

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390326 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.16

(51) Int. Cl. C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.22

(54) КОАГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ GLP-1 И GIP

(31) 63/055,063; 20192415.6

(72) Изобретатель:

(32) 2020.07.22; 2020.08.24

Кнерр Патрик Дж., Финан Брайан,
Лю Фа, Димарки Ричард (US)

(33) US; EP

(86) PCT/EP2021/070483

(74) Представитель:

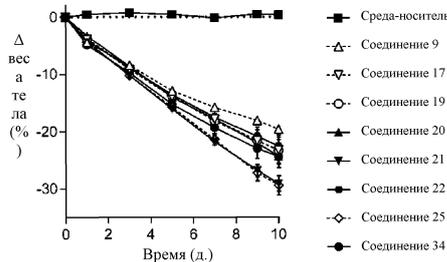
(87) WO 2022/018185 2022.01.27

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

НОВО НОРДИСК А/С (DK)

(57) Описаны пептидные коагонисты рецепторов GLP-1 и GIP человека, их производные с продолжительным действием и их медицинское применение в лечении и/или предупреждении ожирения, диабета и/или заболеваний печени.



A1

202390326

202390326

A1

КОАГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ GLP-1 И GIP

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к соединениям, которые являются агонистами рецептора глюкагонподобного пептида 1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP) с продленным профилем действия.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Настоящая заявка подается с перечнем последовательностей в электронной форме. Полное содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) представляет собой гормон, синтезируемый энтероэндокринными клетками кишечника, и является одним из двух известных эндогенных физиологических инкретинов. GLP-1 улучшает гликемический контроль за счет стимуляции глюкозозависимой секреции инсулина в ответ на поступление питательных веществ (глюкозу), подавляет секрецию глюкагона альфа-клетками поджелудочной железы, замедляет скорость опорожнения желудка и индуцирует потерю веса тела в основном за счет снижения потребления пищи. Глюкозозависимый инсулинотропный полипептид (GIP), другой известный инкретин, улучшает гликемический контроль за счет стимуляции секреции инсулина в ответ на поступление питательных веществ (жиров, глюкозы). Кроме того, GIP, по-видимому, улучшает липидный профиль плазмы крови и стимулирует накопление кальция в костях. В отличие от GLP-1 инкретиновый эффект GIP значительно снижен у пациентов с диабетом 2 типа, хотя в недавних исследованиях было показано, что эффективность GIP у таких пациентов может быть восстановлена после лечения с улучшением контроля глюкозы. Тем не менее роль GIP в регуляции системного метаболизма, помимо своего непосредственного влияния на эндокринную часть поджелудочной железы, остается противоречивой, поскольку, в частности, она связана с действием

GIP, стимулирующим набор жировой массы у животных моделей. Такие результаты подкрепляют представление о том, что антагонизм GIPR может обеспечивать улучшение веса тела. Таким образом, использование соединений, действующих на рецепторы GIP, и, в частности, с обеспечением либо агонизма, либо антагонизма, в качестве стратегии для улучшения веса тела остается противоречивой темой интенсивных научных исследований (Finan *et al*, TRENDS Mol Med, 2016, 22 (5): 359-376; Killion *et al*, Endo Rev, 2020, 41 (1): 1-21).

При моделировании на грызунах было показано, что аналоги GIP длительного действия обеспечивают уменьшение веса тела и улучшают гликемический контроль, хотя и сравнительно с меньшей активностью, чем аналоги GLP-1 уменьшают вес тела (Mroz *et al*, Mol Metab, 2019, 20: 51-62). Более того, аналоги GIP индуцируют потерю веса тела за счет аддитивного/синергетического действия с аналогами GLP-1 при введении двух компонентов (Finan *et al*, Sci Transl Med, 2013, 5 (209): 209ra151; Nørregaard *et al*, Diabetes Obes Metab, 2018, 20 (1): 60-68) и поэтому являются подходящими кандидатами для расширения исследования фармакологических свойств GLP-1. Агонизм GIPR может быть привлечен в качестве дублирующего партнера для обеспечения агонизма GLP-1R в качестве одномолекулярного коагониста для расширения спектра полезных эффектов GLP-1 в отношении метаболизма, что было показано на доклинических животных моделях, в первую очередь с обеспечением потери веса тела и гликемического контроля (Finan *et al*, Sci Transl Med, 2013, 5 (209): 209ra151; Coskun *et al*, Mol Metab, 2018, 18: 3-14). Два разных пептида с высокой активностью двойного агонизма в отношении инкретиновых рецепторов были перенесены в клинические исследования с использованием нескольких доз. Клинические результаты продемонстрировали улучшение гликемического контроля и веса тела, которые превышают такие эффекты, полученные при введении сопоставимых доз стандартных специфических агонистов GLP-1 (Frias *et al*, Cell Metab, 2017, 26 (2): 343-352; Frias *et al*, Lancet, 2018, 392 (10160): 2180-2193), демонстрируя трансляционные аспекты и терапевтические преимущества совместного целенаправленного воздействия на рецепторы GLP-1 и GIP.

Коагонисты рецептора GLP-1/GIP и потенциальные варианты их медицинского применения описаны в нескольких патентных заявках, таких как WO 2010/011439, WO 2013/164483, WO 2014/192284, WO 2015/067715, WO 2015/022420, WO 2015/086728, WO 2015/086729, WO 2016/111971, WO 2020/023386, US 9745360,

US 2014/162945 и US 2014/0357552. Однако ни один из продуктов-коагонистов еще не был утвержден для продажи на рынке.

Сущность изобретения

5 Настоящее изобретение относится к одномолекулярным коагонистам, предусматривающим пептид и заместитель, которые взаимодействуют с рецепторами GLP-1 и GIP человека с высокой активностью и демонстрируют продленный профиль действия, подходящий для введения один раз в неделю людям. Это достигается за счет комбинации определенных вариантов последовательностей пептидов с заместителями посредством ацилирования в одном сайте с помощью двухосновной жирной кислоты.

10 Один аспект настоящего изобретения относится к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность

YX₂EGTFTSDYSIYLX₁₅X₁₆X₁₇AA X₂₀X₂₁FVX₂₄WLLX₂₈GGPX₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉

(SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-конца, где

15 X₂ представляет собой Aib,

X₁₅ представляет собой D или E,

X₁₆ представляет собой E или K,

X₁₇ представляет собой Q или K,

X₂₀ представляет собой Aib,

20 X₂₁ представляет собой E или K,

X₂₄ представляет собой N или Q,

X₂₈ представляет собой A или E,

X₃₂ представляет собой S или отсутствует,

X₃₃ представляет собой S или отсутствует,

X₃₄ представляет собой G или отсутствует,

X₃₅ представляет собой A или отсутствует,

X₃₆ представляет собой P или отсутствует,

X₃₇ представляет собой P или отсутствует,

5 X₃₈ представляет собой P или отсутствует,

X₃₉ представляет собой S или отсутствует.

Один аспект настоящего изобретения относится к соединению, содержащему пептид и заместитель, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой

YX₂EGTFTSDYSIYLX₁₅X₁₆X₁₇AAAX₂₀X₂₁FVX₂₄WLLX₂₈GGPX₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉

10 (SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-концевого аминокислотного остатка,

где

X₂ представляет собой Aib,

X₁₅ представляет собой D или E,

15 X₁₆ представляет собой E или K,

X₁₇ представляет собой Q, R или K,

X₂₀ представляет собой Aib,

X₂₁ представляет собой E или K,

X₂₄ представляет собой N или Q,

20 X₂₈ представляет собой A или E,

X₃₂ представляет собой S или отсутствует,

X₃₃ представляет собой S или отсутствует,

X₃₄ представляет собой G или отсутствует,

X₃₅ представляет собой A или отсутствует,

X₃₆ представляет собой P или отсутствует,

X₃₇ представляет собой P или отсутствует,

5 X₃₈ представляет собой P или отсутствует,

X₃₉ представляет собой S или отсутствует;

и заместитель, присоединенный посредством эpsilon-аминогруппы лизинового (K) остатка в положении 16, 17 или 21;

или его фармацевтически приемлемая соль.

10 Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения коагонистов рецепторов GLP-1/GIP, описанных в данном документе.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединения-коагонисты рецепторов GLP-1/GIP, описанные в данном документе.

15 Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к применению в медицине коагонистов рецепторов GLP-1/GIP, описанных в данном документе.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению коагонистов рецепторов GLP-1/GIP, описанных в данном документе для предупреждения или лечения диабета, ожирения и/или заболеваний печени.

20 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показан эффект в отношении веса тела (выраженный в виде изменения от исходного веса тела в процентах) у мышей с DIO, обработанных с помощью подкожной инъекции один раз в день среды-носителя или 3 нмоль/кг коагонистов рецепторов GLP-1/GIP 9, 17, 19, 20, 21, 22, 25 и 34.

ОПИСАНИЕ

Далее греческие буквы могут быть представлены посредством их символа или соответствующего рукописного названия, например, α = альфа; β = бета; ϵ = эpsilon; γ = гамма; ω = омега и т. д. Также греческая буква μ может быть представлена посредством «мк», например, $\mu\text{л}$ = мкл или $\mu\text{М}$ = мкМ.

Коагонысты рецепторов GLP-1/GIP

Настоящее изобретение относится к соединениям, которые являются агонистами рецептора GLP-1 и рецептора GIP, также называемым коагоныстами рецепторов GLP-1/GIP или просто коагоныстами.

10 Термин «соединение», используемый в данном документе, означает химическое соединение, поэтому «соединения» могут содержать разные структурные элементы, помимо минимального элемента, определенного для каждого соединения или группы соединений. Из этого следует, что соединение может представлять собой пептид или его производное, при условии, что соединение содержит определенные структурные
15 и/или функциональные элементы.

Также подразумевается, что термин «соединение» охватывает его фармацевтически подходящие формы, т. е. соединение, определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемые соль или сложный эфир.

20 Термин «аналог» в общем означает пептид, последовательность которого характеризуется одним или более изменениями в аминокислотах по сравнению с референтной аминокислотной последовательностью. «Аналог» также может включать удлинения из аминокислот в N-концевом и/или C-концевом положениях и/или усечения в N-концевом и/или C-концевом положениях.

25 Как правило, аминокислотные остатки можно определять по их полному названию, их однобуквенному коду и/или их трехбуквенному коду. Эти три способа полностью эквивалентны.

Аминокислоты представляют собой молекулы, содержащие аминокислотную группу и группу карбоновой кислоты и необязательно одну или более дополнительных групп, часто называемых боковой цепью.

Термин «аминокислота» включает протеиногенные (или природные) аминокислоты (среди них 20 стандартных аминокислот), а также непротеиногенные (или неприродные) аминокислоты. Протеиногенными аминокислотами являются аминокислоты, которые в естественных условиях входят в состав белков.

- 5 Стандартными аминокислотами являются аминокислоты, кодируемые генетическим кодом. Непротеиногенные аминокислоты либо не обнаруживаются в белках, либо не синтезируются стандартным клеточным аппаратом (например, они могут быть подвергнуты посттрансляционной модификации). Неограничивающими примерами непротеиногенных аминокислот являются Aib (α -аминоизомасляная кислота или 2-аминоизомасляная кислота), норлейцин, норвалин, а также D-изомеры протеиногенных аминокислот.

Далее следует понимать, что под каждой аминокислотой в составе пептидов, для которой не указан оптический изомер, подразумевается L-изомер (если не указано иное).

- 15 Коагоны рецепторов GLP-1/GIP предусматривают определенные ниже пептид и заместитель или состоят из них. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой синтетический пептид, полученный для оптимизации активности в отношении рецепторов GLP-1 и GIP. Были идентифицированы соединения, обладающие подходящей рецептор-связывающей активностью по отношению как к рецептору GLP-1, так и к рецептору GIP, что продемонстрировано в примерах в данном документе.

- 25 Соединения дополнительно демонстрируют увеличенный период полувыведения, который получен за счет заместителя, содержащего группу жирной кислоты. Таким образом, идентифицированное соединение считается привлекательной молекулой, подходящей для дальнейшей разработки.

- 30 В некоторых вариантах осуществления карбокси-конец пептида содержит группу -COOH. В некоторых вариантах осуществления соединения необязательно могут включать амидную группу ($C(=O)-NH_2$) на C-конце, которая является встречающейся в природе модификацией с замещением -OH на $-NH_2$, такой как наблюдаемая в природном эксендине-4.

Пептид

Коагонысты рецепторов GLP-1/GIP, описанные в данном документе, предусматривают определенные ниже пептид и заместитель, в которых заместитель присоединен к пептидному остову посредством аминокислотного остатка.

- 5 В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой

YX₂EGTFTSDYSIYLX₁₅X₁₆X₁₇AAAX₂₀X₂₁FVX₂₄WLLX₂₈GGPX₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉

(SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-конца, где

- 10 X₂ представляет собой Aib,
 X₁₅ представляет собой D или E,
 X₁₆ представляет собой E или K,
 X₁₇ представляет собой Q или K,
 X₂₀ представляет собой Aib,
- 15 X₂₁ представляет собой E или K,
 X₂₄ представляет собой N или Q,
 X₂₈ представляет собой A или E,
 X₃₂ представляет собой S или отсутствует,
 X₃₃ представляет собой S или отсутствует,
- 20 X₃₄ представляет собой G или отсутствует,
 X₃₅ представляет собой A или отсутствует,
 X₃₆ представляет собой P или отсутствует,
 X₃₇ представляет собой P или отсутствует,

X_{38} представляет собой P или отсутствует,

X_{39} представляет собой S или отсутствует.

В одном варианте осуществления X_{39} отсутствует. В одном варианте осуществления X_{38} и X_{39} отсутствуют. В одном варианте осуществления X_{37} , X_{38} и X_{39} отсутствуют. В
 5 одном варианте осуществления X_{36} , X_{37} , X_{38} и X_{39} отсутствуют. В таких дополнительных вариантах осуществления $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ представляет собой SSGA.

В его дополнительном варианте осуществления пептид характеризуется амидной модификацией C-конца.

В одном варианте осуществления пептид представляет собой

10 $YX_2EGTFTSDYSIYLX_{15}X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}FVX_{24}WLLX_{28}GGPSSGA$ (SEQ ID NO.: 16),

где

X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

X_{16} представляет собой E или K,

15 X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

X_{28} представляет собой A или E.

20 В одном варианте осуществления X_{16} представляет собой K. В одном варианте осуществления X_{16} представляет собой E. В одном варианте осуществления X_{17} представляет собой Q. В одном варианте осуществления X_{17} представляет собой K. В одном варианте осуществления X_{21} представляет собой E. В одном варианте осуществления X_{21} представляет собой K. В одном варианте осуществления X_{24}
 25 представляет собой N. В одном варианте осуществления X_{24} представляет собой Q. В

одном варианте осуществления X_{28} представляет собой А. В одном варианте осуществления X_{28} представляет собой Е.

В одном варианте осуществления $X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}$ выбран из группы, состоящей из KQAAAibE, KKA AAAibE, KQAAAibK и EQAAAibK. В одном варианте осуществления $X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}$ представляет собой KQAAAibE. В одном варианте осуществления $X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}$ представляет собой KKA AAAibE. В одном варианте осуществления $X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}$ представляет собой KQAAAibK. В одном варианте осуществления $X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}$ представляет собой EQAAAibK.

В дополнительном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14. В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой последовательность под SEQ ID NO.: 9.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой последовательность под SEQ ID NO.: 10 или 13.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой последовательность под SEQ ID NO.: 10.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой последовательность под SEQ ID NO.: 11 или 14.

В одном варианте осуществления аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 7, 8, 9 и 12.

В таких дополнительных вариантах осуществления пептид характеризуется амидной модификацией С-конца.

Производные

В некоторых вариантах осуществления агонисты рецепторов GLP-1 и GIP содержат описанный ниже заместитель, ковалентно связанный с пептидом, или состоят из него.

Такие соединения можно называть производными пептида, поскольку их получают путем ковалентного связывания заместителя с пептидным остовом.

Один аспект настоящего изобретения относится к соединению, содержащему пептид и заместитель, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой

5 YX₂EGTFTSDYSIYLYLX₁₅X₁₆X₁₇AAAX₂₀X₂₁FVX₂₄WLLX₂₈GGPX₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉

(SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-конца, где

X₂ представляет собой Aib,

X₁₅ представляет собой D или E,

10 X₁₆ представляет собой E или K,

X₁₇ представляет собой Q или K,

X₂₀ представляет собой Aib,

X₂₁ представляет собой E или K,

X₂₄ представляет собой N или Q,

15 X₂₈ представляет собой A или E,

X₃₂ представляет собой S или отсутствует,

X₃₃ представляет собой S или отсутствует,

X₃₄ представляет собой G или отсутствует,

X₃₅ представляет собой A или отсутствует,

20 X₃₆ представляет собой P или отсутствует,

X₃₇ представляет собой P или отсутствует,

X₃₈ представляет собой P или отсутствует,

X₃₉ представляет собой S или отсутствует;

где заместитель присоединен к пептиду посредством лизинового (K) остатка в положении 16, 17 или 21;

или его фармацевтически приемлемой соли.

- 5 В дополнительных вариантах осуществления пептид может быть определен так, как описанный в данном документе выше.

Заместитель

- 10 В одном варианте осуществления описанные в данном документе заместители присоединены к описанным в данном документе пептидам посредством лизинового (K) остатка в положении 16, 17 или 21.

В одном варианте осуществления заместитель присоединен к пептиду посредством эpsilon-аминогруппы лизина (K), если указанный лизин включен в положении 16, 17 или 21.

- 15 В одном варианте осуществления заместитель представляет собой химическую структуру, ковалентно присоединенную к пептиду, которая способна образовывать нековалентные комплексы с плазменным альбумином, за счет чего обеспечивается циркуляция коагониста в кровотоке, а также эффект пролонгирования времени действия коагониста вследствие того, что комплекс коагониста и альбумина медленно выводится только посредством почечного клиренса.

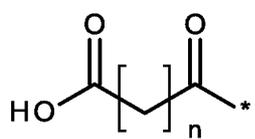
- 20 В одном варианте осуществления заместитель содержит группу жирной кислоты. В таком варианте осуществления группа жирной кислоты содержит углеродную цепь, которая содержит по меньшей мере 8 последовательных групп $-CH_2-$. В одном варианте осуществления группа жирной кислоты содержит по меньшей мере 10 последовательных групп $-CH_2-$, как, например, по меньшей мере 12 последовательных групп $-CH_2-$, по меньшей мере 14 последовательных групп $-CH_2-$, по меньшей мере 16 последовательных групп $-CH_2-$ или как, например, по меньшей мере 18 последовательных групп $-CH_2-$.
- 25

В одном варианте осуществления группа жирной кислоты содержит 8–20 последовательных групп $-\text{CH}_2-$. В одном варианте осуществления группа жирной кислоты содержит 10–18 последовательных групп $-\text{CH}_2-$. В одном варианте осуществления группа жирной кислоты содержит 12–18 последовательных групп $-\text{CH}_2-$.
 5 . В одном варианте осуществления группа жирной кислоты содержит 14–18 последовательных групп $-\text{CH}_2-$.

В некоторых вариантах осуществления заместитель состоит из нескольких элементов, таких как пролонгирующий элемент и один или более линкерных элементов. В одном варианте осуществления термин «пролонгирующее средство» используют для
 10 описания группы жирной кислоты, которая является концевой частью заместителя, отвечающей за удлинение периода полувыведения соединения.

В одном варианте осуществления пролонгирующее средство (Prot) может быть определено под

Chem. 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-^*$, где n представляет собой целое число в диапазоне 8–20,
 15 которое также может обозначать двухосновную $\text{C}(n+2)$ -кислоту, или как

Chem. 1b: , где n представляет собой целое число в диапазоне 8–
 20.

В одном варианте осуществления заместитель дополнительно содержит один или более линкерных элементов. В некоторых вариантах осуществления линкерные элементы
 20 связаны друг с другом и пролонгирующим средством посредством амидных связей и обозначаются как «Z» (см. дополнительно ниже).

Как дополнительно определено в данном документе ниже, количество линкерных элементов может составлять не более 4, обозначаемых $-Z1-Z2-Z3-Z4-$, где $Z1$ связан с пролонгирующим средством (Prot-), и последний элемент Z связан с пептидом, при
 25 этом в данном случае заместитель может обозначаться как Prot-- $Z1-Z2-Z3-Z4-$. Таким образом, символ * выше указывает на точку присоединения к $Z1$, которая в случае соединения амидной связью представляет собой атом азота. В одном варианте

осуществления, где Z1 представляет собой связь (см. ниже), символ * указывает на точку присоединения к атому азота соседнего элемента Z.

5 В одном варианте осуществления заместитель определен под Prot--Z1-Z2-Z3-Z4-, где Prot- выбран из Chem. 1, Chem. 1b, и где n представляет собой целое число в диапазоне 16–20.

В конкретном варианте осуществления в Chem. 1 или Chem. 1b n равняется 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

В конкретном варианте осуществления в Chem. 1 или Chem. 1b n равняется 14, 15, 16, 17 или 18.

10 В конкретном варианте осуществления в Chem. 1 или Chem. 1b n равняется 16 или 18.

В конкретном варианте осуществления в Chem. 1 или Chem. 1b n равняется 16, 17, 18, 19 или 20.

В конкретном варианте осуществления в Chem. 1 или Chem. 1b n равняется 16, 18 или 20.

15 В конкретном варианте осуществления в Chem. 1 или Chem. 1b n равняется 18 или 20.

В конкретном варианте осуществления пролонгирующее средство (Prot) представляет собой двухосновную C18-кислоту или двухосновную C20-кислоту.

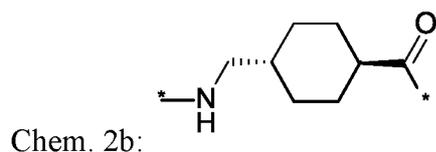
Используемый в данном документе термин «связь» означает ковалентную связь. Если линкерный элемент Z1-Z4 определен как связь, это равносильно ситуации, когда 20 указанный линкерный элемент отсутствует. Указание в данном документе ниже того, что любой из Z1 – Z4 представляет собой связь, также может быть прочитано как любой из Z1 – Z4 отсутствует, то есть предыдущий элемент Z ковалентно связан с следующим элементом Z, который не является «связью» (или отсутствует).

25 В некоторых вариантах осуществления линкерные элементы Z1 – Z4 по отдельности выбраны из химических фрагментов, способных к образованию амидных связей, включая подобные аминокислотам фрагменты, такие как Glu, γ Glu (также называемые гамма-Glu или gGlu и определенные как *-NH-CH-(COOH)-CH₂-CH₂-CO-*), ϵ -Lys

(также называемый эпсилон-Lys или eLys и определенный как $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-^*$), Ser, Ala, Thr, Ado, Aeer и Aеер и дополнительные фрагменты, описанные ниже.

В одном варианте осуществления элемент Z1 является необязательным. В одном таком варианте осуществления Z1 выбран из

5 Chem. 2: $^*-\text{NH}-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_{10})-\text{CO}-^*$ или



и связи.

Chem. 2 также может обозначаться как Tгх в случае транексаминовой кислоты или транс-4-(аминометил)циклогексанкарбоновой кислоты, где Chem 2. охватывает формы 10 (1,2), (1,3) и (1,4), при этом Chem 2b указывает форму (1,4).

В одном варианте осуществления Z1 представляет собой Tгх или связь.

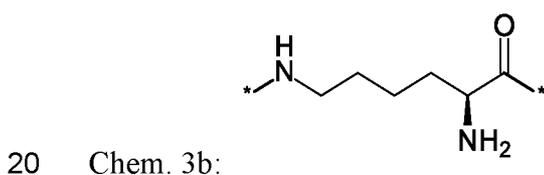
В одном варианте осуществления Z2 выбран из γGlu , Glu или связи.

В одном варианте осуществления Z2 представляет собой γGlu .

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 независимо друг от друга выбраны из Glu, ϵ - 15 Lys, γGlu , Gly, Ser, Ala, Thr, Ado, Aeer, Aеер и связи.

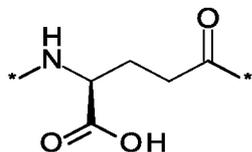
Glu, Gly, Ser, Ala, Thr представляют собой аминокислотные остатки, хорошо известные из уровня техники.

ϵ -Lys определен под Chem. 3: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-^*$, который также может быть описан под

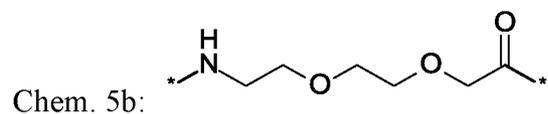


γ Glu определен под Chem. 4: $^*\text{-NH-CH(COOH)-(CH}_2)_2\text{-CO-}^*$, который также может быть описан под

Chem. 4b:

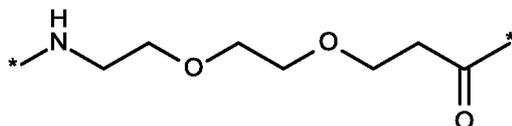


5 Ado определен под Chem. 5: $^*\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-O-(CH}_2)_2\text{-O-CH}_2\text{-CO-}^*$, который также может обозначаться как 8-амино-3,6-диоксаоктановая кислота и который также может быть описан под



Аеер определен под Chem. 6: $^*\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^*$, который также может быть описан под

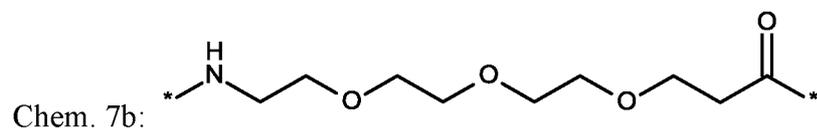
10



Chem. 6b:

Аеер определен как Chem. 7: $^*\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CO}^*$, который также может быть описан под

15



В одном варианте осуществления Z3 и Z4 независимо друг от друга выбраны из Glu, ϵ -Lys, γ Glu, Gly, Ala, Ado, Аеер, Аеерр и связи.

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 независимо друг от друга выбраны из Glu, ϵ -Lys, γ Glu, Gly, Ala, Ado и связи.

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 независимо друг от друга выбраны из Glu, ϵ -Lys, γ Glu, Gly, Ado и связи.

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 независимо друг от друга выбраны из ϵ -Lys, γ Glu, Gly, Ado и связи.

- 5 В одном варианте осуществления Z3 и Z4 независимо друг от друга выбраны из ϵ -Lys, γ Glu, Ado и связи.

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 представляют собой ϵ -Lys или Ado.

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 представляют собой Ado.

В одном варианте осуществления Z3 и Z4 представляют собой ϵ -Lys.

- 10 В одном варианте осуществления заместитель выбран из заместителей A, B, C, D, E, F и G, определенных следующим образом.

