

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201791143** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2017.11.30

(22) Дата подачи заявки  
2013.11.06

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 38/26* (2006.01)  
*C07K 14/605* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)

**(54) ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ БЕЛКОВОГО КОНЬЮГАТА, СОДЕРЖАЩЕГО  
ОКСИНТОМОДУЛИН И ФРАГМЕНТ ИММУНОГЛОБУЛИНА**

(31) 10-2012-0124725

(32) 2012.11.06

(33) KR

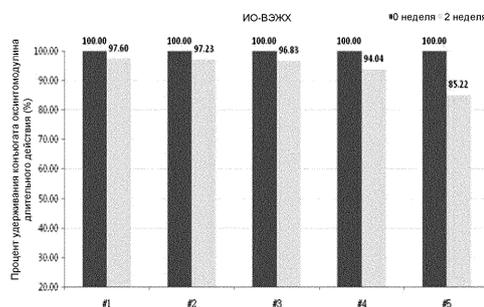
(62) 201590758; 2013.11.06

(71) Заявитель:  
**ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)**

(72) Изобретатель:  
**Ким Хьюн Ок, Лим Хьюнг Кю, Джан  
Мюн Хюн, Ким Сан Юн, Бэ Сан Мин,  
Квон Се Чан (KR)**

(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к жидкой композиции, не содержащей альбумин, содержащей конъюгат оксинтомодулина длительного действия, в котором пептид оксинтомодулин, включая производное, вариант, предшественник или фрагмент оксинтомодулина, связан с областью Fc иммуноглобулина, что может увеличивать продолжительность физиологической активности конъюгата оксинтомодулина длительного действия и сохранять его стабильность in vivo течение длительного периода времени по сравнению с нативным оксинтомодулином, а также к способу получения этой жидкой композиции. Эта жидкая композиция содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество и не содержит сывороточный альбумин человека и факторы, являющиеся потенциально вредными для организма человека, и, следовательно, нечувствительна к вирусной инфекции. Кроме того, конъюгат оксинтомодулина по изобретению содержит оксинтомодулин, связанный с областью Fc иммуноглобулина, и, следовательно, обладает большой молекулярной массой, длительной физиологической активностью и превосходной стабильностью при хранении по сравнению с нативным оксинтомодулином.



**A1**

**201791143**

**201791143**

**A1**

# **ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ БЕЛКОВОГО КОНЪЮГАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ОКСИНТОМОДУЛИН И ФРАГМЕНТ ИММУНОГЛОБУЛИНА**

## **Техническая область изобретения**

Настоящее изобретение относится к жидкой композиции, не содержащей альбумин, содержащей конъюгат оксинтомодулина длительного действия, в котором оксинтомодулиновый пептид, включая производное, вариант, предшественник или фрагмент оксинтомодулина, связан с областью Fc иммуноглобулина, которая может увеличивать продолжительность физиологической активности конъюгата оксинтомодулина длительного действия и сохранять его *in vivo* стабильность в течение длительного периода времени по сравнению с нативным оксинтомодулином. Настоящее изобретение также относится к способу получения данной жидкой композиции.

## **Предшествующий уровень техники**

Ожирение определяют как состояние аномального или избыточного накопления жира, которое может ухудшать состояние здоровья, и оно является результатом нарушения энергетического баланса, при котором потребление энергии превышает затраты энергии. В прошлом ожирение не представляло серьезную проблему для здоровья, но с экономическим ростом популяция людей с ожирением растет при растущем экономическом благополучии, и число различных заболеваний, связанных с ожирением, также растет. Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 1,5 млрд. взрослых людей во всем мире имеет избыточную массу тела, более 500 млн. из них страдает ожирением, и между 1980 и 2008 г. популяция людей с ожирением увеличилась приблизительно вдвое (World Health Organization, Fact sheet on obesity and overweight, 2011). В настоящее время процент людей, страдающих ожирением, растет не только в странах с высоким уровнем дохода, но также в странах с низким уровнем дохода. Избыточная масса тела и ожирение ответственны за повышение кровяного давления и уровней холестерина, а также являются причиной или вызывают ухудшение различных заболеваний. Кроме того, проблема ожирения является более серьезной у детей или подростков, повышает заболеваемость диабетом, сердечными заболеваниями, гипертензией или гиперлипидемией, и может также привести к смерти или инвалидности.

Как описано выше, ожирение является глобальным заболеванием и

социальной проблемой, но в прошлом считали, что с ожирением можно бороться за счет индивидуальных усилий, и, следовательно, лечению ожирения не уделяли особого внимания. Однако ожирение непросто лечить, поскольку оно представляет собой комплексное заболевание, обусловленное механизмами контроля аппетита и энергетического метаболизма. Соответственно, для лечения ожирения необходимы не только собственные усилия пациента, но также методика, способная лечить аномальные механизмы, связанные с контролем аппетита и энергетическим метаболизмом. Поэтому приложены усилия к разработке лекарственных средств для лечения ожирения.

В результате таких усилий были разработаны лекарственные средства, включающие римонабант (Sanofi-Aventis), сибутрамин (Abbott), Contrave (Takeda), орлистат (Roche) и тому подобное, но эти лекарственные средства имеют ограничения в том, что они оказывают побочные действия на плод или обладают недостаточными эффектами при лечении ожирения. Сообщали, что римонабант (Sanofi-Aventis) вызывал расстройства центральной нервной системы, сибутрамин (Abbott) и Contrave (Takeda) демонстрировали сердечно-сосудистые побочные эффекты, а орлистат (Roche) демонстрировал эффект снижения массы тела только приблизительно на 4 кг при введении в течение 1 года. Таким образом, в настоящее время не имеется или имеется немного терапевтических средств против ожирения, которые можно безопасно назначать пациентам с ожирением.

В последнее время значительное внимание привлекли производные глюкагона. Глюкагон продуцируется поджелудочной железой, когда уровни глюкозы в крови начинают падать за счет приема лекарственных средств, заболеваний, гормональных или дефицита ферментов или тому подобного. Функция глюкагона состоит в стимуляции расщепления клетками печени запасенного гликогена до глюкозы, которая затем высвобождается в кровь, чтобы повысить уровень глюкозы в крови до нормального уровня. Сообщали, что в дополнение к действию, заключающемуся в повышении уровня глюкозы в крови, глюкагон подавляет аппетит и активирует гормон-чувствительную липазу (HSL; от англ. "hormone-sensitive lipase") адипоцитов, что способствует липолизу, за счет чего он проявляет эффекты против ожирения. Среди производных глюкагона глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1; от англ.

“glucagon-like peptide-1”) находится в разработке в качестве терапевтического средства для снижения гипергликемии у пациентов с диабетом, и его функция состоит в стимуляции синтеза и секреции инсулина, ингибировании секреции глюкагона, подавлении опорожнения желудка, повышении утилизации глюкозы и ингибировании потребления пищи. Известно, что эксендин-4, выделенный из яда ящерицы, обладает приблизительно 50% аминокислотной гомологией с GLP-1 и активирует рецептор GLP-1, снижая гипергликемию у пациентов с диабетом. Тем не менее, сообщали, что терапевтические лекарственные средства против ожирения, включая GLP-1, вызывают побочные эффекты, такие как рвота и тошнота.

Следовательно, в качестве альтернативы GLP-1 внимание привлек оксинтомодулин, способный к связыванию с обоими рецепторами для двух пептидов (GLP-1 и глюкагона). Оксинтомодулин представляет собой пептид, полученный из предшественника глюкагона пре-глюкагона, и является эффективным средством против ожирения, поскольку он ингибирует потребление пищи подобно GLP-1, стимулирует насыщение и проявляет липолитическую активность подобно глюкагону.

На основании этой двойной функции пептида оксинтомодулина активно проводятся исследования по разработке лекарственных средств для лечения ожирения. Например, в патенте Кореи с регистрационным № 925017, раскрыта пероральная, парентеральная, мукозальная, ректальная, подкожная или трансдермальная фармацевтическая композиция для лечения ожирения у человека, содержащая оксинтомодулин в качестве активного ингредиента. Однако, сообщали, что терапевтические средства против ожирения, содержащие оксинтомодулин, обладают коротким периодом полувыведения *in vivo* и демонстрируют низкую эффективность при лечении ожирения даже при их введении в высокой дозе три раза в сутки. Поэтому были сделаны усилия по увеличению периода полувыведения *in vivo* или эффективности лечения ожирения оксинтомодулином путем модификации оксинтомодулина.

