

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393441** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.02.09

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.07

(54) **ВИДЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ**

(31) **63/208,299**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.06.08**

Линден Дэниел (SE)

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/IB2022/055292**

Билык А.В., Поликарпов А.В.,

(87) **WO 2022/259145 2022.12.15**

Соколова М.В., Путинцев А.И.,

(71) Заявитель:

Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев

АстраЗенека АБ (SE)

А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Представлены способы лечения заболевания печени у субъекта, предусматривающие введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). Также представлены фармацевтические композиции и наборы, содержащие i) ингибитор экспрессии PNPLA3 и ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1.

202393441

A1

A1

202393441

ВИДЫ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 4 июня 2021 года, имеет название 0098-0076PR1_SL.txt, и ее размер составляет 60642 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] В настоящем изобретении представлен способ лечения заболевания печени у субъекта, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). Также представлены фармацевтические композиции и наборы, содержащие i) ингибитор экспрессии PNPLA3 и ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Частота возникновения заболеваний печени растет во всем мире, в частности в странах Запада. Особенно распространенной является неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD). NAFLD охватывает целый спектр заболеваний печени от жировой дегенерации до неалкогольного стеатогепатита (NASH) и цирроза. NAFLD определяется как накопление жира в печени, превышающее 5% по весу, при отсутствии значительного употребления алкоголя, приема стеатогенного лекарственного препарата или наследственного заболевания (Kotronen et al, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2008, 28: 27-38).

[0004] Неалкогольный стеатогепатит (NASH) представляет собой NAFLD с наличием признаков воспаления и повреждения печени. Гистологически NASH определяется по наличию макровезикулярного стеатоза, баллонной дистрофии клеток печени и лобулярных воспалительных инфильтратов (Sanyal, *Hepatology Res.* 2011. 41: 670-4). NASH встречается у 2-3% населения. При наличии других патологий, таких как ожирение или диабет, прогнозируемая частота распространенности возрастает до 7% и 62% соответственно (Hashimoto et al, *J. Gastroenterol.* 2011. 46(1): 63-69).

[0005] PNPLA3 является представителем семейства белков, содержащих домен пататин-подобной фосфолипазы, размером 481 аминокислота, который экспрессируется в ER и на липидных каплях. У людей PNPLA3 экспрессируется на высоком уровне в печени, тогда как уровень экспрессии в жировой ткани в пять раз ниже (Huang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010. 107: 7892-7).

[0006] Глюкагон и глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) происходят из препроглюкагона, полипептида-предшественника из 158 аминокислот, который подвергается избирательному протеолитическому процессингу в тканях с образованием ряда различных пептидов, происходящих из проглюкагона, в том числе глюкагона, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2) и оксинтомодулина (ОХМ), которые вовлечены в широкий спектр физиологических функций, в том числе гомеостаз глюкозы, секрецию инсулина, опорожнение желудка и развитие кишечника, а также регуляцию потребления пищи. Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, который соответствует аминокислотам 33-61 проглюкагона (53-81 препроглюкагона), тогда как GLP-1 вырабатывается в виде пептида из 37 аминокислот, который соответствует аминокислотам 72-108 проглюкагона (92-128 препроглюкагона). Амид GLP-1(7-36) или кислота GLP-1(7-37) являются биологически активными формами GLP-1, которые характеризуются по сути эквивалентной активностью по отношению к рецептору GLP-1.

[0007] Глюкагон вырабатывается эндокринной частью поджелудочной железы и активирует рецептор глюкагона ("GCGR"). Глюкагон оказывает свое действие в печени с повышением уровня глюкозы в крови посредством глюконеогенеза и гликогенолиза. Когда уровень глюкозы начинает снижаться, глюкагон передает сигналы печени расщеплять гликоген и высвободить глюкозу и стимулирует выработку глюкозы, что вызывает повышение уровней глюкозы в крови до нормального уровня. Также было показано, что глюкагон повышает потребление энергии, повышает выработку кетоновых тел, ингибирует липогенез и стимулирует окисление жирных кислот, задерживает опорожнение желудка и подавляет аппетит (Müller et al, Proc. Intl. Journal of Molecular Sciences 2020. 21(2): 383) (Boland et al., Nat Metab., 2020. 2(5): 413-431).

[0008] GLP-1 характеризуется иными биологическими активностями в сравнении с глюкагоном. Он секретируется из L-клеток кишечника и связывается с рецептором GLP-1. Его виды активности включают усиление секреции инсулина за счет инкретинового эффекта, подавление секреции глюкагона и подавление потребления пищи. Было показано, что как глюкагон, так и GLP-1, действуя в качестве агонистов в отношении их соответствующих рецепторов, являются эффективными в потере веса. Определенные аналоги GLP-1 для лечения ожирения имеются в продаже или находятся на стадии разработки, в том числе, например, лираглутид (VICTOZA® от Novo Nordisk) и эксенатид (Byetta® от AstraZeneca AB).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Настоящее изобретение направлено на способ лечения заболевания печени у субъекта, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

[0010] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5567-5731 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5644-5731 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5567-5642 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5567-5620 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая PNPLA3, представляет собой mRNA. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 нуклеозидов.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит один или несколько модифицированных сахарных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько модифицированных сахарных фрагментов представляют собой 2'-дезоксид, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиметил, 2'-О-метоксиэтил, 2'-фтор, 4'-СН(СН₃)-О-2', 4'-СН₂-О-2', 4'-(СН₂)₂-О-2' или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит одно или несколько модифицированных оснований. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько модифицированных оснований представляют собой 5-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин в антисмысловом олигонуклеотиде представляет собой 5'-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или несколько неприродных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатные связи. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит: а) гэта-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов; б) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и с) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; при этом гэта-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар, при этом каждая межнауклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

[0013] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 дополнительно содержит конъюгированную группу.

[0014] В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид. В некоторых вариантах осуществления пептид содержит аминокислотную последовательность:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30 (SEQ ID NO:25),

где

(1) X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y, X12 представляет собой K, X13 представляет собой K, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 14);

(2) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 15);

(3) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой K, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой E, X16 представляет собой G, X17 представляет собой Q, X18 представляет собой A, X20 представляет собой K,

X21 представляет собой E, X23 представляет собой I, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой K и X30 представляет собой R (SEQ ID NO: 20);

(4) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой S, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 18);

(5) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 33) или

(6) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 19).

[0015] В некоторых вариантах осуществления пептид содержит аминокислотную последовательность HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO: 33).

[0016] В некоторых вариантах осуществления пептид дополнительно предусматривает модификацию аминокислоты в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой присоединение ацильного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой пальмитоильный фрагмент при N(эпсилон)-группе остатка лизина. В некоторых вариантах осуществления пальмитоильная группа связана с лизином посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гамма-глутаминовую кислоту. В по меньшей мере одном варианте осуществления пептид представляет собой HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO: 33), где лизин модифицирован пальмитоильным фрагментом посредством линкера из глутаминовой кислоты.

[0017] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят одновременно. В некоторых

вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 1 часа. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 24 часов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 72 часов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах одной недели. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах двух недель. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в сутки, дважды в сутки или три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в неделю, дважды в неделю или три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в месяц, дважды в месяц или три раза в месяц.

[0018] В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в сутки, дважды в сутки или три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в неделю, дважды в неделю или три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в месяц, дважды в месяц или три раза в месяц.

[0019] В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется ожирение и/или сахарный диабет 2 типа. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD). В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит (NASH). В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой фиброз и/или цирроз печени.

[0020] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ обеспечения уменьшения стеатоза в печени субъекта с заболеванием печени, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

[0021] В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 30% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 30% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD). В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой фиброз печени.

[0022] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ обеспечения уменьшения воспаления в печени субъекта с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение воспаления в печени у субъекта на по меньшей мере 50% по сравнению с воспалением в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

[0023] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ обеспечения уменьшения уровня коллагена в печени у субъекта с заболеванием печени, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение уровня коллагена в печени у субъекта на по меньшей мере 25% по сравнению с уровнем коллагена в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

[0024] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлена фармацевтически приемлемая композиция, содержащая: i) ингибитор экспрессии белка 3,

содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и iii) по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для парентерального введения.

[0025] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен набор, содержащий: i) ингибитор экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации иллюстративных вариантов осуществления определенных аспектов настоящего изобретения.

[0027] На фигуре 1A показаны графики, демонстрирующие изменение веса тела в процентах у гомозиготных мышей с нокином *Pnpla3*^{148M/M}, которым скармливали NASH-индуцирующий рацион в течение 36 недель и обрабатывали дозой 1) контрольный ASO + физиологический солевой раствор, 2) ASO к *Pnpla3* + физиологический солевой раствор, 3) контрольный ASO + котадутид или 4) ASO к *Pnpla3* + котадутид в течение 14 недель, как описано в примере 1. На фигуре 1B показаны графики, демонстрирующие концентрации mRNA *mPnpla3* в печени у тех же мышей, измеренные так, как описано в примере 1.

[0028] На фигуре 2 показаны графики, демонстрирующие степень тотального стеатоза печени (2A), макровезикулярного стеатоза (2B) и микровезикулярного стеатоза (2C), измеренные в окрашенных срезах печени, полученных от мышей, описанных выше для фигуры 1A и в примере 1. На фигуре 2D показаны изображения окрашенных срезов, при этом для каждого среза представлена процентная доля общего количества липидных капель на каждый срез.

[0029] На фигуре 3A показаны графики, демонстрирующие процентную долю макрофагов печени, измеренную в срезах печени, полученных от мышей, описанных выше для фигуры 1A и в примере 1. На фигуре 3B показаны графики, демонстрирующие баллы оценки воспаления в органах печени, полученных от мышей, описанных выше для фигуры 1A и в примере 1.

[0030] На фигуре 4 показаны графики, демонстрирующие баллы оценки активности NAFLD (NAS), рассчитанные так, как описано в примере 1, у мышей, описанных выше для фигуры 1A и в примере 1.

[0031] На фигуре 5 показаны графики, демонстрирующие процентную долю коллагена A1A в печени в срезах печени, полученных от мышей, описанных выше для

фигуры 1А и в примере 1. Уровень коллагена в печени измеряют так, как описано в примере 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0032] В настоящем изобретении представлен способ лечения заболевания печени, например NASH и/или NAFLD. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ лечения заболевания печени у субъекта, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

Определения

[0033] Если не указано иное, следующие термины имеют следующие значения.

[0034] По ходу данной заявки выражение "приблизительно" применяется для обозначения того, что значение включает в себя вариацию ошибки, присущую способу/устройству, используемому для определения значения, или вариацию, существующую среди субъектов исследования. Как правило, выражение "приблизительно" предназначено для охвата примерно или менее 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% или большей вариабельности, в зависимости от ситуации. В вариантах осуществления специалист в данной области техники поймет уровень вариабельности, указанный выражением "приблизительно" благодаря контексту, в котором он используется в данном документе. Также следует понимать, что применение выражения "приблизительно" также включает конкретно изложенное значение.

[0035] Применение выражения "или" в формуле изобретения осуществляется для обозначения "и/или", если явно не указано, что он относится только к альтернативам или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя настоящее изобретение поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или".

[0036] Используемая в данном документе фраза "от...до..." представляет собой диапазон включительно с концевыми значениями диапазона. Например, число от x до y явно включает числа x и y и любые числа, которые находятся в пределах между x и y.

[0037] "2'-Дезоксинуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-Н(Н)-фуранозильный сахарный фрагмент, обнаруживаемый во встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК). В определенных вариантах осуществления 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное нуклеиновое основание или может содержать нуклеиновое основание РНК (урацил).

[0038] "2'-О-метоксиэтил" (также 2'-МОЕ) относится к 2'-O(CH₂)₂-OCH₃) вместо

группы 2'-ОН рибозильного кольца. 2'-О-метоксиэтил-модифицированный сахар является модифицированным сахаром.

[0039] "2'-МОЕ-нуклеозид" (также 2'-О-метоксиэтилнуклеозид) означает нуклеозид, содержащий 2'-МОЕ-модифицированный сахарный фрагмент.

[0040] "2'-Замещенный нуклеозид" или "2-модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий 2'-замещенный или 2'-модифицированный сахарный фрагмент. Используемый в данном документе термин "2'-замещенный" или "2-модифицированный" применительно к сахарному фрагменту означает, что сахарный фрагмент содержит по меньшей мере одну 2'-замещающую группу, отличную от Н или ОН.

[0041] "3'-концевой участок-мишень" относится к нуклеотиду нуклеиновой кислоты-мишени, который является комплементарным нуклеотиду конкретного соединения, наиболее близкому к 3'-концу.

[0042] "5'-концевой участок-мишень" относится к нуклеотиду нуклеиновой кислоты-мишени, который является комплементарным нуклеотиду конкретного соединения, наиболее близкому к 5'-концу.

[0043] "5-Метилцитозин" означает цитозин с присоединенной в 5-положении метильной группой.

[0044] "Введение" или "осуществление введения" относится к путям введения индивидууму соединения или композиции, представленных в данном документе, для выполнения их предполагаемой функции. Пример пути введения, который может использоваться, включает без ограничения парентеральное введение, такое как подкожная, внутривенная или внутримышечная инъекция или инфузия.

[0045] "Вводимые одновременно" или "совместное введение" означает введение двух или более соединений любым способом, при котором у пациента проявляются фармакологические эффекты их обоих. Для одновременного введения не требуется, чтобы оба соединения вводились в одной фармацевтической композиции, в одной и той же лекарственной форме, посредством одного и того же пути введения или в одно и то же время. Эффекты обоих соединений не обязательно должны проявляться в одно и то же время. Эффекты должны перекрываться только в течение определенного периода времени и необязательно должны иметь одинаковую длительность. Одновременное введение или совместное введение охватывает параллельное или последовательное введение.

[0046] "Уменьшение интенсивности проявлений" относится к улучшению или ослаблению по меньшей мере одного проявления, признака или симптома ассоциированного заболевания, нарушения или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления уменьшение интенсивности проявлений включает

задержку или замедление прогрессирования или уменьшение степени тяжести одного или нескольких проявлений патологического состояния или заболевания. Прогрессирование или степень тяжести проявлений может определяться с помощью субъективных или объективных показателей, которые известны специалистам в данной области техники.

[0047] "Животное" относится к человеку или отличному от человека животному, в том числе без ограничения к мышам, крысам, кроликам, собакам, кошкам, свиньям и отличным от человека приматам, в том числе без ограничения нечеловекообразным обезьянам и шимпанзе.

[0048] "Антисмысловое соединение" означает соединение, содержащее олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных компонентов, таких как конъюгированная группа или концевая группа. Примеры антисмысловых соединений включают одонитевые и двухнитевые соединения, такие как олигонуклеотиды, рибозимы, siRNA, shRNA, ssRNA и соединения, активность которых зависит от степени занятости активных центров.

[0049] "Антисмысловой олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени или ее области или сегменту. В определенных вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид способен к специфической гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью или ее областью или сегментом.

[0050] "сEt" или "конформационно ограниченный этилом" означает бициклический рибозильный сахарный фрагмент, где второе кольцо бициклического сахара образовано посредством мостика, соединяющего 4'-атом углерода и 2'-атом углерода, при этом мостик характеризуется формулой: 4'-CH(CH₃)-O-2' и при этом метильная группа мостика находится в S-конфигурации.

[0051] "сEt-нуклеозид" означает нуклеозид, содержащий сEt-модифицированный сахарный фрагмент.

[0052] "Химическая модификация" в соединении описывает замещения или изменения в результате химической реакции любой из структурных единиц в соединении по сравнению с исходным состоянием такой структурной единицы. "Модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, независимо содержащий модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное нуклеиновое основание. "Модифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, модифицированный сахар и/или модифицированное нуклеиновое основание.

[0053] "Химически отличная область" относится к области соединения, которая

некоторым образом химически отличается от другой области одного и того же соединения. Например, область с 2'-О-метоксиэтилнуклеотидами химически отличается от области с нуклеотидами без 2'-О-метоксиэтильных модификаций.

[0054] "Химерные антисмысловые соединения" означают антисмысловые соединения, которые имеют по меньшей мере 2 химически отличные области, при этом на каждое положение приходится несколько субъединиц.