Заместитель #	Prot	Z1	Z2	Z3	Z4
A	Двухосновная C18кислота	-	γ Glu	Ado	Ado
B	Двухосновная C18кислота	-	γ Glu	ϵ Lys	ϵ Lys
C	Двухосновная C20кислота	-	γ Glu	Ado	Ado
D	Двухосновная C20кислота	-	γ Glu	ϵ Lys	ϵ Lys
E	Двухосновная C20кислота	Trx	γ Glu	Ado	Ado
F	Двухосновная C20кислота	Trx	γ Glu	ϵ Lys	ϵ Lys
G	Двухосновная C18кислота	-	γ Glu	γ Glu	γ Glu

В некоторых вариантах осуществления заместитель ковалентно присоединен к лизиновому остатку коагониста за счет ацилирования, т. е. посредством амидной связи, образованной между группой карбоновой кислоты заместителя и эpsilon-аминогруппой лизинового остатка.

5 В одном варианте осуществления заместитель ковалентно присоединен к лизиновому остатку в положении 16 пептидного остова путем ацилирования, т. е. посредством амидной связи, образованной между группой карбоновой кислоты заместителя и эpsilon-аминогруппой лизинового остатка.

10 В одном варианте осуществления заместитель ковалентно присоединен к лизиновому остатку в положении 17 пептидного остова путем ацилирования, т. е. посредством амидной связи, образованной между группой карбоновой кислоты заместителя и эpsilon-аминогруппой лизинового остатка.

15 В одном варианте осуществления заместитель ковалентно присоединен к лизиновому остатку в положении 21 пептидного остова путем ацилирования, т. е. посредством амидной связи, образованной между группой карбоновой кислоты заместителя и эpsilon-аминогруппой лизинового остатка.

20 Коагонисты могут существовать в разных стереоизомерных формах, имеющих одинаковую молекулярную формулу и последовательность связанных атомов, но отличающихся только трехмерной ориентацией их атомов в пространстве. Стереои́зомерия приведенных в качестве примера коагонистов указана в экспериментальном разделе в названиях, а также в структурах с использованием стандартной номенклатуры. Если не указано иное, настоящее изобретение относится ко всем стереоизомерным формам изложенного производного.

Функциональная активность, представляющая собой активацию рецепторов

25 Функциональная активность агонистов рецепторов GLP-1/GIP, описанных в данном документе, может быть протестирована *in vitro*, как это описано в данном документе в примере 2.

30 Термин «полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀)» в общем означает концентрацию, которая индуцирует ответ, находящийся посередине между исходным уровнем и максимальным ответом, исходя из кривой зависимости доза-ответ. EC₅₀

используют в качестве меры эффективности соединения, и она представляет собой концентрацию, при которой наблюдается 50% от его максимального эффекта.

Таким образом, эффективность соединений *in vitro* можно определять так, как это описано в данном документе, и определять EC_{50} . Чем ниже значение EC_{50} , тем выше
5 эффективность.

Для определения характеристик таких соединений может быть целесообразным дополнительно рассмотреть значения эффективности *in vitro* относительно нативных гормонов для каждого рецептора.

Эффективность *in vitro* можно определять, например, в среде, содержащей мембраны, экспрессирующие соответствующий рецептор GLP-1 и/или GIP, и/или в анализе с использованием цельных клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор GLP-1
10 и/или GIP.

Например, функциональный ответ рецептора GLP-1 и/или GIP человека или мыши можно измерять в анализе с репортерным геном, например, в стабильно трансфицированной клеточной линии ВНК, которая экспрессирует рецептор GLP-1
15 и/или GIP человека или мыши и содержит ДНК, кодирующую сAMP-зависимый элемент (CRE), соединенный с промотором, и ген, кодирующий люциферазу светлячка (CRE-люциферазу). Когда продуцируется сAMP в результате активации рецептора GLP-1 и/или GIP, это в свою очередь приводит к экспрессии люциферазы. Люциферазу
20 можно определить путем добавления люциферина, который под действием фермента превращается в оксилуциферин и индуцирует биолюминесценцию, которую измеряют в качестве репортера эффективности *in vitro*. Один пример такого анализа описан в примере 2, описанном в данном документе. Поскольку соединения могут включать заместитель, сконструированный для связывания альбумина, также важно отметить,
25 что на рецепторную активность может влиять присутствие или отсутствие сывороточного альбумина человека (HSA) в среде для анализа. Снижение эффективности соединения в присутствии HSA, на что указывает повышение EC_{50} по сравнению с EC_{50} в отсутствие HSA, указывает на взаимодействие соединений с HSA и определяет профиль длительного действия *in vivo*.

30 В одном варианте осуществления соединения обладают сильными эффектами *in vitro*, представляющими собой активацию рецепторов GLP-1 и GIP человека.

В одном варианте осуществления соединения способны к активации рецепторов GLP-1 и GIP человека *in vitro* с EC_{50} , составляющим менее 50 пМ, как, например, менее 40 пМ, как, например, менее 30 пМ, согласно репортерным анализам на основе CRE-люциферазы, описанным в примере 2 в данном документе, при проведении без HSA.

- 5 В одном варианте осуществления соединения обладают эффективностью *in vitro* в отношении рецепторов GLP-1 и GIP человека, определенной с применением способа из примера 2, соответствующей EC_{50} на уровне 100 пМ или ниже, как, например, ниже 50 пМ или как, например, ниже 20 пМ.

- 10 В одном варианте осуществления EC_{50} в анализах на рецепторах GLP-1 и GIP человека в обоих случаях составляет 1–30 пМ, как, например, 1–25 пМ, как, например, 1–20 пМ, как, например, 1–15 пМ или как, например, 1–10 пМ.

- 15 В одном варианте осуществления соединения также обладают сильными эффектами *in vitro*, представляющими собой активацию рецепторов GLP-1 и GIP мыши. В некоторых вариантах осуществления соединения обладают примерно равной эффективностью *in vitro* в отношении рецепторов GLP-1 человека и мыши и в отношении рецепторов GIP человека и мыши при нормализации относительно соответствующих нативных гормонов каждого рецептора.

- 20 В дополнительном конкретном варианте осуществления производные обладают эффективностью *in vitro* в отношении рецепторов GLP-1 и GIP мыши, определенной с применением способа из примера 2, соответствующей EC_{50} на уровне 500 пМ или ниже, более предпочтительно ниже 200 пМ или наиболее предпочтительно ниже 100 пМ.

- 25 В дополнительном варианте осуществления производные способны селективно активировать рецепторы GLP-1 и GIP человека по сравнению с рецептором глюкагона человека. Термин «селективно» при применении по отношению к активации рецепторов GLP-1 и GIP по сравнению с рецептором глюкагона относится к производным, которые демонстрируют по меньшей мере 10-кратную, как, например, по меньшей мере 50-кратную, по меньшей мере 500-кратную или по меньшей мере 1000-кратную, эффективность в отношении рецептора GLP-1 и GIP по сравнению с
30 рецептором глюкагона при измерении *in vitro*. Как описано выше, проводят анализ

эффективности в отношении функции рецептора, такой как функциональный анализ эффективности на основе CRE-люциферазы, и сравнивают полученные значения EC₅₀.

Фармакокинетические свойства

5 Фармакокинетические свойства соединений-коагонистов дополнительно могут быть определены *in vivo* с помощью фармакокинетических (ПК) исследований. Для определения таких характеристик можно использовать животные модели, такие как мышь, крыса, обезьяна, собака или свинья.

10 При таких исследованиях животным обычно вводят однократную дозу лекарственного средства либо внутривенно (в/в), либо подкожно (п/к), либо перорально (п/о) в соответствующем составе. Образцы крови отбирают в заранее определенные моменты времени после введения доз, и образцы анализируют в отношении концентрации лекарственного средства с помощью соответствующего количественного анализа. На основании этих измерений профили зависимости концентрации в плазме крови от времени для исследуемого соединения наносят на график и выполняют так называемый

15 некомпартментный фармакокинетический анализ данных. Важным параметром является конечный период полувыведения, поскольку длинный период полувыведения указывает на то, что может быть возможным менее частое введение соединения. Конечный период полувыведения ($t_{1/2}$) *in vivo* после внутривенного введения можно измерять в организмах карликовых свиней, как описано в примере 3.

20 В одном варианте осуществления конечный период полувыведения представляет собой период полувыведения ($t_{1/2}$) *in vivo* в организме карликовых свиней после в/в введения, например, как описано в примере 3 в данном документе.

В одном варианте осуществления конечный период полувыведения в организме карликовых свиней составляет по меньшей мере 24 часа, как, например, по меньшей мере 40 часов или как, например, по меньшей мере 60 часов.

25

Биологическая активность

Биологические эффекты соединений-коагонистов можно дополнительно изучать *in vivo* с применением подходящих животных моделей, известных из уровня техники, а также в клинических испытаниях.

Мышь с алиментарным ожирением (DIO) является одним примером подходящей животной модели, и эффект в отношении веса тела, потребления пищи и толерантности к глюкозе можно оценивать в ходе субхронического введения доз на этой модели. Эффект соединений по настоящему изобретению в отношении веса тела, потребления пищи и толерантности к глюкозе можно определять у таких мышей *in vivo*, например, как описано в примере 4 в данном документе.

В одном варианте осуществления соединения демонстрируют способность обеспечивать снижение веса тела, потребления пищи и улучшать толерантность к глюкозе у мышей с DIO, как описано в примере 4.

10 В одном варианте осуществления соединения обеспечивают снижение веса тела у мышей с DIO.

В одном варианте осуществления соединения обеспечивают снижение потребления пищи у мышей с DIO.

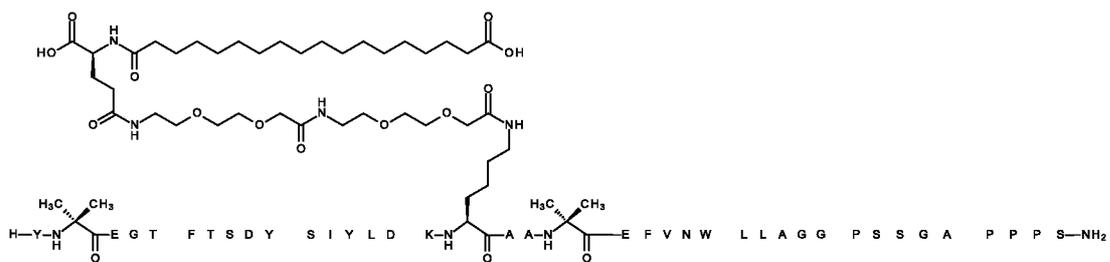
15 В одном варианте осуществления соединения улучшают толерантность к глюкозе у мышей с DIO.

В одном варианте осуществления соединения обеспечивает снижение веса тела на по меньшей мере 20% после введения один раз в день 3 нмоль/кг указанного соединения в течение 10 дней у мышей с DIO.

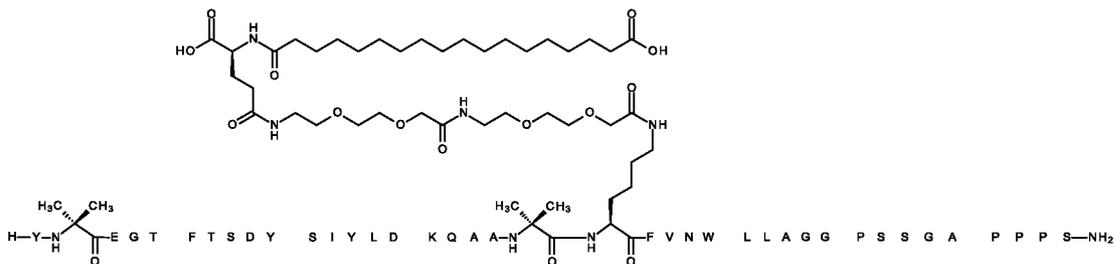
20 В одном варианте осуществления соединения обеспечивает снижение потребления пищи на по меньшей мере 20% после введения один раз в день 3 нмоль/кг указанного соединения в течение 10 дней у мышей с DIO. В одном варианте осуществления соединения улучшают толерантность к глюкозе на по меньшей мере 20%, что измерено в IPGTT (интраперитонеальном тесте толерантности к глюкозе).