Например, двойной агонист оксинтомодулин (Merck) был получен путем замены L-серина D-серином в аминокислоте 2 оксинтомодулина с повышением устойчивости к дипептидилпептидазе-IV (DPP-IV) и путем присоединения холестериновой группировки к C-концу с увеличением периода полувыведения из крови. ZP2929 (Zealand) был получен путем замены L-серина D-серином в

аминокислоте 2 оксинтомодулина с повышением устойчивости к DPP-IV, замены аргинина аланином в аминокислоте 17 с повышением устойчивости к протеазе, замены метионина лизином в аминокислоте 27 с повышением устойчивости к окислению и замены глутаминов в аминокислотах 20 и 24 и аспарагина в аминокислоте 28 аспарагиновой кислотой, аланином и серином, соответственно, с повышением устойчивости к деамидированию. Двойной агонист оксинтомодулин (Merck) обладает увеличенным периодом полувыведения *in vivo* 1,7 часов, который является более длительным, чем период полувыведения (8-12 минут) нативного оксинтомодулина, но все же обладает очень коротким периодом полувыведения *in vivo*, и его вводят в очень высокой дозе, составляющей несколько мг/кг. Таким образом, оксинтомодулин и его производные обладают двумя большими недостатками, то есть коротким периодом полувыведения и низкими лекарственными эффектами. Вследствие этих недостатков их необходимо вводить ежесуточно в высоких дозах. Для преодоления данных недостатков был исследован способ увеличения периода полувыведения оксинтомодулина в крови при сохранении его активности *in vivo*, и в результате было разработано производное оксинтомодулина. Кроме того, используя данную технологию, путем конъюгации носителя с производным оксинтомодулина был получен непептидильный полимер, и было обнаружено, что этот белковый конъюгат может демонстрировать лучшую эффективность против ожирения в результате увеличения его периода полувыведения в крови при сохранении активности *in vivo* (заявка на патент Кореи № 10-2012-0064110).

Как правило, белки и пептиды обладают очень коротким периодом полувыведения и претерпевают денатурацию, такую как осаждение в результате агрегации мономеров, и адсорбцию на поверхностях сосудов под действием различных факторов, таких как неблагоприятные температуры, поверхность раздела между воздушной и водной фазой, высокое давление, физическая/механическая нагрузка, органические растворители и заражение микроорганизмами. Эта денатурация является необратимой, и, следовательно, денатурированные белки и пептиды утрачивают собственные физико-химические свойства и физиологически активные действия. Кроме того, белки и пептиды нестабильны и чувствительны к внешним факторам, таким как температура, влажность, кислород, ультрафиолетовые (УФ) лучи и тому подобное, претерпевая физические или химические изменения, включающие

ассоциацию, полимеризацию и окисление, приводящие в результате к значительной потере активности (патент Кореи, регистрационный № 10-0389726).

Кроме того, адсорбированные белки и пептиды легко агрегируют за счет процесса денатурации, и денатурированные белки и пептиды при введении в организм человека действуют как причина образования антител в организме человека, и в связи с этим белки и пептиды следует вводить в достаточно стабильной форме. Соответственно, исследованы различные способы предотвращения денатурации белков и пептидов в растворе (John Geigert, J. Parenteral Sci. Tech., 43, No5, 220-224, 1989; David Wong, Pharm. Tech. October, 34-48, 1997; Wei Wang., Int. J. Pharm., 185, 129-188, 1999; Willem Norde, Adv. Colloid Interface Sci., 25, 267-340, 1986; Michelle et al., Int. J. Pharm. 120, 179-188, 1995).

Чтобы достичь цели стабильности, к некоторым белковым и пептидным лекарственным средствам применяют лиофилизацию. Однако, лиофилизированные композиции неудобны тем, что для применения они должны быть растворены в воде для инъекций. Кроме того, в случае лиофилизации требуются огромные инвестиции в сублимационные сушилки большой мощности или тому подобное, поскольку процесс лиофилизации включен в процессы изготовления. Кроме того, также применяют способ получения порошкообразных белков и пептидов с использованием распылительной сушилки, но в данном случае экономическая эффективность снижается вследствие низкого выхода, и воздействие высоких температур может неблагоприятно влиять на стабильность белков.

С целью преодоления таких ограничений проведены исследования, при которых к белкам и пептидам в растворе добавляли стабилизаторы, чтобы подавлять физико-химические изменения белков и пептидов, сохраняя при этом их эффективность *in vivo* даже при длительном хранении. Сывороточный альбумин человека представляет собой вид белка, широко применяемый в качестве стабилизатора для различных белковых лекарственных средств, и его эффективность доказана (Edward Tarelli et al., Biologicals (1998) 26, 331-346).

Способ очистки сывороточного альбумина человека включает инактивацию биологических загрязнителей, таких как микопlasма, прион, бактерии и вирус, и скрининг или изучение одного или более биологических

загрязнителей или патогенов. Однако, всегда существует риск, что пациенты подвергнутся воздействию биологических загрязнителей, которые удалены или инактивированы не полностью. Например, способ скрининга включает исследование, содержит ли донорская кровь человека определенный вирус, но данный способ не всегда надежен. В частности, определенный вирус, существующий у очень малого числа доноров, невозможно обнаружить.

Различные белки могут быть постепенно инактивированы с различными скоростями при различных условиях при хранении за счет их химических различий. То есть, продление срока хранения за счет стабилизатора не идентично для различных белков. В связи с этим подходящая доля, концентрация и вид стабилизатора, применяемого для обеспечения стабильности при хранении, варьирует в зависимости от физико-химических свойств целевого белка. При применении стабилизаторов в комбинации они могут вызывать побочные эффекты, отличающиеся от желаемых эффектов, вследствие конкуренции и взаимодействия между ними. Кроме того, поскольку природа или концентрация белков может изменяться в процессе хранения, применяемые стабилизаторы могут проявлять эффекты, отличающиеся от их предназначенных эффектов. Таким образом, для стабилизации белков в растворе требуются огромные усилия и предосторожности.

В частности, конъюгат оксинтомодулина и Fc иммуноглобулина представляет собой конъюгат, в котором оксинтомодулин, представляющий собой физиологически активный пептид, связан с областью Fc иммуноглобулина. Следовательно, поскольку молекулярная масса и объем конъюгата безусловно отличаются от молекулярной массы и объема нативного оксинтомодулина, то для стабилизации белка требуется специальная композиция.

Кроме того, поскольку оксинтомодулин (то есть физиологически активный пептид) и область Fc иммуноглобулина представляют собой белки или пептиды, обладающие различными физико-химическими свойствами, их следует стабилизировать одновременно. Однако, как описано выше, различные белки или белки могут постепенно инактивироваться с различными скоростями в различных условиях в процессе хранения вследствие их химических различий, и при применении стабилизаторов, подходящих для белков или пептидов, в комбинации они могут вызывать побочные эффекты,

отличающиеся от желаемых эффектов, вследствие конкуренции и взаимодействия между ними. Таким образом, в случае конъюгата оксинтомодулина длительного действия существует значительные затруднения при нахождении композиции для одновременной стабилизации оксинтомодулина, представляющего собой физиологически активный пептид, и области Fc иммуноглобулина.

В таких обстоятельствах авторы изобретения приложили значительные усилия для получения стабильной жидкой композиции, которую можно хранить в течение длительного периода времени, не беспокоясь о вирусном загрязнении, и в результате обнаружили, что стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество, и может дополнительно содержать добавку, такую как изотонический агент или аминокислота, и консервант для многократного применения, может повысить стабильность производного оксинтомодулина длительного действия, и экономически эффективная и стабильная жидкая композиция может быть получена с использованием стабилизатора, в результате чего выполнили настоящее изобретение.

### **Раскрытие изобретения**

#### **Техническая задача**

Цель настоящего изобретения состоит в разработке жидкой композиции конъюгата оксинтомодулина длительного действия, содержащей фармакологически эффективное количество конъюгата оксинтомодулина длительного действия, где оксинтомодулин, представляющий собой физиологически активный пептид, связан с областью Fc иммуноглобулина; и не содержащей альбумин стабилизатор.

Другая цель настоящего изобретения состоит в разработке способа получения указанной выше жидкой композиции.

