



(51) МПК  
*A61K 31/7076* (2006.01)  
*C07H 19/167* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C07H 19/167* (2021.08); *A61K 31/7076* (2021.08); *A61P 3/10* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2019134865, 01.05.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**01.05.2018**

Дата регистрации:  
**28.01.2022**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**19.05.2017 US 62/508,730**

(43) Дата публикации заявки: 21.06.2021 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 28.01.2022 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: **19.12.2019**

(86) Заявка РСТ:  
**US 2018/030371 (01.05.2018)**

(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2018/212980 (22.11.2018)**

Адрес для переписки:  
**190000, Санкт-Петербург, БОКС-1125**

(72) Автор(ы):

**ЛАНЬ, Цзы-Цзянь (US),  
ПАУЭР, Ронан (US),  
ЯННИКУРИС, Александр (US),  
ЙЕРРАМРЕДДИ, Тирупати Редди (US)**

(73) Патентообладатель(и):  
**ОЛЛТЕК, ИНК. (US)**

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: ЕР 3144001 A1, 22.03.2017. WO  
2017048253, 23.03.2017. RU 2298557 C2,  
10.05.2007.

R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2

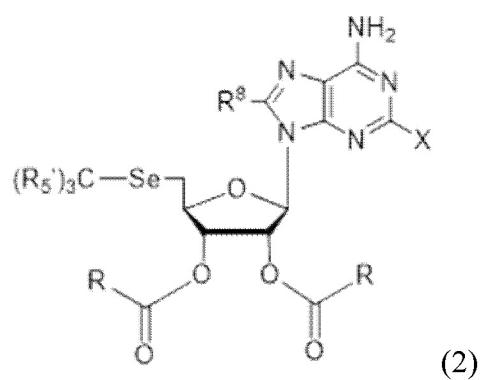
(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К НИМ

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к области химии, фармацевтики и медицине, а именно к селенсодержащим соединениям, которые полезны для лечения связанных с диабетом типа II расстройств, представленным общей формулой 2, или его фармацевтически приемлемой соли или сложному эфиру, причем R<sup>8</sup> представляет собой H; X представляет собой H; каждый R<sub>5</sub>' независимо представляет собой H или галоген; и каждый R независимо представляет собой C<sub>1</sub>-алкил, каждый из которых независимо может быть необязательно замещен 1-3 кратно галогеном. Кроме того, описаны

фармацевтические композиции для модуляции метаболизма глюкозы и на основе этих соединений, способ лечения расстройств, связанных с инсулином, также описаны способ ингибирования выработки глюкозы, способ снижения уровня HbA1c в сыворотке, способ снижения уровня HbA1c в сыворотке, способ повышения толерантности к глюкозе, способ усиления фосфорилирования Pdk1, Akt, AS160 и Foxo1 в печени и/или в скелетных мышцах и др. Технический результат предложенной группы изобретения состоит в обеспечении превосходной активности, в снижении выработки глюкозы в печени и/или улучшении толерантности к глюкозе

у инсулинорезистентных пациентов с диабетом.  
15 н. и 21 з.п. ф-лы, 28 ил., 1 табл., 11 пр.



R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2

R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2



(51) Int. Cl.

A61K 31/7076 (2006.01)

C07H 19/167 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07H 19/167 (2021.08); A61K 31/7076 (2021.08); A61P 3/10 (2021.08)

(21)(22) Application: 2019134865, 01.05.2018

(24) Effective date for property rights:  
01.05.2018Registration date:  
28.01.2022

Priority:

(30) Convention priority:  
19.05.2017 US 62/508,730

(43) Application published: 21.06.2021 Bull. № 18

(45) Date of publication: 28.01.2022 Bull. № 4

(85) Commencement of national phase: 19.12.2019

(86) PCT application:  
US 2018/030371 (01.05.2018)(87) PCT publication:  
WO 2018/212980 (22.11.2018)Mail address:  
190000, Sankt-Peterburg, BOKS-1125

(72) Inventor(s):

LAN, Tszy-Tszyan (US),  
PAUER, Ronan (US),  
YANNIKURIS, Aleksandros (US),  
JERRAMREDDI, Tirupati Reddi (US)

(73) Proprietor(s):

OLLTEK, INK. (US)

R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2

R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2

## (54) PHARMACEUTICAL AGENTS, COMPOSITIONS, AND METHODS RELATED THERETO

(57) Abstract:

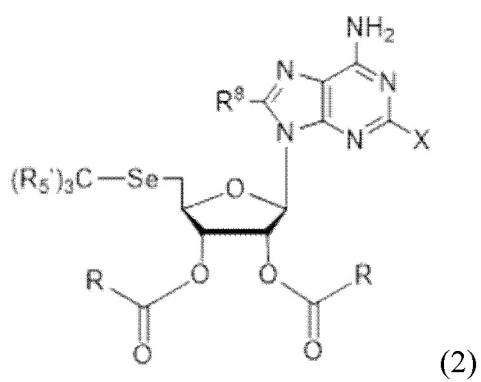
FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present group of inventions relates to the field of chemistry, pharmaceuticals, and medicine, namely, to selenium-containing compounds useful for treating disorders associated with type II diabetes, represented by the general formula 2, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, wherein R<sup>8</sup> represents H; X represents H; each R<sub>5</sub>' independently represents H or halogen; and each R independently represents <sub>1-6</sub>alkyl, each whereof may be independently optionally substituted 1 to 3 times with halogen. Also described are pharmaceutical compositions for modulating glucose metabolism and, on the basis of the above compounds, a method for

treating disorders associated with insulin, also described are a method for inhibiting production of glucose, a method for reducing the level of HbA1c in the serum, a method for reducing the level of HbA1c in the serum, a method for increasing glucose tolerance, a method for enhancing phosphorylation of Pdk1, Akt, AS160, and Foxo1 in the liver and/or skeletal muscles, etc.

EFFECT: provided excellent activity, reduction in the glucose production in the liver and/or improved glucose tolerance in insulin-resistant patients with diabetes.

36 cl, 28 dwg, 1 tbl, 11 ex



(2)

R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2

R U 2 7 6 5 2 8 6 C 2

## ПРИТЯЗАНИЕ НА ПРИОРИТЕТ

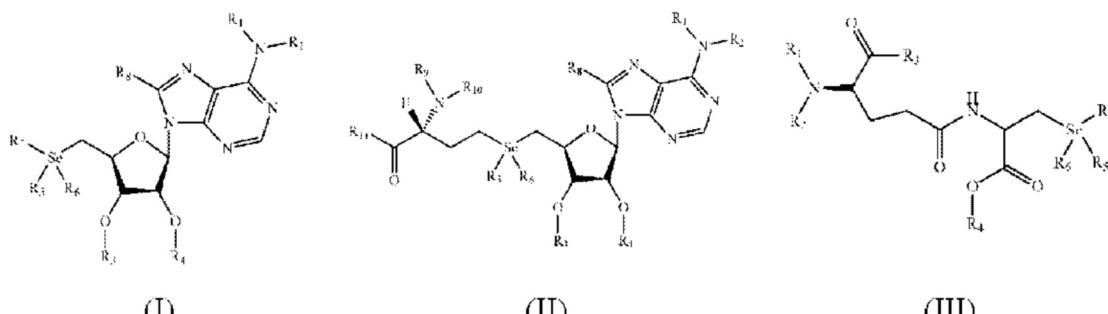
[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США №62/508730, поданной 19 мая 2017 года. Все содержание данной приоритетной заявки включено в настоящий документ посредством ссылки.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Диабет представляет собой группу метаболических заболеваний, при которых в течение длительного периода повышается уровень сахара в крови. Существуют различные виды диабета. Диабет I типа является результатом неспособности поджелудочной железы вырабатывать достаточное количество инсулина. Диабет II типа начинается с инсулинерезистентности, состояния, при котором клетки не реагируют на инсулин должным образом и могут вызывать недостаток инсулина по мере прогрессирования заболевания. В мире насчитывается примерно 400 миллионов пациентов с диабетом, причем диабет II типа составляет примерно 90% случаев. Инсулин или аналоги инсулина обычно используются для лечения диабета I типа. Метформин обычно рекомендуют в качестве первой линии лечения диабета II типа.

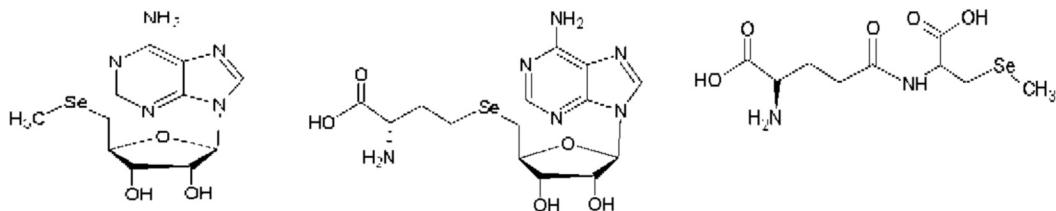
### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] В предыдущей работе (см. WO 2015/137983, US 2016/0045533 (выдан патент США №9642874) и US 2016/0082033, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки), определены некоторые селенорганические соединения, которые проявляют интересную и ценную активность в определенных модельных системах заболеваний. В частности, в настоящем документе определены соединения формул I, II и III, изображенные ниже:



для которых сообщают следующие:

1. Комбинация следующих трех соединений: 5'-метилселеноаденозина (соединение C, которое представляет собой соединение формулы I), Se-аденозил-L-гомоцистеина (соединение D, которое представляет собой соединение формулы II) и гамма-глутамилметилселеноцистеина (соединение E, которое представляет собой соединение формулы III),



Соединение C

Соединение D

Соединение E

но не отдельные соединения, может значительно ослаблять экспрессию Gbrs, тем самым представляя новый способ снижения выработки глюкозы в печени (см. WO 2015/137983);

2. Соединения C и D, каждое в отдельности, могут усиливать митохондриальный

(МТ) потенциал в миобластах C2C12 скелетных мышц мыши, что позволяет предположить, что соединения С и D могут быть потенциально полезны в области исследований и контроля сахарного диабета 2 типа (см. WO 2015/137983);

3. Комбинация соединений С, D и E может снижать выработку глюкозы в печени и

5 улучшать толерантность к глюкозе в инсулинерезистентной, диабетической модели мыши, так что комбинация соединений С, D и E может быть пригодна для лечения ожирения, гипергликемии и диабета (см. US 20160045533);

4. Соединения С и D могут быть пригодны для лечения саркопении, вызванной прогрессирующей потерей функции МТ в почке или скелетных мышцах (см. WO 2015/

10 137983);

5. Соединение С может усиливать глюконеогенез в клетках головного мозга, что может быть полезным для выживания клеток головного мозга при БА (см. US 20160082033); и

6. Соединения С и D могут ингибировать гиперфосфорилирование Тау в мозге при

15 БА (см. US 20160082033).

[004] Таким образом, в предшествующей работе продемонстрировано, что соединения С, D и E могут быть полезны для определенных целей; с конкретным указанием того, что в некоторых контекстах (например, ингибирование гиперфосфорилирования Тау в мозге при БА и усиление глюконеогенеза в клетках головного мозга) соединение С

20 или соединение D могут быть полезными сами по себе. В другом контексте (например, для снижения уровня глюкозы в печени, улучшения толерантности к глюкозе и/или иного эффективного лечения ожирения, гипергликемии и/или диабета) показано, что данные соединения не являются полезными по отдельности, но эффективны в комбинации.

25 [005] В настоящем описании предложены новые селенсодержащие соединения, имеющие некоторые структурные связи с соединениями формул I и II выше (и, в частности, с соединениями С и D), которые неожиданно проявляют сильную активность отдельно в разных контекстах.

[006] В настоящем описании продемонстрировано, среди прочего, что предложенные

30 соединения проявляют биологическую активность, сравнимую или превосходящую активность комбинации CDE, в снижении выработки глюкозы в печени и/или улучшении толерантности к глюкозе у инсулинерезистентных пациентов с диабетом. В данном изобретении также указывается на то, что при условии, что соединения, вероятно, обладают биологической активностью, сравнимой или лучше, чем соединения С и/или D, в усилении глюконеогенеза (например, в клетках мозга) и/или в ингибировании гиперфосфорилирования Тау (например, в мозге при БА).

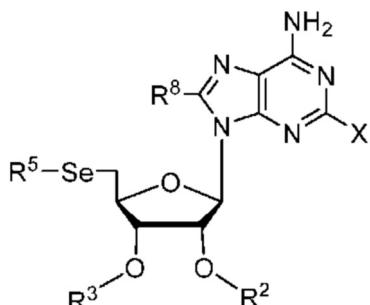
[007] В настоящем описании предложены композиции, которые содержат и/или доставляют такие соединения (и/или один или более продуктов разложения и/или их активных метаболитов), а также различные способы (например, изготовления,

40 характеристики и/или использования) и/или материалы (например, промежуточные продукты, продукты разложения, метаболиты [в частности, активные метаболиты] и т.д.), связанные с такими предоставленными соединениями. В некоторых вариантах реализации, предоставленные технологии относятся и/или особенно полезны для модуляции метаболизма глюкозы; усиление фосфорилирования AS160 для транслокации

45 белков-переносчиков глюкозы (GLUT) из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для захвата глюкозы; и/или усиление захвата глюкозы как в печени, так и в скелетных мышцах. В некоторых вариантах реализации, предоставленные технологии относятся и/или особенно полезны для лечения гиперинсулинемии, ожирения, диабета,

гипергликемии, синдрома поликистозных яичников (PCOS), болезни Альцгеймера (БА) и/или саркопении. В некоторых вариантах реализации, предложенные технологии относятся и/или особенно полезны для лечения связанных с диабетом типа II расстройств, таких как диабетическая ретинопатия, нефропатия, невропатия и 5 сосудистые расстройства.

[008] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложено соединение формулы (1):



(1)

или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер, где

каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо представляет собой H или  $-C(O)-R$ , где каждый R 20 независимо представляет собой  $C_{1-6}$ -алкил или 3-8-членный карбоциклик или гетероциклик, где  $R^2$  и  $R^3$  оба не могут представлять собой H;

или  $R^2$  вместе с  $R^3$  образуют  $-(CH_2)_n-C(O)-(CH_2)_m-$ , где каждый из n и m независимо равен 0-3 и  $n+m \leq 3$ ;

$R^5$  представляет собой  $-C_{1-6}$ -алкил или  $-C_{1-6}$ -алкил- $CH(NH_2)COOH$ ;

$R^8$  представляет собой H или галоген; и

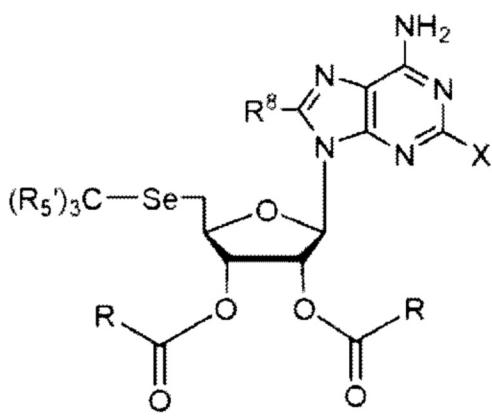
X представляет собой H или галоген;

где каждый из карбоциклила, гетероциклила,  $-(CH_2)_n-$  и  $-(CH_2)_m-$ фрагментов

независимо может быть необязательно замещен 1-3 кратно -OH, галогеном,  $NH_2$ , CN 30 или  $C_{1-6}$ -алкилами; и

каждый  $C_{1-6}$  алкильный фрагмент независимо может быть необязательно замещен 1-3 кратно -OH, галогеном,  $NH_2$  или CN.

[009] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложено соединение формулы (2):



(2),

или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер, где

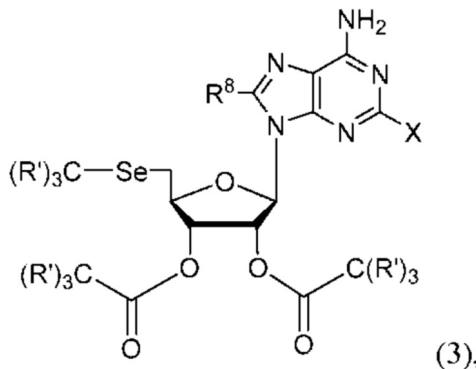
5  $R^8$  представляет собой H или галоген;

X представляет собой H или галоген;

каждый  $R_5'$  независимо представляет собой H или галоген; и

каждый R независимо представляет собой  $C_{1-6}$  алкил, каждый из которых, независимо, может быть необязательно замещен 1-3 кратно галогеном.

[0010] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложено соединение формулы (3):



или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер, где

20  $R^8$  представляет собой H или галоген;

X представляет собой H или галоген; и

каждый R' независимо представляет собой H или галоген.

[0011] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены композиции, которые содержат или доставляют соединение по любой из формул (1)-(3). В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены композиции,

25 содержащие соединение по любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер. В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены композиции, которые доставляют активный фрагмент соединения по любой из формул (1)-(3).

30 [0012] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения заболевания, расстройства или состояния путем введения соединения или композиции, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы усиливают фосфорилирование AS160 для транслокации белков-переносчиков глюкозы (GLUT) из цитозольных везикул в плазматическую мембрану

35 для захвата глюкозы. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы усиливают захват глюкозы как печенью, так и скелетными мышцами. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы ослабляют гиперинсулинемию, не нарушая функцию почек и/или не приводя к повреждению печени.

[0013] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены 40 способы лечения расстройств, связанных с инсулином, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0014] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены 45 способы лечения нарушений восприимчивости к инсулину, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0015] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения нарушений метаболизма глюкозы, включающие введение

терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, нарушения метаболизма глюкозы включают уровень глюкозы в крови, который не находится в пределах нормы. В некоторых вариантах реализации, нарушения

- 5 метаболизма глюкозы связаны с дефектным поглощением и/или переносом глюкозы. В некоторых вариантах реализации, нарушения метаболизма глюкозы представляют собой сахарный диабет, дефицит глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, глюкозурию, гипергликемию, гиперинсулинизм или гипогликемию.

[0016] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены

- 10 способы лечения нарушений переноса глюкозы, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, нарушения переноса глюкозы представляют собой нарушение всасывания глюкозы-галактозы, синдром Фанкони-Бикеля или болезнь Де Виво (синдром дефицита GLUT1 15 (GLUT1DS)).

[0017] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения ожирения, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

- 20 [0018] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения диабета, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0019] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены

- 25 способы лечения гипергликемии, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0020] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения синдрома поликистозных яичников (PCOS), включающие введение

- 30 терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0021] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения болезни Альцгеймера (БА), включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

- 35 [0022] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения саркопении, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

- 40 [0023] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы ингибирования выработки глюкозы, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

- 45 [0024] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы повышения толерантности к глюкозе, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0025] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы активации и/или восстановления функции рецептора инсулина и нисходящей передачи сигналов у субъекта в инсулинорезистентном состоянии, включающие введение

соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0026] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения митохондриальных заболеваний (например, вызванных

- 5 дисфункциональными митохондриями), включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, митохондриальные заболевания могут представлять собой дегенеративные заболевания (например, рак, сердечно-сосудистые заболевания и сердечную недостаточность, диабет
- 10 2 типа, болезнь Альцгеймера и Паркинсона, ожирение печени, катаракту, остеопороз, истощение мышц, такое как саркопения, нарушения сна и воспалительные заболевания, такие как псориаз, артрит и колит). В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы усиления митохондриальной функции, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-
- 15 (3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0027] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы усиления глюконеогенеза в головном мозге, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах

- 20 реализации, предложенные способы увеличивают захват глюкозы мозгом. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы предназначены для поддержания или восстановления функций мозга, включая память и обучение.

- 25 [0028] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы получения соединения по любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[0029] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы характеризации соединения по любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

- 30 [0030] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы получения композиции, как описано в настоящем документе.

[0031] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы характеризации композиции, как описано в настоящем документе.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

- 35 [0032] Фиг. 1. Влияние инсулина и чистых соединений (перечисленных в таблице 1) на выработку глюкозы в клетках HepG2. Клетки обрабатывали 0,24% ДМСО (максимальный объем испытуемого растворителя соединения), инсулином или перечисленными соединениями в бессывороточной среде для выработки глюкозы в течение 48 ч. Данные были нормализованы по количеству клеток, как описано выше, и представлены как среднее ± СОС по меньшей мере 3 образцов на группу.

- 40 [0033] Фиг. 2. Сравнение активности Соединения №43 и метформина в клетках HepG2 и Н4ПЕ. Клетки HepG2 обрабатывали 0,24% ДМСО (максимальный объем растворителя Соединения №43), инсулином, Соединением №43 и метформином в бессывороточной среде для выработки глюкозы в течение 48 ч, тогда как клетки печени крысы обрабатывали в течение 24 ч. Уровни глюкозы в культуральной среде были
- 45 нормализованы по количеству клеток в каждом образце. Данные представлены в виде среднего ± СОС от 3 до 8 образцов на группу.

[0034] Фиг. 3. Дифференциальные эффекты соединения № С, №50 и №43 на уровни глюкозы в крови и уровни HbA1c в сыворотке у мышей Lepr<sup>db/db</sup> после хронического

лечения. Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения - ДМСО), Соединение №C, №50 и №43 в дозе 2,5 мкг селена каждого соединения на килограмм массы тела ежедневно, начиная с возраста 38 дней. В возрасте 81 дня уровень глюкозы в крови мышей натощак определяли с помощью глюкометра. Уровни сывороточного HbA1c мышей определяли через 90 дней после рождения. Относительные уровни HbA1c были получены после того, как уровни HbA1c у мышей, которых лечили Соединением №C, №50 и №43, были разделены на средние уровни HbA1c у мышей, которых лечили физиологическим раствором. Данные представлены как среднее ± СОС указанного количества животных.

Значения Р были получены путем сравнения лечения с контрольной/физиологической группой.

[0035] Фиг. 4. Влияние соединения №43 и его серосодержащего аналога №68 на уровни глюкозы в крови и уровни HbA1c у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения.

Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения ДМСО), соединение №43 и №68 в дозе 25 мкг селена или серы в виде Соединения №43 (0,136 мг) или соединения №68 (0,298 мг), соответственно, на килограмм массы тела ежедневно, начиная с 38-дневного возраста. В возрасте 128 дней определяли уровни глюкозы в крови мышей и уровни HbA1c у мышей, которых не кормили в течение ночи. Уровни HbA1c у мышей, которых лечили Соединением №43 и №68, были разделены на средние уровни HbA1c у мышей, которых лечили физиологическим раствором, для получения относительных уровней HbA1c. Данные представлены в виде среднего ± СОС указанного количества животных. Уровни глюкозы в крови натощак у мышей без диабета/с ожирением (обозначенные символом # на гистограмме) были получены от 4-месячных мышей-самцов дикого типа C57 в лаборатории. Различные буквы на гистограмме указывают значение Р менее чем 0,05.

[0036] Фиг. 5. Дифференциальное влияние соединения №43, №69 и №70 на уровни глюкозы в крови натощак и уровней HbA1c у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения. Самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в возрасте 41 дня внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения- ДМСО), Соединение №43 (0,136 мг), №69 (0,145 мг) и №70 (0,153 мг) в дозе 25 мкг селена каждого соединения на килограмм массы тела ежедневно в течение 43 дней (для анализа глюкозы в крови) и 90 дней (для анализа HbA1c), затем их не кормили в течение ночи, и анализировали уровень глюкозы в крови (с использованием глюкометра) или анализировали уровень HbA1c в крови. Данные представлены как среднее ± СОС указанного количества животных. Значения Р были получены путем сравнения лечения с контрольной/физиологической группой.

[0037] Фиг. 6. Острое лечение Соединением №43 привело к снижению уровня глюкозы в крови у самцов мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ . Самцов мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в возрасте 8-10 недель не кормили в течение ночи, а затем внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% ДМСО, максимальный введенный объем исходного растворителя Соединения №43), 0,0054, 0,054, 0,54 и 5,4 мг Соединения №43/кг массы тела. Были исследованы уровни глюкозы в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  непосредственно до и после инъекции через 1, 2, 3, 5 и 8 ч (в условиях голодаия, но со свободным доступом к воде). Пониженные уровни глюкозы у отдельных мышей были получены путем вычитания уровня глюкозы непосредственно перед инъекцией из уровня глюкозы в крови в каждый период времени после инъекции. Данные представлены в виде среднего ± СОС

указанного количества животных. За исключением показанных значений Р, которые относятся к ранним временными точкам лечения 0,0054 мг/кг массы тела, все другие сокращения были значительными ( $P<0,05$ ) по сравнению с соответствующими временными точками для инъекции ДМСО/физиологического раствора.

<sup>5</sup> [0038] Фиг. 7. Острое лечение Соединением №43 снижало уровни глюкозы в крови у самцов мышей  $Lepr^{db/db}$  в условиях ad-libitum. Уровни глюкозы в крови 6-недельных самцов мыши  $Lepr^{db/db male}$  со свободным доступом к пище и воде определяли до и через 24 ч после внутрибрюшинной инъекции физиологического раствора (содержащего 0,2% растворителя соединения ДМСО) или Соединения №43 в дозе 5,4 мг/кг массы тела. Относительные уровни глюкозы в крови до в/б, были нормализованы по среднему уровню глюкозы у всех пяти мышей в группе и обозначались как 100%. После 24 ч после инъекции относительный уровень глюкозы в крови у каждой мыши был нормализован по уровню глюкозы перед инъекцией. Разные буквы представляют статистически значимое расхождение ( $P<0,05$ ) между группами.

<sup>10</sup> [0039] Фиг. 8. Острое лечение Соединением №43 улучшает толерантность к глюкозе у мышей  $Lepr^{db/db}$ . А-В. Самцам 38-дневных мышей  $Lepr^{db/db}$  внутрибрюшинно вводили (А) физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения ДМСО), Соединение №43, Соединение № С и Соединение №50 ежедневно в течение 43 дней или <sup>15</sup> Соединение (В) №68 или Соединение №43 в течение 60 дней. С. Самцам 41-дневных мышей  $Lepr^{db/db}$  внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя ДМСО соединения), Соединение №43, Соединение №69 и Соединение №70 ежедневно в течение 43 дней. Ежедневная инъекционная доза всех перечисленных соединений составляла 25 мкг селена или серы на испытуемое соединение на килограмм <sup>20</sup> массы тела. В конце лечения, мышам, голодавшим в течение ночи, инъектировали глюкозу (2 г/кг массы тела) и уровни глюкозы в крови непосредственно перед инъекцией глюкозы (называемой нулевой временной точкой) и через 0,25 ч, 0,5 ч, 1 ч и через 2 ч <sup>25</sup> после введения глюкозы измеряли с использованием глюкометра с максимальным показанием 600 мг/дл. Уровень глюкозы, превышающий этот предел, был зарегистрирован как 600 мг/дл. Данные представлены как Среднее ± СОС указанного количества животных. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  по сравнению с мышами, которым <sup>30</sup> вводили физиологический раствор (А, С) или (В) Соединение №68 в тот же момент времени.

<sup>35</sup> [0040] Фиг. 9. Пониженный уровень мРНК G6rc в печени  $Lepr^{db/db}$  мышей после острого лечения Соединением №43. Мышам  $Lepr^{db/db}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения- ДМСО), Соединение №50 и №43 в дозе 25 мкг селена каждого соединения на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. Количественную ПЦР с детекцией <sup>40</sup> в реальном времени проводили на РНК печени, выделенной из этих, которых лечили соединением мышей. Уровень мРНК G6rc в каждом образце был нормализован по уровню мРНК Actb, и данные представлены в виде среднего ± СОС для пяти мышей на группу. Значение Р относительно физиологического раствора.

<sup>45</sup> [0041] Фиг. 10. Ингибирование основного уровня экспрессии G6rc/G6PC Соединением №43 в клетках AML-12 и HepG2 человека и совместное действие как Соединения №43, так и инсулина в ингибировании экспрессии G6rc в клетках AML-12. (А) Влияние соединений селена на экспрессию G6rc в клетках AML-12 в бессывороточных условиях. Клетки AML-12 обрабатывали без (контроля) или с

помощью комбинации соединения CDE, соединения № С, соединения № D, Соединения №50 и Соединения №43 в дозе 300 частей на миллиард (ч/млрд) селена (эквивалентно 3,8 мкМ каждого соединения) в бессывороточной среде, содержащей инсулин-трансферрин-селенит натрия (ITS) и дексаметазон (Dex), в течение 24 ч. (B)

- 5 Ингибиование экспрессии G6PC Соединением №43 в клетках НерG2 человека. Клетки НерG2 инкубировали с 100 нМ инсулина или 600 ч/млрд Соединения №43 в бессывороточной среде в течение 40 ч. (C) Ингибиование экспрессии G6rc Соединением №43 и совместное действие как Соединения №43, так и инсулина в ингибиовании экспрессии G6rc в клетках AML-12, которые были предварительно обработаны
- 10 Соединением №43. Клетки AML-12 предварительно обрабатывали Соединением №43 в FBS-содержащей, но свободной от ITS/Dex среде в течение 24 ч с последующей повторной обработкой Соединением №43 в присутствии или в отсутствие 10 нМ инсулина в бессывороточной свободной от ITS/Dex среде в течение 6 ч. Уровень мРНК G6rc в каждом образце был нормализован по уровню мРНК Actb, и данные
- 15 представлены в виде среднего ± СОС указанного количества образца в каждой группе. Значение Р на панели А-В сравнивали с контрольной группой. Различные буквы на панели С представляют статистическую значимость ( $P<0,05$ ) между этими двумя группами.

[0042] Фиг. 11. Ингибиование экспрессии G6rc Соединением №43 и совместное действие как Соединения №43, так и инсулина в ингибиовании экспрессии G6rc в клетках AML-12, стимулированных диабетическими стимулами.

Клетки AML-12 предварительно обрабатывали Соединением №43 в 10% FBS-содержащей, но свободной от ITS/Dex среде в течение 24 ч с последующей повторной обработкой Соединением №43 в присутствии или в отсутствие инсулина вместе с 8-CPT/  
25 Dex (диабетические стимулы) в бессывороточной и свободной от ITS среде в течение 6 ч. Уровень мРНК G6rc в каждом образце был нормализован по уровню мРНК Actb, и данные представлены в виде среднего ± СОС указанного количества образца в каждой группе. Числа в верхней части каждого столбца представляют собой средние значения уровней мРНК G6rc, нормированные уровнем в группе, не получавшей 8-CPT/Dex  
30 (столбец №1). Различные буквы в столбцах представляют статистическую значимость ( $P<0,05$ ) между этими двумя группами.

[0043] Фиг. 12. Хроническое лечение Соединением №43 усиливает фосфорилирование передачи сигналов Pdk1/Akt/Foxo1 в печени инсулинерезистентных мышей Lep<sup>db/db</sup>  
35 согласно вестерн-блот анализу. Мышам Lep<sup>db/db</sup> постнатальный день 38 внутргибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения- ДМСО) или Соединение №43 в дозе 25 мкг селена на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. Вестерн-блоттинг проводили с тканями печени (100 мкг белка на полосу) мышей, получавших физиологический раствор или Соединение №43. (A) Вестерн-блот изображения. Уровни белка в каждом образце были  
40 нормализованы по уровню Gapdh, и данные представлены в виде среднего ± СОС для пяти мышей на группу в (B). Значение Р сравнивали с физиологическим раствором.

[0044] Фиг. 13. Кратковременная активация PDK1 и АКТ и последующая инактивация FOXO1 в клетках НерG2 печени человека с помощью Соединения # 43. Клетки НерG2 культивировали без сыворотки в течение ночи, инкубированы в отсутствии или в присутствии Соединения №43 (600 ч/млрд) в течение указанного времени, а затем подвергнуты Вестерн-блот анализу. (A) Репрезентативный Вестерн-блот. (B-F) Качественные показатели экспрессии белка (B) pPDK1, (C) pАКТ, (D) общего АКТ, (E) pFOXO1T24 и (F) общего FOXO1 на вестерн-блотте представлены как среднее ±

СОС для 3 образцов. \* Р меньше 0,05 по сравнению с уровнем белка при 0 мин (непосредственно перед обработкой соединением) или его контрольной группой в каждый момент времени.

[0045] Фиг. 14. Кратковременная активация Pdk1 и Akt, и усиление фосфорилирования

- 5 Foxo1 вызываемые Соединением №43 в клетках печени AML-12 мыши, культивируемых в условиях имитации диабета. AML-12 высевали, культивировали в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч, и затем культивировали без сыворотки в простых средах DMEM/F12 в течение ночи. Культивированные без сыворотки клетки AML12 обрабатывали диабетическими стимулами, 8-CPT (0,1 мМ) и Dex (0,5 мкМ), в 10 комбинации, без (контроль) или 10 нМ инсулина или Соединения №43 (300 ч/млрд) в простой среде DMEM/F12 в течение указанных моментов времени, а затем подвергали Вестерн-блоттингу. (A)

Репрезентативный Вестерн-блотт. (B-E) Количественные показатели уровней экспрессии белка на вестерн-блотте представлены в виде среднего ± СОС для 3 образцов.

- 15 \* Р<0,05 по сравнению с контролем (без обработки инсулином/Соединением №43) в каждый момент времени. Различные буквы в (E) представляют статистическую значимость (Р<0,05) между этими двумя группами.

[0046] Фиг. 15. Влияние Соединения №43 и Соединения №50 на экспрессию гена Glut4

- 20 в печени мышей Lepr<sup>db/db</sup>. Мышам Lepr<sup>db/db</sup> в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения - ДМСО), Соединение №50 или Соединение №43 в дозе 25 мкг селена каждого соединения на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили на образцах РНК печени, выделенной из обработанных 25 соединением мышей Lepr<sup>db/db</sup>. Уровень мРНК Glut4 в каждом образце был нормализован по уровню мРНК Actb, и данные представлены в виде среднего ± СОС для от четырех до пяти мышей на группу. Значения Р рассчитывали для лечения в сравнении с контрольной группой с физиологическим раствором.

[0047] Фиг. 16. Усиленная экспрессия мРНК Glut4 в клетках печени мыши AML-12

- 30 вызванная Соединением №43. (A) QRT-ПЦР базальной экспрессии Glut4 в клетках AML-12. Клетки AML-12 амплифицировали, высевали на 24-луночные планшеты и культивировали в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение ночи. Клетки затем инкубировали с носителем (0,024% ДМСО) или Соединением №43 (300 ч/млрд) в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение 24 ч. (B) ПЦР в реальном времени 35 экспрессии Glut4 в клетках AML-12, культивируемых в условиях имитации диабета.

- Амплифицированные клетки AML-12 высевали на 24-луночных планшетах, культивировали в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч, и затем культивировали без сыворотки в простых средах DMEM/F12 в течение ночи. Культивируемые без сыворотки клетки AML-12 затем инкубировали с носителем (0,024% 40 ДМСО) или с Соединением №43 (300 ч/млрд) в присутствии диабетических стимулов, 0,1 мМ 8-CPT (Sigma) и 0,5 мкМ Dex в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение 6 и 24 ч. Уровень мРНК Glut4 в каждом образце был нормализован по уровню мРНК Actb, и данные представлены в виде среднего ± СОС 3 образцов.

[0048] Фиг. 17. Усиленный захват глюкозы в клетках AML-12 (скелетные мышцы)

- 45 как после обработки инсулином, так и Соединением №43 в течение 1,5 ч.

Данные представлены в виде среднего ± СОС указанного количества образцов на группу. \* Значение Р было менее 0,05 по сравнению с базальной группой.

[0049] Фиг. 18. Усиленное фосфорилирование нижестоящих сигнальных молекул

инсулина - Pdk1, Akt и Foxo1 - в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  в ответ на лечение Соединением №43. Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения-ДМСО) или Соединение №43 в дозе 0,136 мкг Соединения №43 на 5 килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. Вестерн-блоттинг проводили на экстрактах белков скелетных мышц (100 мкг белка на полосу), полученных от мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ , получавших физиологический раствор или обработанных Соединением №43. (A) Изображения Вестерн-блота. (B) Количественные уровни белка (нормализованные 10 уровнями белка  $\beta$ -тубулина в каждом образце). Данные представлены в виде среднего  $\pm$  СОС для пяти мышей. Значение Р было получено путем сравнения с контрольной (физиологический раствор) группой.

[0050] Фиг. 19. Влияние инсулина и соединения №43 на захват глюкозы в дифференцированных мышечных клетках C2C12 (скелетные мышцы). Равное количество 15 клеток C2C12 высевали на 96-луночные планшеты (5000 клеток/лунку), культивировали в 10% FBS DMEM среде в течение 5 дней, дифференцировали в среду 0,5% DMEM, содержащую сыворотку лошади, в течение 7 дней. Полностью дифференцированные клетки C2C12 предварительно обрабатывали в отсутствии или в присутствии Соединения №43 (300 или 600 ч/млрд) в среде DMEM без сыворотки/глюкозы в течение ночи, а затем 20 инкубировали в отсутствии (базальный уровень) или в присутствии инсулина, Соединения №43 или обоих в свободной от глюкозы среде DMEM при 37°C в течение 1,5 ч. После обработок клетки инкубировали с 1 мМ 2-дезоксиглюкозой (2DG) при комнатной температуре в течение 30 мин, и затем подвергали люминесцентному анализу с использованием набора Promega для анализа захвата глюкозы-Glo. Данные 25 представлены в виде среднего  $\pm$  СОС указанное количество образцов для каждой группы. Значение Р было получено путем сравнения с базальной группой.

[0051] Фиг. 20. Восстановление функции рецептора инсулина (на что указывает повышенное фосфорилирование Insr $\beta$  по тирозину 1146) в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  после хронического лечения Соединением №43. 30 Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения-ДМСО) или Соединение №43 в дозе 0,136 мкг Соединения №43 на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. Вестерн-блоттинг проводили на экстрактах белков скелетных мышц (100 мкг белка на 35 полосу), полученных от мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ , получавших физиологический раствор или Соединение №43. (A) Изображения Вестерн-блотта. (B-C) Количественные уровни белка (нормализованные по уровню  $\beta$ -тубулина в каждом образце). Данные представлены в виде среднего  $\pm$  СОС для пяти мышей. Значения Р рассчитывали путем сравнения значений обработки со значениями в контрольной/физиологической группе.

[0052] Фиг. 21. Активация Insr и стимуляция фосфорилирования Pdk1/Akt/AS160 в дифференцированных мышечных клетках C2C12 (скелетные мышцы) с помощью Соединения №43. Равное количество клеток C2C12 высевали на 12-луночные планшеты (60000 клеток/лунку), культивировали в 10% FBS DMEM среде в течение 5 дней, дифференцировали в среду 0,5% DMEM, содержащую сыворотку лошади, в течение 7 45 дней. Полностью дифференцированные клетки C2C12 культивировали без сыворотки в течение ночи, а затем обрабатывали в отсутствии или в присутствии Соединения №43 (600 ч/млрд) или инсулина (200 нМ) в бессывороточной среде DMEM при 37°C в течение (A-B) 5 минут или (C-D) 30 минут, а затем подвергали Вестерн-блоттингу. (A, C)

Изображения Вестерн-блотта. (B, D) Количественные уровни белка (нормализованные по уровню  $\beta$ -тубулина в каждом образце). Данные представлены как среднее  $\pm$  СОС трех образцов на группу. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$  по сравнению с контрольной группой (без лечения соединением №43).

[0053] Фиг. 22. Восстановление функции рецептора инсулина (на что указывает повышенное фосфорилирование тирозина  $Insr\beta$  в печени инсулинерезистентных мышей  $Lepr^{db/db}$  после хронической обработки Соединением №43. Мышам  $Lepr^{db/db}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения-ДМСО) или Соединение №43 в дозе 0,136 мкг Соединения №43 на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. Экстракты белка печени, выделенные от мышей  $Lepr^{db/db}$ , которым вводили физиологический раствор или Соединение 43, подвергали анализу ИФА (A) фосфоро- $Insr\beta$  по Y1146 и (B) фосфоро- $Insr\beta$  по Y1150/1151 и Вестерн-блот анализу  $\beta$ -тубулина. (A) Уровни белка фосфоро- $Insr\beta$  по Y1146 (нормализованы по уровню  $\beta$ -тубулина в каждом образце). (B) Уровни белка фосфоро- $Insr\beta$  по Y1150/1151 (нормализованы по уровню  $\beta$ -тубулина в каждом образце). Данные представлены в виде среднего  $\pm$  СОС указанного количества мышей. Значения Р рассчитывали путем сравнения значений обработки со значениями в группе, получавшей физиологический раствор.

[0054] Фиг. 23. Активация INSR и стимуляция фосфорилирования AS160 в клетках HepG2 печени человека с помощью Соединения №43. Клетки HepG2 высевали на 6-луночные планшеты ( $7 \times 10^5$  клеток/лунку), культивировали в среде с 10% FBS ЕМЕМ в течение 30 ч, а затем культивировали без сыворотки в течение ночи. Культивированные без сыворотки клетки HepG2 затем обрабатывали Соединением №43 (600 ч/млрд) при 37°C в течение 30 и 60 минут (мин), а затем подвергали Вестерн-блот анализу. (A) Изображения Вестерн-блотта. (B) Количественные уровни белка (нормализованные по уровню АСТВ в каждом образце). Данные представлены как среднее  $\pm$  СОС трех образцов на группу. \*\*  $P<0,01$ , по сравнению с контрольной группой (0 мин группа, до лечения соединением №43).

[0055] Фиг. 24. Хроническое лечение Соединением №43 приводило к снижению уровней сывороточного инсулина и аланинаминотрансферазы (АЛТ), но не уровней креатинина у мышей  $Lepr^{db/db}$ . Самцам мышей  $Lepr^{db/db}$  в возрасте 38 дней внутрибрюшинно (в.б.) ежедневно инъектировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО или Соединение №43 при дозе 0,136 мг на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. Также собирали сыворотки у мышей в возрасте 3 месяцев дикого типа (без диабета) C57. Образцы сыворотки собирали и анализировали на уровень инсулина (A), АЛТ (B) и креатинина (C). Числа в верхней части каждого столбца в (A) представляют собой средние значения уровней инсулина. Различные буквы в столбцах представляют статистическую значимость между этими двумя группами.

[0056] Фиг. 25. Способ действия Соединения №43 в случае диабета I и II типа.

[0057] Фиг. 26. Прямая активация рецептора инсулина Соединением №43 и инсулином в бесклеточной системе. Равные количества нативных белков рецептора инсулина, содержащих как альфа-, так и бета-субъединицы, инкубировали с 0,003% ДМСО (растворитель Соединения №43), Соединением №43 или инсулином (Ins, 0,5 мкМ) в присутствии АТФ, а затем подвергали вестерн-блот анализу для обнаружения фосфорилированного  $Insr\beta$  (активированного  $Insr$ ) по Y1146, 1150 и 1151. Различные буквы алфавита на гистограмме обозначают статистически значимые изменения между

этими группами.

[0058] Фиг. 27. Соединение №68 гораздо менее эффективно, чем Соединение №43, в активации рецептора инсулина в бесклеточной системе. Равные количества нативного рецептора инсулина инкубировали с 0,003% ДМСО (растворитель Соединения №43),

5 Соединением №43 или Соединением №68 в присутствии АТФ. Активированные Insr белки были обнаружены с помощью вестерн-блот анализа фосфорилированного Insr β по Y1146, 1150 и 1151. Различные буквы алфавита на гистограмме обозначают статистически значимые изменения между этими группами.

[0059] Фиг. 28. Сниженные уровни глюкозы в крови у STZ-индуцированных мышей

10 T1D после острого лечения Соединением №43. STZ-индуцированных мышей T1D с уровнями глюкозы в крови в состоянии покоя между 500–550 мг/дл не кормили в течение ночи и внутрибрюшинно вводили Соединение №43 в дозе 5,4 мг/кг массы тела или физиологический раствор, содержащий 2% ДМСО (исходный растворитель Соединения №43, упоминается как контрольная группа) в течение 1, 2 и 3 ч. Затем у мышей измеряли 15 уровень глюкозы в крови. Значения P были получены путем сравнения лечения соединением №43 с контрольной/физиологической группой в каждый момент времени.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ

##### Определения

[0060] Ниже более подробно описаны определения конкретных функциональных 20 групп и химических терминов. В целях настоящего описания химические элементы идентифицируются в соответствии с Периодической таблицей элементов, версией CAS, Справочником по химии и физике, 75-е издание, внутренняя обложка, и конкретные функциональные группы обычно определяются, как описано в них. Кроме того, общие принципы органической химии, а также специфические функциональные составляющие 25 и реакционная способность описаны в Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

[0061] Формы в единственном числе, используемые в данном документе и в формуле изобретения, включают ссылку и на множественное число, если контекст явно не 30 указывает на иное. Таким образом, например, ссылка на «соединение» включает множество таких соединений.

[0062] Примерно: Термин «примерно», в контексте данного документа, в отношении 35 значения, относится к значению, которое является аналогичным в контексте заданного значения. В общем, специалисты в данной области техники, осведомленные с контекстом, оценят соответствующую степень свободы, охватываемую «примерно» в этом контексте. Например, в некоторых вариантах реализации термин «примерно» может охватывать диапазон значений, который находится в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше от указанного значения.

