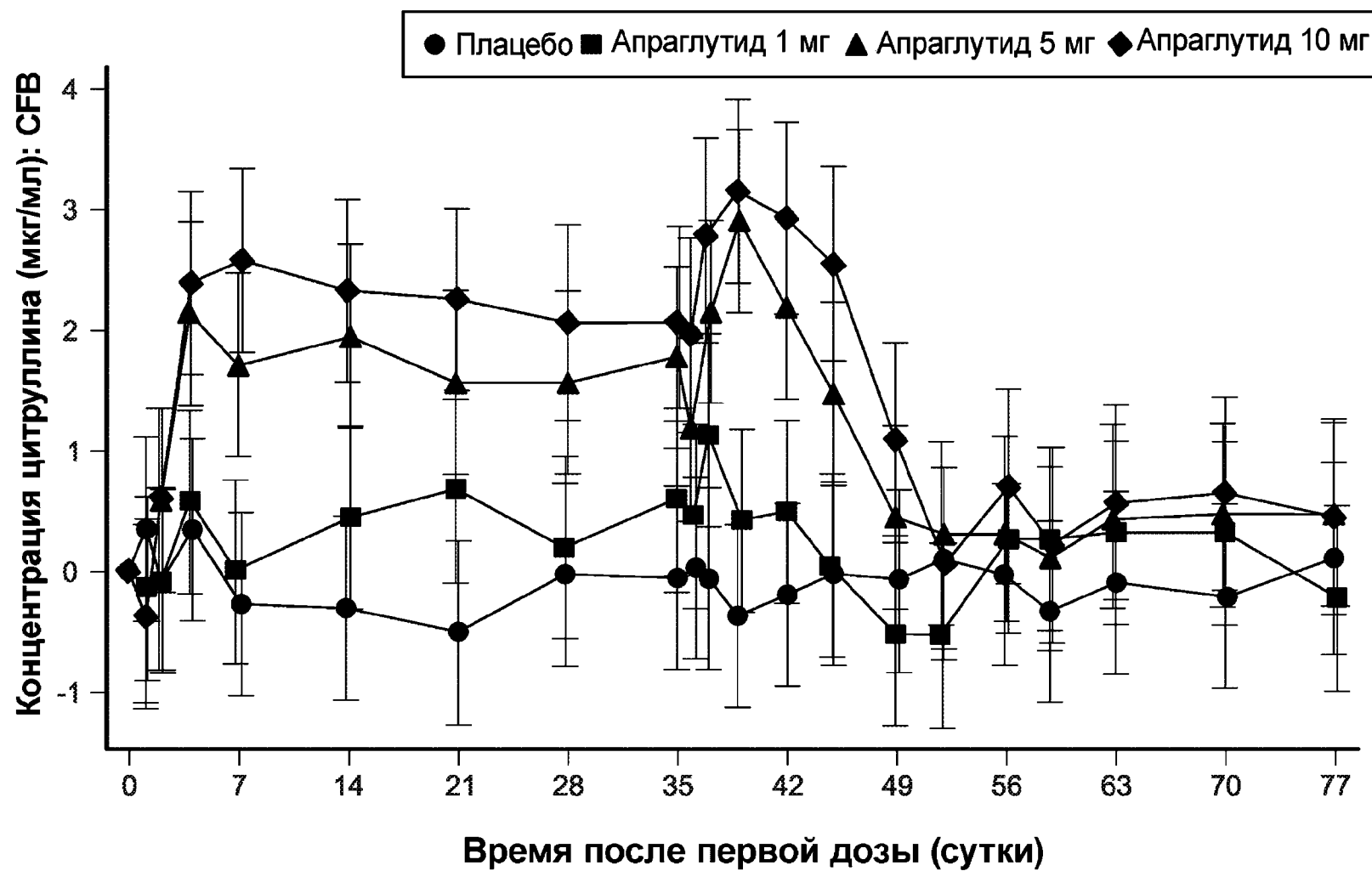
ФИГ. 16



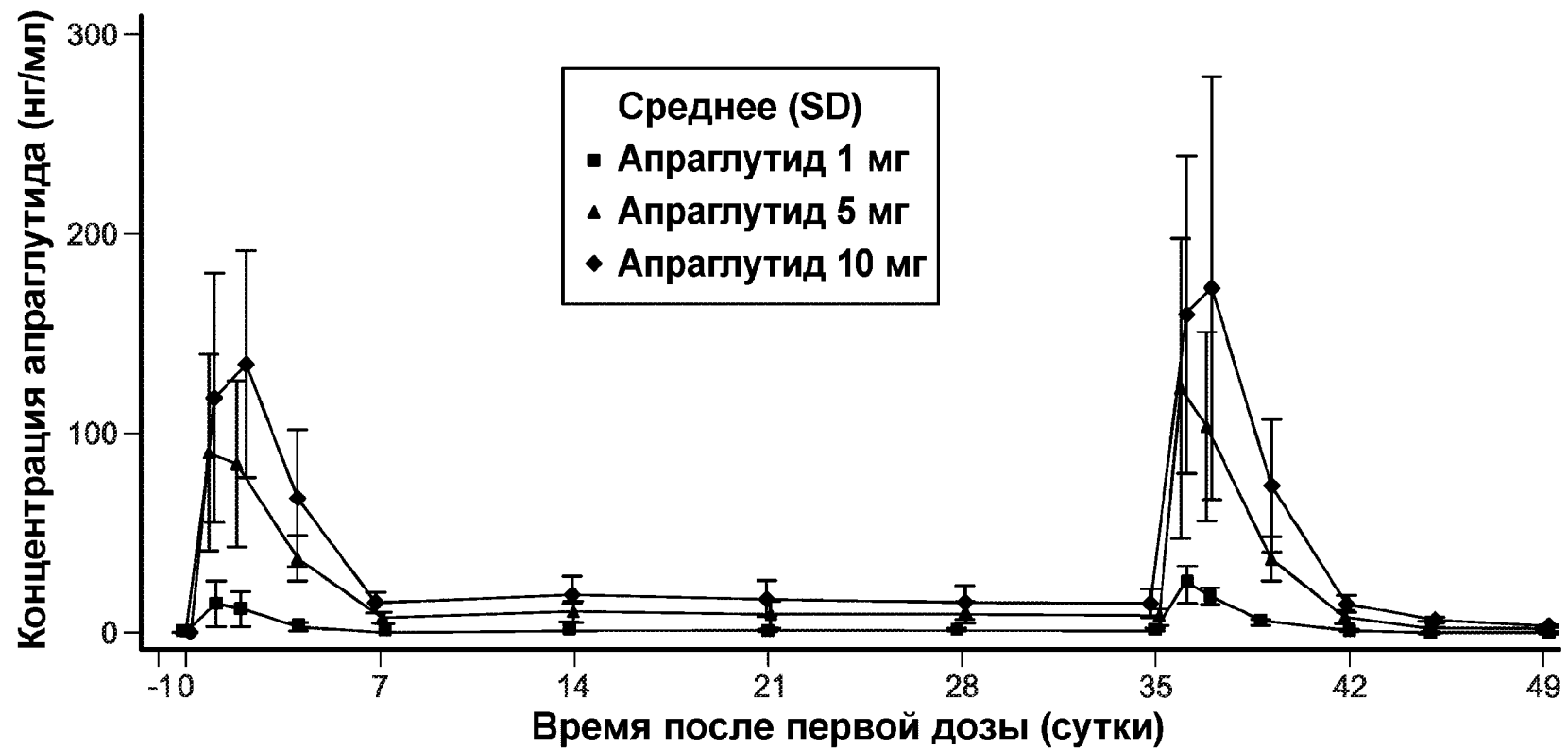