В одном варианте осуществления соединения выбрано из группы, состоящей из

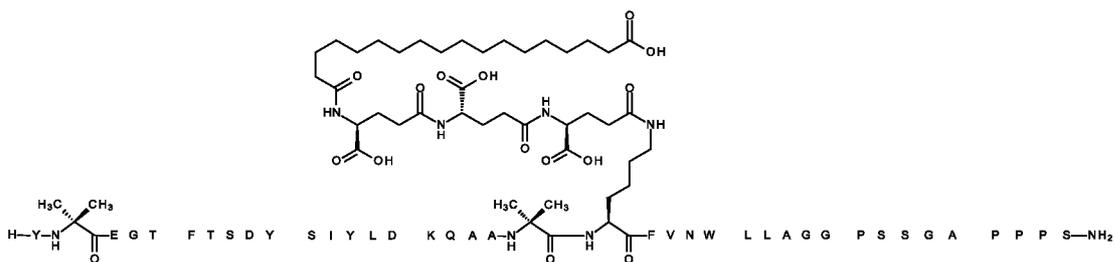
соединения № 4



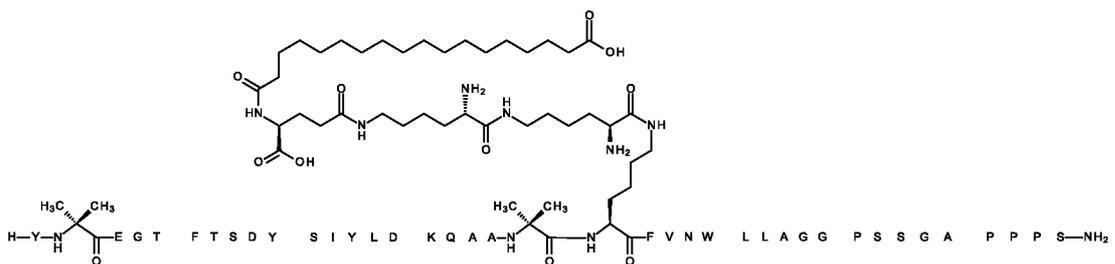
соединения № 5



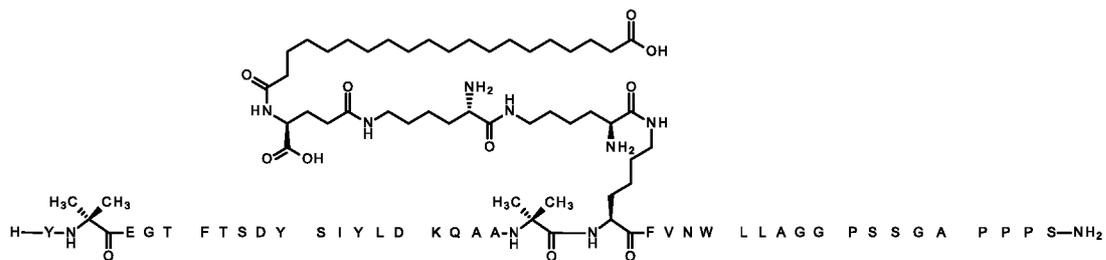
соединения № 6



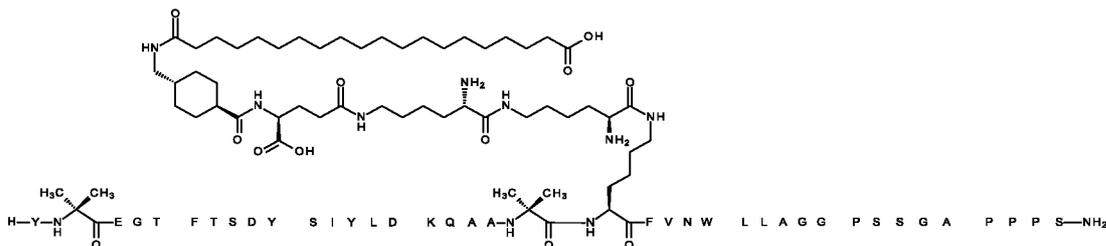
соединения № 9



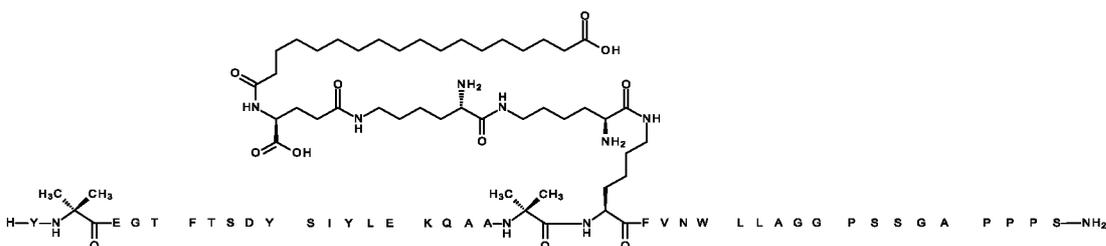
соединения № 13



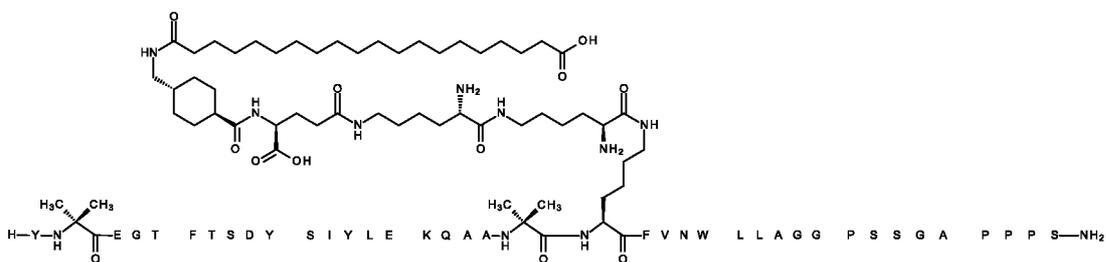
соединения № 14



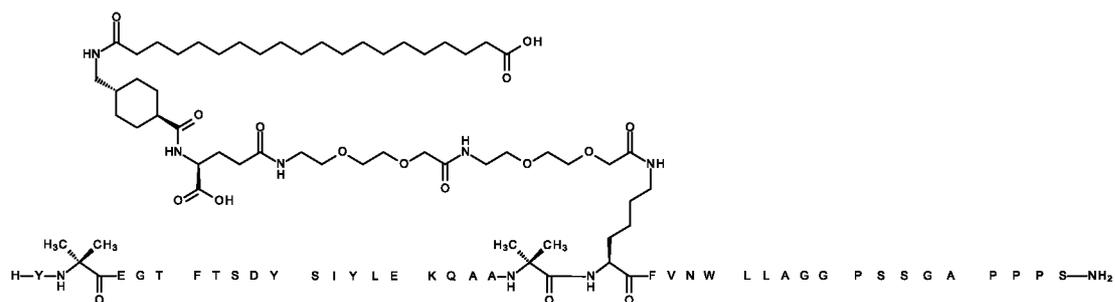
соединения № 15



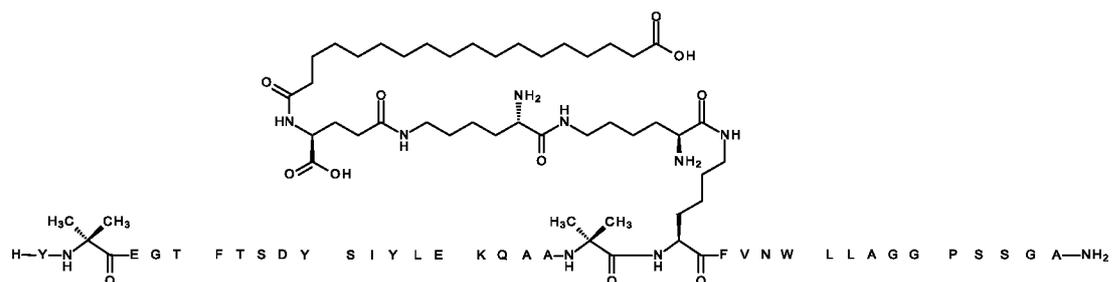
соединения № 16



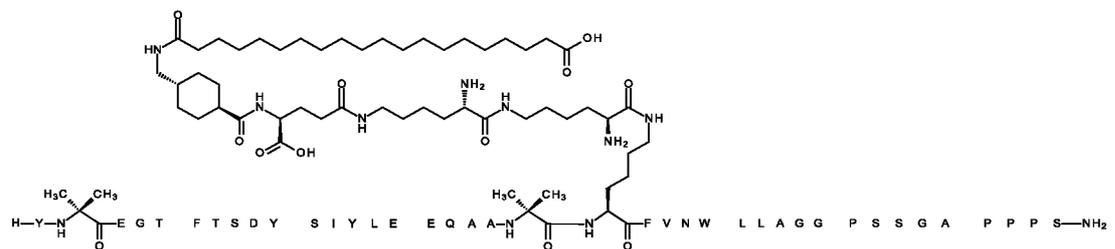
соединения № 17



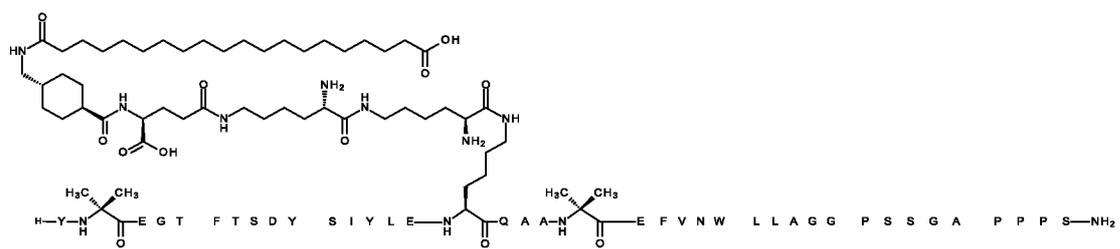
соединения № 18



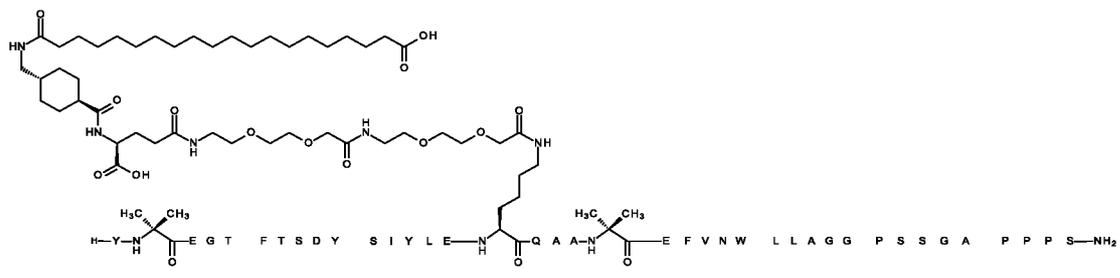
соединения № 19



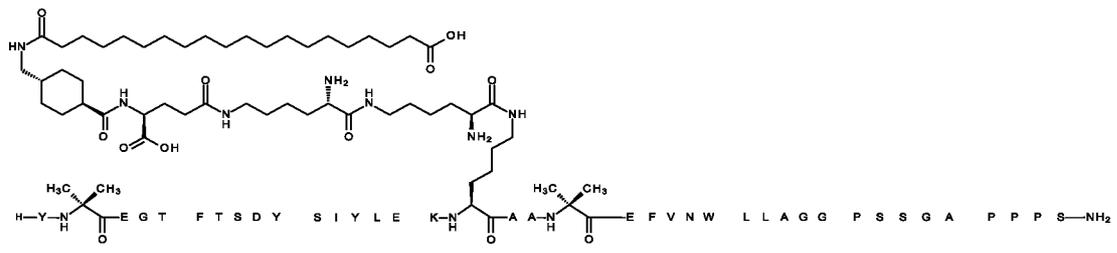
соединения № 20



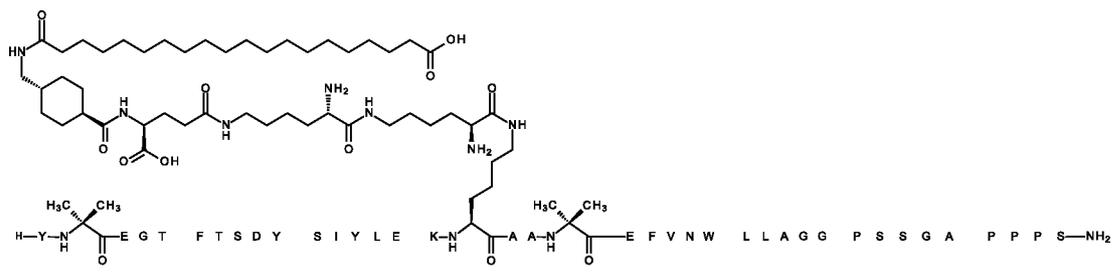
соединения № 21



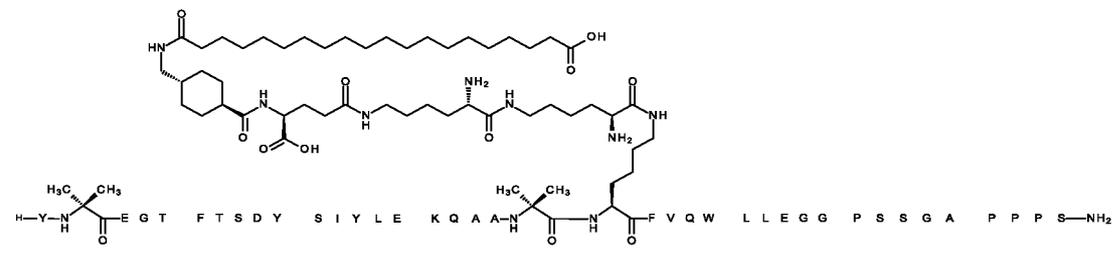
соединения № 22



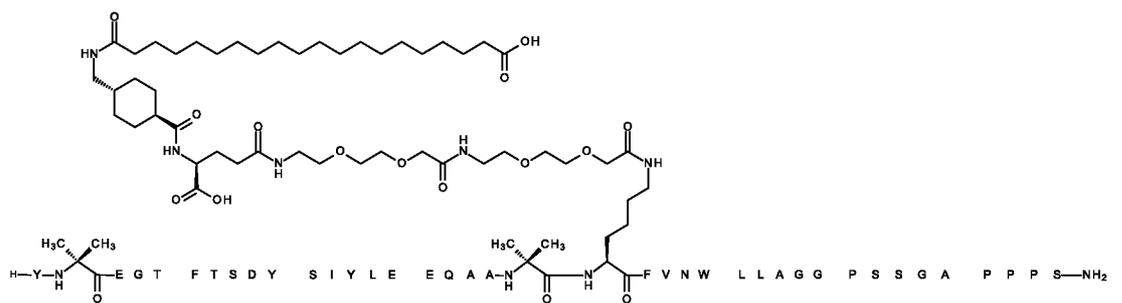
соединения № 23



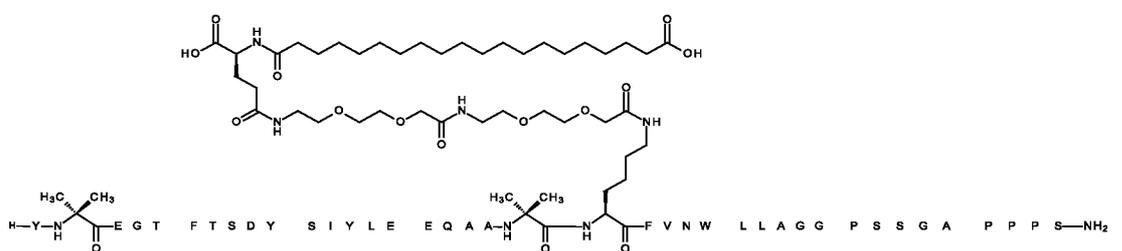
соединения № 24



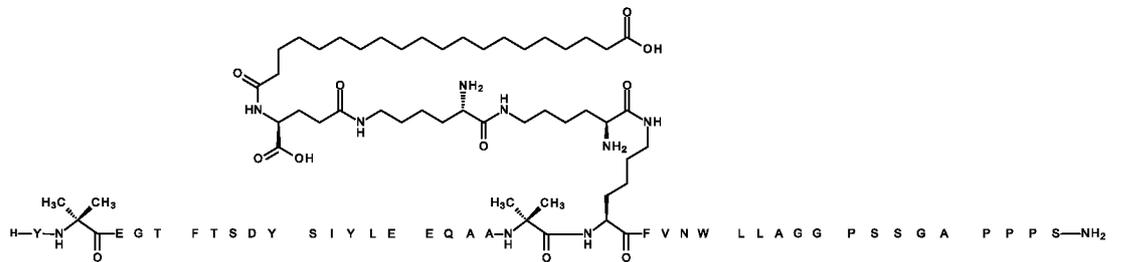
соединения № 25



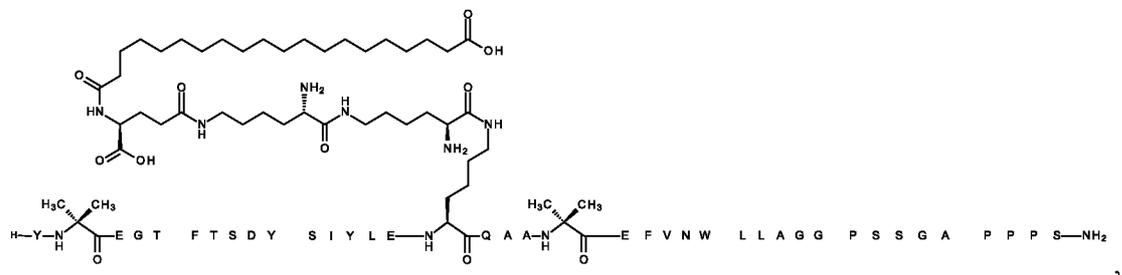
соединения № 26



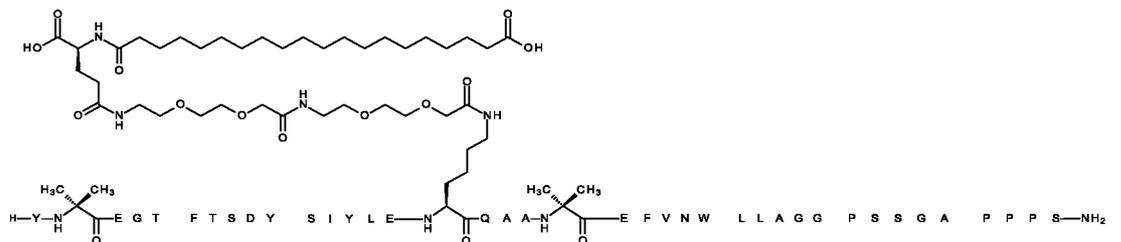
соединения № 27



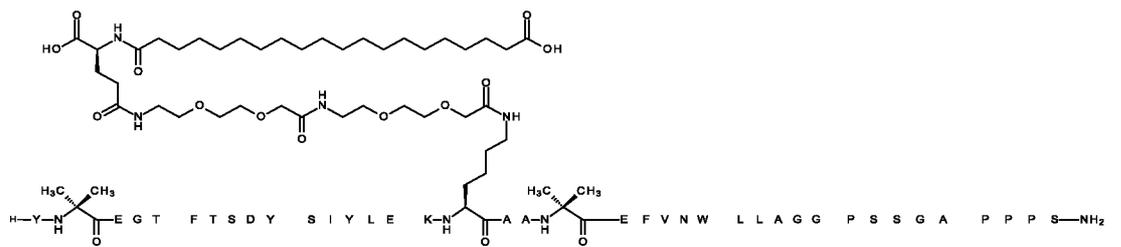
соединения № 28



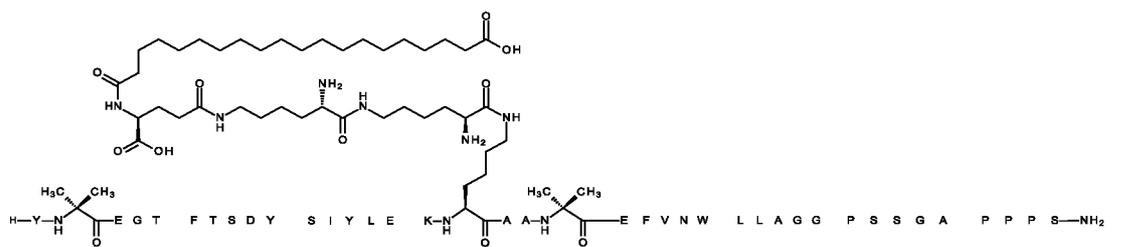
соединения № 29



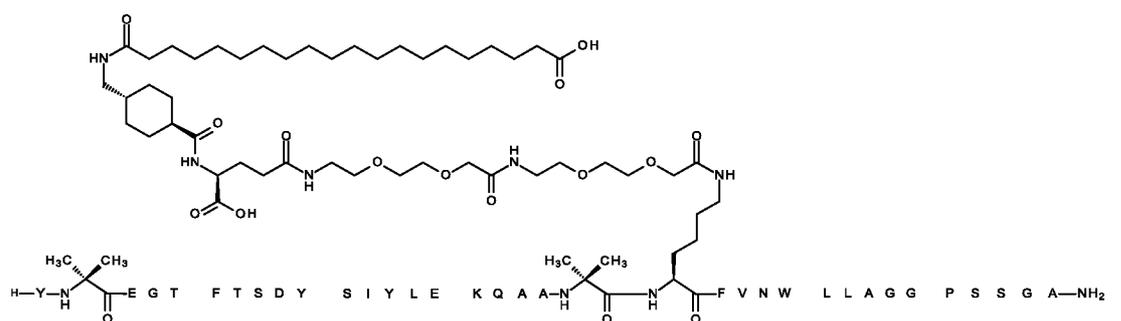
соединения № 30



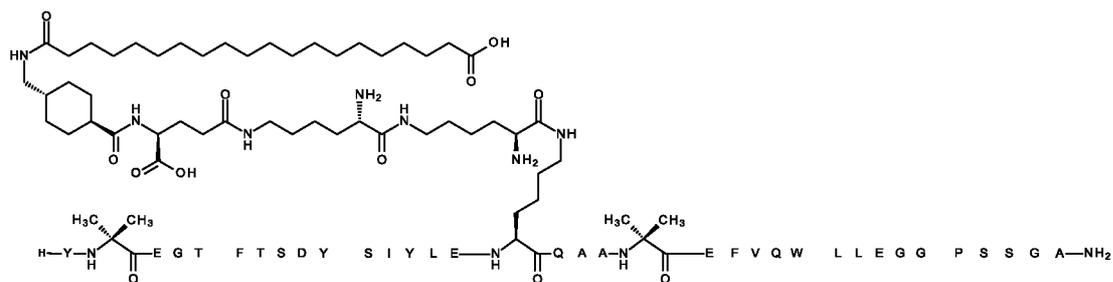
соединения № 31



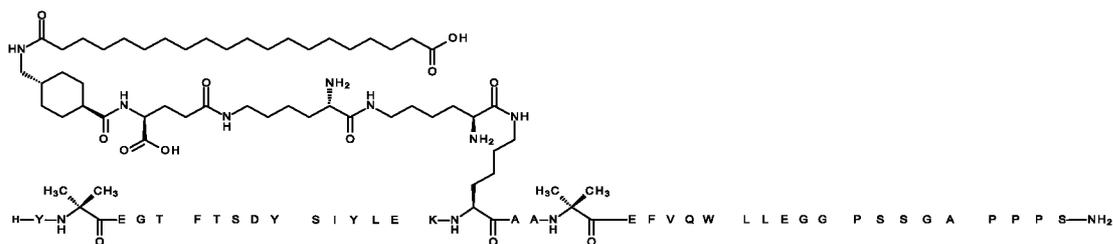
соединения № 32



соединения № 33

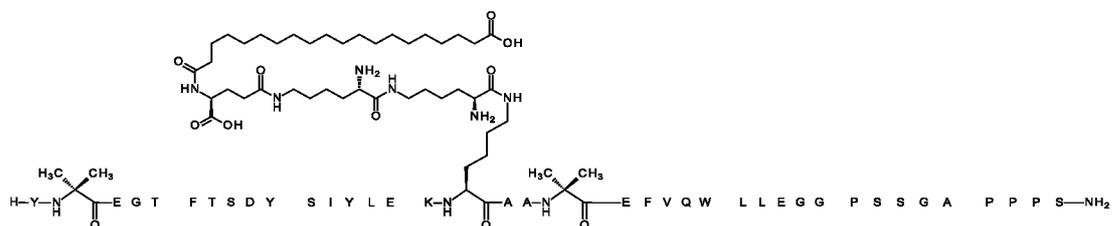


соединения № 34



И

соединения № 35



В одном варианте осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений № 16, № 17 и №№ 19–35.

В одном варианте осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений № 20, № 21, № 28, № 29 и № 33.

В одном варианте осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений № 22, № 23, № 30, № 31, № 34 и № 35.

В одном варианте осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединения № 34 и соединения № 35.

В одном варианте осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений № 16, № 17, № 19, № 24, № 25, № 26, № 27 и № 32.

В одном варианте осуществления соединение выбрано из группы, состоящей из соединений № 19, № 25, № 26 и № 27.

5 Фармацевтически приемлемые соли

В некоторых вариантах осуществления коагонисты, описанные в данном документе, представлены в виде фармацевтически приемлемой соли. Соли, например, образуют путем химической реакции между основанием и кислотой, например: $2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Соль может быть основной солью, кислой солью или может быть ни тем, ни другим (т. е. нейтральной солью). Основные соли образуют гидроксид-ионы и ионы гидроксония в солях кислот в воде. Соли соединений могут быть образованы с добавлением катионов или анионов в реакции с анионными или катионными группами соответственно. Такие группы могут находиться в пептиде и/или в заместителе соединений. Неограничивающие примеры анионных групп включают любые свободные группы карбоновых кислот в заместителе, если он присутствует, а также в пептиде. Пептидный фрагмент может включать свободную группу карбоновой кислоты на С-конце, если он присутствует, а также любую свободную группу карбоновой кислоты при внутренних кислотных аминокислотных остатках, таких как Asp и Glu.

Неограничивающие примеры катионных групп включают любые свободные аминогруппы в заместителе, если он присутствует, а также в пептиде. Пептид может включать свободную аминогруппу на N-конце, если он присутствует, а также любую свободную имидазольную или аминогруппу при внутренних основных аминокислотных остатках, таких как His, Arg и Lys.

В конкретном варианте осуществления пептид или производное представлены в форме фармацевтически приемлемой соли.

Способы получения

Коагонисты можно получать, например, путем классического синтеза пептидов, например твердофазного синтеза пептидов с использованием защитных групп t-Бос или Fmoc, или других хорошо известных методик, см., например, Greene and Wuts, «Protective Groups in Organic Synthesis», John Wiley & Sons, 1999; Florencio Zaragoza

Dörwald, «Organic Synthesis on Solid Phase», Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000 и «Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis», Edited by W.C. Chan and P.D. White, Oxford University Press, 2000.

5 В качестве альтернативы соединения можно получать посредством рекомбинантных способов, например, путем культивирования клетки-хозяина, содержащей последовательность ДНК, кодирующую последовательность пептида, и способной экспрессировать пептид в подходящей питательной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию пептида. Неограничивающие примеры клеток-хозяев, подходящих для экспрессии этих пептидов, представляют собой *Escherichia coli*, *Saccharomyces*
10 *cerevisiae*, а также линии клеток млекопитающих ВНК или CHO.

Коагонысты, которые включают неприродные аминокислоты и/или ковалентно присоединенные заместители, можно получать так, как это описано в экспериментальной части.

15 Конкретные примеры способов получения ряда коагоныстов включены в экспериментальную часть.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения пептидов, описанных в данном документе.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения коагоныстов рецепторов GLP-1/GIP, описанных в данном документе.

20 В одном варианте осуществления способ получения соединения, описанный в данном документе, включает стадию твердофазного синтеза пептидов. Заместитель может быть встроен последовательно в ходе твердофазного синтеза пептидов или получен отдельно и присоединен посредством лизинового остатка после синтеза пептида.

25 В одном варианте осуществления соединения получают посредством двухстадийного способа, в котором два пептидных фрагмента лигируют после присоединения заместителя к одному из пептидных фрагментов.

Фармацевтические композиции

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей коагонист рецепторов GLP-1/GIP, описанный в данном документе. Композиции, содержащие соединение или его фармацевтически приемлемую соль и необязательно одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, можно получать согласно способам, известным из уровня техники.

Жидкие композиции, подходящие для инъекционного введения, можно получать с применением методик, общепринятых для фармацевтической промышленности, которые включают растворение и смешивание подходящих ингредиентов с получением требуемого конечного продукта. Таким образом, в соответствии с одной процедурой, коагонист рецепторов GLP-1/GIP, описанный в данном документе, растворяют в подходящем буфере при подходящем значении pH. Композицию можно стерилизовать, например, посредством стерилизующей фильтрации.

Термин «вспомогательное вещество» в широком смысле означает любой компонент, отличный от активного(активных) терапевтического(терапевтических) ингредиента(ингредиентов). Вспомогательное вещество может представлять собой инертное вещество, неактивное вещество и/или вещество, неактивное в плане терапии. Вспомогательное средство может служить для достижения различных целей, например, в качестве носителя, среды-носителя, разбавителя, вспомогательного вещества для формирования таблетки и/или для улучшения введения и/или для улучшения всасывания активного вещества.

Составление фармацевтически активных ингредиентов с различными вспомогательными веществами известно из уровня техники, см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 19-е издание (1995) и любые более поздние издания).

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав, такой как водный состав.

Показания к применению фармацевтического препарата

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к применению соединений-коагонистов рецепторов GLP-1/GIP, описанных в данном документе, в качестве лекарственного препарата.

- 5 В одном варианте осуществления соединения, описанные в данном документе, предназначены для применения в следующих видах терапевтического лечения:
- (i) предупреждения и/или лечения всех форм диабета, таких как гипергликемия, диабет 2 типа, нарушенная толерантность к глюкозе, диабет 1 типа, инсулинонезависимый диабет, MODY (диабет зрелого типа у молодых), гестационный
10 диабет и/или снижение уровня HbA1C;
 - (ii) (ii) задержки или предупреждения прогрессирования диабетического заболевания, как, например, прогрессирования диабета 2 типа, задержки прогрессирования нарушенной толерантности к глюкозе (IGT) до диабета 2 типа, требующего введения инсулина, задержки или предупреждения
15 инсулинорезистентности и/или задержки прогрессирования диабета 2 типа, не требующего введения инсулина, до диабета 2 типа, требующего введения инсулина;
 - (iii) предупреждения и/или лечения нарушений потребления пищи, таких как ожирение, например, путем уменьшения потребления пищи, снижения веса тела, подавления аппетита, вызывания чувства насыщения; лечения или предупреждения
20 компульсивного переедания, нервной булимии и/или ожирения, вызванного введением антипсихотического или стероидного средства; снижения перистальтики желудка; задержки опорожнения желудка; повышения физической подвижности и/или предупреждения и/или лечения сопутствующих ожирению патологий, таких как остеоартрит и/или недержание мочи;
 - (iv) поддержания веса после успешной потери веса (вызванной лекарственными средствами или диетой и физическими упражнениями), т. е. предупреждения
25 увеличения веса после успешной потери веса;
 - (v) предупреждения и/или лечения заболеваний печени, таких как стеатоз печени, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит
30 (NASH), воспаление печени или жировая инфильтрация печени.

В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе предупреждения и/или лечения диабета и/или ожирения.

В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе лечения диабета и/или ожирения.

5 В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе лечения или предупреждения диабета 2 типа.

В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе лечения диабета 2 типа.

10 В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе лечения или предупреждения ожирения.

В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе лечения ожирения.

15 В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе коррекции веса. В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе снижения аппетита. В одном варианте осуществления соединения предназначены для применения в способе снижения потребления пищи.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Соединение, предусматривающее пептид и заместитель, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой

20 $YX_2EGTFTSDYSIYLX_{15}X_{16}X_{17}AA X_{20}X_{21}FVX_{24}WLLX_{28}GGPX_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}$

(SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-концевого аминокислотного остатка; где

X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

25 X_{16} представляет собой E или K,

X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

5 X_{28} представляет собой A или E,

X_{32} представляет собой S или отсутствует,

X_{33} представляет собой S или отсутствует,

X_{34} представляет собой G или отсутствует,

X_{35} представляет собой A или отсутствует,

10 X_{36} представляет собой P или отсутствует,

X_{37} представляет собой P или отсутствует,

X_{38} представляет собой P или отсутствует,

X_{39} представляет собой S или отсутствует;

и где заместитель присоединен к пептиду посредством лизинового (K) остатка в
15 положении 16, 17 или 21;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 1, где X_{36} , X_{37} , X_{38} и X_{39} отсутствуют.

3. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, где
20 $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ представляет собой SSGA.

4. Соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-3, где пептид характеризуется амидной модификацией C-конца.

5. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 1, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой

$YX_2EGTFTSDYSIYLX_{15}X_{16}X_{17}AA X_{20}X_{21}FVX_{24}WLLX_{28}GGPSSGA$ (SEQ ID NO.: 16),

где

5 X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

X_{16} представляет собой E или K,

X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

10 X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

X_{28} представляет собой A или E.

6. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где $X_{16}X_{17}AA X_{20}X_{21}$ выбран из группы, состоящей из KQAAAibE, 15 KКАААibE, KQAAAibK и EQAAAibK.

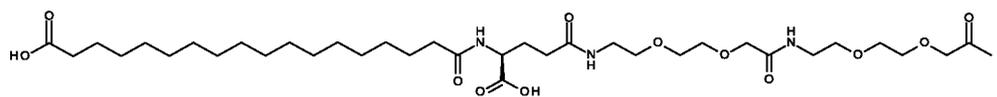
7. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 1, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

8. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 0, где пептид 20 характеризуется амидной модификацией С-конца.

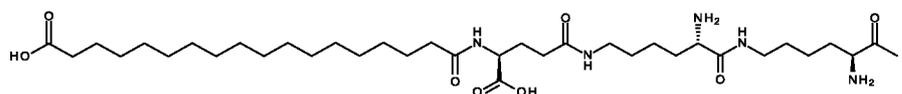
9. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где соединение активирует рецепторы GLP-1 и GIP человека *in vitro* с EC_{50} , составляющим менее 30 пМ, при измерении без HSA в репортерных анализах на основе CRE-люциферазы, описанных в примере 2.

10. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где соединение характеризуется периодом полувыведения в организме карликовых свиней, составляющим по меньшей мере 60 часов.
11. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где соединение обеспечивает снижение веса тела на по меньшей мере 20% у мышей с DIO после введения один раз в день 3 нмоль/кг в течение 10 дней.
12. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 1–11, где заместитель присоединен посредством 16Lys.
13. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 1–11, где заместитель присоединен посредством 17Lys.
14. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 1–11, где заместитель присоединен посредством 21Lys.
15. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где заместитель присоединен к пептиду посредством эpsilon-аминогруппы лизина (K).
16. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где заместитель содержит по меньшей мере одно пролонгирующее средство.
17. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 16, где пролонгирующее средство представляет собой группу жирной кислоты.
18. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 16, где пролонгирующее средство представляет собой двухосновную кислоту, определенную под Chem. 1: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$, где n представляет собой целое число в диапазоне 12–20, как, например, n = 16 или 18.
19. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, где заместитель содержит по меньшей мере один линкерный элемент.
20. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 19, где заместитель содержит не более четырех линкерных элементов.

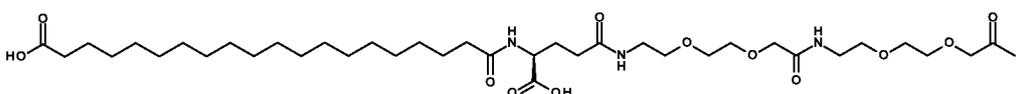
21. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 19, где заместитель содержит не более четырех линкерных элементов, обозначаемых как -Z1-Z2-Z3-Z4-, где -Z1- соединен с пролонгирующим средством, и -Z4- соединен с пептидом.
22. Соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14, где
5 заместитель представляет собой
Prot-Z1-Z2-Z3-Z4-,
где
Prot представляет собой двухосновную C18кислоту или двухосновную C20кислоту,
Z1 представляет собой Trx или связь,
10 Z2 представляет собой γ Glu, Glu или связь,
Z3 представляет собой ϵ -Lys, γ Glu, Gly или Ado и
Z4 представляет собой ϵ -Lys, γ Glu, Gly или Ado.
23. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 22, где -Z1- представляет собой -Trx-.
- 15 24. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 22, где -Z2- представляет собой - γ Glu-.
25. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 22, где -Z3-Z4- представляет собой -Ado-Ado-.
- 20 26. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 22, где -Z3-Z4- представляет собой - ϵ Lys- ϵ Lys-.
27. Соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14, где заместитель выбран из группы, состоящей из
A:



B:

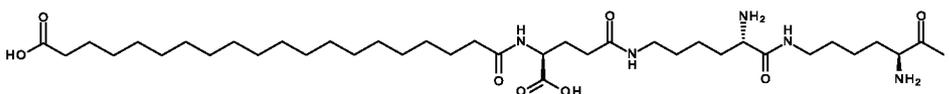


C:

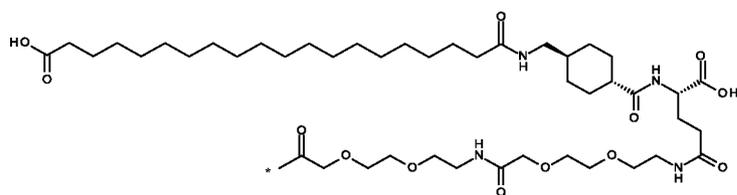


5

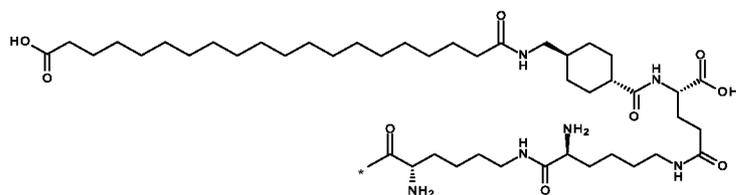
D:



E:

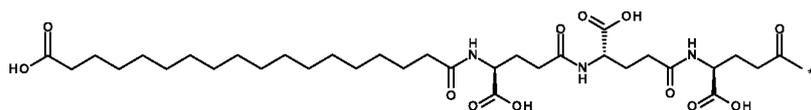


10 F:



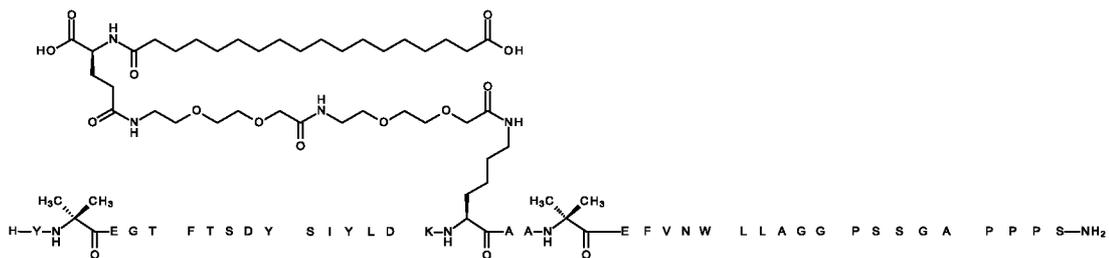
и

G:

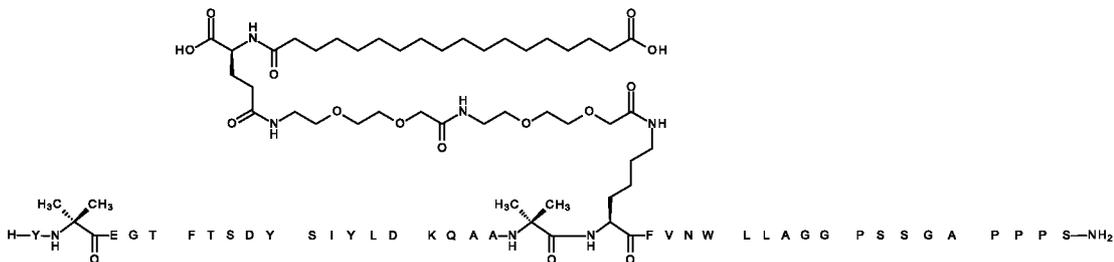


28. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 1, где соединение выбрано из группы, состоящей из