40 [0063] Введение: Термин «введение», в контексте данного документа, обычно относится к введению композиции субъекту или системе. Специалистам в данной области техники известно о множестве путей, которые при соответствующих обстоятельствах могут использоваться для введения субъекту, например, человеку. Например, в некоторых вариантах реализации, введение может быть окулярным, пероральным, 45 парентеральным, местным и т.д. В некоторых конкретных вариантах реализации, введение может быть бронхиальным (например, путем бронхиальной инсталляции), буккальным, кожным (которое может быть или включать, например, один или более из местных средств для дермы, внутрикожным, межкожным, трансдермальным и т.д.),

энтеральным, внутриартериальным, внутрикожным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, внутрибрюшинным, интратекальным, внутривенным, внутрижелудочковым, внутрь конкретного органа (например, внутрипеченочным), через слизистую оболочку, интраназальным, оральным, 5 ректальным, под кожным, сублингвальным, местным, трахеальным (например, интратрахеальным вливанием), вагинальным, витреальным и др. В некоторых вариантах реализации, введение может включать дозирование, которое является прерывистым (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическим (например, индивидуальные дозы, разделенные общим периодом времени) дозированием. В 10 некоторых вариантах реализации, введение может включать непрерывное дозирование (например, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

[0064] Болезнь Альцгеймера: Термин «болезнь Альцгеймера» или «БА», в контексте данного документа, относится к прогрессирующему заболеванию центральной нервной системы человека. Инсулиновая сигнализация в мозг важна для обучения и памяти, а 15 резистентность к инсулину в мозге является основным фактором риска развития БА. Восстановление инсулиновой сигнализации стало потенциальной терапией для БА (White MF, Science 2003; 302:1710-1; De Felice DG et al, Alzheimer's & Dementia 2014; 10: S26-S32). В некоторых вариантах реализации, БА проявляется в виде деменции, обычно у пожилых людей, дезориентации, потери памяти, трудностями с речью, расчетами или 20 визуально-пространственными навыками, а также психиатрическими проявлениями. В определенных вариантах реализации, БА связана с дегенеративными нейронами в нескольких областях мозга. Термин «деменция», в контексте данного документа, включает, но не ограничивается ими, деменцию Альцгеймера с психотическими 25 симптомами или без них. В определенном варианте реализации, терапевтические способы, представленные в настоящем документе, эффективны для лечения легкой, средней и тяжелой болезни Альцгеймера у субъекта. Фазы болезни Альцгеймера дополнительно включают «умеренно тяжелое снижение когнитивных функций», также называемое «болезнь Альцгеймера средней стадии», «тяжелое снижение когнитивных 30 функций», также называемое «болезнь Альцгеймера средней или тяжелой степени» и «очень серьезное снижение когнитивных функций», также называемый «тяжелая или поздняя стадия болезни Альцгеймера». Умеренно тяжелое снижение когнитивных функций характеризуется большими пробелами в памяти и появлением дефицита 35 когнитивной функции. На этом этапе становится необходимой некоторая помощь в повседневных делах. При тяжелом снижении когнитивных функций проблемы с памятью продолжают усугубляться, могут возникать значительные изменения личности, и пострадавшие люди нуждаются в обширной помощи в повседневных делах. Поздняя 40 стадия болезни Альцгеймера или очень серьезное снижение когнитивных функций является конечной стадией заболевания, когда люди теряют способность реагировать на окружающую среду, способность говорить и, в конечном итоге, способность контролировать движение.

[0065] Биологическая активность: Термин «биологическая активность», в контексте данного документа, относится к наблюдаемому биологическому эффекту или результату, достигаемым агентом или субъектом, представляющим интерес. Например, в некоторых вариантах реализации специфическое связывающее взаимодействие представляет собой 45 биологическую активность. В некоторых вариантах реализации модуляция (например, индукция, усиление или ингибирование) биологического пути или события представляет собой биологическую активность. В некоторых вариантах реализации присутствие или степень биологической активности оценивают путем обнаружения прямого или

косвенного продукта, продуцируемого биологическим путем или представляющим интерес событием.

[0066] Комбинированная терапия: Термин «комбинированная терапия», в контексте данного документа, относится к тем ситуациям, в которых субъект одновременно

- 5 подвергается воздействию двух или более схем лечения (например, двух или более терапевтических агентов). В некоторых вариантах реализации, две или более схемы могут вводиться одновременно; в некоторых вариантах реализации такие схемы могут вводиться последовательно (например, все «дозы» первой схемы вводятся до введения любых доз второй схемы); в некоторых вариантах реализации такие агенты вводят в
- 10 перекрывающихся режимах дозирования. В некоторых вариантах реализации, «введение» комбинированной терапии может включать введение одного или более агентов, или применение способов субъекту, получающему другие агенты или способы в комбинации. Для ясности, комбинированная терапия не требует, чтобы отдельные агенты вводились вместе в одной композиции (или даже обязательно в одно и то же время), хотя в
- 15 некоторых вариантах реализации два или более агентов, или их активных фрагментов могут быть введены вместе в комбинации композиции или даже в комбинированном соединении (например, как часть единого химического комплекса или ковалентного объекта).

[0067] Сопоставимый: Термин «сопоставимый», в контексте данного документа,

- 20 относится к двум или более агентам, объектам, ситуациям, наборам условий и т.д., которые могут не быть идентичными друг другу, но которые достаточно похожи, чтобы позволить сравнение между ними, так что специалист в данной области техники поймет, что могут быть сделаны выводы на основе наблюдаемых различий или сходств. В некоторых вариантах реализации, сопоставимые наборы условий, обстоятельств,
- 25 индивидуумов или групп населения характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим количеством различных признаков. Специалисты в данной области техники поймут, в контексте, какая степень идентичности требуется в любом данном случае для того, чтобы два или более таких агентов, объектов, ситуаций, наборов условий и т.д. считались сопоставимыми. Например,
- 30 специалистам в данной области техники должно быть понятно, что совокупности обстоятельств, индивидуумов или популяций сопоставимы друг с другом, когда они характеризуются достаточным количеством и типом по существу идентичных признаков, чтобы сделать разумный вывод о том, что различия в полученных результатах или явлениях наблюдаемые при различных обстоятельствах или при разных обстоятельствах,
- 35 индивидуумов или популяций вызваны или указывают на различия в этих отличительных признаках.

[0068] Диабет: Центральной характеристикой диабета является нарушение функции  $\beta$ -клеток. Одна из аномалий, которая возникает на ранней стадии прогрессирования заболевания при диабете I и II типа, это потеря быстрого инсулинового ответа,

- 40 вызванного приемом пищи. Следовательно, печень продолжает вырабатывать глюкозу, которая увеличивает уровень глюкозы, попадающей в организм и всасываемой из основных компонентов пищи.

[0069] Диабет II типа: Одной из характеристик диабета II типа является нарушение действия инсулина, которое называется резистентностью к инсулину. Резистентность

- 45 к инсулину проявляется как в снижении максимальной скорости выведения глюкозы (GERmax), так и в повышении концентрации инсулина, необходимой для достижения GERmax. Таким образом, чтобы справиться с данной нагрузкой глюкозой, требуется больше инсулина, и эта повышенная концентрация инсулина должна поддерживаться

в течение более длительного периода времени. Следовательно, пациент с диабетом также подвергается воздействию повышенных концентраций глюкозы в течение продолжительных периодов времени, что дополнительно усугубляет инсулинерезистентность. Кроме того, длительный повышенный уровень глюкозы в 5 крови сам по себе токсичен для  $\beta$ -клеток. Другой характеристикой диабетиков II типа является замедленная реакция на повышение уровня глюкозы в крови. В то время как у здоровых индивидуумов обычно начинается выделяться инсулин в течение 2-3 мин после потребления пищи, у диабетиков II типа может не секретироваться эндогенный инсулин до тех пор, пока уровень глюкозы в крови не начнет повышаться, а затем 10 секретироваться с кинетикой второй фазы, то есть медленным ростом до расширенного плато в концентрации. В результате выработка эндогенной глюкозы не прекращается и продолжается после потребления, и у пациента возникает гипергликемия (повышенный уровень глюкозы в крови). Диабет II типа возникает из-за различных и менее понятных 15 обстоятельств. Ранняя потеря высвобождения инсулина на ранней стадии и, как следствие, постоянное высвобождение глюкозы, способствует повышению концентрации глюкозы. Высокие уровни глюкозы способствуют инсулинерезистентности, а инсулинерезистентность вызывает длительное повышение концентрации глюкозы в сыворотке. Данная ситуация может привести к самоусиливающемуся циклу, в котором все более высокие концентрации инсулина менее эффективны для контроля уровня 20 глюкозы в крови. Кроме того, как отмечено выше, повышенные уровни глюкозы токсичны для  $\beta$ -клеток, уменьшая количество функциональных  $\beta$ -клеток. Генетические дефекты, нарушающие рост или поддержание микроциркуляторного русла, питающие островки, также могут играть роль в их разрушении (Glee, S.M., et al. Nature Genetics 38:688-693, 2006). В конце, поджелудочная железа становится перегруженной, и у 25 индивидуумов развивается дефицит инсулина, подобный тому, что у людей с диабетом I типа.

[0070] Диабет I типа: Диабет I типа возникает в результате разрушения инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы ( $\beta$ -клеток) собственной иммунной 30 системы организма. В конечном итоге это приводит к полному дефициту инсулинового гормона.

[0071] Лекарственная форма или стандартная лекарственная форма. Термин «лекарственная форма или стандартная лекарственная форма», в контексте данного документа, относится к физически дискретной единице активного агента (например, терапевтического или диагностического агента) для введения субъекту. В некоторых 35 вариантах реализации, каждая такая единица содержит заранее определенное количество активного агента. В некоторых вариантах реализации, такое количество представляет собой количество лекарственной формы (или ее целую фракцию), подходящую для введения в соответствии с режимом дозирования, который был определен как коррелирующий с желательным или полезным результатом при введении в 40 соответствующую популяцию (то есть, с терапевтический режим дозирования). Специалистам в данной области техники понятно, что общее количество терапевтической композиции или агента, вводимого конкретному субъекту, определяется одним или более лечащими врачами и может включать введение нескольких лекарственных форм.

[0072] Режим дозирования: Термин «режим дозирования», в контексте данного 45 документа, относится к набору однократных доз (обычно более одной), которые вводятся индивидуально субъекту, как правило, разделенные периодами времени. В некоторых вариантах реализации, данный терапевтический агент имеет рекомендованный режим дозирования, который может включать одну или более доз.

В некоторых вариантах реализации, режим дозирования включает множество доз, каждая из которых отделена во времени от других доз. В некоторых вариантах реализации, отдельные дозы отделены друг от друга периодом времени одинаковой продолжительности; в некоторых вариантах реализации, режим дозирования включает множество доз и по меньшей мере два разных периода времени, разделяющих отдельные дозы. В некоторых вариантах реализации, все дозы в режиме дозирования имеют одинаковое количество разовой дозы. В некоторых вариантах реализации, разные дозы в режиме дозирования имеют разные количества. В некоторых вариантах реализации, режим дозирования включает первую дозу в количестве первой дозы, за которой следуют одна или более дополнительных доз в количестве второй дозы, отличном от количества первой дозы. В некоторых вариантах реализации, режим дозирования содержит первую дозу в количестве первой дозы, за которой следуют одна или более дополнительных доз в количестве второй дозы, аналогичном количеству первой дозы. В некоторых вариантах реализации, режим дозирования коррелирует с желаемым или полезным результатом при назначении в соответствующей популяции (т.е. это режим терапевтического дозирования).

[0073] Вспомогательное вещество: Термин «вспомогательное вещество», в контексте данного документа, относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или внесения желаемой консистенции или стабилизирующего эффекта. В некоторых вариантах реализации, подходящие фармацевтические вспомогательные вещества могут включать, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное.

[0074] Период «медового месяца»: Термин период «медового месяца» диабета типа 1, в контексте данного документа, относится к ранним стадиям заболевания, характеризующимся потерей высвобождения инсулина на ранней фазе, а оставшаяся функция  $\beta$ -клеток приводит к выработке некоторого количества инсулина, который высвобождается с кинетикой второй фазы.

[0075] Гипергликемия: Термин «гипергликемия», в контексте данного документа, относится к заболеванию, расстройству или состоянию, характеризующемуся более высокой, чем обычно, концентрацией глюкозы в крови натощак. В некоторых вариантах реализации, гипергликемия характеризуется концентрацией глюкозы в крови 126 мг/дл или выше. В некоторых вариантах реализации, гипергликемия характеризуется концентрацией глюкозы в крови 280 мг/дл (15,6 мМ) или выше.

[0076] Гипогликемия: Термин «гипогликемия», в контексте данного документа, относится к заболеванию, расстройству или состоянию, характеризующемуся более низкой, чем обычно, концентрацией глюкозы в крови. В некоторых вариантах реализации, гипогликемия характеризуется концентрацией глюкозы в крови 63 мг/дл (3,5 мМ) или ниже. В некоторых вариантах реализации, гипогликемия вызывает такие симптомы, как когнитивные нарушения, поведенческие изменения, бледность, гипотония диафореза, приливы и слабость, которые являются признанными симптомами гипогликемии и которые исчезают при соответствующем потреблении калорий. В некоторых вариантах реализации, гипогликемия является тяжелой, так что требуются инъекции глюкагона, вливания глюкозы или помочь другой стороны.

[0077] Улучшение, увеличение, ингибиование или уменьшение: Термины «улучшать», «увеличивать», «ингибировать» и «уменьшать», в контексте данного документа, или их грамматические эквиваленты указывают значения, которые относятся к базовому

или другому эталонному измерению. В некоторых вариантах реализации, подходящее эталонное измерение может представлять собой или включать измерение в конкретной системе (например, в одном индивидууме) при других сопоставимых условиях при отсутствии (например, до и/или после) конкретного агента или лечения, или в

5 присутствии соответствующего сопоставимого эталонного агента. В некоторых вариантах реализации, подходящее эталонное измерение может представлять собой или содержать измерение в сопоставимой системе, о которой известно или ожидается, что оно будет реагировать определенным образом в присутствии соответствующего агента или лечения.

10 [0078] Расстройство, связанное с инсулином: Термин «расстройства, связанные с инсулином», в контексте данного документа, относится к расстройствам, связанным с производством, регуляцией, метаболизмом и действием инсулина у млекопитающего. Расстройства, связанные с инсулином, включают, но не ограничиваются ими, предиабет, диабет I типа, диабет II типа, гипогликемию, гипергликемию, инсулинорезистентность, 15 секреторную дисфункцию, саркопению, потерю функции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и потерю  $\beta$ -клеток поджелудочной железы.

[0079] Инсулиннезависимые пациенты с расстройством, связанным с инсулином: Термин «инсулиннезависимые пациенты с расстройством, связанным с инсулином», в контексте данного документа, относится к пациентам с расстройствами, при которых 20 лечение инсулином, полученным экзогенно, не является текущим стандартным лечением после установления диагноза. Инсулиннезависимые пациенты с расстройствами, связанными с инсулином, которые не лечатся экзогенно введенным инсулином, включают ранний диабет II типа, диабет I типа в фазе медового месяца, предиабет и инсулин-продуцирующие реципиенты клеток-реципиентов.

25 [0080] Инсулинорезистентность: Термин «инсулинорезистентность», в контексте данного документа, относится к неспособности клеток пациента адекватно или эффективно реагировать на инсулин. Поджелудочная железа реагирует на эту проблему на клеточном уровне, вырабатывая больше инсулина. В конце концов, поджелудочная железа не может удовлетворить потребность организма в инсулине, и избыток глюкозы 30 накапливается в кровотоке. Пациенты с инсулинорезистентностью часто имеют высокий уровень глюкозы в крови и высокий уровень инсулина, циркулирующего в их крови одновременно.

[0081] Инсулинорезистентное расстройство: Термин «инсулинорезистентное расстройство», в контексте данного документа, относится к любому заболеванию или 35 состоянию, которое вызвано или обусловлено инсулинорезистентностью. Примеры включают: диабет, ожирение, метаболический синдром, синдромы инсулинорезистентности, синдром X, резистентность к инсулину, высокое кровяное давление, гипертензия, высокий уровень холестерина в крови, дислипидемия, гиперлипидемия, дислипидемия, атеросклеротическое заболевание, включая инсульт, 40 заболевание коронарной артерии или инфаркт миокарда, гипергликемия, гиперинсулинемия и/или гиперпринсулинемия, нарушение толерантности к глюкозе, задержка высвобождения инсулина, диабетические осложнения, в том числе ишемическая болезнь сердца, стенокардия, застойная сердечная недостаточность, инсульт, когнитивные функции при деменции, ретинопатия, невропатия, нефропатия, 45 гломерулонефрит, гломерулосклероз, синдром гломерулосклероза, гломерулосклероз, синдром гиперинсулинемии и/или гиперпринсулинемии гипертонический нефросклероз некоторых видов рака (например, эндометрия, молочной железы, предстательной железы и толстой кишки), осложнения беременности, плохое репродуктивное здоровье

женщины (например, нарушения менструального цикла, бесплодие, нерегулярная овуляция, синдром поликистозных яичников (СПКЯ), липодистрофия, связанные с холестерином расстройства, такие как камни в желчном пузыре, холецистит и желчнокаменная болезнь, подагра, обструктивное апноэ во сне и проблемы с дыханием, 5 остеоартрит, а также профилактика и лечение потери костной массы, например остеопороз.

[0082] Изомер: Как известно в данной области техники, многие химические объекты (в частности, многие органические молекулы и/или множество малых молекул) могут существовать в различных структурных (например, геометрических, конформационных, 10 изотопных) и/или оптических изомерных формах. Например, любой хиральный центр может существовать в конфигурациях R и S, двойные связи могут существовать в конформационных изомерах Z и E, некоторые структурные элементы могут принимать две или более таутомерные формы, некоторые структуры могут быть замещены одним или более изотопно обогащенными атомами (например, дейтерий или тритий для 15 водорода,  $^{12}\text{C}$  или  $^{14}\text{C}$  для  $^{13}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$  для  $^{129}\text{I}$ , и др.). В некоторых вариантах реализации, как будет понятно специалистам в данной области техники из контекста, описание или ссылка на конкретную структуру соединения в данном документе могут представлять все ее структурные и/или оптические изомеры. В некоторых вариантах реализации, как 20 будет понятно специалистам в данной области техники из контекста, описание или ссылка на конкретную составную структуру в данном документе предназначены для охвата только изображенной или ссылочной изомерной формы. В некоторых вариантах реализации, композиции, включающие химический объект, который может существовать в различных изомерных формах, включают множество таких форм; в некоторых вариантах реализации, такие композиции включают только одну форму. Например, в 25 некоторых вариантах реализации, композиции, включающие химический объект, который может существовать в виде различных оптических изомеров (например, стереоизомеры, диастереомеры и т.д.), включают рацемическую популяцию таких оптических изомеров; в некоторых вариантах реализации, такие композиции включают только один оптический изомер и/или включают множество оптических изомеров, 30 которые вместе сохраняют оптическую активность.

[0083] Парентеральное введение: Термины «парентеральное введение», в контексте данного документа, относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции. В некоторых вариантах реализации, парентеральное введение может представлять собой или включать внутривенную, 35 внутримышечную, внутриартериальную, интракапсульную, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкожную, субкутикулярную, субкапсульную, субарахноидальную, внутриспинальную и интрастернальную инъекцию и/или инфузию.

[0084] Частично ненасыщенный: Термин «частично ненасыщенный», в контексте 40 данного документа, относится к кольцевому фрагменту, который включает по меньшей мере одну двойную или тройную связь. Термин «частично ненасыщенный» предназначен для охвата колец, имеющих несколько участков ненасыщенности, но не предназначен для включения арильных или гетероарильных фрагментов, как определено в данном документе.

[0085] Фармацевтическая композиция: Термин «фармацевтическая композиция», в контексте данного документа, относится к композиции, в которой активный агент 45 составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах реализации, активный агент присутствует в единичной дозе,

подходящей для введения в терапевтическом режиме, который показывает статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении в соответствующую популяцию. В некоторых вариантах реализации, фармацевтическая композиция может быть специально составлена для введения в

5 твердой или жидкой форме, включая формы, которые приспособлены для следующего: перорального введения, например, капли (водные или неводные растворы или сусpenзии), таблетки, например, те, которые предназначены для букального, сублингвального и системного всасывания: болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентеральное введение, например, путем подкожной,

10 внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или сусpenзии, или композиции с замедленным высвобождением; местного применение, например, в виде крема, мази или пластиря, или спрея с контролируемым высвобождением, наносимых на кожу, легкие или полость рта; интравагинально или интракретально, например, в виде пессария, крема или пены;

15 сублингвально; окулярно; трансдермально; или назально, ингаляционно и на другие поверхности слизистой оболочки. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в целом любая композиция, которая составлена для введения человеку или животному, в некоторых вариантах реализации может рассматриваться как фармацевтическая композиция, независимо от того, требует ли ее введение предписание

20 врача. Таким образом, например, в некоторых вариантах реализации пища или пищевая добавка (например, жидккая или твердая потребляемая композиция, такая как коктейль или спортивный напиток, или порошок пищевой добавки) может считаться фармацевтической композицией. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах реализации, фармацевтическая композиция может представлять собой

25 препарат, который специально регламентирован и одобрен для введения соответствующим субъектам соответствующим государственным учреждением, таким как, например, Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США. В некоторых вариантах реализации, фармацевтическая композиция представляет собой композицию, которая не может быть легально введена

30 без рецепта от лицензированного врача.

[0086] Фармацевтически приемлемый: Термин «фармацевтически приемлемый», в контексте данного документа, применяемый к носителю, разбавителю или вспомогательному веществу, используемому для составления композиции, как раскрыто в данном документе, означает, что носитель, разбавитель или вспомогательное вещество

35 должны быть совместимы с другими ингредиентами композиции и не оказывать вредного воздействия на его получателя.

[0087] Фармацевтически приемлемый носитель: Термин «фармацевтически приемлемый носитель», в контексте данного документа, относится к фармацевтически приемлемому веществу, композиции или носителю, такому как жидкий или твердый

40 наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или инкапсулирующий растворитель, участвующий в переносе или транспортировке соединения по данному изобретению из одного органа или части тела, в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые

45 могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный

трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиториев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит,

- 5 маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; agar; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; буферные растворы для регулировки pH; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в
- 10 фармацевтических композициях.

[0088] Предиабет: Термин «предиабет», в контексте данного документа, относится к заболеванию, расстройству или состоянию, при котором у пациентов нарушен уровень глюкозы в крови натощак и/или нарушена толерантность к глюкозе. В некоторых вариантах реализации, у пациентов с предиабетом уровень глюкозы в крови натощак составляет от 100 мг/дл (5,5 ммоль/л) до 126 мг/дл (7,0 ммоль/л). В некоторых вариантах реализации, у пациентов с предиабетом уровень глюкозы в крови после приема пищи через 2 ч составляет между 140 мг/дл (7,8 ммоль/л) и 200 мг/дл (11,1 ммоль/л).

[0089] Пролекарство: Термин «пролекарство», в контексте данного документа, относится к фармакологически активному или, более типично, неактивному соединению, которое превращается в фармакологически активный агент с помощью метаболического превращения. Пролекарства соединения любой из формул, как описано в данном документе, получают путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединении любой из формул, таким образом, что модификации могут быть расщеплены *in vivo* для высвобождения исходного соединения. *In vivo* пролекарство легко подвергается химическим изменениям в физиологических условиях (например, подвергается гидролизу или действию естественного(ых) фермента(ов)), что приводит к высвобождению фармакологически активного агента. Пролекарства включают соединения любой из формул, как описано в данном документе, где гидроксильная, амино или карбоксильная группа связана с любой группой, которая может быть расщеплена *in vivo* для регенерации свободной гидроксильной, амино или карбоксильной группы, соответственно. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры (например, производные ацетата, формиата и бензоата) соединений любой из формул, как описано в данном документе, или любое другое производное, которое при доведении до физиологического pH или посредством действия фермента превращается в активное первоначальное лекарственное средство. Обычные процедуры выбора и получения подходящих производных пролекарств описаны в данной области техники (см., например, Bundgaard. Design of Prodrugs. Elsevier, 1985).

[0090] Пролиферативное состояние: Термин «пролиферативное состояние», в контексте данного документа, относится к заболеванию или расстройству, связанному с пролиферацией клеток. В некоторых вариантах реализации, пролиферативное заболевание или расстройство представляет собой или включает рак. В некоторых вариантах реализации, пролиферативное заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах реализации, пролиферативное заболевание или расстройство представляет собой аутоиммунное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах реализации, пролиферативное заболевание или расстройство представляет собой микробную инфекцию (например, бактериальную инфекцию).

[0091] Ссылка: Термин «ссылка», в контексте данного документа, относится к

стандарту или контролю, относительно которого проводится сравнение. Например, в некоторых вариантах реализации, агент, животное, индивидуум, популяция, образец, последовательность или значение, представляющее интерес, сравнивается с эталонным или контрольным агентом, животным, индивидуумом, популяцией, образцом,

5 последовательностью или значением. В некоторых вариантах реализации, стандартный образец или контрольный образец тестируют и/или определяют по существу одновременно с тестированием или определением требуемого образца. В некоторых вариантах реализации, ссылка или элемент управления является исторической справкой или элементом управления, необязательно воплощенным на материальном носителе.

10 Обычно, как будет понятно специалистам в данной области техники, ссылка или контроль определяются или характеризуются в сопоставимых условиях или обстоятельствах с теми, которые оцениваются. Специалистам в данной области техники будет понятно, когда присутствуют достаточные сходства, чтобы оправдать идентичность и/или сравнение с конкретной возможной ссылкой или контролем.

15 [0092] Риск: Термин «риск» заболевания, расстройства и/или состояния, в контексте данного документа, относится к вероятности того, что у конкретного человека разовьется заболевание, расстройство и/или состояние. В некоторых вариантах реализации, риск выражается в процентах. В некоторых вариантах реализации, риск составляет от 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 до 100%. В некоторых

20 вариантах реализации, риск выражается как риск относительно риска, связанного с эталонным образцом или группой эталонных образцов. В некоторых вариантах реализации, эталонный образец или группа эталонных образцов имеют известный риск заболевания, расстройства, состояния и/или события. В некоторых вариантах реализации, эталонный образец или группа эталонных образцов взяты из индивидуумов, сравнимых 25 с конкретным индивидуумом. В некоторых вариантах реализации, относительный риск составляет 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более.

[0093] Твердая форма: Как известно в данной области техники, многие химические объекты (в частности, многие органические молекулы и/или множество небольших молекул) могут принимать различные твердые формы, такие как, например, аморфные 30 формы и/или кристаллические формы (например, полиморфы, гидраты, сольваты и т.д.). В некоторых вариантах реализации, такие объекты могут использоваться в виде одной такой формы (например, в виде чистого препарата одного полиморфа). В некоторых вариантах реализации, такие объекты могут быть использованы в виде смеси таких форм.

35 [0094] Субъект: Термин «субъект», в контексте данного документа, относится к организму, обычно млекопитающему (например, человеку, в некоторых вариантах реализации, включая плод). В некоторых вариантах реализации, субъект страдает от соответствующего заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, субъект подвержен заболеванию, расстройству или состоянию. В некоторых 40 вариантах реализации, субъект проявляет один или более симптомов, или характеристик заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, субъект не проявляет какого-либо симптома или характеристики заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, субъект представляет собой человека с одним или более признаками, характерными для восприимчивости или риска 45 заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, субъектом является пациент. В некоторых вариантах реализации, субъект является индивидуумом, которому установили диагноз и/или назначили лечение.

[0095] Восприимчивый к: Индивидуум, который «восприимчив к» заболеванию,

расстройству или состоянию (например, гриппу), подвержен риску развития заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, индивидуум, который восприимчив к заболеванию, расстройству или состоянию, не проявляет никаких симптомов заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах

- 5 реализации, индивидууму, который восприимчив к заболеванию, расстройству или состоянию, не был поставлен диагноз заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации, индивидуумом, который подвержен заболеванию, расстройству или состоянию, является индивидуум, который подвергался воздействию состояний, связанных с развитием заболевания, расстройства или состояния. В
- 10 некоторых вариантах реализации, риск развития заболевания, расстройства и/или состояния представляет собой популяционный риск (например, члены семьи людей, страдающих от заболевания, расстройства или состояния).

[0096] Терапевтически эффективное количество: Термин «терапевтически эффективное количество», в контексте данного документа, относится к количеству, которое

- 15 обеспечивает желаемый эффект для того, кому его вводят. В некоторых вариантах реализации, данный термин относится к количеству, которое является достаточным при введении популяции, страдающему или подвергенному заболеванию, расстройству и/или состоянию в соответствии с режимом терапевтического дозирования, для лечения заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации,
- 20 терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое уменьшает частоту и/или тяжесть, и/или задерживает начало одного или более симптомов заболевания, расстройства и/или состояния. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что термин «терапевтически эффективное количество» фактически не требует успешного лечения конкретного индивидуума. Скорее,
- 25 терапевтически эффективным количеством может быть такое количество, которое обеспечивает конкретный желаемый фармакологический ответ у значительного числа субъектов при введении пациентам, нуждающимся в таком лечении. В некоторых вариантах реализации, ссылка на терапевтически эффективное количество может быть ссылкой на количество, измеренное в одной или более конкретных тканях (например,
- 30 ткани, пораженной заболеванием, расстройством или состоянием) или жидкостях (например, крови, слюне, сыворотке, поте, слезах, моче и т.д.). Специалистам в данной области техники будет понятно, что в некоторых вариантах реализации терапевтически эффективное количество конкретного агента или терапии может быть составлено и/или введено в одной дозе. В некоторых вариантах реализации, терапевтически
- 35 эффективный агент может составляться и/или вводиться во множестве доз, например, как часть режима дозирования.

[0097] Лечение: Термин «лечение» (также «лечить» или «лечащий»), в контексте данного документа, относится к назначению лечения, которое частично или полностью облегчает, улучшает, ослабляет, подавляет, задерживает начало (например,

- 40 относительно установленного времени начала или периода), уменьшает степень тяжести и/или уменьшает частоту возникновения одного или более симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации, может быть лечение субъекта, у которого нет признаков или симптомов соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекта, которому
- 45 не поставлен диагноз, страдающего соответствующим заболеванием, расстройством и/или состоянием, и/или субъекта, который проявляет только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах реализации лечение может проводиться у субъекта, который

проявляет один или более установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации, лечение может проводиться у субъекта, которому был поставлен диагноз «страдание от соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния». В некоторых вариантах реализации, лечение может быть у субъекта, о котором известно, что он имеет один или более факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах реализации, такое лечение относится к снижению риска развития заболевания, расстройства и/или состояния, и/или к задержке появления одной или более характеристик, или симптомов заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, лечение представляет собой введение терапии в соответствии с режимом, который, как было продемонстрировано, позволяет достигать соответствующего результата (например, частично или полностью облегчать, улучшать, ослаблять, подавлять, задерживать начало, уменьшать тяжесть и/или 10 уменьшать заболеваемость одного или более симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, расстройства и/или состояния), имеющих статистическую значимость применительно к соответствующей популяции или системе (например, модельной системе). В некоторых вариантах реализации, лечение, назначаемое после постановки диагноза и/или появления одного или более симптомов, считается 15

20 «терапевтическим» лечением, тогда как лечение, назначаемое до постановки диагноза и/или появления симптомов, считается «профилактическим» лечением.

[0098] Однократная доза: Термин «однократная доза», в контексте данного документа, относится к количеству, вводимому в виде разовой дозы и/или в физически дискретной единице фармацевтической композиции. Во многих вариантах реализации, 25 однократная доза содержит заранее определенное количество активного агента. В некоторых вариантах реализации, однократная доза содержит целую разовую дозу агента. В некоторых вариантах реализации, вводится более одной однократной дозы для достижения общей однократной дозы. В некоторых вариантах реализации, введение нескольких единичных доз требуется или ожидается для того, чтобы достичь желаемый 30 эффект. Однократная доза может быть, например, объемом жидкости (например, приемлемого носителя), содержащей заранее определенное количество одного или более терапевтических агентов, заранее определенное количество одного или более терапевтических агентов в твердой форме, композицию с замедленным высвобождением или лекарственное средство, устройство доставки, содержащее заранее определенное 35 количество одного или более терапевтических агентов и т.д. Понятно, что однократная доза может присутствовать в композиции, который включает любой из множества компонентов в дополнение к терапевтическому агенту(ам). Например, приемлемые носители (например, фармацевтически приемлемые носители), разбавители, стабилизаторы, буферы, консерванты и т.д. могут быть включены, как описано ниже. 40 Специалистам в данной области техники будет понятно, что во многих вариантах реализации общая подходящая суточная доза конкретного терапевтического агента может включать часть или множество единичных доз и может быть назначена, например, лечащим врачом в рамках здравого медицинского заключения. В некоторых вариантах реализации, конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного субъекта 45 или организма может зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого активного соединения; конкретный используемый состав; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета субъекта; время введения и скорость выведения

конкретного используемого активного соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства и/или дополнительные способы лечения, используемые в комбинации или одновременно с используемым конкретным соединением(ями), и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

<sup>5</sup> [0099] Алкил: Термин «алкил», в контексте данного документа, относится к линейным или разветвленным алкильным группам. Типичные С<sub>1-6</sub> алкильные группы включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, пентил, изопентил, неопентил и гексил.

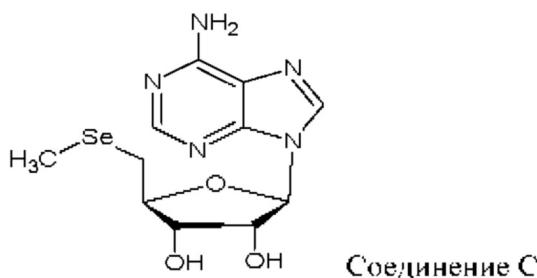
<sup>10</sup> [00100] Гетероатом: Термин «гетероатом», в контексте данного документа, относится к одному или более атомам кислорода, серы, азота, фосфора или кремния (включая любую окисленную форму азота, серы, фосфора или кремния; кватернизованную форму любого основного азота или; замещаемый азот гетероциклического кольца, например, N (как в 3,4-дигидро-2Н-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR<sup>+</sup> (как в N-замещенном пирролидиниле)).

<sup>15</sup> [00101] Карбоциклизил: Термин «карбоциклизил», в контексте данного документа, относится к моноциклическому углеводороду, который полностью насыщен или содержит одну, или более единиц ненасыщенности, но не является ароматическим, который имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы.

<sup>20</sup> [00102] Гетероциклизил: Термин «гетероциклизил», в контексте данного документа, относится к стабильному моноциклическому гетероциклическому фрагменту, который является либо насыщенным, либо частично ненасыщенным и имеет, помимо атомов углерода, один или более, предпочтительно от одного до четырех, гетероатомов, как определено выше. При использовании в отношении кольцевого атома гетероцикла термин «азот» включает замещенный азот. Например, в насыщенном или частично ненасыщенном кольце, имеющем 0-3 гетероатома, выбранных из кислорода, серы или азота, азотом может быть N (как в 3,4-дигидро-2Н-пирролиле), NH (как в пирролидиниле), или <sup>+</sup>NR (как в N-замещенном пирролидиниле). Гетероциклическое кольцо может быть присоединено к его боковой группе при любом гетероатоме или <sup>25</sup> атоме углерода, что приводит к стабильной структуре, и любой из атомов кольца может быть необязательно замещен. Примеры 3-8-членного гетероциклила включают тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил, пирролидинил, пиперидинил, пирролинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, диазепинил, оксазепинил, тиазепинил и морфолинил.

<sup>30</sup> [00103] Галоген: Термины «галоген» и «гало», в контексте данного документа, относятся к F, Cl, Br или I.

[00104] Соединение С Термин «соединение С», в контексте данного документа, относится к 5'-метилселеноаденозину; также известному как (2R, 4S, 5S)-2-(6-амино-9Н-пурин-9-ил)-5-((метилселанил)метил)тетрагидрофуран-3,4-диол, регистрационный <sup>35</sup> номер CAS 5135-40-0, и включает любые его фармацевтически приемлемые соли.

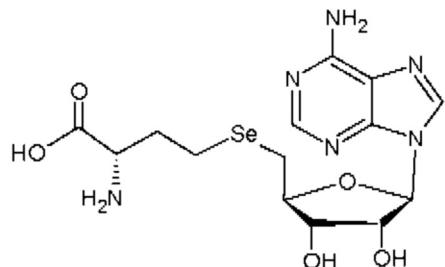


[00105] Соединение D Термин «соединение D», в контексте данного документа,

относится к 5'-селеноаденозил гомоцистеину; также известному как (2R)-2-амино-4-(((2S, 3S, 5R)-5-(6-амино-9Н-пурин-9-ил)-3,4-дигидрокситетрагидрофuran-2-ил)метил)селанил)бутановая кислота, регистрационный номер CAS 4053-91-2 и включает любые ее фармацевтически приемлемые соли.

5

10

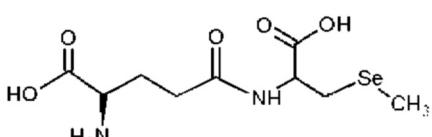


Соединение D

15

[00106] Соединение Е Термин «соединение Е», в контексте данного документа, относится к гамма-глутамилметилселеноцистеину или  $\gamma$ -L-глутамил-Se-метил-L-цистеину; также известному как N5- (1карбокси-2-(метилселанил)этил)-L-глутамин или любой его фармацевтически приемлемой соли.

20



Соединение Е

25

[00107] Соединение СДЕ: Термин «соединение СДЕ», в контексте данного документа, относится к смеси соединения С, соединения D и соединения Е, или их фармацевтически приемлемых солей.

### Соединения

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

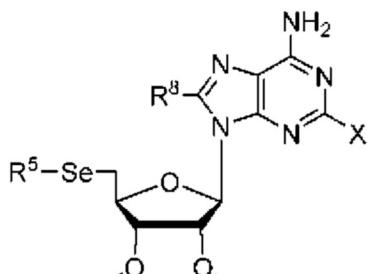
702

703

ответу у мышей дикого типа (Пример 3). Кроме того, в данном документе продемонстрировано, что обработка Соединением №43 может усилить фосфофорилирование AS 160 (чтобы способствовать транслокации GLUT из клеточных везикул в плазматическую мембрану) для захвата глюкозы в клетках печени и скелетных мышц (Пример 8), стимулировать экспрессию GLUT4 в печени мышей с диабетом и культивируемых клеток печени мыши (Пример 6) усиливать и/или потенцировать действие инсулина для стимулирования захвата глюкозы в клетках печени и скелетных мышц (Пример 6-7) и ослаблять гиперинсулинемию без нарушения функции почек и/или повреждения печени у инсулинерезистентных мышей с диабетом (пример 9).

- [00109] В данном документе также представлены признаки селенсодержащих соединений, которые могут способствовать его активности. Например, было показано, что, хотя селен о держащее Соединение №43 обладает большой эффективностью в ингибировании выработки глюкозы, его серосодержащий аналог Соединение 68 обладает низкой активностью (Пример 2); и что Соединение №43 является более активным, чем Соединение №68, в снижении уровней глюкозы в крови и уровней HbA1c, и улучшении толерантности к глюкозе у инсулинерезистентных мышей с диабетом (Пример 3). Также было показано, что ингибирование выработки глюкозы наблюдалось после обработки селенсодержащих соединений, включающих в положении 2' и 3' диацетиловый сложный эфир (№43), циклический карбонат (Соединение №50), морфолинокарбонат (№53), дипропаноиловый сложный эфир (№69) или дигексаноиловый сложный эфир (№70), с наибольшей активностью, наблюдаемой после обработки соединением 43 (Пример 2). Кроме того, было показано, что соединения, содержащие 5'-метилселеновую группу и 5'-селеногомоцистеиновую группу, обладают сходной активностью в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2.
- (Соединение С против Соединения D в Примере 2). Исследования *in vivo* также показали, что Соединение №43 является более активным, чем Соединение №69 и №70, в снижении уровней глюкозы в крови и улучшении толерантности к глюкозе у инсулинерезистентных мышей с диабетом (Пример 3).

- [00110] В некоторых вариантах реализации в данном документе предложено соединение формулы (1):



- или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер, где каждый из R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо представляет собой H или -C(O)-R, где каждый R независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>-алкил или 3-8-членный карбоцикл или гетероцикл, где R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> оба не могут представлять собой H; или R<sup>2</sup> вместе с R<sup>3</sup> образуют -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, где каждый из n и m независимо равен 0-3 и n+m≤3;

$R^5$  представляет собой  $-C_{1-6}\text{-алкил}$  или  $-C_{1-6}\text{-алкил}-CH(NH_2)COOH$ ;

$R^8$  представляет собой Н или галоген; и

X представляет собой Н или галоген;

5 где каждый из карбоцикла, гетероцикла,  $-(CH_2)_n$ - и  $-(CH_2)_m$ -фрагментов независимо может необязательно быть замещен 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub>, CN или C<sub>1-6</sub>алкилами; и

каждый C<sub>1-6</sub> алкильный фрагмент независимо может быть необязательно замещен

10 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN.

[00111] В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>8</sup> представляет собой Н.

В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>8</sup> формулы (1) представляет собой атом галогена. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>8</sup> формулы (1)

15 представляет собой F.

[00112] В некоторых вариантах реализации формулы (1), X представляет собой Н.

В некоторых вариантах реализации формулы (1), X представляет собой атом галогена. В некоторых вариантах реализации формулы (1), X представляет собой F.

[00113] В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой

20 -C<sub>1-6</sub>алкил, который может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой -C<sub>1-6</sub>алкил, который может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В

25 некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой незамещенный -C<sub>1-6</sub>алкил. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой незамещенный линейный -C<sub>1-6</sub>алкил. В некоторых вариантах реализации, формулы (1), R<sup>5</sup>

30 представляет собой метил. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой этил. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой пропил.

[00114] В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой

-C<sub>1-6</sub>алкил-CH(NH<sub>2</sub>)COOH, причем C<sub>1-6</sub>алкил может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN. В некоторых вариантах реализации формулы

35 (1), R<sup>5</sup> представляет собой -C<sub>1-6</sub>алкил-CH(NH<sub>2</sub>)COOH, причем C<sub>1-6</sub>алкил может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой -C<sub>1-6</sub>алкил-CH(NH<sub>2</sub>)COOH, причем

40 C<sub>1-6</sub>алкил является незамещенным. В некоторых вариантах реализации, формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)COOH. В некоторых вариантах реализации

формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)COOH. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>5</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)COOH.

45 [00115] В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>2</sup> представляет собой Н, а R<sup>3</sup> представляет собой -C(O)-R, причем R представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил или 3-8-

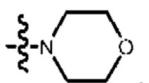
членный карбоцикл или гетероцикл, причем каждый карбоциклический и гетероциклический фрагменты, независимо, может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub>, CN или C<sub>1-6</sub>алкилом; и каждый C<sub>1-6</sub>алкил независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN.

[00116] В некоторых вариантах реализации формулы (1),  $R^3$  представляет собой H, а  $R^2$  формулы (1) представляет собой -C(O)-R, причем R представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил или 3-8-членный карбоцикл или гетероцикл, причем каждый карбоциклический и гетероциклический фрагменты, независимо, может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub>, CN или C<sub>1-6</sub>алкилом; и каждый C<sub>1-6</sub>алкил независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN.

[00117] В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо представляет собой -C(O)-R, причем каждый R независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил или 3-8-членный карбоцикл или гетероцикл, причем каждый карбоциклический и гетероциклический фрагменты, независимо, может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub>, CN или C<sub>1-6</sub>алкилом; и каждый C<sub>1-6</sub>алкил независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN.

[00118] В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой 3-8-членный карбоцикл или гетероцикл, причем каждый карбоциклический и гетероциклический фрагменты, независимо, может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub>, CN или C<sub>1-6</sub>алкилом; и каждый C<sub>1-6</sub>алкил независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH,

галогеном,  $\text{NH}_2$  или  $\text{CN}$ . В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой 3-8-членный карбоцикл или гетероцикл, причем каждый карбоциклический и гетероциклический фрагмент независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой 3-8-членный карбоцикл или гетероцикл, причем каждый карбоциклический и гетероциклический фрагмент независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой 3-8-членный ненасыщенный карбоцикл или ненасыщенный гетероцикл. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой 6-членный ненасыщенный карбоцикл или ненасыщенный гетероцикл. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой ненасыщенный гетероцикл. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R представляет собой

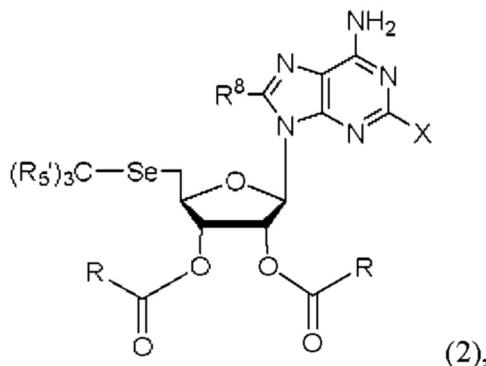


[00119] В некоторых вариантах реализации формулы, (1), каждый R независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, и каждый C<sub>1-6</sub>алкил, независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN. В некоторых вариантах реализации, формулы (1), каждый R независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, и каждый C<sub>1-6</sub>алкил, независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой незамещенный C<sub>1-6</sub>алкил. В некоторых вариантах реализации, формулы (1),

каждый R независимо представляет собой незамещенный линейный С<sub>1-6</sub>алкил. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый R независимо представляет собой метил, этил или пропил. В некоторых вариантах реализации формулы (1), R представляет собой CH<sub>3</sub>.

[00120] В некоторых вариантах реализации формулы (1), R<sup>2</sup> вместе с R<sup>3</sup> образует -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, причем каждый из n и m независимо представляет собой 0-3, и n+m≤3, при этом каждый из фрагментов -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- и -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub>, CN или С<sub>1-6</sub>алкилом; и каждый С<sub>1-6</sub>алкил независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно -OH, галогеном, NH<sub>2</sub> или CN. В некоторых вариантах реализации формулы (1), каждый из фрагментов -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- и -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В некоторых вариантах реализации формулы (1), фрагменты -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- и -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- являются незамещенными. В некоторых вариантах реализации, n=m=0.

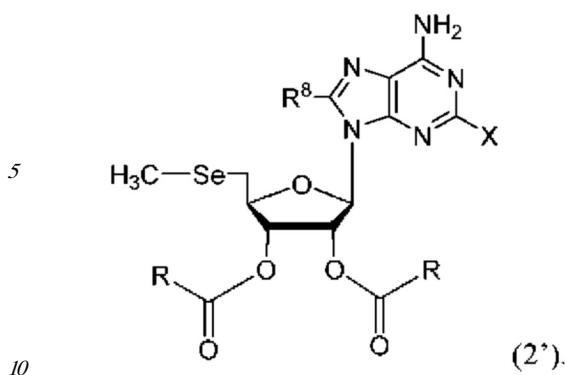
[00121] В некоторых вариантах реализации в данном документе предложено соединение формулы (2):



или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер,  
где R<sup>8</sup> представляет собой H или галоген;  
Х представляет собой H или галоген;  
каждый R<sub>5'</sub> независимо представляет собой H или галоген; и  
каждый R независимо представляет собой С<sub>1-6</sub> алкил, каждый из которых, независимо,  
может быть необязательно замещен 1-3 кратно галогеном.