[0055] "Конъюгированная группа" означает группу атомов, которая присоединена к олигонуклеотиду. Конъюгированные группы включают конъюгируемый фрагмент и конъюгирующий линкер, который присоединяет конъюгируемый фрагмент к олигонуклеотиду.

[0056] "Конъюгирующий линкер" означает группу атомов, содержащую по меньшей мере одну связь, которая соединяет конъюгируемый фрагмент с олигонуклеотидом.

[0057] "Конъюгируемый фрагмент" означает группу атомов, которую присоединяют к олигонуклеотиду посредством конъюгирующего линкера.

[0058] "Смежный" применительно к олигонуклеотиду относится к нуклеозидам, нуклеиновым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеозидным связям, которые непосредственно примыкают друг к другу. Например, "смежные нуклеиновые основания" означают нуклеиновые основания, которые непосредственно примыкают друг к другу в последовательности.

[0059] "Доза" означает определенное количество соединения или фармацевтического средства, обеспечиваемое за одно введение или за определенный период времени. В определенных вариантах осуществления дозу можно вводить в виде двух или более болюсов, таблеток или инъекций. Например, в определенных вариантах осуществления, если требуется подкожное введение, для требуемой дозы может потребоваться объем, который трудно вместить в одну инъекцию. В таких вариантах осуществления для достижения требуемой дозы можно использовать две или более инъекций. В определенных вариантах осуществления дозу можно вводить за две или более инъекции для сведения к минимуму реакции в месте инъекции у индивидуума. В других вариантах осуществления соединение или фармацевтическое средство вводят путем инфузии в течение длительного периода времени или непрерывно. Дозы могут быть указаны в виде количества фармацевтического средства в час, день, неделю или месяц.

[0060] "Схема введения доз" представляет собой комбинацию доз, разработанную для достижения одного или нескольких требуемых эффектов.

[0061] "Эффективное количество" означает количество соединения, достаточное для достижения требуемого физиологического результата у индивидуума, нуждающегося в

соединении. Эффективное количество может варьироваться для индивидуумов в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, подлежащего лечению, таксономической группы индивидуумов, подлежащих лечению, состава композиции, оценки медицинского состояния индивидуума, а также других учитываемых факторов.

[0062] "Гэпмер" означает олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, содержащую несколько нуклеозидов, которые способствуют расщеплению под действием РНКазы Н, расположенную между внешними областями, содержащими один или несколько нуклеозидов, где нуклеозиды, образующие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, образующих внешние области. Внутренняя область может называться "гэпом", а внешние области могут называться "флангами".

[0063] "Непосредственно прилегающий" означает, что между непосредственно прилегающими элементами одного типа отсутствуют промежуточные элементы (например, между непосредственно прилегающими нуклеиновыми основаниями отсутствуют промежуточные нуклеиновые основания).

[0064] "Межнуклеозидная связь" означает группу или связь, которые образуют ковалентную связь между прилегающими друг к другу нуклеозидами в олигонуклеотиде. "Модифицированная межнуклеозидная связь" означает любую межнуклеозидную связь, отличную от встречающейся в природе фосфатной межнуклеозидной связи. Нефосфатные связи относятся в данном документе к модифицированным межнуклеозидным связям.

[0065] "Линкерный нуклеозид" означает нуклеозид, который связывает олигонуклеотид с конъюгируемым фрагментом. Линкерные нуклеозиды расположены в конъюгирующем линкере соединения. Линкерные нуклеозиды не считаются частью олигонуклеотидного фрагмента соединения, даже если они являются смежными с олигонуклеотидом.

[0066] "Несовпадающее" или "некомплементарное" означает нуклеиновое основание первого олигонуклеотида, которое не является комплементарным соответствующему нуклеотидному основанию второго олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты-мишени при выравнивании первого и второго олигонуклеотидов. Например, нуклеиновые основания, в том числе без ограничения универсальные нуклеиновые основания инозин и гипоксантин, способны к гибридизации с по меньшей мере одним нуклеиновым основанием, но тем не менее являются несовпадающими или некомплементарными в отношении нуклеинового основания, с которым они гибридизируются. В качестве другого примера нуклеиновое основание первого олигонуклеотида, которое не способно гибридизоваться с соответствующим нуклеиновым основанием второго

олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты-мишени при выравнивании первого и второго олигонуклеотидов, является несовпадающим или некомплементарным нуклеиновым основанием.

[0067] "Модулирование" относится к изменению или корректированию признака в клетке, ткани, органе или организме. Например, модулирование РНК PNPLA3 может означать увеличение или уменьшение уровня РНК PNPLA3 и/или белка PNPLA3 в клетке, ткани, органе или организме. "Модулятор" осуществляет изменение в клетке, ткани, органе или организме. Например, соединение, оказывающее воздействие на PNPLA3, может представлять собой модулятор, который уменьшает количество РНК PNPLA3 и/или белка PNPLA3 в клетке, ткани, органе или организме.

[0068] "МОЕ" означает метоксиэтил.

[0069] "Небициклический модифицированный сахар" или "небициклический модифицированный сахарный фрагмент" означает модифицированный сахарный фрагмент, который содержит модификацию, такую как заместитель, который не образует мостик между двумя атомами сахара с образованием второго кольца.

[0070] "Олигомерное соединение" означает соединение, содержащее один олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных компонентов, таких как конъюгируемая группа или концевая группа.

[0071] "Олигонуклеотид" означает полимер из связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным независимо друг от друга. Если не указано иное, олигонуклеотиды состоят из 8-80 связанных нуклеозидов. "Модифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, где по меньшей мере один сахар, нуклеиновое основание или межнуклеозидная связь являются модифицированными. "Немодифицированный олигонуклеотид" означает олигонуклеотид, который не содержит какую-либо модификацию сахара, нуклеинового основания или межнуклеозидной связи.

[0072] "Фосфоротиоатная связь" означает модифицированную фосфатную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода замещен атомом серы. Фосфоротиоатная межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

[0073] "Часть" означает определенное количество смежных (т. е. связанных) нуклеиновых оснований нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления часть представляет собой определенное количество смежных нуклеиновых оснований нуклеиновой кислоты-мишени. В определенных вариантах осуществления часть представляет собой определенное количество смежных нуклеиновых оснований олигомерного соединения.

[0074] "№ в RefSeq" представляет собой уникальную комбинацию букв и цифр, присвоенных последовательности, которая указывает на то, что последовательность соответствует конкретному транскрипту-мишени (например, гену-мишени). Такая последовательность и информация о гене-мишени (в совокупности запись о гене) могут быть найдены в базе данных генетических последовательностей. Базы данных генетических последовательностей включают базу данных эталонных последовательностей NCBI, GenBank, Европейский архив нуклеотидов и Японский банк данных по ДНК (последние три образуют Международное сотрудничество баз данных о нуклеотидных последовательностях или INSDC).

[0075] "Соединение для RNAi" означает антисмысловое соединение, которое действует, по меньшей мере частично, посредством RISC или Ago2, но не посредством РНКазы H, модулируя нуклеиновую кислоту-мишень и/или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой-мишенью. Соединения для RNAi включают без ограничения двухнитевую siRNA, однонитевую РНК (ssRNA) и микроРНК, в том числе миметики микроРНК.

[0076] "Сахарный фрагмент" означает немодифицированный сахарный фрагмент или модифицированный сахарный фрагмент. "Немодифицированный сахарный фрагмент" или "немодифицированный сахар" означает 2'-ОН(Н)-рибозильный фрагмент, обнаруживаемый в РНК ("немодифицированный сахарный фрагмент РНК"), или 2'-Н(Н)-фрагмент, обнаруживаемый в ДНК ("немодифицированный сахарный фрагмент ДНК"). "Модифицированный сахарный фрагмент" или "модифицированный сахар" означает модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент или имитатор сахара. "Модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент" означает фуранозильный сахар, содержащий отличный от атома водорода заместитель вместо по меньшей мере одного атома водорода или гидроксила немодифицированного сахарного фрагмента. В определенных вариантах осуществления модифицированный фуранозильный сахарный фрагмент представляет собой 2'-замещенный сахарный фрагмент. Такие модифицированные фуранозильные сахарные фрагменты включают бициклические сахара и небциклические сахара.

[0077] "Имитатор сахара" означает модифицированный сахарный фрагмент, отличный от фуранозильного фрагмента, который может связывать нуклеиновое основание с другой группой, такой как межнуклеозидная связь, конъюгируемая группа или концевая группа, в олигонуклеотиде. Модифицированные нуклеозиды, содержащие имитаторы сахаров, могут быть встроены в состав олигонуклеотида в одном или нескольких положениях, и такие олигонуклеотиды способны к гибридизации с комплементарными

соединениями или нуклеиновыми кислотами.

[0078] "Терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, фармацевтического средства или композиции, которое обеспечивает терапевтически благоприятный эффект для индивидуума.

[0079] Подразумевается, что используемый в данном документе термин "полипептид" охватывает "полипептид" в единственном числе, а также "полипептиды" во множественном числе, и содержит любую цепь или цепи из двух или более аминокислот. Таким образом, используемые в данном документе термины "пептид", "пептидная субъединица", "белок", "аминокислотная цепь", "аминокислотная последовательность" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", несмотря на то, что каждый из этих терминов может иметь более конкретное значение. Термин "полипептид" можно использовать вместо любых из этих терминов или взаимозаменяемо с таковыми. Термин дополнительно подразумевает полипептиды, которые подверглись посттрансляционным или постсинтетическим модификациям, например, гликозилированию, ацетилированию, фосфорилированию, амидированию, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическому расщеплению или модификации с помощью не встречающихся в природе аминокислот.

[0080] Термин "идентичность последовательности", используемый в данном документе, относится к связи между двумя или более полинуклеотидными последовательностями или между двумя или более полипептидными последовательностями. Если положение в одной последовательности занято одним и тем же основанием нуклеиновой кислоты или аминокислотой, что и в соответствующем положении в сравниваемой последовательности, то последовательности в этом положении считаются "идентичными". Процентное значение "идентичности последовательностей" рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислота находится в обеих последовательностях, с получением числа "идентичных" положений. Число "идентичных" положений затем делят на общее число положений в окне сравнения и умножают на 100 с получением процентного значения "идентичности последовательностей". Процентное значение "идентичности последовательностей" определяют путем сравнения двух последовательностей, подвергнутых оптимальному выравниванию, в окне сравнения. Чтобы произвести оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения, часть последовательности полинуклеотида или полипептида в окне сравнения может содержать добавления или делеции, называемые гэпами, в то время как референтная последовательность остается

неизменной. Оптимальное выравнивание представляет собой такое выравнивание, в котором даже при наличии гэпов образуется наибольшее возможное число "идентичных" положений между референтной и сравниваемой последовательностями. Процентное значение "идентичности последовательностей" между двумя последовательностями можно определить с использованием версии программы "BLAST 2 Sequences", которая была доступна из Национального центра биотехнологической информации по состоянию на 1 сентября 2004 года, при этом программа включает в себя программы BLASTN (для сравнения нуклеотидных последовательностей) и BLASTP (для сравнения полипептидных последовательностей), при этом в основе данных программ лежит алгоритм Карлина-Альтшуля (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993). При использовании "BLAST 2 Sequences" для длины слова (3), штрафа за открытие гэпа (11), штрафа за продолжение гэпа (1), величины максимального продления с использованием гэпов (50), ожидаемого значения (10) и каких-либо других необходимых параметров, включая без ограничения опцию "matrix", можно применять параметры, которые были параметрами по умолчанию по состоянию на 1 сентября 2004 года.

PNPLA3

[0081] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ лечения заболевания печени путем введения ингибитора PNPLA3. PNPLA3 является представителем семейства белков, содержащих домен пататин-подобной фосфолипазы, размером 481 аминокислота, который экспрессируется в ER и на липидных каплях. У людей PNPLA3 экспрессируется на высоком уровне в печени, тогда как уровень экспрессии в жировой ткани в пять раз ниже (Huang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010. 107: 7892-7). В некоторых вариантах осуществления PNPLA3 относится к SEQ ID NO: 1. "PNPLA3" означает любую нуклеиновую кислоту или белок PNPLA3. "Нуклеиновая кислота PNPLA3" означает любую нуклеиновую кислоту, кодирующую PNPLA3. Например, в определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота PNPLA3 включает последовательность ДНК, кодирующую PNPLA3, последовательность РНК, транскрибируемую с ДНК, кодирующей PNPLA3 (включая геномную ДНК, содержащую интроны и экзоны), и последовательность mRNA, кодирующую PNPLA3. "mRNA PNPLA3" означает mRNA, кодирующую белок PNPLA3. Мишень может быть указана в верхнем или нижнем регистре.

[0082] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены способы, соединения и композиции, предназначенные для подавления экспрессии PNPLA3 (PNPLA3) для лечения заболевания печени в комбинации с агонистом рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1. Определенные варианты осуществления, представленные в данном документе, относятся к способам лечения заболевания печени путем введения ингибитора

PNPLA3. "Специфический ингибитор PNPLA3" может относиться к любому средству, способному к специфическому подавлению экспрессии или активности РНК PNPLA3 и/или белка PNPLA3 на молекулярном уровне. Например, специфические ингибиторы PNPLA3 включают нуклеиновые кислоты (в том числе антисмысловые соединения), пептиды, антитела, малые молекулы и другие средства, способные подавлять экспрессию РНК PNPLA3 и/или белка PNPLA3.

[0083] Термины "ингибитор в отношении PNPLA3", "ингибитор PNPLA3" и "ингибитор экспрессии PNPLA3" в данном документе используют взаимозаменяемо. Подавление экспрессии PNPLA3 может быть применимым для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности проявлений заболевания, ассоциированного с PNPLA3, у индивидуума путем введения соединения, которое нацеливается на PNPLA3. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 может представлять собой специфический ингибитор PNPLA3. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 может представлять собой антисмысловое соединение, олигомерное соединение или олигонуклеотид, нацеливающийся на PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой siRNA, олигонуклеотид, нацеливающийся на микроРНК, или одонитевое соединение для RNAi, такое как малые шпилечные РНК (shRNA), одонитевые siRNA (ssRNA) и миметики микроРНК.

[0084] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеливающийся на нуклеиновую кислоту PNPLA3. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота PNPLA3 характеризуется последовательностью, представленной в патенте США № 10774333, включенном посредством ссылки, например, под номером доступа в RefSeq или GENBANK NM_025225.2; NC_000022.11, усеченной по нуклеотидам от 43921001 до 43954500 (SEQ ID NO: 2); AK123806.1; BQ686328.1; BF762711.1; DA290491.1; и последовательностями, перечисленными под "SEQ ID NO 7, 8, 9 и 10" в патенте США № 10774333. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является одонитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является двунитевым.

[0085] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид длиной 16 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение.

[0086] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов и характеризующийся последовательностью нуклеиновых оснований, содержащей любую из последовательностей нуклеиновых оснований, описанных в патенте США № 10774333, включенном в данный документ посредством ссылки, например любой из “SEQ ID NO: 17-2169” из патента США № 10774333. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является одонитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является двунитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой модифицированный олигонуклеотид длиной от 16 до 30 связанных нуклеозидов.

[0087] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид, состоящий из любой из последовательностей нуклеиновых оснований, находящихся в патенте США № 10774333, включенном в данный документ посредством ссылки, например любой из “SEQ ID NO: 17-2169” из патента США № 10774333. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является одонитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является двунитевым.

[0088] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов и комплементарный нуклеиновым основаниям, представленным в патенте США № 10774333, включенном в данный документ посредством ссылки, например, нуклеиновым основаниям 5567-5642, 5644-5731, 5567-5731, 5567-5620, 13697-13733, 20553-20676, 20664-20824, 20553-20824 и 25844-25912 в последовательности под SEQ ID NO: 1, где указанный модифицированный олигонуклеотид является на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% комплементарным к последовательности под SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является одонитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является двунитевым. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 связанных нуклеозидов.