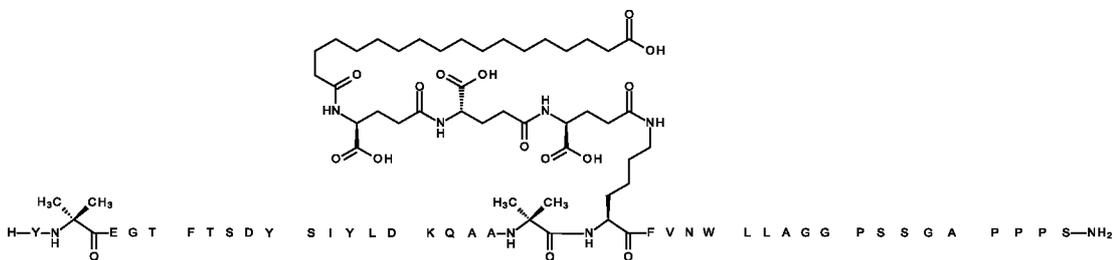
соединения № 4



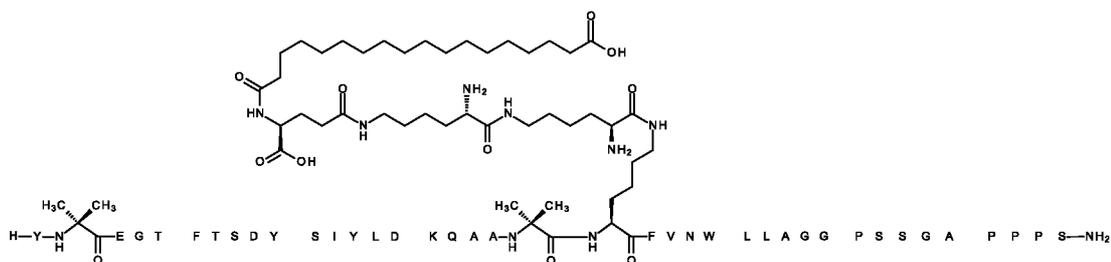
соединения № 5



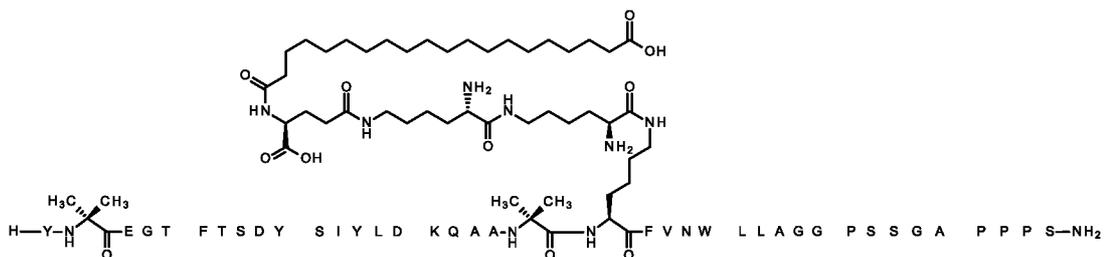
соединения № 6



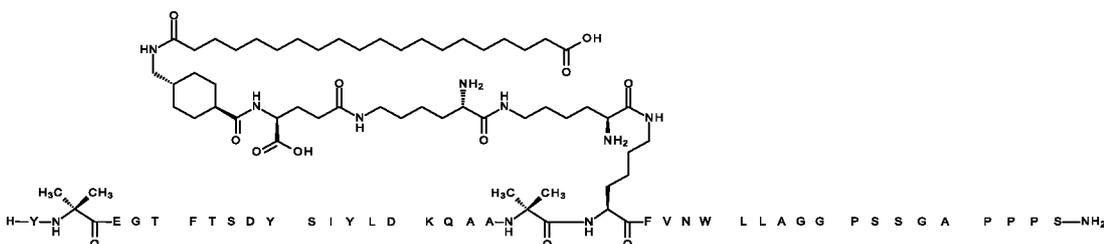
соединения № 9



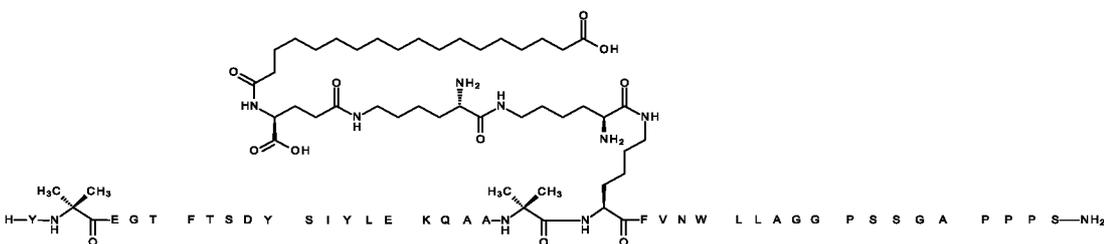
соединения № 13



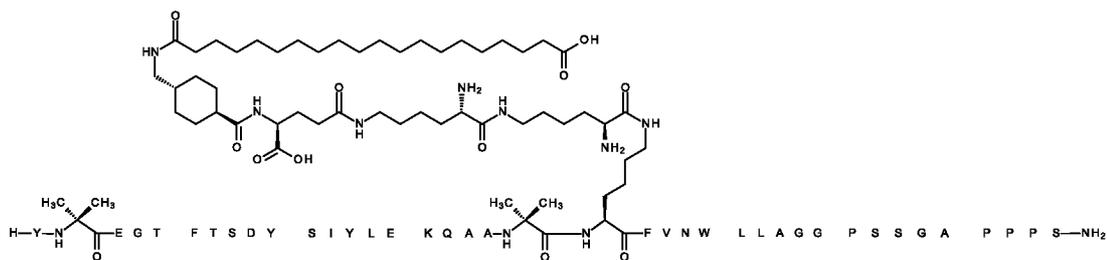
соединения № 14



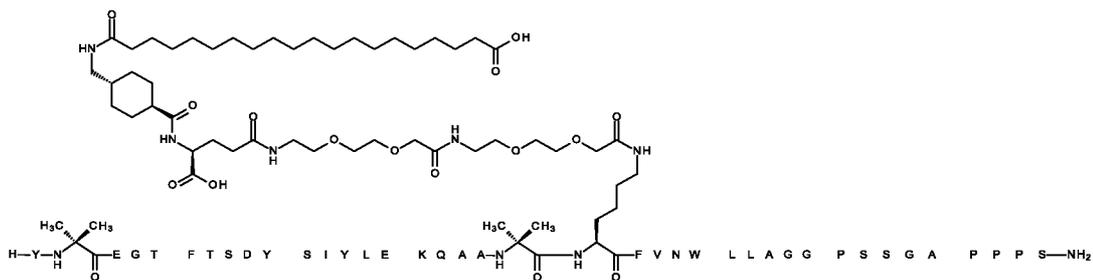
соединения № 15



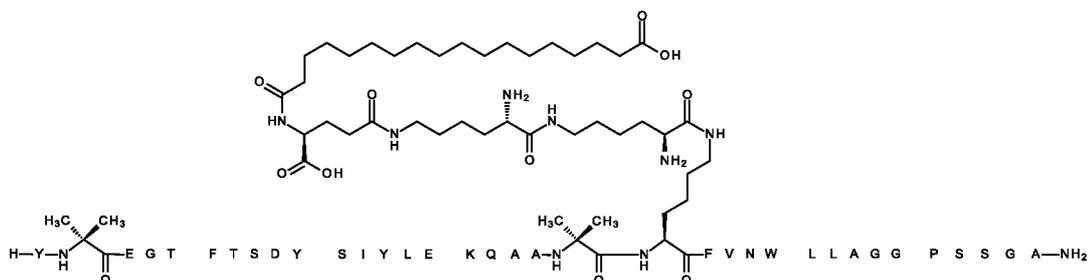
соединения № 16



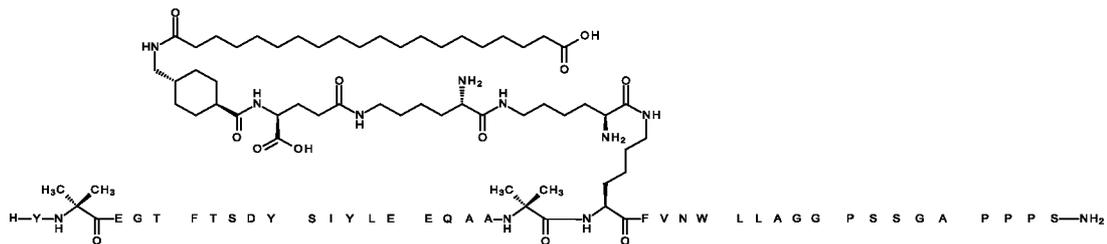
соединения № 17



соединения № 18

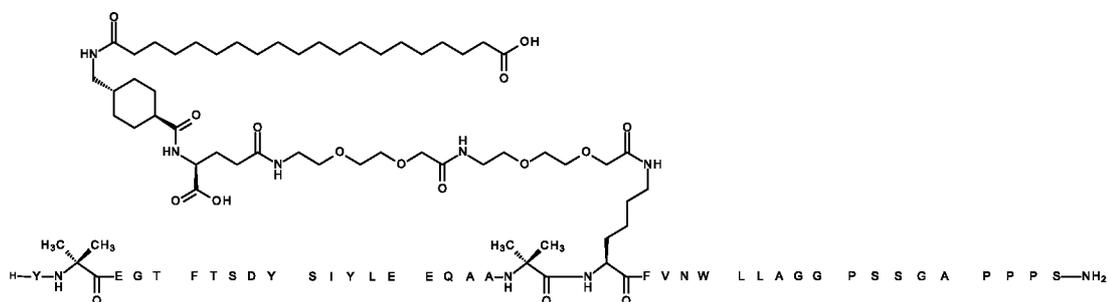


соединения № 19

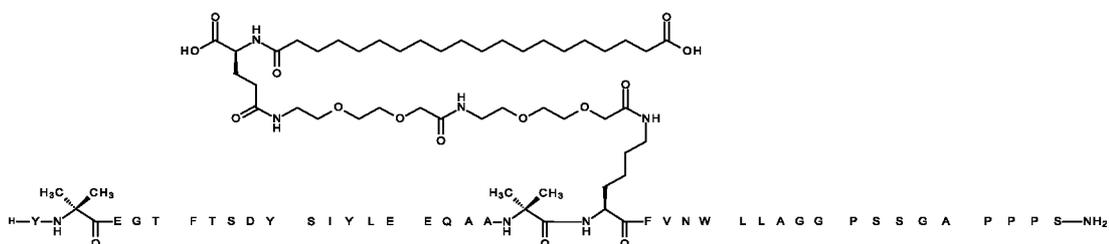


соединения № 20

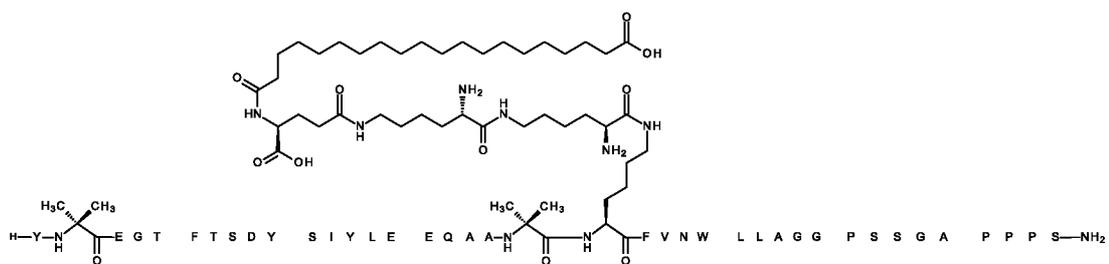
соединения № 25



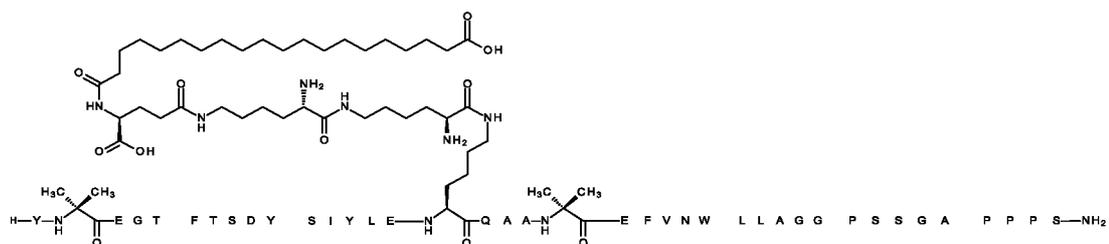
соединения № 26



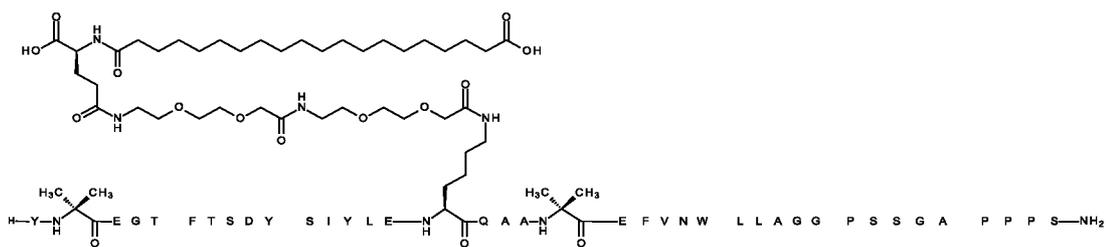
соединения № 27



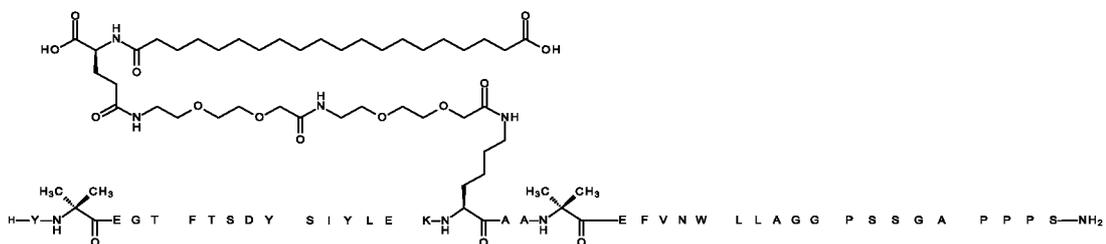
соединения № 28



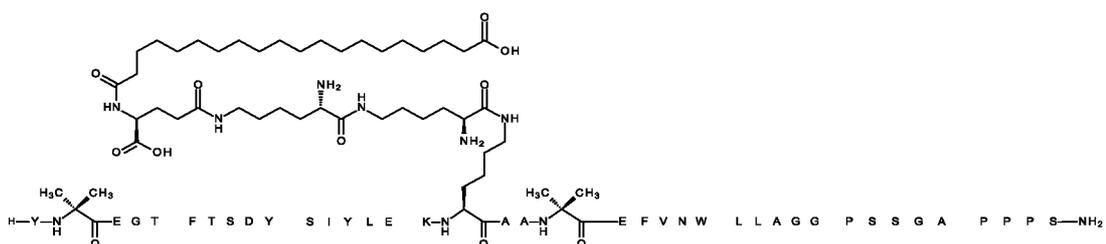
соединения № 29



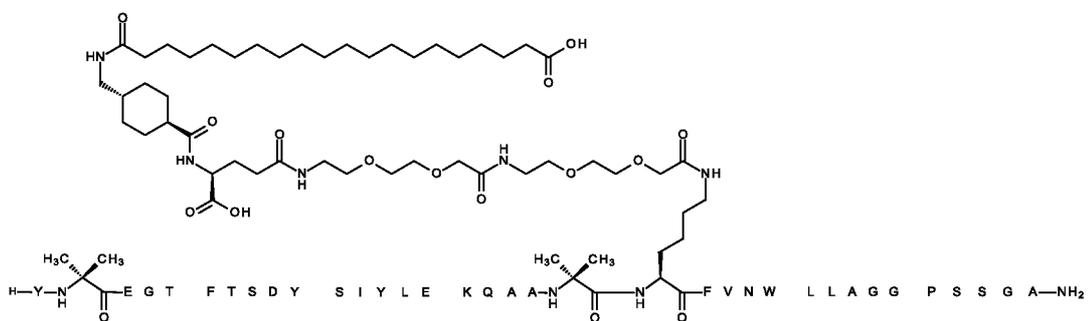
соединения № 30



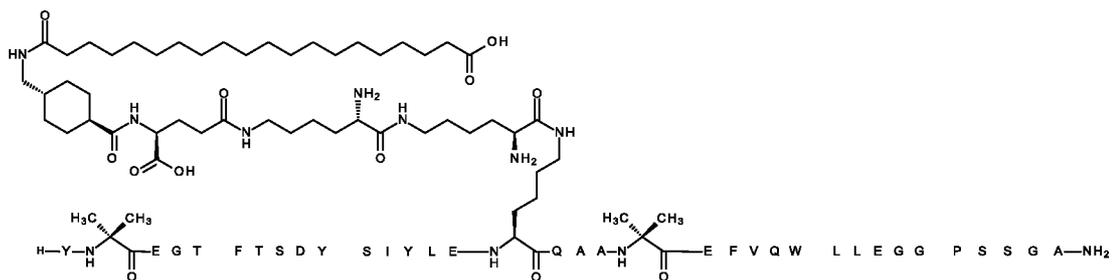
соединения № 31



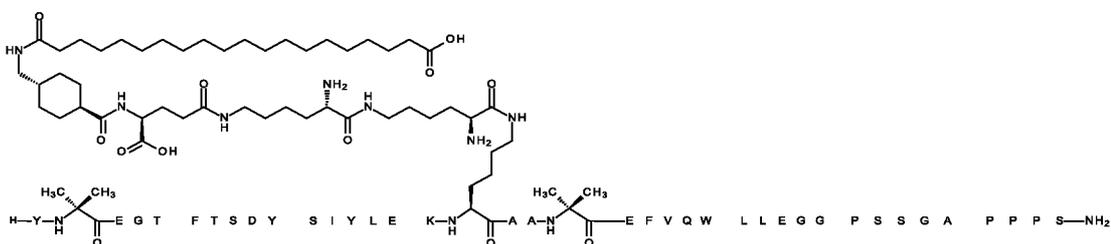
соединения № 32



соединения № 33

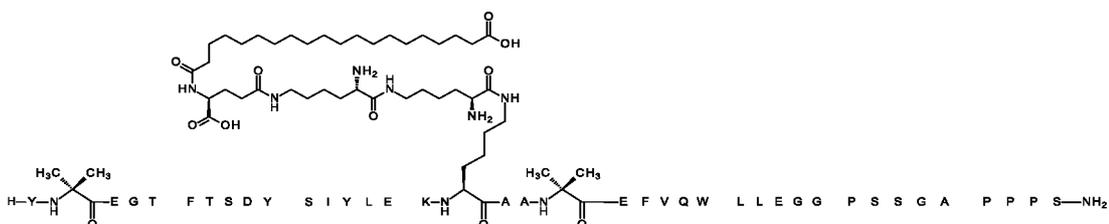


соединения № 34



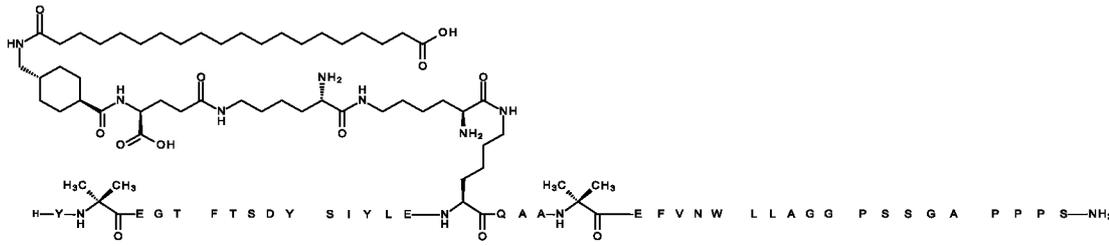
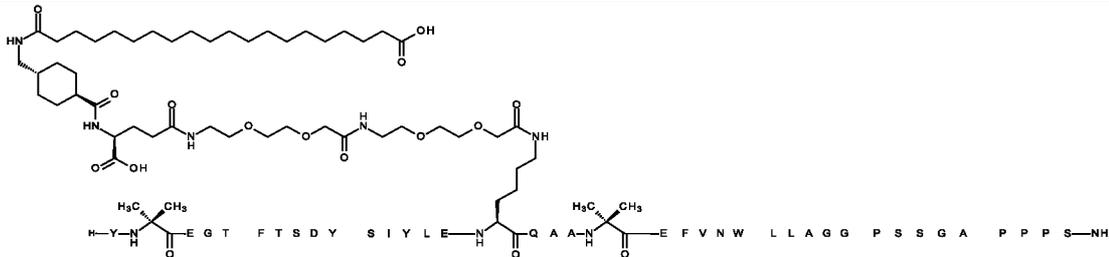
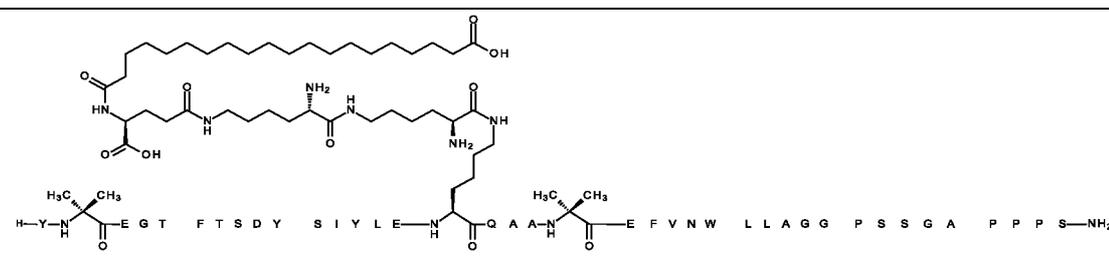
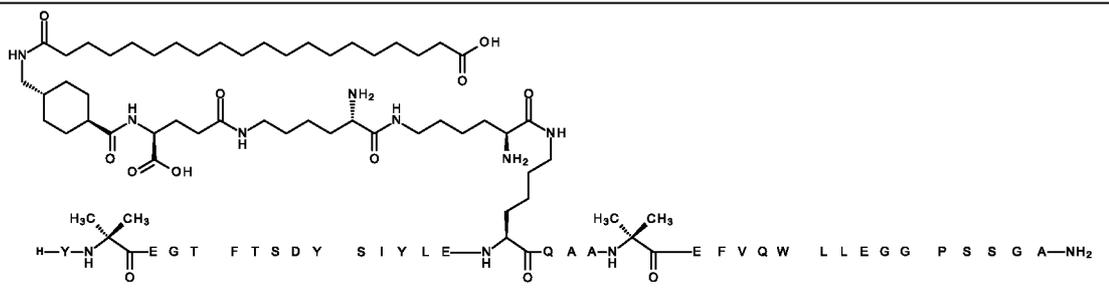
и

соединения № 35



29. Соединение в соответствии с вариантом осуществления 1, где соединение выбрано из группы, состоящей из

соединения № 20

 <p>Chemical structure of compound 21, showing a long-chain fatty acid derivative and a peptide backbone. The peptide sequence is H-Y-N(CH₃)₂-EGTFTSDYSIYLE-NH-QAA-N(CH₃)₂-EFVNWLLAGGPSSGA PPPS-NH₂.</p>
соединения № 21
 <p>Chemical structure of compound 28, showing a long-chain fatty acid derivative and a peptide backbone. The peptide sequence is H-Y-N(CH₃)₂-EGTFTSDYSIYLE-NH-QAA-N(CH₃)₂-EFVNWLLAGGPSSGA PPPS-NH₂.</p>
соединения № 28
 <p>Chemical structure of compound 29, showing a long-chain fatty acid derivative and a peptide backbone. The peptide sequence is H-Y-N(CH₃)₂-EGTFTSDYSIYLE-NH-QAA-N(CH₃)₂-EFVNWLLAGGPSSGA PPPS-NH₂.</p>
соединения № 29
И
соединения № 33
 <p>Chemical structure of compound 33, showing a long-chain fatty acid derivative and a peptide backbone. The peptide sequence is H-Y-N(CH₃)₂-EGTFTSDYSIYLE-NH-QAA-N(CH₃)₂-EFVQWLLLEGGPSSGA-NH₂.</p>

30. Соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления для применения в качестве лекарственного препарата.
31. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 0-29.
- 5 32. Композиция в соответствии с вариантом осуществления 31, где указанная композиция представляет собой водный жидкий состав.
33. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 31 и 32 для предупреждения и/или лечения диабета и/или ожирения.
34. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 31 и 10 32 для предупреждения и/или лечения заболеваний печени, таких как стеатоз печени, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), воспаление печени или жировая инфильтрация печени.
35. Способ предупреждения и/или лечения диабета и/или ожирения, включающий введение пациенту фармацевтически активного количества соединения в соответствии с 15 с любым из вариантов осуществления 1-29.
36. Способ предупреждения и/или лечения заболеваний печени, таких как стеатоз печени, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), воспаление печени и/или жировая инфильтрация печени, включающий введение пациенту фармацевтически активного количества соединения в 20 соответствии с любым из вариантов осуществления 1-29.
37. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность
- YX₂EGTFTSDYSIYLX₁₅X₁₆X₁₇AAX₂₀X₂₁FVX₂₄WLLX₂₈GGPX₃₂X₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉
- (SEQ ID NO.: 15)
- с необязательной амидной модификацией С-конца, где
- 25 X₂ представляет собой Aib,
- X₁₅ представляет собой D или E,

X_{16} представляет собой E или K,

X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

X_{21} представляет собой E или K,

5 X_{24} представляет собой N или Q,

X_{28} представляет собой A или E,

X_{32} представляет собой S или отсутствует,

X_{33} представляет собой S или отсутствует,

X_{34} представляет собой G или отсутствует,

10 X_{35} представляет собой A или отсутствует,

X_{36} представляет собой P или отсутствует,

X_{37} представляет собой P или отсутствует,

X_{38} представляет собой P или отсутствует,

X_{39} представляет собой S или отсутствует.

15 38. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где X_{36} , X_{37} , X_{38} и X_{39} отсутствуют.

39. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ представляет собой SSGA.

20 40. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где пептид характеризуется амидной модификацией С-конца.

41. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой

$YX_2EGTFTSDYSIYLX_{15}X_{16}X_{17}AA X_{20}X_{21}FVX_{24}WLLX_{28}GGPSSGA$ (SEQ ID NO.: 16),

где

X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

X_{16} представляет собой E или K,

5 X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

X_{28} представляет собой A или E.

10 42. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

43. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где пептид характеризуется амидной модификацией С-конца.

15 44. Пептид в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 37–43, где $X_{16}X_{17}AA X_{20}X_{21}$ выбран из группы, состоящей из KQAAAibE, KKA AAAibE, KQAAAibK и EQAAAibK.

20 45. Пептид в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 37–44, где пептид активирует рецепторы GLP-1 и GIP человека *in vitro* с EC₅₀, составляющим менее 20 пМ, при измерении без HSA в репортерных анализах на основе CRE-люциферазы, описанных в примере 2.

46. Пептид в соответствии с вариантом осуществления 37, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 10 и 14.

25 47. Пептид в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 37–45, где X_{16} представляет собой K.

48. Пептид в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 37–45, где X_{17} представляет собой К.

49. Пептид в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления 37–45, где X_{20} представляет собой К.

5 50. Способ получения соединения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–29.

51. Способ получения пептида в соответствии с любым из вариантов осуществления 37–49.

СПОСОБЫ И ПРИМЕРЫ

10 Перечень сокращений

Следующие сокращения в дальнейшем используются в алфавитном порядке.