[00122] В некоторых вариантах реализации формулы (2), C(R<sub>5'</sub>)<sub>3</sub> представляет собой CF<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>F или CH<sub>3</sub>.

[00123] В некоторых вариантах реализации формулы (2), соединение представляет собой формулу (2'):

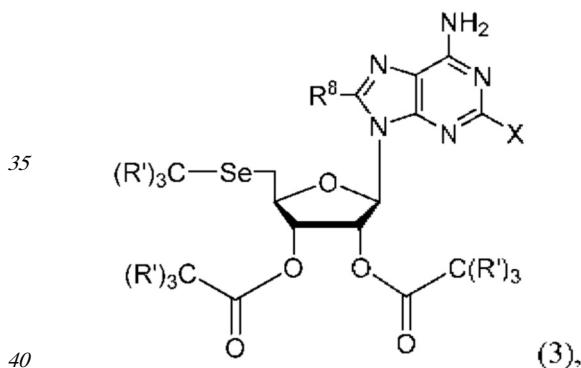


[00124] В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R<sup>8</sup> представляет собой H. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R<sup>8</sup> представляет собой атом галогена. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R<sup>8</sup> представляет собой F.

[00125] В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), X представляет собой H. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), X представляет собой атом галогена. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), X представляет собой F.

20 [00126] В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R каждый независимо представляет собой незамещенный C<sub>1-6</sub>алкил. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R каждый независимо представляет собой C<sub>1-3</sub>алкил, каждый из которых независимо может необязательно быть замещенным 1-3 кратно галогеном. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R каждый независимо 25 представляет собой незамещенный C<sub>1-3</sub>алкил. В некоторых вариантах реализации формулы (2) или (2'), R каждый независимо представляет собой -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

30 [00127] В некоторых вариантах реализации в данном документе предложено соединение формулы (3):



или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер,

где R<sup>8</sup> представляет собой H или галоген;

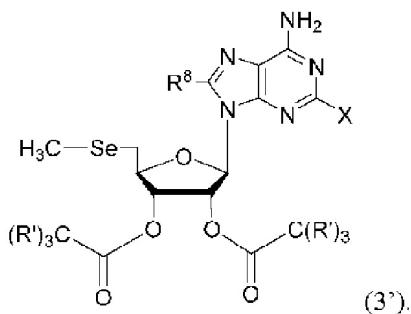
X представляет собой H или галоген; и

каждый R' независимо представляет собой H или галоген.

45 [00128] В некоторых вариантах реализации формулы (3), -Se-C(R')<sub>3</sub> представляет собой -Se-CH<sub>3</sub>, -Se-CHF<sub>2</sub>, -Se-CH<sub>2</sub>F или -Se-CF<sub>3</sub>.

[00129] В некоторых вариантах реализации формулы (3), соединение представляет

собой формулу (3'):

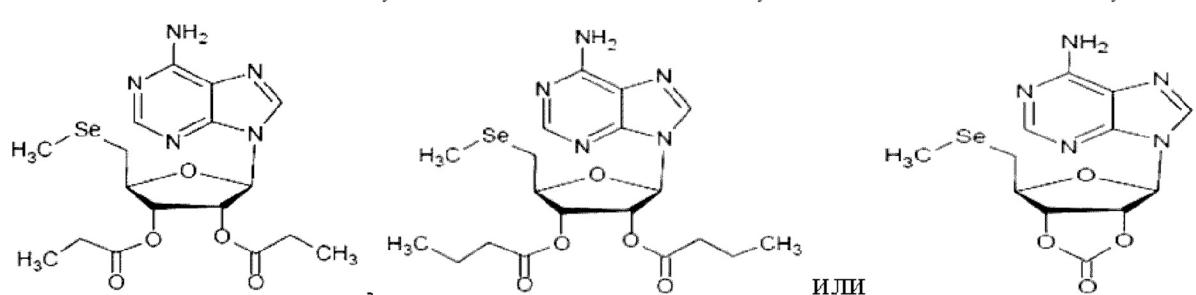
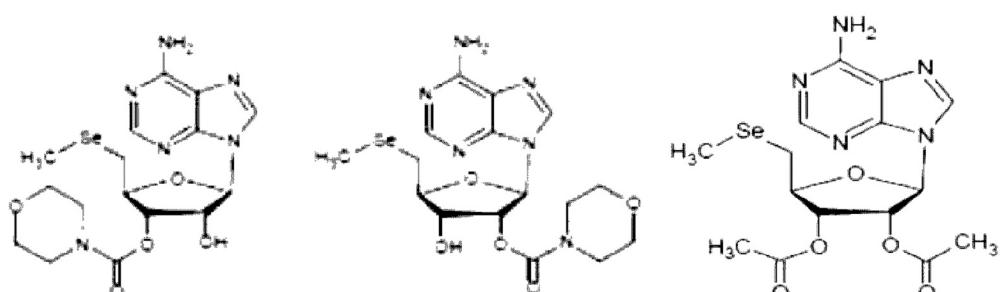


[00130] В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), R<sup>8</sup> представляет собой H. В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), R<sup>8</sup> представляет собой атом галогена. В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), R<sup>8</sup> представляет собой F.

[00131] В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), X представляет собой H. В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), X представляет собой атом галогена. В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), X представляет собой F.

[00132] В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), каждый C(R')<sub>3</sub> независимо представляет собой CF<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub> или CH<sub>2</sub>F, или CH<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), каждый C(R')<sub>3</sub> независимо представляет собой CH<sub>2</sub>F или CH<sub>3</sub>. В некоторых вариантах реализации формулы (3) или (3'), каждый C(R')<sub>3</sub> представляет собой CH<sub>3</sub>.

[00133] В некоторых вариантах реализации в данном документе предложено соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер.

Композиции

[00134] В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены композиции, содержащие и/или доставляющие (т.е., при введении в систему или субъекту) соединение любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении

предложены композиции, содержащие только одно соединение по любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены композиции, содержащие одно или более соединений любой из формул (1)-(3) или их фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер, и один или более носителей или вспомогательных веществ, подходящих для введения человеку или животному в соответствии с данным изобретением.

[00135] В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены композиции, которые доставляют активный фрагмент соединения по любой из формул (1)-(3). В некоторых вариантах реализации, композиция содержит активный метаболит соединения любой из формул (1)-(3). В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение, которое образует метаболит соединения любой из формул (1)-(3) при введении указанной композиции, причем данный метаболит поддерживает соответствующую биологическую активность.

[00136] В некоторых вариантах реализации в данном документе представлены композиции, представляющие собой фармацевтические композиции, содержащие активный фармацевтический ингредиент (АФИ) и один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ. В некоторых вариантах реализации АФИ представляет собой или включает соединение любой из формул (1)-(3). В некоторых вариантах реализации, АФИ включает соединение любой из формул (1)-(3). В некоторых вариантах реализации, АФИ включает одно соединение любой из формул (1)-(3).

[00137] В некоторых вариантах реализации в данном документе представлены способы изготовления предоставленной композиции, например, путем объединения одного или более подходящих (т.е., фармацевтически приемлемых) носителей или вспомогательных веществ с соединением любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой солью, пролекарством или изомером. В некоторых вариантах реализации, один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ являются подходящими для перорального введения, и смесь составляют в пероральный состав. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой твердую лекарственную форму. В некоторых вариантах реализации твердая лекарственная форма представляет собой таблетку, капсулу или таблетку для рассасывания. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой жидкую лекарственную форму (например, напиток).

[00138] В Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) раскрываются различные носители, используемые при составлении фармацевтических композиций, и известные способы их приготовления. В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемое количество соединения, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации количество активного ингредиента, которое может быть скомбинировано с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, может варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению хозяина и/или конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть скомбинировано с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтический эффект. Обычно это количество составляет от примерно 1% до примерно 99% активного ингредиента, от примерно 5% до примерно 70% или от примерно 10% до примерно 30%.

[00139] В некоторых вариантах реализации в композициях также могут присутствовать смачивающие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивы, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

[00140] Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбильпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

[00141] В некоторых вариантах реализации композиции по данному изобретению

включают препараты, подходящие для перорального, назального, местного (включая трансбукиальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. В некоторых вариантах реализации композиции могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. В некоторых вариантах реализации композиции, как описано в данном документе, содержат вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из циклодекстринов, липосом, мицеллообразующих агентов, например, желчных кислот, и полимерных носителей, например сложных полизифиров и полиангидридов; и соединение, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации композиции, как описано в данном документе, составляют с перорально биодоступным соединением, как описано в данном документе.

[00142] В некоторых вариантах реализации способы получения таких композиций могут включать стадию объединения соединения, как описано в данном документе, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами и, необязательно, одним или более дополнительными ингредиентами. В некоторых вариантах реализации композиции получают путем равномерного объединения соединения, как описано в настоящем документе, с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями, или с обеими, а затем, если необходимо, формированием продукта.

[00143] В некоторых вариантах реализации описанные в данном документе

композиции, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди, или трагаканта), порошков, гранул или в виде раствора или супензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масловоде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахарозы и аравийской камеди) и/или для полоскания рта, напитков и тому подобного, каждый из которых содержит заранее определенное количество соединения, как описано в данном документе, в качестве активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации соединение, как описано в данном документе, может альтернативно или дополнительно вводиться в виде болюса, электуария или пасты.

[00144] В некоторых вариантах реализации в твердых дозированных формах, как описано в данном документе, для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и тому подобное), активный ингредиент смешивают с одним

или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или гидрофосфат кальция, и/или любой из следующих: наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; связывающие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты,

- 5 желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; увлажнители, такие как глицерин; разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; замедляющие растворение агенты, такие как парафин; ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; смачивающие агенты, такие как,
- 10 например, цетиловый спирт, моностеарат глицерина и неионные поверхностно-активные вещества; абсорбенты, такие как каолиновая и бентонитовая глина; смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и красители. В некоторых вариантах реализации в случае капсул, таблеток и пилоль фармацевтические композиции также могут содержать
- 15 буферные агенты. В некоторых вариантах реализации твердые композиции аналогичного типа также можно использовать в качестве наполнителей в желатиновых капсулах с мягкой и твердой оболочкой, используя такие носители, как лактоза или молочные сахара, а также полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой и тому подобное.

[00145] В некоторых вариантах реализации таблетка может быть изготовлена

- 20 прессованием или формовкой, необязательно, с одним или более дополнительными ингредиентами. В некоторых вариантах реализации прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием связующего вещества (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, дезинтегранта (например, гликолята крахмала натрия или сшитой
- 25 карбоксиметилцеллюлозы натрия), поверхностно-активного или диспергирующего агента. В некоторых вариантах реализации, формованные таблетки могут быть изготовлены в подходящей машине, в которой смесь порошкообразного соединения увлажняют инертным жидким разбавителем.

[00146] В некоторых вариантах реализации таблетки и другие твердые дозированные

- 30 формы фармацевтических композиций, как описано в данном документе, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут быть необязательно с линией разлома или приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другими хорошо известными покрытиями в области фармацевтики. В некоторых вариантах реализации они могут быть составлены так, чтобы обеспечить медленное
- 35 или контролируемое высвобождение активного ингредиента в нем, используя, например, гидроксипропилметилцеллюлозу в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения, другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросфера. В некоторых вариантах реализации они могут быть составлены для быстрого высвобождения, например, лиофилизированы. В некоторых вариантах реализации они
- 40 могут быть стерилизованы, например, фильтрованием через задерживающий бактерии фильтр или включением стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены в стерилизованной воде или в некоторой другой стерилизованной инъецируемой среде непосредственно перед использованием. В некоторых вариантах реализации эти композиции могут также необязательно
- 45 содержать затемняющий вещества и могут представлять собой композицию, в которой они высвобождают только активный ингредиент(ы) или предпочтительно, в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой. Примеры капсулирующих композиций, которые можно использовать, включают

полимерные вещества и воски. В некоторых вариантах реализации активный ингредиент может быть в микрокапсулированной форме, если необходимо, с одним или более из вышеописанных вспомогательных веществ.

[00147] В некоторых вариантах реализации жидкие лекарственные формы для

- 5 перорального введения соединений, как описано в настоящем документе, включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, сусpenзии, сиропы и эликсиры. В некоторых вариантах реализации в дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, такие как, например, вода или другие
- 10 растворители, солюбилизирующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этил карбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных
- 15 кислот и сorbitана и их смеси.

[00148] В некоторых вариантах реализации, помимо инертных разбавителей, композиции для перорального введения могут содержать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и сусpenдирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

- 20 [00149] В некоторых вариантах реализации сусpenзии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать сусpenдирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитола и сорбита, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

- 25 [00150] В некоторых вариантах реализации композиции, как описано в настоящем документе для ректального или вагинального введения, могут быть представлены в виде суппозитория, который может быть приготовлен путем смешивания одного или более соединений, как описано в настоящем документе, с одним или более подходящими нераздражающими вспомогательными веществами или носителями, включающими,
- 30 например, масло какао, полиэтиленгликоль, воск для суппозиториев или салицилат, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке или вагинальной полости, и высвобождать активное соединение.

- 35 [00151] В некоторых вариантах реализации, описанные в данном документе композиции, которые подходят для вагинального введения, включают пессарии, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или составы для распыления, содержащие такие носители, которые известны в данной области техники как подходящие.

- 40 [00152] В некоторых вариантах реализации лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения, как описано в настоящем документе, включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластиры и лекарственные формы для ингаляции. В некоторых вариантах реализации, активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

- 45 [00153] В некоторых вариантах реализации мази, пасты, кремы и гели могут содержать, в дополнение к соединению, как описано в данном документе, вспомогательные вещества, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы,

бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка, или их смеси.

[00154] В некоторых вариантах реализации порошки и аэрозоли могут содержать, в дополнение к соединению, как описано в данном документе, вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и порошок полиамида, или смеси этих веществ. В некоторых вариантах реализации, спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфтоглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

[00155] В некоторых вариантах реализации трансдермальные пластыри имеют

10 дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки соединения, как описано в данном документе, в организм. В некоторых вариантах реализации, растворение или диспергирование соединения в подходящей среде может давать такие лекарственные формы. В некоторых вариантах реализации, усилители абсорбции могут быть использованы для увеличения потока соединения через кожу.

15 В некоторых вариантах реализации, либо обеспечение регулирующей скорость мембранны, либо диспергирование соединения в полимерной матрице или геле может контролировать скорость такого проникновения.

[00156] В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены офтальмологические композиции, глазные мази, порошки, растворы и тому подобное.

20 [00157] В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, подходящие для парентерального введения, включают одно или более соединений, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные растворы или дисперсии для инъекций непосредственно перед использованием, которые могут содержать сахара, спирты, антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают композицию изотонической с кровью предполагаемого реципиента или суспендирующих или загущающих агентов.

25 [00158] Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в фармацевтических композициях, как описано в настоящем документе, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, так и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. В некоторых вариантах реализации, надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

[00159] В некоторых вариантах реализации композиции, описанные в настоящем

30 документе, могут содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. В некоторых вариантах реализации, предотвращение действия микроорганизмов на соединения по настоящему изобретению может быть обеспечено путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой 35 кислоты и тому подобного. В некоторых вариантах реализации, может быть желательным включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и тому подобное. В некоторых вариантах реализации пролонгированное всасывание инъецируемой фармацевтической формы может быть вызвано включением

агентов, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

[00160] В некоторых вариантах реализации, например, для продления действия лекарственного средства, желательно замедлить всасывание лекарства от подкожной или внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах реализации это может быть достигнуто путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде. В некоторых вариантах реализации скорость всасывания лекарственного средства затем зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. В некоторых вариантах реализации отсроченная абсорбция лекарственной формы для парентерального введения достигается путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

[00161] В некоторых вариантах реализации инъецируемые депо-формы получают путем формирования микрокапсульных матриц рассматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В некоторых вариантах реализации, в зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, и природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения лекарственного средства может быть контролированной. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоЭфиры) и поли(ангидриды). В некоторых вариантах реализации, композиции для инъекций депо готовят путем введения лекарственного средства в липосомы или микроэмulsionи, которые совместимы с тканями организма.

[00162] В некоторых вариантах реализации формы с лекарственным покрытием включают покрытые или лекарственные стенты и имплантируемые устройства. В некоторых вариантах реализации стенты, выделяющие лекарственное средство и другие устройства могут быть покрыты соединением или фармацевтическим препаратом, и могут дополнительно содержать полимер, предназначенный для пролонгированного высвобождения.

[00163] В некоторых вариантах реализации соединение или фармацевтический препарат вводят перорально. В некоторых вариантах реализации соединение или фармацевтический препарат вводят внутривенно. В некоторых вариантах реализации соединение присоединяют через расщепляемый линкер к твердой подложке, которую вводят с помощью катетера. В некоторых вариантах реализации пути введения включают сублингвальное, внутримышечное и трансдермальное введение.

[00164] В некоторых вариантах реализации соединения, как описано в данном документе, вводят в виде фармацевтических препаратов людям и животным, их можно вводить *per se* или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1% до 99,5% или от 0,5% до 90% активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

[00165] В некоторых вариантах реализации соединения, как описано в настоящем документе, могут вводиться перорально, парентерально, местно или ректально. В некоторых вариантах реализации они, конечно, приведены в формах, подходящих для каждого пути введения. В некоторых вариантах реализации их вводят в форме таблеток или капсул, путем инъекции, ингаляции, лосьона для глаз, мази, суппозитория и т.д., путем введения инъекцией, инфузией или ингаляцией; местным нанесением лосьона или мази; и ректально через суппозитории.

[00166] В некоторых вариантах реализации соединения, как описано в настоящем документе, могут вводиться людям и другим животным для терапии любым подходящим путем введения, включая пероральное, назальное введение, например, посредством

аэрозоля, спрея, ректально, интравагинально, парентерально, интрацистернально и местно, например, в виде порошков, мазей или капель, в том числе в щечной и сублингвальной форме.

[00167] В некоторых вариантах реализации соединения, как описано в настоящем

5 документе, которые могут быть использованы в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем документе, составляют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы обычными способами, известными специалистам в данной области техники.

[00168] В некоторых вариантах реализации фактические уровни дозировки активных

10 ингредиентов в фармацевтических композициях, как описано в настоящем документе, могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

15 [00169] В некоторых вариантах реализации выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного соединения, как описано в данном документе, путь введения, время введения, скорость выведения или метаболизм конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании 20 с конкретным применяемым соединением, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предыдущая история болезни пациента, поддающегося лечению, и подобные факторы, хорошо известны в области медицины.

25 [00170] Врач или ветеринар, имеющий обычные навыки в данной области техники, может определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах реализации, врач или ветеринар может начинать с дозы соединений, как описано в настоящем документе, в фармацевтической композиции при уровнях, меньших, чем уровни, требуемые для достижения желаемого терапевтического эффекта, а затем постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект.

30 [00171] В некоторых вариантах реализации соединения или фармацевтические композиции, как описано в настоящем документе, предоставляются субъекту длительно. В некоторых вариантах реализации длительное лечение включает любую форму повторного введения в течение продолжительного периода времени, такого как повторное введение в течение одного или более месяцев, между месяцем и годом, одним

35 или более годами или дольше. В некоторых вариантах реализации длительное лечение включает введение соединения или фармацевтической композиции, как описано в данном документе, многократно в течение жизни субъекта. В некоторых вариантах реализации длительное лечение включает регулярное введение, например, один или более раз в день, один или более раз в неделю, или один или более раз в месяц. В некоторых

40 вариантах реализации подходящая доза, такая как суточная доза соединения, как описано в данном документе, будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации дозы соединений, как описано

45 в настоящем документе, для пациента, при использовании для указанных эффектов будут варьироваться от примерно 0,0001 до примерно 100 мг на кг массы тела в день. В некоторых вариантах реализации суточная доза будет составлять от 0,001 до 50 мг соединения на кг массы тела. В некоторых вариантах реализации суточная доза будет

составлять от 0,01 до 10 мг соединения на кг массы тела. Однако можно использовать более низкие или более высокие дозы. В некоторых вариантах реализации доза, вводимая субъекту, может быть изменена, когда физиология субъекта изменяется из-за возраста, прогрессирования заболевания, веса или других факторов.

5 [00172] В некоторых вариантах реализации эффективная суточная доза активного соединения может вводиться в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых раздельно с соответствующими интервалами в течение дня, необязательно, в единичных дозированных формах.

10 [00173] В некоторых вариантах реализации соединения, как описано в данном документе, вводят отдельно. В некоторых вариантах реализации соединение, как описано в данном документе, вводят в виде фармацевтической композиции, как описано в данном документе.

15 [00174] В некоторых вариантах реализации соединения, как описано в данном документе, могут быть составлены для введения любым удобным способом для применения в медицине или ветеринарии по аналогии с другими фармацевтическими препаратами.

#### Получение соединений и/или композиций

20 [00175] В некоторых вариантах реализации соединение любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер могут быть получены полностью или частично с помощью химического синтеза; в некоторых вариантах реализации, соединение любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер, полученное частично с помощью химического синтеза, получают с использованием полусинтетических способов. В некоторых вариантах реализации соединение любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемая соль, пролекарство или изомер могут быть получены с помощью выделения.

25 [00176] В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены способы получения Соединения и/или Композиции, как описано в настоящем документе, включающие анализ одного или более образцов, например, для обнаружения в нем биологической активности. В некоторых вариантах реализации один или более образцов содержат соединение любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер. В некоторых вариантах реализации способы, представленные в настоящем документе, включают этап обнаружения и/или подтверждения наличия обнаруживаемой биологической активности в одном или более образцах. В некоторых вариантах реализации способы, представленные в настоящем документе, включают этап подтверждения отсутствия обнаруживаемой биологической активности в одном или более образцах.

30 [00177] В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой ингибицию выработки глюкозы. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют в клетках НерG2. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют в клетках Н4ПЕ.

35 [00178] В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой снижение уровня HbA1c в сыворотке. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют на инсулинерезистентных и диабетических мышах.

40 [00179] В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой повышенную толерантность к глюкозе. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют на инсулинерезистентных и диабетических мышах.

[00180] В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой ингибицию экспрессии G6pc. В некоторых вариантах реализации

б 5 биоактивность тестируют на клетках AML-12. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют на клетках AML-12, стимулированных диабетическими стимулами. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют в клетках НерГ2 человека. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют в печени инсулинорезистентных и диабетических мышей.

[00181] В некоторых вариантах реализации биоактивность усиливается фосфорилированием Pdk1, Akt, Foxo1 и AS160. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируется в печени. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируется в скелетных мышцах.

10 [00182] В некоторых вариантах реализации биологическая активность усиливает экспрессию Glut4. В некоторых вариантах реализации, биоактивность тестируют на клетках AML-12 печени мыши. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют в печени инсулинорезистентных и диабетических мышей.

15 [00183] В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой активацию и/или восстановление передачи сигналов инсулина у субъекта в инсулинорезистентном состоянии. В некоторых вариантах реализации субъект характеризуется значительными уровнями циркулирующего инсулина. В некоторых вариантах реализации инсулинорезистентное состояние характеризуется сниженным уровнем и/или активностью фосфорилированного рецептора инсулина у субъекта. В 20 некоторых вариантах реализации у субъекта имеется диабет и/или связанные с диабетом заболевание, расстройства или состояния.

25 [00184] В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой повышенный захват глюкозы. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой клетки печени и клетки скелетных мышц. В некоторых вариантах реализации биологическая активность представляет собой снижение уровня инсулина в сыворотке. В некоторых вариантах реализации биоактивность тестируют на инсулинорезистентных и диабетических мышах.

Идентификация и/или характеристика соединений, и/или композиций

30 [00185] В некоторых вариантах реализации в данном изобретении предложены способы для идентификации и/или характеристики соединения и/или композиции, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации такой способ включает стадии тестирования множества образцов, каждый из которых содержит соединение любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемую соль, пролекарство или изомер для определения его биологической активности; и определение наличия и/или 35 уровня указанной биологической активности в одном или более таких образцах. В некоторых вариантах реализации предоставленный способ включает обнаружение указанной биологической активности, связанной с присутствием и/или уровнем соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации предоставленный способ 40 включает стадию идентификации и/или характеристики конкретного соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера путем обнаружения указанной биологической активности соединения.

45 [00186] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой ингибирование выработки глюкозы. В некоторых вариантах реализации, биоактивность тестируют в клетках НерГ2. В некоторых вариантах реализации, биоактивность тестируют в клетках Н4ПЕ.

[00187] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой снижение уровня HbA1c в сыворотке. В некоторых вариантах реализации,

бионактивность тестируют на инсулинерезистентных и диабетических мышах.

[00188] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой повышенную толерантность к глюкозе. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют на инсулинерезистентных и диабетических мышах.

- 5 [00189] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой ингибирование экспрессии G<sub>brcs</sub>. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют на клетках AML-12. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют на клетках AML-12, стимулированных диабетическими стимулами. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют в клетках HepG2 человека. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют в печени инсулинерезистентных и диабетических мышей.

- 10 [00190] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой усиленное фосфорилирование Pdk1, Akt, Foxo1 и AS160. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируется в печени. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируется в скелетных мышцах.

- 15 [00191] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность усиливает экспрессию Glut4. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют на клетках AML-12 печени мыши. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют в печени инсулинерезистентных и диабетических мышей.

- 20 [00192] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой активацию и/или восстановление передачи сигналов инсулина у субъекта в инсулинерезистентном состоянии. В некоторых вариантах реализации, субъект характеризуется значительными уровнями циркулирующего инсулина. В некоторых вариантах реализации, инсулинерезистентное состояние характеризуется сниженным уровнем и/или активностью фосфорилированного рецептора инсулина у субъекта. В некоторых вариантах реализации, у субъекта имеется диабет и/или связанные с диабетом заболевание, расстройства или состояния.

- 25 [00193] В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой усиленный захват глюкозы клетками у субъекта. В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой усиленный захват глюкозы клетками печени и скелетных мышц. В некоторых вариантах реализации, биологическая активность представляет собой снижение уровня инсулина в сыворотке. В некоторых вариантах реализации, бионактивность тестируют на инсулинерезистентных и диабетических мышах.

### 35 Применения

- 30 [00194] В настоящем описании предложены описанные в данном документе соединения, например соединение 43, могут имитировать инсулин для ингибирования выработки глюкозы (см., например, Пример 2); снизить уровень глюкозы в крови и уровни HbA1c, ослабить развитие гипергликемии и улучшить толерантность к глюкозе у пациентов с инсулинерезистентным диабетом (см., например, пример 3); ингибировать экспрессию G<sub>brcs</sub> в печени инсулинерезистентных субъектов с диабетом и имитировать, но обходить инсулин, чтобы ингибировать экспрессию G<sub>brcs</sub> в культивируемых клетках печени мыши и человека, и усиливать действие инсулина (см., например, пример 4); имитируют, но обходят инсулин, чтобы активировать Pdk1 и Akt и усиливать фосфорилирование Foxo1 в печени (см., например, Пример 5); усиливают экспрессию Glut4 в печени инсулинерезистентных субъектов с диабетом и имитируют, но обходят инсулин для усиления экспрессии Glut4 в клетках печени мыши (см., например, Пример 6), фосфорилирование AS160 (ключевое событие для транспорта GLUT4 из цитозольных

везикул в плазматической мембране для облегчения захвата глюкозы) клетками печени человека (см., например, Пример 8) и захват глюкозы клетками печени мыши (см., например, Пример 6); усиливают и/или восстанавливают передачу сигналов инсулина Pdk1/Akt/Foxo1 в скелетных мышцах инсулинерезистентных субъектов с диабетом (см.,

5 например, пример 7), имитируют путем обходного инсулина активацию Akt и усиливают фосфорилирование AS 160 (ключевое событие для GLUT4 транспорт от цитозольных везикул к плазматической мембране) в клетках скелетных мышц (см., например, Пример 8) и потенцирование действия инсулина для стимуляции захвата глюкозы клетками скелетных мышц (см., например, Пример 7); активировать и/или восстанавливать

10 функцию рецептора инсулина (Insr) в скелетных мышцах и печени инсулинерезистентных субъектов с диабетом, а также в культурируемых мышечных скелетных мышцах и клетках печени человека (см., например, Пример 8); и ослаблять гиперинсулинемию, не нарушая функцию почек и/или не приводя к повреждению печени (Пример 9).

Соответственно, в данном изобретении ясно продемонстрировано, что описанные в 15 данном документе соединения полезны для модуляции метаболизма глюкозы и лечения расстройств, связанных с инсулином, как описано в данном документе.

[00195] В некоторых вариантах реализации, настоящее описание относится к способам модулирования метаболизма глюкозы и/или лечения нарушений метаболизма глюкозы, включающим введение терапевтически эффективного количества соединения любой 20 из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, нарушения метаболизма глюкозы включают уровень глюкозы в крови, который не находится в пределах нормы. В некоторых вариантах реализации, нарушения метаболизма глюкозы связаны с дефектным поглощением и/или переносом глюкозы. В некоторых вариантах реализации, нарушения 25 метаболизма глюкозы представляют собой сахарный диабет, дефицит глицеральдегид-3-fosfatdehidrogenazy, глюкозурию, гипергликемию, гиперинсулинозм или гипогликемию.

[00196] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения нарушений переноса глюкозы, включающие введение терапевтически 30 эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, нарушения переноса глюкозы представляют собой нарушение всасывания глюкозы-галактозы, синдром Фанкони-Биккеля или болезнь Де Виво (синдром дефицита GLUT1 (GLUT1DS)).

35 [00197] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы улучшения фосфорилирования AS160 для транслокации белков-переносчиков глюкозы (GLUT) из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для захвата глюкозы, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

40 [00198] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы усиления захвата глюкозы как в печени, так и в скелетных мышцах, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

45 [00199] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы лечения расстройств, связанных с инсулином, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах

реализации, расстройства, связанные с инсулином, выбраны из группы, состоящей из предиабета, диабета типа I, диабета типа II, гипогликемии, гипергликемии, резистентности к инсулину, секреторной дисфункции, потери функции р-клеток поджелудочной железы и потери р-клеток поджелудочной железы. В некоторых 5 вариантах реализации, пациенты с инсулин-зависимыми расстройствами являются инсулиннезависимыми пациентами, имеющими инсулин-связанные расстройства.

[00200] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения нарушений восприимчивости к инсулину, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его 10 фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. Некоторые примеры нарушений резистентности к инсулину описаны выше. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы предназначены для лечения диабета II типа, гиперинсулинемии, гиперпроинсулинемии, ретинопатии, невропатии или нефропатии. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы ослабляют 15 гиперинсулинемию, не нарушая функцию почек и/или не приводя к повреждению печени.

[00201] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения ожирения, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00202] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы лечения диабета, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, диабет 20 представляет собой диабет I типа. В некоторых вариантах реализации, диабет 25 представляет собой диабет II типа.

[00203] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения гипергликемии, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00204] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы ингибирования выработки глюкозы, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00205] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы снижения уровня HbA1c в сыворотке, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00206] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы повышения толерантности к глюкозе, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00207] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы ингибирования экспрессии Gbrs, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00208] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы усиления фосфорилирования Pdk1, Akt и Foxo1 в печени и/или в скелетных мышцах, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его

45 фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00209] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы увеличения экспрессии Glut4, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00210] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы активации и/или восстановления функции передачи сигналов рецептора инсулина у субъекта в инсулинерезистентном состоянии, включающие введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли,

- 5 пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, субъект характеризуется значительными уровнями циркулирующего инсулина. В некоторых вариантах реализации, инсулинерезистентное состояние характеризуется сниженным уровнем и/или активностью фосфорилированного рецептора инсулина у субъекта. В некоторых вариантах реализации, у субъекта имеется диабет и/или связанные с диабетом
- 10 заболевание, расстройства или состояния. В некоторых вариантах реализации, субъект имеет диабет II типа.

[00211] В некоторых вариантах реализации настоящее описание относится к способам увеличения захвата глюкозы клетками у субъекта, включающим введение соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой клетки скелетных мышц.

- 15 [00212] Было показано, что соединение №43 может имитировать инсулин, но обходить его, чтобы активировать передачу сигналов рецептора инсулина в печени и скелетных мышцах, и может восстанавливать функцию рецептора инсулина даже у
- 20 инсулинерезистентных пациентов с диабетом. Эти наблюдения показывают, что Соединение №43 может быть использовано для лечения заболеваний или синдромов, характеризующихся нарушением передачи сигналов инсулина, таких как синдром поликистозных яичников (PCOS), болезнь Альцгеймера (БА) и саркопения.

- 25 [00213] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. СПКЯ представляет собой гормональный дисбаланс, который может вызвать нерегулярные месячные, нежелательный рост волос и акне. Молодые женщины с СПКЯ часто имеют
- 30 повышенный уровень инсулина, который может заставить яичники вырабатывать больше гормонов андрогенов, что приводит к увеличению волос на теле, появлению акне и нерегулярным или небольшим периодам. Наличие СПКЯ может вызвать резистентность к инсулину и развитие диабета 2 типа. Метформин представляет собой препарат, который часто назначают женщинам с СПКЯ, чтобы улучшить
- 35 чувствительность к инсулину и предотвратить развитие диабета 2 типа. Результаты показывают, что Соединение №43 является более активным, чем метформин, в ингибировании выработки глюкозы в культивируемых клетках печени и может восстанавливать функцию рецептора инсулина у инсулинерезистентных мышей с диабетом. Таким образом, Соединение №43 может быть потенциально полезным для
- 40 лечения СПКЯ.

- 45 [00214] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены способы лечения болезни Альцгеймера (БА), включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. Инсулиновая сигнализация в мозг важна для обучения и памяти, а резистентность к инсулину в мозге является основным фактором риска развития БА. Восстановление инсулиновой сигнализации стало потенциальной терапией для AD (White MF, Science 2003; 302:1710-1; De Felice DG et al, Alzheimer's & Dementia 2014; 10: S26-S32). Ввиду вышеприведенных результатов,

показывающих, что Соединение №43 проявляет инсулиноподобную активность и способно восстанавливать функцию рецептора инсулина у инсулинорезистентных субъектов, оно может быть потенциально полезным для лечения БА.

[00215] В некоторых вариантах реализации, в настоящем описании предложены

- 5 способы лечения саркопении, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. Саркопения характеризуется прогрессирующей потерей массы скелетных мышц с увеличением возраста, что приводит к снижению мышечной силы, снижению подвижности и функции, повышенной утомляемости, повышенному
- 10 риску травм, связанных с падением, и, часто, слабости (Candow and Chilibeck, 2005; Sakuma and Yamaguchi, 2012). Последние достижения в области биологии мышц показали, что передача сигналов инсулина (Insr/PI3K/Akt) является критической для синтеза мышечного белка и ингибирования деградации мышечного белка (посредством Akt/Foxo1-опосредованного ингибирования экспрессии двух генов атрофии Fbxo32 и Trim63).
- 15 Оптимальная передача сигналов инсулина ослабляет процессы истощения мышц, включая саркопению (Glass and Roubenoff, 2010; Ryall et al., 2008; Sakuma and Yamaguchi, 2012). Таким образом, стимуляторы передачи сигналов инсулина, аминокислотные добавки (для улучшения синтеза белка) и ингибиторы деградации протеосомных белков становятся новыми стратегиями лечения саркопении. Инсулиноподобная активность
- 20 Соединения №43 в активации передачи сигналов Insr/Pdk1/Akt/Foxo1 в скелетных мышцах даже у инсулинорезистентных мышей с диабетом, как описано в настоящем документе, предполагает потенциальное применение этого соединения для лечения атрофических состояний в мышцах.

[00216] Настоящее описание также указывает на то, что предложенные соединения,

- 25 вероятно, улучшают митохондриальную функцию и, следовательно, полезны для лечения митохондриальных заболеваний и/или дисфункции. В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы лечения митохондриальных заболеваний (например, вызванных дисфункциональными митохондриями), включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, заболевания, связанные с митохондриями, могут представлять собой дегенеративные заболевания (например, рак, сердечно-сосудистые заболевания и сердечная недостаточность, диабет 2 типа, болезни Альцгеймера и Паркинсона, ожирение печени, катаракта, остеопороз, истощение мышц, нарушения сна и
- 30 воспалительные заболевания, такие как псориаз, артрит и колит). В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы усиления митохондриальной функции, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.
- 35

- 40 [00217] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы усиления глюконеогенеза в головном мозге, включающие введение терапевтически эффективного количества соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера. В некоторых вариантах реализации, предложенные способы увеличивают захват глюкозы мозгом. В некоторых
- 45 вариантах реализации, предложенные способы предназначены для поддержания или восстановления функций мозга, включая память и обучение.

Комбинированная терапия

[00218] В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложено

использование соединений и/или композиций, как описано в данном документе, для комбинированной терапии заболевания, расстройства или состояния, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации, в данном изобретении предложены способы лечения пациентов с заболеванием, расстройством или состоянием, 5 которые получили, получают или получат один или более различных способов лечения указанного заболевания, расстройства или состояния, при этом способы включают введение терапевтически эффективное количество соединения любой из формул (1)-(3) или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства или изомера.

[00219] В некоторых вариантах реализации, одну или более терапий для пациентов

- 10 с инсулино-связанными расстройствами выбирают из группы, состоящей из инсулиновой терапии, например, для диабета типа I; диета и физические упражнения, например, для начинающего диабета типа II; пероральные противодиабетические средства, например, для ранней стадии диабета типа II; метформин; стимуляторы секреции инсулина, например сульфонилмочевины; глитазоны; базальный инсулин длительного действия; 15 инсулин промежуточного действия; и инсулин короткого (быстрого) действия. В некоторых вариантах реализации, терапия инсулином включает введение подкожно (п/к), внутривенно и/или путем ингаляции. В некоторых вариантах реализации, один или более способов лечения пациентов с нарушениями, связанными с инсулином, могут представлять собой в настоящее время разрабатываемые способы лечения, например, 20 инсулин-фумарилдикетопиразин (EDKP).

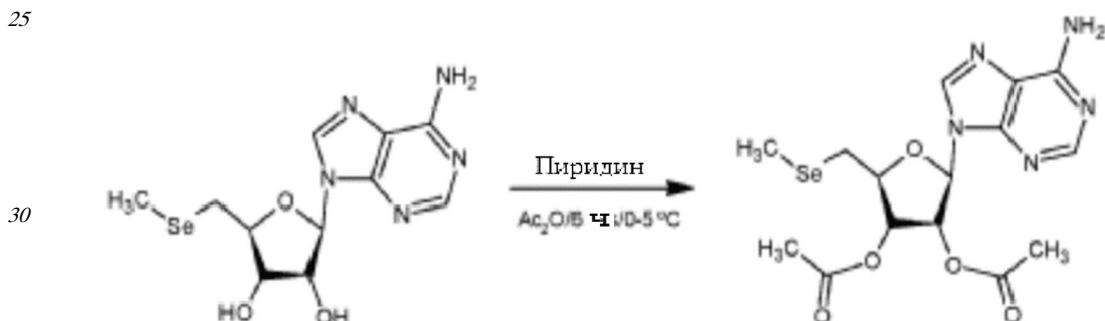
### ПРИМЕРЫ

Пример 1: Синтез Соединений №43, №50, №53, №69, №70 и №68

1a. Синтез аденоzin, 5'-Se-метил-5'-селено-, 2',3'-диацетата (Соединение №43)

Схема:

25



- [00220] Способ синтеза: 5'-Se-метил-5'-селено-аденоzin (1,0 г, 0,0029 моль, 1,0 моль экв.) и безводный пиридин (10 мл) помещали в высушенную в печи трехгорлую колбу объемом 50 мл, снаженную капельной воронкой, входом/выходом инертного газа и термометром. Колбу помещали в баню со льдом/солью и начинали перемешивание. Когда температура раствора упала до 0°C, по каплям добавляли уксусный ангидрид (10 мл, 0,105 моль, 36,47 моль экв.) в течение 15 минут, при этом во время добавления уксусного ангидрида температуру реакционной смеси поддерживали ниже 5°C. 35 Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при 5-10°C. Избыток уксусного ангидрида нейтрализовали добавлением ледяной воды (100 мл), а затем доводили pH до 7, добавляя 10% масс. водного раствора NaHCO<sub>3</sub>. Водную смесь экстрагировали этил ацетатом (2×100 мл). Объединенные этил ацетатные экстракты сушили над 40 безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 г), фильтровали в круглодонную колбу объемом 250 мл. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении при 35-40°C, получая неочищенный продукт в виде бледно-желтой сиропообразной жидкости, затем получали очищенный продукт в виде почти белых кристаллов (1,12 г, выход: 90,3%, чистота по ВЭЖХ: >99%).

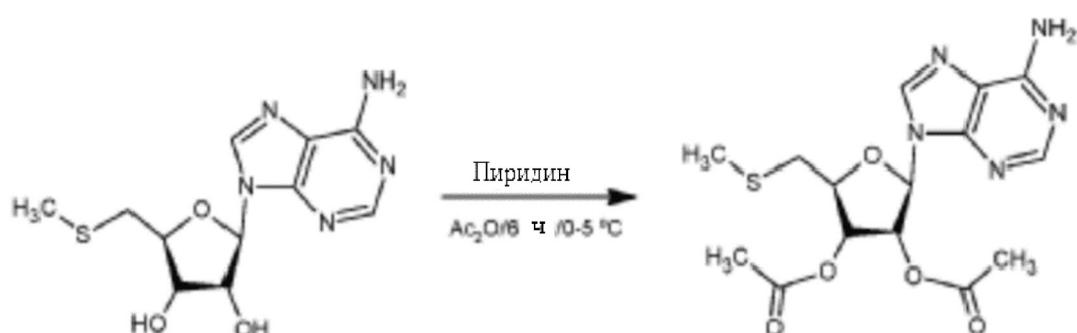
путем пропускания через колонку с силикагелем со смесью этилацетата и смесью изомеров гексана (1:3 об/об).

16. Синтез аденоzin, 5'-S-метил-5'-тио-, 2',3'-диацетата (Соединение №68):

Схема:

5

10



[00221] Способ синтеза: 5'-S-метил-5'-тио-аденоzin (1,0 г, 0,0033 моль, 1,0 моль экв.)

и безводный пиридин (10 мл) помещали в высушенную в печи трехгорлую колбу объемом 50 мл, снабженную капельной воронкой, входом/выходом инертного газа и термометром. Колбу помещали в баню со льдом/солью и начинали перемешивание. Когда температура раствора упала до 0°C, по каплям добавляли уксусный ангидрид (10 мл, 0,105 моль, 31,8 моль экв.) в течение 15 минут, при этом во время добавления

уксусного ангидрида температуру реакционной смеси поддерживали ниже 5°C.

Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при 5-10°C. Избыток уксусного ангидрида нейтрализовали добавлением ледяной воды (100 мл), а затем доводили pH до 7, добавляя 10% масс. водного раствора  $\text{NaHCO}_3$ . Водную смесь экстрагировали

этилацетатом (2×100 мл). Объединенные этил ацетатные экстракты сушили над

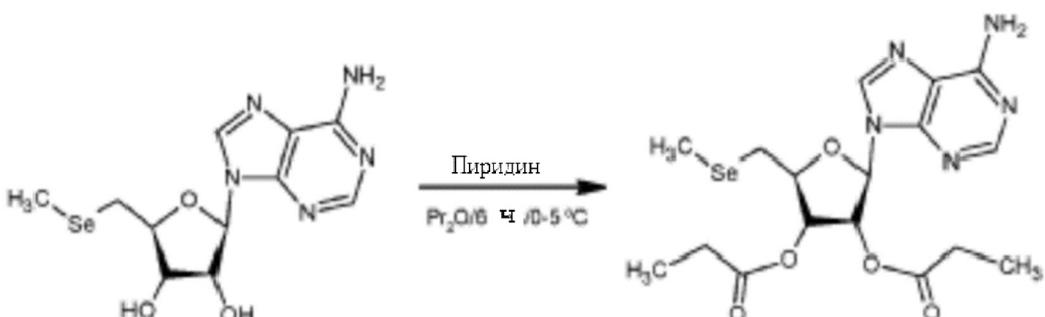
безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1 г), фильтровали в круглодонную колбу объемом 250 мл. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении при 35-40°C, получая неочищенный продукт в виде бледно-желтой сиропообразной жидкости, затем получали очищенный продукт в виде почти белых кристаллов (1,08 г, выход: 87%, чистота по ВЭЖХ: >99%) путем пропускания через колонку с силикагелем со смесью этилацетата и смесью изомеров гексана (1:3 об/об).

1с. Синтез аденоzin, 5'-Se-метил-5'-селено-, 2',3'-дипропионата (Соединение №69):

Схема:

35

40



[00222] Способ синтеза: 5'-Se-метил-5'-селено-аденоzin (1,0 г, 0,0029 моль, 1,0 моль экв.)

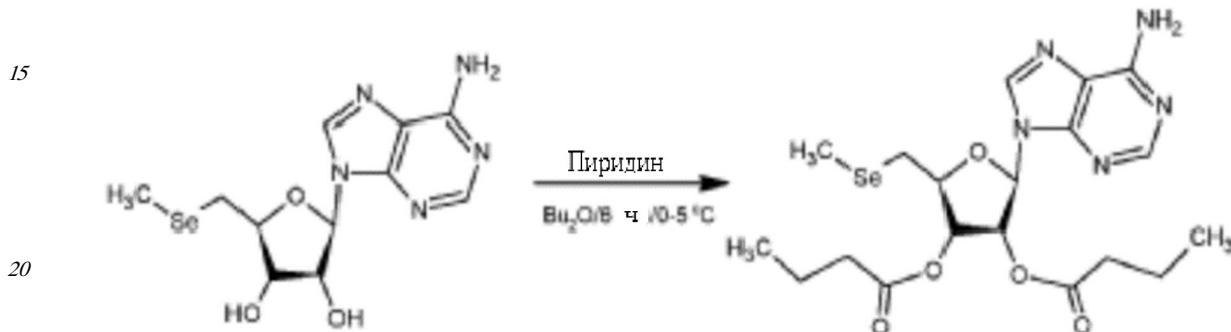
и безводный пиридин (10 мл) помещали в высушенную в печи трехгорлую колбу объемом 50 мл, снабженную капельной воронкой, входом/выходом инертного газа и термометром. Колбу помещали в баню со льдом/солью и начинали перемешивание.