ФИГ. 17



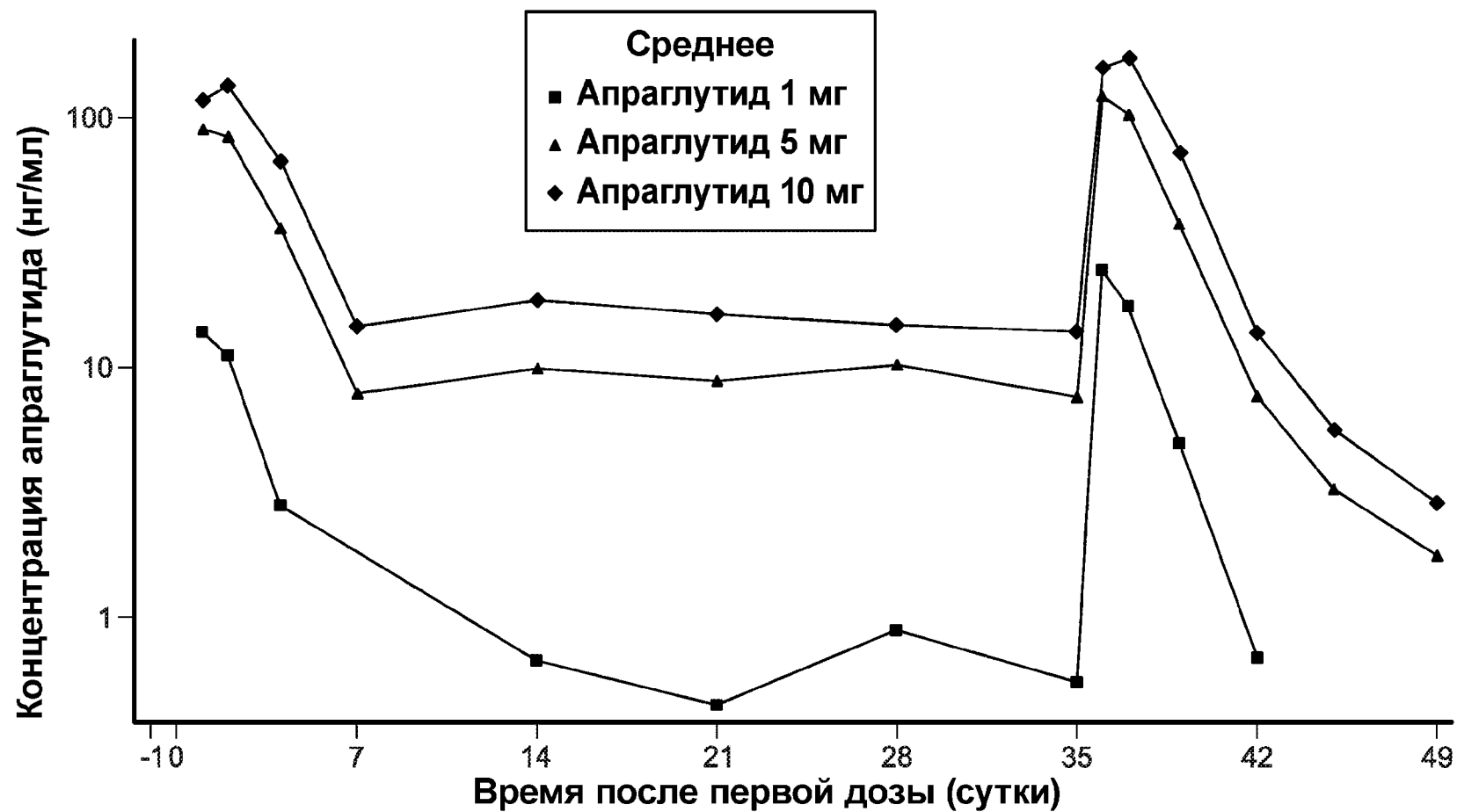
ФИГ. 18