Ac: ацетил

Ado (также называемый OEG): 8-амино-3,6-диоксаоктановая кислота

Aib: α -аминоизомасляная кислота

15 API: активный фармацевтический ингредиент

API-ES: ионизация при атмосферном давлении – электрораспыление

ВНК: почка новорожденного хомяка

Woc: *трет*-бутилоксикарбонил

BW: вес тела

20 Cl-NOBt: 6-хлор-1-гидроксибензотриазол

DCM: дихлорметан

DIC: диизопропилкарбодиимид

DIPEA: *N,N*-диизопропилэтиламин

DMEM: среда Игла, модифицированная Дульбекко

DPBS: фосфатно-буферный солевой раствор Дульбекко

EDTA: этилендиаминтетрауксусная кислота

ELISA: твердофазный иммуноферментный анализ

5 экв.: молярный эквивалент

FBS: фетальная бычья сыворотка

Fmoc: 9-флуоренилметилоксикарбонил

GcgR: рецептор глюкагона

GIP: глюкозозависимый инсулинотропный полипептид

10 GIPR: рецептор глюкозозависимого инсулинотропного полипептида

GLP-1: глюкагоноподобный пептид-1

GLP-1R: рецептор глюкагоноподобного пептида-1

ч: часы

HEPES: 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

15 HFIP: 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол или гексафторизопропанол

hGcgR: рецептор глюкагона человека

hGIPR: рецептор глюкозозависимого инсулинотропного полипептида человека

hGLP-1R: рецептор глюкагоноподобного пептида 1 человека

HPLC: высокоэффективная жидкостная хроматография

20 HSA: сывороточный альбумин человека

iAUC: площадь под кривой за вычетом исходного уровня

В/бр: внутрибрюшинно

IPGTT: внутрибрюшинный тест на толерантность к глюкозе

В/в: внутривенно

LCMS: жидкостная хроматография с масс-спектрометрией

5 MeCN: ацетонитрил

mGIPR: рецептор глюкозозависимого инсулинотропного полипептида мыши

mGLP-1R: рецептор глюкагоноподобного пептида 1 мыши

mM: миллимолярный

ммоль: миллимоли

10 мин: минуты

Mtt: 4-метилтрифил

MW: молекулярная масса

NMP: 1-метилпирролидин-2-он

OEG: 8-амино-3,6-диоксооктановая кислота (также называемая Ado)

15 OtBu: сложный *трет*-бутиловый эфир

Охума Pure®: сложный этиловый эфир цианогидроксииминоуксусной кислоты

Pbf: 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил

PBS: фосфатно-буферный солевой раствор

PK: фармакокинетика

20 пМ: пикомолярный

RP: обращенная фаза

об/мин: обороты в минуту

Rt: время удерживания

П/к: подкожный

SEM: стандартная погрешность среднего

5 SPPS: твердофазный синтез пептидов

tBu: *трет*-бутил

TFA: трифторуксусная кислота

TIS: триизопропилсилан

Trt: трифенилметил или тритил

10 Tgx: транексамовая кислота

Общие способы получения

Способы твердофазного синтеза пептидов (способы SPPS, включая способы удаления защитной группы аминокислот, способы отщепления пептида от смолы и его очистки), а также способы выявления и определения характеристик полученного пептида (способы LCMS) описаны в данном документе ниже.

Смолы, используемые для получения C-концевых амидов пептида, представляли собой смолу H-Rink Amide-ChemMatrix (загрузка, например, 0,5 ммоль/г). Рекомендованным стандартом, если специально не указано иное, являются применяемые защищенные Fmoc-группой производные аминокислот: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-D-Tyr-(tBu)-OH и т. д., поставляемые, например, AAPPTEC, Anaspec, Bachem, ChemImpex, Iris Biotech, Midwest Biotech, Gyros Protein Technologies или Novabiochem. Если не указано иное, используются природные L-формы аминокислот. Если N-концевая аминокислота не ацетилирована, N-концевую

аминокислоту защищали Вос-группой по альфа-аминогруппе, либо с помощью реагента с предварительно установленной Вос-группой (например, Вос-Тур (tBu)-ОН для пептидов с Тур на N-конце) или путем замены N-концевой защитной Fmoc-группы на защитную Вос-группу после установки аминокислоты на N-конце пептида.

- 5 В случае присоединения модульного альбуминсвязывающего фрагмента с использованием SPPS, использовали следующие подходящим образом защищенные структурные блоки, такие как без ограничения Fmoc-8-амино-3,6-диоксооктановая кислота (Fmoc-Ado-ОН), Fmoc-транексамовая кислота (Fmoc-Trx-ОН), Вос-Lys(Fmoc)-ОН, Fmoc-Glu-OtBu, моно-*трет*-бутиловый эфир октадекандикарбоновой кислоты, моно-*трет*-бутиловый эфир нонадекандикарбоновой кислоты, моно-*трет*-бутиловый эфир эйкозандикарбоновой кислоты, моно-*трет*-бутиловый эфир тетрадекандикарбоновой кислоты или *трет*-бутиловый эфир 4-(9-карбоксихинонилокси)бензойной кислоты. Все указанные ниже операции выполняли в масштабе синтеза 0,1–0,2 ммоль.

15 1. Синтез связанного со смолой защищенного пептидного остова

Способ: SPPS_A

- SPPS осуществляли с использованием химических реакций на основе Fmoc на установке для твердофазного синтеза пептидов Protein Technologies SymphonyX с использованием предоставленных изготовителем протоколов с некоторыми модификациями. Перемешивание осуществляли периодическим барботированием азотом. Постадийную сборку осуществляли с использованием следующих стадий: 1) обеспечение предварительного набухания смолы в DMF; 2) удаление защитной группы Fmoc посредством использования 20% (об./об.) пиперидина в DMF для двух обработок по 10 мин каждая; 3) промывание посредством DMF с удалением пиперидина; 4) осуществление реакции сочетания с Fmoc-аминокислотой путем добавления Fmoc-аминокислоты (12 экв.) и Охута Pure® (12 экв.), каждого реагента в виде 0,6 М раствора в DMF, с последующим добавлением DIC (12 экв.) в виде 1,2 М раствора в DMF, с последующим добавлением DMF со снижением конечной концентрации каждого компонента до 0,3 М, затем смешивание в течение 0,5–4 ч; 4) промывание посредством DMF с удалением избытка реагентов; 5) конечные промывания посредством DCM по окончании сборки. Некоторые аминокислоты, такие как без

ограничения аминокислоты, следующие за стерически затрудненной аминокислотой (например, Aib), подвергали реакции сочетания с увеличенным временем реакции (например, 4 ч) для обеспечения завершения реакции. Для пептидов, несущих ацетилирование при α -амине N-концевой аминокислоты, N-концевую группу Fmoc удаляли путем обработки с помощью 20% (об./об.) пиперидина в DMF, как описано выше для стадии 2. Затем пептидильную смолу удаляли из установки для синтеза и вручную обрабатывали с помощью смеси 10% (об./об.) уксусный ангидрид/10% (об./об.) DIPEA в DMF в течение 30—60 мин, затем промывали в помощью DMF и DCM.

10 *Способ: SPPS_B*

Защищенную пептидильную смолу синтезировали в соответствии со стратегией Fmoc на установке для твердофазного синтеза пептидов Applied Biosystems 431A с использованием стандартных протоколов для Fmoc, предоставленных производителем. Перемешивание осуществляли встряхиванием и периодическим барботированием азотом. Постадийную сборку выполняли с использованием следующих стадий: 1) активация Fmoc-аминокислоты путем растворения Fmoc-аминокислоты в виде твердого вещества (10 экв.) в Cl-NOBt (10 экв.) в виде 1 М раствора в NMP, затем добавление DIC (10 экв.) в виде 1 М раствора в NMP, затем смешивание с одновременным переходом к стадиям 2–3; 2) удаление защитной группы Fmoc посредством использования 20% (об./об.) пиперидина в NMP для одной обработки в течение 3 мин, затем второй обработки в течение 15 мин; 3) промывания посредством NMP с удалением пиперидина; 4) добавление раствора активированной Fmoc-аминокислоты к смоле, затем смешивание в течение 45–90 мин; 4) промывания посредством NMP с удалением избытка реагентов; 5) конечные промывания посредством DCM по завершении сборки. Стандартные защищенные производные аминокислот, перечисленные выше, поставлялись в предварительно взвешенных картриджах (например, от Midwest Biotech), а нестандартные производные взвешивали вручную. Некоторые аминокислоты, такие как без ограничения аминокислоты, следующие за стерически затрудненной аминокислотой (например, Aib), подвергали «двойной реакции сочетания» для обеспечения завершения реакции, то есть это означает, что после первой реакции сочетания (например, 45 мин) смолу сушат, добавляют дополнительное количество реагентов (Fmoc-аминокислота, DIC, Cl-NOBt), и вновь обеспечивают прохождение реакции в смеси (например, 45 мин). Для пептидов,

несущих ацетилирование при α -амине N-концевой аминокислоты, N-концевую группу Fmoc удаляли путем обработки с помощью 20% (об./об.) пиперидина в NMP, как описано выше для стадии 2. Затем пептидильную смолу удаляли из установки для синтеза и вручную обрабатывали с помощью смеси 10% (об./об.) уксусный ангидрид/10% (об./об.) пиридин в DMF в течение 30—60 мин, затем промывали в 5 помощью DMF и DCM.

2. Присоединение заместителя к защищенному пептидному остову, связанному со смолой

Способ: SC_A

10 Защитную группу Mtt с N-эпсилон-лизина удаляли путем промывания смолы посредством 30% HFIP в DCM в течение двух обработок по 45 мин каждая с последующим промыванием посредством DCM и DMF. Ацилирование проводили на установке для твердофазного пептидного синтеза Protein Technologies SymphonyX с использованием протоколов, описанных в способе SPPS_A, с использованием 15 постадийного добавления структурных блоков, таких как без ограничения Boc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-8-амино-3,6-диоксооктановая кислота, Fmoc-транексамовая кислота, Fmoc-Glu-OtBu, сложный моно-*трет*-бутиловый эфир октадекандикарбоновой кислоты и сложный моно-*трет*-бутиловый эфир эйкозандикарбоновой кислоты.

20 *Способ: SC_B*

Защитную группу Mtt с N-эпсилон-лизина удаляли путем промывания смолы посредством 30% HFIP в DCM в течение двух обработок по 45 мин каждая с последующим промыванием посредством DCM и DMF. Ацилирование проводили на 25 установке для твердофазного пептидного синтеза Applied Biosystems 431A с использованием протоколов, описанных в способе SPPS_B, с использованием постадийного добавления структурных блоков, таких как без ограничения Boc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-8-амино-3,6-диоксооктановая кислота, Fmoc-транексамовая кислота, Fmoc-Glu-OtBu, сложный моно-*трет*-бутиловый эфир октадекандикарбоновой кислоты и сложный моно-*трет*-бутиловый эфир 30 эйкозандикарбоновой кислоты.

3. Отщепление пептида, связанного со смолой, и очистка

Способ: CP_A

После завершения синтеза боковой цепи пептидильную смолу промывали посредством DCM и высушивали, затем обрабатывали смесью TFA/вода/TIS (95:2,5:2,5 об./об./об.) в течение примерно 2 ч с последующим осаждением посредством диэтилового эфира. Осадок промывали диэтиловым эфиром, растворяли в подходящем растворителе (например, вода/MeCN 2:1), и обеспечивали отстаивание до разрушения всех нестабильных аддуктов. Очистку выполняли посредством препаративной HPLC с обращенной фазой (бинарный градиентный модуль Waters 2545, УФ-детектор/видимой области спектра Waters 2489, отборник фракций Waters III) на колонке Phenomenex Luna C8(2) (размер частиц 10 мкм, размер пор 100 Å, линейные размеры 250 x 21,2 мм). Отделение примесей и элюирование продукта осуществляли с применением возрастающего градиента MeCN в воде, содержащей 0,1% TFA. Соответствующие фракции проверяли на идентичность и чистоту посредством аналитической LCMS. Фракции, содержащие чистый требуемый продукт, объединяли и лиофилизировали с получением TFA-соли пептида в виде белого твердого вещества.

4. Солевой обмен с TFA-соли на натриевую

Способ: SX_A

Лиофилизированный пептид, выделенный посредством способа CP_A, растворяли до 5–20 мг/мл в подходящем водном буфере (например, вода/MeCN 4:1, 0,2 М ацетат натрия) и при необходимости доводили до pH 7–8 с использованием 1 М NaOH с достижением полного растворения. Буферные растворы, содержащие пептид, подвергали солевому обмену с использованием картриджа Sep-Pak C18 (0,5–2 г). Картридж сначала уравнивали 4 объемами колонки изопропанола, затем 4 объемами колонки MeCN, затем 8 объемами колонки воды. Раствор пептида вводили в картридж, и элюат наносили повторно, чтобы гарантировать полное удержание пептида. Картридж промывали 4 объемами колонки воды, затем 10 объемами колонки буферного раствора (например, pH 7,5), содержащего, например, без ограничения NaHCO₃, NaOAc или Na₂HPO₄. Колонку промывали 4 объемами колонки воды и пептид элюировали 5–20 объемами колонки 50–80% MeCN в воде. Элюент,

содержащий пептид, лиофилизировали с получением натриевой соли пептида в виде белого твердого вещества, которую использовали как таковую.

Общие способы детекции и определения характеристик

Способы LCMS:

5 Способ: LCMS_A

LCMS_A выполняли на установке, состоящей из системы для HPLC Agilent 1260 Infinity series и Agilent Technologies 6120 Quadrupole MS. Элюенты: А: 0,05% TFA в воде; В: 0,05% TFA в смеси MeCN/вода 9:1.

- 10 Анализ выполняли при к. т. (температура колонки 37С) путем введения подходящего объема образца в колонку, которую элюировали градиентом А и В. Колонка: Phenomenex Kinetex C8, 2,6 мкм, 100 Å, 4,6 x 75 мм. Время прохождения градиента: линейно 10–80% В за 10 мин при скорости потока 1,0 мл/мин. Детекция: детектор на диодной матрице с установкой на 214 нм. Режим ионизации при MS: API-ES, положительная полярность. Диапазон сканирования массы при MS: 500–2000 а. е. м.
- 15 Приведен наиболее распространенный изотоп для каждого значения *масса/заряд*.

Способ: LCMS_B

LCMS_B выполняли на установке, состоящей из системы для HPLC Agilent 1260 Infinity series и Agilent Technologies 6120 Quadrupole MS. Элюенты: А: 0,05% TFA в воде; В: 0,05% TFA в смеси MeCN/вода 9:1.

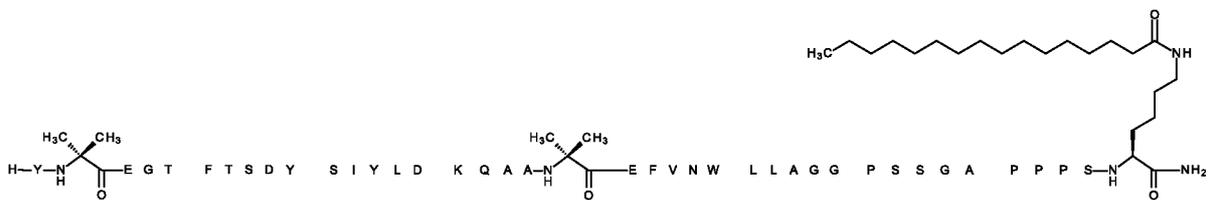
- 20 Анализ выполняли при к. т. (температура колонки 37С) путем введения подходящего объема образца в колонку, которую элюировали градиентом А и В. Колонка: Phenomenex Kinetex C8, 2,6 мкм, 100 Å, 4,6 x 75 мм. Время прохождения градиента: линейно 20–100% В за 10 мин при скорости потока 1,0 мл/мин. Детекция: детектор на диодной матрице с установкой на 214 нм. Режим ионизации при MS: API-ES, положительная полярность. Диапазон сканирования массы при MS: 500–2000 а. е. м.
- 25 Приведен наиболее распространенный изотоп для каждого значения *масса/заряд*.

Пример 1. Синтез соединений

Соединения далее описаны с применением однобуквенных кодов аминокислот за исключением Aib. Заместитель включен после лизинового (K) остатка, к которому он присоединен.

5 Соединение № 1

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-K[гексадеcanoил]-NH₂



SEQ ID NO: 1 с заместителем в положении K40 и амидной модификацией C-конца.

10 Заместитель: монокарбоновая C16-кислота, также известная как гексадеcanoил

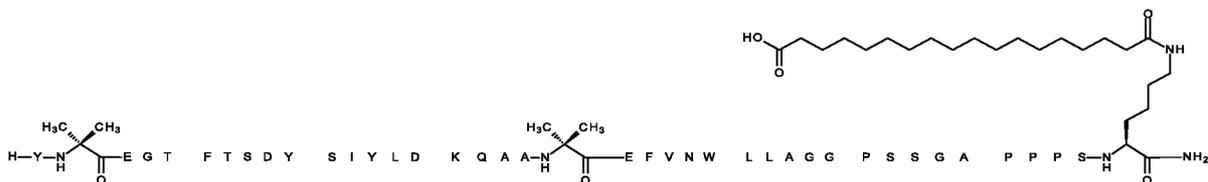
Способы синтеза: SPPS_B; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4473,0 Да

LCMS_B: Rt = 7,1 мин.; обнаруженное значение [M+3H]³⁺ 1491,7, [M+4H]⁴⁺ 1119,1

Соединение № 2

15 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-K[17-карбоксихептадеcanoил]-NH₂



SEQ ID NO: 1 с заместителем в положении K40 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота, также известная как 17-карбоксихептадеcanoил

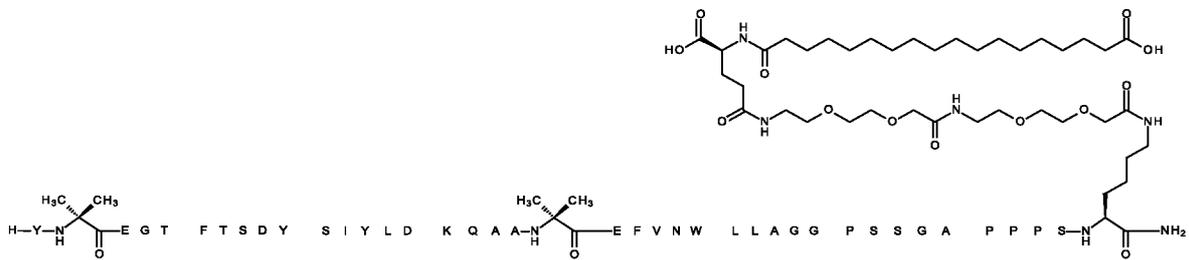
20 Способы синтеза: SPPS_A; SC_A; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4531,1 Да

LCMS_B: Rt = 6,5 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1511,0, $[M+4H]^{4+}$ 1133,6

Соединение № 3

- 5 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-
 [[(4S)-4-карбокси-4-(17-
 карбоксигептадеканоиламино)бутаноил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]-NH₂



SEQ ID NO: 1 с заместителем в положении K40 и амидной модификацией C-конца

- 10 Заместитель: двухосновная C18кислота-γGlu-Ado-Ado (A)

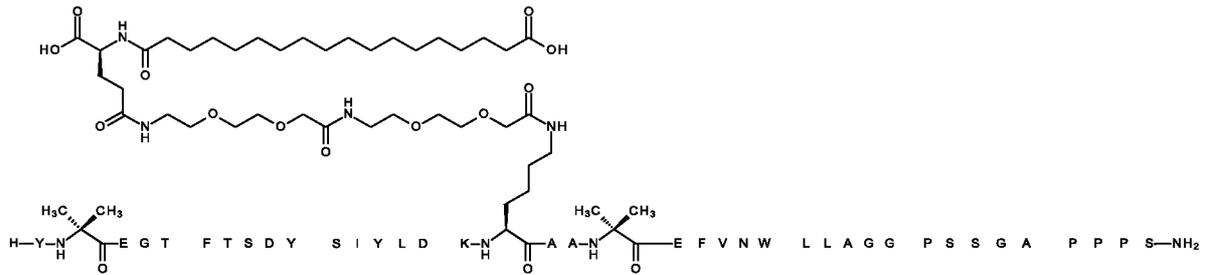
Способы синтеза: SPPS_A; SC_A; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4950,5 Да

LCMS_B: Rt = 6,1 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1651,0, $[M+4H]^{4+}$ 1238,3

Соединение № 4

- 15 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDK-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-карбокси-4-(17-
 карбоксигептадеканоиламино)бутаноил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]-QAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 2 с заместителем в положении K17 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu-Ado-Ado (A)

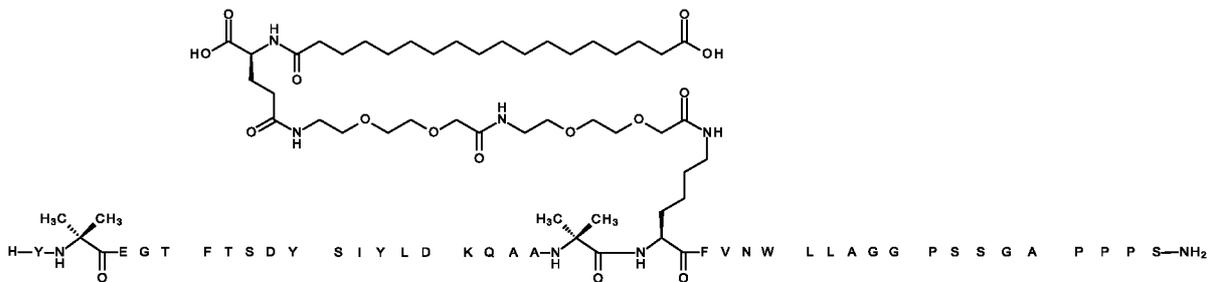
5 Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4822,4 Да

LCMS_B: Rt = 6,1 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1608,3, $[M+4H]^{4+}$ 1206,5

Соединение № 5

10 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S)-4-карбокси-4-(17-карбоксигептадеканоиламино)бутаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]ацетил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 3 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией С-конца.

15 Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu-Ado-Ado (A)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4821,4 Да

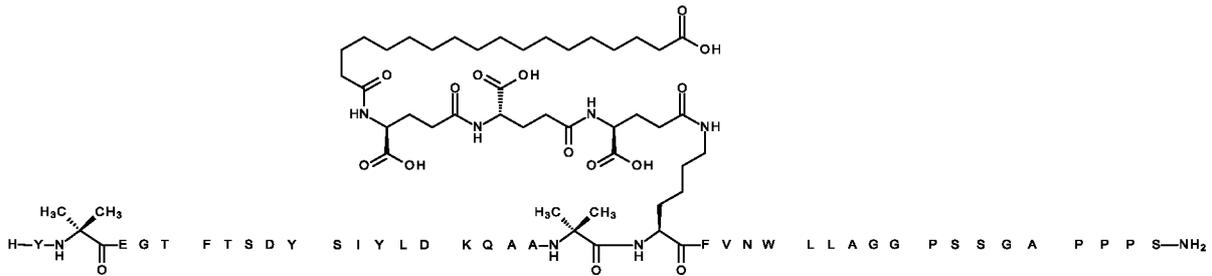
LCMS_B: Rt = 6,0 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1607,9, $[M+4H]^{4+}$ 1206,1

Соединение № 6

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[(4S)-4-карбокситетрадекананоило(17-

карбокситетрадекананоило)бутаноил]амино]бутаноил]амино]бутаноил]-

5 FVNWLLAGG-PSSGAPPS-NH₂



SEQ ID NO: 3 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- γ Glu- γ Glu (G)

10 Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

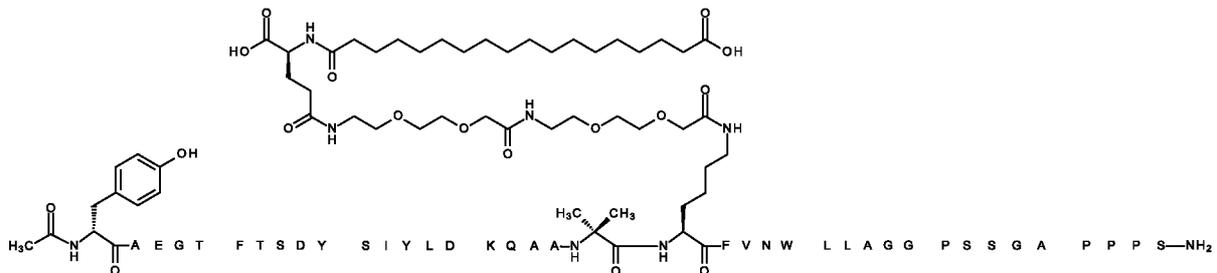
Расчетная молекулярная масса (средняя): 4789,3 Да

LCMS_A: Rt = 7,9 мин.; обнаруженное значение [M+3H]³⁺ 1597,1, [M+4H]⁴⁺ 1198,2

Соединение № 7

Ac-(D-Tyr)-AEGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[

15 карбокситетрадекананоило(17-карбокситетрадекананоило)бутаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]ацетил]-FVNWLLAGGPSSGAPPS-NH₂



SEQ ID NO: 4 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu-Ado-Ado (A)

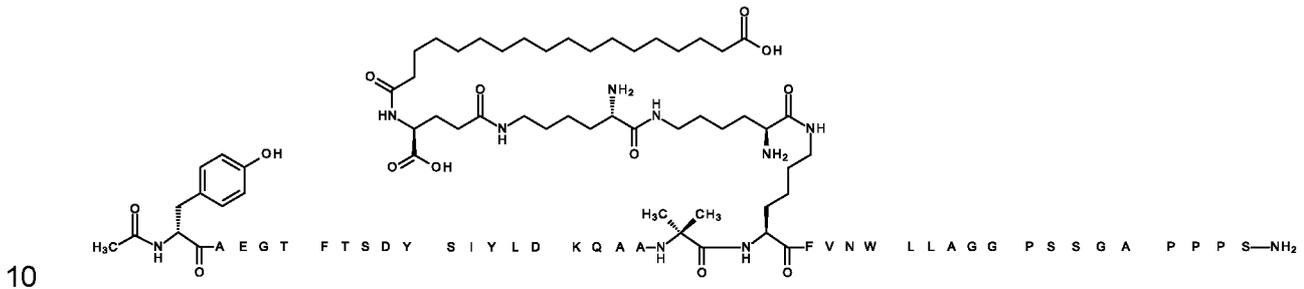
Способы синтеза: SPPS_A; SC_A; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4849,4 Да

LCMS_A: Rt = 8,3 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1617,1, $[M+4H]^{4+}$ 1213,1

5 Соединение № 8

Ac-(D-Tyr)-AEGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(17-карбоксихептадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 4 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

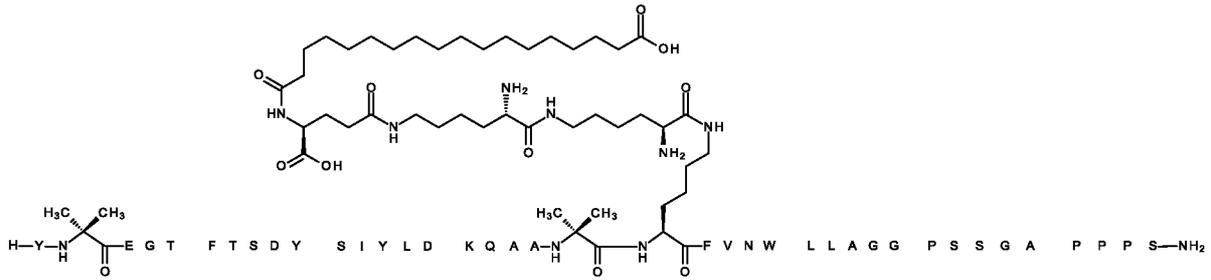
Расчетная молекулярная масса (средняя): 4815,4 Да

15 LCMS_A: Rt = 7,9 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1605,9, $[M+4H]^{4+}$ 1204,6

Соединение № 9

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(17-карбоксихептадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂

20



SEQ ID NO: 3 с заместителем в положении К21 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