Когда температура раствора упала до 0°C, по каплям добавляли пропионовый ангидрид (10 мл, 0,078 моль, 27,0 моль экв.) в течение 15 минут, при этом во время добавления пропионового ангидрида температуру реакционной смеси поддерживали ниже 5°C.

Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при 5-10°C. Избыток пропионового ангидрида нейтрализовали добавлением ледяной воды (100 мл), а затем доводили pH до 7, добавляя 10% масс. водного раствора NaHCO<sub>3</sub>. Водную смесь экстрагировали этил ацетатом (2×100 мл). Объединенные этил ацетатные экстракты сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 г), фильтровали в круглодонную колбу объемом 250 мл. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении при 35-40°C, получая неочищенный продукт в виде бледно-желтой сиропообразной жидкости, затем получали очищенный продукт в виде почти белых кристаллов (1,18 г, выход: 89.3%, чистота по ВЭЖХ: >99%) путем пропускания через колонку с силикагелем со смесью этилацетата и смесью изомеров гексана (1:3 об/об).

1d. Синтез аденоzin, 5'-Se-метил-5'-селено-, 2,3'-дибутаноата (Соединение №70):

Схема:

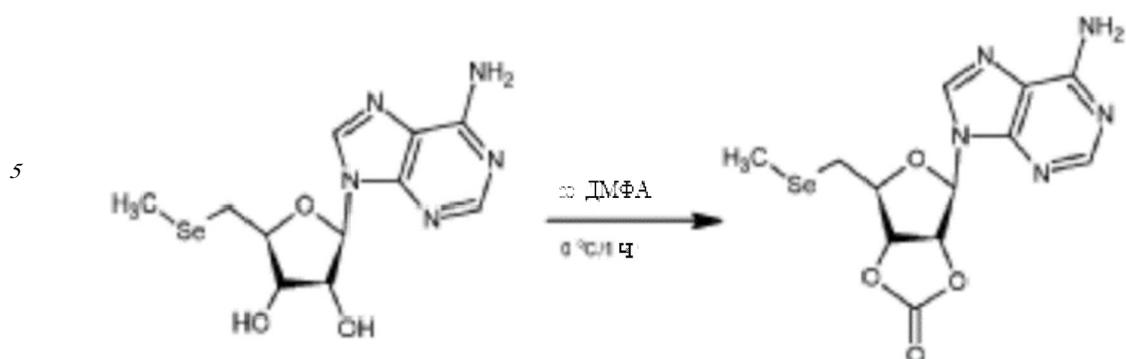


[00223] Способ синтеза: 5'-Se-метил-5'-селено-аденозин (1,0 г, 0,0029 моль, 1,0 моль экв.) и безводный пиридин (10 мл) помещали в высушенную в печи трехгорлую колбу объемом 50 мл, снаженную капельной воронкой, входом/выходом инертного газа и термометром. Колбу помещали в баню со льдом/солью и начинали перемешивание. Когда температура раствора упала до 0°C, по каплям добавляли масляный ангидрид (10 мл, 0,078 моль, 27,0 моль экв.) в течение 15 минут, при этом во время добавления масляного ангидрида температуру реакционной смеси поддерживали ниже 5°C.

Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при 5-10°C. Избыток масляного ангидрида нейтрализовали добавлением ледяной воды (100 мл), а затем доводили pH до 7, добавляя 10% масс. водного раствора NaHCO<sub>3</sub>. Водную смесь экстрагировали этил ацетатом (2×100 мл). Объединенные этил ацетатные экстракты сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 г), фильтровали в круглодонную колбу объемом 250 мл. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении при 35-40°C, получая неочищенный продукт в виде бледно-желтой сиропообразной жидкости, затем получали очищенный продукт в виде почти белых кристаллов (1,20 г, выход: 85.7%, чистота по ВЭЖХ: >99%) путем пропускания через колонку с силикагелем со смесью этилацетата и смесью изомеров гексана (1:3 об/об).

1e. Синтез аденоzin, 5'-Se-метил-5'-селено-, циклического 2',3'-карбоната (соединение №50):

Схема:



[00224] Способ синтеза: 5'-Se-метил-5'-аденозин (1,0 г, 0,0029 моль, 1,0 моль экв.) и безводный диметилформамид (20 мл) помещали в высушенную в печи трехгорлую колбу объемом 50 мл, снабженную капельной воронкой, входом/выходом инертного газа и термометром. Колбу помещали в баню со льдом/солью и начинали перемешивание. Когда температура раствора упала до 0°C, добавляли 15 карбонилдиimidазол (CDI, 0,57 г, 0,0035 моль, 1,21 моль экв.) при температуре ниже 5°C. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры, а затем реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при той же температуре в атмосфере аргона. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением остатка, который растворяли в смеси хлороформа (5 мл) и этанола (несколько капель) с получением прозрачного раствора, органический слой промывали 1% водн. раствором уксусной кислоты (2×1 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 г), фильтровали в круглодонную колбу объемом 250 мл. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении при 25-30°C, получая неочищенный продукт в виде бледно-желтой сиропообразной жидкости.

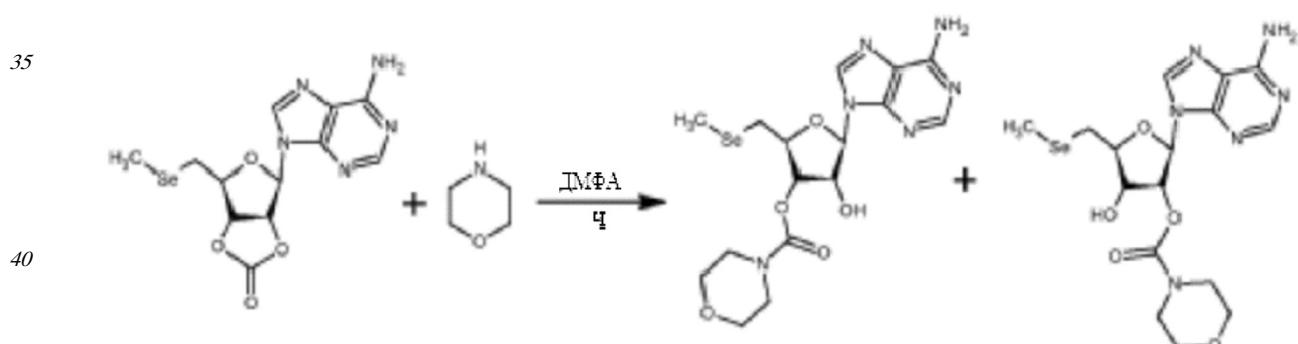
20

25

Неочищенный продукт растворяли в смеси этанол/вода (1:1 об./об.), а затем упаривали досуха при пониженном давлении при 45-50°C с получением остатка, добавляли смесь изомеров гексана (25 мл) и перемешивали в течение 10 минут, а затем упаривали досуха при пониженном давлении при 30-35°C, получая желаемый продукт в виде почти белых кристаллов (1,02 г, выход: 95,3%, чистота по ВЭЖХ: >99%).

30 1f. Синтез регион-изомерной смеси аденоцина, 5'-Se-метил-5'-селено-, 2'-морфолинокарбамата и аденоцина, 5'-Se-метил-5'-селено-, 3'-морфолинокарбамата (соединение №53):

Схема:



[00225] Способ синтеза: Аденозин, 5'-Se-метил-5'-селено-, циклический 2',3'-карбонат (1,0 г, 0,0027 моль, 1,0 моль экв.) и безводный диметилформамид (10 мл) помещали в высушенную в печи трехгорлую колбу объемом 50 мл, снабженную капельной воронкой, впускным/выпусканым отверстием для инертного газа и термометром. Добавляли 45 морфолин (0,26 г, 0,0029 моль, 1,1 моль экв.) при 20-25°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем упаривали досуха при

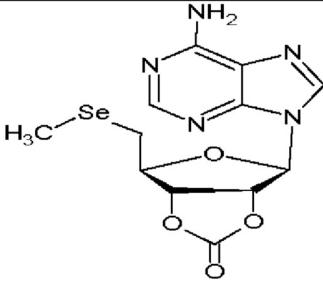
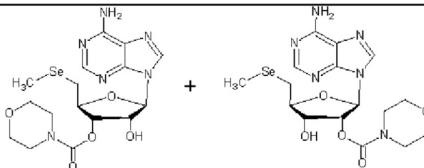
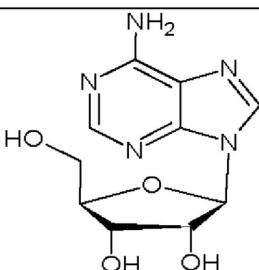
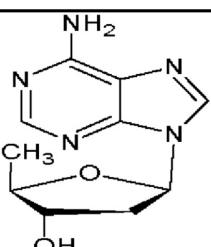
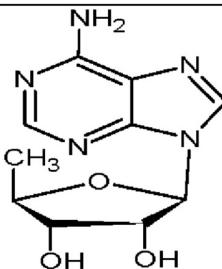
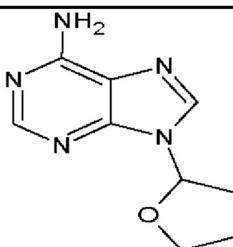
пониженном давлении при 45-50°C, получая остаток, добавляли смесь изомеров гексана (25 мл) и перемешивали в течение 10 минут для осаждения желаемого продукта изомерной области - смесив виде почти белого твердого вещества (1,12 г, выход: 91%, чистота по ВЭЖХ: >99%).

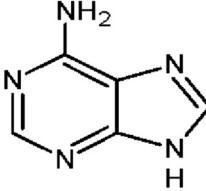
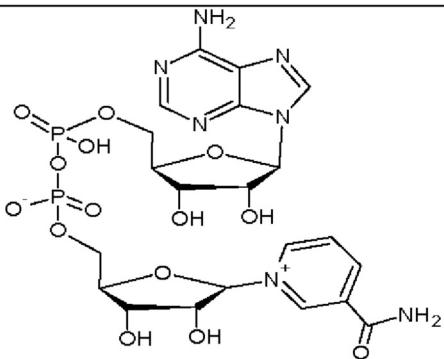
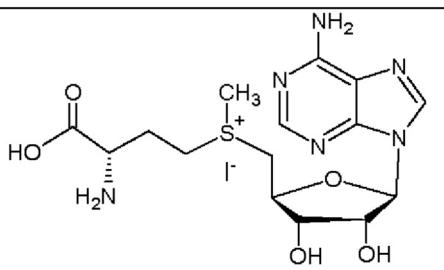
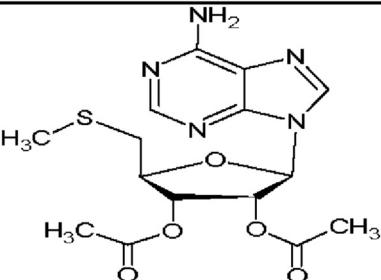
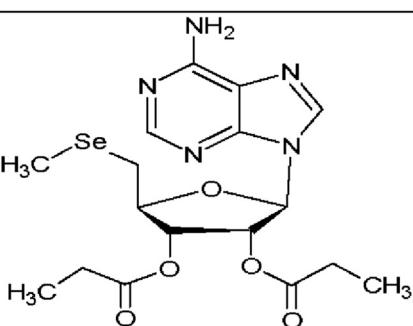
**Пример 2**

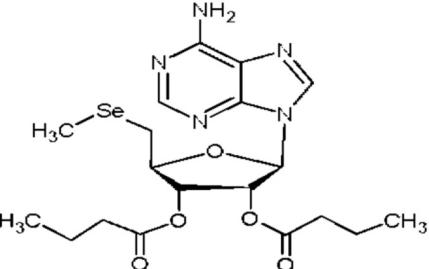
[00226] Синтетические соединения, перечисленные в таблице 1, были протестированы в культуре клеток (*in vitro*) на воздействие на выработку глюкозы и жизнеспособность клеток в описанных в данном документе примерах. В частности, протестированными клетками были клетки гепатомы человека HepG2 и Н4ПЕ печени крысы.

**Таблица 1.**

Сокращенное название соединения	Название соединения	Структура соединения	Мол. масса	Растворимость
Соединение-C	5'-метилселеноаденозин		(344,22)	ДМС О
Соединение-D	5'-сelenoadenozilгомоцистеин		(431,30)	ДМС О
Соединение-E-	γ-L-глутамил-Se-метил-L-сelenоцистеин		311,19	Вода
Соединение № 43 (Диацетиловый эфир метилселеноаденозина Соединения-C)	Диацетиловый эфир метилселеноаденозина		428,30	ДМС О

5	Соединение № 50	Циклический карбонат метилселеноаденозина		370,22	ДМС О
10	Соединение № 53	Карбаматный аналог метилселеноаденозина с морфолином		457,34	ДМС О
15	Соединение № 57	Аденозин		267,24	ДМС О
20	Соединение № 59 (проницаемый для клеток ингибитор аденилаткиназы)	2',5'-дидезоксиаденозин		235,24	ДМС О
25	Соединение № 60	5'-дезоксиаденозин		251,24	Вода
30	Соединение № 61 (ингибитор аденилаткиназы)	9-(тетрагидрофуран-2-ил)-9h-пурин-6-амин (SQ 22,536)		205,21	ДМС О
35					
40					
45					

5	Соединение № 62	Аденин		135,12	ДМС О
10	Соединение № 63	Никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD)		664,43	Вода
15	Соединение № 64	S-(5'-Аденозил)-L-метионин йодид (SAM)		526,35	Вода
20	Соединение № 68 (серный аналог соединения № 43)	Диацетиловый эфир метилтиоаденозина		381,40	ДМС О
25	Соединение № 69 (дипропаноиловый ловый сложный эфир метилселеноаденозина)	Дипропаноиловый сложный эфир метилселеноаденозина		456,35	ДМС О
30					
35					
40					
45					

5 5 10 15 20 25 30 35 40 45	<p>Соединение № 70 (дибутилово- ый эфир соединения- C)</p>	<p>Дибутилово- ый сложный эфир метилселеноаденозина</p> 	<p>484,40</p>	<p>ДМС О</p>
--	--	--	---------------	------------------

10 Материалы и способы

Клеточные линии и соединения

[00227] Клетки HepG2 гепатомы человека и Н4ПЕ гепатомы крысы были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Клетки HepG2 и клетки Н4ПЕ культивировали в минимальной основной среде Игла (EMEM), дополненной 10% FBS.

[00228] Соединение №43 и другие соединения, перечисленные в таблице 1, были либо синтезированы, либо получены из коммерческих источников (при наличии). Было установлено, что чистота всех тестируемых соединений составляет  $\geq 99\%$ , как определено с помощью ВЭЖХ. Все эти соединения либо растворяли в ДМСО, либо в воде, чтобы получить 126,7 или 12,67 мМ исходного раствора для экспериментов. Метформин и инсулин были приобретены у Sigma.

Анализ выработки глюкозы

[00229] Равные количества клеток человека HepG2 или крысы Н4ПЕ ( $1-1,5 \times 10^5$  клеток/лунку) высевали на 96-луночные планшеты в 10% FBS-содержащей среде в течение 24 ч. Затем клетки дважды промывали PBS и обрабатывали различными концентрациями соединений, метформина или инсулина в 100 мкл среды, для выработки глюкозы (без глюкозы, без фенолового красного DMEM, с добавлением 20 мМ лактата натрия, 2 мМ пирувата натрия и 5 мМ HEPES) при 37°C в течение 24 ч (только клетки Н4ПЕ) или 48 ч (только клетки HepG2). Клетки также инкубировали с 0,24% ДМСО (максимальный объем растворителя ДМСО, использованного в экспериментах).

[00230] После вышеупомянутых обработок 50 мкл культуральной среды собирали и анализировали уровень глюкозы с использованием набора для анализа глюкозы Molecular Probes Amplex Red (Cat # A22189) в соответствии с протоколом производителя. Количество клеток или жизнеспособность в чашке для культивирования после вышеупомянутых обработок соединениями определяли с использованием наборов для анализа пролиферации клеток Promega CellTiter96® AQueous One Solution в соответствии с протоколом и инструкциями производителя. Вкратце, после удаления 50 мкл культуральной среды для анализа глюкозы клетки инкубировали с раствором AQueous One (25 мкл исходного раствора и 50 мкл предварительно нагретого PBS/на лунку) при 37°C в течение 1 ч и поглощении OD490 нм в каждый образец определяли с помощью устройства для считывания микропланшетов Bio-Tek. Жизнеспособность клеток в культуральных лунках определяли вычитанием OD490 нм в культивируемых клетках с OD490 нм в простых культуральных средах (без высеива клеток). Уровень выработки глюкозы в культуральных клетках получали путем нормализации концентрации глюкозы в культуральной среде по жизнеспособности клеток в каждой лунке. По меньшей мере 3 образца на каждую обработку были исследованы для вышеуказанного анализа. Данные представлены как среднее  $\pm$  СОС этих образцов. Эксперименты повторяли как минимум дважды.

[00231] Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (значения IC50) Соединения №43 или метформина для ингибирования выработки глюкозы определяли с использованием онлайн-программного обеспечения ED50 Plus v1.0.

#### Результаты и обсуждение

- 5 1. Влияние инсулина и растворителя ДМСО на выработку глюкозы в клетках HepG2  
[00232] Как показано на левой панели Фиг. 1, обработка 10 нМ и 100 нМ инсулина, соответственно, приводила к снижению выработки глюкозы в клетках HepG2 на 20% и 30%, тогда как растворитель ДМСО в максимальном использованном объеме не влиял на уровни глюкозы в культивируемых клетках HepG2. Эти результаты позволяют
- 10 предположить, что клетки HepG2 реагируют на инсулин в ингибировании выработки глюкозы, и наблюдаемые эффекты тестируемых соединений на выработку глюкозы не связаны с потенциальными эффектами ДМСО. Эти результаты показывают, что клетки HepG2 являются подходящей клеточной системой для скрининга соединений, обладающих инсулиноподобной активностью и способных ингибировать выработку
- 15 глюкозы в клетках печени.

2. Соединение №43 может имитировать инсулин для ингибирования выработки глюкозы в клетках HepG2

- [00233] Как показано на Фиг. 1, инкубация клеток HepG2 с Соединением №43 в испытанных дозах в бессывороточных условиях приводила к снижению уровня глюкозы
- 20 в культуральной среде. Наблюданное снижение выработки глюкозы клетками HepG2 после обработки Соединением №43 (3,8 мкМ) было сопоставимо с тем, которое достигалось при использовании инсулина (100 нМ), тогда как более высокие дозы Соединения №43 (7,6, 15,2 и 30,4 мкМ) были гораздо более активны чем 100 нМ инсулина. Кроме того, не наблюдалось значительного снижения жизнеспособности
- 25 клеток в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 при всех испытанных дозах (данные не показаны). Эти результаты предполагают, что Соединение №43 является миметиком инсулина, который может ингибировать выработку глюкозы в клетках HepG2.

3. Соединение №43 само по себе показало более высокую конечную активность, чем комбинация трех соединений, CDE, в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2.

- [00234] Обработка клеток HepG2 Соединением CDE при всех испытанных дозах (соотношение C/D/E 1:1:1) также ингибировало выработку глюкозы с активностью, сравнимой с 100 нМ инсулина. Соединение №43 в дозе 3,8 мкМ было таким же сильным, как и комбинированный продукт CDE (который содержал 3,8 мкМ каждого отдельного соединения), в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2. Однако Соединение №43 в дозе 7,6 мкМ или выше было более активным, чем CDE, в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2. Эти результаты продемонстрировали, что Соединение №43 само по себе показало более высокую конечную активность, чем комбинация трех соединений, CDE, в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2. Отмечая, что концентрация селена в соединении CDE в три раза выше, чем в соединении №43 в каждой дозовой точке, эти результаты могут свидетельствовать о том, что одна или более структурных особенностей Соединения №43 в дополнение к его сelenосодержащей молекуле могут, по меньшей мере в некоторых случаях, способствовать его активности.

4. Ингибирование выработки глюкозы в HepG2 останавливается, когда атом серы заменен на атом селена в Соединении №43

[00235] Как показано на правой панели Фиг. 1, обработка клеток серосодержащими

соединениями, Соединением №68 (серосодержащий аналог Соединения №43) или Соединением №64 (SAM), а также другими перечисленными не содержащими селен соединениями оказывала минимальное влияние на снижение выработки глюкозы в клетках HepG2. Поразительное различие в ингибировании выработки глюкозы между Соединением №43 и №68 демонстрирует, что атом селена в Соединении №43 способствует функции этого соединения в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2.

5. Дифференциальное влияние селенсодержащих соединений на ингибирование выработки глюкозы в клетках HepG2

[00236] Как описано выше, эквимолярная смесь селенсодержащих соединений C, D и E (CDE) ингибировала выработку глюкозы в клетках HepG2 человека в указанных дозах. Отмечая, что концентрация соединения, указанная на оси X на Фиг. 1, относится к концентрации Se каждого Se-содержащего соединения в смеси, общая концентрация Se фактически в три раза выше, чем указано на оси X. Это было сделано для облегчения прямого сравнения компонентов смеси с каждым из отдельных кандидатов, протестированных в данных экспериментах.

[00237] Если бы ингибирование выработки глюкозы было вызвано исключительно селеном, то можно ожидать, что CDE, поскольку он содержит в три раза больше селена, чем Соединение №43, покажет более сильный ответ, чем последнее. Что явно не является

20 указанным случаем.

[00238] На Фиг. 1 (левая панель) показано, что каждое из соединений C, D, 43, 50, 53, 69 и 70 ингибировало выработку глюкозы, среди указанных соединений Соединение 43 было наиболее активным. Кроме того, было обнаружено, что соединение E стимулирует выработку глюкозы в клетках HepG2.

25 [00239] Взятые вместе, данные результаты говорят о том, что:

(i) Атом селена в соединении необходим для эффективного ингибирования выработки глюкозы (сравните Соединение №43 на левой панели на Фиг. 1 с его точным серосодержащим аналогом, Соединением №68 на правой панели).

30 (ii) Однако одного атома селена может быть недостаточно для ингибирования выработки глюкозы (в некоторых случаях селенсодержащие, структурно подобные, соединения проявляют более низкий или противоположный эффект);

(iii) Повышение концентрации лишь селена может не повышать активность (концентрация селена в CDE в три раза выше, чем в Соединении №43, но оно не является настолько эффективным);

35 (iv) Среди протестированных соединений Соединение №43 продемонстрировало наибольшую активность в ингибировании выработки глюкозы в клетках печени.

6. Анализ структурных особенностей перечисленных селенсодержащих соединений для определения химических групп, которые могут способствовать их активности

[00240] Сравнение Соединений C и D показывает, что 5'-метилселеновая группа и 40 5'-селеногомоцистеин могут обеспечивать аналогичное ингибирование выработки глюкозы. Сравнение Соединений 43, 50, 53, 69 и 70 показывает, что диацетиловый сложный эфир в положении 2' и 3' (№43) обеспечивает более сильное ингибирование выработки глюкозы, чем циклический карбонат (Соединение №50),

морфолинокарбоксилат (№53), дипропаноиловый сложный эфир (№69) и

45 дигуаноиловый сложный эфир (№70). Аденин, аденоzin и несколько химических вариантов аденоzина не ингибируют выработку глюкозы в клетках HepG2. Кроме того, два ингибитора аденилатцилазы (№59 и 61) также не ингибируют выработку глюкозы, что указывает на то, что маловероятно, чтобы ингибирование выработки глюкозы

Соединением №43 было вызвано снижением клеточных уровней АМФ (Hardie DG. Cell Metabolism 2013; 17(3): 313-314). Вместе результаты показывают, что один или более фрагментов, в дополнение к молекуле аденина и атому селена, могут, по крайней мере, при определенных обстоятельствах, вносить вклад в активность.

5 7. Сравнительные исследования Соединения №43 и метформина (хорошо известного противодиабетического лекарственного средства) в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2 и Н4ПЕ крысы

[00241] Как описано выше, устойчивое ингибирование выработки глюкозы в клетках HepG2 наблюдалось после обработки Соединением №43. Эффекты этого соединения 10 сравнивали с известным антидиабетическим лекарственным средством метформином. Как описано выше и показано на верхней панели Фиг. 2, наблюдалось дозозависимое снижение уровней глюкозы в клетках HepG2 после обработки Соединением №43, и значение IC 50 (половина максимальной ингибирующей концентрации) составляло 15,5 мкМ. Таким образом, видно, что метформин в дозе 500 мкМ не ингибировал выработку 15 глюкозы в клетках HepG2, но вместо этого показывал некоторые стимулирующие эффекты. Более высокие дозы метформина (0,5-4 мМ) показали клеточную токсичность для этих клеток (данные не представлены). Эти результаты показывают, что Соединение №43, подобно инсулину, может ингибировать выработку глюкозы в клетках HepG2.

[00242] Сообщалось, что клетки печени крысы Н4ПЕ могут реагировать на 20 метформин, что приводит к снижению выработки глюкозы. Таким образом, эту клеточную линию печени крысы использовали для дополнительного подтверждения ингибирующей активности Соединения №43 в отношении выработки глюкозы и для 25 сравнения эффективности Соединения №43 с метформином. Как представлено на Фиг. 2, обработка Соединением №43 и метформином, соответственно, приводила к дозозависимому снижению выработки глюкозы в клетках Н4ПЕ в бессывороточных условиях. Никакого токсического действия соединений при испытанных дозах на 30 жизнеспособность клеток не наблюдалось (данные не показаны). IC50 Соединения №43 составляла 17,8 мкМ, что почти идентично IC50 в клетках HepG2. В отличие от этого, метформин в дозе 36,25 мкМ проявлял незначительную или нулевую ингибирующую 35 активность, и IC50 метформина в этом эксперименте составляла 275 мкМ. Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №43 является более активным (по меньшей мере в 15 раз более активным), чем метформин в ингибировании выработки глюкозы в культивируемых клетках печени крысы.

[00243] Таким образом, Соединения №43, 50, 53, 69 и 70 все проявляют активность 35 в ингибировании выработки глюкозы в культивируемых клетках печени. Тем не менее, Соединение №43 было самым активным тестируемым соединением с ингибиторной активностью в отношении выработки глюкозы, которая превышала таковую при высокой дозе инсулина (100 нМ) в клетках HepG2.

[00244] Более того, было показано, что Соединение №43 является гораздо более 40 эффективным, чем бигуанидное лекарственное средство метформин, в обеих протестированных клеточных линиях печени. Метформин в настоящее время является лекарственным средством первой линии, применяемым для лечения диабета 2 типа.

Пример 3: Исследования с Соединением №43 и близкородственными 45 селенорганическими соединениями (№C, №50, №69 и №70) вместе с серосодержащим аналогом Соединения №43 (Соединение №68) в регулировании уровней глюкозы и/или HbA1c в кровотоке и в улучшении толерантности к глюкозе у спонтанных нуль-мутантных мышей с инсулинорезистентным и диабетическим рецептором лептина (Lepr)

Материалы и способы

## Соединения

[00245] Соединения №43, №C, №50, №68, №69 и №70 были синтезированы в Химической лаборатории Alltech, Inc. Было установлено, что чистота всех тестируемых соединений составляет ≥99%, как определено по ВЭЖХ.

### 5 Животные

[00246] Самцы мышей в возрасте 5-10 недель со спонтанной диабетической мутацией (мутация рецептора лептина)  $Lepr^{db/db}$  (штамм C57BL/6J) были приобретены в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн) и помещены в виварий без патогенов со свободным доступом к пище и воде.

### 10 Хроническое лечение Соединением №43 и другими соединениями

[00247] Самцам мышей  $Lepr^{db/db}$  в возрасте 38 дней внутрибрюшинно (в.б.) ежедневно инъецировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, Соединение №C, Соединение №50, Соединение №68 и/или Соединение №43 (25 мкг селенсодержащего или серосодержащего соединения на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение периодов от 43 до 90 дней. Массы тела вышеописанных мышей регистрировали ежедневно с использованием весов, и ежедневно наблюдали за любой видимой аномальной морфологией животного и поведением при ходьбе. После лечений животные голодали в течение ночи, и затем проводили анализы на содержания глюкозы или HbA1c в крови, тесты на толерантность к глюкозе или собирали ткани.

### 15 [00248] Для сравнительных исследований любых потенциальных

противодиабетических эффектов Соединений №43, №69 и №70, самцам мышей  $Lepr^{db/db}$  в возрасте 41 дня внутрибрюшинно (в.б.) ежедневно вводили физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, Соединение №43, Соединение №69 или Соединение №70 (25 мкг каждого селенсодержащего соединения на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе). После лечения в течение 43 дней животных не кормили в течение ночи, и затем проводили анализы на содержание глюкозы в крови и тесты на толерантность к глюкозе. После ежедневных введений данных соединений в течение 90 дней, от этих животных собирали сыроватки и анализировали их на содержание HbA1c в крови.

### 20 Острое лечение Соединением №43

[00249] После голодания в течение ночи 8-10-недельным мышам  $Lepr^{db/db}$  внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, или соединение №43 (0,0054, 0,054, 0,54 или 5,4 мг Соединения №43 (исходный раствор соединения разводили в стерильном физиологическом растворе) на килограмм массы тела). После инъекции физиологического раствора или соединения мышей возвращали в их клетки со свободным доступом к воде, но не к еде в течение 1, 2, 3, 5 и 8 ч. В каждый момент времени после инъекции отбирали небольшую каплю крови из хвоста каждой мыши для анализа уровня глюкозы.

[00250] Дополнительным 6-недельным мышам  $Lepr^{db/db}$  в условиях без голодания внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, или однократную дозу Соединения №43 (5,4 мг соединения/кг массы тела).

45 После инъекции животных возвращали обратно в их клетки со свободным доступом к воде и пище. Через 24 ч отбирали небольшую каплю крови из хвоста мыши для анализа уровня глюкозы.

### Анализ уровня глюкозы в крови

[00251] После введения физиологического раствора или соединений, или после введения болюса глюкозы отбирали небольшую каплю крови у каждой мыши путем обрезания кончика хвоста мыши. Уровни глюкозы в крови определяли с использованием глюкометра с максимальной способностью к измерению глюкозы 600 мг/дл.

<sup>5</sup> Тест на толерантность к глюкозе

[00252] Тесты на толерантность к глюкозе проводили, как описано ранее (Li et al, Int J Biol Sci 2008; 4:29-36). Вкратце, мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , голодающим в течение ночи после обработки физиологическим раствором или соединением, внутрибрюшинно вводили 2 г/кг массы тела 20% D-глюкозы. Уровни глюкозы в крови в моменты времени 0 (непосредственно перед инъекцией глюкозы), через 0,25, 0,5, 1 и 2 ч после введения глюкозы определяли с использованием глюкометра с максимальной способностью измерения глюкозы 600 мг/дл. Из-за этого уровни глюкозы в крови выше 600 мг/дл были подсчитаны как 600 мг/дл в анализе данных.

<sup>15</sup> Анализы крови и сыворотки на HbA1c

[00253] После обработки физиологическим раствором или соединением небольшую каплю крови из хвоста мыши отбирали в пробирку Эппендорфа с ЭДТА покрытием (для предотвращения свертывания крови) (Fisher Scientific), а затем подвергали анализу на HbA1c с использованием набора с гликированным гемоглобином A1c мыши для ИФА Crystal Chem или Kamiya, в соответствии с протоколом производителя. Также <sup>20</sup> после заключительных введений сыворотку мыши собирали и подвергали анализу на HbA1c с использованием набора для анализа на HbA1c мыши компании Kamiya Biomedical Company в соответствии с протоколом производителя.

Статистический анализ

[00254] Там, где это применимо, t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости различий между группами, получавшими физиологический раствор и соединение, причем значение Р менее 0,05 считалось значимым. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  СОС указанного количества мышей на фигурах.

Результаты и обсуждение

[00255] У мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  отсутствуют все известные изоформы гена рецептора лептина (Lepr). Эта модель гомозиготных мышей представляет собой агрессивную мышью модель диабета типа II с нарушенной толерантностью к глюкозе, сниженной чувствительностью к инсулину, гипергликемией и гиперинсулинемией. У этих мышей наблюдается общее ожирение в возрасте примерно 3-4 недель, повышение уровня инсулина в плазме, начинающееся через 10-14 дней, и гипергликемия (т.е. высокий уровень сахара в крови), развивающаяся в возрасте примерно 4-8 недель (Coleman DL. 1978 Diabetologia 14:141-8).

[00256] Исследования *in vitro* показали, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, в ингибировании выработки глюкозы с гораздо большей эффективностью, чем близкородственные соединения, такие как Соединение №C или №50. Кроме того, серосодержащий аналог Соединения №43 (Соединение №68) оказывал слабое или отсутствующее ингибирующее действие на выработку глюкозы в клетках HepG2 (Фиг. 1-2). Следовательно, инсулинерезистентная мышь  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  является идеальной модельной системой *in vivo* для исследования использования экспериментальных соединений для потенциального снижения уровня глюкозы в крови и улучшения чувствительности к инсулину и толерантности к глюкозе на фоне тяжелого диабетического фона.

1. Соединение №43, наиболее активное соединение среди трех протестированных

селенорганических соединений (№C, №50, №43) против гипергликемии у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  после хронического лечения

[00257] Режимы введения соединений были приняты для исследования потенциальной роли тестируемых соединений в лечении гипергликемии, как показано на мышах  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ . Мышам вводили лечение ежедневно путем внутрибрюшинной инъекции соединений в начале гипергликемии (развивавшейся примерно через 4-8 недель после рождения). Три соединения (т.е., Соединение №43, соединение №C и соединение №50, доставляющие идентичные концентрации селена) вводили ежедневно в течение 43-52 дней, чтобы выяснить, обладают ли эти селенорганические соединения измеримыми эффектами в отношении гипергликемии в инсулинрезистентных мышах.

[00258] Было обнаружено, что лечение всеми тестируемыми соединениями не влияло на увеличение массы тела у этих мутантных мышей (данные не представлены), что указывает на то, что тестируемые соединения, вероятно, оказывают незначительное или вообще не оказывает ингибирующего воздействия на аномально повышенный аппетит к потреблению пищи, представленный у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ . Кроме того, не было видимых различий в морфологии животных и поведении при ходьбе между мышами, получавшими физиологический раствор (контроль), и мышами  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ , получавшими соединение, в течение периода лечения (данные не показаны). Эти результаты показывают, что указанные соединения в испытанных дозах не оказывали токсического воздействия на поведение или активность животных.

[00259] Среди соединений №C, №50 и №43 обработка Соединением №43 привела к наиболее значительному снижению уровня глюкозы в крови мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ , на примерно 45% по сравнению с контролем (см. Фиг. 3 (левая панель), даже несмотря на то, что уровни глюкозы в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ , получавших Соединение №43, все еще были выше, чем у нормальных мышей дикого типа того же возраста (примерно 100 мг/дл, данные не показаны). Кроме того, эти результаты ясно демонстрируют, что Соединение №43 может значительно снижать уровни глюкозы в кровотоке в этой мышиной модели тяжелого диабета типа II, указывая на потенциал данного соединения в предотвращении гипергликемии. Кроме того, эти результаты являются хорошим доказательством дифференциальных эффектов селенорганических соединений на гипергликемию и показывают, что Соединение №43 является наиболее активным соединением (среди трех протестированных соединений) для лечения гипергликемии.

[00260] Кроме того, у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ , получавших Соединения №C-, №50 и №43, собирали сыворотки и тестировали их для определения уровня HbA1c. Уровни HbA1c представляют собой долгосрочный индекс концентрации глюкозы в крови за последние 2-3 месяца, и этот тест широко используется в клинической медицине для мониторинга истории уровня глюкозы в крови у пациентов с диабетом. Как представлено на Фиг. 3, среди соединений №C, №50 и №43 обработка Соединением №43 приводила к единственному значительному снижению (примерно на 20%) уровней сывороточного HbA1c по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор. Эти результаты согласуются с наблюдаемыми выше различающимися эффектами указанных трех соединений на уровни глюкозы натощак у мышей (левая панель на Фиг. 3) и на выработку глюкозы *in vitro* (клетки HepG2, Фиг. 1).

[00261] Таким образом, результаты дают *in vivo* доказательства того, что существует различное действие селенорганических соединений на гипергликемию и что Соединение

№43 является наиболее активным соединением среди указанных трех селеносодержащих соединений (№C, №50 и №43) с явным потенциалом для лечения гипергликемии у инсулинерезистентных субъектов.

2. Замена атомы селена в Соединении №43 на атом серы в тестируемой дозе не

<sup>5</sup> оказывает существенного влияния на гипергликемию у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения.

[00262] Исследования *in vitro* показали, что Соединение №43, но не Соединение №68, эффективно ингибирует выработку глюкозы в клетках HepG2 (Фиг. 1). Приведенные выше исследования показывают, что Соединение №43 может снижать выработку глюкозы и уровни HbA1c у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (Фиг. 3). Чтобы дополнительно подтвердить антидиабетические эффекты Соединения №43 у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  и исследовать, необходим ли атом селена в Соединении №43 для указанного антигипергликемического эффекта, 38-дневным самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  вводили лечение ежедневно путем <sup>10</sup> внутрибрюшинной инъекции равного количества селена или серы в Соединении №43 и его прямой серосодержащий аналог, Соединение №68, в течение 3 месяцев. <sup>15</sup>

[00263] Еще раз, не было никаких видимых морфологических отклонений, нарушений поведения при ходьбе или изменений массы тела у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после лечения соединениями в течение 3-месячного периода, что указывает на то, что Соединение №43 или №68 в испытанной дозе не оказывало явных токсических эффектов на этих мышах. Однако инъекция Соединения №43 в течение 3 месяцев приводила к статистически значимому снижению уровней глюкозы в крови натощак, тогда как Соединение №68 не приводило к значительному снижению уровней глюкозы в крови (Фиг. 4, левая панель). Более значительно то, что уровни глюкозы натощак после <sup>20</sup> лечения Соединением №43 в течение 3 месяцев были снижены примерно до 135 мг/дл, что приближается к уровням глюкозы в крови, о которых сообщалось для нормальных мышей, не страдающих диабетом/ожирением (примерно 100 мг/дл). В соответствии с этими сниженными уровнями глюкозы в крови, уровни HbA1c в образцах крови мышей <sup>25</sup>  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после обработки Соединением №43 в течение 3 месяцев также были значительно снижены (примерно на 30%) по сравнению с контрольной (обработанной физиологическим раствором) группой. Однако лечение Соединением №68 не влияло на уровни HbA1c в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ . Степень снижения уровней HbA1c у мышей <sup>30</sup>  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после 90-дневной обработки Соединением №43 (Фиг. 4), по-видимому, более выражена, чем у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после 42 дней обработки соединением №43 (Фиг. 3).

[00264] Вместе, эти результаты *in vivo* дополнительно подтверждают обнаружение того, что Соединение №43 может значительно снизить уровни глюкозы в крови и уровни HbA1c в мышиной модели агрессивного диабета типа II, что указывает на потенциал Соединения №43 в лечении гипергликемии у пациентов с диабетом. Кроме того, <sup>40</sup> результаты также подтвердили, что антидиабетический потенциал Соединения №43 теряется после замены атома селена в Соединении №43 на атом серы.

3. Соединение №43 показало более высокий антигипергликемический потенциал у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения, чем соединения №69 и №70.

<sup>45</sup> [00265] Исследования *in vitro* показали, что замена диацетильных групп в 2',3'-положениях Соединения №43 дипропаноильными группами (Соединение №69) или бутаноильными группами (Соединение №70) ослабляет активность Соединения №43 в ингибировании выработки глюкозы в клетках HepG2 (Фиг. 2). Вышеприведенные

исследования показывают, что Соединение №43 может значительно снижать выработку глюкозы и уровни HbA1c у мышей  $Lepr^{db/db}$  (Фиг. 3-4). Для дальнейшего подтверждения антидиабетического действия Соединения №43 у мышей  $Lepr^{db/db}$  и для исследования вклада диацетильных групп в Соединении №43 в этот антигипергликемический эффект самцам мышей  $Lepr^{db/db}$  в 41-дневном возрасте вводили ежедневно лечение, посредством внутрибрюшинной инъекции равного количества селена в Соединениях №43, №69 и №70 в течение 43 и 90 дней.

[00266] Еще раз, не было никаких видимых морфологических отклонений, нарушений

поведения при ходьбе или изменений массы тела у мышей  $Lepr^{db/db}$  после лечения тремя соединениями в течение 90 дней, что указывает на то, что Соединение №43, №69 или №70 в испытанной дозе не оказывали явных токсических эффектов на этих мышей.

Было обнаружено, что инъекция Соединения №43 в течение 43 дней приводила к статистически значимому снижению уровней глюкозы в крови натощак (снижение на

примерно 35% с примерно 290 мг/дл в группе, получавшей физиологический раствор до 188 мг/дл) (Фиг. 5, левая панель). Замена диацетильных групп в Соединении №43 дигубаноильными группами (Соединение №70) также приводила к снижению уровней глюкозы в крови натощак у мышей  $Lepr^{db/db}$ , но менее значимому, чем в случае

Соединения №43 (Фиг. 5, левая панель). Замена диацетильных групп в Соединении №43 дипропаноильными группами (Соединение №69) приводила к незначительному повышению уровней глюкозы в крови натощак у мышей  $Lepr^{db/db}$  (Фиг. 5, левая панель).

Для дальнейшей проверки приведенных выше наблюдений, мышам  $Lepr^{db/db}$  продолжали ежедневно вводить внутрибрюшинную инъекцию равного количества селена в

Соединениях №43, №69 и №70 в течение еще 47 дней (всего 90 дней ежедневного введения соединений) и сыворотку собирали и подвергали анализу крови на HbA1c. Как представлено на правой панели Фиг. 5, обработка Соединением №43 привела к значительному снижению уровней HbA1c (Фиг. 5, правая панель). Первоначальные оценки показали, что лечение Соединением №70 также привело к снижению уровня

HbA1c на примерно 50% (Фиг. 5, правая панель), тогда как лечение Соединением №69 не привело к значительному снижению уровней HbA1c (Фиг. 5, правая панель);

Дальнейший анализ этих данных показал, что ни Соединение №69, ни Соединение №70 не оказали какого-либо значимого эффекта (Фиг. 5, правая панель). Вместе эти

результаты показывают, что Соединение №43 обладает огромным потенциалом для лечения гипергликемии у инсулинерезистентных субъектов. Кроме того, результаты демонстрируют, что диацетильные группы в положении 2', 3' в Соединении №43 вносят вклад в его антигипергликемическую активность *in vivo*, и что удлинение диацетильных групп одним или двумя атомами углерода может, в определенных обстоятельствах, отрицательно влиять на гомеостаз глюкозы.

4. Острое лечение Соединением №43 приводило к дозозависимому снижению уровней глюкозы в крови у мышей  $Lepr^{db/db}$ .

[00267] Вышеуказанные исследования показали, что хроническое лечение Соединением №43 может значительно снизить уровни глюкозы и HbA1c в крови. Чтобы определить эффективный диапазон доз и установить продолжительность реакции на

Соединение №43, самцов мышей  $Lepr^{db/db}$  в возрасте 8-10 недель не кормили в течение ночи, а затем внутрибрюшно инъецировали физиологический раствор (содержащий 0,2% ДМСО, максимальный вводимый объем исходного растворителя Соединения

№43), 0,0054, 0,054, 0,54 и 5,4 мг Соединения №43 (полученного путем разбавления исходного раствора соединения физиологическим раствором)/кг массы тела. Уровни глюкозы в крови у мышей  $Lepr^{db/db}$ , непосредственно перед и после инъекции через 1, 2, 3, 5 и 8 ч (в условиях голодания, но со свободным доступом к воде), исследовали, и полученные уровни глюкозы в крови наносили на график для каждого отдельного животного в каждый момент времени.

[00268] Острая однократная инъекция вышеуказанных доз Соединения №43 не вызывала каких-либо видимых токсических эффектов на общую морфологию и поведение при ходьбе. У мышей  $Lepr^{db/db}$ , получавших физиологический раствор, в течение 8 ч периода времени теста (Фиг. 6) наблюдалось лишь незначительное снижение (примерно 50-70 мг/дл) уровней глюкозы в крови, что согласуется с тем фактом, что эти  $Lepr^{db/db}$  мыши демонстрируют дефектную способность к клиренсу глюкозы. Однако лечение Соединением №43 при всех испытанных дозах приводило к значительному снижению уровней глюкозы в крови (по сравнению с физиологическим раствором в каждый период времени), за исключением самой низкой дозы лечения Соединением №43 через 2 или 3 ч после введения (в котором сниженные уровни глюкозы были близки к статистически значимым) (Фиг. 6). Результаты показали, что Соединение №43 при всех испытанных дозах эффективно снижало уровень глюкозы в крови через 1 ч после однократного введения. Это указывает на то, что Соединение №43 может достигать соответствующих тканей-мишеней *in vivo* в течение короткого периода времени (то есть 1 ч), чтобы вызвать эффект снижения уровня глюкозы. Активность Соединения №43 в снижении уровней глюкозы в крови в условиях голодания достигала пика через 2-5 ч после введения, и этот эффект сохранялся, по меньшей мере, еще в течение 3 ч. Поскольку испытуемые животные (которые голодали в течение ночи и продолжали голодать в течение периода времени испытания, 8 ч) не могли быть подвергнуты дальнейшему голоданию, максимальная эффективная продолжительность действия Соединения №43 не была определена из этих экспериментов.

[00269] Результаты демонстрируют, что острое лечение Соединением №43 в 1000-кратном диапазоне концентраций значительно снижает уровни глюкозы в крови на широко используемой животной модели инсулинорезистентности и диабета 2 типа. Соединение №43 является быстродействующим ( $\leq 1$  ч после обработки) и остается активным в течение не менее 8 ч.

5. Острое лечение Соединением №43 замедляет прогрессировать гипергликемии у молодых мышей  $Lepr^{db/db}$ .