[0089] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, который комплементарен области

нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 нацеливается на нуклеотиды 5567-5620 нуклеиновой кислоты PNPLA3. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 нацеливается на нуклеотиды, расположенные в пределах 5567-5642, 5644-5731, 5567-5731, 5567-5620 нуклеотидов нуклеиновой кислоты PNPLA3, характеризующейся последовательностью нуклеиновых оснований под SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 комплементарен участку, расположенному в пределах 5567-5731 в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3, например SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 комплементарен участку, расположенному в пределах 5644-5731 в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3, например SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 комплементарен участку, расположенному в пределах 5567-5642 в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3, например SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 комплементарен участку, расположенному в пределах 5567-5620 в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3, например SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления такие соединения представляют собой антисмысловые соединения, олигомерные соединения или олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая PNPLA3, представляет собой mRNA.

[0090] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 12 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид длиной от 16 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов и характеризующийся последовательностью нуклеиновых оснований, содержащей часть из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 смежных нуклеиновых оснований из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит антисмысловый олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере 8 смежных нуклеиновых оснований из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 связанных нуклеозидов.

[0091] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов

и характеризующийся последовательностью нуклеиновых оснований, содержащей любую из последовательностей под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит антисмысловую олигонуклеотид, содержащий последовательность, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 16 смежных оснований из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит антисмысловую олигонуклеотид, содержащий последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из последовательностей под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

[0092] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит антисмысловую олигонуклеотид, содержащий любую из последовательностей под SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

[0093] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3, нацеливающийся на PNPLA3, представляет собой ION 916333, 975616, 994284, 975605, 994282, 975613, 975617, 975735, 975736 или 975612, описанные в патенте США № 10774333, включенном в данный документ посредством ссылки.

[0094] В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, по меньшей мере один модифицированный сахар и/или по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный сахарный фрагмент предусматривает 2'-дезоксид, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиметил, 2'-О-метоксиэтил, 2'-фтор, 4'-СН(СН₃)-О-2', 4'-СН₂-О-2', 4'-СН₂-О-2' или их комбинации. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный сахар содержит 2'-дезоксид-, 2'-О-метоксиэтильную группу. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один модифицированный сахар представляет собой бициклический сахар, такой как содержащий группу 4'-СН(СН₃)-О-2', группу 4'-СН₂-О-2' или группу 4'-СН₂-О-2'.

[0095] В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит одно или несколько модифицированных

оснований. В некоторых вариантах осуществления модифицированное основание представляет собой 5-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше цитозинов представляют собой 5-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин в антисмысловом олигонуклеотиде представляет собой 5-метилцитозин.

[0096] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, такую как фосфоротиоатная межнуклеозидная связь. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.

[0097] В определенных вариантах осуществления любой из вышеперечисленных модифицированных олигонуклеотидов содержит г3п-сегмент, состоящий из связанных дезоксирибонуклеозидов; 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; и 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из связанных нуклеозидов; при этом г3п-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, и при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит модифицированный сахар. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 связанных нуклеозидов и характеризуется последовательностью нуклеиновых оснований, содержащей последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 связанных нуклеозидов и характеризуется последовательностью нуклеиновых оснований, содержащей последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных нуклеозидов и характеризуется последовательностью нуклеиновых оснований, состоящей из последовательности, указанной под любым из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

[0098] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, содержащий:

г3п-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом г3п-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сEt-сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную

связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

[0099] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, состоящий из модифицированного олигонуклеотида, имеющего длину 12-30 связанных нуклеиновых оснований и характеризующегося последовательностью нуклеиновых оснований, содержащей последовательность, указанную под любым из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, при этом модифицированный олигонуклеотид содержит:

гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сEt-сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид состоит из 16-30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид состоит из 16 связанных нуклеозидов.

[00100] В определенных вариантах осуществления соединение содержит или состоит из модифицированного олигонуклеотида, где модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных нуклеозидов и состоит из последовательности под SEQ ID NO: 2, при этом модифицированный олигонуклеотид содержит:

гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сEt-сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь; и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

[00101] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, дополнительно содержащий конъюгированную группу. В некоторых вариантах осуществления конъюгированная группа расположена на 5'-конце антисмыслового олигонуклеотида. Таким образом, в определенных вариантах осуществления соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида и конъюгированной группы, где модифицированный олигонуклеотид имеет длину 16 связанных нуклеозидов и состоит из последовательности под SEQ ID NO: 2, при этом

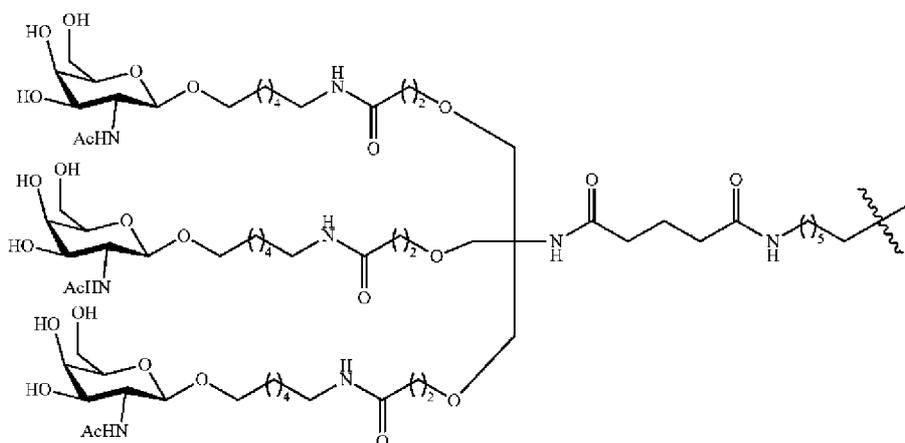
модифицированный олигонуклеотид содержит:

гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

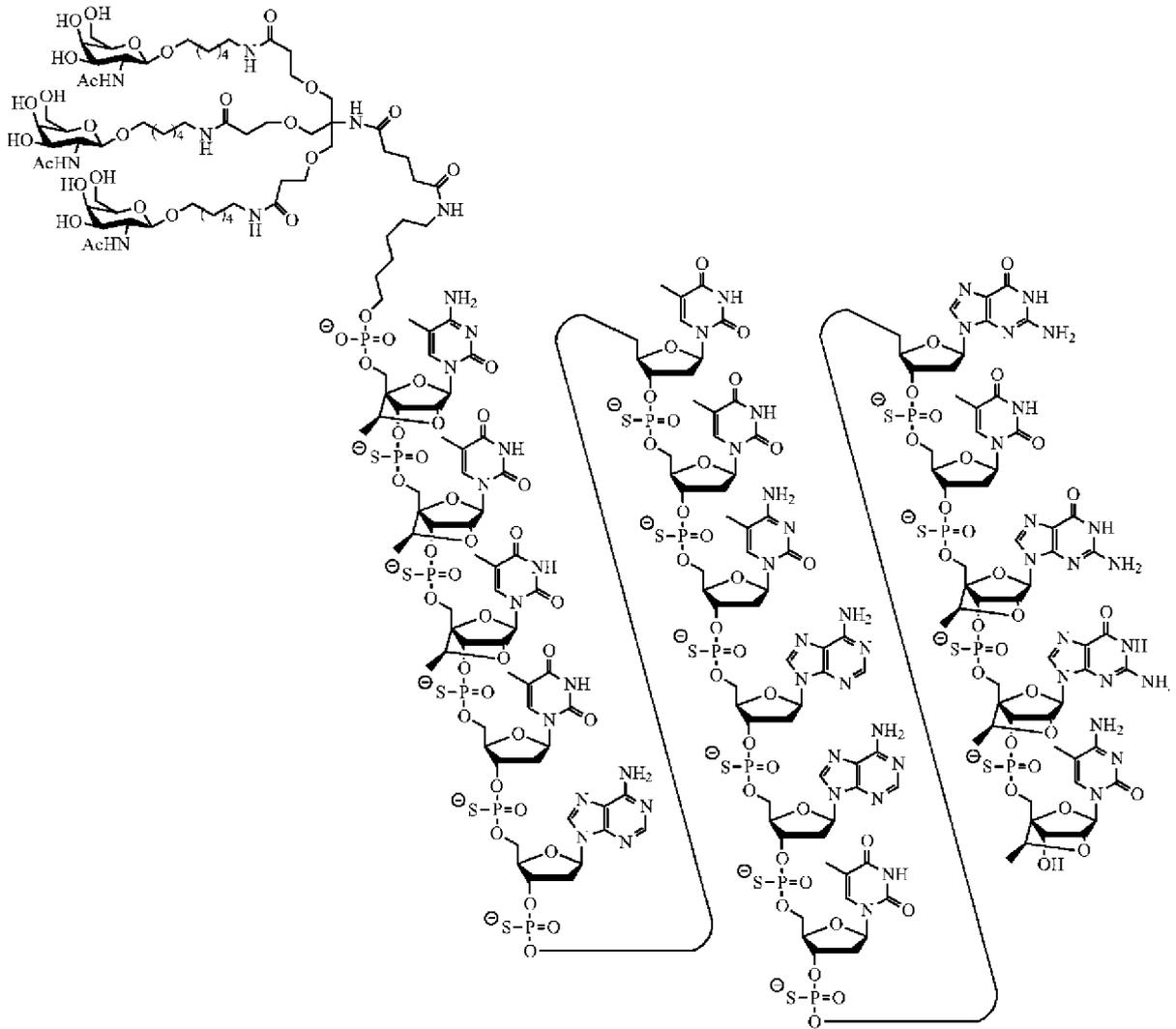
5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

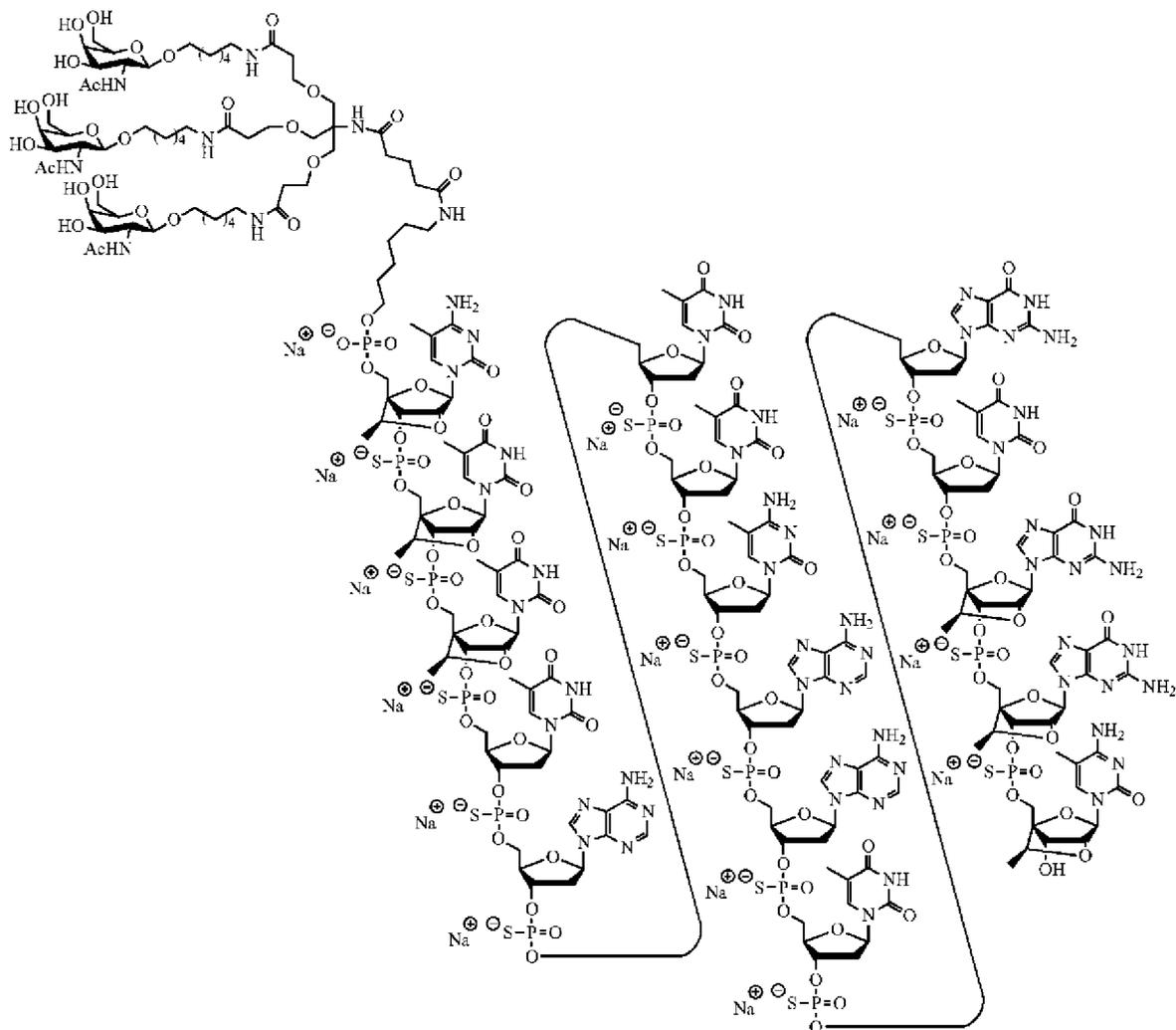
при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит сEt-сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин; и при этом конъюгированная группа расположена на 5'-конце модифицированного олигонуклеотида и представляет собой



[00102] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой соединение следующей формулы (SEQ ID NO: 2):



[00103] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой соединение следующей формулы (SEQ ID NO: 2):



[00104] В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, где антисмысловой олигонуклеотид может являться на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% комплементарным нуклеиновой кислоте, кодирующей PNPLA3.

[00105] В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, при этом антисмысловой олигонуклеотид может являться однонитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 содержит дезоксирибонуклеотиды. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является дунитевым. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 является дунитевым и содержит рибонуклеотиды.

[00106] В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления ингибитор PNPLA3 может представлять собой антисмысловое соединение или олигомерное соединение.

[00107] В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, где антисмысловой олигонуклеотид может иметь длину от 8 до 80, от 10 до 30, от 12 до 50, от 13 до 30, от 13 до 50, от 14 до 30, от 14 до 50, от 15 до 30, от 15 до 50, от 16 до 30, от 16 до 50, от 17 до 30, от 17 до 50, от 18 до 22, от 18 до 24, от 18 до 30, от 18 до 50, от 19 до 22, от 19 до 30, от 19 до 50 или от 20 до 30 связанных нуклеозидов. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой олигонуклеотид.

[00108] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, где антисмысловой олигонуклеотид содержит модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе, и конъюгированную группу. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа связана с модифицированным олигонуклеотидом на 5'-конце модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа связана с модифицированным олигонуклеотидом на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления конъюгированная группа содержит по меньшей мере один N-ацетилгалактозамин (GalNAc), по меньшей мере два N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или по меньшей мере три N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

[00109] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3, представленный в данном документе, содержит фармацевтически приемлемую соль модифицированного олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления соль представляет собой натриевую соль. В определенных вариантах осуществления соль представляет собой калиевую соль.

[00110] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3, описанный в данном документе, являются активными в силу того, что они характеризуются по меньшей мере одной из IC_{50} in vitro, составляющей менее 2 мкМ, менее 1,5 мкМ, менее 1 мкМ, менее 0,9 мкМ, менее 0,8 мкМ, менее 0,7 мкМ, менее 0,6 мкМ, менее 0,5 мкМ, менее 0,4 мкМ, менее 0,3 мкМ, менее 0,2 мкМ, менее 0,1 мкМ, менее 0,05 мкМ, менее 0,04 мкМ, менее 0,03 мкМ, менее 0,02 мкМ или менее 0,01 мкМ.

[00111] В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3, описанный в данном документе, хорошо переносится, что продемонстрировано посредством того, что они характеризуются по меньшей мере одним из значений повышения уровня аланинаминотрансферазы (ALT) или аспартатаминотрансферазы (AST) не более чем в 4 раза, 3 раза или 2 раза по сравнению с контрольными животными или повышением массы печени, селезенки или почки, составляющим не более 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 5% или 2% по сравнению с контрольными животными. В определенных вариантах осуществления

ингибитор PNPLA3, описанный в данном документе, хорошо переносится, что продемонстрировано отсутствием повышения уровней ALT или AST по сравнению с контрольными животными. В определенных вариантах осуществления ингибитор PNPLA3, описанный в данном документе, хорошо переносится, что продемонстрировано отсутствием увеличения веса печени, селезенки или почки по сравнению с контрольными животными.