Еще одна цель настоящего изобретения состоит в разработке композиции для предупреждения или лечения ожирения или диабета, включающей жидкую композицию конъюгата оксинтомодулина, содержащую физиологически активный пептид оксинтомодулин, связанный с областью Fc иммуноглобулина.

Еще одна цель настоящего изобретения состоит в разработке способа предупреждения или лечения ожирения или диабета, включающего введение

субъекту указанной выше жидкой композиции.

#### Техническое решение

Для достижения указанных выше целей в одном аспекте в настоящем изобретении предложена жидкая композиция конъюгата оксинтомодулина длительного действия, содержащая фармакологически эффективное количество конъюгата оксинтомодулина длительного действия, где оксинтомодулин, представляющий собой физиологически активный пептид, связан с областью Fc иммуноглобулина; и не содержащий альбумин стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

Как используют в данном описании, термин "жидкая композиция" относится к лекарственной композиции, полученной в жидкой форме, и включает все жидкие композиции для внутреннего применения и композиции для наружного применения. В предшествующем уровне техники жидкая композиция по изобретению, пригодная для фармакологически эффективного количества конъюгата оксинтомодулина, содержащая оксинтомодулин, связанный с доменом Fc иммуноглобулина, не была описана. Таким образом, жидкая композиция по настоящему изобретению может содержать фармакологически эффективное количество конъюгата оксинтомодулина, содержащего оксинтомодулин, связанный с доменом Fc иммуноглобулина, и не содержащий альбумин стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество. Кроме того, жидкая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать консервант.

В настоящем изобретении стабилизатор может дополнительно содержать один или более чем один ингредиент, выбранный из группы, состоящей из изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов и аминокислот. Сахарный спирт может представлять собой один или более чем один сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из маннита, сорбита и глицерина, и концентрация сахарного спирта в жидкой композиции может составлять 2-15% (масс./об.). Кроме того, буфер может представлять собой один или более чем один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитратных, ацетатных, гистидиновых и фосфатных буферов, и может иметь pH в диапазоне от 4,5 до 7,0. Изотонический агент может представлять собой

хлорид натрия, и неионогенное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат или полоксамер и может находиться в концентрации 0,001-0,1% (масс./об.). Аминокислота может представлять собой метионин. Таким образом, жидкая композиция по настоящему изобретению может включать стабилизатор, содержащий буфер, имеющий pH в диапазоне от 4,8 до 6,0, один или более чем один сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из маннита и сорбита, и полисорбат 20.

Кроме того, жидкая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать один или более чем один консервант, выбранный из группы, состоящей из *мета*-крезола, фенола и бензилового спирта. Концентрация консерванта в жидкой композиции может составлять 0,001-1% (масс./об.).

В частности, жидкая композиция по настоящему изобретению может содержать фармакологически эффективное количество конъюгата оксинтомодулина длительного действия, 5-50 мМ гистидина, 2-15% (масс./об.) маннита, 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (масс./об.) полисорбата 20. В дополнение к этим ингредиентам жидкая композиция может дополнительно содержать 0,001-1% (масс./об.) *мета*-крезола.

Как используют в данном описании, термин "стабилизатор" относится к веществу, стабильно сохраняющему ингредиенты, такие как активные ингредиенты, в течение определенного периода времени. Для цели настоящего изобретения этот термин относится к веществу, обеспечивающему стабильное хранение конъюгата оксинтомодулина длительного действия. Стабильность при хранении белков, таких как конъюгат оксинтомодулина длительного действия, важна не только для гарантии точной дозы, но также для ингибирования потенциального образования антигенного вещества для конъюгата производного оксинтомодулина.

Стабилизатор в настоящем изобретении предпочтительно содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество с целью придания стабильности конъюгату оксинтомодулина длительного действия. Кроме того, стабилизатор может предпочтительно дополнительно содержать один или более чем один ингредиент, выбранный из группы, состоящей из изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов и аминокислот.

Буферные функции, поддерживающие рН жидкой композиции таким образом, чтобы рН жидкой композиции не изменялся быстро, для того чтобы сделать конъюгат оксинтомодулина длительного действия стабильным. Примеры буфера могут включать фармацевтически приемлемые буферы рН, включающие соль металла (фосфат натрия, фосфат калия или их однозамещенную или двузамещенную соль), цитрат натрия, лимонную кислоту, ацетат натрия, уксусную кислоту и гистидин, либо можно также использовать смесь этих буферов. Буфер предпочтительно представляет собой цитратный или гистидиновый буфер, и более предпочтительно гистидиновый буфер. Концентрация буфера предпочтительно составляет 5-100 мМ, и более предпочтительно 5-50 мМ. Значение рН буфера предпочтительно составляет 4,0-8,0, более предпочтительно 4,5-7,0 и еще более предпочтительно 5,0-6,0.

В примере настоящего изобретения была измерена стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН буфера жидкой композиции. То есть после хранения конъюгата оксинтомодулина длительного действия при 25°C в течение 0-4 недель при изменении рН буфера анализировали остаточное количество конъюгата, и в результате было показано, что конъюгат оксинтомодулина был более стабилен при рН 5,6, рН 5,8 и рН 6,0 (Пример 3, таблицы 2-5, Пример 7, таблицы 18-21, Пример 8 и таблицы 22-25). Таким образом, было обнаружено, что рН наиболее стабильного буфера в настоящем изобретении находится в диапазоне от 5,0 до 6,0. В примере настоящего изобретения измеряли стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида буфера жидкой композиции. В частности, после хранения конъюгата оксинтомодулина с 0,02% полисорбатом 20, 0,1 мг/мл метионина и 5% маннитом при 25°C в течение 0-4 недель анализировали остаточное количество конъюгата. Результаты анализа эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э-ВЭЖХ) показали, что остаточное количество конъюгата значительно не различается между буферами при одном и том же значении рН. Результаты анализа с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО-ВЭЖХ) или высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) показали, что гистидин был наиболее стабилен при одном и том же рН (Пример 8 и таблицы 22-25).

Функция сахарного спирта состоит в повышении стабильности конъюгата

оксинтомодулина длительного действия. В настоящем изобретении сахарный спирт может представлять собой один или более чем один сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из маннита, сорбита и глицерина. Предпочтительно сахарный спирт может представлять собой маннит. Концентрация сахарного спирта в жидкой композиции предпочтительно составляет 1-20% (масс./об.), и более предпочтительно 2-15% (масс./об.).

В примере настоящего изобретения анализировали влияние вида сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, конъюгат оксинтомодулина хранили в цитратном буфере (pH 5,6) при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В результате конъюгат был более стабильным в присутствии маннита или сорбита, чем в присутствии глицерина при одной и той же концентрации. Результаты анализа ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат был несколько более стабильным в присутствии маннита по сравнению с присутствием сорбита (Пример 4 и таблицы 6-9). Иными словами, было показано, что добавление маннита или сорбита показало превосходную стабильность, но конъюгат был наиболее стабильным в присутствии маннита.

В примере настоящего изобретения анализировали влияние концентрации сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, конъюгат оксинтомодулина хранили при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В результате в присутствии 2% маннита или 15% маннита образовывался осадок белка, а в присутствии 5% маннита или 10% маннита конъюгат был стабилен (Пример 5, таблицы 10-13, Пример 7 и таблицы 18-21).

Функции неионогенного поверхностно-активного вещества состоят в уменьшении поверхностного натяжения раствора белка для предотвращения адсорбции белка на гидрофобной поверхности или его агрегации. Предпочтительные примеры неионогенного поверхностно-активного вещества, которое можно применять в настоящем изобретении, включают неионогенные поверхностно-активные вещества на основе полисорбата и неионогенные поверхностно-активные вещества на основе полуксамера, которые можно применять отдельно или в комбинации двух или более. Неправильно

использовать неионогенное поверхностно-активное вещество в жидкой композиции в высоких концентрациях. Жидкая композиция по настоящему изобретению содержит неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации 0,2% (масс./об.) или менее, и предпочтительно 0,001-0,1% (масс./об.).

Стабилизатор по настоящему изобретению может содержать аминокислоту, такую как метионин. Функция метионина состоит в дополнительной стабилизации белка за счет ингибирования образования примесей, которое может быть вызвано, например, окислительной реакцией белка.