[00270] Как обсуждалось выше, у мышей  $Lepr^{db/db}$  наблюдается повышенный уровень инсулина в плазме, начиная с 10-14 дней, и гипергликемия (то есть высокие уровни сахара в крови) в период примерно 4-8 недель (Coleman DL. 1978 Diabetologia 14:141-8). Чтобы проверить, обладает ли Соединение №43 потенциалом ослабления развития гипергликемии, однократную дозу Соединения №43 вводили путем острой инъекции мышам младшего возраста. Вкратце, самцам мышей  $Lepr^{db/db}$  6-недельного возраста в нормальных условиях кормления внутрибрюшинно вводили единоразово физиологический раствор, содержащий 0,2% ДМСО или Соединение №43, в дозе 5,4 мг/кг массы тела. Через 24 ч после обработки у мышей определяли уровни глюкозы в крови, когда они имели свободный доступ к пище и воде.

[00271] Как представлено на Фиг. 7, уровни глюкозы в крови у молодых мышей  $Lepr^{db/db}$  через 24 ч после обработки физиологическим раствором были значительно

увеличены (увеличение примерно на 20%), что указывает на то, что у этих мышей все еще развивается гипергликемия. Напротив, лечение Соединением №43 приводило к значительному снижению (примерно на 20%) уровней глюкозы в крови у мышей  $Lepr^{db/db}$  (Фиг. 7).

[00272] Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №43 может ослабить развитие гипергликемии. Кроме того, эти исследования также показывают, что эффективность Соединения №43 в снижении выработки глюкозы, вероятно, будет длиться, по меньшей мере, 24 ч у мышей с диабетом в условиях кормления.

10 6. Повышенная толерантность к глюкозе у  $Lepr^{db/db}$  мышей с диабетом после введения Соединения №43

[00273] Тест на толерантность к глюкозе выявляет нарушения в том, как организм обрабатывает глюкозу после высокого и быстрого повышения уровня сахара в крови (например, обычно после еды). Инсулин играет критическую роль не только в подавлении выработки глюкозы в печени, но также в поглощении, хранении и метаболизме глюкозы в мышцах, печени и жировых клетках, вызывая снижение уровня глюкозы в крови.

[00274] Пациенты с диабетом имеют очень низкую толерантность к глюкозе либо из-за своей неспособности вырабатывать инсулин, либо эффективно реагировать на инсулин для поддержания гомеостаза глюкозы. Исследования *in vitro*, описанные в данном документе, показывают, что Соединение №43 не только может имитировать инсулин, но также может обходить инсулин для ингибирования выработки глюкозы (Фиг. 1-2). Мыши  $Lepr^{db/db}$  являются идеальной мышью моделью диабета типа II для исследования роли Соединения №43 в поддержании гомеостаза глюкозы, учитывая тот факт, что у этих мутантных мышей наблюдается нарушение толерантности к глюкозе и резистентность к инсулину. Следовательно, было исследовано влияние Соединения №43 и других сходных по структуре родственных соединений селена и серы на улучшенную толерантность к глюкозе у мышей  $Lepr^{db/db}$  после внутрибрюшинной инъекции соответствующих соединений мышам.

[00275] Самцам мышей в возрасте 38 дней внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% ДМСО), Соединение №C, №43 или №50 (25 мкг селена на каждое соединение на килограмм массы тела) в течение 43 дней. В конце лечения этих мышей не кормили в течение ночи, инъецировали глюкозу (2 г/кг массы тела) и измеряли уровни глюкозы в крови через 0,25 ч (15 мин), 0,5 ч (30 мин), 1 ч (60 мин) и 2 ч (120 мин) после введения глюкозы. Уровни глюкозы в крови непосредственно перед инъекцией глюкозы (называемые уровни глюкозы в нулевой момент времени) также регистрировали.

[00276] Как представлено на Фиг. 8А, значительное увеличение уровня глюкозы в крови, начинающееся через 0,25 ч и во все последующие испытанные моменты времени, наблюдалось у мышей  $Lepr^{db/db}$ , получавших физиологический раствор, после введения глюкозы. Как описано в данном документе, предел измерения глюкозы глюкометра, используемого для этих анализов, составлял 600 мг/дл. Таким образом, уровни глюкозы, превышающие этот предел, были зарегистрированы как 600 мг/дл. Соответственно, определенные измерения в определенный момент времени после введения глюкозы, особенно для животных, получавших физиологический раствор, могут хорошо представлять недооценку истинных концентраций глюкозы в крови.

[00277] У мышей, которым вводили Соединение №C, уровни глюкозы в крови во все

испытанные моменты времени после введения глюкозы оставались очень высокими, аналогично группе, получавшей физиологический раствор (Фиг. 8А). Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №С в тестируемой дозе не улучшало толерантность к глюкозе у этих инсулинерезистентных мышей с диабетом.

5 [00278] Обработка Соединением №50 приводила к значительному снижению уровня глюкозы через 2 ч после инъекции глюкозы по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор, даже при том, что очевидное снижение не наблюдалось через 0,25, 0,5 или 1 ч после введения глюкозы, см. Фиг. 8А. Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №50, вероятно, оказывает некоторое влияние на улучшение  
10 толерантности к глюкозе у данных мышей с диабетом.

[00279] Напротив, у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43, уровни глюкозы в крови через 0,25, 0,5 и 1 ч после введения глюкозы были заметно ниже, чем у мышей, которым вводили физиологический раствор, Соединение №С или №50 (Фиг. 8А). Из-за предела измерения глюкометра степень снижения уровней глюкозы у мышей, 15 которым вводили Соединение №43, по сравнению с другими введениями в указанные моменты времени после инъекции глюкозы, вероятно, была гораздо более значительной, чем представлено на Фиг. 8А. Через 2 ч после введения глюкозы уровни глюкозы в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43, были значительно ниже, 20 чем у однопометных животных, которым вводили физиологический раствор, Соединение №С или Соединение №50 (см. Фиг. 8А), и почти полностью возвращались к уровням глюкозы перед инъекцией. Снижение уровня глюкозы у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43, через 2 ч после введения глюкозы значительно отличалось 25 по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор или Соединение №С ( $P<0,001$ ). Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №43, но не Соединение №С, в тестируемой дозе может почти полностью восстановить действие инсулина у указанных инсулинерезистентных мышей с диабетом, что оценивается по улучшенной толерантности к глюкозе, тогда как Соединение №50 также может оказывать некоторые полезные эффекты на улучшение клиренса глюкозы.

30 [00280] Чтобы дополнительно подтвердить большой потенциал Соединения №43 в улучшении клиренса глюкозы у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  и исследовать, необходим ли атом селена в Соединении №43 для этого эффекта, 38-дневным самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  вводили лечение ежедневно, путем внутри брюшинной инъекции равного количества 35 селена или серы в Соединении №43 или №68 соответственно в течение 2 месяцев. В конце лечения этих мышей не кормили в течение ночи и тестировали на толерантность к глюкозе, как описано выше.

[00281] Как представлено на Фиг. 8В, значительное увеличение уровней глюкозы в крови наблюдалось у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших Соединение №68, после введения 40 глюкозы, начиная с 0,25 ч и во все последующие испытанные моменты времени. Не было очевидного снижения уровней глюкозы в крови в момент времени 2 ч после введения глюкозы (по сравнению с уровнями в периоды времени 0,25, 0,5 и 1 ч), что указывает на то, что Соединение №68 в тестируемой дозе не имеет или почти не имеет 45 эффектов на улучшение толерантности к глюкозе у указанных инсулинерезистентных мышей с диабетом.

[00282] У мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43, уровни глюкозы в крови перед инъекцией глюкозы, были значительно ниже, чем у мышей, которым вводили Соединение №68 ( $P<0,05$ ). Эти результаты согласуются с приведенным выше

наблюдением, что Соединение №43 является более эффективным, чем Соединение №68, в снижении уровня глюкозы в крови натощак в данной модели диабетических мышей (Фиг. 4). Уровни глюкозы в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших Соединение №43, через 0,25, 0,5 и 1 ч после введения глюкозы были ниже, чем у мышей, получавших Соединение №68.

Через 2 ч после введения глюкозы уровни глюкозы в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших Соединение №43, были значительно ниже, чем у однопометных животных, которым вводили Соединение №68 (см. Фиг. 8В,  $P<0,001$ ). Кривая клиренса глюкозы у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43, в данном эксперименте (Фиг. 8В) была почти идентична кривой, наблюдавшейся в первом тесте на толерантность к глюкозе, описанном выше (Фиг. 8А). Еще раз, из-за предела измерения глюкометра, степень снижения уровней глюкозы у мышей, которым вводили Соединение №43, по сравнению с мышами, которым вводили Соединение №68 в указанные моменты времени после инъекции глюкозы, вероятно, была гораздо более значительной, чем представлено на Фиг. 8В. Несмотря на это, приведенные выше результаты дополнительно подтверждают, что Соединение №43 в испытанных дозах значительно улучшает толерантность к глюкозе, а замена атома селена в Соединении №43 на серу почти полностью разрушает его способность облегчать клиренс глюкозы у указанных инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  с диабетом.

[00283] Наконец, было исследовано, может ли замена ацетильных групп в положениях 2' и 3' рибозной группы Соединения №43 пропаноильной или бутаноильной группами улучшить клиренс глюкозы у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ . 41-дневным самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  вводили лечение ежедневно путем внутрибрюшинной инъекции равного количества селена в Соединении №43, №69 или №70, соответственно, в течение 43 дней. В конце лечения этих мышей не кормили в течение ночи и тестировали на толерантность к глюкозе, как описано выше.

[00284] Как представлено на Фиг. 8С, значительное увеличение уровня глюкозы в крови, начинаяющееся через 0,25 ч и во все последующие испытанные моменты времени, наблюдалось у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших физиологический раствор, после введения глюкозы. Не наблюдалось очевидного снижения уровня глюкозы в крови до момента времени 1 ч после инъекции глюкозы (по сравнению с уровнями глюкозы в периоды времени 0,25 и 0,5 ч), в то время как уровни глюкозы были слегка снижены через 2 ч после введения глюкозы в указанных инсулинерезистентных мышах с диабетом.

[00285] Введение Соединения №69 приводило к малому, но статистически незначительному снижению уровня глюкозы через 2 ч после инъекции глюкозы по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор, даже при том, что не наблюдалось очевидного снижения уровня глюкозы в крови через 0,25, 0,5 или 1 ч после введения глюкозы на Фиг. 8С. Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №69, может оказывать некоторое влияние на улучшение толерантности к глюкозе у данных мышей с диабетом.

[00286] У мышей, получавших Соединение №70, уровни глюкозы в крови натощак перед инъекцией глюкозы были ниже, чем в группе, получавшей физиологический раствор (Фиг. 8С). После инъекции глюкозы, особенно в момент времени 2 ч,

наблюдалось малое, но статистически незначительное снижение уровня глюкозы в крови у мышей, получавших Соединение №70, по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор. Эти результаты свидетельствуют о том, что Соединение №70 в испытанной дозе, как и Соединение №69, также, вероятно, оказывает некоторое

влияние на улучшение толерантности к глюкозе у указанных инсулинерезистентных мышей с диабетом.

[00287] Напротив, уровни глюкозы в крови через 0,25 и 0,5 ч после инъекции глюкозы у мышей  $Lepr^{db/db}$ , получавших Соединение №43, были заметно ниже, чем у мышей, получавших физиологический раствор, Соединение №69 или №70 (Фиг. 8С). Через 1 ч после введения глюкозы уровни глюкозы в крови у мышей  $Lepr^{db/db}$ , которым вводили Соединение №43, были значительно ниже, чем у однопометных животных, которым вводили физиологический раствор, Соединение №69 или Соединение №70 (Фиг. 8С).

Через 2 ч после введения глюкозы уровни глюкозы в крови у мышей  $Lepr^{db/db}$ , которым вводили Соединение №43, также были значительно ниже, чем у мышей, которым вводили физиологический раствор, Соединение №69 или Соединение №70. Снижение уровня глюкозы у мышей  $Lepr^{db/db}$ , которым вводили Соединение №43, через 2 ч после введения глюкозы статистически значительно отличалось по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор ( $P<0,05$ ). Еще раз, из-за предела измерения глюкометра степень снижения уровней глюкозы у мышей, которым вводили Соединение №43, по сравнению с другими введениями в каждый момент времени после инъекции глюкозы, вероятно, была гораздо более значительной, чем представлено на Фиг. 8С. Несмотря на это, результаты дополнительно демонстрируют, что Соединение №43 в тестируемой дозе может значительно улучшить толерантность к глюкозе у указанных инсулинерезистентных мышей с диабетом. Также эти результаты предполагают, что Соединение №69 и №70 может оказывать некоторые положительные эффекты на улучшение клиренса глюкозы. При сравнении химической структуры Соединения №43 с Соединением №69 и №70 очевидно, что ацетильные группы в положениях 2' и 3' рибозной группы Соединения №43 необходимы для оптимального клиренса глюкозы, и что замена этих диацетильных групп в Соединении №43 дипропаноильными или диглутаноильными группами значительно ослабляет их способность облегчать клиренс глюкозы у указанных инсулинерезистентных диабетических мышей  $Lepr^{db/db}$ .

[00288] Таким образом, приведенные выше исследования показывают, что Соединение №43 в тестируемой дозе может значительно улучшить толерантность к глюкозе у мышей  $Lepr^{db/db}$ . Действие Соединения №43 в этом процессе, вероятно, опосредовано улучшением чувствительности к инсулину при клиренсе глюкозы в скелетных мышцах, печени и жировых тканях. Кроме того, хотя селен необходим для действия Соединения №43, его присутствие само по себе недостаточно для придания способности к клиренсу глюкозы у субъекта с диабетом. Атом селена должен быть представлен в очень специфической химической форме. Об этом свидетельствуют более низкая активность Соединения №50 и отсутствие активности Соединения С; оба из которых структурно очень близки к Соединению №43. Кроме того, ацетильные группы в положениях 2' и 3' рибозной группы Соединения №43 также необходимы для поддержания его активности в клиренсе глюкозы.

Пример 4: Ингибирование экспрессии гена глюконеогенного фермента G6pc в печени мышей со спонтанным нуль-мутантным диабетическим рецептором лептина ( $Lepr$ ) и в культивируемых клетках печени после обработки Соединением №43, вместе с потенцированием действия инсулина при ингибировании экспрессии G6pc в культивируемых клетках печени

[00289] Печень является основным органом для производства глюкозы для поддержания нормального уровня глюкозы в крови. Глюкозо-6-фосфатазная

катализическая субъединица (Gбrc) является важным ферментом для глюконеогенеза в печени. Влияние Соединения №43 на регуляцию экспрессии Gбrc изучали как *in vivo*, так и *in vitro*.

#### Материалы и способы

##### Соединения

[00290] Соединения №43, №C, №D и №50 были синтезированы в Химической лаборатории Alltech, Inc. Было установлено, что чистота всех тестируемых соединений составляет ≥ 99%, как определено по ВЭЖХ.

#### Введение Соединения №43 и №50 мышам Lepr<sup>db/db</sup> *in vivo*

[00291] Самцам мышей Lepr<sup>db/db</sup> (гибрид C57BL/6J, приобретенный в The Jackson Laboratory) в возрасте 38 дней внутрибрюшинно ежедневно инъецировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, Соединение №50, и/или Соединение №43 (25 мкг каждого селенсодержащего соединения на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. После обработки печень собирали и подвергали РНК анализу.

#### Клеточные линии и клеточная амплификация

[00292] Клетки гепатомы человека HepG2 и печени мыши AML-12 были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Клетки HepG2 амплифицировали в минимальной основной среде Игла (EMEM) с добавлением 10% FBS. Клетки AML-12 амплифицировали в модифицированной Дульбекко среде Игла и среде Хэма F12 (DMEM/F12), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 40 нг/мл дексаметазона (Dex, Sigma) и IX ITS (содержащей 0,01 мг/мл бычьего инсулина, 0,0055 мг/мл человеческого трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия) раствором (Sigma).

#### Обработка клеток для РНК анализа

[00293] Для РНК анализа базальной экспрессии Gбrc (без присутствия диабетических стимулов: 8-CPT/Dex) амплифицированные клетки AML-12 и HepG2 культивировали на 24-луночных планшетах ( $0,5-2 \times 10^5$  клеток/лунку) в течение ночи в 10% FBS свободной от ITS-и Dex- DMEM/F12 среде и 10% FBS EMEM среде, соответственно. Клетки дважды промывали PBS для удаления остаточных сывороток. Затем промытые PBS клетки HepG2 обрабатывали без инсулина или инсулином, или Соединением №43 в бессывороточной среде EMEM в течение 40 ч. В некоторых экспериментах промытые PBS клетки AML-12 инкубировали без Соединения №43 или с Соединением №43, или другими селенсодержащими соединениями в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение 24 ч. В других экспериментах амплифицированные клетки AML-12 предварительно обрабатывали без Соединения №43 или Соединением №43 (150 или 300 ч/млрд) в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч. После 24-чной обработки клетки AML-12 дважды промывали PBS (для удаления любой остаточной сыворотки в культуре) и затем обрабатывали инсулином, Соединением №43 или обоими, в бессывороточной среде DMEM/Dex в течение 6 ч.

[00294] Для РНК анализа экспрессии Gбrc, индуцированной диабетическими стимулами, клетки AML-12 предварительно обрабатывали без Соединения №43 или Соединением №43 (150 или 300 ч/млрд) в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч. Затем клетки дважды промывали PBS, удаляли любые остаточные сыворотки и инкубировали с Соединением №43 (150 или 300 ч/млрд) в присутствии или в отсутствие инсулина (10 или 100 нМ) или 0,1 мМ 8-CPT (Sigma) и 0,5 М Dex в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение еще 6 ч.

## Выделение РНК и анализ ПЦР в реальном времени

[00295] Общую РНК от мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили физиологический раствор или селенсодержащее соединение, выделяли с использованием набора для выделения РНК Qiagen RNAeasy в соответствии с протоколом производителя. Общую РНК из 5 культивируемых клеток выделяли с использованием Trizol (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя, а затем инкубировали с ДНКазой I для удаления любых потенциально загрязняющих геномных ДНК. Образцы РНК были подвергнуты анализу ПЦР в реальном времени (QRT-PCR) с использованием RT-набора Applied-Bioscience 10 и предварительно разработанных зондов Taqman (Invitrogen), как описано ранее (Lan et al EMBO J 2003). Данные были нормализованы по уровням мРНК актина В (Actb) в каждом образце и представлены как среднее ± СОС для 3-5 образцов.

## Статистический анализ

[00296] Там, где это применимо, использовали t-критерий Стьюдента для определения статистической значимости различий между группами лечения со значением Р менее 15 0,05, которое считается статистически значимым.

## Результаты:

### 1. Анализ экспрессии мРНК G6rc в печени мышей $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$

[00297] Предыдущие эксперименты показали разные эффекты Соединения №43 и

20 №50 на ингибирование уровней глюкозы и HbA1c в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (Фиг. 3). Не желая быть связанными какой-либо конкретной гипотезой, такие различные эффекты могут быть вызваны, по меньшей мере частично, потенциальным дифференциальным действием этих соединений на экспрессию глюконеогенного гена G6rc *in vivo*.

25 Следовательно, экспрессию мРНК G6rc у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  измеряли после хронического введения этих двух соединений.

[00298] Как представлено на Фиг. 9, уровни мРНК G6rc в печени несколько, но незначительно, снижались у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после обработки Соединением №50. Однако введение Соединения №43 привело к резкому снижению (примерно на 56%) уровней 30 мРНК G6rc в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  по сравнению с контрольными группами, получавшими физиологический раствор (Фиг. 9).

[00299] В совокупности результаты предоставляют *in vivo* доказательства того, что эти селенсодержащие соединения могут оказывать различное влияние на ингибирование экспрессии G6rc, и что Соединение №43 является сильным ингибитором экспрессии 35 G6rc в печени указанных мышей с тяжелым диабетом II типа. Эти результаты позволяют предположить, что пониженные уровни глюкозы и HbA1c в крови у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после обработки Соединением №43 (Фиг. 3), по меньшей мере частично, обусловлены ослабленной экспрессией мРНК G6rc. Кроме того, поскольку экспрессия G6rc

40 модулируется в ответ на передачу сигналов инсулина и учитывая, что мыши  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  являются инсулинорезистентными, результаты показывают, что Соединение №43 может обходить инсулин или восстанавливать действие инсулина для регуляции экспрессии G6rc у указанных мышей с диабетом.

45 2. Ингибирование экспрессии мРНК G6rc и усиление действия инсулина при ингибировании экспрессии G6rc в клетках печени мыши и человека после обработки Соединением №43

[00300] Вышеуказанные исследования показали, что Соединение №43 может значительно ингибировать экспрессию G6rc у мышей с диабетом в условиях резистентности к инсулину. Культивируемые клетки печени использовали для изучения

(а) того, существует ли дифференциальное влияние селеносодержащих соединений на экспрессию G6pc, (б) оказывает ли Соединение №43 прямое влияние на экспрессию G6pc в печени и (с) может ли Соединение №43 улучшать действие инсулина в регуляции экспрессии G6pc. Два режима обработки (прямая обработка клеток печени в

5 бессывороточных условиях и предварительная обработка клеток печени соединениями в содержащих сыворотку средах с последующей повторной обработкой соединением в бессывороточных условиях) были использованы для изучения влияния Соединения №43 на экспрессию G6pc в данных клетках печени.

[00301] Сначала клетки AML-12 печени мыши обрабатывали без (контроля)

10 комбинацией соединения CDE, Соединением №C, Соединением №D, Соединением №50 и Соединением №43 в дозе 300 ч/млрд (ppb) селена (эквивалент 3,8 мкМ каждого соединения) в бессывороточной среде, содержащей инсулин-трансферрин- селенит натрия (ITS) и дексаметазон (Dex), в течение 24 ч, чтобы исследовать, существует ли дифференциальное влияние этих селеносодержащих соединений на экспрессию G6pc.

15 Как представлено на Фиг. 10А, соединение CDE (300 ч/млрд каждого соединения) приводило к значительному снижению экспрессии мРНК G6pc. Однако, Соединение №C, №D или №50 в тестируемой дозе существенно не ингибировало экспрессию G6pc в клетках AML-12. Напротив, обработка Соединением №43 в той же дозе селена приводила к значительному снижению (примерно на 60%, по сравнению с контрольной

20 группой) экспрессии G6pc в клетках AML-12 (Фиг. 10А). Степень снижения экспрессии G6pc (60%) после обработки Соединением №43 была более выраженной, чем при комбинированной обработке Соединением CDE (снижение примерно на 40%). Эти результаты предполагают, что может существовать различное влияние этих

25 селенорганических соединений на ингибирование экспрессии G6pc *in vitro*, и Соединение №43 является наиболее активным соединением среди всех испытанных соединений. Это согласуется с вышеуказанными исследованиями на мышах *in vivo* (Фиг. 9). Поскольку этот эксперимент был выполнен на клетках AML-12 в условиях, не содержащих сыворотки (то есть при отсутствии инсулина или любых других факторов роста), результаты показывают, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин,

30 напрямую ингибируя экспрессию G6pc в AML- 12 клетках с активностью выше, чем у Соединения CDE.

[00302] Затем другую клеточную линию печени, клетки HepG2 человека, инкубировали с 100 нМ инсулина или 600 ч/млрд Соединения №43 в бессывороточной среде в течение 40 ч для дальнейшей проверки прямого ингибирующего действия Соединения №43 на экспрессию G6PC. Как представлено на Фиг. 10 В обработка инсулином приводила к значительному снижению экспрессии G6PC, что указывает на то, что передача сигналов инсулина функционирует в клетках HepG2. Кроме того, уровни мРНК G6PC в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 в условиях, не содержащих сыворотки, были значительно снижены по сравнению с контрольной группой (Фиг. 10В). Снижение 35 экспрессии G6PC в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 согласуется со сниженной выработкой глюкозы, наблюдаемой на Фиг. 1. Таким образом, результаты дополнительно подтверждают, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, для прямого подавления экспрессии G6PC и тем самым ингибировать 40 выработку глюкозы в клетках HepG2.

45 [00303] Наконец, клетки AML-12 предварительно обрабатывали Соединением №43 в содержащей сыворотку, но не содержащей ITS/Dex среде, в течение 24 ч с последующей повторной обработкой этим соединением в среде, не содержащей FBS/ITS /Dex, в присутствии или в отсутствие инсулина в течение 6 ч для дальнейшего изучения, может

ли Соединение №43 ингибировать экспрессию G<sub>brc</sub> и существует ли аддитивный или синергетический эффект между инсулином и Соединением №43 в подавлении экспрессии G<sub>brc</sub>. Как представлено на Фиг. 10С, обработка 10 нМ инсулина привела к значительному снижению (примерно 65%) уровней мРНК G<sub>brc</sub> по сравнению с 5 контрольной группой (1-й столбец на Фиг. 10С). Как и инсулин, обработка Соединением №43 (как при 150, так и при 300 ч/млрд) также приводила к значительному снижению экспрессии G<sub>brc</sub> при уровнях снижения, сравнимых с обработкой 10 нМ инсулина. Кроме того, снижение уровней мРНК G<sub>brc</sub> было более выраженным в AML-12 после предварительной обработки Соединением №43 с последующей совместной обработкой 10 как Соединением №43, так и инсулином, чем при обработке с использованием лишь Соединения №43 или лишь инсулина. Эти результаты также подтверждают 15 вышеупомянутые наблюдения о том, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, ингибировать экспрессию G<sub>brc</sub> в клетках AML-12. Результаты также свидетельствуют о том, что Соединение №43 может усиливать действие инсулина при подавлении экспрессии G<sub>brc</sub> в клетках AML-12.

3. Ингибирование экспрессии G<sub>brc</sub> и улучшение действия инсулина в регуляции экспрессии G<sub>brc</sub> после обработки Соединением №43 в клетках AML-12, культивируемых в условиях имитации диабета (стимулированных как 8-CPT, так и Dex)

[00304] Циклический АМФ (8-CPT) и Dex являются хорошо известными стимулами

20 экспрессии G<sub>brc</sub> и выработка глюкозы в печени, что имитирует диабетические состояния *in vivo*. Для дальнейшего изучения влияния Соединения №43 на экспрессию G<sub>brc</sub>, была исследована экспрессия мРНК G<sub>brc</sub> в клетках AML-12, обработанных проницаемым для клеток 8-(4-хлорфенилтио)цАМФ (8-CPT) и дексаметазоном (Dex). Вкратце, клетки печени AML-12 предварительно обрабатывали без или с 150 ч/млрд или 300 ч/млрд 25 Соединения №43 в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч. После двухкратного промывания PBS, клетки повторно обрабатывали этими селенсодержащими соединениями в присутствии или в отсутствие 10 нМ или 100 нМ инсулина, 0,1 мМ 8-CPT и 0,5 М Dex в бессывороточной среде в течение 6 ч. После этих обработок клетки собирали и подвергали анализу QRT-PCR.

30 [00305] Как представлено на Фиг. 11, клетки печени AML-12, обработанные 8-CPT/Dex, приводили к 41,5-кратному увеличению экспрессии мРНК G<sub>brc</sub> (колонка №1 по сравнению с колонкой №2). Обработка обеими дозами инсулина значительно снижала 8-CPT/Dex-индуцированную экспрессию G<sub>brc</sub> в клетках AML-12 по сравнению с группой 35 8-CPT/Dex (колонка №3-4 по сравнению с колонкой №2 на Фиг. 11). Кроме того, Соединение №43 в дозах 150 и 300 ч/млрд также значительно ослабило 8-CPT/Dex-индуцированную экспрессию G<sub>brc</sub> (уменьшилась с 41,5 в колонке №2 до 13 в колонке №5 и 13,5 в колонке №8, Фиг. 11) с активностью, сравнимой с 10 нМ инсулина (колонка №3, Фиг. 11). Эти исследования показали, что, подобно инсулину, одно Соединение 43 в испытанных дозах может ингибировать 8-CPT/Dex-индуцированную экспрессию G<sub>brc</sub> 40 (снижение на примерно 68% по сравнению с группой 8-CPT/Dex, колонки №5 и №8 против колонки №2 на Фиг. 11).

[00306] Кроме того, обработка Соединением №43 в сочетании с инсулином (колонка №6-7 и колонка №9-10 на Фиг. 11) дополнительно ингибировала индуцированную 8-CPT/Dex экспрессию G<sub>brc</sub> в клетках AML-12 по сравнению с обработкой без инсулина/ 45 Соединением №43 (колонка №2), только инсулином (колонка №3-4) или только Соединением №43 (колонки №5 и №8 на Фиг. 11). Более того, уровни мРНК G<sub>brc</sub> при обработке Соединением №43 при 150 ч/млрд в сочетании с 100 нМ инсулина вместе с 8-CPT/Dex (колонка №7) и при обработке Соединением №43 при 300 ч/млрд в сочетании

с 100 нМ инсулина вместе с 8-CPT/Dex (колонка №10) были сильно снижены по сравнению с уровнями в обработке только 8-CPT/Dex (колонка №2) до уровней (колонка №7, №10), близких к без обработки-8-CPT/Dex контрольной группы (колонка №1 на Фиг. 11). Другими словами, совместная обработка Соединением №43 (150 или 300 ч/5 млрд) 100 нМ инсулина почти полностью устранила 8-CPT/Dex-индуцированную экспрессию G6rc в клетках AML-12.

[00307] Вместе эти результаты демонстрируют, что, подобно инсулину, одно Соединение 43 в испытанных дозах может ингибировать 8-CPT/Dex-индуцированную экспрессию G6rc, и комбинация инсулина, и Соединения №43 была даже более 10 эффективной, чем инсулин или Соединение №43 отдельно в подавлении повышенной экспрессии G6rc из-за обработки 8-CPT/Dex в клетках AML-12.

[00308] Эффекты вышеуказанного снижения экспрессии G6rc в ответ на селенсодержащие соединения не были связаны с потенциальным токсическим действием этих селенсодержащих соединений на выживаемость клеток, поскольку эти соединения 15 в тестируемой дозе не влияли на жизнеспособность клеток AML-12 или HepG2 в условиях аналогичных условиям эксперимента (данные не показаны).

[00309] Таким образом, эти результаты продемонстрировали, что существует разное влияние Соединения №43 и №50 на ингибирование экспрессии G6rc в печени. Как минимум, данные демонстрируют, что Соединение №43 является активным соединением, 20 которое ингибирует экспрессию G6rc в печени как *in vivo*, так и *in vitro*. Исследования также показали, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, напрямую ингибируя экспрессию G6rc в клетках печени мыши и человека, культивируемых как в нормальных условиях, так и в условиях, имитирующих диабет (то есть, обработка клеток 8-CPT/Dex). Кроме того, Соединение №43 может улучшать 25 действие инсулина при ингибировании экспрессии G6rc в клетках AML-12, культивируемых как в нормальных условиях, так и в условиях, имитирующих диабет. Вместе эти результаты предоставляют молекулярные доказательства того, что Соединение №43 может ингибировать экспрессию G6rc в печени как *in vivo*, так и *in vitro* и, таким образом, может быть ценным средством для лечения больных диабетом 30 типа I и типа II.

Пример 5: Соединение №43 имитирует, но обходит инсулин для активации передачи сигналов фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы 1 (PDK1) и протеинкиназы B (AKT), чтобы усилить фосфорилирование транскрипционного фактора FOXQ1 (FOXQ1) в печени, *in vivo* и *in vitro*

[00310] Транскрипционный фактор FOXO1 играет критическую роль в метаболизме, глюконеогенезе и чувствительности к инсулину в печени. Внутриклеточная активность FOXO1 жестко регулируется посттрансляционной модификацией. В частности, фосфорилирование FOXO1 исключает FOXO1 из ядра, тем самым блокируя его доступ к его генам-мишеням, таким как G6rc, в печени для производства глюкозы. У 35 инсулинорезистентных или диабетических индивидуумов нет сигнала для исключения FOXO1 из ядра, поэтому он остается в ядре и стимулирует транскрипцию G6rc. Повышенная экспрессия G6rc стимулирует глюконеогенез, что приводит к 40 гипергликемии.

[00311] Как описано выше, результаты *in vivo* и *in vitro* продемонстрировали, что Соединение №43 может имитировать, но обходить действие инсулина, ингибировать 45 экспрессию G6rc и может улучшать действие инсулина в процессе. Поскольку FOXO1 является основной сигнальной молекулой для глюконеогенеза и чувствительности к инсулину в печени, а PDK1 и AKT являются двумя основными промежуточными

сигнальными молекулами перед FOXO1, вопрос относительно того, будет ли Соединение №43, подобно инсулину, нацеливаться на FOXO1 и его восходящие сигнальные молекулы, PDK1 и AKT, исследовали у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , в клетках печени HepG2 человека и AML-12 мыши.

<sup>5</sup> Материалы и способы

Соединения

[00312] Соединение №43 было синтезировано в химической лаборатории Alltech, Inc. Чистота этого испытуемого соединения составляет  $\geq 99\%$ , как определено по ВЭЖХ.

Обработка Соединением №43 *in vivo* у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  и получение белка печени

[00313] Самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (гибрид C57BL/6J, приобретенный в The Jackson Laboratory) в возрасте 38 дней внутрибрюшинно ежедневно инъецировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, Соединение №43 (25 мкг каждого селенсодержащего или серосодержащего соединения на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. После обработки печень собирали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

[00314] Замороженные ткани печени измельчали в стерильном ледяном PBS, содержащем полные ингибиторы протеиназы и фосфатазы (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс), и подвергали гомогенизации с использованием гомогенизатора тканей (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс). Эти гомогенаты тканей разбавляли в предварительно приготовленном буфере RIPA Themo-Fisher (1 часть гомогената/2 части буфера RIPA), содержащем полные ингибиторы протеиназы/фосфатазы, для экстракции белков. Белки в гомогенатах экстрагировали в буфер RIPA при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Эти экстрагированные в течение ночи белковые лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ , и уровни белка в супернатанте этих тканевых лизатов определяли с использованием набора для анализа белка Pierce Micro-BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс) согласно протоколу производителя.

Культура клеток

[00315] Клеточные линии гепатомы человека HepG2 и печени мыши AML-12 были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Клетки HepG2 культивировали в минимальной основной среде Игла (EMEM) с добавлением 10% FBS. Клетки AML-12 амплифицировали в модифицированной Дульбекко среде Игла и среде Хэма F12 (DMEM/F12), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 40 нг/мл дексаметазона (Dex, Sigma) и IX ITS (содержащей 0,01 мг/мл бычьего инсулина, 0,0055 мг/мл человеческого трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия) раствором (Sigma).

Обработка клеток для анализа белка

[00316] Клетки HepG2 высевали на 6-луночные планшеты ( $7 \times 10^5$  клеток/лунку) и культивировали в среде с 10% FBS EMEM в течение 30 ч. Затем клетки дважды промывали PBS для удаления остаточных сывороток и культивировали без сыворотки в простой среде EMEM в течение ночи. Культивированные без сыворотки клетки HepG2 обрабатывали в отсутствии или в присутствии Соединения №43 (600 ч/млрд) в течение 0 мин (непосредственно перед обработкой), 30 мин, 60 мин, 90 мин, 24 ч, 30 ч и 40 ч.

[00317] Клетки AML-12 использовали для изучения того, может ли Соединение №43 регулировать сигнальные молекулы Pdk1/Akt/Foxo1 в клетках печени после индукции диабетическими стимулами. Амплифицированные клетки AML-12 высевали на 6-луночные ( $1 \times 10^6$  клеток/лунку) планшеты и культивировали в 10% FBS свободной от

ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч. Затем клетки дважды промывали PBS для удаления остаточных сывороток и культивировали без сыворотки в простой среде DMEM/F12 в течение ночи. Культивированные без сыворотки клетки AML12 обрабатывали диабетическими стимулами 8-CPT (0,1 мМ) и Dex (0,5 мКМ) в комбинации, 5 без (контрольная группа) или 10 нМ инсулина, или Соединения №43 (300 ч/млрд) в бессывороточной среде простой среде DMEM/F12 в течение 60 мин, 90 мин и 6 ч соответственно.

[00318] После вышеописанных обработок культивируемые клетки HepG2 и AML-12 дважды промывали охлажденным на льду PBS и лизировали в охлажденном на льду 10 буфере RIPA, содержащем полные ингибиторы протеиназы и фосфатазы (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс), на льду в течение 30 мин. Клеточные лизаты собирали, используя клеточный скребок и пипетку для переноса, и затем центрифугировали при 12000 × g в течение 30 мин при 4°C для удаления осадка ДНК и получения белкового экстракта. Уровни белка в супернатанте этих клеточных лизатов определяли с 15 использованием набора для анализа белка Pierce Micro-BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс) согласно протоколу производителя.

#### Вестерн-блот анализ

[00319] Сто микрограммов белков ткани печени или пять микрограммов общих белков из клеток HepG2 или AML-12, обработанных контролем и соединением(ями), 20 подвергали разделению в геле SDS-PAGE и затем переносили на мембранны PVDF, как описано ранее (Reddy et al. 2008 Science). Мембранны блокировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 5% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Сэнт Луис, Миссури), и инкубировали со специфическими первичными антителами с последующей инкубацией с HRP-конъюгированными анти-мышиными или вторичными 25 анти-кроичными антителами (разведение 1: 5000, Cell Signaling Inc.). Все первичные антитела, за исключением Gapdh (Li-COR, Линкольн, Небраска), были приобретены у Cell Signaling Inc. Положительные сигналы на мембранных блотах были обнаружены с использованием усиленных хемилюминесцентных реагентов Western Blotting Prime Detection от Amersham (GE Healthcare Lifescience, Питсбург, Пенсильвания). Изображения 30 указанных люминесцентных сигналов на мембранных блотах были получены с использованием системы LI-COR Odyssey Fc Image (Линкольн, Небраска). Тот же самый мембранный блот удаляли и повторно блоттировали с другим антителом, как описано в протоколе определения первичного уровня GE WB ECL (GE Healthcare, Lifescience, Питсбург, Пенсильвания). Плотность белковых полос в Вестерн-блоттинге определяли 35 с использованием программного обеспечения NIH ImageJ и затем нормализовали по уровню Gapdh или Actb/ACTB в каждом образце. Данные представлены в виде среднего ± СОС трех образцов для каждой группы.

#### Статистический анализ

[00320] Если применимо, был проведен t-тест Стьюдента, чтобы определить 40 статистическую разницу между двумя группами. Значение P менее 0,05 считалось значимым.

#### Результаты:

1. Усиленное фосфорилирование Pdk1, Akt и Foxo1 в печени инсулинорезистентных мышей Lepr<sup>db/db</sup> после хронического лечения Соединением №43

45 [00321] Исследования на животных показали, что Соединение №43 может снижать уровни глюкозы и HbA1c в крови и ингибировать экспрессию Gbrc в печени у мышей Lepr<sup>db/db</sup> (фиг. 3-7, 9) Пониженные уровни глюкозы натощак и уровни HbA1c в крови, по меньшей мере, частично приписываются ослабленной экспрессии глюконеогенного

гена G6pc в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ . Экспрессия G6pc в печени контролируется сигнальным каскадом инсулина Pdk1/Akt/Foxo1. Следовательно, в заявке исследуется, может ли хроническое лечение Соединением №43 восстановить, по меньшей мере, до некоторой степени передачу сигналов инсулина (т.е. усиливать фосфорилирование Pdk1/Akt/Foxo1 в печени этих инсулинрезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ ).

[00322] Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор или Соединение №43 в дозе 25 мкг селена на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. После вышеуказанных обработок ткани печени собирали и подвергали Вестерн-блоттингу с использованием специфических антител против сигнальных молекул инсулина. Как представлено на Фиг. 12А, белковые сигналы фосфорилированного-Pdk1, -Akt по треонину 308 и -Foxo1 по серину 256 в печени мышей, которым вводили Соединение №43, были заметно более многочисленными, чем у мышей, получавших физиологический раствор. Количественный анализ этих вестерн-блоттингов показал, что уровни белка pPdk1, pAkt и pFoxo1 были значительно повышены в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после обработки Соединением №43 (Фиг. 12В). Напротив, не было значительного изменения общих уровней Akt у мышей, которым вводили Соединение №43. Повышенное фосфорилирование Pdk1, Akt и Foxo1 убедительно свидетельствует о том, что нисходящий каскад передачи сигналов инсулина активен в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения Соединением №43, даже несмотря на то, что мыши  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , как известно, не способны реагировать на инсулин. Другими словами, результаты демонстрируют, что Соединение №43 может либо восстанавливать действие инсулина, по меньшей мере, частично, обходить инсулин, либо и то и другое, чтобы стимулировать фосфорилирование Pdk1/Akt/Foxo1, что приводит к ослаблению экспрессии G6pc и выработки глюкозы в печени этих инсулинрезистентных мышей с диабетом.

2. Соединение №43 имитирует, но обходит инсулин для временной активации PDK1/АКТ и последующей инактивации FOXO1 в клетках HepG2 человека, культивируемых в бессывороточной среде

[00323] Чтобы исследовать, существует ли инсулиннезависимый, но инсулиноподобный эффект Соединения №43 в печени для регуляции фосфорилирования PDK1, АКТ и FOXO1, клетки HepG2 человека, культивируемые без сыворотки, обрабатывали контролем и 600 ч/млрд Соединения №43 в бессывороточной среде в течение различных периодов времени, от 30 мин до 48 ч. Обработанные клетки подвергали Вестерн-блот анализу.

[00324] Как представлено на Фиг. 13А, имел место заметно повышенный сигнал белка для фосфорилированного PDK1 в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 в течение 30, 60 и 90 мин, но не в более длительные моменты времени обработки (после 24 ч обработки). Количественные исследования показали значительное и кратковременное увеличение pPDK1 в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 с максимальным увеличением через примерно 60-90 мин после обработки соединением (Фиг. 13В). Аналогичным образом, значительное и кратковременное увеличение фосфорилированного АКТ при T308 также наблюдалось в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 в течение 30, 60, 90 мин и 24 ч с увеличением пика через 60 и 90 мин (Фиг. 13А, С). Напротив, общие уровни белка АКТ во всех протестированных временных точках не были значительно изменены в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 (Фиг. 13А, D).

[00325] Уровни фосфорилированного FOXO1 при Т24 были значительно увеличены в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 в течение 90 мин и дольше (Фиг. 13А, Е). Повышенное фосфорилирование FOXO1 наблюдалось позже, чем увеличение уровня pPDK1 и pAkt (Фиг. 13А, 13Е по сравнению с 13В-С). Не наблюдалось

- 5 значительного изменения общего уровня белка FOXO1 в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 в течение менее чем 24 ч (Фиг. 13А, 13F). Однако продолжительная обработка Соединением №43 (30 ч или 48 ч) привела к незначительному, но статистически значимому снижению общего количества белков FOXO1 в клетках HepG2 (Фиг. 13А, F), что могло быть связано с потенциально повышенной деградацией
- 10 протеасомного белка FOXO1 в результате постоянного повышения уровня фосфорилированного FOXO1 в клетках HepG2. Фосфорилированный FOXO1 исключен из ядра, что означает меньший уровень ядерного FOXO1 и меньшую экспрессию G6rc как прямой результат. Кроме того, значительно сниженная выработка глюкозы (Фиг. 1) и экспрессия G6PC (Фиг. 10В) наблюдались в клетках HepG2, обрабатываемых
- 15 Соединением №43, а также сниженная гипергликемия и ослабленная экспрессия G6rc в мышах Lepr<sup>db/db</sup>, которым вводили Соединение №43 (Фиг. 3-7, 9).

[00326] Вместе вышеупомянутые результаты продемонстрировали, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, для временной активации PDK1 и Akt и последующей инактивации FOXO1 в клетках HepG2 печени человека.

- 20 3. Соединение №43 имитирует, но обходит инсулин для временной активации Pdk1/Akt и последующей инактивации Foxo1 в клетках AML-12, культивируемых в условиях имитации диабета (стимулируемых как 8-CPT, так и Dex)

[00327] Как описано в предыдущих примерах, Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, ингибировать индуцированную 8-CPT/Dex экспрессию G6rc в клетках AML-12 (Фиг. 11). Этот эффект может быть связан с потенциальной инсулиноподобной активностью Соединения №43 в инактивации Foxo1 в указанных клетках печени мыши. Таким образом, в настоящей заявке исследовали экспрессию белка сигнальных молекул инсулина в клетках AML-12, культивируемых в имитированных диабетических условиях (стимулированных 8-CPT и Dex).

- 30 [00328] Как представлено на Фиг. 14А, обработка инсулином усиливала фосфорилирование Pdk1, Akt и Foxo1 через 60 и 90 мин, указывая на то, что клетки AML-12, культивированные в имитированных диабетических условиях, реагировали на инсулин. Подобно инсулину, Соединение №43 также значительно индуцировало фосфорилирование Pdk1, Akt и Foxo1 в этих обработанных 8-CPT/Dex клетках AML-12
- 35 после 60 мин обработки соединением (Фиг. 14А-В). Через 90 мин после обработки соединением наблюдалось значительное увеличение уровней pFoxo1 в этих клетках AML-12, в то время как уровни всех других протестированных молекул, включая pPdk1, pAkt, Akt и Foxo1, не были существенно изменены после обработки Соединением №43 (Фиг. 14А, С). Через 6 ч обработки Соединением №43 все еще наблюдалось значительное увеличение уровней pFoxo1 и небольшое, но значительное снижение общих уровней Foxo1 (Фиг. 14А, D). Повышенный уровень pFoxo1 и незначительное снижение общего уровня Foxo1 при 6 ч обработке также наблюдались в клетках AML-12 после обработки 10 нМ инсулина (Фиг. 14А, Е). Еще раз, небольшое снижение общего уровня Foxo1
- 40 через 6 ч обработки может быть связано с целенаправленной протеасомной деградацией белков Foxo1 в результате непрерывного фосфорилирования Foxo1 в цитозоле клеток AML-12, которые подвергались диабетическим стимулам. Усиленное фосфорилирование Foxo1 после обработки Соединением №43 может привести к снижению уровня ядерного Foxo1 и ослаблению индуцированной 8-CPT/Dex экспрессии G6rc, наблюдавшейся на Фиг.
- 45

11. Вместе результаты показывают, что Соединение №43, подобно инсулину, может временно индуцировать фосфорилирование Pdk1 и Akt и затем индуцировать фосфорилирование Foxo1 в клетках AML-12, культивируемых в условиях имитации диабета.