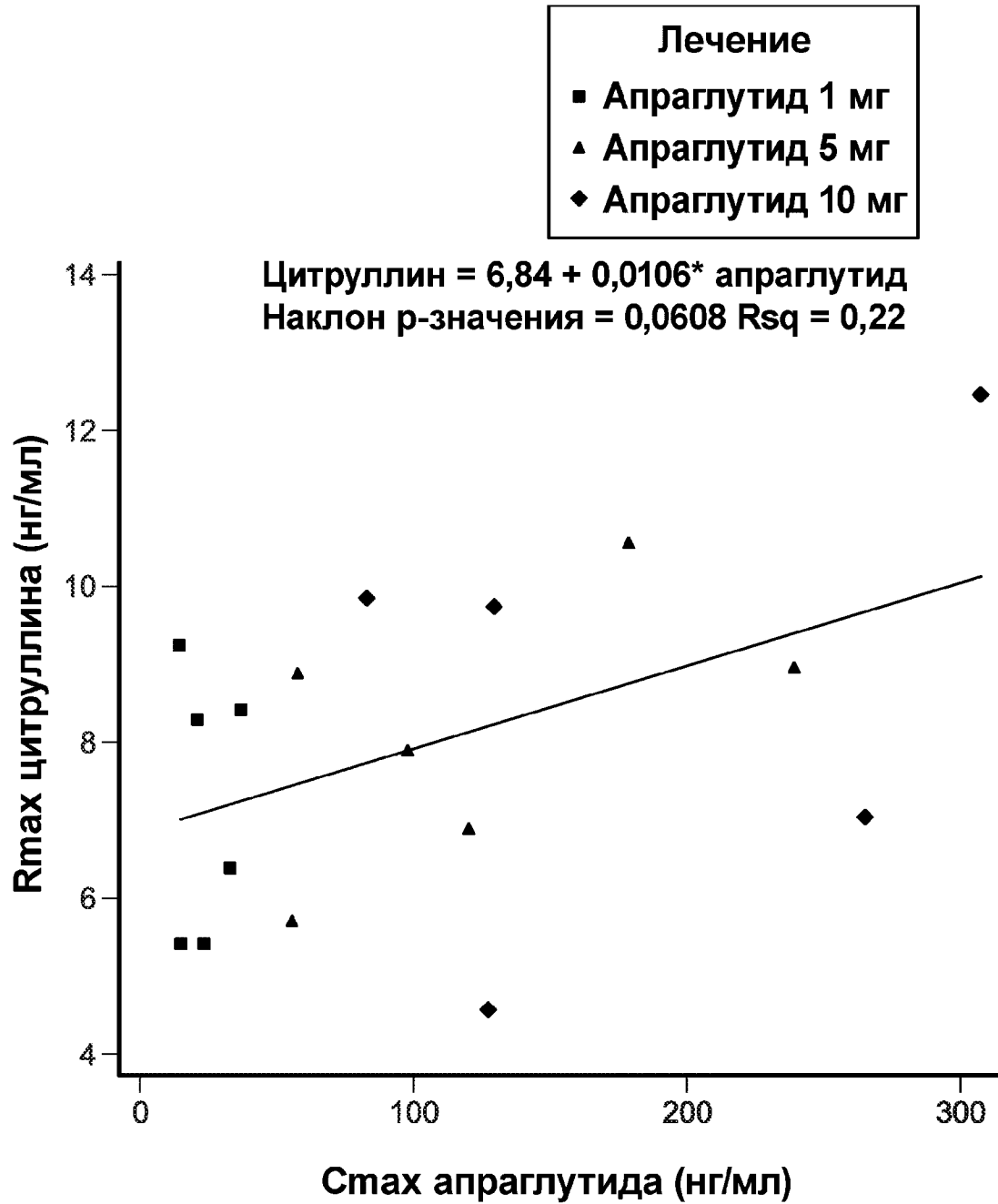
ФИГ. 19



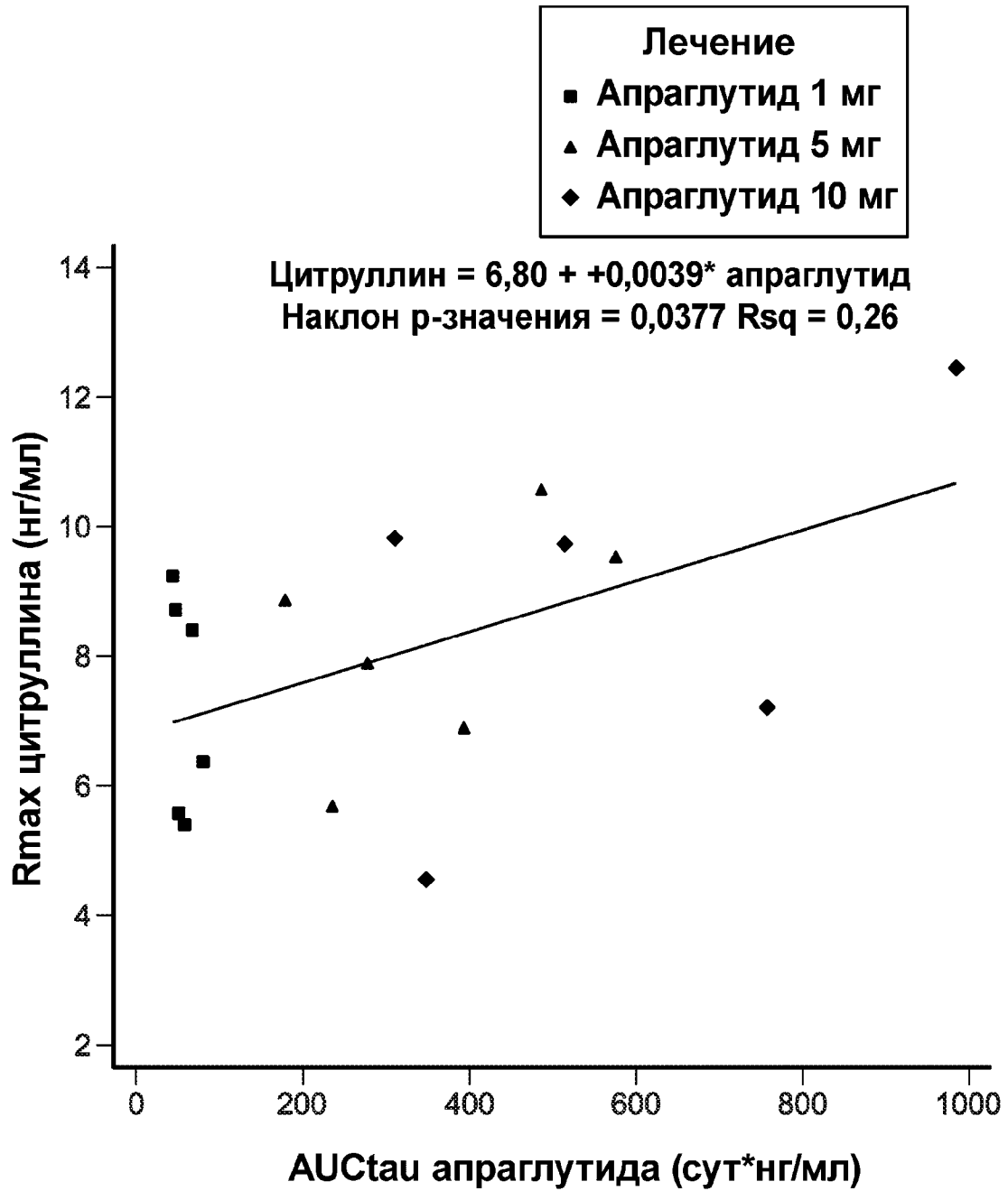