В примере настоящего изобретения тестировали влияние концентрации неионогенного поверхностно-активного вещества в качестве стабилизатора и присутствия или отсутствия аминокислоты на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, конъюгат оксинтомодулина хранили в цитратном буфере (pH 5,6) и 10% манните при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В результате конъюгат оксинтомодулина был наиболее стабильным в присутствии 0,02% полисорбата 20 и 0,1 мг/мл метионина (Пример 6 и таблицы 14-17).

Функция изотонического агента состоит в поддержании подходящего уровня осмотического давления при введении конъюгата оксинтомодулина длительного действия в растворе *in vivo*, и его дополнительная функция может состоять в дополнительной стабилизации конъюгата оксинтомодулина длительного действия в растворе. Характерные примеры изотонического агента включают водорастворимые неорганические соли, такие как хлорид натрия, сульфат натрия, цитрат натрия и тому подобное. Концентрация изотонического агента предпочтительно составляет 0-200 мМ, и его содержание можно надлежащим образом контролировать.

Стабилизатор по настоящему изобретению предпочтительно не содержит альбумин. Сывороточный альбумин человека, который можно использовать в качестве стабилизатора белка, получают из крови человека, и, следовательно, он может быть заражен патогенным вирусом человека, а желатин или бычий сывороточный альбумин может вызвать заболевания или вызвать аллергические реакции у некоторых пациентов. Не содержащий

альбумин стабилизатор по настоящему изобретению не содержит инородный белок, такой как сывороточный альбумин человека или животного или очищенный желатин, и, следовательно, нечувствителен к вирусной инфекции.

Предпочтительные примеры сахаров среди сахаров и многоатомных спиртов, которые можно дополнительно использовать для повышения стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия при хранении, включают моносахариды, такие как манноза, глюкоза, фукоза и ксилоза, и полисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза, раффиноза и декстран, и предпочтительные примеры многоатомных спиртов включают полипропилен, низкомолекулярный полиэтиленгликоль, глицерин, низкомолекулярный полипропиленгликоль и тому подобное. Эти сахара и многоатомные спирты можно использовать сами по себе или в комбинации двух или более.

В дополнение к вышеописанному буферу, изотоническому агенту, сахарному спирту, аминокислоте и неионогенному поверхностно-активному веществу жидкая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать другие компоненты или вещества, известные в данной области техники, в диапазоне, не уменьшающем эффективность настоящего изобретения.

Жидкая композиция конъюгата оксинтомодулина длительного действия по изобретению содержит фармакологически эффективное количество конъюгата оксинтомодулина длительного действия, содержащего физиологически активный пептид оксинтомодулин, связанный с областью Fc иммуноглобулина, и не содержащий альбумин стабилизатор, который может содержать буфер, имеющий рН в диапазоне от 4,8 до 7,0, один или более чем один сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из маннита и сорбита, и полисорбат 20. Более конкретно стабилизатор может содержать буфер, имеющий рН в диапазоне от 5,0 до 6,0, маннит и полисорбат 20. Кроме того, стабилизатор может дополнительно содержать один или более чем один компонент, выбранный из группы, состоящей из изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов и аминокислот.

Не содержащая альбумин жидкая композиция по изобретению, которая содержит высокую концентрацию конъюгата оксинтомодулина длительного действия, придает стабильность конъюгату оксинтомодулина длительного действия, нечувствительна к вирусной инфекции, является простой и обладает

превосходной стабильностью при хранении, и, следовательно, может быть экономично получена по сравнению с другими стабилизаторами или лиофилизированными композициями.

Кроме того, поскольку жидкая композиция по настоящему изобретению содержит конъюгат оксинтомодулина длительного действия, обладающий физиологической активностью в течение продолжительного периода времени по сравнению с нативным оксинтомодулином, она может сохранять активность белка в организме человека в течение продолжительного периода времени по сравнению с традиционными препаратами оксинтомодулина, и, следовательно, ее можно применять в качестве эффективного лекарственного препарата. Кроме того, жидкая композиция по настоящему изобретению обладает превосходной стабильностью даже при высокой концентрации конъюгата оксинтомодулина длительного действия.

Как используют в данном описании, термин "оксинтомодулин" относится к пептиду, продуцируемому из пре-глюкагона, являющегося предшественником глюкагона. В настоящем изобретении подразумевают, что оксинтомодулин включает нативный оксинтомодулин и его предшественник, производное, фрагмент и вариант. Предпочтительно оксинтомодулин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA).

Как используют в данном описании, термин "производное оксинтомодулина" включает пептид, производное пептида или пептидомиметик, который получен путем добавления, делеции или замены аминокислот в аминокислотной последовательности оксинтомодулина и может активировать рецепторы глюкагона и GLP-1 на более высоком уровне, чем при активации нативным оксинтомодулином. В настоящем изобретении производное оксинтомодулина может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2-34. Предпочтительно, производное оксинтомодулина может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или 25. Более предпочтительно, оно может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

Как используют в данном описании, термин "фрагмент оксинтомодулина" относится к фрагменту, имеющему одну или более аминокислот на амино- или карбокси-конце нативного оксинтомодулина, в котором добавленные

аминокислоты могут также представлять собой неприродные аминокислоты (например, аминокислоту D-типа). Этот фрагмент оксинтомодулина обладают функцией регулирования уровней глюкозы в крови *in vivo*.

Как используют в данном описании, термин "вариант оксинтомодулина" представляет собой пептид, имеющий один или более чем один аминокислотный остаток, отличающийся от остатков аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина, и обладает функцией активации рецепторов GLP-1 и глюкагона. Вариант оксинтомодулина может быть получен любым путем из следующих: замены, добавления, делеции, модификации или их комбинации некоторых аминокислот в аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина.

Способы получения варианта, производного и фрагмента оксинтомодулина можно применять по отдельности или в комбинации. Например, настоящее изобретение также включает пептид, имеющий одну или более аминокислот, отличающихся от аминокислот нативного оксинтомодулина, и дезаминированные N-концевые аминокислотные остатки и обладает функцией активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона.

Аминокислоты, упоминаемые в данном описании, сокращают согласно правилам номенклатуры IUPAC-IUB, как описано ниже:

Аланин A; Аргинин R;

Аспарагин N; Аспарагиновая кислота D;

Цистеин C; Глутаминовая кислота E;

Глутамин Q; Глицин G;

Гистидин H; Изолейцин I;

Лейцин L; Лизин K;

Метионин M; Фенилаланин F

Пролин P; Серин S;

Треонин T; Триптофан W;

Тирозин Y; Валин V.

В настоящем изобретении производное оксинтомодулина включает любой пептид, который получен путем замены, добавления, делеции или посттрансляционной модификации (например, метилирования, ацилирования, убиквитинирования или внутримолекулярного ковалентного связывания) аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и может

активировать и рецептор глюкагона, и рецептор GLP-1. При замене или добавлении аминокислот можно использовать не только 20 аминокислот, обычно находящихся в белках человека, но также атипичные или неприродные аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот включают фирмы Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, включающие эти аминокислоты, и атипичные пептидные последовательности могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например, American Peptide Company или Bachem (USA) или Anygen (Korea).

В конкретном воплощении настоящего изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой новый пептид, содержащий аминокислотную последовательность следующей формулы 1:

Формула 1

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (SEQ ID NO: 50) (Формула 1),

где

R1 представляет собой гистидин, дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин;

X1 представляет собой Aib (аминоизомаляную кислоту), d-аланин, глицин, Sar (N-метилглицин), серин или d-серин;

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или альфа-метил-глутаминовую кислоту, или отсутствует;

X10 представляет собой глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин или серин, или отсутствует;

X11 представляет собой аланин, аргинин или валин, или отсутствует;

X12 представляет собой аланин, аргинин, серин или валин, или отсутствует;

X13 представляет собой лизин, глутамин, аргинин или альфа-метил-глутаминовую кислоту, или отсутствует;

X14 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или лейцин, или отсутствует;

X15 представляет собой фенилаланин или отсутствует;

X16 представляет собой изолейцин или валин, или отсутствует;

X17 представляет собой аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин или альфа-метил-глутаминовую кислоту, или отсутствует;

X18 представляет собой триптофан или отсутствует;

X19 представляет собой аланин, изолейцин, лейцин, серин или валин, или отсутствует;

X20 представляет собой аланин, лизин, метионин, глутамин или аргинин, или отсутствует;

X21 представляет собой аспарагин или отсутствует;

X22 представляет собой аланин, глицин или треонин, или отсутствует;

X23 представляет собой цистеин или лизин, или отсутствует;

X24 представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящий из комбинации аланина, глицина и серина, или отсутствует; и

R2 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39), HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 40) или отсутствует (за исключением случая, где аминокислотная последовательность формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1).