<sup>5</sup> [00329] В заключение вышеупомянутые исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, для временной активации Pdk/Akt и затем неактивного Foxo1 в печени.

<sup>10</sup> Пример 6: Повышенная экспрессия Glut4 (SLC2A4) в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  и культивируемых клетках печени и повышенный захват глюкозы в клетках печени после обработки Соединением №43

<sup>15</sup> [00330] Исследования *in vivo* показали, что Соединение №43 может снизить уровень глюкозы в крови и улучшить клиренс глюкозы у инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  (Фиг. 3-8). Частично это связано с уменьшением выработки глюкозы в печени, но также может быть вызвано повышенным поглощением глюкозы из кровотока в периферические ткани, включая печень. Glut4 является критическим переносчиком глюкозы и косвенным целевым геном Foxo1 для захвата глюкозы в печени в ответ на системные стимулы инсулина. Поэтому мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  и культивируемые клетки печени AML-12 мыши обрабатывали Соединением №43 для проверки его потенциального влияния на экспрессию Glut4 и поглощение глюкозы в печени.

#### Материалы и способы

##### Соединения

<sup>25</sup> [00331] Соединения №43 и №50 были синтезированы в Химической лаборатории Alltech, Inc. Было установлено, что чистота данных соединений составляет  $\geq 99\%$ , как определено по ВЭЖХ.

#### Введение Соединения №43 и №50 мышам $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$ *in vivo*

<sup>30</sup> [00332] Самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db}/\text{db}}$  (гибрид C57BL/6J, приобретенный в The Jackson Laboratory) в возрасте 38 дней внутрибрюшинно ежедневно инъектировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, Соединение №43 или Соединение №50 (25 мкг каждого селенсодержащего соединения на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. После обработки печень собирали и подвергали РНК анализу.

#### Культура клеток

<sup>35</sup> [00333] Клетки печени мыши AML-12 были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Данные амплифицировали в модифицированной Дульбекко среде Игла и среде Хэма F12 (DMEM/F12), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 40 нг/мл дексаметазона (Dex, Sigma) и 1X ITS (содержащей 0,01 мг/мл бычьего инсулина, 0,0055 мг/мл человеческого трансферрина, 40 5 нг/мл селенита натрия) раствором (Sigma).

#### Обработка клеток для РНК анализа

<sup>45</sup> [00334] Для РНК анализа базальной экспрессии Glut4 (Slc2a4) (в отсутствие диабетических стимулов 8-CPT/Dex) амплифицированные клетки AML-12 культивировали на 24-луночных ( $1 \times 10^5$  клеток/лунку) планшетах в течение ночи в 10% FBS свободной от ITS- и Dex- DMEM/F12 среде. Клетки дважды промывали PBS для удаления остаточных сывороток и затем инкубировали с носителем (0,024% ДМСО) или с Соединением №43 (300 ч/млрд) в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение 24 ч.

[00335] Для РНК анализа экспрессии Glut4 в клетках AML-12, культивируемых в

имитированных диабетических условиях, амплифицированные клетки AML-12 культивировали на 24-луночных ( $2 \times 10^5$  клеток/лунку) планшетах в 10% FBS свободной от ITS- и Dex- DMEM/F12 среде в течение ночи. Затем клетки дважды промывали PBS для удаления любых потенциальных остаточных сывороток и затем культивировали без сыворотки в простой среде DMEM/F12 в течение ночи. Культивируемые без сыворотки клетки AML-12 затем инкубировали с носителем (0,024% ДМСО) или с Соединением №43 (300 ч/млрд) в присутствии диабетических стимулов, 0,1 мМ 8-CPT (Sigma) и 0,5 мКМ Dex в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение 6 и 24 ч.

#### Выделение РНК и анализ ПЦР в реальном времени

[00336] Общую РНК от мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили физиологический раствор или Соединение №43, выделяли с использованием набора для выделения РНК Qiagen RNAeasy в соответствии с протоколом производителя. Общую РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием Trizol (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя, а затем инкубировали с ДНКазой I для удаления любых потенциально загрязняющих геномных ДНК. Образцы РНК были подвергнуты анализу ПЦР в реальном времени с использованием RT-набора Applied-Bioscience и предварительно разработанных зондов Taqman (Invitrogen), как описано ранее (Lan et al EMBO J 2003). Данные были нормализованы по уровням мРНК актина В (Actb) в каждом образце и представлены как среднее СОС для 3-5 образцов.

#### Анализ захвата глюкозы

[00337] Равное количество амплифицированных клеток AML-12 высевали на 96-луночные планшеты ( $1,5 \times 10^5$ /лунку) и культивировали в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение ночи. Затем клетки дважды промывали PBS (для удаления любых потенциальных остаточных сывороток) и культивировали без сыворотки в простой среде DMEM/F12 в течение ночи. Культивируемые без сыворотки клетки AML-12 обрабатывали средой (базальный уровень), инсулином (10 и 100 нМ) или Соединением №43 (150, 300 и 600 ч/млрд) в среде DMEM без глюкозы/фенолового красного при 37°C в течение 1,5 ч. После обработки среду удаляли и клетки один раз промывали PBS и инкубировали с 1 мМ 2-дезоксиглюкозой (2DG) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем обработанные 2DG клетки подвергали измерению захвата глюкозы с использованием набора Promega для определения уровня захвата глюкозы-Glo в соответствии с протоколом производителя. Люминесцентные сигналы регистрировали с помощью люминометра Bio-Tek.

#### Статистический анализ

[00338] Там, где это применимо, t-критерий Стьюдента использовался для определения статистической значимости различий между различными группами обработки, при этом значение Р было менее 0,05 для представления значимого результата.

#### Результаты:

1. Анализ экспрессии мРНК Glut4 в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения Соединениями №43 и №50

[00339] Самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в возрасте 38 дней внутрибрюшинно ежедневно инъектировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО, Соединение №43 или Соединение №50 (25 мкг эквивалентны селену каждого соединения на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. После лечения соединениями печень собирали и подвергали РНК анализу на мРНК Glut4 и Actb.

[00340] Как представлено на Фиг. 15, лечение Соединением №50 численно увеличивало

уровни мРНК Glut4 в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (по сравнению с группой, получавшей физиологический раствор). Однако лечение Соединением №43 вызвало большое и статистически значительное увеличение (в 5 раз;  $P=0,048$ ) уровней экспрессии мРНК

5 Glut4 в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (Фиг. 15). Эти результаты свидетельствуют о том, что между этими двумя селенсодержащими соединениями существуют четкие различия в стимуляции экспрессии Glut4 в печени и что Соединение №43 является мощным усилителем экспрессии Glut4 в этом органе. Данные результаты также позволяют предположить, что снижение уровня глюкозы в крови и улучшение толерантности к

10 глюкозе, наблюдаемое у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших Соединение №43 (Фиг. 3-8), может быть отчасти обусловлено усилением экспрессии Glut4, что приводит к увеличению захвата глюкозы из кровотока в печень у диабетических субъектов.

2. Усиленная экспрессия мРНК Glut4 после обработки Соединением №43 в клетках печени мыши AML-12 с или без стимуляции диабетическими стимулами (8-CPT/Dex)

15 [00341] Вышеуказанные исследования *in vivo* показали, что Соединение №43 может значительно стимулировать экспрессию Glut4 в печени инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ . Что может быть связано с потенциальным системным воздействием Соединения №43 или потенциальным прямым воздействием Соединения №43 на ткани печени. Чтобы проверить последний сценарий, культивируемые клетки печени использовали

20 для изучения того, может ли Соединение №43 непосредственно регулировать экспрессию Glut4 в печени.

[00342] Было исследовано, может ли Соединение №43 регулировать базальную экспрессию Glut4 в нормальных клетках AML-12 (без применения диабетических стимулов). Вкратце, клетки AML-12 обрабатывали носителем (0,024% ДМСО) и Соединением №43 (300 ч/млрд) в бессывороточной и свободной от ITS/Dex среде в течение 24 ч и подвергали РНК анализу экспрессии Glut4 и Actb. Как представлено на Фиг. 16А, обработка Соединением №43 (300 ч/млрд) приводила к значительному увеличению (примерно в 2,1 раза) экспрессии мРНК Glut4 в клетках AML-12. Учитывая, что этот эксперимент был выполнен на клетках AML-12, культивируемых в условиях, не содержащих сыворотки, результаты свидетельствуют о том, что повышенная экспрессия Glut4 после обработки Соединением №43 в клетках AML-12 не зависит от инсулина, сыворотки или любых факторов роста.

[00343] Чтобы дополнительно проверить, может ли Соединение №43 регулировать экспрессию Glut4, использовали клетки AML-12, которые были подвергнуты диабетическим стимулам. Вкратце, клетки AML-12 культивировали без сыворотки и затем инкубировали с носителем (0,024% ДМСО) или с Соединением №43 (300 ч/млрд) в присутствии диабетических стимулов, 0,1 mM 8-CPT (Sigma) и 0,5 M Dex в бессывороточной среде DMEM/F12 в течение 6 и 24 ч. Как представлено на Фиг. 16В, обработка Соединением №43 в течение 6 и 24 ч приводила к значительному увеличению экспрессии мРНК Glut4 в этих клетках AML-12, которые были обработаны диабетическими стимулами, 8-CPT и Dex. Таким образом, эти результаты демонстрируют, что Соединение №43 может непосредственно регулировать экспрессию Glut4 в клетках AML-12, культивируемых в условиях имитации диабета.

3. Соединение №43 имитирует, но обходит инсулин для усиления захвата глюкозы в клетках печени мыши AML-12

[00344] Повышенная экспрессия Glut4 позволяет предположить, что Соединение №43, вероятно, может имитировать, но обходить инсулин, усиливая захват глюкозы в печени. Чтобы проверить это, были проведены эксперименты по захвату глюкозы в

клетках печени AML-12 мыши. Вкратце, равные количества клеток AML-12 высевали на 96-луночные планшеты, культивировали в 10% FBS свободной от ITS/Dex DMEM/F12 среде в течение 24 ч, и культивировали без сыворотки в простых средах DMEM/F12 в течение ночи. Культивируемые без сыворотки клетки AML-12 обрабатывали инсулином (10 и 100 нМ) или Соединением №43 (150, 300 и 600 ч/млрд) в среде DMEM без глюкозы/фенолового красного/сыворотки при 37°C в течение 1,5 ч. После обработок клетки инкубировали с 1 мМ 2-дезоксиглюкозой (2DG) при комнатной температуре в течение 30 мин, и затем подвергали люминесцентному анализу с использованием набора Promega для анализа захвата глюкозы-Glo. Обнаруженные люминесцентные сигналы отражают захват глюкозы в культивируемых клетках.

[00345] Как представлено на Фиг. 17, обработка 10 нМ инсулина не увеличивала захват глюкозы. Однако обработка 100 нМ инсулина привела к значительному увеличению захвата глюкозы клетками AML-12. Кроме того, обработка Соединением №43 при всех трех испытанных дозах приводила к значительному увеличению захвата глюкозы, и степень повышенного захвата глюкозы клетками AML-12, обработанными 600 ч/млрд Соединения №43, была сопоставима с обработкой 100 нМ инсулина (Фиг. 17). Поскольку клетки AML-12 обрабатывали Соединением №43 в бессывороточных условиях, результаты показывают, что, подобно инсулину, Соединение №43 может действовать быстро (менее 1,5 ч), непосредственно стимулируя захват глюкозы клетками печени. Повышенный захват глюкозы печенью может быть одной из причин, по которой Соединение №43 может снизить уровень глюкозы в крови и улучшить клиренс глюкозы у инсулинорезистентных мышей Lep<sup>db/db</sup> (Фиг. 3-8).

Пример 7: Усиленная экспрессия ключевых нижестоящих молекул передачи сигналов инсулина, фосфорилированных Pdk1, Akt и Foxo1, в скелетных мышцах инсулинорезистентных мышей Lep<sup>db/db</sup> и совместное действие как инсулина, так и Соединения №43 при стимуляции захвата глюкозы в дифференцированные клетки C2C12 (скелетные мышцы)

#### Материалы и способы Соединения

[00346] Соединение №43 было синтезировано в химической лаборатории Alltech, Inc. Чистота этого испытуемого соединения составляет ≥99%, как определено по ВЭЖХ.

#### Введение Соединения №43 мышам Lep<sup>db/db</sup> in vivo

[00347] Самцам мышей Lep<sup>db/db</sup> (гибрид C57BL/6J, приобретенный в The Jackson Laboratory) в возрасте 38 дней внутрибрюшинно ежедневно инъектировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО или 0,136 мг Соединения №43 на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. После обработки образцы икроножных скелетных мышц собирали и хранили при -80°C.

#### Получение белка скелетных мышц и Вестерн-блот анализ

[00348] Замороженные скелетные мышцы измельчали в стерильном ледяном PBS, содержащем полные ингибиторы протеиназы и фосфатазы (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс), и подвергали гомогенизации с использованием гомогенизатора тканей (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс). Эти гомогенаты тканей разбавляли в буфере RIP A Thermo-Fisher (1 часть гомогената/2 части буфера RIPA), содержащем полные ингибиторы протеиназы/фосфатазы, для экстракции белков. Белки в гомогенатах экстрагировали в буфер RIPA при 4°C в течение ночи. Эти экстрагированные в течение ночи белковые/тканевые лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 30 минут при 4°C, и уровни белка в супернатанте тканевых лизатов

определяли с использованием набора для анализа белка Pierce Micro-BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс) согласно протоколу производителя.

[00349] Сто микрограммов белков скелетных мышц подвергали разделению в геле SDS-PAGE и затем переносили на мембранны PVDF, как описано ранее (Reddy et al. 2008

Science). Мембранны блокировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 5% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Сэнт Луис, Миссури), и инкубировали со специфическими первичными антителами с последующей инкубацией с HRP-конъюгированными анти-мышечными или вторичными анти-крючковыми антителами (разведение 1:5000, Cell Signaling Inc.). Все первичные антитела были

приобретены у Cell Signaling Inc, кроме антител к β-тубулину (LI-COR bioscience). Положительные сигналы на мембранных блотах были обнаружены с использованием усиленных хемилюминесцентных реагентов Western Blotting Prime Detection от Amersham (GE Healthcare Lifescience, Питсбург, Пенсильвания). Изображения указанных люминесцентных сигналов на мембранных блотах были получены с

использованием системы LI-COR Odyssey Fc Image (Линкольн, Небраска). Тот же самый мембранный блот удаляли и повторно блоттирували с другим антителом, как описано в протоколе определения первичного уровня GE WB ECL (GE Healthcare, Lifescience, Питсбург, Пенсильвания). Плотность белковых полос в Вестерн-блоттинге определяли с использованием программного обеспечения NIH ImageJ и затем нормализовали по

уровню β-тубулина в каждом образце. Данные представлены в виде среднего ± SEM для 5 образцов животных.

Культура клеток C2C12, дифференцирование клеток C2C12 и анализ захвата глюкозы

[00350] Клетки миобластов мыши C2C12 были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния). Клетки амплифицировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS. Равное количество клеток C2C12 затем высевали на 96-луночные планшеты (5000 клеток/лунку) и культивировали в 10% FBS DMEM среде при 37°C в течение 5 дней. Клетки ежедневно пополняли свежей 10% FBS DMEM средой. На 5-й день культивирования клетки C2C12 дифференцировали, используя 0,5% сыворотку лошади в среде DMEM (среда дифференцирования) (Sigma), и продолжали

культурирование в течение 7 дней с ежедневной заменой среды на свежую среду дифференцирования, как описано ранее (Misra et al, Cell Metabolism 12, 483-95, 2010). На 7-й день после дифференцирования дифференцированные клетки C2C12 дважды промывали PBS и предварительно обрабатывали в отсутствии или в присутствии 0,006% ДМСО (растворитель Соединения №43) или Соединения №43 (300 или 600 ч/млрд) в

бессывороточной среде без глюкозы DMEM в течение ночи. Затем эти клетки промывали один раз PBS и затем обрабатывали в отсутствии (базальный уровень) или в присутствии инсулина (200 нМ), Соединения №43 (300 и 600 ч/млрд) или обоих инсулина, и Соединения №43 в среде DMEM без глюкозы/фенолового красного при 37°C в течение 1,5 ч. После обработки среду удаляли и клетки один раз промывали PBS и инкубировали

с 1 мМ 2-дезоксиглюкозой (2DG) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем обработанные 2DG клетки подвергали измерению захвата глюкозы с использованием набора Promega для определения уровня захвата глюкозы-Glo в соответствии с протоколом производителя. Люминесцентные сигналы регистрировали с помощью люминометра Bio-Tek.

#### 45 Статистический анализ

[00351] Там, где это применимо, t-критерий Стьюдента использовался для определения статистической значимости различий между различными группами обработки, при этом значение Р было менее 0,05.

Результаты:

1. Повышенное фосфорилирование нижестоящих сигнальных молекул инсулина - Pdk1, Akt и Foxo1- в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения Соединением №43

[00352] Помимо печени, скелетные мышцы являются другим важным органом, необходимым для гомеостаза глюкозы в ответ на системный инсулин. Захват глюкозы в скелетных мышцах играет ключевую роль в поддержании нормального уровня глюкозы в крови. Исследования на животных показали, что Соединение №43 может снижать уровни глюкозы и HbA1c в крови, а также значительно улучшать толерантность к глюкозе у инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (Фиг. 3-8). Эти эффекты могут быть связаны с восстановлением передачи сигналов инсулина (то есть Pdk1/Akt) в скелетных мышцах, чтобы стимулировать захват глюкозы. Поэтому было исследовано, может ли хроническое введение Соединения №43 частично восстановить поврежденную передачу сигналов инсулина в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ .

[00353] Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% ДМСО) или Соединение №43 в дозе 0,136 мкг Соединения №43 на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. После вышеуказанных обработок скелетные мышцы собирали и подвергали Вестерн-блоттингу с использованием специфических антител против указанных сигнальных молекул инсулина.

[00354] Как представлено на Фиг. 18А, плотности белковых полос фосфорилированного Pdk1, Akt по треонину 308 и Foxo1 по серину 256, но не общего уровня Akt или Foxo1, были заметно выше в скелетных мышцах мышей, которым вводили Соединение №43, чем у мышей, которым вводили физиологический раствор. Количественный анализ этих вестерн-блотов показал, что уровни белка pPdk1 были повышены в скелетных мышцах мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после обработки Соединением №43 по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор (Фиг. 18В). Повышенные уровни pPdk1 в скелетных мышцах мышей, которым вводили Соединение №43, приблизились к статистической значимости ( $P=0,11$ ). Кроме того, уровни белка двух сигнальных молекул инсулин/Pdk1 ниже по сигнальному пути, pAkt и pFoxo1, были значительно повышены в скелетных мышцах мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после введения Соединения №43 (Фиг. 18В). Напротив, не было значительного изменения уровней общего белка Akt и Foxo1 в скелетных мышцах мышей, которым вводили Соединение №43. Повышенное фосфорилирование Pdk1 и значительное увеличение фосфорилированного Akt и фосфорилированного Foxo1 позволяют предположить, что нисходящий сигнальный каскад инсулина активен в скелетных мышцах мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения Соединением №43, даже несмотря на то, что мыши  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , как известно, не способны реагировать на инсулин. Другими словами, результаты демонстрируют, что Соединение №43 может восстанавливать действие инсулина, обходя инсулин или оба, активировать PI3K, вызывая фосфорилирование Pdk1/Akt в скелетных мышцах, что позволяет им выполнять свои ключевые функции в регуляции гомеостаза глюкозы у инсулинерезистентных мышей с диабетом II типа.

2. Усиленный захват глюкозы в дифференцированных мышечных клетках C2C12 (скелетные мышцы) после обработки как инсулином, так и Соединением №43

[00355] У людей и других млекопитающих скелетные мышцы обычно составляют 75% инсулин-стимулированного захвата глюкозы в организме. Нарушение способности

скелетных мышц реагировать на инсулин серьезно нарушает системный гомеостаз глюкозы. Хорошо известно, что процесс захвата глюкозы скелетными мышцами в основном опосредуется через сигнальный каскад PI3K/Pdk1/Akt в ответ на инсулин. Активация сигнальных молекул PI3K/Pdk1/Akt в скелетных мышцах

5 инсулинерезистентных мышей позволяет предположить, что Соединение №43, вероятно, может непосредственно регулировать захват глюкозы в скелетных мышцах и потенцировать действие инсулина в данном процессе. Чтобы проверить эти возможности, были проведены эксперименты по захвату глюкозы на дифференцированных мышиных клетках C2C12 (скелетные мышцы).

10 [00356] Вкратце, равное количество клеток C2C12 затем высевали на 96-луночные планшеты (5000 клеток/лунку) и культивировали в 10% FBS DMEM среде при 37°C в течение 5 дней. Клетки дифференцировали, используя 0,5% сыворотку лошади в среде DMEM (Sigma) в течение 7 дней, с получением клеток скелетных мышц, как описано ранее (Misu et al, Cell Metabolism 12, 483-495, 2010). Полностью дифференцированные 15 клетки C2C12 предварительно обрабатывали без или с 0,006% ДМСО (растворитель Соединения №43) или Соединением №43 (300 или 600 ч/млрд) в бессывороточной без глюкозы DMEM среде в течение ночи. Затем эти клетки инкубировали в отсутствии (базальный уровень) или в присутствии инсулина (200 нМ), Соединения №43 (300 и 600 ч/млрд) или обоих инсулина, и Соединения №43 в среде DMEM без глюкозы/фенолового 20 красного при 37°C в течение 1,5 ч. После обработок клетки инкубировали с 1 мМ 2-дезоксиглюкозой (2DG) при комнатной температуре в течение 30 мин, и затем подвергали люминесцентному анализу с использованием набора Promega для анализа захвата глюкозы-Glo. Обнаруженные люминесцентные сигналы отражают захват глюкозы в 25 культивируемых дифференцированных клетках C2C12.

25 [00357] Как представлено на Фиг. 19, обработка 200 нМ только инсулина или 600 ч/млрд только Соединения №43, но не 300 ч/млрд Соединения №43, привела к увеличению на 16-19% (хотя увеличение и не было статистически значимым по сравнению с базальной группой) захвата глюкозы в культивируемых клетках скелетных мышц. Поскольку наблюдалась тенденция к увеличению захвата глюкозы в культивируемых клетках 30 скелетных мышц после обработки более высокой дозы (600 ч/млрд) Соединения №43 с эффективностью, аналогичной 200 нМ инсулина, возможно, что Соединение №43 в дозе выше 600 ч/млрд может непосредственно и значительно увеличить захват глюкозы в дифференцированных мышечных клетках. Несмотря на это, результаты показали, что Соединение №43 в испытанной дозе 600 ч/млрд может стимулировать захват 35 глюкозы с эффективностью, сравнимой с 200 нМ инсулина.

[00358] Совместное лечение как инсулином (200 нМ), так и Соединением №43 (300 ч/млрд) приводило к значительному и статистически значимому увеличению (63%) захвата глюкозы дифференцированными клетками C2C12 (Фиг. 19). Более выраженное 40 увеличение (79%) захвата глюкозы наблюдалось в дифференцированных клетках после совместной обработки 200 нМ инсулина и 600 ч/млрд Соединения №43. Степень повышенного захвата глюкозы в дифференцированных клетках C2C12 после совместной обработки как инсулином, так и Соединением №43 была значительно выше, чем инсулином или Соединением №43, что указывает на синергетическое действие инсулина и Соединения №43. Следовательно, приведенные выше исследования демонстрируют, 45 что Соединение №43 может взаимодействовать с инсулином для значительного усиления захвата глюкозы в дифференцированных клетках скелетных мышц.

[00359] Вместе вышеприведенные исследования предполагают, что Соединение №43 может активировать или восстанавливать передачу сигналов инсулина (на что указывает

усиленное фосфорилирование Pdk1/Akt/Foxo1) в скелетных мышцах

инсулинерезистентных диабетических мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  и может усиливать действие инсулина в увеличение захвата глюкозы в культивируемых клетках скелетных мышц (дифференцированных C2C12). Результаты являются дополнительным молекулярным доказательством того, что Соединение №43 может снижать уровень глюкозы в крови и улучшать толерантность к глюкозе у инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (Фиг. 3-8).

Пример 8: Активация передачи сигналов инсулинового рецептора (Insr) в скелетных

мышцах и печени инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  и в культивируемых клетках скелетных мышц и печени мыши после обработки Соединением №43 и инсулиноподобные эффекты Соединения №43 на фосфорилирование AS160-ключа для транслокации GLUT4 из клеточных везикул в плазматическую мембрану для захвата глюкозы в дифференцированных клетках C2C12 мыши (скелетная мышца) и клетках печени HepG2 человека

[00360] Хорошо известно, что после связывания инсулина с альфа-субъединицей Insr, Insr подвергается автофосфорилированию по тирозину, начиная с Y1146, а затем по Y1150/51, что впоследствии активирует PI3K/Pdk1, вызывая фосфорилирование Akt в печени и скелетной мышце. $\beta$  AS160, также известен как член семейства доменов TBC1

4 (TBC1D4), является субстратом Akt, который играет критическую роль в удерживании белков GLUT4 в цитозольных везикулах. Активация передачи сигналов Insr/PI3k/Pdk1/ Akt в ответ на инсулин фосфорилирует AS160, способствуя транслокации белков GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для облегчения захвата глюкозы в клетках скелетных мышц, а также в клетках печени. Таким образом, способность

25 Соединения №43 вызывать фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  была исследована в скелетных мышцах и печени инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  и в дифференцированных клетках C2C12 мыши (скелетные мышцы), а также в клетках печени HepG2 человека. $\beta$  Кроме того, было исследовано, может ли Соединение №43 имитировать, но обходить инсулин, активировать Akt, нижестоящую сигнальную 30 молекулу рецептора инсулина в дифференцированных клетках C2C12 мыши. Кроме того, влияние Соединения №43 на фосфорилирование субстрата-мишени Akt, AS160, было исследовано как на дифференцированных клетках C2C12 мыши, так и на клетках печени HepG2 человека.

Материалы и способы

Соединение

[00361] Соединение №43 было синтезировано в химической лаборатории Alltech, Inc. Чистота этого испытуемого соединения составляет  $\geq 99\%$ , как определено по ВЭЖХ.

Введение Соединения №43 мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  in vivo

40 [00362] Самцам мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (гибрид C57BL/6J, приобретенный в The Jackson Laboratory) в возрасте 38 дней внутрибрюшинно ежедневно инъецировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО или 0,136 мг Соединения №43 на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. После обработки образцы икроножных скелетных мышц 45 и печени собирали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Получение белков скелетных мышц и печени

[00363] Замороженные ткани скелетных мышц и печени измельчали в стерильном ледяном PBS, содержащем полные ингибиторы протеиназы и фосфатазы (Thermo-Fisher

Scientific, Валтам, Массачусетс), и подвергали гомогенизации с использованием гомогенизатора тканей (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс). Эти гомогенаты тканей разбавляли в предварительно приготовленном буфере RIPA Thermo-Fisher (1 часть гомогената/2 части буфера RIPA), содержащем полные ингибиторы протеиназы/5 фосфатазы, для экстракции белков. Белки в гомогенатах экстрагировали в буфер RIPA при 4°C в течение ночи. Эти экстрагированные в течение ночи белковые/тканевые лизаты центрифугировали при 12000 g в течение 30 минут при 4°C, и уровни белка в супернатанте тканевых лизатов определяли с использованием набора для анализа белка Pierce Micro-BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс) согласно 10 протоколу производителя.

Клеточная культура клеток HepG2 и C2C12, дифференцирование клеток C2C12, обработка клеток и получение экстрактов культивируемых клеточных белков

[00364] Клетки гепатомы человека HepG2 и клеточные линии миобластов мыши C2C12 были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC, Сити, Манассас, Вирджиния).

15 Клетки HepG2 культивировали в минимальной основной среде Игла (EMEM), дополненной 10% FBS, в то время как клетки C2C12 амплифицировали в среде DMEM, дополненной 10% FBS.

[00365] Клетки HepG2 высевали на 6-луночные планшеты ( $7 \times 10^5$  клеток/лунку) и 20 культивировали в среде с 10% FBS EMEM в течение 30 ч. Затем клетки дважды промывали PBS для удаления остаточных сывороток и культивировали без сыворотки в простой среде EMEM в течение ночи. Культивированные без сыворотки клетки HepG2 обрабатывали в отсутствии или в присутствии Соединения №43 (600 ч/млрд) в свободной от сыворотки среде в течение 0 мин (непосредственно перед обработкой), 30 мин и 60 мин.

25 [00366] Чтобы дифференцировать клетки C2C12, равное количество клеток миобластов сначала высевали на 12-луночные планшеты (60000 клеток/лунку) и культивировали в среде 10% FBS DMEM при 37°C в течение 5 дней. Клетки ежедневно пополняли свежей 10% FBS DMEM средой. На 5-й день культивирования клетки C2C12 30 дифференцировали, используя 0,5% сыворотку лошади в среде DMEM (среда дифференцирования) (Sigma), и продолжали культивирование в течение 7 дней с ежедневной заменой среды на свежую среду дифференцирования, аналогично, как описано ранее (Misu et al, Cell Metabolism 12, 483-495, 2010). На 7-й день после дифференцирования дифференцированные клетки C2C12 дважды промывали PBS и инкубировали в бессывороточной DMEM среде в течение ночи. Культивируемые без сыворотки клетки обрабатывали в отсутствии (базальный уровень) или в присутствии 35 инсулина (200 нМ), Соединения №43 (600 ч/млрд) или обоих инсулина, и Соединения №43 в бессывороточной среде DMEM при 37°C в течение 5 и 60 мин.

[00367] После вышеописанных обработок культивируемые клетки HepG2 или 40 дифференцированные клетки C2C12 дважды промывали охлажденным на льду PBS и лизировали в охлажденном на льду буфере RIPA, содержащем полные ингибиторы протеиназы и фосфатазы (Thermo-Fisher Scientific, Валтам, Массачусетс), на льду в течение 30 минут. Клеточные лизаты собирали, используя клеточный скребок и пипетку для переноса, и затем центрифугировали при  $12000 \times g$  в течение 30 минут при 4°C для удаления осадка ДНК и получения белкового экстракта. Уровни белка в супернатанте 45 этих клеточных лизатов определяли с использованием набора для анализа белка Pierce Micro-BCA (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс) согласно протоколу производителя.

Вестерн-блот анализ

[00368] Сто микрограмм белков скелетных мышц или тканей печени, пять микрограмм экстрактов клеточных белков НерG2 или восемь микрограмм экстрактов дифференцированных клеточных белков C2C12 подвергали разделению в геле SDS-PAGE и затем переносили на мембранны PVDF, как описано ранее (Reddy et al. 2008 Science). Мембранны блокировали в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 5% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Сэнт Луис, Миссури), и инкубировали со специфическими первичными антителами с последующей инкубацией с HRP-конъюгированными анти-мышиными или вторичными анти-кроичными антителами (разведение 1:5000, Cell Signaling Inc.). Все первичные антитела были приобретены у Cell Signaling Inc, кроме антител к  $\beta$ -тубулину (LI-COR bioscience). Положительные сигналы на мембранных блотах были обнаружены с использованием усиленных хемилюминесцентных реагентов Western Blotting Prime Detection от Amersham (GE Healthcare Lifescience, Питсбург, Пенсильвания). Изображения указанных люминесцентных сигналов на мембранных блотах были получены с использованием системы LI-COR Odyssey Fc Image (Линкольн, Небраска). Тот же самый мембранный блот удаляли и повторно блоттировали с другим антителом, как описано в протоколе определения первичного уровня GE WB ECL (GE Healthcare, Lifescience, Питсбург, Пенсильвания). Плотность белковых полос в Вестерн-блоттинге определяли с использованием программного обеспечения NIH Image J и затем нормализовали по уровню  $\beta$ -тубулина или АСТВ белка в каждом образце. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  SEM 3-5 образцов для каждой группы.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA, ИФА) фосфоро-Insr $\beta$  при Y1146 или Y1150/51

[00369] Образцы белка печени от мышей Lep $r^{db/db}$ , которым вводили физиологический раствор или Соединение №43, подвергали анализу ИФА с использованием наборов для ИФА PathScan Phospho-Insulin Receptor $\beta$  (Tyr1146 или Tyr1150/1151) (Cell Signaling Technology, Данверс, Масачусет) в соответствии с протоколами производителя, за исключением инкубации белковых экстрактов с захватывающими антителами pInsr $\beta$  Y1146 или pInsr $\beta$  Y1150/1151 при 4°C в течение ночи (вместо инкубации при 37°C в течение 2 ч, как описано в протоколе). Четыреста микрограммов экстрактов белка печени были использованы для обнаружения фосфоро-Insr $\beta$  при Y1146 и шестьсот микрограммов экстрактов белка печени для обнаружения фосфоро-Insr $\beta$  при Y1150/1151. Поглощение при 450 нм (OD450) тестируемых образцов регистрировали с использованием микропланшетного ридера Bio-tek. Уровень внутреннего контроля белка  $\beta$ -тубулина в каждом образце определяли с помощью вестерн-блоттинга с использованием 100 мкг белкового экстракта и специфического моноклонального антитела к  $\beta$ -тубулину с последующим количественным анализом плотности полосы белка  $\beta$ -тубулина в вестерн-блоттинге с использованием программного обеспечения NIH Image J. Затем OD450 каждого тестируемого образца нормализовали по уровню белка  $\beta$ -тубулина для получения уровня фосфоро-Insr $\beta$  при Y1146 или Y1150/1151.

#### Статистический анализ

[00370] Там, где это применимо, t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости различий между группами, причем значение Р менее 0,05 считалось значимым.

#### Результаты:

1. Усиленное фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  в скелетных мышцах инсулинорезистентных мышей Lep $r^{db/db}$  после хронического лечения Соединением №43 [00371] Как обсуждалось выше, скелетные мышцы абсолютно необходимы для

гомеостаза глюкозы в ответ на системный инсулин. Исследования на животных показали, что Соединение №43 может снижать уровень глюкозы и уровни HbA1c в крови и улучшать толерантность к глюкозе у инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  (Фиг. 3-8). Данные эффекты могут быть связаны с возможным восстановлением функционирования рецептора инсулина в скелетных мышцах, что приводит к захвату глюкозы у инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ . Усиленное фосфорилирование Pdk1 и Akt в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей которым вводили Соединение №43 (Фиг. 18) говорит о том, что Соединение №43 может обходить, но имитировать инсулин, или восстанавливать действие инсулина для активации сигнального каскада инсулиновых молекул выше каскада Pdk1/Akt в скелетной мышце. Фосфорилирование тирозина  $\text{Insr}\beta$  по Y1146 отражает первую стадию передачи сигналов активированного рецептора инсулина после связывания инсулина с  $\text{Insr}\alpha$ , и это является ключевым событием перед передачей сигналов PI3K/Pdk1/Akt в скелетных мышцах. Поэтому было исследовано, может ли хроническое лечение Соединением №43 регулировать фосфорилирование  $\text{Insr}\beta$  в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ .

[00372] Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения ДМСО) или Соединение №43 в дозе 0,136 мкг Соединения №43 на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. После вышеуказанных обработок образцы скелетных мышц собирали и подвергали Вестерн-блоттингу с использованием специфических антител против вышеуказанных сигнальных инсулиновых молекул.

[00373] Как представлено на Фиг. 20А, плотности белковых полос фосфорилиированного  $\text{Insr}\beta$  по тирозину 1146, но не по общему количеству  $\text{Insr}\beta$ , были намного выше в скелетных мышцах мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших Соединение №43, чем в скелетных мышцах мышей, получавших физиологический раствор.

Количественный анализ этих вестерн-блотов показал, что уровни фосфорилиированного белка  $\text{Insr}\beta$  были значительно увеличены (примерно в 2,5 раза) в скелетных мышцах

мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после обработки Соединением №43 по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор (Фиг. 20В). Напротив, не было значительного изменения уровней общего уровня  $\text{Insr}\beta$  в скелетных мышцах мышей, которым вводили Соединение №43 (Фиг. 20С). Данные результаты согласуются с наблюдением

повышенного фосфорилирования Pdk1 и Akt, ключевых сигнальных молекул инсулина ниже  $\text{Insr}$  в скелетной мышце мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43 (Фиг. 18). Вместе результаты ясно показывают, что рецептор инсулина активируется в

скелетных мышцах мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения Соединением №43, даже несмотря на то, что мыши  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  модифицированы так, чтобы не реагировать

на инсулин. Другими словами, результаты показывают, что Соединение №43 может либо восстанавливать действие инсулина, либо обходить инсулин, либо и то и другое, стимулировать фосфорилирование тирозина  $\text{Insr}\beta$  для последующей активации передачи сигналов PI3K/Pdk1/Akt в скелетных мышцах мышей с тяжелым инсулинерезистентным диабетом II типа.

[00374] Эти результаты, наряду с наблюдением за улучшенным клиренсом глюкозы из кровотока, снижением уровня глюкозы в крови натощак, снижением уровней HbA1C и усилением в сочетании с инсулином захвата глюкозы в скелетных мышцах, строго указывают на то, что Соединение №43 может быть эффективным лечение диабета I и

II типа.

2. Соединение №43 имитирует, но обходит инсулин для стимуляции фосфорилирования Insr $\beta$  по Y1146, Pdk1, Akt и AS160 в дифференцированных клетках C2C12 мыши (скелетных мышц)

- 5 [00375] Для дальнейшего изучения того, может ли Соединение №43 напрямую активировать передачу сигналов рецептора инсулина в скелетных мышцах, инкубированные без сыворотки клетки C2C12 (скелетные мышцы) инкубировали в отсутствии или в присутствии Соединения №43 (600 ч/млрд), инсулина (200 нМ, положительный контроль) или обоих в бессывороточной среде, и в среде без глюкозы
- 10 DMEM в течение очень короткого периода времени (т.е. 5 мин) и 60 мин. Затем проводили вестерн-блот анализ для изучения уровней экспрессии активированного Insr (т.е. pInsr $\beta$  по Y1146) и его нижестоящих сигнальных молекул, включая фосфорилированные Pdk1, Akt и As 160 в дифференцированных клетках скелетных мышц.
- 15 [00376] Экспрессию активированного Insr в культивируемых клетках скелетных мышц измеряли после обработки инсулином или Соединением №43. Как и ожидалось, обработка инсулином в течение 5 мин приводила к значительному увеличению уровня pInsr $\beta$  по Y1146, но не общего Insr $\beta$ , в дифференцированных клетках C2C12 (Фиг. 21A-B), что указывает на то, что дифференцированные клетки C2C12 быстро реагируют на
- 20 инсулин. Кроме того, обработка 600 ч/млрд Соединения №43 также приводила к значительному увеличению pInsr $\beta$  по Y1146, но не общего уровня Insr $\beta$ , в культивируемых клетках скелетных мышц (Фиг. 21A-B). Совместная обработка инсулином и Соединением №43 в течение 5 мин имела тенденцию к повышению уровня белка pInsr $\beta$  в дифференцированных клетках C2C12 (Фиг. 21A-B), что указывает на то,
- 25 что стимуляция Insr $\beta$  после обработки Соединением №43 или обработки инсулином является временным явлением. Действительно, длительное лечение (60 мин) инсулином, Соединением №43 или обоими привело к снижению уровня pInsr $\beta$  (Фиг. 21C-D), что дополнительно указывает на то, что активация Insr после обработки инсулином или Соединением №43 действительно является временным явлением, и что существует
- 30 отрицательная обратная связь для регуляции фосфорилирования Insr $\beta$  тирозина в клетках скелетных мышц. Независимо от этого, усиленное фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  по Y1146, наблюдаемое в культивируемых клетках скелетных мышц после кратковременной (5 мин) обработки Соединением №43, согласуется с активацией Insr $\beta$  у инсулинорезистентных мышей Lepr<sup>db/db</sup>, описанных выше (Фиг. 20). Поскольку
- 35 дифференцированные клетки C2C12 были культивированы без сыворотки, культивированы и обработаны Соединением №43 в условиях, не содержащих сыворотки, результаты показывают, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, для прямой и быстрой активации Insr $\beta$  в дифференцированных клетках скелетных мышц.
- [00377] Поскольку фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  будет активировать передачу сигналов PI3K/Pdk1 для усиления фосфорилирования Akt в ответ на инсулин, было исследовано, может ли Соединение №43 имитировать инсулин для регуляции фосфорилирования Akt в дифференцированных клетках скелетных мышц C2C12. Как представлено на Фиг. 21A, обработка инсулином в течение 5 мин приводила к значительному увеличению уровней фосфорилированного Akt, но не общего уровня Akt. Однако повышенное фосфорилирование Akt не наблюдалось в дифференцированных клетках C2C12 после 60 мин обработки инсулином (Фиг. 21C-D). Напротив, обработка Соединением №43 в течение 5 мин не вызывала значительного увеличения уровней фосфорилированных белков Akt в клетках C2C12, в то время как значительное

увеличение уровней фосфорилированных белков Akt наблюдалось в клетках после обработки Соединением №43 в течение 60 мин (Фиг. 21C-D). Совместная обработка как инсулином, так и Соединением №43 приводила к значительному увеличению уровней белка pAkt в обеих протестированных временных точках (6 мин и 60 мин, Фиг. 21).

- 5 Уровни повышенного фосфорилирования Akt в группе, совместно обработанной инсулином и Соединением №43, были сопоставимы с таковыми в группе, которую обрабатывали одним инсулином через 5 мин, в то время как уровни фосфорилированного Akt через 60 мин после совместной обработки как инсулином, так и Соединением №43 были почти идентичны уровням после обработки только
- 10 Соединением №43. Эти результаты показывают, что инсулин может временно активировать Insr нижестоящую сигнальную молекулу Akt в клетках скелетных мышц. Кроме того, результаты показали, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, чтобы активировать Akt в клетках, хотя и не так быстро, как инсулин. Кроме того, результаты также показывают, что не было синергического действия между
- 15 инсулином и Соединением №43 в стимуляции фосфорилирования Akt в дифференцированных клетках скелетных мышц. Однако результаты показали, что совместная обработка как Соединением №43, так и инсулином может увеличить продолжительность активации Akt сигналов.

[00378] Как обсуждалось выше, AS160 является субстратом-мишенюю Akt и необходим для удержания белков GLUT4 в везикулах внутри клеток скелетных мышц.

Фосфорилирование AS160 по S588 в ответ на передачу сигналов инсулина/Insr $\beta$ /PI3K/Akt вызовет транс локацию белков GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для облегчения захвата глюкозы. Исследования *in vivo* показали, что Соединение №43 может снизить уровень глюкозы в крови и улучшить толерантность к глюкозе у инсулинерезистентных мышей Lepr<sup>db/db</sup> с диабетом (Фиг. 3-8). Кроме того, в культивируемых клетках скелетных мышц наблюдался повышенный захват глюкозы после обработки Соединением №43, особенно после совместной обработки как инсулином, так и Соединением №43 (Фиг. 19). Таким образом, возможно, что Соединение №43 может регулировать транслокацию GLUT4 в клетках скелетных мышц для захвата глюкозы посредством фосфорилирования AS160. Поэтому уровни фосфорилированного AS160 по S588 измеряли в дифференцированных клетках C2C12 (скелетные мышцы) после обработок инсулином, Соединением №43 или обоими в бессывороточных средах в течение 5 и 60 мин.

[00379] Как представлено на Фиг. 21A-B, обработка инсулином в течение 5 мин не влияла на экспрессию белка AS160, но приводила к значительному (примерно в 2 раза) фосфорилированию AS160 по S588 в дифференцированных клетках C2C12. Тем не менее, никакого очевидного увеличения уровня фосфорилированного AS160 не наблюдалось после обработки инсулином в течение 60 мин (Фиг. 21C-D). Данные результаты показывают, что инсулин может временно усиливать фосфорилирование AS160 для транслокации GLUT4 в клетках скелетных мышц.

[00380] Напротив, обработка только Соединением №43 в течение 5 мин не влияла на уровни фосфорилированного AS160 и общий уровень AS160 в дифференцированных клетках C2C12 (Фиг. 21A-B). Однако значительное увеличение (примерно в 6 раз) уровней фосфорилированного AS160 по S588 наблюдалось в клетках скелетных мышц после обработки Соединением №43 в течение 60 мин (Фиг. 21C-D). Эти результаты показывают, что Соединение №43 может имитировать инсулин, хотя и не так быстро, как инсулин, вызывать фосфорилирование AS160 для транслокации GLUT4 в культивируемых клетках скелетных мышц.

[00381] Совместная обработка как инсулином, так и Соединением №43 в обеих протестированных временных точках (5 и 60 мин) привела к значительному увеличению уровней фосфорилированного AS160 (Фиг. 21). Уровень повышенного фосфорилирования AS 160 в группе совместной обработки через 5 мин был сопоставим с одним инсулином (Фиг. 21 A-B), что указывает на то, что наблюдаемое фосфорилирование AS160 в группе совместной обработки главным образом связано с действием инсулина на этот момент времени. Подобным образом, через 60 мин после обработки уровни фосфорилированного AS160 в группе совместного лечения были почти идентичны уровням после обработки только Соединением №43 (Фиг. 21C-D), что указывает на то, что наблюдаемое фосфорилирование AS 160 в группе совместной обработки в этот момент времени вызвано в основном только Соединением №43. Эти результаты позволяют предположить, что совместное лечение как Соединением №43, так и инсулином может увеличить продолжительность фосфорилирования AS160, чтобы способствовать транслокации GLUT4 для захвата глюкозы в дифференцированных, инсулин-чувствительных клетках.

[00382] Вместе результаты показывают, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, для непосредственной и быстрой активации Insr (на что указывает фосфорилирование тирозина в Insr $\beta$ ) в дифференцированных клетках C2C12. Это согласуется с наблюдаемой активацией Insr $\beta$  в скелетных мышцах инсулинерезистентных мышей с диабетом Lepr $^{db/db}$  (Фиг. 20). Затем активированный Insr может активировать передачу сигналов PI3K/Pdk1/Akt в скелетных мышцах (что дополнительно подтверждается исследованиями *in vivo*, показанными на Фиг. 18) для последующего фосфорилирования AS160 (известного субстрата-мишени Akt), что приводит к усилению транслокации GLUT4 из цитозольных везикул к клеточной мембране для захвата глюкозы.