ФИГ. 20А

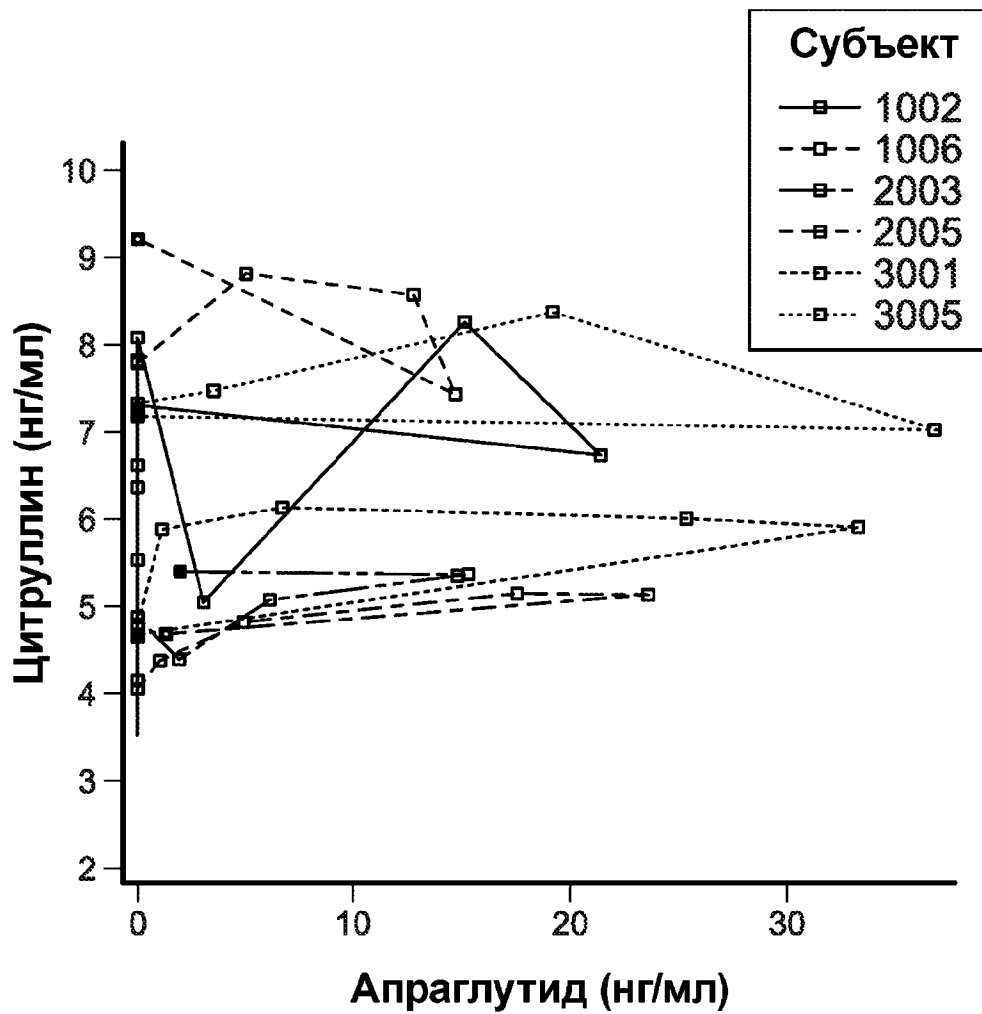


ФИГ. 20В

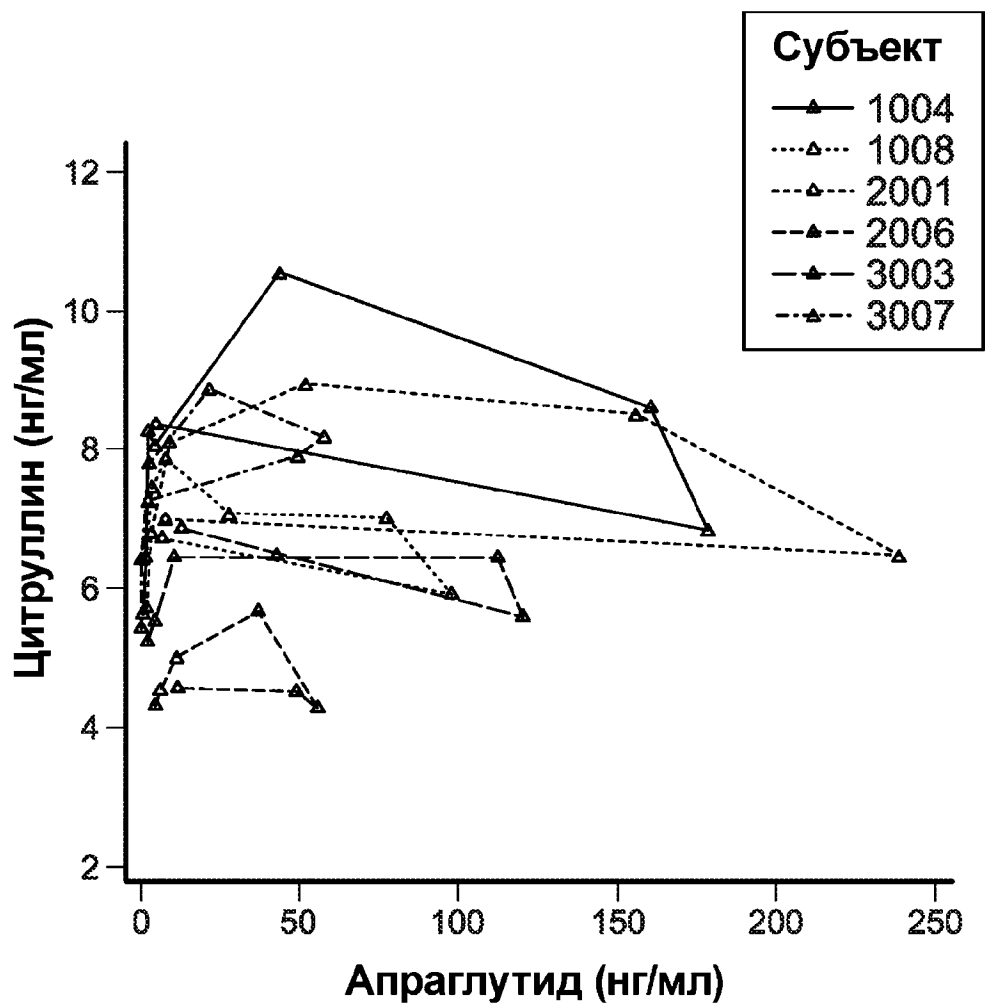