С целью повышения активности оксинтомодулина дикого типа по отношению к рецептору глюкагона и к рецептору GLP-1 производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может быть замещено 4-имидазоацетиллом, полученным путем делеции альфа-углерода гистидина в положении 1 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, дезамино-гистидилом, полученным путем делеции N-концевой аминогруппы, диметил-гистидилом (N-диметил-гистидилом), полученным путем модификации N-концевой аминогруппы двумя метильными группами, бета-гидроксиимидазопропионилом, полученным путем замещения N-концевой

аминогруппы гидроксильной группой, или бета-карбоксиимидазопропионом, полученным путем замещения N-концевой аминогруппы карбоксильной группой. Кроме того, рецептор-связывающая область GLP-1 может быть замещена аминокислотами, усиливающими гидрофобные и ионные связи или их комбинацию. Кроме того, часть последовательности оксинтомодулина может быть замещена аминокислотной последовательностью GLP-1 или эксендина-4, чтобы повысить активность рецептора GLP-1.

Кроме того, часть последовательности оксинтомодулина может быть замещена последовательностью, усиливающей альфа-спираль. Предпочтительно аминокислоты в положениях 10, 14, 16, 20, 24 и 28 аминокислотной последовательности формулы 1 могут быть замещены аминокислотами или производными аминокислот, состоящими из следующих: Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO<sub>2</sub>), Phe(4-NH<sub>2</sub>), Phg, Pal, Nal, Ala(2-тиенил) и Ala(бензотиенил), о которых известно, что они стабилизируют альфа-спираль, и тип и число встраиваемых аминокислот или производных аминокислот, стабилизирующих альфа-спираль, не ограничено. Предпочтительно аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24, и 24 и 28 аминокислотной последовательности могут быть также замещены глутаминовой кислотой или лизином, чтобы образовать кольца, и число встраиваемых колец не ограничено. Наиболее предпочтительно производное оксинтомодулина может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из формул 2-6.

В конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 2, полученной путем замещения аминокислотной последовательности оксинтомодулина последовательностью эксендина или GLP-1:

R1-A-R3 (SEQ ID NO: 51) (Формула 2).

В другом конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 3, полученную путем связывания части аминокислотной последовательности оксинтомодулина и части аминокислотной последовательности эксендина или GLP-1 посредством соответствующего аминокислотного линкера:

R1-B-C-R4 (SEQ ID NO: 52) (Формула 3).

В другом конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 4, где часть аминокислотной последовательности оксинтомодулина замещена аминокислотой, усиливающей гидрофобное связывание с рецептором GLP-1. например, он представляет собой пептид, где Leu в положении 26 замещен аминокислотой Ile или Val, усиливающей гидрофобность.

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (SEQ ID NO: 53) (Формула 4).

В другом конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 5, где часть аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина делетирована, добавлена или замещена другими аминокислотами с целью повышения способностей нативного оксинтомодулина к активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона:

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5 (SEQ ID NO:54) (Формула 5).

В формулах 2-5 R1 является таким, как описано в формуле 1;

A выбран из группы, состоящей из  
 SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41),  
 SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42),  
 SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43),  
 GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44),  
 GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45),  
 GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46) и  
 SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47);

B выбран из группы, состоящей из  
 SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41),  
 SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42),  
 SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43),  
 GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44),  
 GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45),

GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46),  
 SQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47),  
 GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO: 48) и SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO: 49);

C представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящий из комбинации аланина, глицина и серина;

D1 представляет собой серин, глутаминовую кислоту или аргинин;

D2 представляет собой аргинин, глутаминовую кислоту или серин;

D3 представляет собой аргинин, аланин или валин;

D4 представляет собой аргинин, валин или серин;

D5 представляет собой глутамин, аргинин или лизин;

D6 представляет собой изолейцин, валин или серин;

D7 представляет собой метионин, аргинин или глутамин;

D8 представляет собой треонин, глицин или аланин;

E1 представляет собой серин, Aib, Sar, d-аланин или d-серин;

E2 представляет собой серин или глутаминовую кислоту;

E3 представляет собой аргинин или лизин;

E4 представляет собой глутамин или лизин;

E5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

E6 представляет собой глутамин, цистеин или лизин;

E7 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует;

R3 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) или GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37);

R4 представляет собой HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) или HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVK (SEQ ID NO: 40); и

R5 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) или GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37) или делетирован (за исключением случая, где аминокислотные последовательности формул 2-5 идентичны SEQ ID NO: 1).

Предпочтительное производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может представлять собой новый пептид приведенной ниже формулы 6:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (SEQ ID NO: 55) (Формула 6),

где R1 представляет собой гистидин, дезамино-гистидил, 4-имидазоацетил или тирозин;

X1 представляет собой Aib (аминоизомасляную кислоту), глицин, серин или серин;

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту или альфа-метил-глутаминовую кислоту, или отсутствует;

X10 представляет собой глутамин, глутаминовую кислоту, лизин или аргинин, или отсутствует;

X11 представляет собой аланин или аргинин отсутствует;

X12 представляет собой аланин или валин, или отсутствует;

X13 представляет собой лизин, глутамин, аргинин или альфа-метил-глутаминовую кислоту или отсутствует;

X14 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или лейцин, или отсутствует;

X15 представляет собой фенилаланин, или отсутствует;

X16 представляет собой изолейцин или валин, или отсутствует;

X17 представляет собой аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин или альфа-метил-глутаминовую кислоту, или отсутствует;

X18 представляет собой триптофан или отсутствует;

X19 представляет собой аланин, изолейцин, лейцин или валин, или отсутствует;

X20 представляет собой аланин, лизин, метионин или аргинин, или отсутствует;

X21 представляет собой аспарагин или отсутствует;

X22 представляет собой треонин или отсутствует;

X23 представляет собой цистеин, лизин или отсутствует;

X24 представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящий из глицина, или отсутствует; и

R2 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) or HEGTFTSDLKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 40) или отсутствует (за исключением случая, где аминокислотная последовательность формулы 6 идентична последовательности SEQ ID NO: 1).

Более предпочтительно производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может быть выбрано из группы, состоящей из пептидов SEQ ID NO: 2-34. Еще более предпочтительно производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может представлять собой производное оксинтомодулина, описанное в таблице 1 Примера 1.

Оксинтомодулин обладает активностями двух пептидов, GLP-1 и глюкагона. GLP-1 обладает эффектом, снижающим уровни глюкозы в крови посредством секреции инсулина, а глюкагон обладает эффектом, повышающим уровни глюкозы в крови. Кроме того, GLP-1 ингибирует потребление пищи и подавляет опорожнение желудка, а глюкагон обладает эффектом, снижающим массу тела посредством стимуляции липолиза и повышения энергетического метаболизма. Таким образом, GLP-1 и глюкагон обладают различными биологическими эффектами. Следовательно, в случае, когда оба пептида присутствуют в виде конъюгата, если эффект любого из этих двух пептидов превышает эффект другого, может произойти побочное действие. Например, если эффект глюкагона выше, чем эффект GLP-1, уровни глюкозы в крови могут увеличиться, а, если эффект GLP-1 выше, чем эффект глюкагона, могут встречаться побочные эффекты, такие как тошнота и рвота. Кроме того, эффект этих двух пептидов может варьировать в зависимости от соотношения активностей этих двух пептидов. Следовательно, производные оксинтомодулина и их конъюгаты не ограничены только производными, обладающими повышенными активностями.

Как используют в данном описании, термин "конъюгат оксинтомодулина" относится к конъюгату, содержащему оксинтомодулин и другой элемент. Этот другой элемент может представлять собой любое вещество, обладающее

полезными функциями, включающими увеличение периода полувыведения оксинтомодулина в крови или замедление высвобождения оксинтомодулина в почках. Конъюгат по настоящему изобретению может ковалентно связываться с оксинтомодулином или образовывать микросферы, что повышает сывороточную стабильность оксинтомодулина или замедляет высвобождение оксинтомодулина в почках, либо изменяет связывающую активность оксинтомодулина с его рецептором. Носитель, который может образовать конъюгат, содержащий оксинтомодулин, может быть выбран из группы, состоящей из альбумина, трансферрина, антител, фрагментов антител, эластина, гепарина, полисахарида, такого как хитин, фибронектин и тому подобное, который может связываться с оксинтомодулином, повышая сывороточную стабильность оксинтомодулина. Предпочтительно носитель представляет собой область Fc иммуноглобулина.