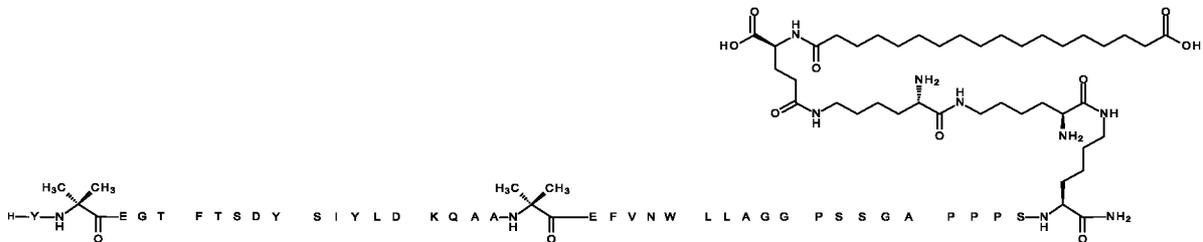
5 Расчетная молекулярная масса (средняя): 4787,4 Да

LCMS_A: Rt = 7,7 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1596,5, $[M+4H]^{4+}$ 1197,6

Соединение № 10

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-K[(2S)-2-амино-6-
[[[2S)-2-амино-6-[[[4S)-4-карбокси-4-(17-

10 карбоксигептадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-NH₂



SEQ ID NO: 1 с заместителем в положении К40 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

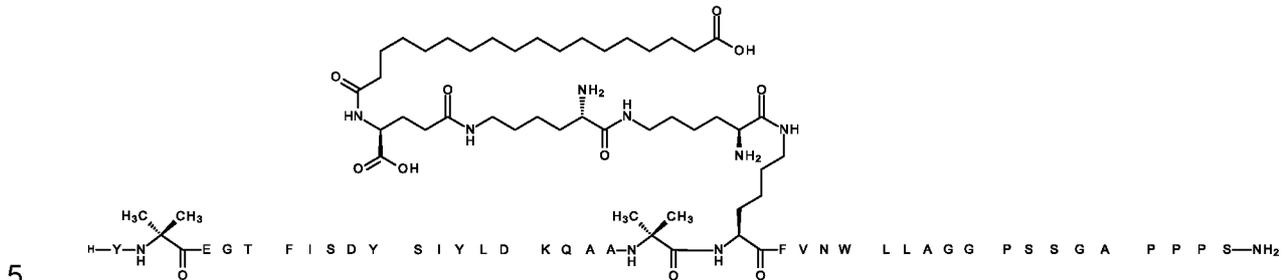
Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

15 Расчетная молекулярная масса (средняя): 4916,5 Да

LCMS_A: Rt = 7,7 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1639,5, $[M+4H]^{4+}$ 1229,9

Соединение № 11

Y-Aib-EGTFISDYSIYLDKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокситетрадеcanoиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 5 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

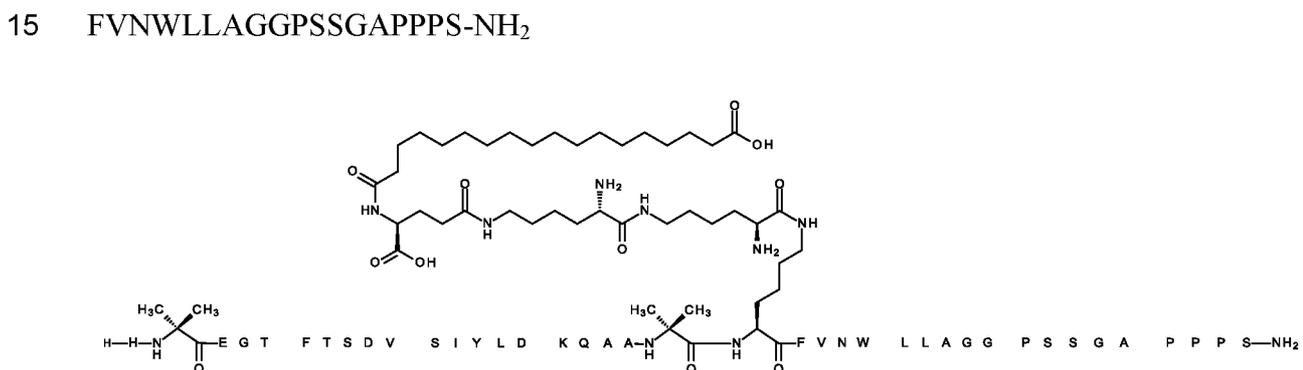
Способы синтеза: SPPS_B; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4799,5 Да

10 LCMS_A: Rt = 8,0 мин.; обнаруженное значение [M+3H]³⁺ 1600,5, [M+4H]⁴⁺ 1200,8

Соединение № 12

H-Aib-EGTFTSDVSIYLDKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокситетрадеcanoиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 6 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

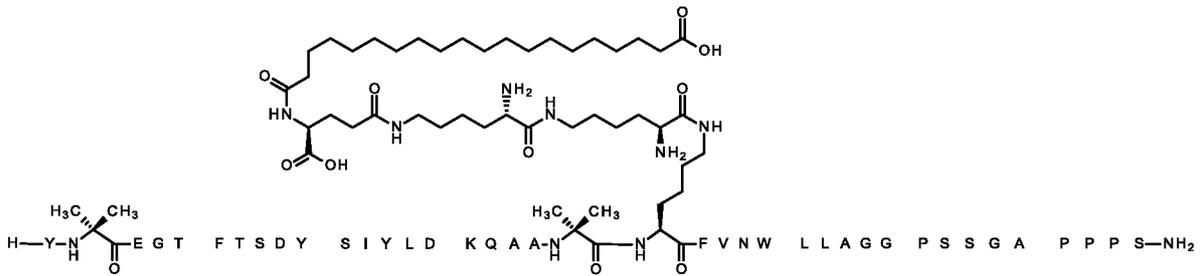
Способы синтеза: SPPS_B; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4697,3 Да

LCMS_A: Rt = 7,5 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1566,6, $[M+4H]^{4+}$ 1175,2

Соединение № 13

- 5 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(19-карбоксихекодеcanoиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 3 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-γGlu-εLys-εLys (D)

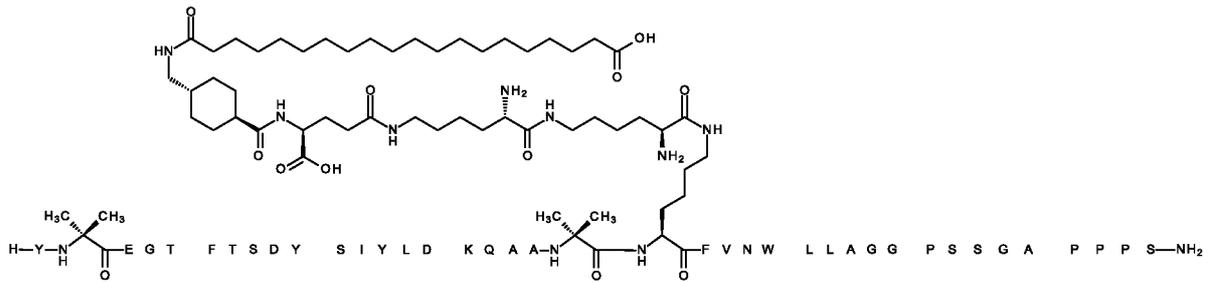
Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4815,5 Да

- 15 LCMS_A: Rt = 8,0 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1605,8, $[M+4H]^{4+}$ 1204,7

Соединение № 14

- 20 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLDKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[4-(19-карбоксихекодеcanoиламино)метил]циклогексанкарбонил]амино]бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 3 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (F)

5 Способы синтеза: SPPS_B; SC_B; CP_A

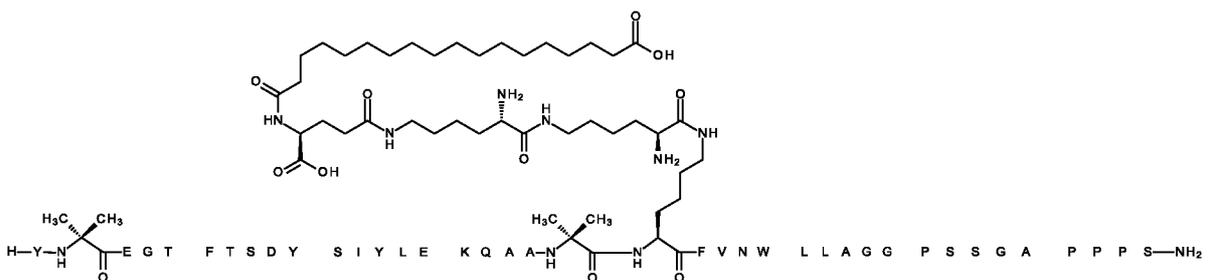
Расчетная молекулярная масса (средняя): 4954,7 Да

LCMS_A: Rt = 8,3 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1652,3, $[M+4H]^{4+}$ 1239,5

Соединение № 15

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(17-карбоксигептадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂

10

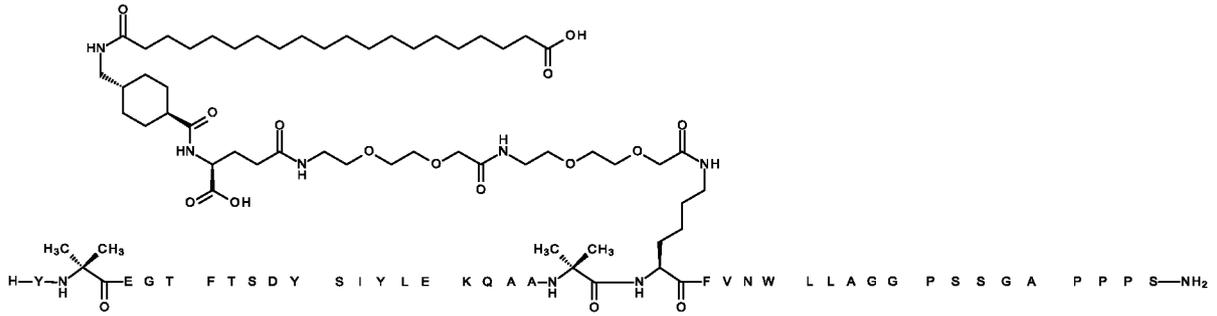


SEQ ID NO: 7 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией С-конца.

15 Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4801,5 Да



SEQ ID NO: 7 с заместителем в положении К21 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu-Ado-Ado (E)

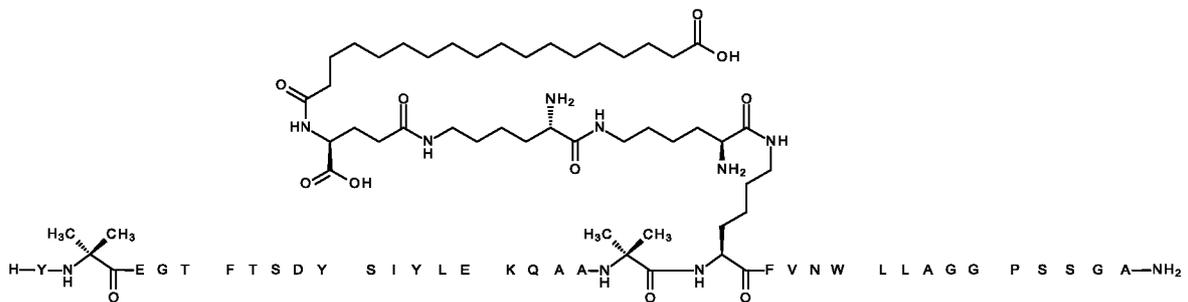
5 Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 5002,7 Да

LCMS_B: Rt = 6,5 мин.; обнаруженное значение [M+3H]³⁺ 1668,3, [M+4H]⁴⁺ 1251,5

Соединение № 18

10 Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEKQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(17-карбоксигептадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGA-NH₂



SEQ ID NO: 8 с заместителем в положении К21 и амидной модификацией С-конца.

15 Заместитель: двухосновная C18кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (B)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

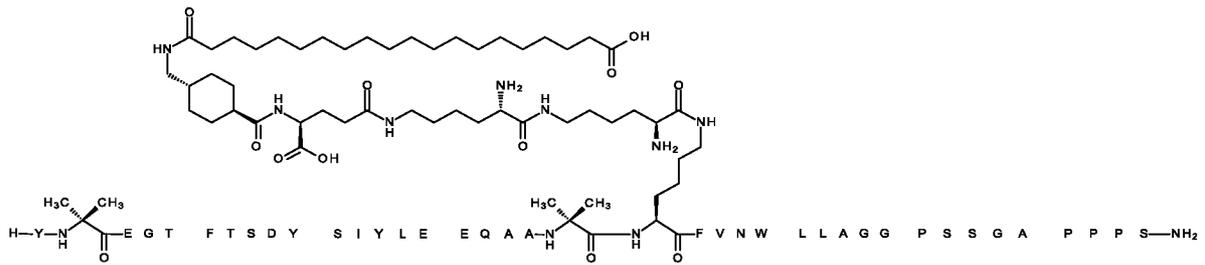
Расчетная молекулярная масса (средняя): 4423,0 Да

LCMS_A: Rt = 7,9 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1475,0, $[M+4H]^{4+}$ 1106,6

Соединение № 19

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEEQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[4-[(19-

5 карбоксинонадеканоиламино)метил]циклогексанкарбонил]амино]бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 9 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx-γGlu-εLys-εLys (F)

10 Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A; SX_A

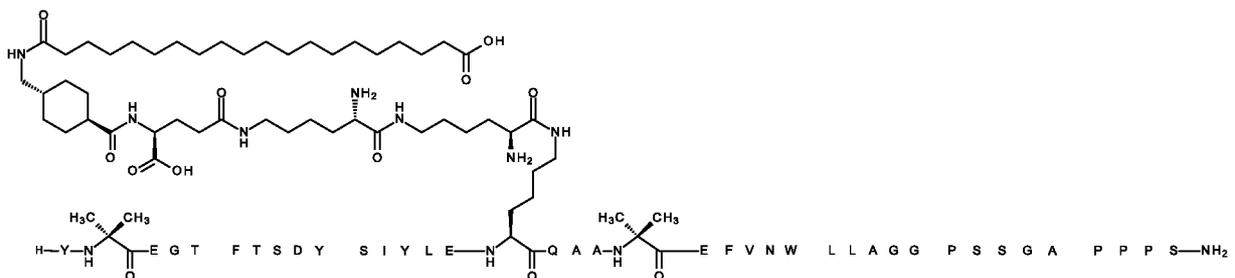
Расчетная молекулярная масса (средняя): 4969,6 Да

LCMS_B: Rt = 6,8 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1657,3, $[M+4H]^{4+}$ 1243,0

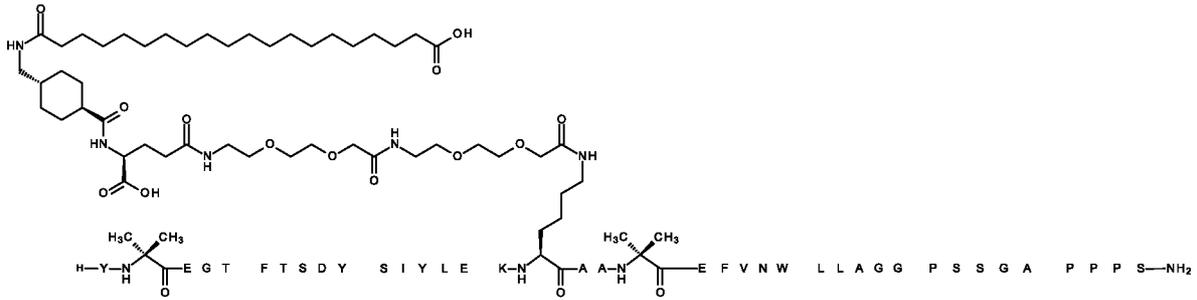
Соединение № 20

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[4-[(19-

15 [[(19-карбоксинонадеканоиламино)метил]циклогексанкарбонил]амино]бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-QAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 10 с заместителем в положении K16 и амидной модификацией C-конца.



SEQ ID NO: 11 с заместителем в положении K17 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu-Ado-Ado (E)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A; SX_A

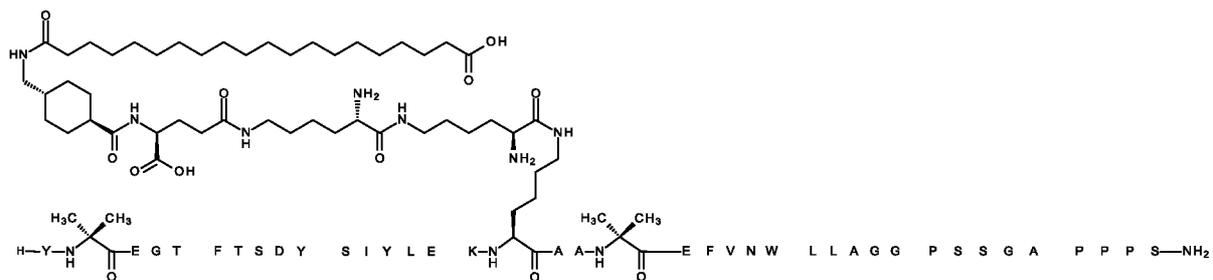
5 Расчетная молекулярная масса (средняя): 5003,7 Да

LCMS_B: Rt = 6,5 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1668,7, $[M+4H]^{4+}$ 1251,8

Соединение № 23

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEK-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[4-

10 карбоксихнонадеканоиламино)метил]циклогексанкарбонил]амино]бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-AA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 11 с заместителем в положении K17 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (F)

15 Способы синтеза: SPPS_A; SC_A; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4969,7 Да

LCMS_B: Rt = 6,2 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1657,3, $[M+4H]^{4+}$ 1243,3

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu-Ado-Ado (E)

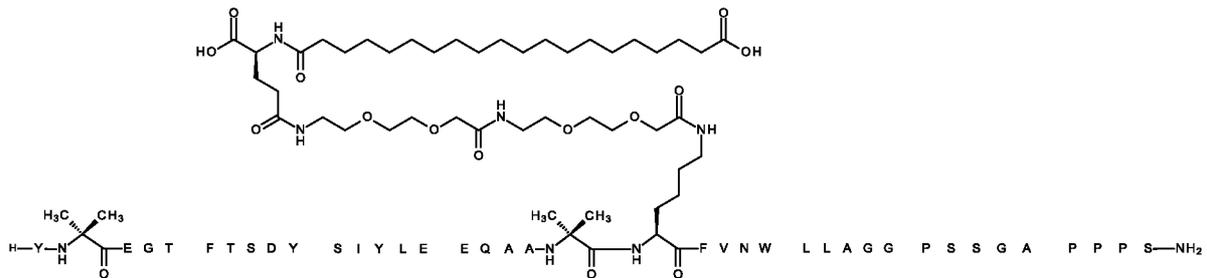
Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 5003,6 Да

LCMS_B: Rt = 7,0 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1668,6, $[M+4H]^{4+}$ 1251,7

5 Соединение № 26

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEEQAA-Aib-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-карбокси-4-(19-карбоксихонадеканоиламино)бутаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этоксид]ацетил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



10 SEQ ID NO: 9 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота- γ Glu-Ado-Ado (C)

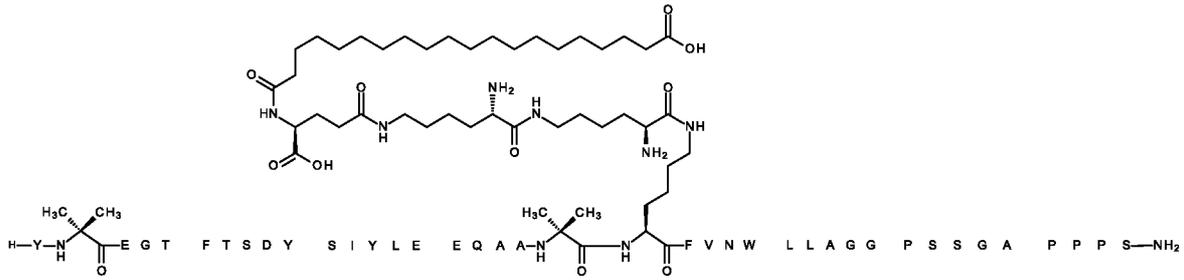
Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4864,4 Да

LCMS_B: Rt = 6,9 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1622,1, $[M+4H]^{4+}$ 1217,0

15 Соединение № 27

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEEQAA-Aib-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(19-карбоксихонадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-FVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 9 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (D)

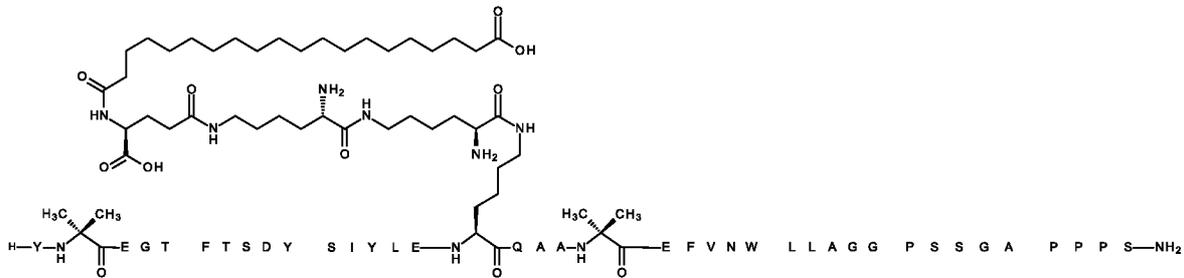
Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A; SX_A

5 Расчетная молекулярная масса (средняя): 4830,4 Да

LCMS_B: Rt = 6,7 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1611,0, $[M+4H]^{4+}$ 1206,4

Соединение № 28

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбоксо-4-(19-карбоксононадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-QAA-Aib-
10 EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 10 с заместителем в положении K16 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (D)

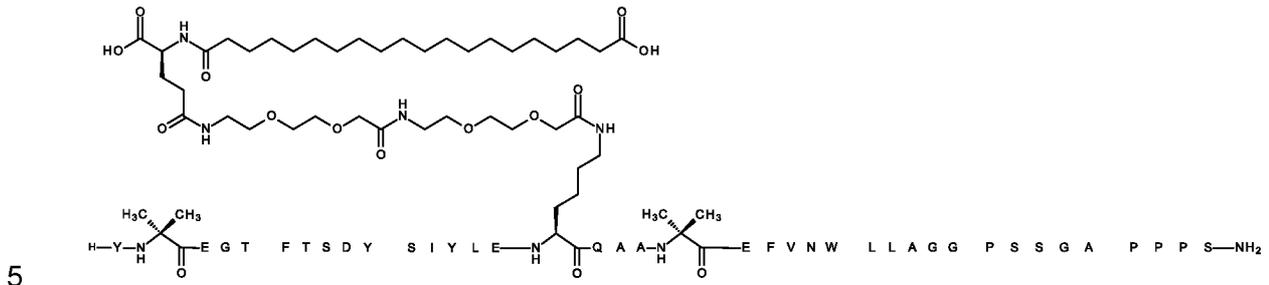
Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A; SX_A

15 Расчетная молекулярная масса (средняя): 4830,4 Да

LCMS_B: Rt = 6,2 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1610,5, $[M+4H]^{4+}$ 1208,6

Соединение № 29

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-карбокси-4-(19-карбоксихнадеканоиламино)бутаноил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]-QAA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 10 с заместителем в положении K16 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-γGlu-Ado-Ado (C)

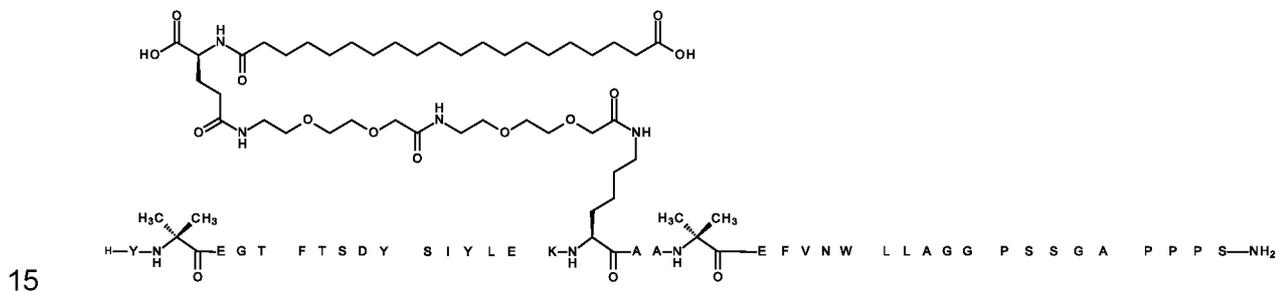
Способы синтеза: SPPS_A; SC_A; CP_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4864,4 Да

10 LCMS_B: Rt = 7,0 мин.; обнаруженное значение [M+3H]³⁺ 1622,3, [M+4H]⁴⁺ 1216,8

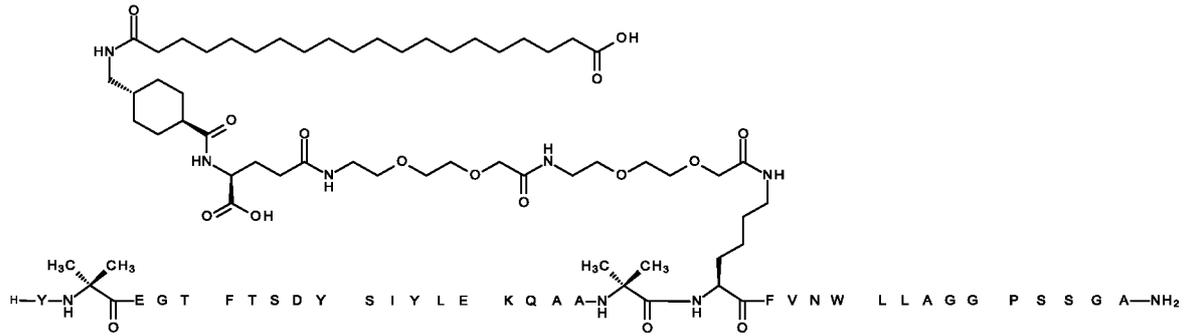
Соединение № 30

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEK-K[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-карбокси-4-(19-карбоксихнадеканоиламино)бутаноил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]амино]этоксид]этоксид]ацетил]-AA-Aib-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 11 с заместителем в положении K17 и амидной модификацией С-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-γGlu-Ado-Ado (C)



SEQ ID NO: 8 с заместителем в положении K21 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu-Ado-Ado (E)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

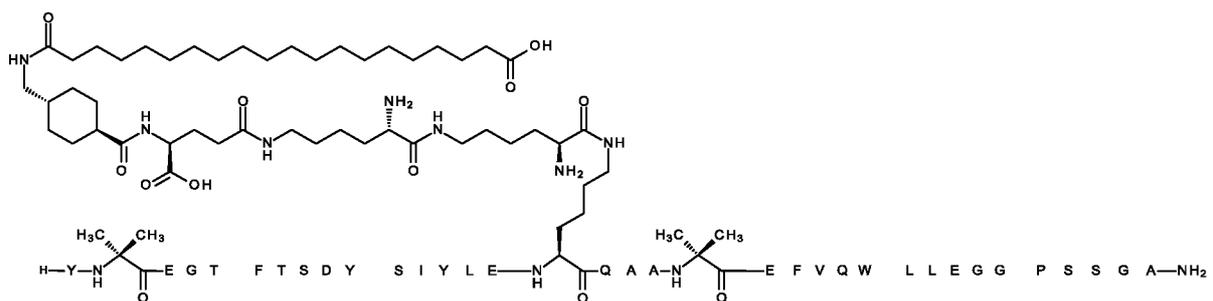
5 Расчетная молекулярная масса (средняя): 4624,2 Да

LCMS_B: Rt = 6,6 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1542,2, $[M+4H]^{4+}$ 1156,9

Соединение № 33

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLE-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[4-

10 карбоксинонадеканоиламино)метил]циклогексанкарбонил]амино]бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-QAA-Aib-EFVQWLLEGGPSSGA-NH₂



SEQ ID NO: 13 с заместителем в положении K16 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (F)

15 Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

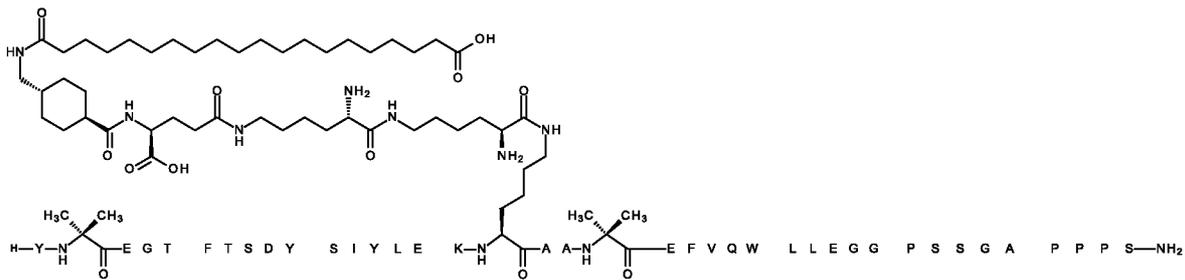
Расчетная молекулярная масса (средняя): 4663,3 Да

LCMS_B: Rt = 6,4 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1555,1, $[M+4H]^{4+}$ 1166,8

Соединение № 34

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEK-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-[[4-

- 5 карбоксинонадеканоиламино)метил]циклогексанкарбонил]амино]бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-AA-Aib-EFVQWLLEGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 14 с заместителем в положении K17 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота-Trx- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (F)

- 10 Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A

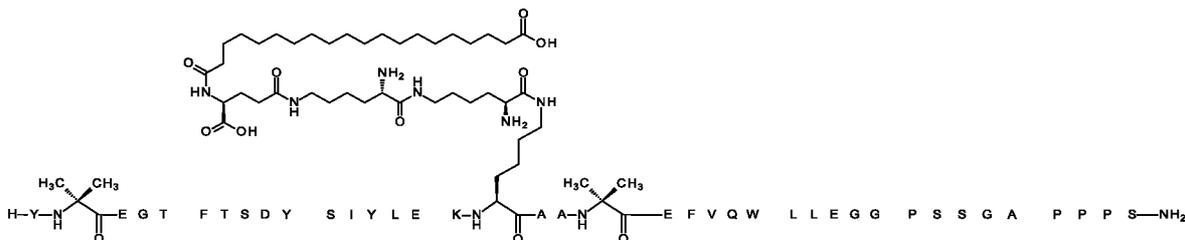
Расчетная молекулярная масса (средняя): 5041,7 Да

LCMS_B: Rt = 6,3 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1681,4, $[M+4H]^{4+}$ 1261,3

Соединение № 35

Y-Aib-EGTFTSDYSIYLEK-K[(2S)-2-амино-6-[[[(2S)-2-амино-6-[[[(4S)-4-карбокси-4-(19-

- 15 карбоксинонадеканоиламино)бутаноил]амино]гексаноил]амино]гексаноил]-AA-Aib-EFVQWLLEGGPSSGAPPPS-NH₂



SEQ ID NO: 14 с заместителем в положении K17 и амидной модификацией C-конца.