ФИГ. 21

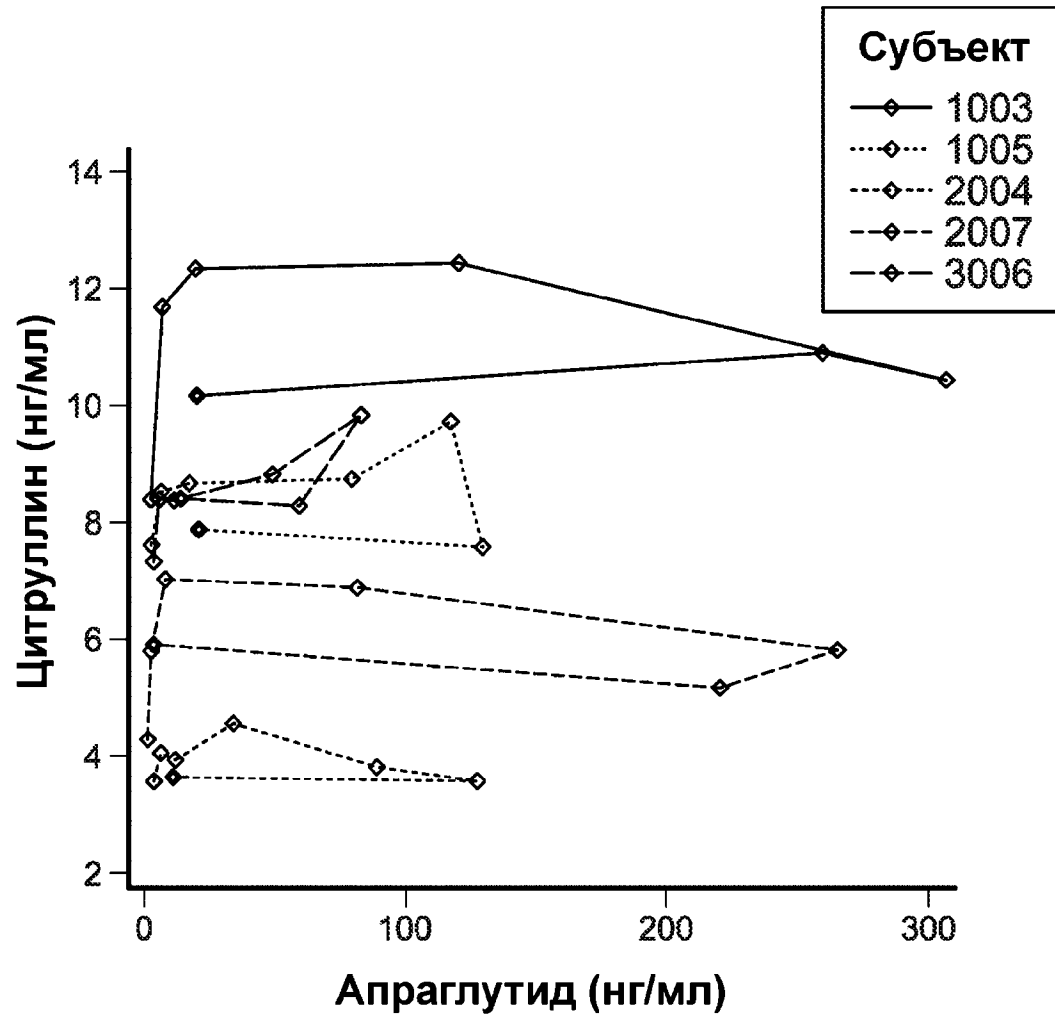
**ФИГ. 22**