[00112] В определенных вариантах осуществления представлена композиция, содержащая ингибитор PNPLA3 по любому из вышеуказанных вариантов осуществления или любую его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя. В определенных вариантах осуществления композиция характеризуется вязкостью, составляющей менее приблизительно 40 сантипуаз (сП), менее приблизительно 30 сантипуаз (сП), менее приблизительно 20 сантипуаз (сП), менее приблизительно 15 сантипуаз (сП) или менее приблизительно 10 сантипуаз (сП). В определенных вариантах осуществления композиция, характеризующаяся любым из вышеуказанных значений вязкости, содержит ингибитор PNPLA3, представленный в данном документе, в концентрации, составляющей приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 125 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 175 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 225 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл, приблизительно 275 мг/мл или приблизительно 300 мг/мл. В определенных вариантах осуществления композиция, характеризующаяся любым из вышеуказанных значений вязкости и/или значений концентрации ингибитора PNPLA3, характеризуется температурой, соответствующей комнатной температуре или составляющей приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C, приблизительно 25°C, приблизительно 26°C, приблизительно 27°C, приблизительно 28°C, приблизительно 29°C или приблизительно 30°C.

Пептид GLP-1

[00113] Глюкагон и глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) происходят из препроглюкагона, полипептида-предшественника из 158 аминокислот, который подвергается процессингу в различных тканях с образованием ряда различных пептидов, происходящих из проглюкагона, в том числе глюкагона, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), глюкагоноподобного пептида-2 (GLP-2) и оксинтомодулина (ОХМ), которые вовлечены в широкий спектр физиологических функций, в том числе гомеостаз глюкозы, секрецию инсулина, опорожнение желудка и развитие кишечника, а также регуляцию потребления пищи. Глюкагон представляет собой пептид из 29 аминокислот, который

соответствует аминокислотам 33-61 проглюкагона (53-81 препроглюкагона), тогда как GLP-1 вырабатывается в виде пептида из 37 аминокислот, который соответствует аминокислотам 72-108 проглюкагона (92-128 препроглюкагона). Амид GLP-1(7-36) или кислота GLP-1(7-37) являются биологически активными формами GLP-1, которые характеризуются по сути эквивалентной активностью по отношению к рецептору GLP-1. См., например, US 9765130, включенный в данный документ посредством ссылки.

[00114] Используемый в данном документе "пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона" представляет собой химерный пептид, который характеризуется активностью в отношении рецептора глюкагона, составляющей по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с нативным глюкагоном, и также характеризуется активностью в отношении рецептора GLP-1, составляющей по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше по сравнению с нативным GLP-1, в условиях анализа 1.

[00115] Используемый в данном документе термин "нативный глюкагон" относится к встречающемуся в природе глюкагону, например глюкагону человека, содержащему последовательность под SEQ ID NO: 11. Термин "нативный GLP-1" относится к встречающемуся в природе GLP-1, например GLP-1 человека, и представляет собой общий термин, который охватывает, например, амид GLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 12), кислоту GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 13) или смесь этих двух соединений. Подразумевается, что используемая в данном документе общая ссылка на "глюкагон" или "GLP-1" в отсутствие любого дополнительного обозначения означает соответственно нативный глюкагон человека или нативный GLP-1 человека. Если не указано иное, "глюкагон" относится к глюкагону человека, и "GLP-1" относится к GLP-1 человека.

[00116] Глюкагон может вырабатываться поджелудочной железой и может взаимодействовать с рецептором глюкагона ("GCGR"). Глюкагон может оказывать свое действие в печени с повышением уровня глюкозы в крови посредством глюконеогенеза и гликогенолиза. Если уровень глюкозы начинает снижаться, глюкагон может передавать сигнал печени расщеплять гликоген и высвободить глюкозу, что вызывает повышение уровней глюкозы в крови до нормального уровня. GLP-1 может характеризоваться различными биологическими активностями в сравнении с глюкагоном. Он может секретироваться из L-клеток кишечника и может связываться с рецептором GLP-1. Виды активности GLP-1 могут включать стимуляцию синтеза и секреции инсулина, ингибирование секреции глюкагона и подавление потребления пищи.

[00117] В данном документе представлены агонисты рецептора глюкагона или глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). В некоторых вариантах осуществления агонисты

рецептора глюкагона или глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) содержат полипептид. Пептиды связываются как с рецептором глюкагона, так и рецептором GLP-1. В определенных вариантах осуществления пептиды, представленные в данном документе, являются коагонистами активности глюкагона и GLP-1. Такие пептиды обозначаются в данном документе как пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона. Представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются активностью GLP-1 и глюкагона в оптимальных соотношениях для содействия потере веса, предупреждения набора веса или поддержания необходимого веса тела, а также характеризуются оптимальной растворимостью, способностью к составлению и стабильностью. В определенных вариантах осуществления представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются активными в отношении рецепторов GLP1 человека и глюкагона человека, в определенных вариантах осуществления относительная активность по сравнению с природным лигандом в отношении рецептора GLP-1 составляет в 1 раз, 2 раза, 5 раз, 8 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз или 25 раз больше, чем в отношении рецептора глюкагона.

[00118] Используемый в данном документе термин "пептид" охватывает полноразмерные пептиды и их фрагменты, варианты или производные, например пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона (например, длиной 29, 30 или 31 аминокислота). "Пептид", раскрытый в данном документе, например пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, может представлять собой часть слитого полипептида, содержащего дополнительные компоненты, такие как, например, Fc-домен или домен альбумина, для увеличения периода полувыведения. Пептид, описанный в данном документе, также может быть дериватизирован с помощью ряда различных способов.

[00119] Термины "фрагмент", "аналог", "производное" или "вариант" в контексте пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, подразумевают любой пептид, у которого сохраняется по меньшей мере некоторая требуемая активность, например, связывание с рецепторами глюкагона и/или GLP-1. Представленные в данном документе фрагменты пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, включают фрагменты, подвергнутые протеолитическому расщеплению, фрагменты, подвергнутые делеции, которые характеризуются требуемыми свойствами в ходе экспрессии, очистки и/или введения субъекту.

[00120] В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются требуемыми специфическими видами активности в отношении рецепторов глюкагона и GLP-1 и характеризуются требуемыми относительными специфическими видами активности для стимуляции потери веса. В

определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими видами активности в отношении рецептора GLP-1 *in vitro*, что показано посредством EC50 в анализе cAMP 1 (см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими видами активности в отношении рецептора GLP-1 *in vitro*, что показано посредством EC50 в анализе cAMP с 4,4% сывороточного альбумина человека (анализ 2, см. пример 2), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими видами активности в отношении рецептора глюкагона *in vitro*, что показано посредством EC50 в анализе cAMP 1 (см. пример 2 в патенте США № 9765130, включенном в данный документ посредством ссылки), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими видами активности в отношении рецептора глюкагона *in vitro*, что показано посредством EC50 в анализе cAMP с 4,4% сывороточного альбумина человека (анализ 2, см. пример 2 в патенте США № 9765130, включенном в данный документ посредством ссылки), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются относительными соотношениями специфической активности в отношении GLP1-R/GCGR по сравнению с нативными лигандами, находящимися в диапазоне от приблизительно 0,01 до 0,50, например от приблизительно 0,02 до 0,30, например составляющими приблизительно 0,02, 0,03, 0,04,

0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28 или 0,30, при использовании анализа 2.

[00121] В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими видами активности в отношении глюкозозависимого инсулиотропного пептида (желудочного ингибиторного пептида) (GIPR) *in vitro*, что показано посредством EC50 в анализе сАМР 1 (см. пример 2 в патенте США № 9765130, включенном в данный документ посредством ссылки), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются специфическими активностями в отношении GIPR *in vitro*, что показано посредством EC50 в анализе сАМР с 4,4% сывороточного альбумина человека (анализ 2, см. пример 2 в патенте США № 9765130, включенном в данный документ посредством ссылки), составляющей менее 10000 пМ, менее 5000 пМ, менее 2500 пМ, менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ, менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ, менее 50 пМ, менее 25 пМ, менее 20 пМ, менее 15 пМ, менее 10 пМ, менее 5 пМ, менее 4 пМ, менее 3 пМ или менее 2 пМ.

[00122] В определенных вариантах осуществления представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, характеризуются одним или несколькими критериями из приемлемой растворимости, легкости составления, стабильности в плазме крови и улучшенных фармакокинетических свойств. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферах в пределах широкого диапазона значений pH.

[00123] В определенных вариантах осуществления пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферных растворах при концентрации не более 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл или больше, в буферных системах и при диапазоне значений ионной силы, например от 0,25 до 150 мМ, в том числе без ограничения фосфатном буфере, Tris-буфере, глутаматном буфере, ацетатном буфере, сукцинатном буфере или гистидиновом буфере. Иллюстративные буферы включают 100 мМ глутаматный буфер с pH 4,5, 100 мМ ацетатный буфер с pH 5, 100 мМ сукцинатный буфер с pH 5, 100 мМ фосфатный буфер с pH 6, 100 мМ

гистидиновый буфер с рН 6, 100 мМ фосфатный буфер с рН 6,5, 100 мМ фосфатный буфер с рН 7,0, 100 мМ гистидиновый буфер с рН 7,0, 100 мМ фосфатный буфер с рН 7,5, 100 мМ Tris-буфер с рН 7,5 и 100 мМ Tris-буфер с рН 8,0. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферах при 0,8 мг/мл в пределах диапазона значений рН, например от рН 4,0 до рН 8,0, например при значениях рН, составляющих 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 или 8,5. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в стандартных буферах со значениями рН от 4,5 до 8,0, от 5,0 до 8,0, от 5,5 до 8,0, от 6,0 до 8,0, от 6,5 до 8,0, от 7,0 до 8,0, от 4,5 до 8,5, от 5,5 до 8,5, от 5,5 до 8,5, от 6,0 до 8,5, от 6,5 до 8,5 или от 7,0 до 8,5.

[00124] В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, могут быть составлены в стандартных фармацевтических составах. Иллюстративные составы включают без ограничения: 0,1 М Tris с рН 7,5, 150 мМ маннита, конечное значение рН состава = 7,2; 0,05 М Tris, 50 мМ аргинина/пролина, конечное значение рН состава = 8,0; или натрий-фосфатный буфер (рН 8)/1,85% вес/об. пропиленгликоля, конечное значение рН состава = 7,0. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются растворимыми в этих или других составах при концентрации не более 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл или больше.

[00125] В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, являются приемлемо стабильными в сыворотке крови или плазме крови. Обычные продукты распада глюкагона или GLP-1 включают продукты с массой +1 (кислоту) и продукты расщепления под действием DPP IV. Продукты с массой +1 могут образовываться в результате дезамидирования на амидных группах глутамата или на С-конце. Продукты расщепления образуются в результате действия протеазы DPP IV в плазме крови. В определенных вариантах осуществления раскрытые пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, остаются стабильными в плазме крови при уровнях включительно до 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% через 24 часа в плазме крови при 37°C.

[00126] В данном документе представлен пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, содержащий аминокислотную последовательность:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30,

где X2 представляет собой G или S, X10 представляет собой Y или K, X12 представляет собой K, E, R или S, X13 представляет собой K или Y, X15 представляет собой D или E, X16 представляет собой S или G, X17 представляет собой E, R, Q или K, X18 представляет собой R, S или A, X20 представляет собой R, K или Q, X21 представляет собой D или E, X23 представляет собой V или I, X24 представляет собой A или Q, X27 представляет собой E или V, X28 представляет собой A или K и X30 представляет собой G или R (SEQ ID NO: 25). В определенных вариантах осуществления представлен выделенный пептид, показанный выше, где X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y или K, X12 представляет собой K, E, R или S, X13 представляет собой K или Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, R, Q или K, X18 представляет собой R, S или A, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E или V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO:26). В определенных вариантах осуществления представлен выделенный пептид, показанный выше, где X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y или K, X12 представляет собой K, E, R или S, X13 представляет собой K или Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, если X17 представляет собой E и X18 представляет собой R или если X17 представляет собой R и X18 представляет собой S, то X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E или V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 соответственно).

[00127] В определенных вариантах осуществления представлен выделенный пептид, показанный выше, где X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y, X12 представляет собой K, X13 представляет собой K, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, если X17 представляет собой E и X18 представляет собой R или если X17 представляет собой R и X18 представляет собой S, то X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно). В определенных вариантах осуществления представлен выделенный пептид, показанный выше, где X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, если X12 представляет собой K, E или R и если X12 представляет собой K, E, R или S, то X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, если X17 представляет собой E и X18 представляет собой R и если X17 представляет собой R и X18 представляет собой S, то X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27

представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно). В определенных вариантах осуществления представлен выделенный пептид, показанный выше, где X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, если X17 представляет собой E и X18 представляет собой R или если X17 представляет собой R и X18 представляет собой S, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно). В определенных вариантах осуществления представлен выделенный пептид, показанный выше, где X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой R, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, если X17 представляет собой E и X18 представляет собой R или если X17 представляет собой R и X18 представляет собой S, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 соответственно).

[00128] Представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, могут включать без ограничения G730 (SEQ ID NO: 14), G797 (SEQ ID NO: 15), G849 (SEQ ID NO: 16), G933 (SEQ ID NO: 17), G865 (SEQ ID NO: 18), G796 (SEQ ID NO: 19), G812 (SEQ ID NO: 20) и G380 (SEQ ID NO: 21). Данные пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, перечислены в **таблице 1**.

Таблица 1.

Последовательность пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона		
Пептид	Последовательность	SEQ ID NO
G730	HSQGT FTSDY SKXD SERAR DFVAW LVAGG-амид X13 = K(gE-пальм.)	14
G797	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-пальм.)	15
G849	HSQGT FTSDX SRYLD SRSAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-пальм.)	16
G933	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-кислота X10 = K(gE-пальм.)	17

G865	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-пальм.)	18
G796	HSQGT FTSDX SSYLD SRRAR DFVAW LEAGG-амид X10 = K(gE-пальм.)	19
G812	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFIAW LEKGR-амид X10 = K(gE-пальм.)	20
G380	HGQGT FTSDY SKYLD SXRAQ DFVQW LVAGG-амид X17 = K(gE-пальм.)	21
G931	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-кислота X13 - K(gE-пальм.)	22
G934	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFIAW LEKGR-кислота X10 - K(gE-пальм.)	23
G973	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-кислота X10 - K(gE-пальм.)	24
GLP-1 (7-36-амид)	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGR	12
GLP-1 (7-37-кислота)	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFIAW LVKGRG	13
Глюкагон	HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LMNT	11

i. Способы получения агониста рецептора глюкагона и/или рецепторов GLP-1

[00129] Пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона Пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, представленные в данном документе, можно получать посредством любого подходящего способа, например способов, описанных в патентном документе US 9765130, включенном в данный документ посредством ссылки. Например, в определенных вариантах осуществления представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, химически синтезируют с помощью способов, известных средним специалистам в данной области техники, например, с помощью твердофазного синтеза, как описано Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). Твердофазный синтез пептидов можно выполнять, например, посредством автоматических синтезаторов с применением стандартных реагентов.

[00130] В качестве альтернативы представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, можно получить рекомбинантным способом с

применением подходящей комбинации вектор/клетка-хозяин, что хорошо известно среднему специалисту в данной области техники. Доступен ряд способов рекомбинантного получения пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона. В целом полинуклеотидную последовательность, кодирующую пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, встраивают в соответствующее средство экспрессии, например, вектор, который содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроеной кодирующей последовательности. Нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, встраивают в вектор в соответствующей рамке считывания. Затем вектором экспрессии трансфицируют подходящую клетку-хозяина, которая будет экспрессировать пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения клетки бактерий, дрожжей или млекопитающих. Ряд коммерчески доступных векторных систем для экспрессии в хозяине можно использовать для экспрессии описанных в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона.

ii. Модификации, конъюгаты, продукты слияния и производные

[00131] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе пептиды предусматривают модификацию аминокислоты в аминокислотной последовательности. В определенных вариантах осуществления представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, стабилизируют посредством аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления карбоксильная группа С-концевой аминокислоты является амидированной. В определенных вариантах осуществления С-концевая аминокислота представляет собой амидированный глицин, например, G730, G797, G849, G865, G796, G812 и G380. В определенных вариантах осуществления, например в G933, С-концевой глицин представляет собой немодифицированную кислоту. В определенных вариантах осуществления представлены пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются ацилированными, т. е. добавлен ацильный фрагмент. Например, в определенных вариантах осуществления представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, содержат один или несколько остатков лизина, в которых пальмитоильный фрагмент присоединен к N(эпсилон)-группе. В определенных вариантах осуществления линкер встроен между лизином и пальмитоильной группой. Данный линкер может представлять собой группу гамма-глутаминовой кислоты или альтернативный линкер, такой как без ограничения бета-аланин и аминокетонавая кислота. Можно применять различные способы ацилирования, такие как добавление холестериновых или миристоильных групп.