Заместитель: двухосновная C20кислота- γ Glu- ϵ Lys- ϵ Lys (D)

Способы синтеза: SPPS_A; SC_B; CP_A; SX_A

Расчетная молекулярная масса (средняя): 4902,6 Да

LCMS_B: Rt = 6,2 мин.; обнаруженное значение $[M+3H]^{3+}$ 1634,9, $[M+4H]^{4+}$ 1226,6

5 Пример 2. Функциональная эффективность *in vitro* (CRE-люцифераза; цельные клетки)

Целью этого примера является тестирование функциональной активности или эффективности соединений *in vitro* в отношении рецепторов GLP-1 и GIP человека и мыши, а также в отношении рецептора глюкагона человека. Функциональная эффективность *in vitro* является мерой активации рецептора-мишени в анализе с использованием цельных клеток. Значения эффективности производных из примера 1 определяли так, как это описано ниже. GLP-1(7-37) человека (идентичный GLP-1(7-37) мыши), GIP человека, GIP мыши и глюкагон человека были включены в подходящие анализы для сравнения.

15

Принцип

Функциональную эффективность *in vitro* определяли путем измерения ответа рецептора-мишени в анализе с использованием репортерного гена в отдельных клеточных линиях. Анализ выполняли с использованием стабильно трансфицированных клеточных линий ВНК, которые экспрессируют один из следующих рецепторов: рецептор GLP-1 человека, рецептор GIP человека, рецептор GLP-1 мыши, рецептор GIP мыши или рецептор глюкагона человека; и при этом каждая клеточная линия содержит ДНК, кодирующую сAMP-чувствительный элемент (CRE), связанный с промотором и геном люциферазы светлячка (CRE-люцифераза). Активация соответствующего рецептора приводит к продуцированию сAMP, что в свою очередь приводит к экспрессии белка люциферазы. После завершения инкубации реакционной смеси добавляют субстрат люциферазы (люциферин), что приводит к ферментативному превращению люциферина в оксилуциферин и индуцирует

25

биолюминесценцию. Люминесценцию измеряют в качестве считываемого показателя в данном анализе.

Культивирование и получение клеток

5 Клеточные линии, используемые в этих анализах, представляли собой клетки ВНК, при этом линией родительских клеток является ВНКTS13. Клеточные линии происходили от клона, содержащего CRE-люциферазный элемент, и их получали путем дополнительной трансфекции с помощью соответствующего рецептора с получением соответствующей клеточной линии. Использовали следующие клеточные линии:

	Человек	Мышь
Анализ рецептора GLP-1	ВНК CRE-luc2P hGLP-1R	ВНК CRE-luc2P mGLP-1R
Анализ рецептора GIP	ВНК CRE-luc2P hGIPR	ВНК CRE-luc2P mGIPR
Анализ рецептора глюкогона	ВНК CRE-luc2P hGCGR	-

10 Клетки культивировали при 37°C с 5% CO₂ в среде для культивирования клеток. Их разделяли на аликвоты и хранили в жидком азоте. Клетки поддерживали в непрерывной культуре и высевали за день до каждого анализа.

Материалы

15 В анализе использовали следующие химические вещества: Pluronic F-68 10% (Gibco 2404), сывороточный альбумин человека (HSA; Sigma A9511), 10% фетальная бычья сыворотка (FBS; Invitrogen 16140-071), овальбумин белка куриного яйца (Sigma A5503), DMEM без фенолового красного (Gibco 21063-029), DMEM (Gibco 12430-054), 1 M Hepes (Gibco 15630), Glutamax 100x (Gibco 35050), G418 (Invitrogen 10131-027), гигромицин (Invitrogen 10687-010) и Steadylite plus (PerkinElmer 6016757).

20 Буферы

Среда для культивирования клеток для GLP-1R и GcgR состояла из среды DMEM с 10% FBS, 500 мкг/мл G418 и 300 мкг/мл гигромицина. Среда для культивирования клеток для GIPR состояла из среды DMEM с 10% FBS, 400 мкг/мл G418 и 300 мкг/мл гигромицина. Аналитический буфер состоял из DMEM без

фенолового красного, 10 мМ Hepes, 1x GlutaMax, 1% овалбумина и 0,1% Pluronic F-68 с добавлением HSA в двойной концентрации от конечной концентрации для анализа. Аналитический буфер смешивали 1:1 с равным объемом тестируемого соединения в аналитическом буфере с получением конечной концентрации HSA для анализа.

5 Процедура

- 1) Клетки высевали при 5000 клеток/лунка и инкубировали в течение ночи в аналитическом планшете.
- 2) Клетки однократно промывали в DPBS.
- 3) Исходные растворы тестируемых соединений и референтных соединений в концентрациях в диапазоне 100–300 мкМ разбавляли в аналитическом буфере 1:150. Затем соединения разбавляли 1:10 в колонке 1 96-луночного планшета для разбавления с глубокими лунками, а затем переносили вдоль ряда для получения 12-точечной 3,5-кратной кривой разведения.
- 4) Аналитический буфер (аликвота 50 мкл) с добавлением HSA или без него вносили в каждую лунку в аналитическом планшете.
- 5) Аликвоту 50 мкл соединения или холостого контроля переносили из планшета для разведения в аналитический планшет, содержащий аналитический буфер с добавлением HSA или без него.
- 6) Аналитический планшет инкубировали в течение 3 ч в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C.
- 7) Клетки однократно промывали посредством DPBS.
- 8) Аликвоту 100 мкл DPBS добавляли в каждую лунку аналитического планшета.
- 9) Аликвоту 100 мкл реагента Steadylite plus (чувствительного к свету) добавляли в каждую лунку аналитического планшета.
- 10) Каждый аналитический планшет накрывали алюминиевой фольгой для защиты от света и встряхивали при 250 об/мин в течение 30 мин при комнатной температуре.

11) Реакцию в каждом аналитическом планшете считывали на ридере для титрационных микропланшетов.

Расчеты и результаты

5 Сначала в Excel выполняли регрессионный анализ данных, полученных посредством ридера для титрационных микропланшетов, для расчета логарифмической шкалы концентраций для оси x на основе отдельных исходных концентраций тестируемых соединений и разведений в анализе. Затем эти данные переносили в программное обеспечение GraphPad Prism для построения графика и статистического анализа. Программное обеспечение выполняет анализ методом нелинейной регрессии (зависимость ответа от $\log(\text{концентрация агониста})$). Значения EC_{50} , которые рассчитывали с помощью программного обеспечения и выражали в пМ, показаны в таблицах 1 и 2 ниже. Для каждого образца измеряли не менее двух повторностей. Зарегистрированные значения представляют собой средние значения для повторностей.

15 Таблица 1. Функциональная эффективность в отношении GLP-1R и GIPR человека в присутствии 0% и 1% HSA

№ соединения	hGLP-1R, CRE-Luc, 0% HSA EC_{50} (пМ)	hGLP-1R, CRE-Luc, 1% HSA EC_{50} (пМ)	hGIPR, CRE-Luc, 0% HSA EC_{50} (пМ)	hGIPR, CRE-Luc, 1% HSA EC_{50} (пМ)
hGLP-1(7-37)	3,8	2,5	н. о.	н. о.
hGIP	н. о.	н. о.	8,5	3,8
1.	2,8	6,5	4,6	5,8
2.	67,5	438,5	27,8	550,2
3.	13,4	606,0	19,2	513,8
4.	10,6	231,5	27,3	217,3
5.	9,2	161,1	11,3	212,1
6.	5,9	244,1	8,1	101,2
7.	55,7	1730,0	3,3	49,3
8.	29,9	699,0	4,7	34,1
9.	6,7	109,7	11,6	134,7
10.	18,2	297,9	22,1	286,9
11.	393,8	н. о.	4,1	н. о.

12.	2,9	н. о.	>10000	н. о.
13.	12,4	103,4	14,1	71,4
14.	11,4	377,3	15,8	98,1
15.	6,1	127,7	3,8	73,6
16.	6,1	201,6	4,5	141,4
17.	4,1	229,2	3,2	223,2
18.	3,3	89,9	3,3	85,3
19.	4,6	297,1	4,8	236,9
20.	3,3	260,6	2,3	125,8
21.	3,0	465,3	2,3	182,0
22.	3,3	1134,1	3,9	626,9
23.	4,0	177,9	3,4	175,1
24.	4,7	114,3	4,7	132,5
25.	4,8	602,1	4,5	358,2
26.	4,7	369,7	5,8	420,3
27.	3,3	195,5	5,7	328,9
28.	5,0	356,3	2,9	139,4
29.	6,2	429,3	2,8	231,7
30.	8,4	352,8	8,8	315,2
31.	1,9	54,3	2,7	90,3
32.	11,7	221,1	5,0	168,8
33.	5,9	741,4	5,1	358,5
34.	3,2	379,1	3,1	180,8
35.	2,2	168,9	3,7	155,4

н. о.= не определяли

Таблица 2. Функциональная эффективность в отношении GLP-1R и GIPR мыши в отсутствие белков плазмы крови

Соединение	mGLP-1R, CRE Luc EC ₅₀ (нМ)	mGIPR, CRE Luc EC ₅₀ (нМ)
mGLP-1(7-37)	3,5	н. о.

mGIP	н. о.	35,4
1.	2,0	8,0
2.	н. о.	н. о.
3.	н. о.	н. о.
4.	3,9	1552,0
5.	2,5	522,6
6.	2,3	1267,5
7.	17,4	42,5
8.	17,0	23,3
9.	2,5	68,0
10.	2,1	258,6
11.	280,8	13,7
12.	2,2	>10000,0
13.	5,4	57,0
14.	6,0	18,6
15.	1,7	27,3
16.	3,5	16,9
17.	2,3	21,9
18.	2,0	24,3
19.	5,5	133,5
20.	2,6	12,0
21.	2,6	36,6
22.	2,1	123,6
23.	3,7	17,5
24.	9,9	40,5
25.	2,9	339,7
26.	2,8	776,5
27.	4,2	544,6
28.	2,3	26,0
29.	1,8	51,0
30.	1,9	201,2
31.	1,3	13,4
32.	2,5	80,2

33.	4,0	31,1
34.	1,8	19,5
35.	1,3	21,3

н. о.= не определяли

Соединения по настоящему изобретению демонстрируют эффективную функциональную активацию рецепторов GLP-1R человека, GIPR человека, GLP-1R мыши и GIP мыши в заданных условиях. Изменения, которые позволяют сохранять эффективность между мышеспецифическими и человекоспецифическими рецепторами, обеспечивают большую уверенность перенесения результатов, полученных для мыши, на человека *in vivo*. Кроме того, соединения демонстрируют функциональную активацию рецептора глюкагона человека на уровне от минимального до неизмеряемого, как показано в таблице 3 ниже.

10

Таблица 3. Значения эффективности в отношении рецептора глюкагона человека в отсутствие белков плазмы крови

Соединение	hGcgR, CRE Luc EC ₅₀ (нМ)
hГлюкагон	17,0
1	2855,5
9	>10000,0
13	>10000,0
14	>10000,0
16	>10000,0
17	>10000,0
19	>10000,0
20	>10000,0
21	>10000,0
22	>10000,0
23	>10000,0
24	>10000,0

28	>10000,0
29	>10000,0
31	9601,0

Соединения по настоящему изобретению демонстрируют функциональную активацию рецептора глюкагона человека на уровне от минимального до неизмеряемого, таким образом обеспечивая селективные коагонисты GLP-1R и GIPR.

5 Пример 3. Фармакокинетическое исследование на карликовых свиньях

Цель данного примера состоит в определении периода полувыведения *in vivo* производных по настоящему изобретению после в/в введения карликовым свиньям, т. е. продления времени их нахождения в организме и, тем самым, времени их действия. Это выполняли в фармакокинетическом (ПК) исследовании, в котором определяют конечный период полувыведения исследуемого производного. Под конечным периодом полувыведения, как правило, подразумевается период времени, который требуется для уменьшения вдвое определенной концентрации в плазме крови, измеренной после фазы начального распределения.

Исследование

15 В исследованиях использовали самок геттингенских карликовых свиной, полученных от Ellegaard Göttingen Minipigs (Дальмосе, Дания), возрастом примерно 7–14 месяцев и весом примерно 16–35 кг. Карликовых свиной содержали индивидуально и кормили строго один раз в день рационом для карликовых свиной SDS (Special Diets Services, Эссекс, Великобритания).

20 Через 3 недели акклиматизации каждому животному имплантировали два постоянных центральных венозных катетера в хвостовую полую вену. Животным обеспечивали возможность восстановиться в течение 1 недели после хирургического вмешательства, а затем их использовали для многократных фармакокинетических исследований с подходящим периодом отмывки между последовательными введениями доз
25 производных.

Животных не кормили в течение приблизительно 18 часов перед введением доз и от 0 до 4 часов после введения доз, но в течение всего периода они имели доступ к воде *ad libitum*.

5 Натриевые соли соединений из примеров 1 растворяли до концентрации 20–40 нмоль/мл в буфере, содержащем 0,025% полисорбата 20, 10 мМ фосфата натрия, 250 мМ глицерина, рН 7,4. Внутривенные введения (объем, обычно соответствующий 1,5–2 нмоль/кг, например, 0,1 мл/кг) соединений осуществляли через один катетер, и кровь отбирали в заранее определенные моменты времени в течение 14 дней включительно после введения доз (предпочтительно через другой катетер). Образцы 10 крови (например, 0,8 мл) отбирали в 8 мМ буфер EDTA, а затем центрифугировали при 4°C и 1942 g в течение 10 минут.

Отбор образцов и анализ

15 Плазму крови отбирали пипеткой в пробирки Micronic на сухом льду и хранили при -20°C до анализа в отношении концентрации соединений в плазме крови с применением ELISA или аналогичного анализа на основе антител или LCMS. Индивидуальные профили зависимости концентрации в плазме крови от времени анализировали с помощью некомпартментной модели в Phoenix WinNonLin версии 6.4. (Pharsight Inc., Маунтин-Вью, Калифорния, США), и определяли полученные в результате конечные периоды полувыведения (среднее гармоническое).

20 Результаты

Таблица 4. Конечный период полувыведения, измеренный после в/в введения карликовым свиньям

№ соединения	$t_{1/2}$ (ч)
19	112
20	88
21	62
22	95
27	88
28	111
35	90

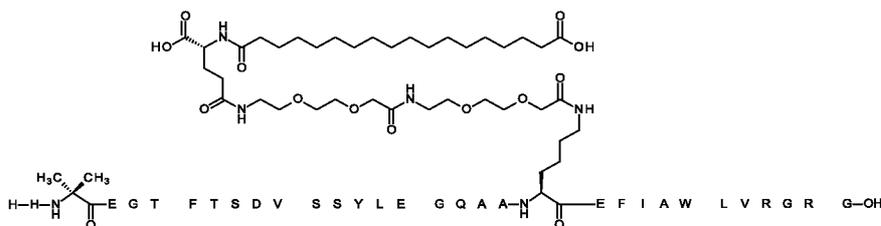
Протестированные соединения по настоящему изобретению характеризуются очень длительными значениями периода полувыведения по сравнению со значениями периода полувыведения hGLP-1 и hGIP, которые при измерении у человека составляют примерно 2–4 мин и 5–7 мин соответственно (Meier et al., Diabetes, 2004, 53(3): 654-662). На основе измеренных значений периода полувыведения в организмах карликовых свиней прогнозируют значения периода полувыведения у людей, достаточные для введения по меньшей мере раз в неделю при инъекционном введении жидкости.

10 Пример 4. Фармакодинамические исследования на мышах с алиментарным ожирением (DIO)

Целью данного примера является оценка *in vivo* эффекта выбранных соединений в отношении фармакодинамических параметров у мышей с алиментарным ожирением (DIO). Животных обрабатывали один раз в день путем подкожного инъекционного введения жидкого состава тестируемого соединения с оцениванием эффектов в отношении веса тела, потребления пищи и толерантности к глюкозе. Для сравнения в качестве эталонов использовали известный коагонист GLP-1R/GIPR тирзепатид и суррогат агониста GLP-1R семаглутида. Суррогат семаглутида характеризуется аналогичными фармакологическими свойствами, что и семаглутид, но имеет слегка модифицированную структуру, в которой элемент γ Glu заместителя был изменен с L-изомера на D-изомер. Суррогат семаглутида и тирзепатид синтезировали с применением способов, известных из уровня техники, например, как описано в способах из примера 1 выше, в примере 4 в WO 2006/097537 или в примере 1 в WO 2016/111971.

25 Суррогат

семаглутида



Тирзепатид

смаглутида или коагонысты рецепторов GLP-1/GIP, описанные в данном документе, где среда-носитель представляла собой 50 мМ фосфата, 70 мМ хлорида натрия, 0,05% Tween-80, рН 7,4. Тестируемые соединения растворяли в среде-носителе до исходных концентраций 100 мкМ, затем разбавляли в 50–200 раз в среде-носителе с достижением 5 требуемых концентраций раствора для введения доз. Животным осуществляли введение подкожно один раз в день утром в течение каждого дня обработки раствором для введения доз в объеме 2–5 мкл на грамм веса тела при необходимости с получением требуемой дозы (например, 0,3 нмоль/кг, 1,0 нмоль/кг или 3,0 нмоль/кг).

Вес тела и потребление пищи

10 Вес тела (BW) и потребления пищи измеряли непосредственно перед введением доз каждый день. Изменение веса тела в процентах рассчитывали по отдельности для каждой мыши на основе исходного веса тела до первой инъекции.

IPGTT (внутрибрюшинный тест толерантности к глюкозе)

15 В день проведения теста толерантности к глюкозе животных не кормили в течение 4 часов. Пищу убирали, а животных переводили в свежие клетки. Животные имели доступ к воде, но не к пище. Измеряли уровни глюкозы в крови из хвостовой вены, и мышам вводили путем инъекции (t=0) внутрибрюшинную (i. p.) нагрузку глюкозой, составляющую 2 г/кг (200 мг/мл раствора глюкозы, объем дозы 10 мл/кг). Уровни глюкозы в крови из хвостовой вены измеряли в моменты времени 0, 15, 30, 60, 90, 120 20 минут после i. p. нагрузки глюкозой. Стратификация животных во время IPGTT была такой, что, например, двум мышам из группы 1 вводили дозу, а затем двум мышам из групп 2, 3, 4, до того, как обрабатывали следующих двух мышей из групп 1, 2, 3 и т. д. Это должно было обеспечить равное распределение по «времени суток» во всех группах.

25 Результаты

В одном исследовании мыши с DIO получали суточную дозу соединения 9 или суррогата семаглутида подкожно в дозе 0,3 нмоль/кг, 1,0 нмоль/кг или 3,0 нмоль/кг в течение 30 дней. Результаты показаны в таблице 5. Оба соединения демонстрировали дозозависимый ответ в отношении всего из потребления пищи, веса тела и 30 толерантности к глюкозе. Соединение 9 демонстрировало превосходящее суррогат

семаглутида действие по всем параметрам в дозах 1,0 нмоль/кг и 3,0 нмоль/кг, что указывает на важный эффект в таких исходах коагонизма.

Таблица 5. Эффекты в отношении потребления пищи, веса тела и толерантности к глюкозе у мышей с DIO, обработанных ежедневно соединением 9 или суррогатом

5 семаглутида в указанных дозах

№ соединения	Совокупное потребление пищи (грамм)	Абсолютный BW (грамм)		Изменение BW (%)	iAUC, IPGTT (мин*мг/дл)
	День 31	День 0	День 31	День 31	День 31
Средо-носитель	92,4 ± 12,1	66,5 ± 1,7	68,6 ± 2,9	3,8 ± 2,3	24928 ± 2309
0,3 нмоль/кг					
9	87,4 ± 5,9	66,5 ± 2,6	66,9 ± 3,2	3,4 ± 1,7	14979 ± 3423
Суррогат семаглутида	78,6 ± 3,9	66,8 ± 2,6	66,7 ± 2,2	0,1 ± 1,5	20761 ± 4931
1,0 нмоль/кг					
9	60,4 ± 4,5	70,0 ± 1,9	50,9 ± 2,2	-23,9 ± 2,6	7714 ± 1722
Суррогат семаглутида	66,5 ± 1,6	67,9 ± 2,9	56,6 ± 2,6	-16,8 ± 2,0	9535 ± 2855
3,0 нмоль/кг					
9	46,4 ± 6,6	65,8 ± 1,4	40,0 ± 2,4	-39,1 ± 3,8	4073 ± 1764
Суррогат семаглутида	66,1 ± 5,3	66,0 ± 2,0	49,7 ± 2,6	-24,8 ± 2,4	8167 ± 1824

Результаты выражены в виде среднего значения ± SEM, n = 2 (потребление пищи) или n = 4–8 (вес тела, IPGTT). iAUC = площадь под кривой за вычетом исходного уровня.

В другом исследовании мыши с DIO получали суточную дозу одного из восьми коагонистов рецепторов GLP-1/GIP подкожно при 3,0 нмоль/кг в течение 10 дней.

10 Наблюдали эффекты в отношении потребления пищи и веса тела. Все протестированные коагонисты продемонстрировали сильный эффект снижения потребления пищи и веса тела по сравнению со средой-носителем, как показано на фигуре 1 и в таблице 6 ниже. Такие результаты демонстрируют, что оптимизация

эффективности в отношении мышеспецифических рецепторов может приводить к улучшенной эффективности в данной доклинической модели.

Таблица 6. Эффекты в отношении потребления пищи и веса тела у мышей с DIO, обработанных ежедневно коагонистами рецепторов GLP-1/GIP при 3,0 нмоль/кг

№ соединения	Совокупное потребление пищи (грамм)	Абсолютный BW (грамм)		Изменение BW (%)
	День 10	День 0	День 10	День 10
Среданоситель	25,4 ± 0,9	63,2 ± 1,9	63,5 ± 2,0	0,3 ± 0,6
9	8,3 ± 1,0	63,8 ± 0,8	51,3 ± 0,9	-19,6 ± 0,7
17	6,9 ± 1,3	63,4 ± 2,1	48,7 ± 2,2	-23,2 ± 1,8
19	6,4 ± 1,1	63,7 ± 1,9	49,0 ± 2,4	-23,3 ± 2,2
20	5,9 ± 0,3	64,5 ± 1,4	48,9 ± 1,5	-24,3 ± 1,4
21	5,7 ± 0,5	61,9 ± 1,6	43,9 ± 1,5	-29,1 ± 1,3
22	6,4 ± 2,6	63,2 ± 1,7	49,0 ± 2,0	-22,6 ± 1,9
25	4,9 ± 1,8	63,0 ± 1,4	44,4 ± 1,2	-29,4 ± 1,7
34	6,7 ± 0,2	63,3 ± 1,8	47,9 ± 2,0	-24,4 ± 2,0

5 Результаты выражены в виде среднего значения ± SEM, n = 2 (потребление пищи) или n = 8 (вес тела).

Дополнительные исследования с применением соединений 19 и 20 продемонстрировали дозозависимый ответ в отношении всего из потребления пищи, веса тела и толерантности к глюкозе у мышей с DIO после ежедневного подкожного введения доз в течение 14 дней. Эффекты снижения потребления пищи и снижения веса тела при дозах 1,0 нмоль/кг и 3,0 нмоль/кг для обоих соединений превосходили таковые для тирзепатида в эквивалентных дозах, как показано в таблице 7 ниже. Такие результаты демонстрируют, что оптимизация эффективности в отношении мышеспецифических рецепторов может приводить к улучшенной эффективности в данной доклинической модели.