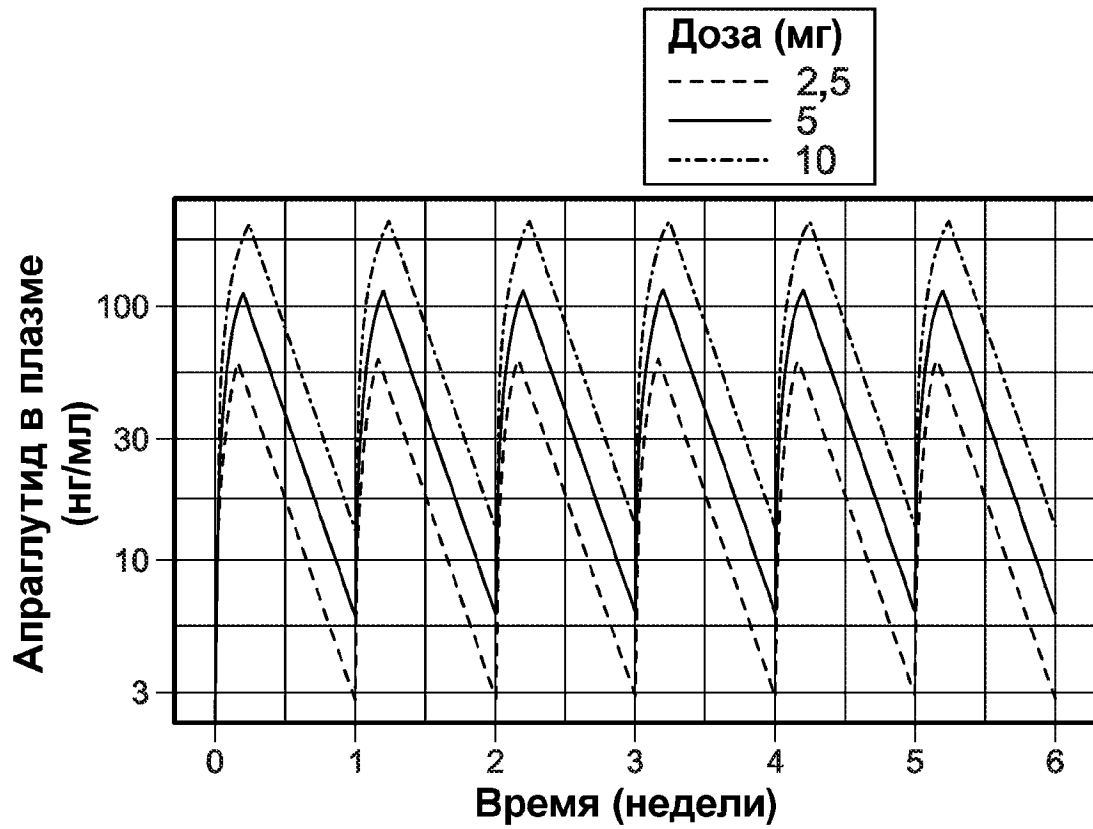
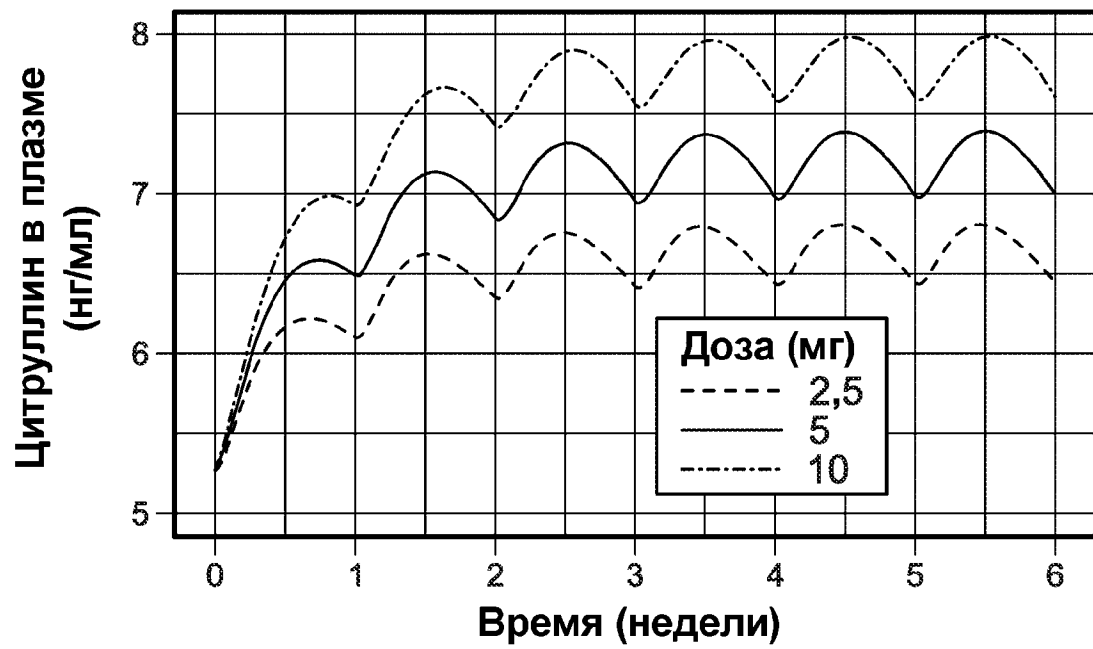