Fc иммуноглобулина, который можно применять в настоящем изобретении, может представлять собой область Fc иммуноглобулина человека, область Fc иммуноглобулина, имеющий последовательность его аналога, или область Fc иммуноглобулина, происходящую из животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок. Кроме того, область Fc иммуноглобулина может происходить из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации, или их гибрида. Кроме того, каждый домен области Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой гибрид доменов, происходящих из разных иммуноглобулинов, выбранных из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM. Альтернативно область Fc иммуноглобулина представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов, состоящих из доменов одинавого происхождения. Предпочтительно область Fc иммуноглобулина представляет собой область, полученную из IgG или IgM, являющихся самыми распространенными белками в крови человека. Наиболее предпочтительно она представляет собой Fc иммуноглобулина, происходящую из IgG, о которой известно, что она увеличивает периоды полувыведения лиганд-связывающих белков. Fc иммуноглобулина может быть получена либо путем обработки нативного IgG специфичной протеазой, либо из трансформированных клеток с помощью рекомбинантного метода. Предпочтительно она представляет собой рекомбинантную Fc иммуноглобулина человека, полученную в *E. coli*.

В то же время, IgG может быть также разделен на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и в настоящем изобретении также возможны комбинация или гибрид этих подклассов. Предпочтительно IgG относится к подклассам IgG2 и IgG4, и наиболее предпочтительно к IgG4, у область Fc которого по существу отсутствуют эффекторные функции, такие как комплементзависимая цитотоксичность (complement-dependent cytotoxicity; CDC). Иными словами, наиболее предпочтительной областью Fc иммуноглобулина, используемой в качестве носителя лекарственного средства в настоящем изобретении, является негликозилированная область Fc, происходящая из IgG4 человека. Область Fc человеческого происхождения более предпочтительна, чем область Fc происхождения, отличающегося от человеческого, которая может действовать в качестве антигена в организме человека и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как продуцирование нового антитела против антигена.

В настоящем изобретении конъюгат оксинтомодулина может быть получен путем использования непептидильного полимера или методом генной рекомбинации. Предпочтительно конъюгат может быть получен путем связывания оксинтомодулина с областью Fc иммуноглобулина посредством непептидильного полимера.

Непептидильный полимер может быть связан с каждой из молекул: оксинтомодулином и областью Fc иммуноглобулина. Каждый конец непептидильного полимера может быть связан с областью Fc иммуноглобулина и аминной или тиольной группой производного оксинтомодулина, соответственно.

Как используют в данном описании, термин "конъюгат оксинтомодулина" относится к конъюгату, обладающему пролонгированным длительным эффектом по сравнению с нативным оксинтомодулином. Примеры конъюгата длительного действия включают, но не ограничены ими, конъюгат, в котором производное оксинтомодулина, полученное в результате модификации, замены, добавления или делеции аминокислот в аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина, связан с биоразлагаемым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), конъюгата, в котором белок, обладающий превосходными свойствами длительного действия, такой как альбумин или иммуноглобулин, связан с оксинтомодулином, конъюгата, в

котором жирная кислота, обладающая способностью к связыванию с альбумином *in vivo*, связана с оксинтомодулином, или конъюгата, в котором оксинтомодулин инкапсулирован в биоразлагаемых наночастицах.

Как используют в данном описании, термин “непептидильный полимер” относится к биосовместимому полимеру, включающему два или более повторяющихся звеньев, связанных друг с другом любой ковалентной связью вместо пептидной связи. В настоящем изобретении непептидильный полимер можно использовать взаимозаменяемо с непептидильным линкером.

Пептидный линкер, используемый в слитом белке, полученном традиционным способом слияния в рамке считывания, имеет недостатки, состоящие в том, что он легко расщепляется протеиназой *in vivo*, и, следовательно, желаемый эффект увеличения периода полувыведения активного лекарственного средства в сыворотке за счет носителя не может быть получен. Тем не менее, в настоящем изобретении можно использовать полимер, обладающий устойчивостью к протеиназе, для поддержания периода полувыведения пептида в сыворотке, аналогично носителю. Таким образом, в настоящем изобретении можно использовать любой непептидильный полимер без ограничения, если он представляет собой полимер, обладающий упомянутой выше функцией, то есть полимер, обладающий устойчивостью к протеиназе *in vivo*. Непептидильный полимер имеет молекулярную массу в диапазоне от 1 до 100 кДа, и предпочтительно от 1 до 20 кДа. Непептидильный полимер по настоящему изобретению, связанный с областью Fc иммуноглобулина, может представлять собой один вид полимера или комбинацию разных полимеров.

Непептидильный полимер, используемый в настоящем изобретении, может иметь активную группу, способную к связыванию с областью Fc иммуноглобулина и белковым лекарственным средством. Активная группа на обоих концах непептидильного полимера предпочтительно выбрана из группы, состоящей из активной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и производного сукцинимиды.

Производное сукцинимиды может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, когда непептидильный полимер имеет активную альдегидную группу на его обоих концах, неспецифические

взаимодействия можно свести к минимуму, и физиологически активный полипептид и иммуноглобулин могут быть эффективно связаны с обоими концами непептидильного полимера, соответственно. Конечный продукт, образованный путем восстановительного алкилирования альдегидной связью, значительно более стабилен, чем связанный амидной связью. Альдегидная активная группа селективно связывается с N-концом при низком рН и может образовать ковалентную связь с остатком лизина при высоком рН, таком как рН 9,0.

Активные группы на обоих концах линкера, то есть непептидильного полимера, могут быть одинаковыми или разными. Например, непептидильный полимер может содержать на одном конце малеимидную группу, а на другом конце альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу. Для получения конъюгата длительного действия по настоящему изобретению при использовании в качестве непептидильного полимера полиэтиленгликоля, содержащего активную гидроксигруппу на его обоих концах, эта гидроксигруппа может быть активирована с образованием различных активных групп с помощью известных химических реакций, либо можно использовать полиэтиленгликоль, содержащий имеющуюся в продаже модифицированную активную группу.

Конъюгат по настоящему изобретению может представлять собой конъюгат, в котором каждый конец непептидильного полимера связан с областью Fc иммуноглобулина и с аминной или тиольной группой аналога оксинтомодулина, соответственно.

При этом в настоящем изобретении оба конца непептидильного полимера включают активные группы, с которыми может быть связана область Fc иммуноглобулина и белковое лекарственное средство. Примеры активных групп включают, но не ограничены ими, альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу, малеимидную группу, производное сукцинимида (сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилпропионаткарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат) и тому подобное.

Активные группы на обоих концах линкера, то есть непептидильного полимера, могут быть одинаковыми или разными. Например, непептидильный полимер может содержать на одном конце малеимидную группу, а на другом

конце альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу. Например, когда непептидильный полимер содержит активную альдегидную группу на одном конце и активную малеимидную группу на другом конце, неспецифические взаимодействия можно свести к минимуму, и физиологически активный полипептид и иммуноглобулин могут быть эффективно связаны с обоими концами непептидильного полимера. Непептидильный полимер, который можно использовать в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля/пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахаридов, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемых полимеров, таких как PLA (полимолочная кислота) и PLGA (полимолочно-гликолевая кислота), липидных полимеров, хитинов, гиалуроновой кислоты и их комбинаций. Предпочтительно непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль. Кроме того, его производные, известные в данной области техники, и производные, которые могут быть легко получены способом, известным в данной области техники, также включены в объем настоящего изобретения.

В примере настоящего изобретения конъюгат синтезировали путем связывания оксинтомодулина или его производного с областью Fc иммуноглобулина посредством ковалентной связи, используя непептидильный полимер ПЭГ, включающий одну пропиональдегидную группу или обе группы, малеимидную и альдегидную.

Конъюгат по настоящему изобретению обладает превосходными активностями по отношению к рецептору GLP-1 и к рецептору глюкагона по сравнению с нативным оксинтомодулином. Кроме того, он связан с областью Fc, что увеличивает период полувыведения из крови *in vivo* для поддержания его активности *in vivo* в течение длительного периода времени.