В определенных вариантах осуществления пальмитоильный фрагмент добавлен в положении 13 (например, G730). В определенных вариантах осуществления пальмитоильный фрагмент добавлен в положении 10 (например, G797, G849, G933, G865, G796 и G812). В определенных вариантах осуществления пальмитоильный фрагмент добавлен в положении 17 (например, G380).

[00132] Представленные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, например, G730, G797, G849 и G933, могут быть пальмитоилированными для удлинения их периода полувыведения за счет связывания с сывороточным альбумином, за счет чего снижается их предрасположенность к почечному клиренсу, как описано в примере 1 в US 9765130, включенном в данный документ посредством ссылки.

[00133] В качестве альтернативы или в дополнение раскрытый в данном документе пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, может быть связан с гетерологичным фрагментом, например, для удлинения периода полувыведения. Гетерологичный фрагмент может представлять собой белок, пептид, домен белка, линкер, органический полимер, неорганический полимер, полиэтиленгликоль (PEG), биотин, альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA), участок, отвечающий за связывание HSA с FcRn, антитело, домен антитела, фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, доменное антитело, альбумин-связывающий домен, фермент, лиганд, рецептор, связывающий пептид, каркасную структуру, отличную от каркасной структуры на основе FnIII, эпитопную метку, рекомбинантный полипептидный полимер, цитокин или комбинацию двух или более таких фрагментов.

[00134] Например, пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, могут быть слиты с гетерологичным полипептидом. Пептиды могут быть слиты с белками посредством слияния и экспрессии рекомбинантного гена либо посредством химической конъюгации. Белки, которые подходят в качестве партнеров для слияния, включают без ограничения сывороточный альбумин человека, антитела и фрагменты антител, в том числе слияние с Fc-участком антител. GLP-1 сливали с данными белками с сохранением специфической активности (L. Baggio et al, *Diabetes* 53 2492-2500 (2004); P. Barrington et al *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13 426-433 (2011); P. Paulik et al *American Diabetes Association* 2012, Poster 1946). Удлиненные последовательности рекомбинантных пептидов также были описаны для получения высокомолекулярного пептида (V. Schellenberger et al *Nature Biotechnol* 27 1186-1190 (2009); PASylation (EP2173890)). В определенных вариантах осуществления пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, встроены в качестве N-концевой части слитого белка с партнером по слиянию, например, альбумином или Fc-участком, на C-терминальном конце. Описанные в данном документе пептиды, являющиеся агонистами

GLP-1/глюкагона, также могут быть слиты с пептидами или белковыми доменами, такими как `Albudab`, которые характеризуются аффинностью к сывороточному альбумину человека (M. S. Dennis et al J Biol Chem 277 35035-35043 (2002); A. Walker et al Protein Eng Design Selection 23 271-278 (2010)). Способы слияния раскрытых в данном документе пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, с гетерологичным полипептидом, например, альбумином или Fc-областью, хорошо известны средним специалистам в данной области техники.

[00135] Другие гетерологичные фрагменты могут быть конъюгированы с пептидами, являющимися агонистами GLP-1/глюкагона, для дополнительной стабилизации или увеличения периода полувыведения. В случае химического слияния в определенных вариантах осуществления предусматривается сохранение свободного N-конца, однако могут быть сделаны альтернативные точки для дериватизации. Дополнительным альтернативным методом является дериватизация пептида посредством крупного химического фрагмента, такого как высокомолекулярный полиэтиленгликоль (PEG). "Пегилированный пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона" имеет цепь PEG, ковалентно связанную с ним. Дериватизацию пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, например пегилирование, можно выполнять по лизину, который является пальмитоилированным, или в качестве альтернативы по остатку, таком как цистеин, который замещен или встроен в результате удлинения с целью обеспечения возможности дериватизации. Вышеуказанные формы пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, можно характеризовать *in vitro* и/или *in vivo* в отношении относительной специфической активности и соотношения между активацией рецепторов GLP-1 и глюкагона.

[00136] Общий термин "цепь полиэтиленгликоля" или "цепь PEG" относится к смесям конденсированных полимеров этиленоксида и воды с разветвленной или прямой цепью, представленных общей формулой $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где n представляет собой целое число, равное 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или больше. Цепи PEG включают полимеры этиленгликоля со средней общей молекулярной массой, выбранной из диапазона от приблизительно 500 до приблизительно 40000 дальтон. Средняя молекулярная масса цепи PEG указывается числом, например, PEG-5000 обозначает цепь полиэтиленгликоля, имеющую среднюю общую молекулярную массу, составляющую приблизительно 5000.

[00137] Пегилирование можно осуществлять с помощью любой из реакций пегилирования, известных из уровня техники. См., например, Focus on Growth Factors, 3: 4-10, 1992 и заявки на европейский патент EP 0154316 и EP 0401384. Пегилирование можно осуществлять с использованием реакции ацилирования или реакции алкилирования с

реакционноспособной молекулой полиэтиленгликоля (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером).

[00138] Способы получения пегилированных пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, в целом предусматривают стадии (а) обеспечения вступления в реакцию пептида, являющегося агонистом GLP-1/глюкагона, с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное PEG) в условиях, при которых молекула присоединяется к одной или нескольким группам PEG, и (b) получения продукта(продуктов) реакции.

Введение

[00139] В настоящем изобретении представлены способы лечения заболевания печени у субъекта путем введения субъекту ингибитора экспрессии PNPLA3 и агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 1 часа. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 24 часов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 72 часов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах одной недели. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах двух недель. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах одного месяца, друг за другом в пределах 2 месяцев или друг за другом в пределах 3 месяцев или больше.

[00140] Различные способы введения известны специалисту в данной области техники и могут использоваться для введения ингибитора экспрессии PNPLA3 и агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1. Например, способы введения могут включать пероральный, парентеральный, введение посредством ингаляции или местный. "Парентеральное введение" может означать введение посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение может включать подкожное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение или внутрочерепное введение, например интратекальное или интрацеребровентрикулярное, вагинальное или ректальное введение. Другим примером

формы для введения является раствор для инъекций, в частности для внутривенных или внутриартериальных инъекций или капельного введения. Ингибиторы экспрессии PNPLA3 и/или пептиды, являющиеся агонистами GLP-1/глюкагона, представленные в данном документе, можно вводить в виде однократной дозы или многократных доз. В определенных вариантах осуществления и ингибитор экспрессии PNPLA3, и/или пептид, являющийся агонистом GLP-1/глюкагона, вводят посредством подкожной инъекции.

[00141] В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят посредством одного и того же способа введения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят разными способами введения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят парентерально.

[00142] Составы для парентерального введения могут представлять собой однократную болюсную дозу, инфузионную или нагрузочную болюсную дозу с последующей поддерживающей дозой. Эти композиции можно вводить с конкретными фиксированными или переменными интервалами, например, один раз в день или "по мере необходимости". Схемы дозирования также можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

[00143] Частоту введения доз ингибитора экспрессии PNPLA3 и/или агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 может определить специалист в данной области техники без проведения излишних экспериментов. В некоторых вариантах осуществления частота введения доз ингибитора экспрессии PNPLA3 является такой же, как и частота введения доз агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1. В некоторых вариантах осуществления частота введения доз ингибитора экспрессии PNPLA3 отличается от частоты введения доз агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1, например, введение является более частым или менее частым. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в сутки, дважды в сутки или три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в неделю, дважды в неделю или три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в месяц, дважды в месяц или три раза в месяц. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят не более чем один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель или один раз

в 7 недель. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в сутки, дважды в сутки или три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в неделю, дважды в неделю или три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в месяц, дважды в месяц или три раза в месяц. В некоторых вариантах осуществления агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят не более чем один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в 4 недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель или один раз в 7 недель.

Показания

[00144] Способы, соединения, пептиды и композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболевания печени у субъекта. Термин "субъект" означает любого субъекта, в частности субъекта-млекопитающего, нуждающегося в лечении комбинацией ингибитора экспрессии PNPLA3 и пептидов, являющихся агонистами GLP-1/глюкагона, представленными в данном документе. Субъекты-млекопитающие включают без ограничения людей, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей, коров, обезьян, мартышек, орангутангов, шимпанзе и т. п. В одном варианте осуществления субъектом является субъект-человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-женщина. В одном варианте осуществления субъектом является субъект-мужчина.

[00145] Используемая в данном документе фраза "нуждающийся в этом субъект" относится к индивидууму, которого необходимо подвергнуть лечению, например, субъекту с заболеванием печени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ лечения заболевания печени, например NASH и или NAFLD. Неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) может охватывать целый спектр заболеваний печени от жировой дегенерации до неалкогольного стеатогепатита (NASH) и цирроза печени. NAFLD может быть определена как накопление жира в печени, превышающее 5% по весу, в отсутствии значительного употребления алкоголя, приема стеатогенного лекарственного препарата или наследственного заболевания (см., например, Kotronen et al, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2008, 28: 27-38).

[00146] Неалкогольный стеатогепатит (NASH) может представлять собой NAFLD с наличием признаков воспаления и повреждения печени. В некоторых вариантах осуществления NASH может быть определен гистологически по наличию макровезикулярного стеатоза, баллонной дистрофии клеток печени и лобулярных воспалительных инфильтратов (Sanyal, *Hepatology Res.* 2011. 41: 670-4). По оценкам

некоторых исследований NASH встречается у 2-3% населения. В некоторых исследованиях сообщается, что при наличии других патологий, таких как ожирение или диабет, прогнозируемая частота распространенности возрастает до 7% и 62% соответственно (см., например, Hashimoto et al, J. Gastroenterol. 2011. 46(1): 63-69).

[00147] В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, подходят для лечения заболевания печени, NAFLD, жировой дегенерации печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, алкогольной болезни печени, алкогольного стеатогепатита (ASH), гепатита, вызванного HCV, хронического гепатита, наследственного гемохроматоза или первичного склерозирующего холангита. Определенные варианты осуществления, представленные в данном документе, направлены на соединения и композиции, которые обеспечивают уменьшение повреждения печени, стеатоза, фиброза печени, воспаления печени, рубцевания или цирроза печени, печеночной недостаточности, увеличения печени, повышенных уровней аминотрансфераз или накопления жира в печени у животного.

[00148] В некоторых вариантах осуществления у субъекта может иметься дополнительное показание, например у субъекта с ожирением или субъекта, склонного к ожирению, целесообразным является способствование потере веса или уменьшению содержания жира в организме, поддержанию веса или содержанию жира в организме или предупреждение или сведение к минимуму набора веса в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD). В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени представляет собой фиброз печени.

[00149] В некоторых вариантах осуществления в раскрытии представлен способ обеспечения уменьшения стеатоза в печени субъекта с заболеванием печени, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 30% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение

тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55% или по меньшей мере 60% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

[00150] В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 30% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55% или по меньшей мере 60% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

[00151] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен способ обеспечения уменьшения воспаления в печени субъекта с неалкогольной жировой болезнью печени, предусматривающий введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение воспаления в печени у субъекта на по меньшей мере 50% по сравнению с воспалением в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение воспаления в печени у субъекта на по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% по сравнению с воспалением в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

[00152] В некоторых вариантах осуществления способ обеспечения уменьшения уровня коллагена в печени у субъекта с заболеванием печени предусматривает введение субъекту: i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение уровня коллагена в печени у субъекта на по меньшей мере 25% по сравнению с уровнем коллагена в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается уменьшение уровня коллагена в печени у

субъекта на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45% или по меньшей мере 50% по сравнению с уровнем коллагена в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

Фармацевтические составы

[00153] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлена фармацевтически приемлемая композиция, содержащая ингибитор экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00154] Термины "композиция" или "фармацевтическая композиция" относятся к композициям, содержащим ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1, представленные в данном документе, вместе, например, с фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или разбавителями, предназначенным для введения субъекту, нуждающемуся в лечении, например, субъекту-человеку с заболеванием печени.

[00155] Термин "фармацевтически приемлемый" относится к композициям, которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для контакта с тканями людей и животных без избыточной токсичности или других осложнений в соответствии с разумным соотношением польза/риск. "Фармацевтическая композиция" или "фармацевтический состав" могут включать смесь веществ, подходящих для введения индивидууму. Например, фармацевтическая композиция может содержать одно или несколько соединений или их соль и стерильный водный раствор. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. "Фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель" означает любое вещество, подходящее для применения при введении индивидууму. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой стерильный водный раствор, такой как PBS, или воду для инъекций.

[00156] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат фармацевтически приемлемую соль. "Фармацевтически приемлемые соли" означают физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединений, таких как олигомерные соединения или олигонуклеотиды, т. е. соли, которые сохраняют требуемую биологическую активность исходного соединения и не придают ему нежелательных токсических свойств.

[00157] Дополнительно представлены композиции, например, фармацевтические композиции, которые содержат эффективное количество ингибитора экспрессии PNPLA3 и агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1, представленных в данном документе, которые составлены для лечения метаболических заболеваний, например заболевания печени. "Эффективное количество" представляет собой такое количество ингибитора экспрессии PNPLA3 и агониста рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1, представленных в данном документе, введение которого субъекту, или в однократной дозе, или в качестве части серии доз, является эффективным для лечения, например лечения заболевания печени. Данное количество может представлять собой фиксированную дозу для всех субъектов, подлежащих лечению, или может изменяться в зависимости от веса, состояния здоровья и физического состояния субъекта, подлежащего лечению, требуемой степени потери веса или поддержания веса, состава пептида, профессиональной оценки медицинского случая и других значимых факторов.

[00158] Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии с известными способами. Подходящие способы получения описаны, например, в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1995), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Композиция может быть представлена во множестве форм, в том числе без ограничения в форме водного раствора, эмульсии, геля, суспензии, лиофилизированной форме или любой другой форме, известной из уровня техники. Кроме того, композиция может содержать фармацевтически приемлемые добавки, в том числе, например, разбавители, связующие, стабилизаторы и консерванты. Непосредственно после составления композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту.

[00159] Носители, которые можно использовать с композициями по настоящему изобретению, хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения, например, тироглобулин, альбумины, такие как сывороточный альбумин человека, столбнячный анатоксин и полиаминокислоты, такие как поли-L-лизин, поли-L-глутаминовая кислота, коровий белок вируса гриппа, вируса гепатита В и т. п. Можно использовать ряд водных носителей, например, воду, забуференную воду, 0,8% физиологический солевой раствор, 0,3% глицин, гиалуроновую кислоту и т. п. Композиции можно стерилизовать с помощью обычных хорошо известных методик стерилизации или можно стерилизовать посредством фильтрации. Полученная в результате композиция может быть упакована для применения как есть или лиофилизирована, при этом перед введением лиофилизированный препарат объединяют со стерильным раствором. Композиции могут содержать фармацевтически

приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для того, чтобы приблизительно соответствовать физиологическим условиям, например, вещества для регулирования pH и буферные вещества, вещества для регулирования тоничности, смачивающие вещества и т. п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и т. д. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для парентерального введения

[00160] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлен набор, содержащий: i) ингибитор экспрессии PNPLA3 и ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представлены в наборе в одинаковой лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представлены в наборе в разных лекарственных формах.