Фактически, увеличение захвата глюкозы наблюдалось в культивируемых клетках скелетных мышц после обработки Соединением №43, особенно после совместной обработки как инсулином, так и Соединением №43 (Фиг. 19). Повышенный захват глюкозы скелетными мышцами после обработки Соединением №43 может снизить уровень глюкозы в крови и улучшить толерантность к глюкозе у мышей с диабетом (Фиг. 3-8). Вкратце, эти результаты указывают на то, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, чтобы напрямую активировать передачу сигналов Insr $\beta$ /PI3K/Pdk1/Akt для фосфорилирования AS160 в клетках скелетных мышц, что приводит к усиленной транслокации GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для стимулирования захвата глюкозы в скелетные мышцы, таким образом, противодействуя ключевой характеристике и патологии диабета 1 и 2 типа.

3. Усиленное фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  в печени инсулинерезистентных мышей Lepr $^{db/db}$  после хронического лечения Соединением №43

[00383] Исследования, описанные в Примере 6, показали, что Соединение №43 может усиливать фосфорилирование Pdk1/Akt/Foxo1 в печени как *in vivo*, так и *in vitro* (Фиг. 12-14). Все эти эффекты могут быть связаны с активацией их восходящей сигнальной молекулы, Insr, в клетках печени после обработки Соединением №43, аналогично тем, которые описаны в клетках скелетных мышц, описанных выше. Как обсуждалось выше, фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  по Y1146, а затем по Y1150/1151 отражает первые несколько этапов передачи сигналов активированного рецептора инсулина после связывания инсулина с Insra, и является ключевым событием перед передачей сигналов PI3K/Pdk1/Akt/Foxo1 в печени. Поэтому было исследовано, может ли хроническая обработка Соединением №43 регулировать фосфорилирование тирозина Insr $\beta$  в печени

инсулинерезистентных мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ .

[00384] Мышам  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  в постнатальный день 38 внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (содержащий 0,2% растворителя соединения ДМСО) или Соединение №43 в дозе 0,136 мкг Соединения №43 на килограмм массы тела ежедневно в течение 52 дней. После вышеупомянутых обработок образцы печени были собраны и подвергнуты ИФА анализам фосфоро- $\text{Insr}\beta$  по Y1146 и фосфоро- $\text{Insr}\beta$  по Y1150/1151 (для получения OD450) и Вестерн-блот анализу с внутренним контролем  $\beta$ -тубулином. Уровень фосфоро- $\text{Insr}\beta$  по Y1146 или по Y1150/1151 в каждом образце был получен после того, как OD450 в каждом образце был нормализован по уровню белка  $\beta$ -тубулина.

[00385] Как представлено на Фиг. 22A, уровни фосфорилированного  $\text{Insr}\beta$  по тирозину 1146 были значительно повышены (примерно в 2,9 раза) в печени мышей после обработки Соединением №43 по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор. Аналогично, уровни фосфорилированного  $\text{Insr}\beta$  по тирозину 1150/1151 также были значительно повышены (примерно в 2,95-кратном увеличении) в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического лечения Соединением №43 по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор (Фиг. 22B). Эти результаты согласуются с наблюдением повышенного фосфорилирования Pdk1 и Akt, ключевых сигнальных молекул инсулина, ниже по сигнальному пути от  $\text{Insr}$  в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , которым вводили Соединение №43 (Фиг. 12). Вместе результаты ясно показывают, что рецептор инсулина активируется в печени мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  после хронического введения Соединения №43, даже несмотря на то, что мыши  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$  модифицированы так, чтобы не реагировать на инсулин. Другими словами, результаты показывают, что Соединение №43 может либо восстанавливать действие инсулина, либо обходить инсулин, либо и то и другое, стимулировать фосфорилирование тирозина  $\text{Insr}\beta$  для последующей активации передачи сигналов PI3K/Pdk1/Akt в печени мышей с тяжелым инсулинерезистентным диабетом II типа.

4. Соединение №43 имитирует, но обходит инсулин для стимуляции фосфорилирования

$\text{Insr}\beta$  по Y1146 и AS160 по S588 в клетках HepG2 печени человека

[00386] Для дальнейшего изучения того, может ли Соединение №43 имитировать, но обходить инсулин для непосредственной активации рецептора инсулина в клетках печени, клетки печени HepG2 человека культивировали без сыворотки в течение ночи, а затем инкубировали с Соединением №43 (600 ч/млрд) в бессывороточной и без глюкозы среде DMEM в течение 30 и 60 мин. Вестерн-блот анализ выполняли для изучения уровней экспрессии белка активированного INSR (т.е. pINSR $\beta$  по Y1146) в клетках печени человека. Как представлено на Фиг. 23, обработка 600 ч/млрд Соединения №43 в течение 30 и 60 мин приводила к значительному увеличению фосфорилированного INSR $\beta$  по Y1146, но не общего INSR $\beta$ , в культивируемых клетках печени. Эти результаты согласуются с повышенным фосфорилированием нижестоящих сигнальных молекул INSR, PDK1 и AKT, в клетках HepG2 после обработки Соединением №43 в течение тех же периодов времени (Фиг. 13). Поскольку клетки печени были лишены сыворотки, а обработка Соединением №43 проводилась в условиях полного отсутствия сыворотки, результаты показывают, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, напрямую стимулируя фосфорилирование тирозина INSR $\beta$ , что приводит к активации PI3K/PI3K/AKT для инактивации FOXO1 для ингибирования экспрессии G6PC для выработки глюкозы и стимуляции экспрессии GLUT4 для захвата глюкозы клетками печени.

[00387] Помимо FOXO1, AS160 является другим субстратом-мишеню АКТ, который играет критическую роль в транслокации глюкозы из клеточных везикул в плазматическую мембрану в тканях-мишениях инсулина, таких как жировые клетки и скелетные мышцы. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что Соединение №43 может

5 снизить уровень глюкозы в крови и улучшить толерантность к глюкозе у мышей с диабетом (Фиг. 3-8), и может увеличить захват глюкозы в культивируемых клетках печени AML-12 (Фиг. 17), что указывает на то, что усиленный захват глюкозы в печени может быть одним из механизмов по которому Соединение №43 снижает уровень глюкозы в крови и улучшает толерантность к глюкозе в отношении диабета I и II типа.

10 Повышенное поглощение глюкозы, вызванное обработкой Соединением №43, вполне может быть результатом усиленной экспрессии GLUT4 (представлено на Фиг. 15-16), потенциальной улучшенной транслокации GLUT4 или обоих, чтобы стимулировать захват глюкозы клетками печени. Для рассмотрения последнего сценария измеряли 15 уровни фосфорилированного AS160 (АКТ мишень-субстрат) в клетках НепG2, которые обрабатывали Соединением №43.

[00388] Как представлено на Фиг. 23, обработка 600 ч/млрд Соединения №43 в течение 30 и 60 мин приводила к значительному увеличению фосфорилированного AS160 по S588, но не общего AS160, в культивируемых клетках печени человека. Эти результаты согласуются с повышенным фосфорилированием PDK1 и АКТ, двух критических 20 сигнальных молекул выше по сигнальному пути от AS160, в клетках НепG2 после обработки Соединением №43 в течение тех же периодов времени (Фиг. 13). Поскольку фосфорилирование AS160 может усиливать транслокацию GLUT4 из клеточных везикул в клеточную мембрану для захвата глюкозы, результаты показывают, что Соединение №43 может имитировать, но обходить инсулин, чтобы стимулировать транслокацию 25 GLUT4 из цитозольной везикулы в плазматическую мембрану для захвата глюкозы в клетках печени человека. В подтверждение этого следует напомнить, что усиленный захват глюкозы наблюдался в культивируемых клетках печени AML-12 после обработки Соединением №43 в течение 1,5 ч (Фиг. 17). Таким образом, в клетках печени Соединение №43 будет не только стимулировать экспрессию GLUT4, опосредованную посредством 30 передачи сигналов Insr/PI3k/Pdk1/Akt/Foxo1 (представлено на Фиг. 12-17), но также усиливать транслокацию GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану, опосредованную через Insr/PI3K/Pdk1/Akt/AS160 (представлено на Фиг. 12-17, 23), тем самым увеличивая захват глюкозы.

[00389] Таким образом, все вышеперечисленные исследования показывают, что 35 Соединение №43 может восстанавливать функцию рецептора инсулина (на что указывает усиленное фосфорилирование тирозина Insr $\beta$ ) как в скелетных мышцах, так и в печени инсулинерезистентных мышей Lep $r^{db/db}$  с диабетом. Исследования *in vitro* дополнительно демонстрируют, что Соединение №43 может близко имитировать инсулин для активации 40 рецептора инсулина как в клетках скелетных мышц, так и в клетках печени человека. Кроме того, результаты показывают, что Соединение №43, подобно инсулину, может активировать передачу сигналов Pdk1/Akt, чтобы индуцировать фосфорилирование AS160 (субстрата-мишени АКТ) как в культивируемых клетках скелетных мышц, так 45 и в клетках печени человека. Усиленное фосфорилирование AS160 способствует транслокации GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для повышения захвата глюкозы в клетках печени и скелетных мышц, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови и повышению толерантности к глюкозе в диабетических ситуациях.

[00390] Следует подчеркнуть, что эти две ткани, печень и скелетные мышцы, являются

наиболее важными в развитии и патогенезе диабета II типа. Соединение №43 благодаря своей способности восстанавливать сигнальный каскад инсулина в указанных тканях может иметь огромное терапевтическое значение при лечении диабета II типа.

[00391] Кроме того, поскольку Соединение №43 может функционировать как инсулин-

<sup>5</sup> миметик в инсулин-чувствительных клетках, в которые не был добавлен инсулин, существует высокая вероятность того, что оно также может быть эффективным для лечения диабета I типа.

Пример 9: Хроническое лечение Соединением №43 приводило к снижению уровней сывороточного инсулина и аланинаминотрансферазы (АЛТ), но не уровней <sup>10</sup> сывороточного креатинина у инсулинерезистентных мышей db/db с диабетом

#### Материалы и способы

##### Соединение

[00392] Соединение №43 было синтезировано в Химической лаборатории Alltech, Inc. Было установлено, что чистота всех тестируемых соединений составляет ≥99%, как <sup>15</sup> определено по ВЭЖХ.

##### Животные

[00393] Самцы мышей в возрасте 5 недель со спонтанной диабетической мутацией <sup>20</sup> (мутация рецептора лептина) Lep<sup>rdb/rdb</sup> (штамм C57BL/6J) были приобретены в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн) и помещены в виварий без патогенов со свободным доступом к пище и воде. Мыши в возрасте 3 месяцев дикого типа (без диабета) C57 также были приобретены в лаборатории Джексона.

##### Хроническое лечение Соединением №43

[00394] Самцам мышей Lep<sup>rdb/rdb</sup> в возрасте 38 дней внутрибрюшинно (в.б.) ежедневно <sup>25</sup> инъектировали физиологический раствор (0,09% NaCl), содержащий 0,2% ДМСО и Соединения №43 (0,136 мг на килограмм массы тела, разведенные в стерильном физиологическом растворе) в течение 52 дней. Также собирали сыворотки от мышей в возрасте 3 месяцев дикого типа (без диабета) C57. После лечения эти образцы <sup>30</sup> сыворотки были собраны и подвергнуты анализу на уровень инсулина, АЛТ и креатинина.

##### Анализы на уровень сывороточного инсулина, ALT и креатинина

[00395] Уровни сывороточного инсулина, АЛТ и креатинина определяли с использованием набора для определения уровня инсулина мыши ИФА от Themo-Fisher Scientific (номер в каталоге № EMINS), набора для анализа активности АЛТ Sigma <sup>35</sup> (номер в каталоге MAK052) и набора для анализа уровня креатинина Abeam (номер в каталоге Ab65340) в соответствии с протоколами производителя, соответственно.

##### Статистический анализ

[00396] Там, где это применимо, t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости различий между группами, получавшими физиологический раствор и соединение, причем значение Р менее 0,05 считалось значимым. Данные <sup>40</sup> представлены в виде среднего ± СОС указанного количества мышей на фигурах.

##### Результаты и обсуждение

[00397] Как представлено на Фиг. 24A, у мышей Lep<sup>rdb/rdb</sup> обнаружена гиперинсулинемия с уровнями инсулина примерно 2586 мкМЕ/мл (примерно в 100 раз <sup>45</sup> выше, чем у мышей дикого типа, не страдающих диабетом). Однако лечение Соединением №43 привело к значительному снижению уровня инсулина в сыворотке (снижение на примерно 80%), хотя его уровень все еще был выше, чем у мышей дикого типа, не страдающих диабетом (Фиг. 24A). Эти результаты позволяют предположить,

что Соединение №43 обладает потенциалом для лечения гиперинсулинемии у пациентов с диабетом.

[00398] Анализ на уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) обычно используется для выявления повреждения печени. Как представлено на Фиг. 24В, уровни АЛТ в

<sup>5</sup> сыворотке у мышей  $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ , получавших физиологический раствор, были значительно выше, чем у мышей, не страдающих диабетом. Однако лечение Соединением №43 приводило к значительному снижению уровней АЛТ в сыворотке. Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническое лечение Соединением №43 (лечение ежедневно в течение 52 дней) не приводило к токсичности для печени; вместо этого лечение может <sup>10</sup> оказывать защитное действие против повреждения печени.

[00399] Анализ уровня креатинина в крови широко используется для оценки функции почек, а повышенный уровень креатинина указывает на нарушение функции почек или заболевание почек. Как представлено на Фиг. 24С, не было значительного изменения <sup>15</sup> в уровне креатинина в сыворотке у мыши после обработки Соединением №43. Эти результаты свидетельствуют о том, что хроническое лечение Соединением №43 (лечение ежедневно в течение 52 дней), вероятно, не оказывает токсического воздействия на функцию почек.

[00400] Вместе приведенные выше результаты свидетельствуют о потенциальном применении Соединения №43 против гиперинсулинизма у пациентов с диабетом. Кроме <sup>20</sup> того, приведенные выше результаты также указывают на то, что Соединение №43 оказывает незначительное или не оказывает токсического воздействия на функции печени и почек. Вместо этого Соединение №43 может проявлять некоторый защитный эффект против повреждения печени.

#### Вывод (способ действия; Фиг. 25)

[00401] Экспериментальные результаты в этом описании показаны сплошными красными стрелками, в то время как ожидаемые результаты (основанные на опубликованной литературе) показаны пунктирными стрелками. Соединение №43 может имитировать инсулин, но обходить его, чтобы быстро индуцировать <sup>25</sup> фосфорилирование тирозина $\beta$  субъединицы рецептора инсулина на внутренней поверхности клеточной мембранны, что исключает необходимость связывания инсулина и активации рецептора инсулина $\alpha$  на поверхности клетки. Это приводит к активации сигнального каскада PI3K/PDK1/AKT как в печени, так и в скелетных мышцах. Другими словами, нормальная передача сигналов инсулина может быть восстановлена без <sup>30</sup> необходимости присутствия инсулина или активного рецептора инсулина на клеточной поверхности. В клетках печени активация AKT вызывает значительное увеличение фосфорилирования FOXO1, что приводит к значительному снижению экспрессии прямого целевого гена FOXO1 G6PC; и это приводит к ингибированию выработки глюкозы в гепатоцитах субъектов с диабетом. Кроме того, экспрессия FOXO1-непрямого <sup>35</sup> целевого гена GLUT4 и фосфорилирование субстрата-мишени AKT AS160 (TBC1D4), который является ключевым для транслокации GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану, повышаются в клетках печени после обработки Соединением №43, приводя к большему количеству транспортных белков GLUT4 в клеточной мемbrane печени и улучшенному поглощению глюкозы из кровотока. Все это указывает <sup>40</sup> на улучшение толерантности к глюкозе у пациентов с диабетом I и II типа. В клетках скелетных мышц Соединение №43 также может имитировать, но в тоже время обходить, инсулин для активации передачи сигналов INSR $\beta$ /PDK1/AKT, что приводит к фосфорилированию AS160 (TBC1D4). Опять же, это приводит к усиленной транслокации GLUT4 из цитозольных везикул в плазматическую мембрану для облегчения захвата <sup>45</sup>

глюкозы клетками скелетных мышц, что в конечном итоге приводит к значительному снижению уровня глюкозы в крови и значительному улучшению толерантности к глюкозе у пациентов с диабетом I и II типа. Как показано, Соединение №43 может усиливать действие инсулина путем ингибирования экспрессии G6PC в клетках печени.

- 5 Неконтролируемое производство глюкозы печенью является процессом, обусловленным экспрессией G6PC, и является ключевым признаком, и ключевой проблемой при диабете 2 типа. Подавление выработки глюкозы в диабетической печени является ключевым механизмом действия для наиболее широко используемого класса противодиабетических лекарственных средств, бигуанидов, например метформина. Способность Соединения
- 10 №43 блокировать этот процесс делает его потенциально очень ценным при лечении диабета 2 типа. Кроме того, Соединение №43 может восстанавливать функцию рецептора инсулина в скелетных мышцах инсулинорезистентных мышей с диабетом и может усиливать действие инсулина для стимуляции захвата глюкозы в культивируемых клетках скелетных мышц. Вместе эти результаты указывают на большой потенциал
- 15 применения Соединения №43 против диабета I и II типа у людей.

Пример 10: Прямая активация белков рецептора инсулина Соединением №43 в бесклеточной системе

#### Материалы и способы

#### Соединения

- 20 [00402] Соединения №43 и его серосодержащий аналог, Соединение №68, были синтезированы в Химической лаборатории Alltech, Inc. Было установлено, что чистота данных соединений составляет ≥99%, как определено по ВЭЖХ.

In vitro фосфорилирование рецептора инсулина (Insr) и обнаружение активированного Insr (на что указывают фосфорилированные остатки тирозина 1146, 1150 и 1151 бета-субъединицы Insr) с помощью вестерн-блот анализа

- [00403] Фосфорилирование Insr in vitro проводили в соответствии с протоколом Sigma со следующими модификациями. Вкратце, 10 мкл раствора нативного рецептора инсулина, содержащего 0,8 мкл исходного раствора нативного INSR (Sigma, Номер в каталоге 19266; разведенного в буфере для разведения фермента, содержащем 50 мМ HEPES, pH 7,6, 150 мМ NaCl и 0,1% Triton X- 100) инкубировали с равным объемом растворов, содержащих инсулин (Sigma), ДМСО (растворитель Соединения №43), Соединение №43 или Соединение №68 (разведенные в 50 мМ HEPES, pH 7,6 и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина) на льду в течение 30 мин. Затем 20 мкл 2 X киназного буфера, содержащего 0,2 мМ АТФ, 50 мМ HEPES, pH 7,6, 50 мМ MgCl<sub>2</sub> и 4 мМ MnCl<sub>2</sub>, добавляли к вышеуказанным реакциям, смешивали и инкубировали на льду в течение 45 мин.

[00404] Пять микролитров вышеуказанных реакций были немедленно подвергнуты Вестерн-блот анализу с использованием специфических антител к фосфорилированным остаткам тирозина 1146, 1150 и 1151 белков Insrβ (Cell Signaling Inc.). Плотность белковых полос определяли с использованием программного обеспечения NIH Image J.

#### Статистический анализ

[00405] Там, где это применимо, t-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости различий между группами, причем значение Р менее 0,05 считалось значимым.

#### 45 Результаты:

1. Нативный рецептор шли белок инсулина, очищенный из тканей печени крысы, активировался в бесклеточной системе in vitro Соединением №43 и инсулином.

[00406] Исследования в культивируемых клетках печени и дифференцированных

скелетных мышц, а также у мышей с диабетом T2D показали, что Соединение №43 может активировать рецептор инсулина как *in vitro*, так и *in vivo*. Чтобы исследовать, оказывает ли Соединение №43 прямое влияние на активацию Insr, были проведены *in vitro* бесклеточные анализы фосфорилирования нативных белков рецептора инсулина (очищенных из тканей печени крысы). Активированный Insr был обнаружен с использованием специфических антител к фосфорилированным остаткам тирозина 1146, 1150 и 1151 Insr $\beta$ . Как и ожидалось, обработка инсулином способна индуцировать фосфорилирование Insr $\beta$  по Y1146/1150/1151 в данной бесклеточной системе *in vitro* (Фиг. 26). Важно, что Соединение №43 в дозах 1,9 и 3,8 мкМ также способно значительно усиливать фосфорилирование Insr $\beta$  по Y1146/1150/1151 с повышенными уровнями фосфорилирования, непосредственно сопоставимыми с 0,5 мкМ инсулина (Фиг. 26). Эти результаты подтверждают, что Соединение №43 может точно имитировать инсулин для прямой активации рецептора инсулина, предоставляя дополнительные молекулярные доказательства того, что Соединение №43 способно заменить инсулин при лечении диабета, включая диабет I типа.

2. Соединение №68, серосодержащий аналог Соединения №43, гораздо менее эффективно, чем Соединение №43, в активации Insr в бесклеточной системе.

[00407] Исследования на культивируемых клетках печени и мышах Lep $r^{db/db}$  с диабетом 2 типа (T2D) показали, что Соединение №68, серосодержащий аналог Соединения №43, было менее эффективным, чем Соединение №43, в подавлении выработки глюкозы *in vitro* (Фиг. 1) и ослаблении гипергликемии у мышей T2D (Фиг. 4). Чтобы исследовать, существует ли дифференциальный эффект между Соединением №43 и Соединением №68 в активации Insr в бесклеточной системе, равные количества нативных белков рецептора инсулина инкубировали с той же молярной концентрацией (3,8 мкМ) Соединения №43 или Соединения №68, и затем анализировали на фосфорилирование *in vitro*. Как представлено на Фиг. 27, Соединение №43, но не Соединение №68 в испытанной дозе, могло активировать Insr. Эти исследования показывают, что Соединение №68 было менее эффективным при испытанной дозе, чем Соединение №43, в активации Insr, что может объяснить более низкую эффективность Соединения №68 в подавлении выработки глюкозы в печени (Фиг. 1) и ослаблении гипергликемии у мышей T2D (Фиг. 4).

Пример 11: Умеренные уровни глюкозы в крови у мышей с диабетом типа 1 (T1D), индуцированные стрептозотоцином (STZ), после хронического лечения Соединением №43

<sup>35</sup> Материалы и способы  
Соединения

[00408] Стрептозотоцин (STZ) был приобретен у Sigma. Соединение №43 было синтезировано в химической лаборатории Alltech, Inc. Чистота Соединения №43 составляет ≥99%, как определено по ВЭЖХ.

<sup>40</sup> Модель диабета типа 1 (T1D) у мыши и влияние Соединения №43 на уровни глюкозы в крови у данных мышей T1D

[00409] Пятинедельным самцам мышей C57/BL6 внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин (STZ, 55 мг/кг массы тела мыши) ежедневно в течение 5 дней, а затем помещали в виварий еще на 14 дней для выздоровления. Уровни глюкозы в крови этих мышей измеряли с использованием глюкометра. Животные с уровнем глюкозы в крови выше 500 мг/дл считались больными диабетом I типа (T1D). Мышей T1D с уровнями глюкозы в крови в состоянии покоя между 500-550 мг/дл не кормили в течение ночи и внутрибрюшинно вводили Соединение №43 в дозе 5,4 мг/кг массы тела или

физиологический раствор, содержащий 2% ДМСО (исходный растворитель Соединения №43). Через 1, 2 и 3 ч после инъекции уровни глюкозы в крови у этих мышей измеряли с использованием глюкометра.

#### Статистический анализ

[00410] Т-критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости различий между контрольной группой (ДМСО) и группой Соединения №43 в каждый момент времени. Значение Р менее 0,05 обозначает статистически значимые различия между этими двумя группами.

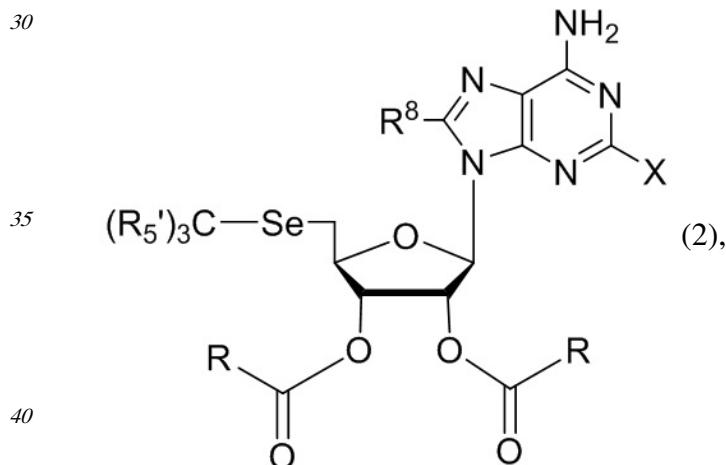
#### Результаты

[00411] Чтобы исследовать потенциал Соединения №43 в лечении гипергликемии у мышей T1D, индуцированных STZ мышей T1D с уровнями глюкозы в крови между 500-550 мг/дл не кормили в течение ночи, внутрибрюшно вводили физиологический раствор, содержащий ДМСО или Соединение №43 (5,4 мг/килограмм массы тела) в течение 1, 2 и 3 ч, и затем измеряли уровень глюкозы в крови. Как представлено на Фиг. 28, в течение 3 ч периода не было очевидных изменений в уровнях глюкозы в крови у контрольных мышей (с инъекцией ДМСО-содержащего физиологического раствора). Однако у T1D мышей наблюдалась тенденция к снижению уровня глюкозы в крови после введения Соединения №43 в течение 1 ч (Фиг. 28). Что еще более важно, значительное снижение уровня глюкозы в крови наблюдалось у мышей T1D после введения Соединения №43 в течение 2 ч и 3 ч (Фиг. 28). Вместе эти результаты подтверждают, что Соединение №43 ослабляет гипергликемию у мышей T1D.

[00412] Хотя некоторые варианты реализации проиллюстрированы в примерах, очевидно, что они могут быть изменены, чтобы обеспечить другие варианты реализации настоящего описания. Следовательно, следует понимать, что объем изобретения должен определяться прилагаемой формулой изобретения, а не конкретными вариантами реализации, которые были представлены в качестве примера.

#### (57) Формула изобретения

##### 1. Соединение формулы (2)



или его фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир,

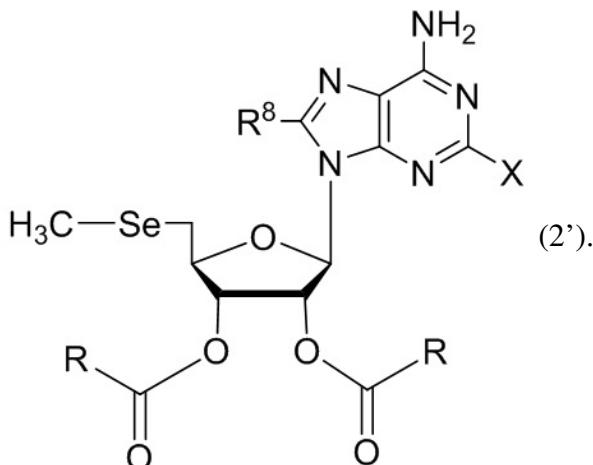
причем R<sup>8</sup> представляет собой H;

X представляет собой H;

каждый R<sub>5'</sub> независимо представляет собой H или галоген; и

каждый R независимо представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, каждый из которых независимо может быть необязательно замещен одно-трехкратно галогеном.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что соединение имеет формулу (2')



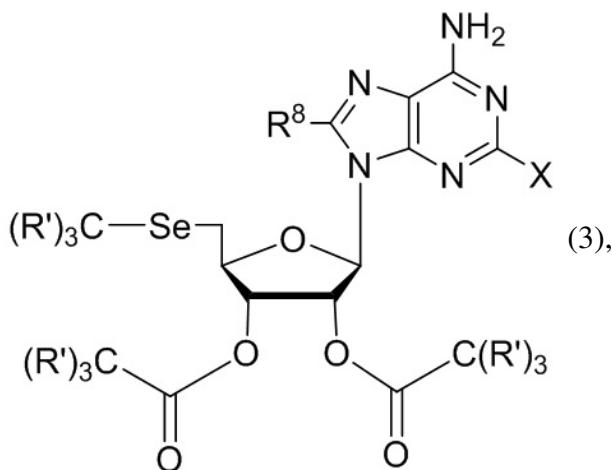
15 3. Соединение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что каждый R независимо представляет собой незамещенный C<sub>1-6</sub>алкил.

4. Соединение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что каждый R независимо представляет собой C<sub>1-3</sub>алкил, каждый из которых независимо может быть необязательно замещен одно-трехкратно галогеном.

20 5. Соединение по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что каждый R независимо представляет собой незамещенный C<sub>1-3</sub>алкил.

6. Соединение по п. 5, отличающееся тем, что каждый R независимо представляет собой -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

25 7. Соединение по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир, отличающееся тем, что соединение имеет формулу (3)

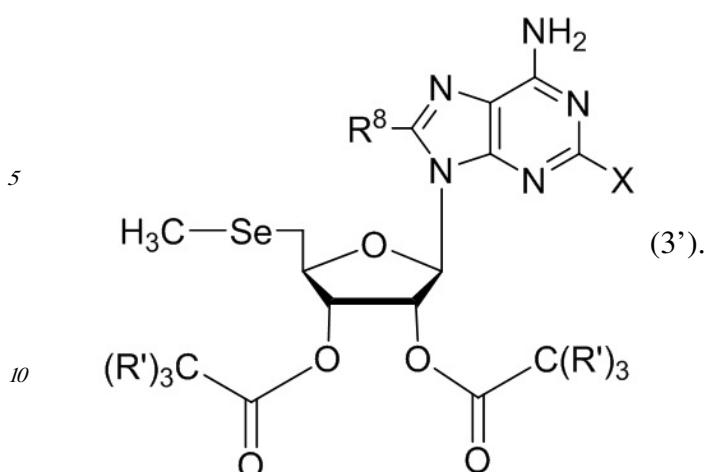


40 причем R<sup>8</sup> представляет собой H;

X представляет собой H; и

каждый R' независимо представляет собой H или галоген.

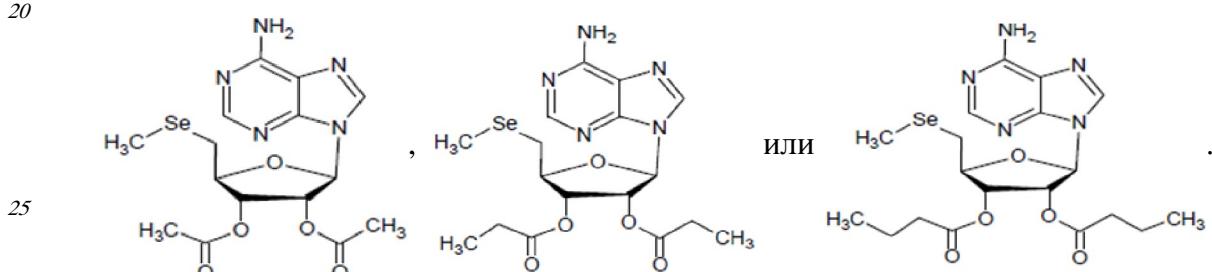
8. Соединение по п. 7, отличающееся тем, что соединение имеет формулу (3')



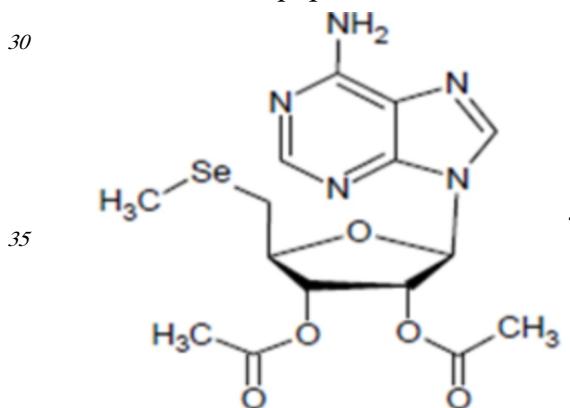
9. Соединение по п. 7 или 8, отличающееся тем, что каждый  $C(R')_3$  независимо представляет собой  $CF_3$ ,  $CHF_2$  или  $CH_2F$  или  $CH_3$ .

10. Соединение по п. 9, отличающееся тем, что каждый  $C(R')_3$  представляет собой  $CH_3$ .

11. Соединение по любому из пп. 1-6 или его фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир, отличающееся тем, что соединение имеет формулу



12. Соединение по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир, отличающееся тем, что соединение имеет формулу



40

13. Фармацевтическая композиция для модуляции метаболизма глюкозы, содержащая эффективное количество соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

45

14. Фармацевтическая композиция по п. 13, отличающаяся тем, что композиция содержит только одно соединение формулы (2) или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир.

15. Способ лечения расстройства, связанного с инсулином, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

16. Способ лечения инсулинерезистентного расстройства, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

17. Способ по п. 15 или 16, отличающийся тем, что расстройство представляет собой

- 5 диабет, ожирение, метаболический синдром, синдромы инсулинерезистентности, синдром Х, резистентность к инсулину, высокое кровяное давление, гипертензию, высокий уровень холестерина в крови, дислипидемию, гиперлипидемию, дислипидемию, атеросклеротическое заболевание, включая инсульт, заболевание коронарной артерии или инфаркт миокарда, гипергликемию, нарушение толерантности к глюкозе, задержку 10 высвобождения инсулина, диабетические осложнения, в том числе ишемическая болезнь сердца, стенокардию, застойную сердечную недостаточность, инсульт, когнитивные функции при деменции, ретинопатию, невропатию, нефропатию, гломерулонефрит, гломерулосклероз, нефротический синдром, гипертонический нефросклероз, рак (например, эндометрия, молочной железы, предстательной железы и толстой кишки), 15 гиперинсулинемию и/или гиперпроинсулинемию, осложнения беременности или плохое репродуктивное здоровье женщины (например, нарушения менструального цикла, бесплодие, нерегулярную овуляцию, синдром поликистозных яичников (PCOS)), липодистрофию, связанное с холестерином расстройство, такое как камни в желчном пузыре, холецистит и желчнокаменная болезнь, подагра, обструктивное апноэ во сне 20 и проблемы с дыханием, остеоартрит, остеопороз или сосудистое расстройство, связанное с диабетом II типа.

18. Способ лечения диабета, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

- 25 19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что диабет представляет собой диабет I типа или диабет II типа.

20. Способ лечения дегенеративного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира, где дегенеративное заболевание 30 выбрано из группы, состоящей из сердечно-сосудистого заболевания и сердечной недостаточности, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и саркопении.

21. Способ ингибиования выработки глюкозы, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

22. Способ снижения уровня HbA1c в сыворотке, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

23. Способ повышения толерантности к глюкозе, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

24. Способ ингибиования экспрессии G6pc, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

25. Способ усиления фосфорилирования Pdk1, Akt, AS160 и Foxo1 в печени и/или в скелетных мышцах, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

26. Способ увеличения экспрессии Glut4, включающий введение терапевтически

эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

27. Способ активации и/или восстановления передачи сигналов инсулина у субъекта в резистентном к инсулину состоянии, включающий введение терапевтически

5 эффективного количества соединения по любому из пп.1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что субъект характеризуется значительными уровнями циркулирующего инсулина.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что инсулинерезистентное состояние

10 характеризуется снижением уровня правильно или подходящее фосфорилированного рецептора инсулина у субъекта.

30. Способ по п. 27, отличающийся тем, что субъект имеет диабет и/или связанное с диабетом заболевание, расстройство или состояние.

31. Способ усиления захвата глюкозы клетками у субъекта, включающий введение

15 терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки скелетных мышц и клетки печени.

33. Способ усиления транслокации белков-переносчиков глюкозы (GLUT) из

20 цитозольных везикул в цитоплазматическую мембрану для захвата глюкозы, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира.

34. Способ по любому из пп. 15-33, отличающийся тем, что стадия введения включает введение композиции, которая содержит и/или доставляет соединение, в соответствии 25 со схемой, которая обеспечивает введение терапевтически эффективного количества.

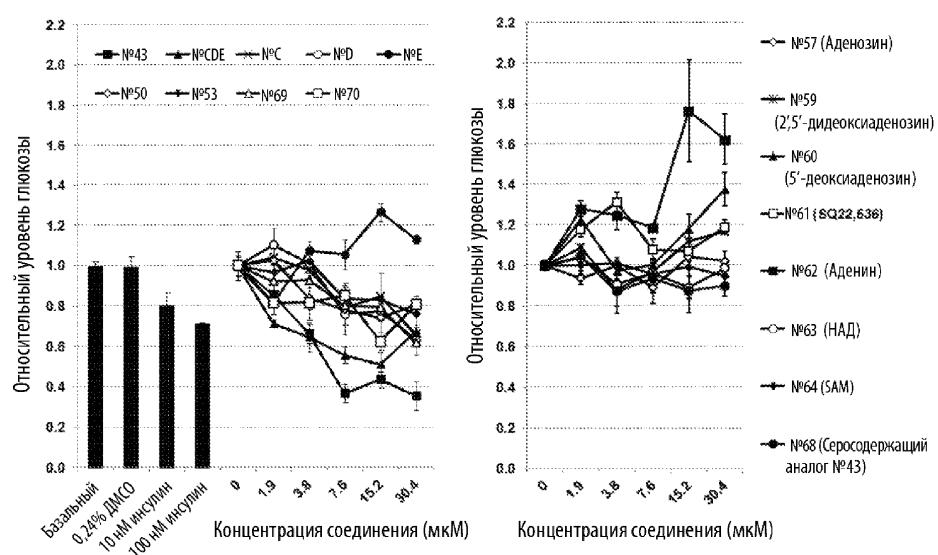
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую активный фармацевтический ингредиент и один или более носителей, или вспомогательных веществ, причем активный фармацевтический ингредиент содержит или состоит из соединения формулы (2).

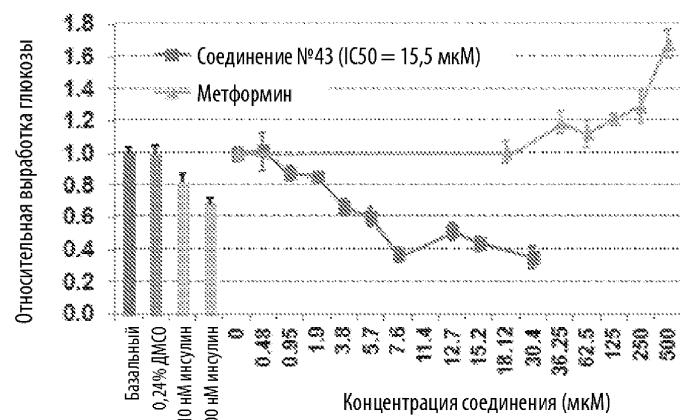
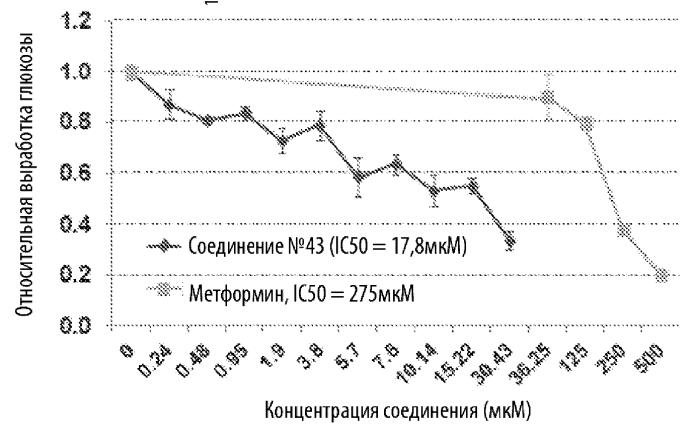
30 36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что активный фармацевтический ингредиент состоит из указанного соединения.