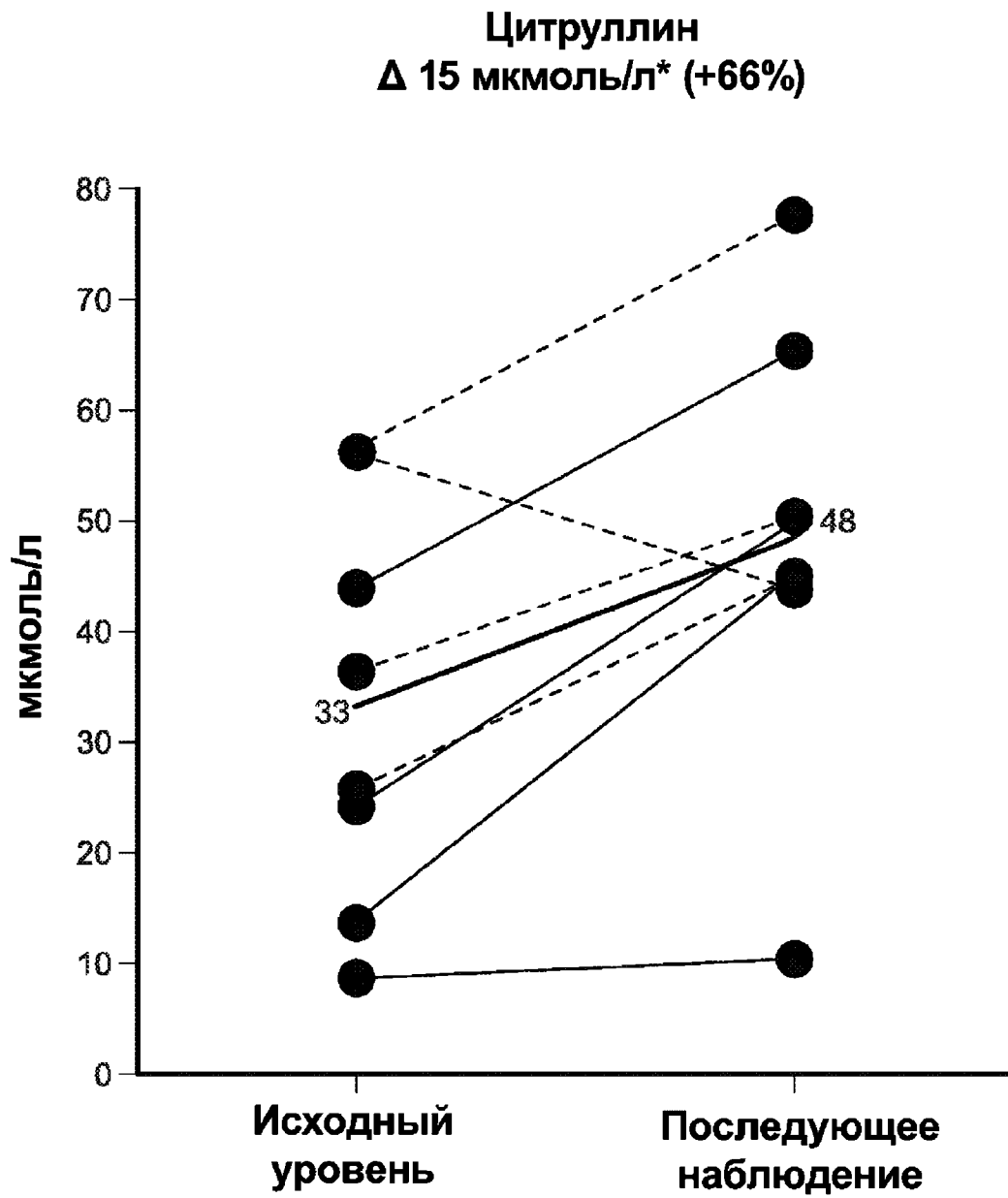
ФИГ. 23

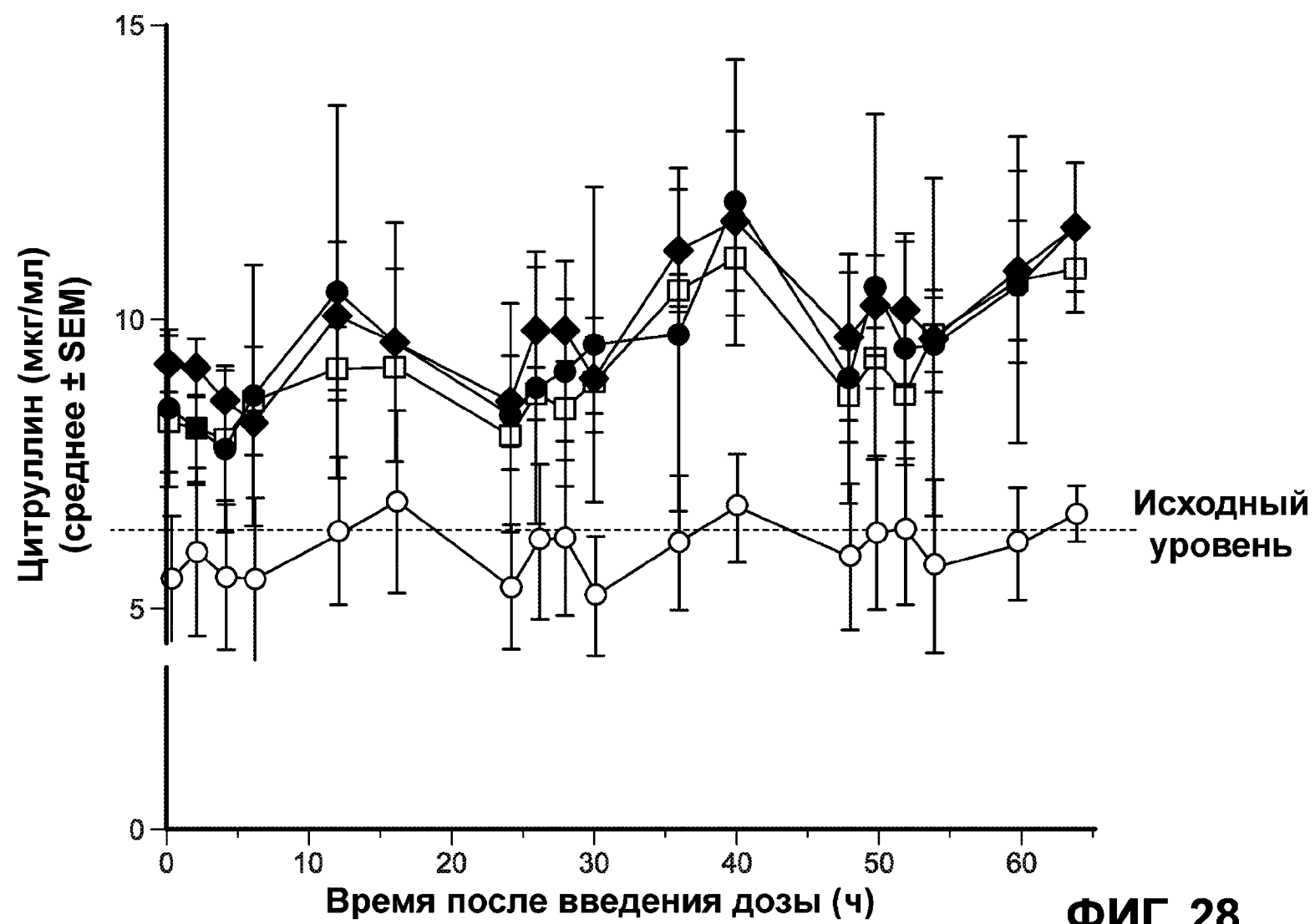