Как используют в данном описании, термин "консервант" относится к веществу, используемому для предотвращения аномальных взаимодействий или распада, вызванных микробным загрязнением. Жидкая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать консервант. Консервант, как правило, применяют в композициях многократного дозирования, которые с наибольшей вероятностью загрязняются

микроорганизмами, но не только в них и может также применяться в лиофилизированных композициях или композициях однократного дозирования для предотвращения загрязнения микроорганизмами. Жидкая композиция по настоящему изобретению может содержать один или более чем один консервант, выбранный из *мета*-крезола, фенола и бензилового спирта. Концентрация консерванта в жидкой композиции может составлять 0,001-1% (масс./об.). В частности, консервант, включенный в жидкую композицию по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой *мета*-крезол. Жидкая композиция по настоящему изобретению может представлять собой композицию для введения многократных доз.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения жидкой композиции конъюгата оксинтомодулина длительного действия.

В частности, в одном воплощении настоящего изобретения способ получения жидкой композиции может включать следующие стадии: а) получение конъюгата оксинтомодулина длительного действия; и б) смешивание полученного конъюгата оксинтомодулина длительного действия со стабилизатором, содержащим буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

В другом воплощении настоящего изобретения способ получения жидкой композиции может включать следующие стадии: а) получение конъюгата оксинтомодулина длительного действия; и б) смешивание полученного конъюгата оксинтомодулина длительного действия со стабилизатором, содержащим буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество, и консервантом.

Предпочтительно стабилизатор на стадии б) может дополнительно содержать одно или более чем одно вещество, выбранное из группы, состоящей из изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов и аминокислот.

Еще в одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения ожирения или диабета, содержащая описанную выше жидкую композицию.

Как используют в данном описании, термин "предупреждение" относится ко всем действиям, ингибирующими или замедляющим развитие заболевания-мишени. Как используют в данном описании, термин "предупреждение"

означает введение конъюгата по настоящему изобретению для ингибирования или замедления развития диабетических состояний, таких как аномальные уровни глюкозы в крови или аномальная секреция инсулина, или состояний ожирения, таких как увеличение массы тела или жировой ткани.

Как используют в данном описании, термин "лечение" относится ко всем действиям, облегчающим, улучшающим или ослабляющим симптомы развившегося заболевания. Как используют в данном описании, термин "лечение" означает введение конъюгата по настоящему изобретению для облегчения, улучшения или ослабления описанных выше диабетических состояний или состояний ожирения для нормализации уровней глюкозы в крови и секреции инсулина, а также уменьшения массы тела или жировой ткани.

Как используют в данном описании, термин "ожирение" относится к избыточному количеству жировой ткани. Индекс массы тела (= масса (кг), деленная на рост (м)), равный 25 или более, определяют как ожирение. Ожирение, как правило, является результатом нарушения энергетического баланса, при котором потребление энергии превышает затраты энергии. Ожирение представляет собой метаболическое заболевание, влияющее на весь организм и с высокой вероятностью приводящее к диабету и гиперлипидемии. Кроме того, ожирение связано с половой дисфункцией, артритом и повышенным риском развития сердечнососудистых заболеваний, а также в некоторых случаях связано с развитием рака.

Как используют в данном описании, термин "диабет" представляет собой вид метаболического заболевания, при котором секреция инсулина недостаточна, или нормальные функции не выполняются. Диабет характеризуется повышенными уровнями глюкозы в крови и вызывает различные проблемы со здоровьем. В случае диабета глюкоза выводится с мочой.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Как используют в данном описании, термин "фармацевтически приемлемый" означает количество, достаточное для проявления терапевтических эффектов и не вызывающее побочных эффектов. Доза активного ингредиента фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть легко определена специалистами в данной области

техники в зависимости от типа заболевания, возраста пациента, массы, состояния здоровья, пола и чувствительности к лекарственному средству, пути введения, режима введения, частоты введения, продолжительности лечения, лекарственных средств, применяемых в комбинации или одновременно с композицией по данному изобретению, и от других факторов, известных в области медицины.

Еще в одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ предупреждения или лечения ожирения или диабета, включающий введение субъекту жидкой композиции.

В данном случае жидкая композиция, ожирение и диабет являются такими, как описано выше.

Как используют в данном описании, термин "субъект" относится к субъекту с подозрением на ожирение или диабет. В частности, этот термин означает млекопитающих, включая людей, крыс и домашних животных, страдающих или обладающих риском развития описанного выше заболевания. Кроме того, субъект может представлять собой любого субъекта, которого можно лечить жидкой композицией производного по настоящему изобретению.

Терапевтический способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей жидкую композицию. Суммарная суточная доза композиции может быть определена на основании соответствующего медицинского заключения врача, и композицию можно вводить один раз или несколько раз. Однако, в свете цели настоящего изобретения конкретная терапевтически эффективная доза композиции для какого-либо конкретного пациента может варьировать в зависимости от различных факторов, хорошо известных в области медицины, включающих вид и степень ответа, который должен быть достигнут, конкретные композиции в том отношении, применяют ли совместно с ними другие ингредиенты, возраст пациента, массу тела, состояние здоровья, пол и режим питания, время и путь введения, скорость секреции композиции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с композицией по настоящему изобретению, а также другие факторы, известные в области медицины.

### **Полезные эффекты изобретения**

Жидкая композиция по изобретению, содержащая конъюгат оксинтомодулина длительного действия, содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество и не содержит сывороточный альбумин человека и факторы, являющиеся потенциально вредными для организма человека, и, таким образом, нечувствительна к вирусной инфекции. Кроме того, конъюгат оксинтомодулина по настоящему изобретению содержит оксинтомодулин, связанный с областью Fc иммуноглобулина, и, таким образом, обладает большой молекулярной массой, длительной физиологической активностью и превосходной стабильностью при хранении по сравнению с нативным оксинтомодулином.

### **Краткое описание графических материалов**

На ФИГ. 1a показан график, на котором представлены результаты, полученные при очистке моно-пэгилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) на колонке для очистки SOURCE S.

На ФИГ. 1b показан график, на котором представлены результаты, полученные при очистке конъюгата моно-пэгилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE 15Q.

На ФИГ. 1c показан график, на котором представлены результаты, полученные при очистке конъюгата моно-пэгилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE ISO.

На ФИГ. 2a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 3 после 0-2 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 2a демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 2b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 3 после 0-2 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 2b демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 2с показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 3 после 0-2 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 2с демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 3а показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и присутствия или отсутствия изотонического агента с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 4 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 3а демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 3б показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и присутствия или отсутствия изотонического агента с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 4 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 3б демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 3с показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и присутствия или отсутствия изотонического агента с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 4 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 3с демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 4а показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации сахарного спирта с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 5 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 4а демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 4б показана графическая диаграмма, на которой представлены

результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации сахарного спирта с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 5 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 4b демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 4c показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации сахарного спирта с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 5 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 4c демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 5a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации поверхностно-активного вещества и присутствия или отсутствия аминокислоты с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 6 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 5a демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 5b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации поверхностно-активного вещества и присутствия или отсутствия аминокислоты с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 6 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 5b показывает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 5c показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации поверхностно-активного вещества и присутствия или отсутствия аминокислоты с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 6 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 5c демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 6a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина

длительного действия в зависимости от рН и концентрации сахарного спирта с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 7 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 6а демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 6b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН и концентрации сахарного спирта с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 7 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 6b демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 6с показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН и концентрации сахарного спирта с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 7 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 6с демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 7а показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН и вида буфера с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 8 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 7а демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 7b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН и вида буфера с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 8 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 7b демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 7с показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН и вида буфера с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 8 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 7с демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 8a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от присутствия или отсутствия консерванта и концентрации оксинтомодулина длительного действия с помощью ИО-ВЭЖХ в Примере 9 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 8a демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 8b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от присутствия или отсутствия консерванта и концентрации оксинтомодулина длительного действия с помощью Э-ВЭЖХ в Примере 9 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 8b демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На ФИГ. 8c показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от присутствия или отсутствия консерванта и концентрации оксинтомодулина длительного действия с помощью ОФ-ВЭЖХ в Примере 9 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на ФИГ. 8c демонстрирует процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

### **Осуществление изобретения**

Далее настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на примеры. Тем не менее, понятно, что эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

### **Пример 1: Синтез оксинтомодулина и производных оксинтомодулина**

С целью измерения стабильностей оксинтомодулина и производных оксинтомодулина в жидкой композиции по настоящему изобретению были синтезированы производные оксинтомодулина, имеющие аминокислотные последовательности, показанные в таблице 1 ниже.