35

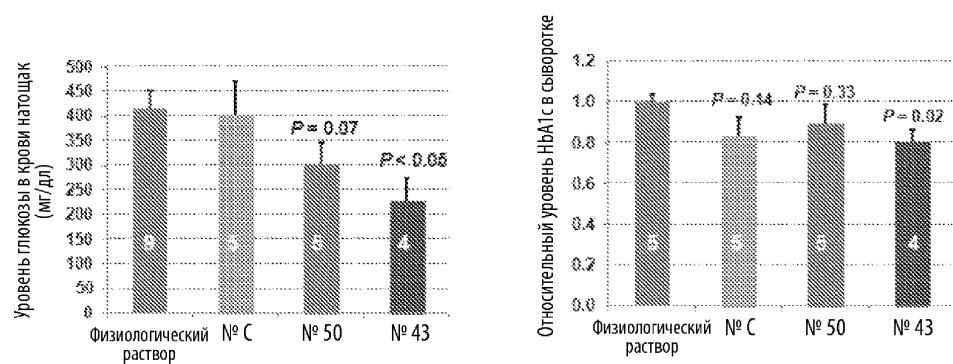
40

45



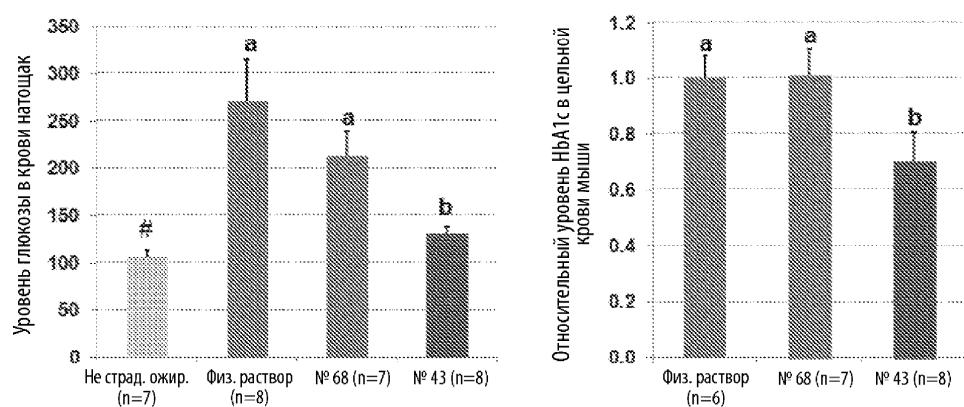
**Клетки HepG2****Клетки Н4IIЕ крысы****Фиг. 2**

3/31



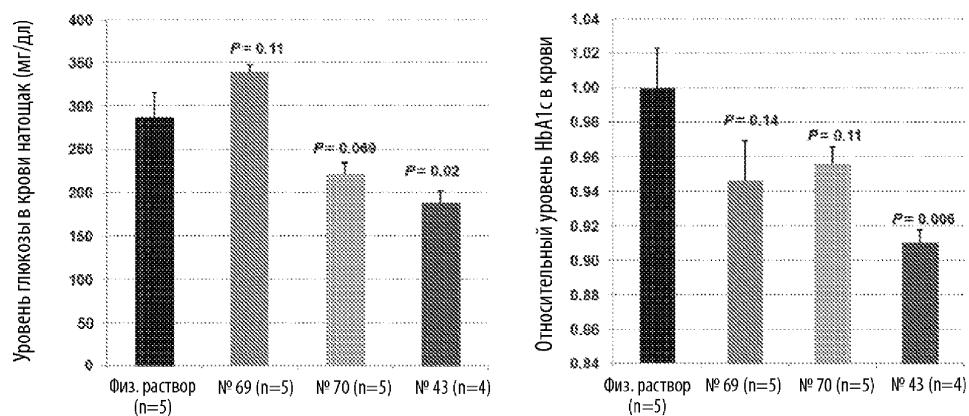
Фиг. 3

4/31



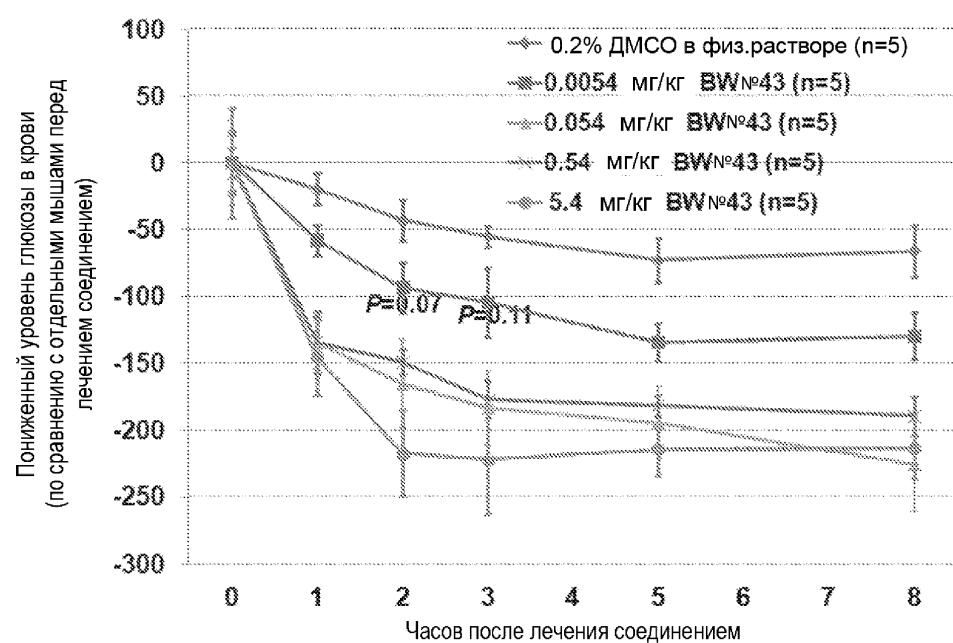
ФИГ. 4

5/31



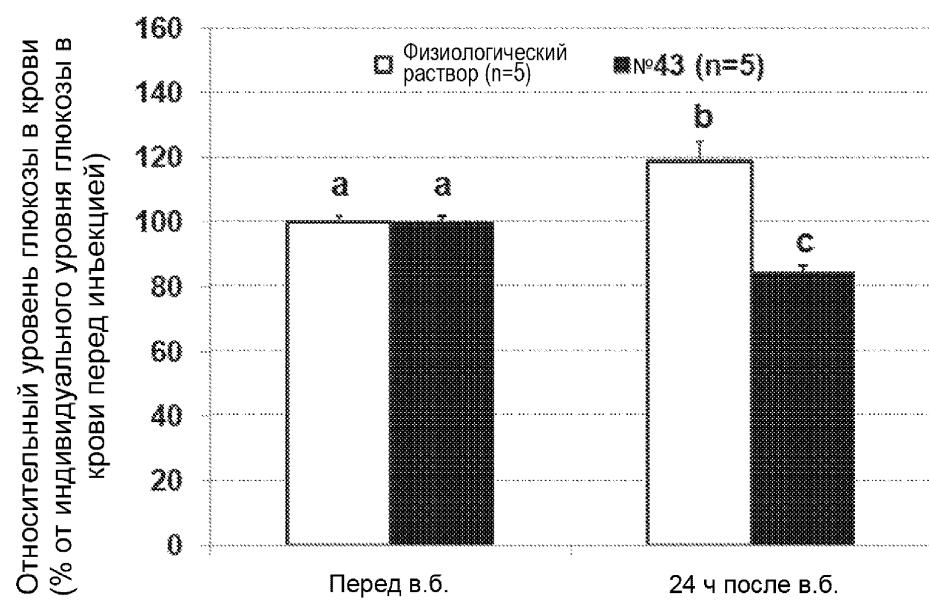
ФИГ. 5

6/31



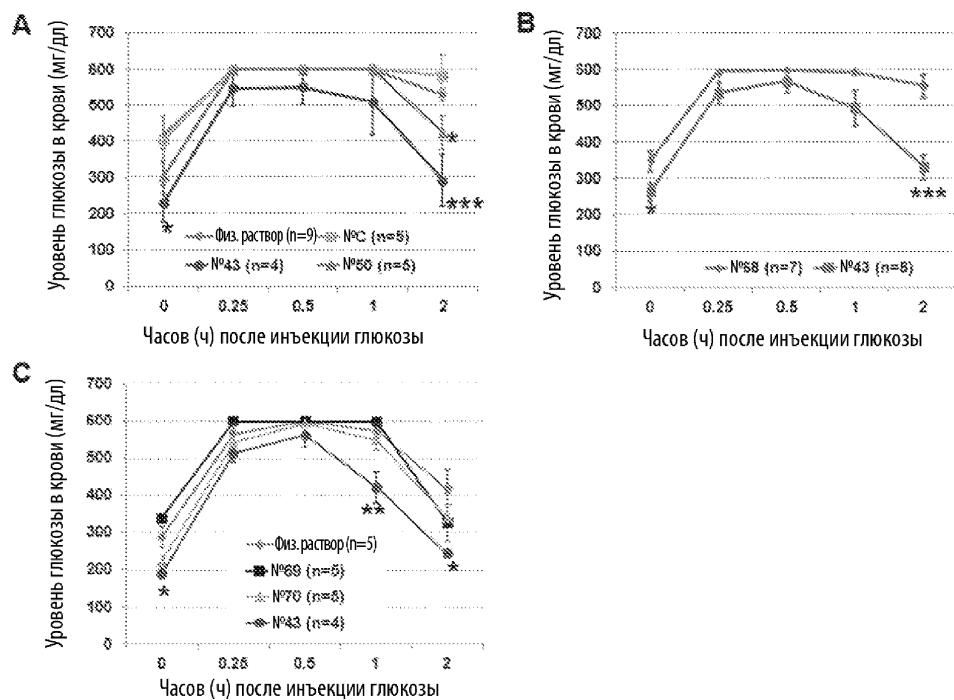
Фиг. 6

7/31



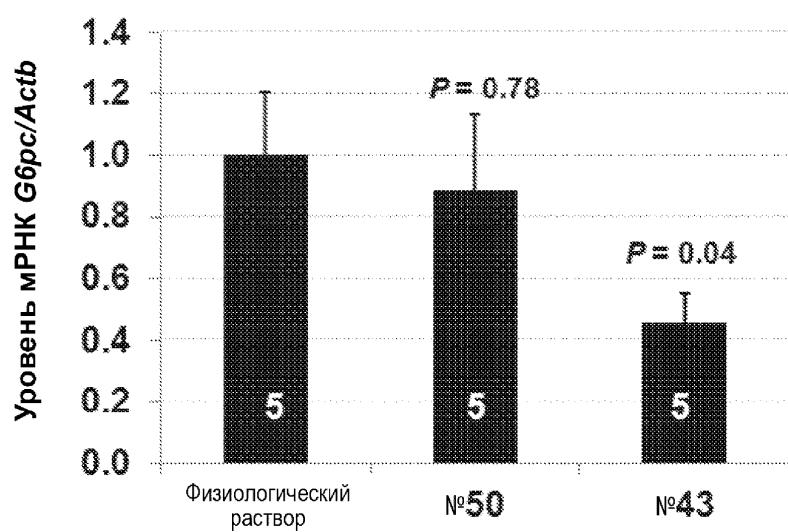
Фиг. 7

8/31



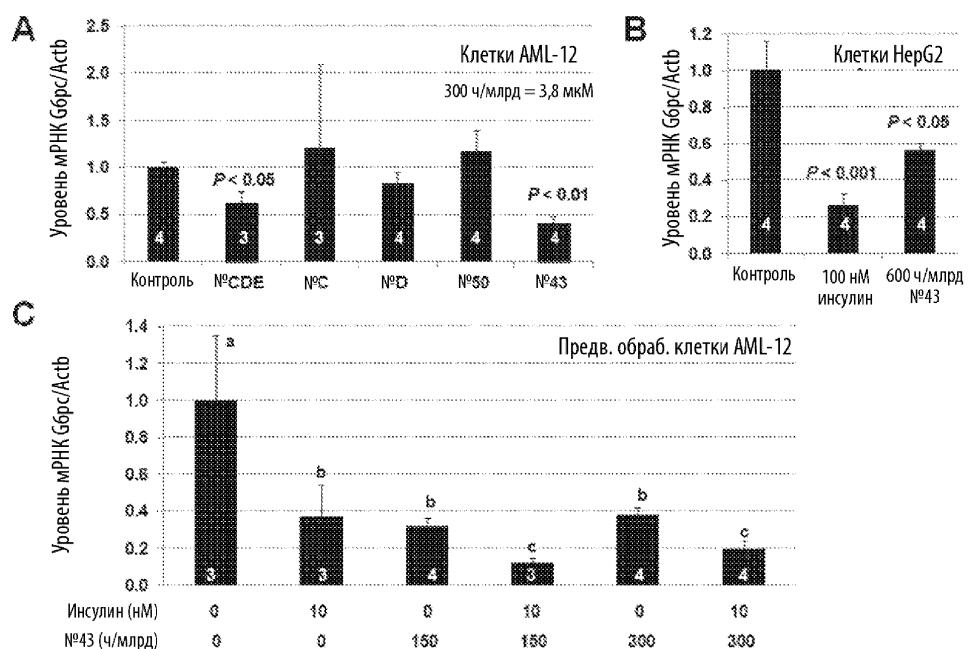
Фиг. 8

9/31



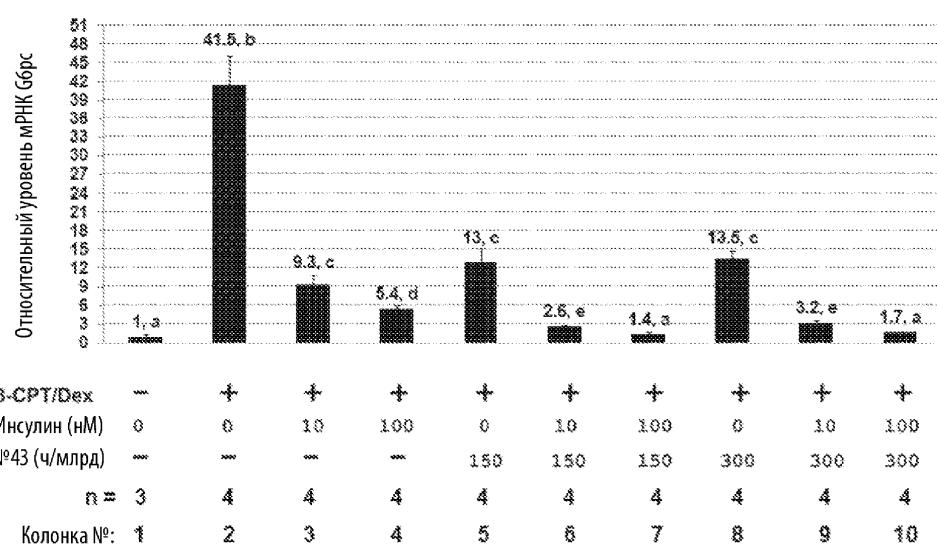
Фиг. 9

10/31



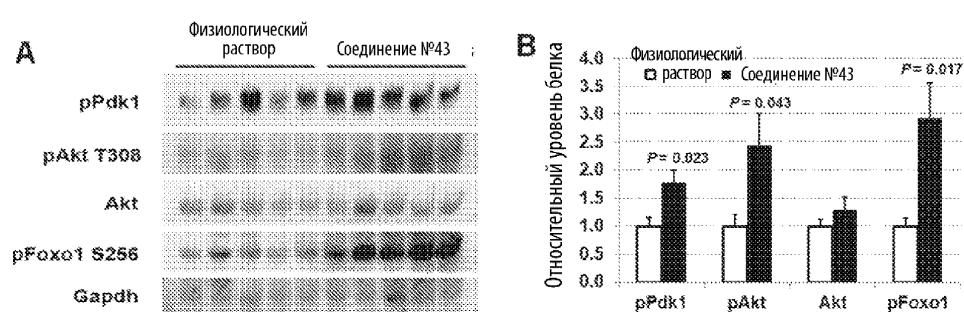
Фиг. 10

11/31



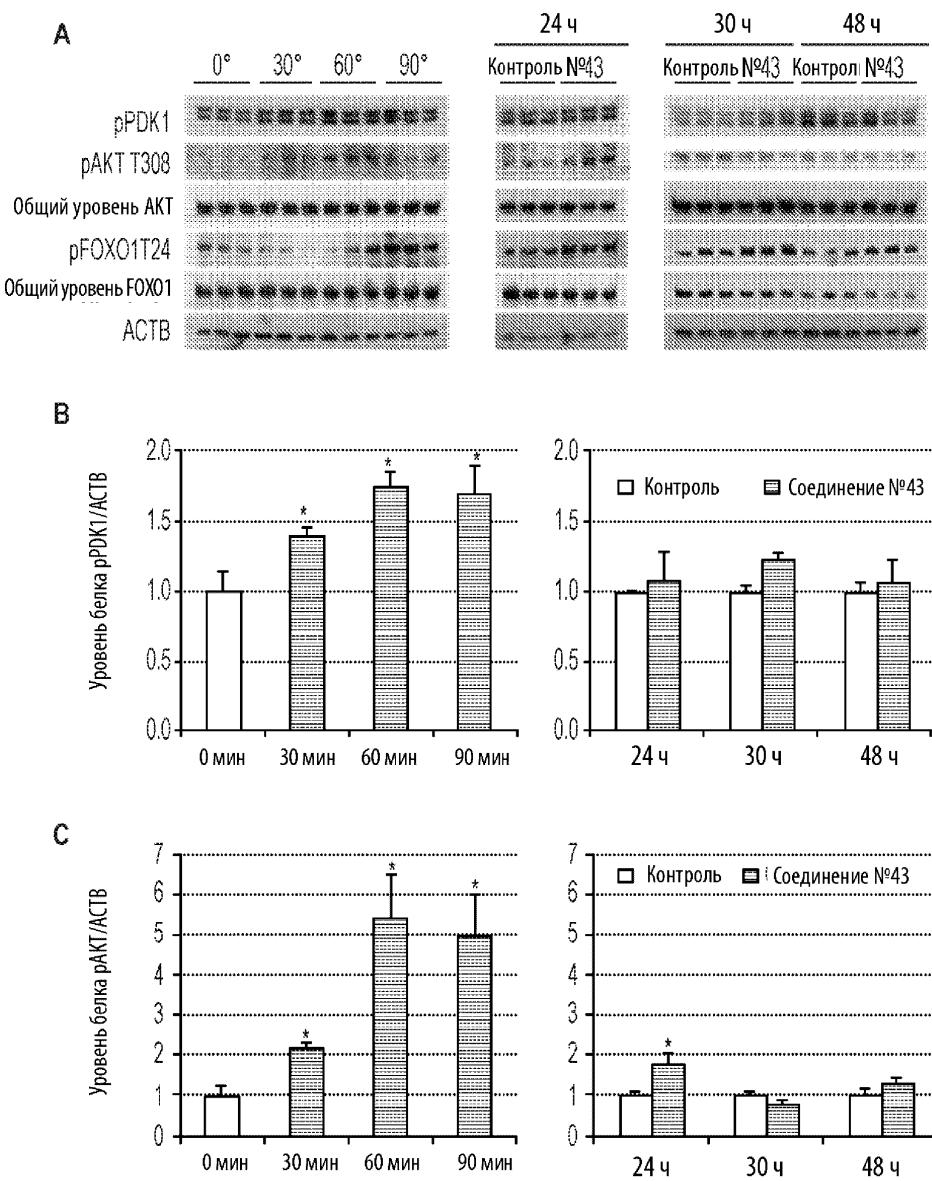
Фиг. 11

12/31



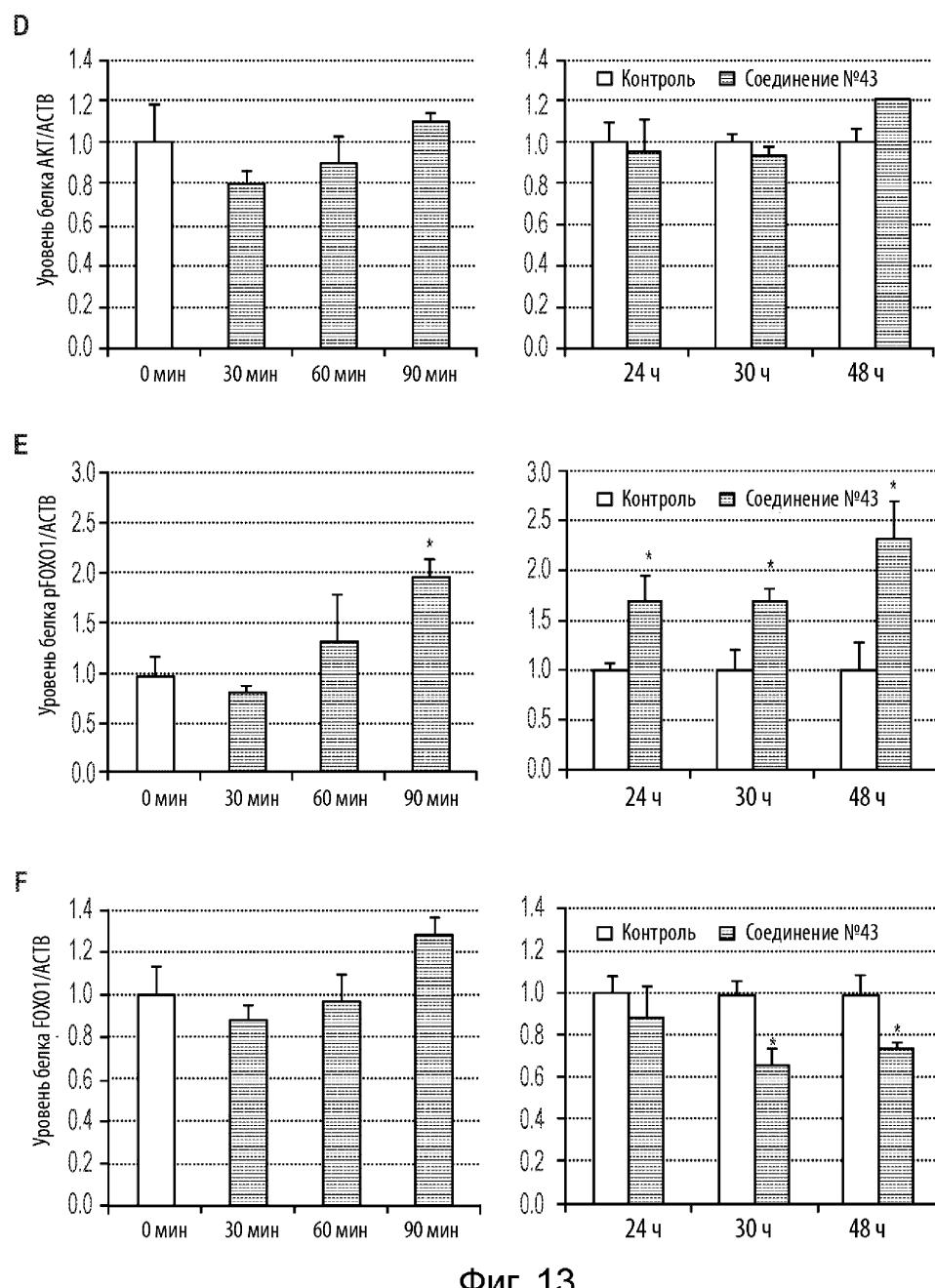
Фиг. 12

13/31



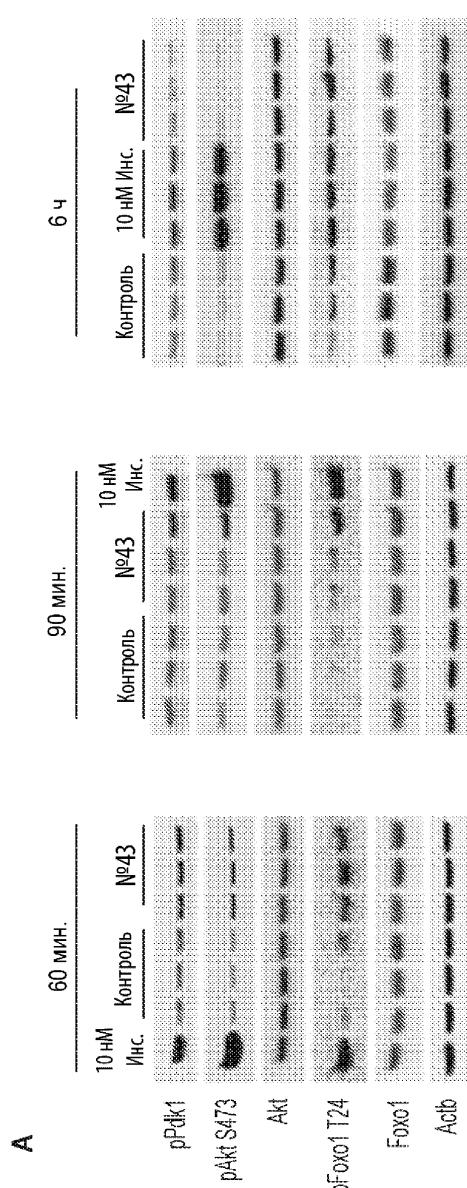
Фиг. 13

14/31



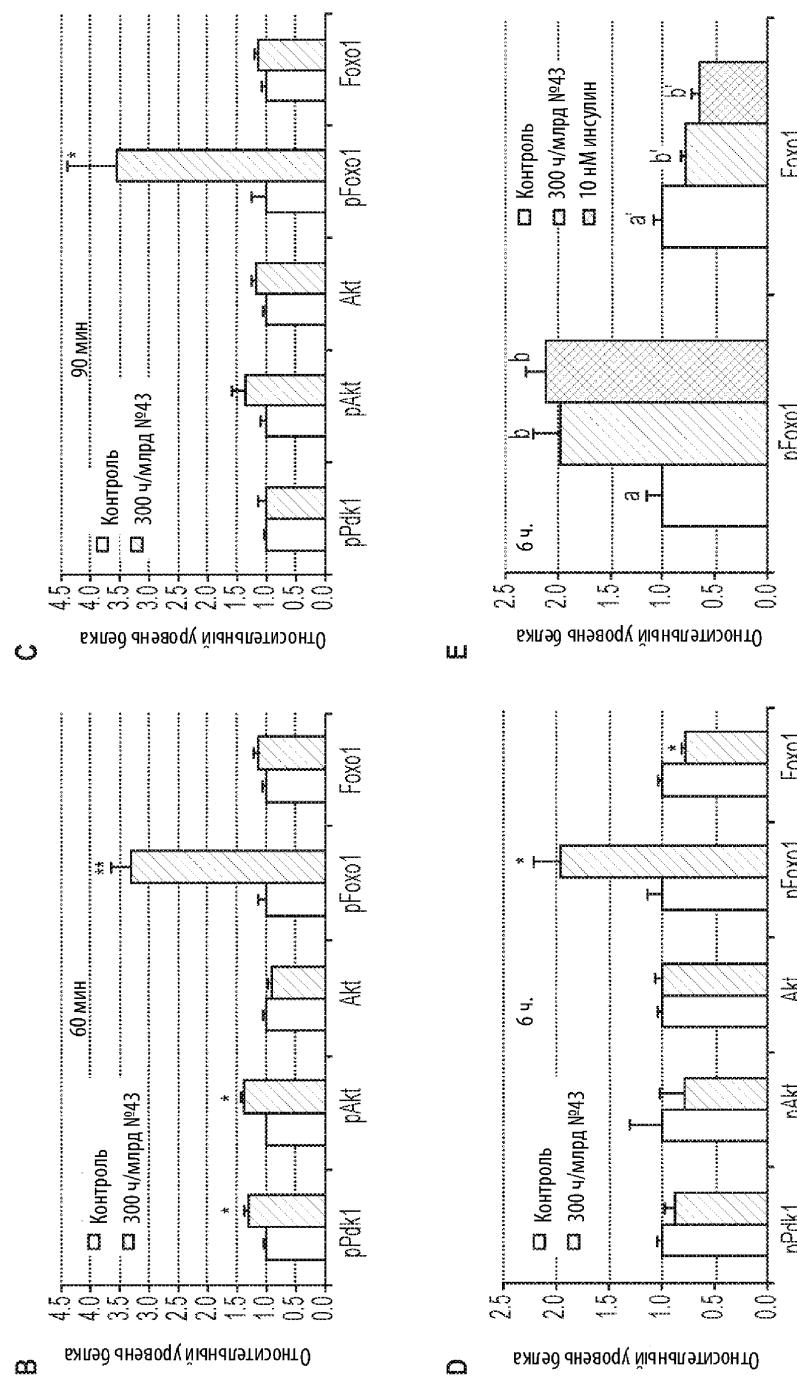
Фиг. 13  
(продолжение)

15/31



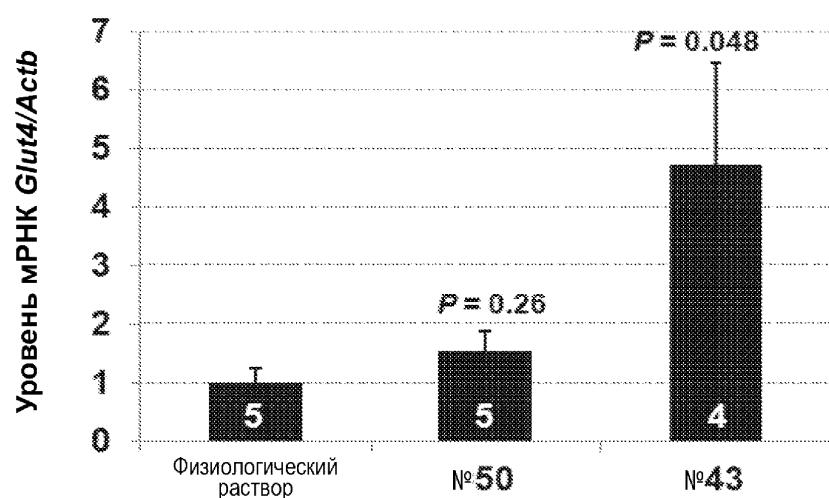
ФИГ. 14

16/31



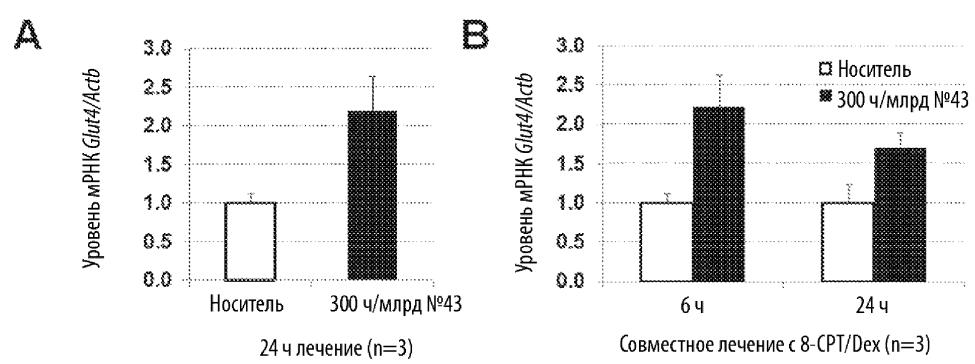
Фиг. 14  
продолжение

17/31



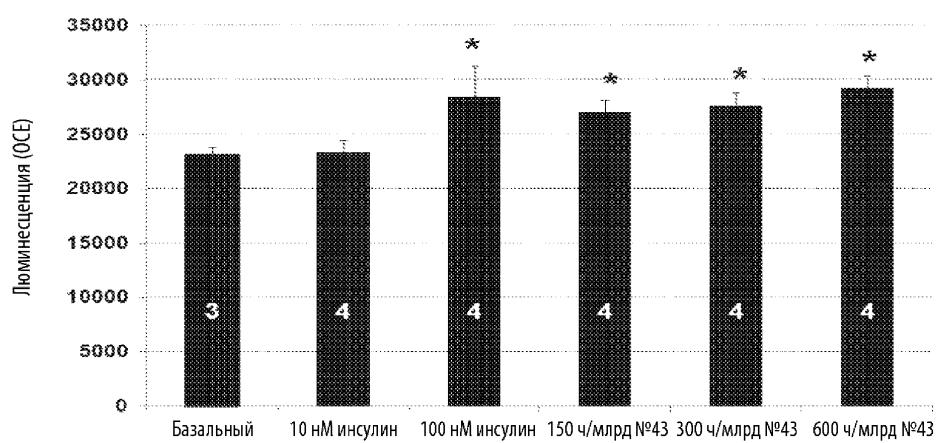
Фиг. 15

18/31



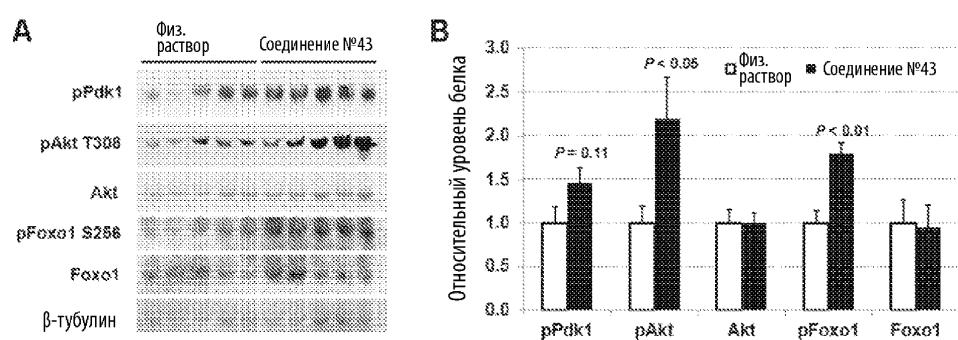
Фиг. 16

19/31



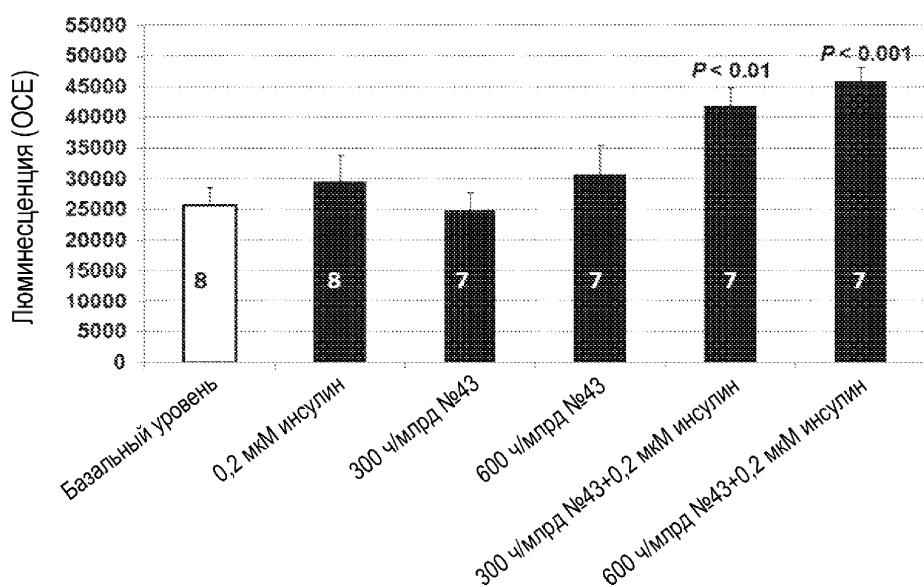
Фиг. 17

20/31



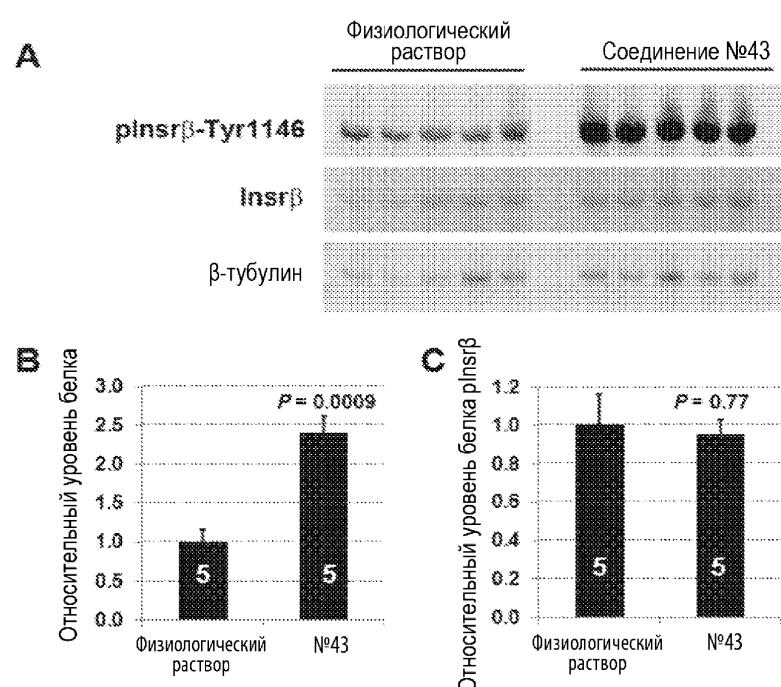
Фиг. 18

21/31



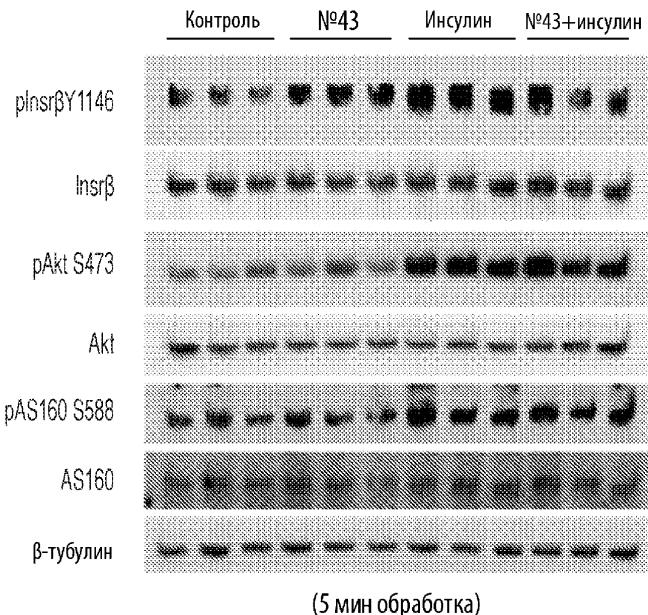
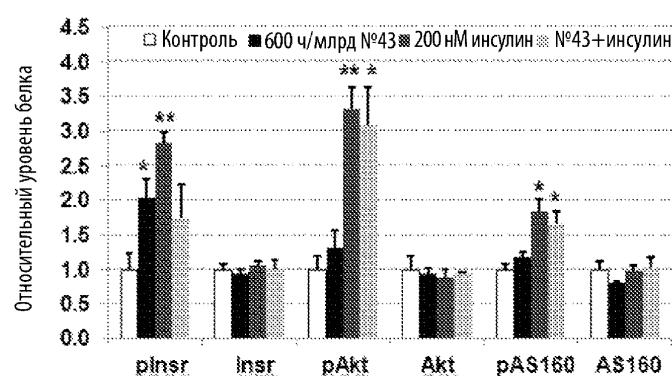
Фиг. 19

22/31



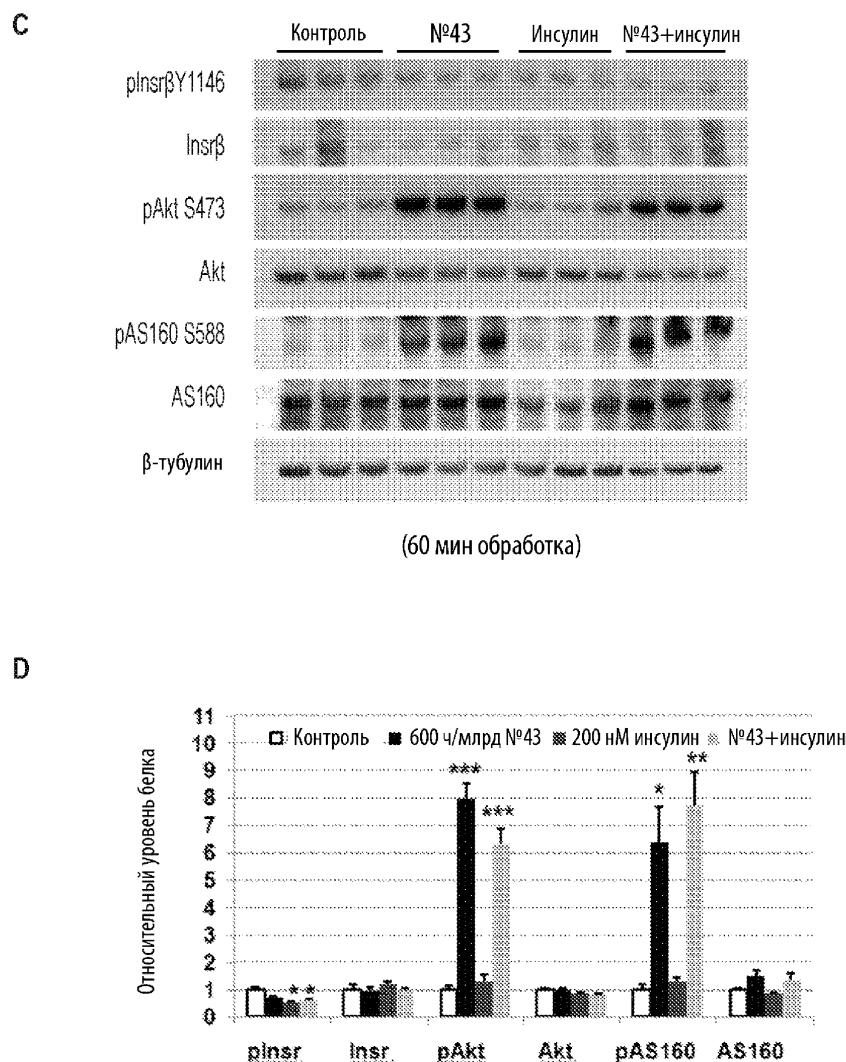
Фиг. 20

23/31

**A****B**

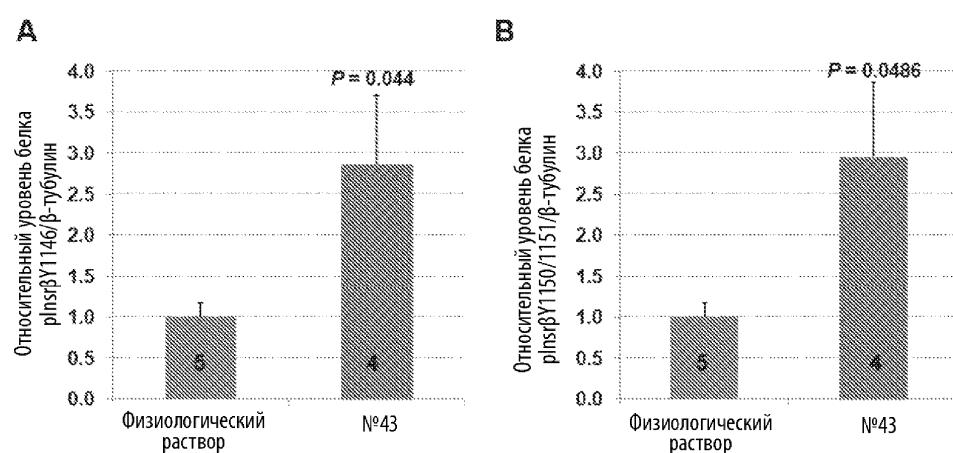
Фиг. 21

24/31



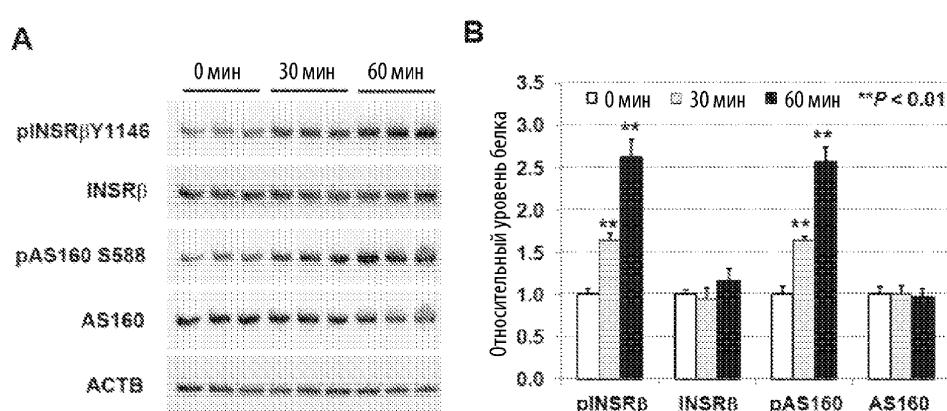
Фиг. 21  
продолжение

25/31



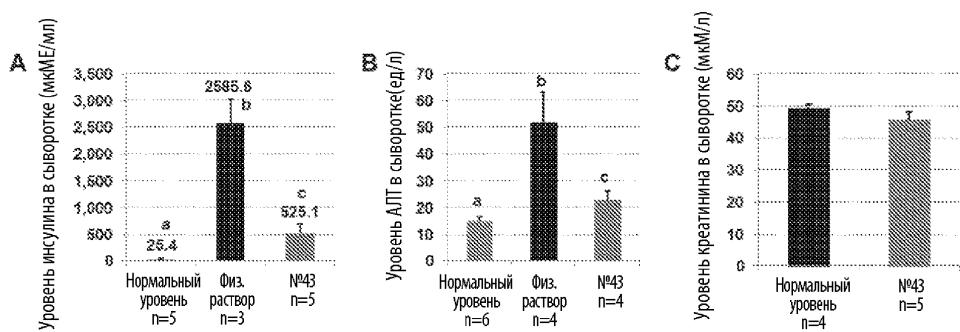
Фиг. 22

26/31



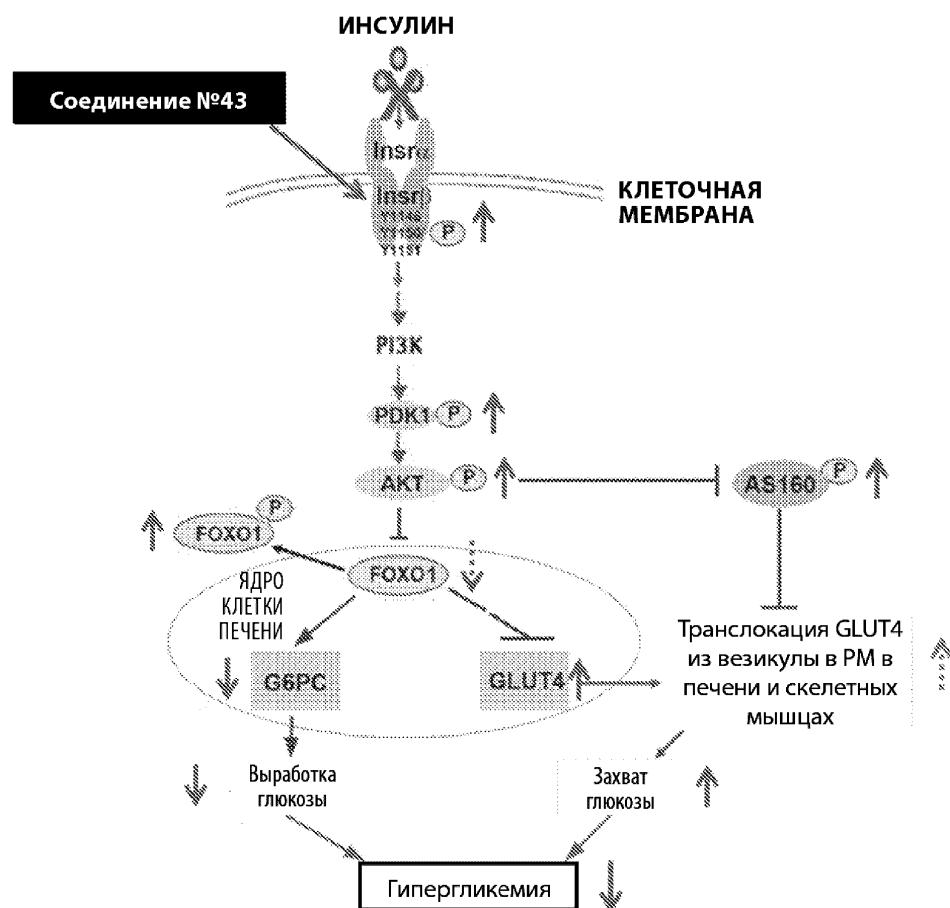
Фиг. 23

27/31



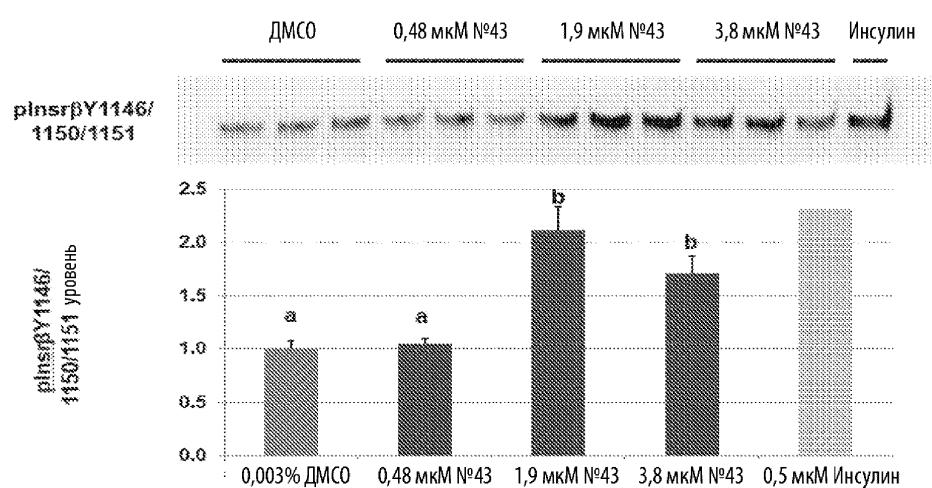
Фиг. 24

28/31



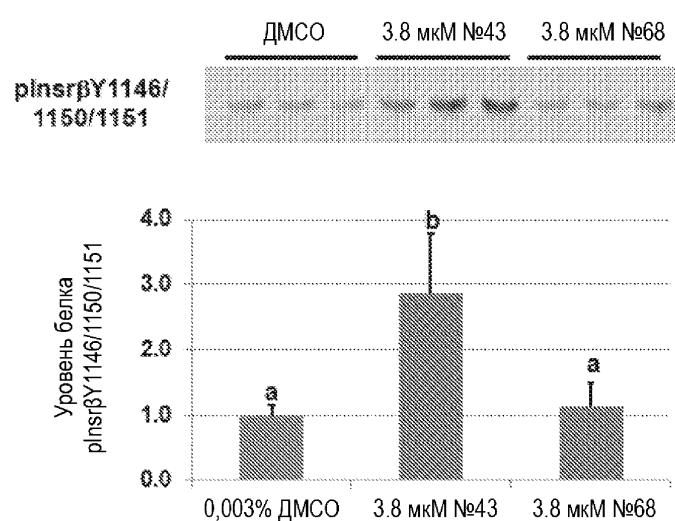
Фиг. 25

29/31



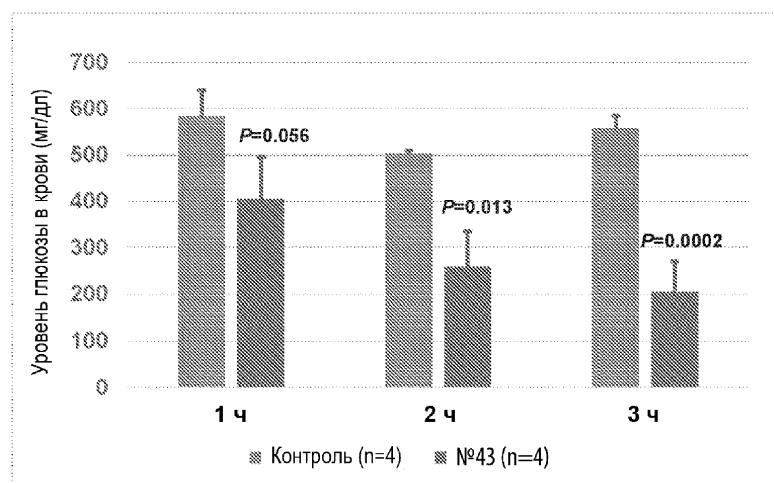
Фиг. 26

30/31



Фиг. 27

31/31



Фиг. 28