Таблица 7. Эффекты в отношении потребления пищи, веса тела и толерантности к глюкозе у мышей с DIO, обработанных ежедневно соединением 19, 20 или тирзепатидом в указанных дозах

№ соединения	Совокупное потребление пищи (грамм)	Абсолютный BW (грамм)		Изменение BW (%)	iAUC, IPGTT (мин*мг/дл)
	День 14	День 0	День 14	День 14	День 15
Среда-носитель	38,6 ± 0,3	63,2 ± 1,6	62,6 ± 1,6	-0,9 ± 0,2	21857 ± 3052
0,3 нмоль/кг					
19	27,0 ± 0,2	62,1 ± 2,0	54,7 ± 1,9	-11,9 ± 0,5	11041 ± 1835
20	28,6 ± 0,2	63,5 ± 1,4	57,3 ± 1,2	-9,8 ± 0,9	15599 ± 3145
Тирзепатид	32,3 ± 1,9	64,1 ± 1,7	58,2 ± 1,9	-9,4 ± 1,2	13005 ± 2962
1,0 нмоль/кг					
19	15,9 ± 0,7	62,6 ± 2,2	45,6 ± 2,4	-27,3 ± 2,3	10024 ± 1685
20	12,6 ± 1,5	63,7 ± 1,2	46,3 ± 1,5	-27,4 ± 1,5	12117 ± 1680
Тирзепатид	18,4 ± 0,7	63,5 ± 1,6	49,8 ± 1,8	-21,0 ± 1,2	10365 ± 3585
3,0 нмоль/кг					
19	8,6 ± 0,1	62,8 ± 1,8	39,2 ± 1,5	-37,8 ± 0,8	9288 ± 2363
20	8,4 ± 0,3	63,4 ± 2,0	38,9 ± 1,1	-38,6 ± 1,2	9191 ± 2262
Тирзепатид	16,4 ± 2,3	63,6 ± 2,5	45,1 ± 2,1	-29,0 ± 2,4	8974 ± 1804

Результаты выражены в виде среднего значения ± SEM, n = 2–3 (потребление пищи)

5 или n = 5–8 (вес тела, IPGTT).

Хотя определенные признаки настоящего изобретения были проиллюстрированы и описаны в данном документе, специалистам средней квалификации в данной области техники будут очевидны многие модификации, замены, изменения и эквиваленты. Следовательно, следует понимать, что прилагаемые варианты осуществления

10 предназначены для охвата всех таких модификаций и изменений, которые находятся в пределах фактической сущности настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, предусматривающее пептид и заместитель, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой



5 (SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-конца;

где

X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

10 X_{16} представляет собой E или K,

X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

15 X_{28} представляет собой A или E,

X_{32} представляет собой S или отсутствует,

X_{33} представляет собой S или отсутствует,

X_{34} представляет собой G или отсутствует,

X_{35} представляет собой A или отсутствует,

20 X_{36} представляет собой P или отсутствует,

X_{37} представляет собой P или отсутствует,

X_{38} представляет собой P или отсутствует,

X_{39} представляет собой S или отсутствует;

и где заместитель присоединен к пептиду посредством лизинового (K) остатка в положении 16, 17 или 21;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, где X_{36} , X_{37} , X_{38} и X_{39} отсутствуют.

5 3. Соединение по п. 1 или п. 2, где $X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ представляет собой SSGA.

4. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой

$YX_2EGTFTSDYSIYLX_{15}X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}FVX_{24}WLLX_{28}GGPSSGA$ (SEQ ID NO.: 16),

где

10 X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

X_{16} представляет собой E или K,

X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

15 X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

X_{28} представляет собой A или E.

5. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где $X_{16}X_{17}AAX_{20}X_{21}$ выбран из группы, состоящей из KQAAAibE, KKAABibE, KQAAAibK и EQAAAibK.

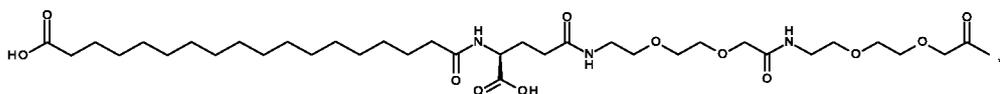
20 6. Соединение по п. 1, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

7. Соединение по п. 6, где пептид характеризуется амидной модификацией C-конца.

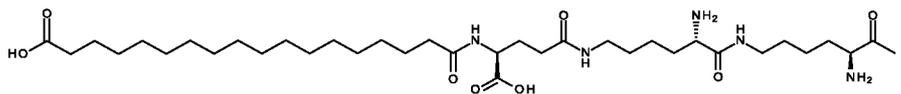
8. Соединение по любому из предыдущих пп. 1–7, где заместитель присоединен посредством 16Lys.

9. Соединение по любому из пп. 1–8, где заместитель выбран из группы, состоящей из

A:

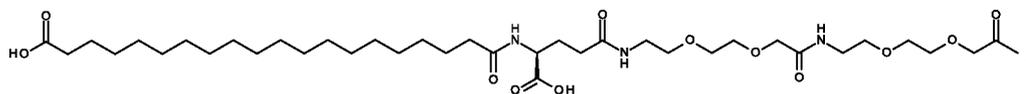


B:

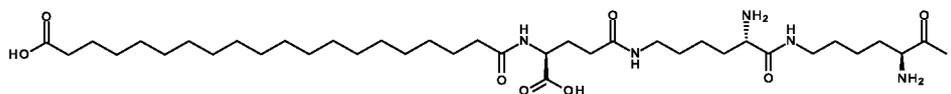


5

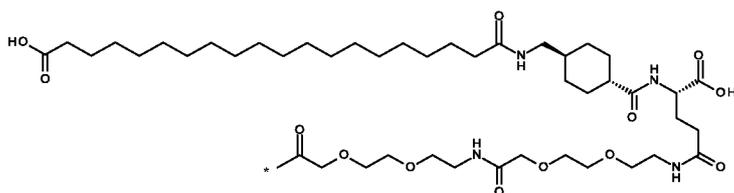
C:



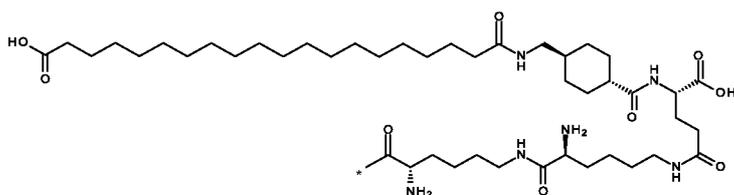
D:



10 E:

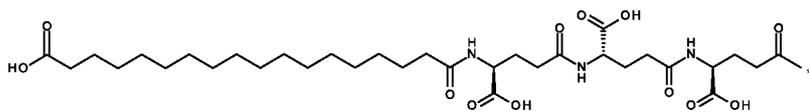


F:



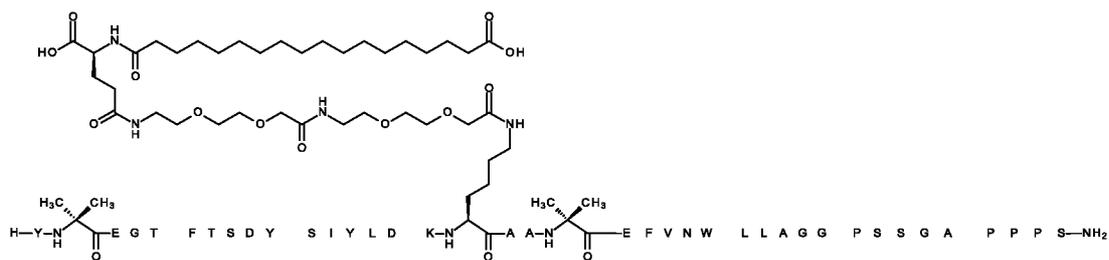
И

G:

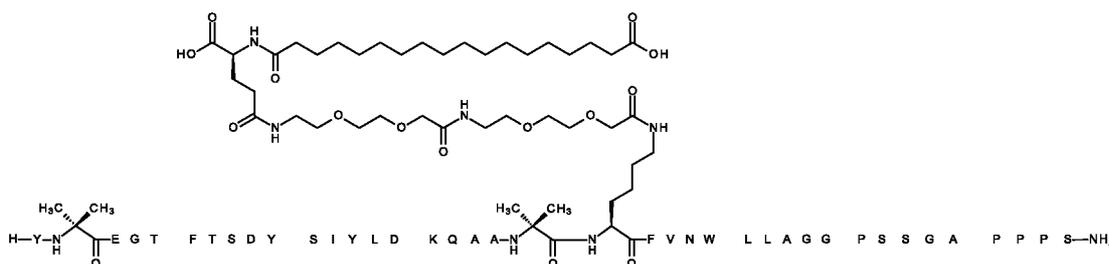


10. Соединение по п. 1, где соединение выбрано из группы, состоящей из

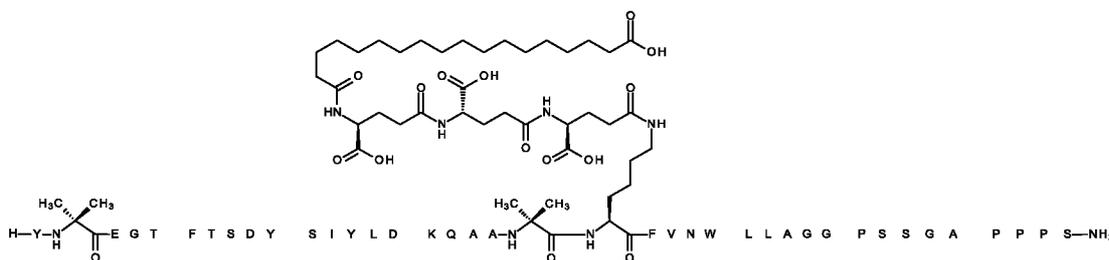
соединения № 4



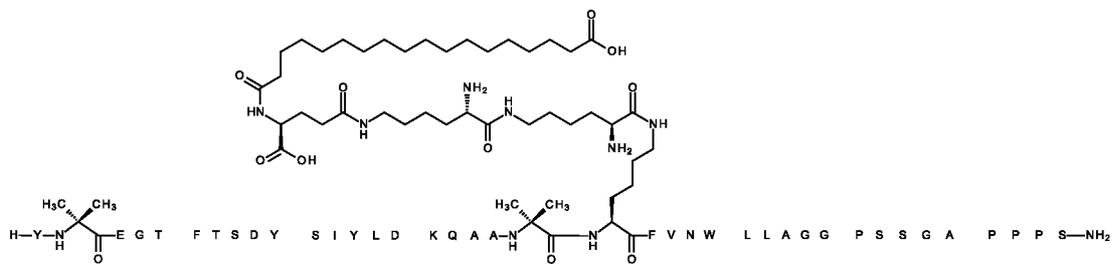
соединения № 5



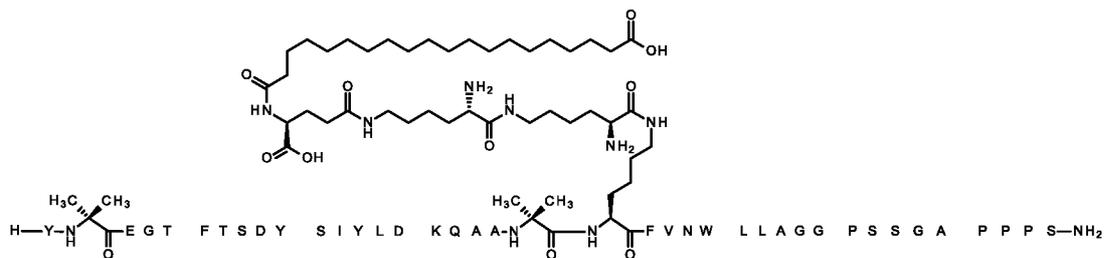
соединения № 6



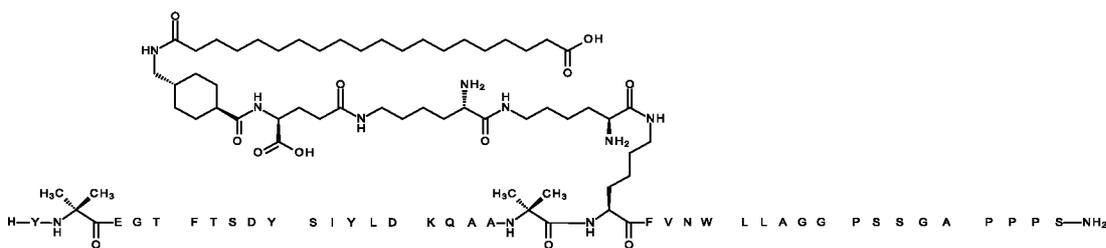
соединения № 9



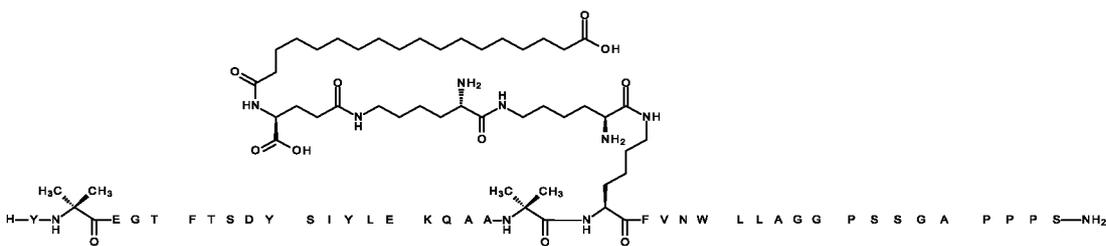
соединения № 13



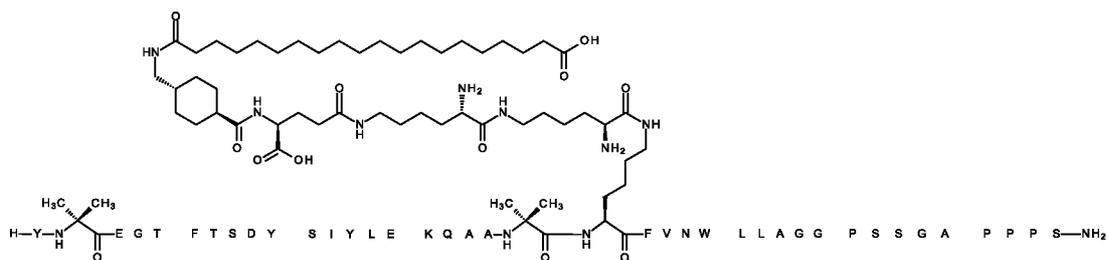
соединения № 14



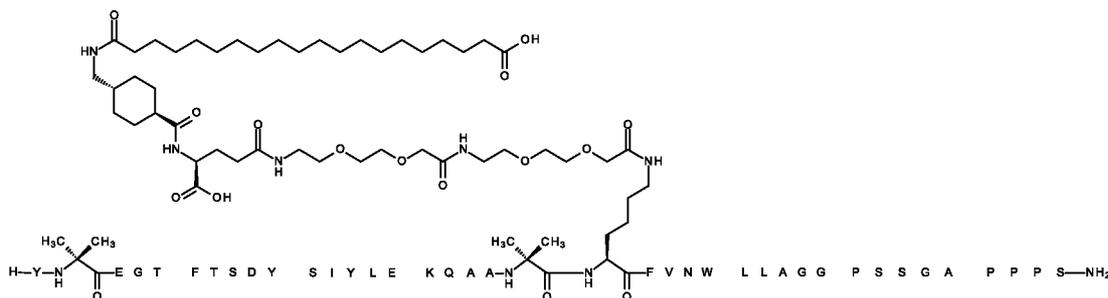
соединения № 15



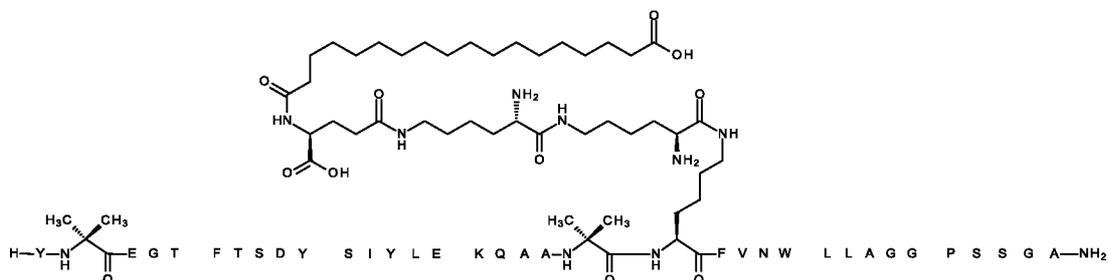
соединения № 16



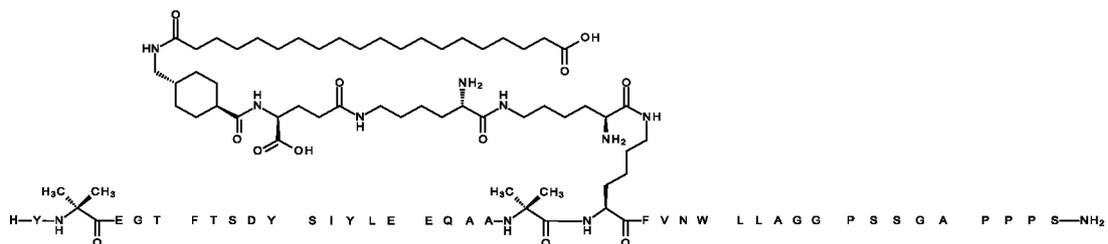
соединения № 17



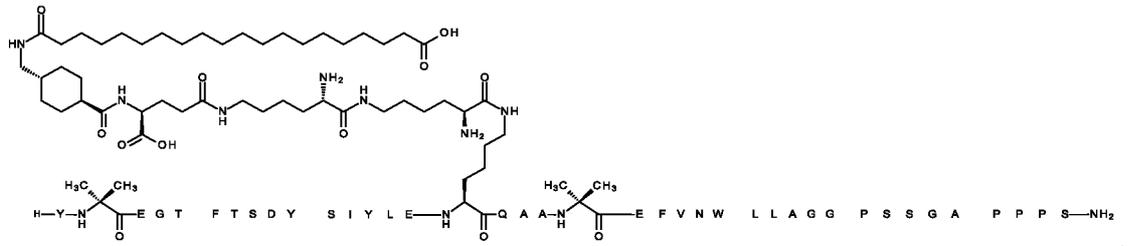
соединения № 18



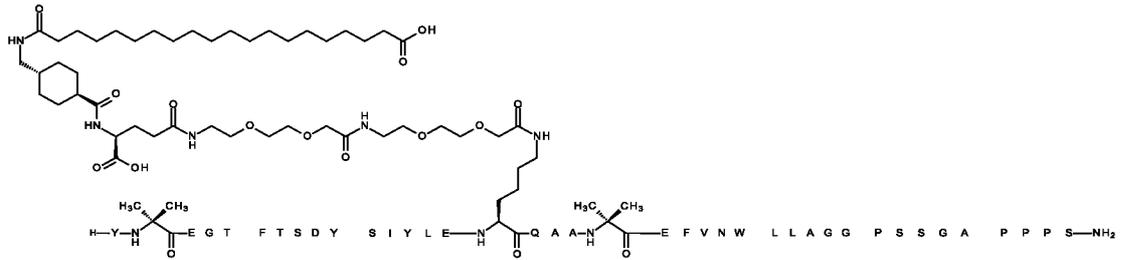
соединения № 19



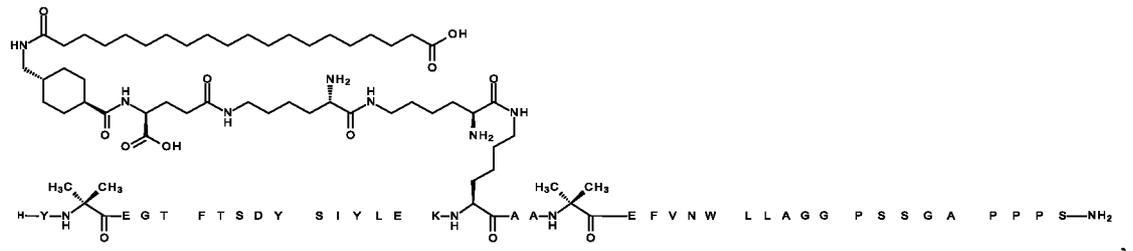
соединения № 20



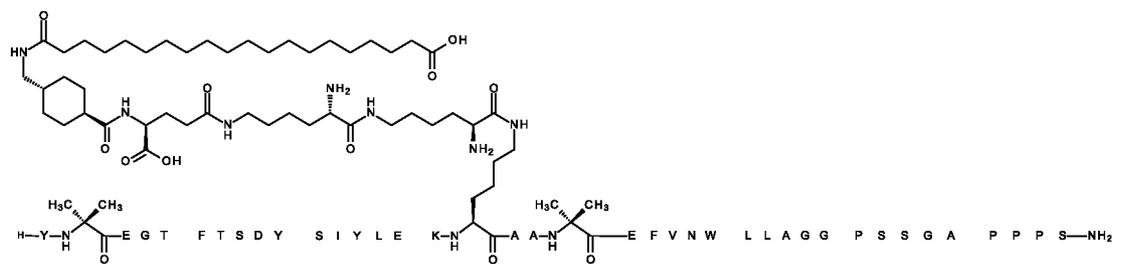
соединения № 21



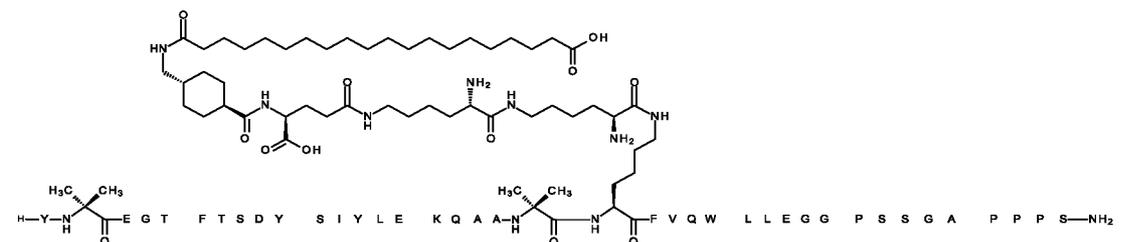
соединения № 22

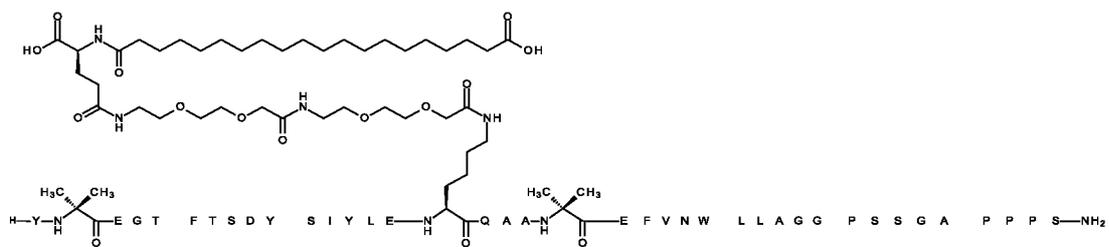


соединения № 23

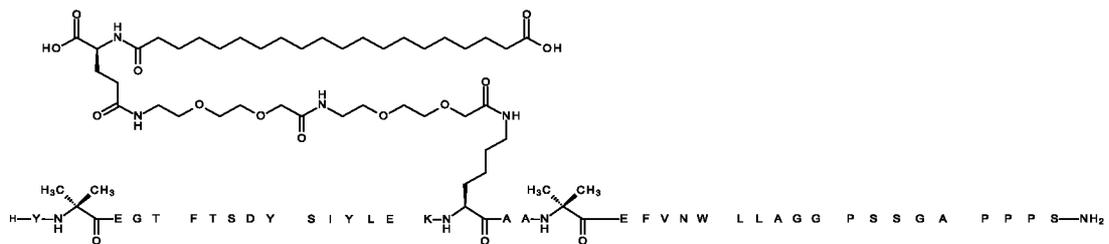


соединения № 24

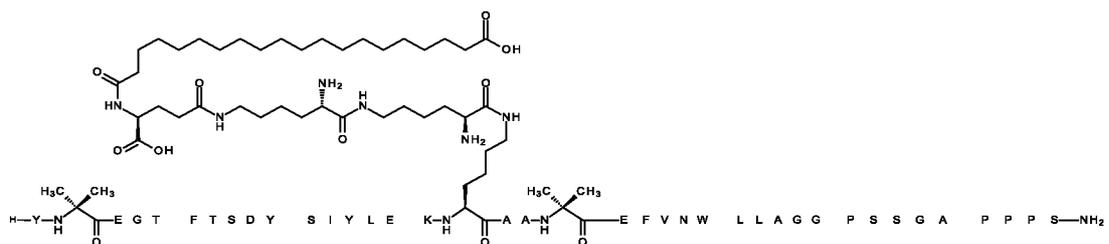




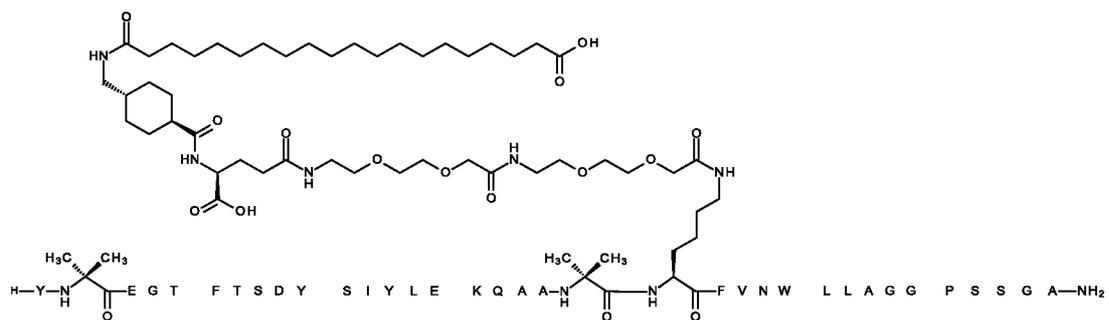
соединения № 30



соединения № 31



соединения № 32



соединения № 33

(SEQ ID NO.: 15)

с необязательной амидной модификацией С-конца, где

X_2 представляет собой Aib,

X_{15} представляет собой D или E,

5 X_{16} представляет собой E или K,

X_{17} представляет собой Q или K,

X_{20} представляет собой Aib,

X_{21} представляет собой E или K,

X_{24} представляет собой N или Q,

10 X_{28} представляет собой A или E,

X_{32} представляет собой S или отсутствует,

X_{33} представляет собой S или отсутствует,

X_{34} представляет собой G или отсутствует,

X_{35} представляет собой A или отсутствует,

15 X_{36} представляет собой P или отсутствует,

X_{37} представляет собой P или отсутствует,

X_{38} представляет собой P или отсутствует,

X_{39} представляет собой S или отсутствует.

15. Пептид по п. 14, где аминокислотная последовательность пептида представляет собой
20 любую из последовательностей под SEQ ID NO.: 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14

Фиг. 1