[00161] Все ссылки, цитируемые в данном документе, в том числе патенты, заявки на патенты, статьи, пособия и т. п., и ссылки, цитируемые в них, до той степени, в которой они уже не являются таковыми, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Комбинация ингибирования с обеспечением сайленсинга PNPLA3 и терапии на основе инкретина – двойной агонист рецепторов GLP-1 и глюкагона обладает превосходной эффективностью в отношении улучшения состояния при неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), неалкогольном стеатогепатите (NASH) и фиброзе печени

Введение

[00162] Неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) и ее более запущенная патогенная форма – неалкогольный стеатогепатит (NASH) являются неразрешенными медицинскими проблемами, которые затрагивают большую и продолжающую увеличиваться популяцию (Younossi et al Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109). NAFLD определена как избыточное накопление жира в печени (жировая печень), вызываемое причинами, отличными от употребления алкоголя, и включает NAFL и NASH, фиброз и цирроз. Жировая печень прогрессирует до стеатогепатита, NASH, с фиброзом или без него у разной части индивидуумов, приводя в конечном итоге к развитию цирроза печени, печеночной недостаточности и гепатоцеллюлярной карциномы у восприимчивых индивидуумов (Friedman et al Nat Med, 2018, DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9).

[00163] NAFLD и NASH характеризуются большим вкладом генетического компонента. Наиболее распространенной мутацией, ассоциированной с данными состояниями, является вариант rs738409 (148M) гена, кодирующего белок 3, содержащий домен пататин-подобной фосфолипазы (*PNPLA3*) (Carlsson et al *Aliment Pharmacol Ther*, 2020, DOI: 10.1111/apt.15738). Сайленсинг *Pnpla3* в печени улучшает состояние при NAFLD, NASH и ассоциированном фиброзе печени мышшиной модели, генетически сконструированной со встраиванием варианта аллеля человека, являющегося фактором риска (148M), в мышшиный ген *Pnpla3* (Lindén et al *Mol Metab*, 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013).

[00164] Ожирение и сахарный диабет 2 типа (T2DM) являются основными факторами риска развития NAFLD и NASH, и было показано, что процедуры лечения инкретиновыми гормонами, которые обеспечивают уменьшение веса тела и улучшение гомеостаза глюкозы, улучшают состояние при NAFLD и NASH. Такие инкретиновые гормоны включают аналоги пептидов, которые взаимодействуют с рецептором глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), рецепторами как GLP-1, так и глюкагона, или рецепторами GLP-1 и желудочного ингибиторного полипептида (GIP) (Newsome et al *NEJM*, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2028395; Ambry et al *Lancet*, 2018, DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30726-8; Boland et al *Nat Metab*, 2020, DOI: 10.1038/s42255-020-0209-6 и Hartman et al *Diabetes Care*, 2020, DOI: 10.2337/dc19-1892; Kannt et al *Diabetes Obes Metab*, 2020, DOI: 10.1111/dom.14035).

[00165] Была выдвинута гипотеза, что комбинированное лечение посредством ингибирования с обеспечением сайленсинга *PNPLA3* и активации рецепторов инкретиновых гормонов может обладать аддитивным полезным эффектом при лечении NAFLD, NASH и фиброза печени. С целью изучения указанного выше эффекта использовали генетически сконструированную мышшиную модель с аллелем риска развития NASH *PNPLA3* I148M человека при скармливании рациона, индуцирующего NASH. Затем этих мышшей обрабатывали посредством: 1) контрольного антисмыслового олигонуклеотида (ASO); 2) ASO к *Pnpla3*; 3) котадутида, пептида, являющегося сбалансированным двойным агонистом рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона; или 4) комбинации ASO к *Pnpla3* и котадутида.

[00166] В данном исследовании впервые продемонстрировано, что комбинирование обработки посредством ингибирующего и обеспечивающего сайленсинг ASO к *PNPLA3* с обработкой миметиками инкретина (проиллюстрировано котадутидом) неожиданно показывает достижение превосходящих полезных эффектов обработки при NAFLD, NASH и фиброзе печени. Результаты, достигаемые за счет комбинированной обработки,

показывают синергетический эффект по сравнению с соответствующими средствами обработки по отдельности.

Материалы и методы

cEt-5'-GalNAc₃-конъюгированный-cEt ASO к Pnpla3 мыши и котадутид

[00167] Использовали оптимальный эффективный мышинный 16-мерный ASO, модифицированный S-конформационно ограничением этилом (cEt), который нацеливается на ген *Pnpla3* мыши (5'-TATTTTTGGTGTATCC-3') (SEQ ID NO: 37) (Lindén et al Mol Metab, 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013). Данный мышинный ASO к *Pnpla3* модифицировали путем конъюгирования на 5'-конце с трехантенным N-ацетилгалактозамином (GalNAc₃) для дополнительного усиления нацеливания на клетки печени *in vivo* после подкожного введения. Специфичность целевого нокдауна была продемонстрирована с применением химически соответствующего GalNAc₃-конъюгированного ASO, представлявшего собой скремблированный контроль (5'-GGCCAATACGCCGTCA-3')(SEQ ID NO: 38). Котадутид (MEDI0382) был сконструирован с обеспечением баланса агонистического воздействия на рецептор GLP-1 и рецептор глюкагона (со смещением ~5:1 в сторону аффинности к рецептору GLP-1) (Henderson et al Diabetes Obes Metab, 2016, DOI: 10.1111/dom.12735).

Животные

[00168] Все эксперименты с животными проводились с гуманным отношением, и они были одобрены Комиссией по этике обращения с экспериментальными животными Гетеборга, Швеция. Виварий получил полную аккредитацию от Ассоциации по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AAALAC). Мутацию I148M в *PNPLA3* человека вводили в ген *Pnpla3* мыши путем замены кодона, кодирующего изолейцин, на кодон, кодирующий метионин, в аминокислотном положении 148 гена *Pnpla3* мыши с применением гомологичной рекомбинации, что было описано ранее (Lindén et al Mol Metab, 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013). Гетерозиготных мышей *Pnpla3*^{I48M} скрещивали друг с другом с получением экспериментальных гомозиготных мышей с нокином *Pnpla3*^{I48M/M} для фармакологического исследования. У всех экспериментальных животных подтверждали правильный генотип с применением ПЦР перед началом исследования и снова подтверждали с применением ПЦР после его завершения, как было описано ранее (Lindén et al Mol Metab, 2019, DOI: 10.1016/j.molmet.2019.01.013). Всех животных содержали в прозрачных клетках из стекла Makrolon с подстилкой из осиновой древесной стружки и подстилочным материалом для гнездования, и в виварии контролировали температуру (21 ± 1°C) и влажность (50 ± 10%).

У мышей был свободный доступ к водопроводной воде и корму, и их содержали с циклом 12 ч день/ночь.

[00169] Самцам мышей с *Pnpla3*^{148M/M} (возрастом 6-8 недель) скормливали рацион с высоким содержанием жиров (40 ккал % жиров (без трансжиров, Primex Shortening), фруктозы (20 ккал %) и холестерина (2%) (рацион для NASH; D16022301, Research Diets, Нью-Брансуик, Нью-Джерси) в течение 22 недель. Затем мышей распределяли в группы исследования на основе веса тела, и скормливали им тот же рацион для индуцирования NASH, и вводили дозы 1) контрольный ASO + физиологический солевой раствор, 2) ASO к *Pnpla3* + физиологический солевой раствор, 3) ASO + котадутид или 4) ASO к *Pnpla3* + котадутид в течение 14 недель. ASO вводили в дозе 5 мг/кг/неделя путем введения двумя подкожными инъекциями в неделю с солевым раствором в качестве носителя. Котадутид вводили в дозе 1 нмоль/кг путем введения подкожных инъекций с физиологическим солевым раствором в качестве носителя ежедневно. Мышам, которые не получали обработку котадутидом, ежедневно вводили посредством инъекции носитель (физиологический солевой раствор), так что все животные получали одинаковое количество подкожных инъекций. Во время исследования регистрировали значения веса тела. При умерщвлении не кормленных мышей подвергали эвтаназии изофлураном (Forene, Abbot Scandinavia AB, Швеция), кровь отбирали и выделяли плазму крови, отбирали печень и образцы (из одного и того же положения в левой доле у всех мышей) фиксировали с помощью 4% формальдегида в PBS для гистологического исследования или подвергали быстрой заморозке в жидком N₂ и хранили при -80°C.

Гистологическое исследование печени

[00170] Фиксированные формальдегидом, залитые парафином срезы печени мышей толщиной четыре мкм (один срез на мыш) окрашивали в стандартном порядке с использованием гематоксилина и эозина (HE). Смежные срезы окрашивали иммуногистохимическим методом на коллаген 1A1 (Col1A1, LS-C343921, BioSite, США). Препараты сканировали в Panoramic Scan II (3Dhistech, Венгрия) и цифровые изображения анализировали с применением программы для анализа изображений Visiopharm (версии 2020.03.0.7300, Visiopharm, Херсхольм, Дания) путем определения окрашенной на галектин 3 или коллаген 1A1 площади на общую площадь среза.

[00171] Стеатоз печени определяли путем проведения оценки срезов печени, окрашенных с использованием HE. Степень тотального стеатоза печени определяли путем измерения общего количества липидных капель в виде процентной доли от площади среза. Макровезикулярный стеатоз определяли путем измерения количества больших липидных капель в виде процентной доли от площади среза. Микровезикулярный стеатоз определяли

путем измерения количества небольших липидных капель в виде процентной доли от площади среза.

[00172] Макрофаги печени определяли путем окрашивания разных срезов печени на галектин-3 (Mac2) и определения процентной доли окрашенного среза.

[00173] Балл оценки активности NAFLD (NAS) определяли в соответствии со способом, описанным Kleiner *et al.* (Kleiner et al Hepatology, 2005, DOI: 10.1002/hep.20701). NAS был основан на комбинации балла оценки стеатоза печени (стеатоз <5% = балл 0, 5% – 33% = балл 1, >33% – 66% = балл 2, >66% = балл 3) и балла оценки воспаления (нет очагов = балл 0, <2 очага в поле зрения при увеличении 200x = балл 1, 2-4 очага в поле зрения при увеличении 200x = балл 2, >4 очага в поле зрения при увеличении 200x = балл 3). Баллонную гепатоцеллюлярную дистрофию не обнаруживали ни в одной из печени мышей, и это не было неожиданным, поскольку это редко наблюдается в доклинических моделях NASH на грызунах в отличие от патологии NASH у человека. Все процедуры гистологической оценки проводились сертифицированным ветеринарным врачом-патологом, которые были заслеплены относительно обработки.

Получение РНК и qPCR

[00174] РНК выделяли из быстрозамороженной ткани печени с применением набора RNeasy Mini (Qiagen, Германия). cDNA-матрицы получали путем обратной транскрипции с помощью набора для cDNA (ThermoFisher Scientific, Стокгольм, Швеция) и использовали для количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием прибора QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems, Стокгольм, Швеция). Использовали коммерческий полный анализ для анализирования экспрессии mRNA *Pnpla3* мыши (Mm00504420_m1, TaqMan, Life Technologies Europe, Стокгольм, Швеция). Результаты нормализовали по большому рибосомному белку Р0 мыши (*Rplp0*, *36B4*) с использованием прямого праймера 5'-GAGGAATCAGATGAGGATATGGGA-3' (SEQ ID NO: 39), обратного праймера 5'-AAGCAGGCTGACTTGGTTGC-3' (SEQ ID NO: 40) и FAM-TAM-меченного зонда 5'-TCGGTCTCTTCGACTAATCCCGCCAA-3' (SEQ ID NO: 41) (Sigma-Aldrich) в качестве референтного гена.

Статистический анализ

[00175] Отличия между группами обработки исследовали с применением 1-факторного ANOVA с последующим ретроспективным анализом с применением критерия Тьюки (GraphPad Prism v.8.0.1., программное обеспечение GraphPad, Калифорния). Отличия между группами обработки по показателю активности NAFLD (NAS), полученному на основе гистологического исследования печени, анализировали с помощью анализа порядковой регрессии с последующей корректировкой согласно групповой вероятности

ошибки с применением критерия Шидака. Значимым считали p -значение менее 0,05. Данные представлены в виде отдельных значений и в виде средние значения \pm стандартная погрешность среднего (SEM).

Результаты и выводы

Комбинированная обработка посредством ASO к Pnpla3 и котадутида обладает аддитивными эффектами в улучшении состояния при NAFLD, NASH и фиброзе печени у мышей с Pnpla3^{148M/M}, которым скармливали рацион, вызывающий NASH

[00176] С целью исследования комбинированной обработки посредством ASO к Pnpla3 и котадутида гомозиготным мышам с нокином Pnpla3^{148M/M} скармливали рацион, вызывающий NASH, в течение 36 недель. Во время последних 14 недель их также обрабатывали либо посредством ASO к Pnpla3, либо посредством котадутида отдельно или в комбинации и сравнивали с животными, обработанными контрольным ASO (все мыши получали одинаковое количество подкожных инъекций). Обработка котадутидом, но не обработка посредством ASO к Pnpla3, обеспечивала уменьшение набора веса тела во время периода обработки по сравнению с животными, обработанными контрольным ASO (фигура 1A). Обработка посредством ASO к Pnpla3, но не обработка котадутидом, обеспечивала заметное уменьшение уровней mRNA Pnpla3 в печени на $\geq 97\%$ (фигура 1B).

[00177] Степень общего стеатоза печени (фигура 2A), степень макровезикулярного стеатоза (фигура 2B) и степень микровезикулярного стеатоза (фигура 2C) определяли, как описано. Окрашенные срезы показаны на фигуре 2D, при этом для каждого среза представлена процентная доля общего количества липидных капель на участок. Как можно увидеть на фигурах 2A-C, комбинированная обработка посредством ASO к Pnpla3 и котадутида обеспечивала значительное уменьшение выраженности всех типов стеатоза по сравнению с каким-либо из средств обработки по отдельности. Процентную долю макрофагов печени (фигура 3A) и балл оценки воспаления (фигура 3B) определяли для каждого варианта обработки, как описано. Как показано на фигурах 3A и 3B, макрофаги печени и баллы оценки воспаления были сниженными во всех группах обработки по сравнению с контролем.

[00178] Балл оценки активности NAFLD (NAS) рассчитывали, как описано выше. Обработка посредством ASO к Pnpla3 обеспечивала уменьшение NAS по сравнению с животными, обработанными контрольным ASO ($p < 0,005$) (фигура 4). Обработка котадутидом также обеспечивала уменьшение NAS по сравнению с животными, обработанными контрольным ASO ($p < 0,001$) (фигура 4). Важно отметить, что комбинированная обработка посредством ASO к Pnpla3 и котадутида обеспечивала уменьшение NAS по сравнению с животными, обработанными контрольным ASO

($p < 0,001$), по сравнению с животными, обработанными посредством ASO к Pnpla3 ($p < 0,001$), и по сравнению с животными, обработанными котадутидом ($p < 0,001$) (фигура 4). Данные результаты показывают, что комбинированная обработка посредством ингибирования с нокдауном Pnpla3 и посредством двойного агониста рецепторов GLP-1 и глюкагона обладает улучшенным полезным эффектом обработки в улучшении состояния при NAFLD и NASH.

[00179] Наблюдалась тенденция к тому, что обработка посредством ASO к Pnpla3 обеспечивает уменьшение фиброза печени, что измерено по содержанию коллагена 1A1 в печени, а также наблюдалась тенденция к тому, что обработка котадутидом обеспечивает уменьшение содержания коллагена 1A1 в печени (фигура 5). Важно отметить, что комбинированная обработка посредством ASO к Pnpla3 и котадутидом обеспечивала значительное уменьшение содержания коллагена 1A1 в печени по сравнению с животными, обработанными контрольным ASO ($p < 0,005$) (фигура 5). Таким образом, эти результаты показывают, что комбинированная обработка посредством ингибирования с нокдауном Pnpla3 и посредством двойного агониста рецепторов GLP-1 и глюкагона обладает превосходящим полезным эффектом обработки в улучшении состояния при фиброзе печени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения заболевания печени у субъекта, предусматривающий введение субъекту:

i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и

ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

2. Способ по п. 1, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

3. Способ по п. 2, где антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5567-5731 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

4. Способ по п. 2, где антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5644-5731 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

5. Способ по п. 2, где антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5567-5642 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

6. Способ по п. 2, где антисмысловой олигонуклеотид комплементарен участку, расположенному в пределах нуклеотидов 5567-5620 нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

7. Способ по любому из пп. 2-6, где нуклеиновая кислота, кодирующая PNPLA3, представляет собой mRNA.