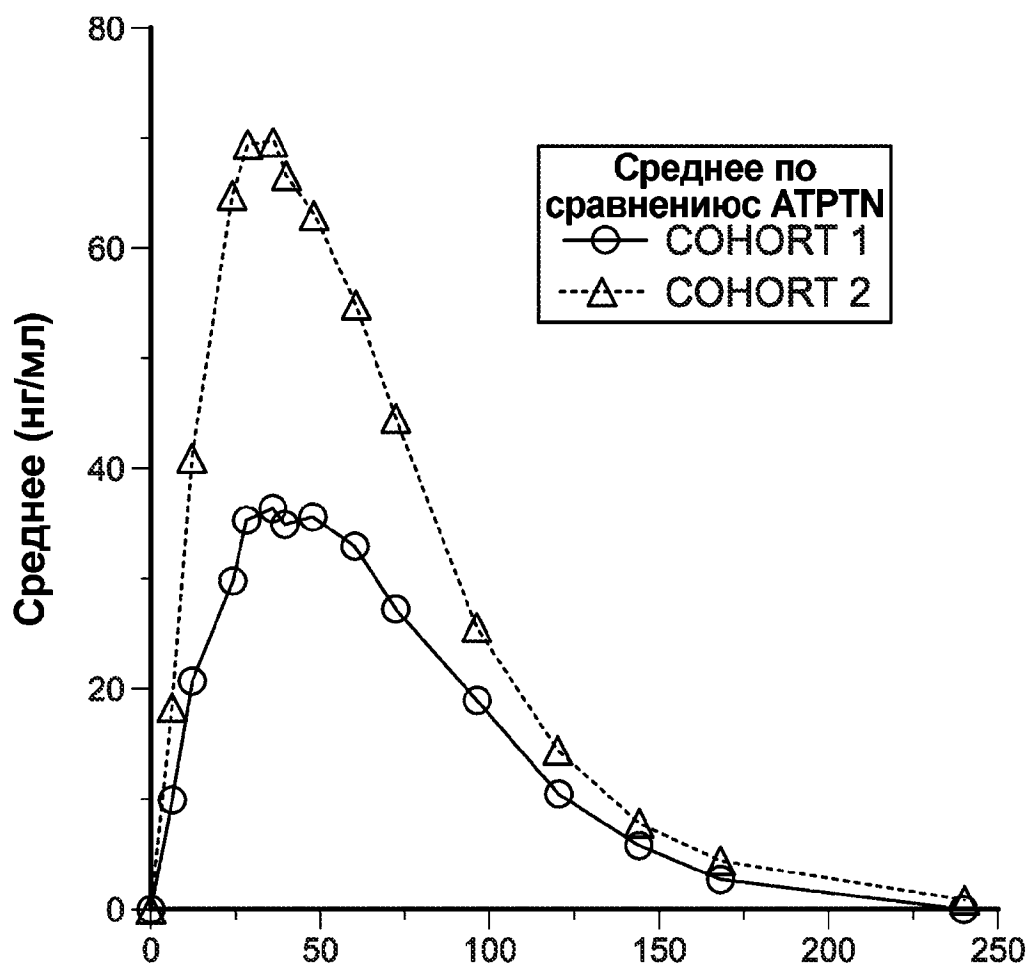
ФИГ. 24



**ФИГ. 26А****ФИГ. 26В**

**ФИГ. 27**





ФИГ. 29