8. Способ по любому из пп. 2-7, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 нуклеозидов.

9. Способ по любому из пп. 2-7, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 нуклеозидов.

10. Способ по любому из пп. 2-9, где антисмысловой олигонуклеотид содержит один или несколько модифицированных сахарных фрагментов.

11. Способ по п. 10, где один или несколько модифицированных сахарных фрагментов представляют собой 2'-дезоксид, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиметил, 2'-О-метоксиэтил, 2'-фтор, 4'-CH(CH₃)-O-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' или их комбинации.

12. Способ по любому из пп. 2-11, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одно или несколько модифицированных оснований.

13. Способ по п. 12, где одно или несколько модифицированных оснований представляют собой 5-метилцитозин.

14. Способ по п. 13, где каждый цитозин в антисмысловом олигонуклеотиде представляет собой 5'-метилцитозин.

15. Способ по любому из пп. 2-14, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или несколько неприродных межнуклеозидных связей.

16. Способ по п. 15, где одна или несколько межнуклеозидных связей представляют собой фосфоротиоатные связи.

17. Способ по п. 16, где каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.

18. Способ по любому из пп. 2-17, где антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

19. Способ по любому из пп. 2-17, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

20. Способ по любому из пп. 2-19, где антисмысловой олигонуклеотид содержит:

а) гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

б) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

с) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

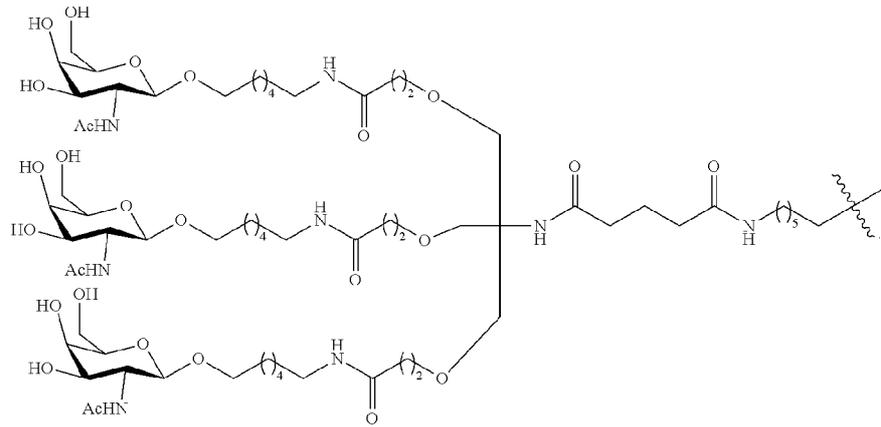
при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар,

при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

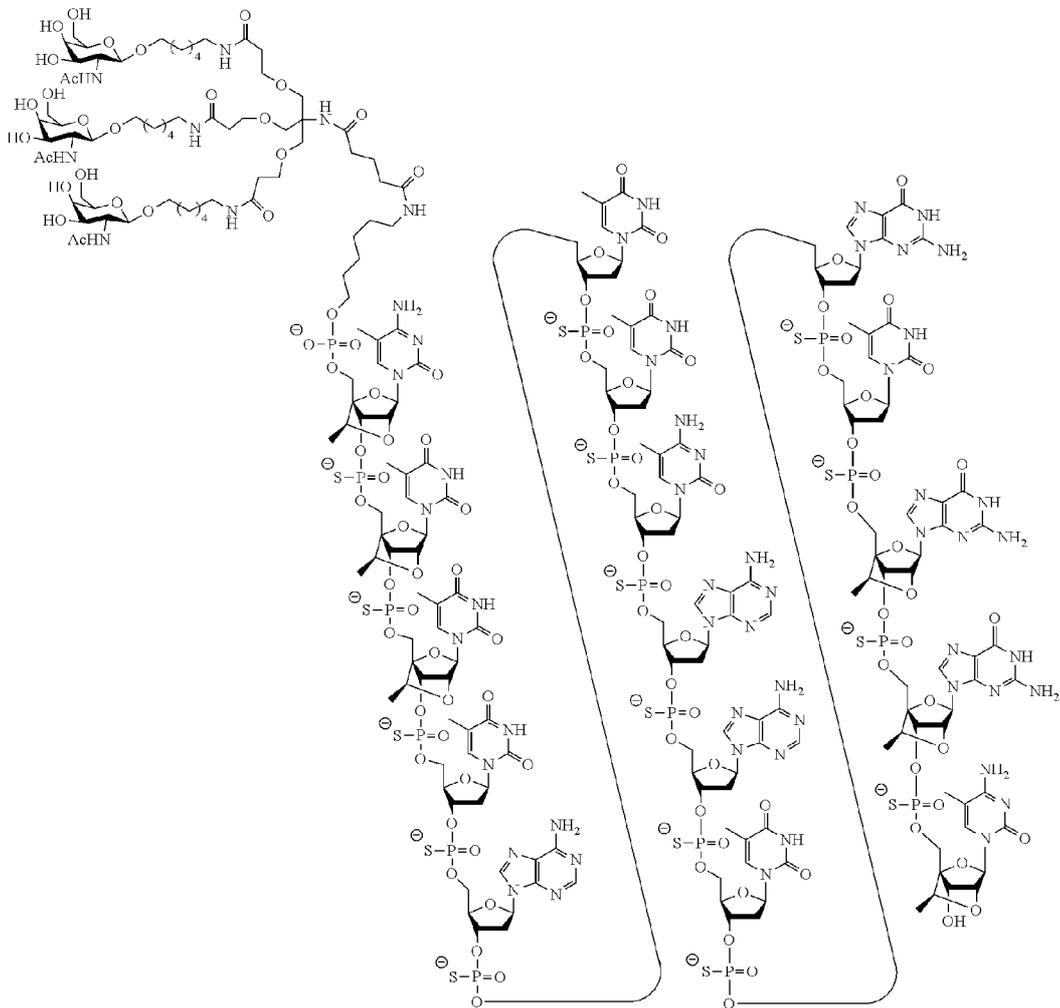
21. Способ по любому из пп. 2-20, где ингибитор экспрессии PNPLA3 дополнительно содержит конъюгированную группу.

22. Способ по п. 21, где конъюгированная группа расположена на 5'-конце антисмыслового олигонуклеотида.

23. Способ по п. 21 или п. 22, где конъюгированная группа представляет собой



24. Способ по любому из пп. 1-23, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой соединение следующей формулы (SEQ ID NO: 2):



или его фармацевтически приемлемую соль.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид.

26. Способ по п. 25, где пептид содержит аминокислотную последовательность:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30
(SEQ ID NO: 25),

собой А, X27 представляет собой Е, X28 представляет собой А и X30 представляет собой G (SEQ ID NO:19).

27. Способ по п. 25, где пептид содержит аминокислотную последовательность HSQGTFTSDKSEYLDSEARDFVAWLEAGG (SEQ ID NO: 33).

28. Способ по любому из пп. 25-27, где пептид дополнительно предусматривает модификацию аминокислоты в аминокислотной последовательности.

29. Способ по п. 28, где модификация представляет собой присоединение ацильного фрагмента.

30. Способ по п. 29, где модификация представляет собой пальмитоильный фрагмент при N(эпсилон)-группе остатка лизина.

31. Способ по п. 30, где пальмитоильная группа связана с лизином посредством линкера.

32. Способ по п. 31, где линкер представляет собой гамма-глутаминовую кислоту.

33. Способ по любому из пп. 1-32, где ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят одновременно.

34. Способ по любому из пп. 1-32, где ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 1 часа.

35. Способ по любому из пп. 1-32, где ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 24 часов.

36. Способ по любому из пп. 1-32, где ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах 72 часов.

37. Способ по любому из пп. 1-32, где ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах одной недели.

38. Способ по любому из пп. 1-32, где ингибитор экспрессии PNPLA3 и агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят друг за другом в пределах двух недель.

39. Способ по любому из пп. 1-38, где ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят парентерально.

40. Способ по любому из пп. 1-39, где ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в сутки, дважды в сутки или три раза в сутки.

41. Способ по любому из пп. 1-39, где ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в неделю, дважды в неделю или три раза в неделю.

42. Способ по любому из пп. 1-39, где ингибитор экспрессии PNPLA3 вводят один раз в месяц, дважды в месяц или три раза в месяц.

43. Способ по любому из пп. 1-42, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят парентерально.

44. Способ по любому из пп. 1-42, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в сутки, дважды в сутки или три раза в сутки.

45. Способ по любому из пп. 1-42, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в неделю, дважды в неделю или три раза в неделю.

46. Способ по любому из пп. 1-42, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 вводят один раз в месяц, дважды в месяц или три раза в месяц.

47. Способ по любому из пп. 1-46, где у субъекта имеется ожирение и/или сахарный диабет 2 типа.

48. Способ по любому из пп. 1-47, где заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD).

49. Способ по любому из пп. 1-47, где заболевание печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит.

50. Способ по любому из пп. 1-47, где заболевание печени представляет собой фиброз печени.

51. Способ обеспечения уменьшения стеатоза в печени субъекта с заболеванием печени, предусматривающий введение субъекту:

i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и

ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

52. Способ по п. 51, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

53. Способ по п. 52, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 нуклеозидов.

54. Способ по п. 52, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 нуклеозидов.

55. Способ по любому из пп. 52-54, где антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

56. Способ по любому из пп. 52-54, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

57. Способ по любому из пп. 52-56, где антисмысловой олигонуклеотид содержит:

a) гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

b) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

с) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

58. Способ по любому из пп. 51-57, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид.

59. Способ по п. 58, где пептид содержит аминокислотную последовательность:

NX2QGTF TSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30
(SEQ ID NO:25),

где

(1) X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y, X12 представляет собой K, X13 представляет собой K, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 14);

(2) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 15);

(3) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой K, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой E, X16 представляет собой G, X17 представляет собой Q, X18 представляет собой A, X20 представляет собой K, X21 представляет собой E, X23 представляет собой I, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой K и X30 представляет собой R (SEQ ID NO: 20);

(4) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой S, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет

собой А, X27 представляет собой Е, X28 представляет собой А и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 18);

(5) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой Е, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой Е, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой А, X27 представляет собой Е, X28 представляет собой А и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 33) или

(6) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой А, X27 представляет собой Е, X28 представляет собой А и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 19).

60. Способ по любому из пп. 51-59, где обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

61. Способ по любому из пп. 51-59, где обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 30% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

62. Способ по любому из пп. 51-59, где обеспечивается уменьшение тотального стеатоза печени у субъекта на по меньшей мере 30% по сравнению с тотальным стеатозом печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

63. Способ по любому из пп. 51-62, где заболевание печени представляет собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD).

64. Способ по любому из пп. 51-62, где заболевание печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит.

65. Способ по любому из пп. 51-62, где заболевание печени представляет собой фиброз печени.

66. Способ обеспечения уменьшения воспаления в печени субъекта с неалкогольной жировой болезнью печени, предусматривающий введение субъекту:

i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и

ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

67. Способ по п. 66, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

68. Способ по п. 67, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 нуклеозидов.

69. Способ по п. 67, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 нуклеозидов.

70. Способ по любому из пп. 67-69, где антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

71. Способ по любому из пп. 67-69, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

72. Способ по любому из пп. 67-71, где антисмысловой олигонуклеотид содержит:

a) гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;

b) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

c) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

73. Способ по любому из пп. 66-72, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид.

74. Способ по п. 73, где пептид содержит аминокислотную последовательность:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30
(SEQ ID NO:25),

где

(1) X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y, X12 представляет собой K, X13 представляет собой K, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24

представляет собой A, X27 представляет собой V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 14);

(2) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 15);

(3) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой K, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой E, X16 представляет собой G, X17 представляет собой Q, X18 представляет собой A, X20 представляет собой K, X21 представляет собой E, X23 представляет собой I, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой K и X30 представляет собой R (SEQ ID NO: 20);

(4) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой S, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 18);

(5) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 33) или

(6) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 19).

75. Способ по любому из пп. 50-58, где обеспечивается уменьшение воспаления в печени у субъекта на по меньшей мере 50% по сравнению с воспалением в печени в случае

введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

76. Способ обеспечения уменьшения уровня коллагена в печени у субъекта с заболеванием печени, предусматривающий введение субъекту:

- i) ингибитора экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и
- ii) агониста рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

77. Способ по п. 76, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

78. Способ по п. 77, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 12 до 30 нуклеозидов.

79. Способ по п. 77, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 16 до 30 нуклеозидов.

80. Способ по любому из пп. 77-79, где антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

81. Способ по любому из пп. 77-79, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

82. Способ по любому из пп. 77-81, где антисмысловой олигонуклеотид содержит:

- a) гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;
- b) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и
- c) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

83. Способ по любому из пп. 76-82, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид.

84. Способ по п. 83, где пептид содержит аминокислотную последовательность:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30
(SEQ ID NO:25),

где

собой А, Х27 представляет собой Е, Х28 представляет собой А и Х30 представляет собой G (SEQ ID NO:19).

85. Способ по любому из пп. 50-84, где обеспечивается уменьшение уровня коллагена в печени у субъекта на по меньшей мере 25% по сравнению с уровнем коллагена в печени в случае введения ингибитора экспрессии PNPLA3 или агониста рецептора глюкагона/рецептора GLP-1 по отдельности.

86. Способ по любому из пп. 50-85, где у субъекта имеется ожирение и/или сахарный диабет 2 типа.

87. Способ по любому из пп. 50-85, где заболевание печени представляет собой неалкогольный стеатогепатит.

88. Способ по любому из пп. 50-85, где заболевание печени представляет собой фиброз печени.

89. Фармацевтически приемлемая композиция, содержащая:

i) ингибитор экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3);

ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1);

iii) по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

90. Композиция по п. 89, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

91. Композиция по п. 90, где антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

92. Композиция по п. 90, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

93. Композиция по любому из пп. 90-92, где антисмысловой олигонуклеотид содержит:

а) гЭП-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксирибонуклеозидов;

б) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и

с) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом гЭП-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

94. Композиция по любому из пп. 89-93, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид.

95. Композиция по п. 94, где пептид содержит аминокислотную последовательность:

HX2QGTFTSDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30
(SEQ ID NO:25),

где

(1) X2 представляет собой S, X10 представляет собой Y, X12 представляет собой K, X13 представляет собой K, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой V, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 14);

(2) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 15);

(3) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой K, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой E, X16 представляет собой G, X17 представляет собой Q, X18 представляет собой A, X20 представляет собой K, X21 представляет собой E, X23 представляет собой I, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой K и X30 представляет собой R (SEQ ID NO: 20);

(4) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой S, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой S, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO: 18);

(5) X2 представляет собой S, X10 представляет собой K, X12 представляет собой E, X13 представляет собой Y, X15 представляет собой D, X16 представляет собой S, X17 представляет собой E, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет

собой А, Х27 представляет собой Е, Х28 представляет собой А и Х30 представляет собой G (SEQ ID NO: 33) или

(6) Х2 представляет собой S, Х10 представляет собой К, Х12 представляет собой S, Х13 представляет собой Y, Х15 представляет собой D, Х16 представляет собой S, Х17 представляет собой R, Х18 представляет собой R, Х20 представляет собой R, Х21 представляет собой D, Х23 представляет собой V, Х24 представляет собой А, Х27 представляет собой Е, Х28 представляет собой А и Х30 представляет собой G (SEQ ID NO:19).

96. Композиция по любому из пп. 89-95, где композиция составлена для парентерального введения.

97. Набор, содержащий:

- i) ингибитор экспрессии белка 3, содержащего домен пататин-подобной фосфолипазы (PNPLA3), и
- ii) агонист рецептора глюкагона и/или рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1).

98. Набор по п. 97, где ингибитор экспрессии PNPLA3 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, который комплементарен области нуклеиновой кислоты, кодирующей PNPLA3.

99. Набор по п. 98, где антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 8 смежных оснований из любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

100. Набор по п. 98, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

101. Набор по любому из пп. 98-100, где антисмысловой олигонуклеотид содержит:

- a) гэп-сегмент, состоящий из десяти связанных дезоксинуклеозидов;
- b) 5'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов; и
- c) 3'-концевой фланговый сегмент, состоящий из трех связанных нуклеозидов;

при этом гэп-сегмент расположен между 5'-концевым фланговым сегментом и 3'-концевым фланговым сегментом, при этом каждый нуклеозид каждого флангового сегмента содержит конформационно ограниченный этилом сахар; при этом каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и при этом каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

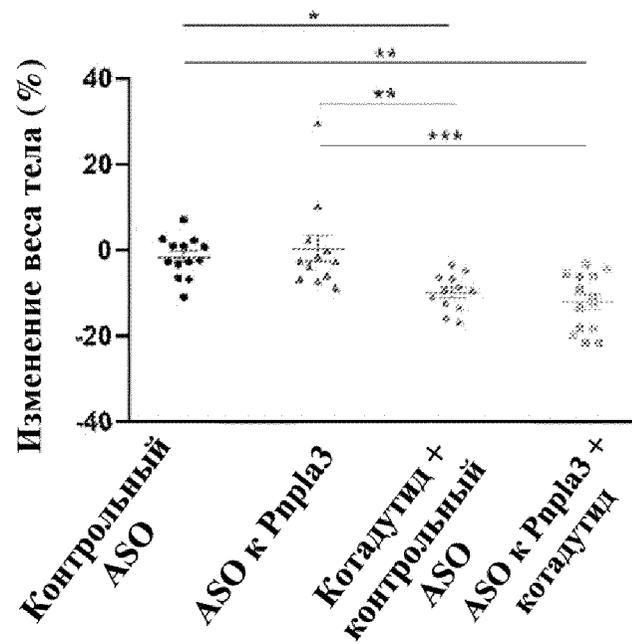
102. Набор по любому из пп. 97-101, где агонист рецептора глюкагона и/или рецептора GLP-1 представляет собой пептид.

103. Набор по п. 102, где пептид содержит аминокислотную последовательность:

собой S, X17 представляет собой R, X18 представляет собой R, X20 представляет собой R, X21 представляет собой D, X23 представляет собой V, X24 представляет собой A, X27 представляет собой E, X28 представляет собой A и X30 представляет собой G (SEQ ID NO:19).

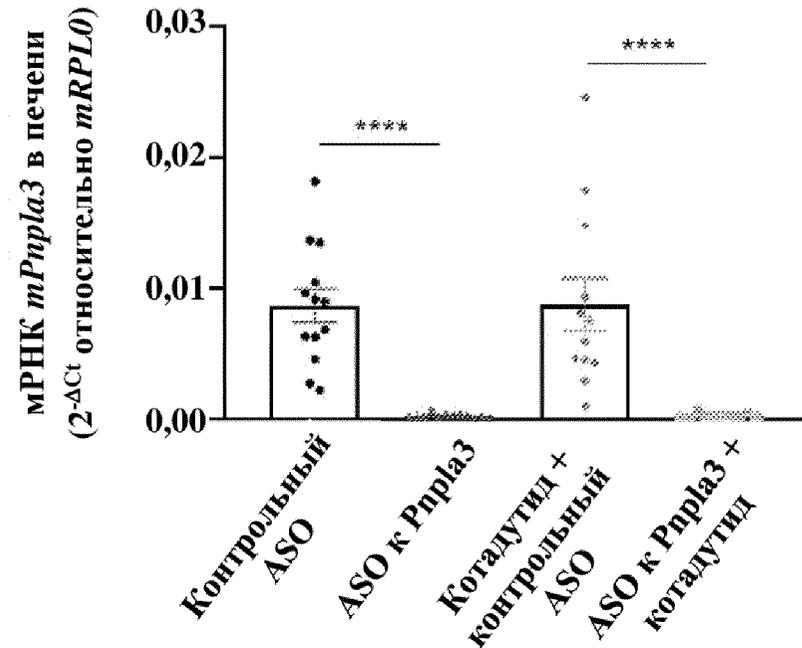
ФИГУРА 1

А



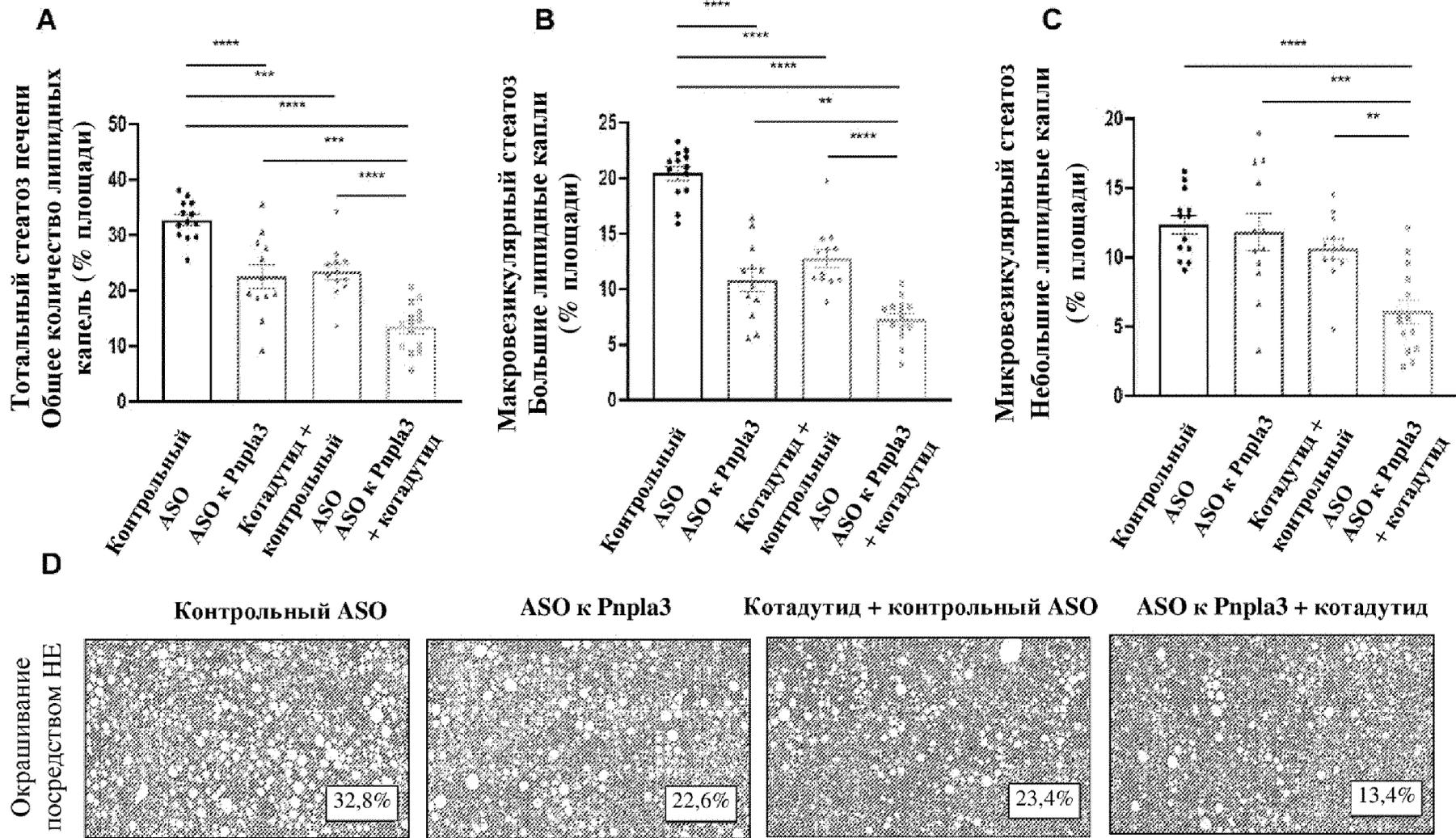
* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$, 1-факторный Анова с последующим анализом с помощью критерия Тьюки

В

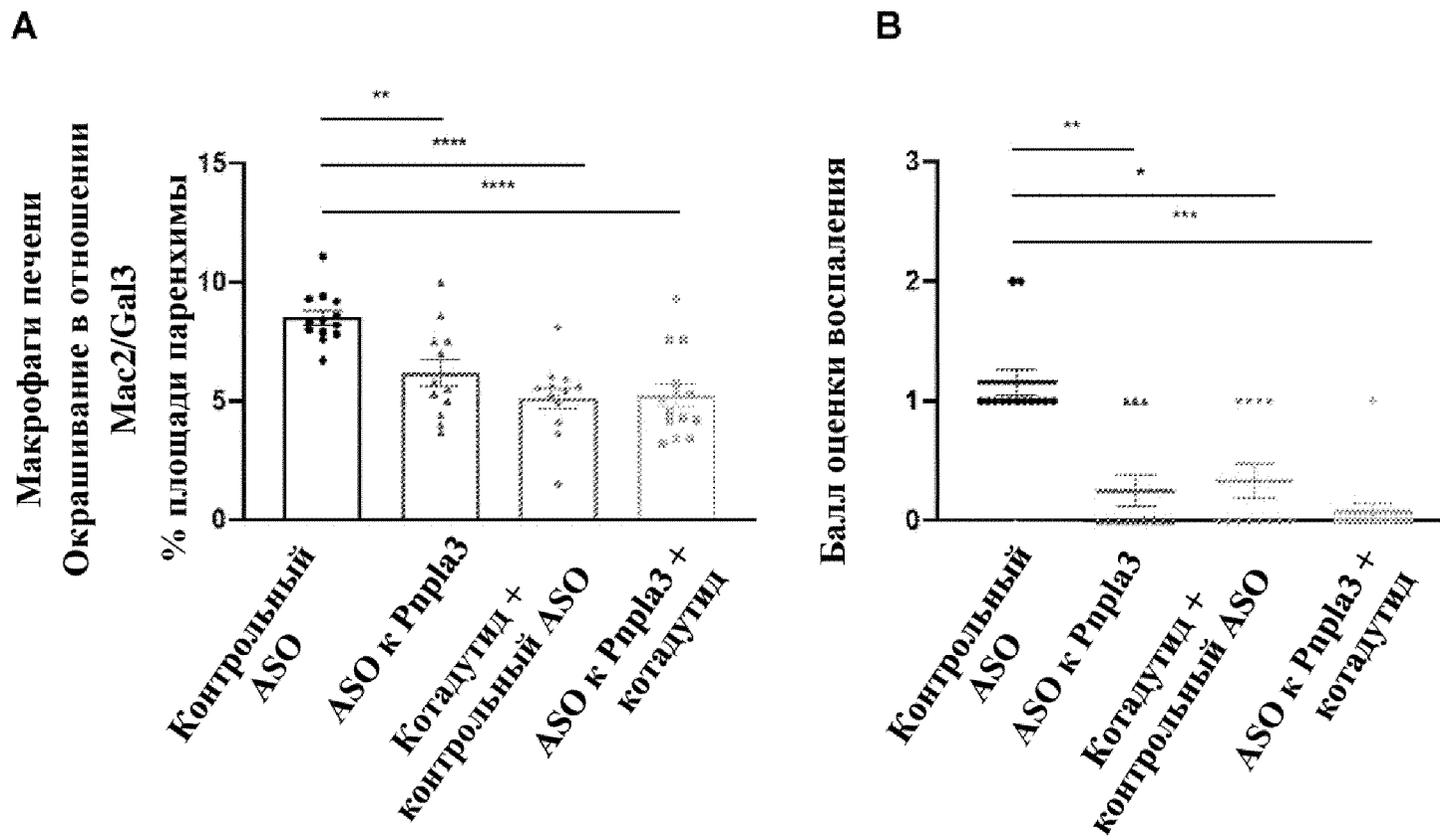


**** = $p < 0,0001$, 1-факторный Анова с последующим анализом с помощью критерия

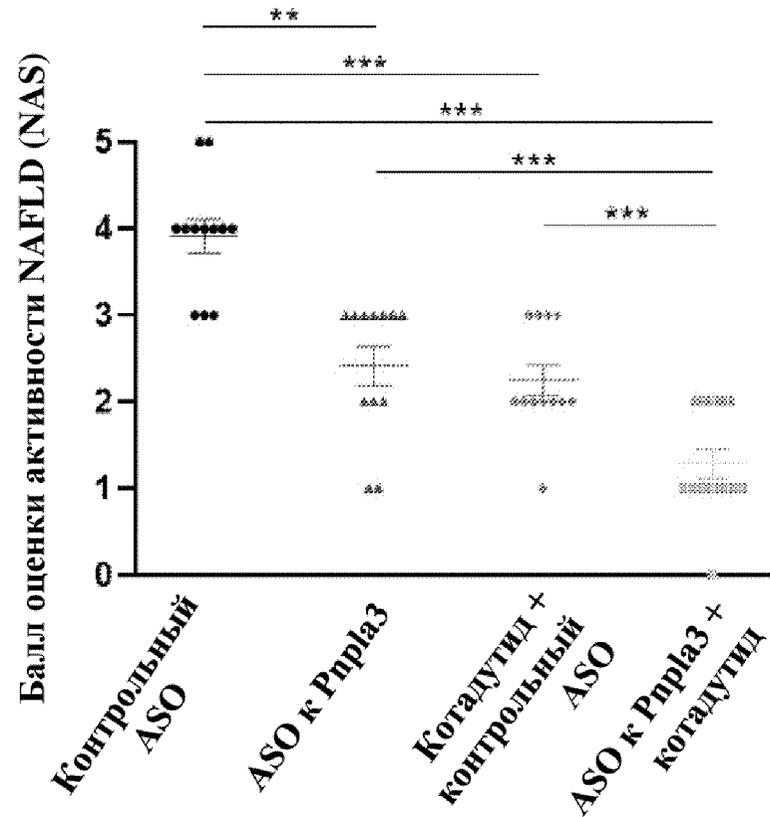
ФИГУРА 2



ФИГУРА 3

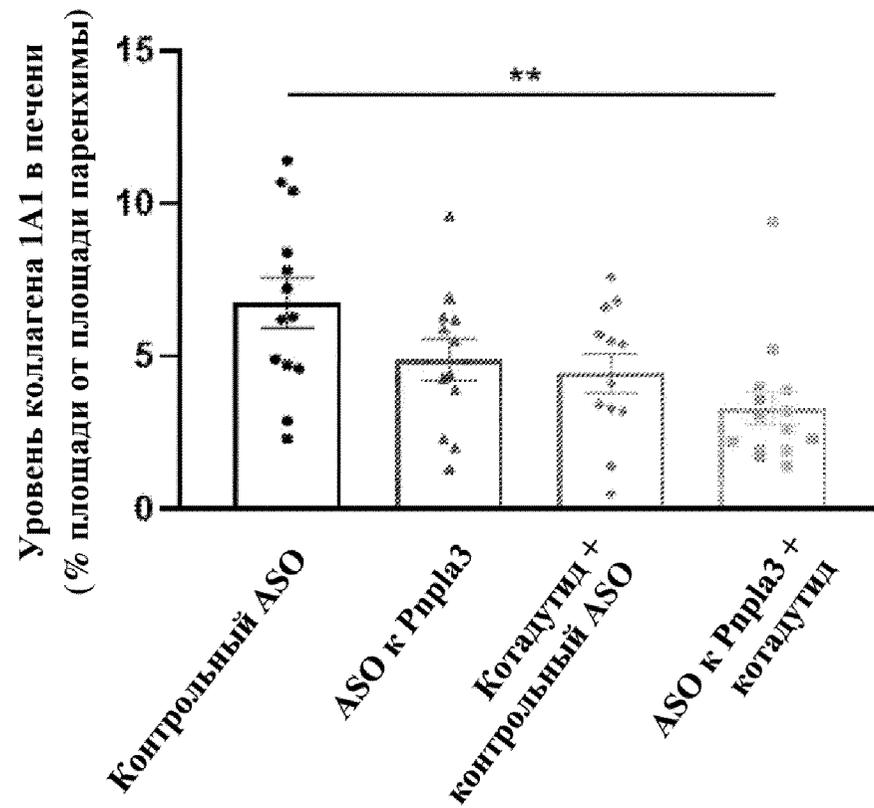


ФИГУРА 4



** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, порядковая регрессия с последующей корректировкой согласно групповой вероятности ошибки с применением критерия

ФИГУРА 5



** = <0,005, 1-факторный Анова с последующим анализом с помощью критерия Тьюки