**Таблица 1**  
**Оксинтомодулин и производные оксинтомодулина**

SEQ ID NO	Последовательность
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLD <del>S</del> RRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> EAVRLFIEWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> RRAQDFVAWLKNTGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 4	CA-GQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EEAVRLFIEWLKN <del>G</del> GPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 5	CA-GQGTFTSDYSRQME <del>E</del> EEAVRLFIEWLKN <del>G</del> GPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 6	CA-GEGTFTSDLSRQME <del>E</del> EEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD
SEQ ID NO: 7	CA-SQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 8	CA-SQGTFTSDLSRQLE <del>E</del> EEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID NO: 9	CA-GQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EAVXLFIEWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 10	CA-SQGTFTSDYSRQME <del>E</del> EEAVRLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 11	CA- GEGTFTSDLSRQME <del>E</del> EEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYL <del>D</del> K
SEQ ID NO: 12	CA-SQGTFTSDYSRYLD <del>G</del> GGHGEGTFTSDLSKQME <del>E</del> EAVK
SEQ ID NO: 13	CA-SQGTFTSDYSRYLD <del>X</del> EAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 14	CA-GQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EAVXLFIXWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 15	CA-GQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EAVRLFIXWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 16	CA-SQGTFTSDLSRQLE <del>G</del> GGHSQGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID NO: 17	CA-SQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EAVRLFIEWIRNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 18	CA-SQGTFTSDYSRYL <del>E</del> EAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 19	CA-SQGTFTSDYSRYLD <del>E</del> EAV <del>K</del> L <del>F</del> IEWIRNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 20	CA-SQGTFTSDYSRYLD <del>E</del> EAV <del>K</del> L <del>F</del> IEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 21	CA-SQGTFTSDYSRQLE <del>E</del> EEAVRLFIEWVRNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> E <del>K</del> R <del>A</del> K <del>E</del> FVQWLMNTK
SEQ ID NO: 23	HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> E <del>K</del> R <del>A</del> K <del>E</del> FVCWLMNT
SEQ ID NO: 24	HAibQGTFTSDY SKYLDEKRAK E <del>F</del> VQWLMNTC
SEQ ID NO: 25	HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> E <del>K</del> R <del>A</del> K <del>E</del> FVQWLMNTC
SEQ ID NO: 26	HAibQGTFTSDYS <del>K</del> YLDE <del>E</del> E <del>K</del> R <del>A</del> K <del>E</del> FVQWLMNTC
SEQ ID NO: 27	HAibQGTFTSDYSKYLD <del>E</del> E <del>Q</del> A <del>A</del> K <del>E</del> FICWLMNT
SEQ ID NO: 28	HAibQGTFTSDY SKYLDEKRAK E <del>F</del> VQWLMNT

SEQ ID NO: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA
SEQ ID NO: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 33	HAibQGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 34	YAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

В приведенной выше таблице аминокислотные остатки, указанные полужирным шрифтом, обозначают аминокислоты, образующие кольца, и аминокислотные остатки, указанные как X, означают альфа-метил-глутаровую кислоту, не являющуюся нативной аминокислотой. Кроме того, CA означает 4-имидазоацетил, DA означает дезамино-гистидил а (d)S означает d-серин.

**Пример 2: Получение конъюгата, содержащего производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина (производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25), связанное с областью Fc иммуноглобулина)**

Во-первых, для пэгилирования MAL-10K-ALD PEG по остатку цистеина в аминокислотном положении 30 производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25), давали возможность взаимодействовать друг с другом производному оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и MAL-10K-ALD PEG в молярном отношении 1:3 и при концентрации белка 3 мкг/мл при комнатной температуре в течение 3 часов. В данном случае реакцию проводили в 50 мМ Трис-буфере (pH 8,0) в присутствии 1 М гуанидина. После завершения реакции реакционный раствор наносили на колонку SOURCE S для очистки производного оксинтомодулина, моно-пэгилированного по остатку цистеина (колонка: SOURCE S, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 →100% 50 мин B (A: 20 мМ Na-цитрат, pH 3,0 + 45% этанол, B: A + 1М KCl)) (ФИГ. 1а). ФИГ. 1а представляет собой график, на котором представлены результаты, полученные при очистке моно-пэгилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) на колонке для очистки SOURCE S.

Затем очищенное моно-пэгилированное производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию друг с другом при молярном отношении 1:5 и концентрации белка 20 мг/мл при 4°C в течение 16 часов. Реакцию проводили в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH

6,0) в присутствии 20 мМ цианоборгидрида натрия (SCB) в качестве восстанавливающего агента. После завершения реакции реакцию смесь наносили на колонку для очистки SOURCE 15Q (колонка: SOURCE 15Q, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 → 4% 1 мин B → 20% 80 мин B (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1 М NaCl)) (ФИГ. 1b) и на колонку для очистки SOURCE ISO (колонка: SOURCE ISO, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: B 0 → 100% 100 мин A (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1,1 М сульфат аммония (CA)) (ФИГ. 1c) для очистки конъюгата, содержащего производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина. ФИГ. 1b представляет собой график, на котором представлены результаты, полученные в результате очистки конъюгата моно-пэгилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE 15Q, и ФИГ. 1c представляет собой график, на котором представлены результаты, полученные в результате очистки конъюгата моно-пэгилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки Source ISO.

Конъюгат оксинтомодулина, полученный, как описано выше, был разработан для увеличения периода полувыведения оксинтомодулина из крови. Он содержит область Fc иммуноглобулина, непептидильный полимер и оксинтомодулин, ковалентно связанные друг с другом сайт-специфическим путем, и обладает значительно увеличенным периодом полувыведения из крови.

### **Пример 3: Оценка стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH**

С целью оценки стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия (полученного в Примере 2) в жидких композициях конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, показанных в таблице 2 при 25°C в течение 0-2 недель, а затем анализировали с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО-ВЭЖХ), эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э-ВЭЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ). Для хранения конъюгата оксинтомодулина использовали цитратный буфер в качестве буфера, маннит в качестве сахарного спирта и полисорбат 20 в качестве неионогенного поверхностно-активного вещества. В таблицах 3, 4 и

5 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что означает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 3 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 4 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в таблице 5 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 2

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	4,8	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,2	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#4	6,0	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#5	6,4	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл

Таблица 3

	ИО-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 недели	97,6	97,2	96,8	94,0	85,2

Таблица 4

	Э-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 недели	99,7	99,8	99,8	99,3	99,4

Таблица 5

	ОФ-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 недели	83,0	84,4	86,7	65,5	74,0

Как видно из результатов ИО-ВЭЖХ (%) в таблице 3 выше, конъюгат оксинтомодулина был более стабильным при более низком рН. В результатах Э-ВЭЖХ в таблице 4 конъюгат оксинтомодулина был наиболее стабилен при рН 5,2, и по результатам ОФ-ВЭЖХ в таблице 5 конъюгат оксинтомодулина был наиболее стабилен при рН 5,6. Хотя стабильность при рН не различалась между способами анализа, различие в удержании между значениями рН была самой высокой при анализе с помощью ОФ-ВЭЖХ. Это позволяет предположить, что конъюгат оксинтомодулина был наиболее стабилен при рН 5,6.

**Пример 4: Оценка стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и от присутствия или отсутствия изотонического средства**

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние вида сахарного спирта в качестве стабилизатора и присутствия или отсутствия хлорида натрия в качестве изотонического агента на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя цитратный буфер (рН 5,6), выбранный в Примере 3, конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в таблице 6 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В таблицах 7, 8 и 9 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ показана площадь %/исходная площадь %, что означает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 7 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 8 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после

хранения, и в таблице 9 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

**Таблица 6**

	рН	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#2	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Сорбит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Глицерин	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#4	5,6	20 мМ Na-Цитрат	150 мМ NaCl	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл

**Таблица 7**

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	98,8	98,8	88,3	98,3
2 недели	97,2	96,9	79,0	95,0
3 недели	94,4	94,5	63,0	93,8
4 недели	91,6	91,8	55,8	91,6

**Таблица 8**

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,9	100,0	92,0	100,0
2 недели	99,7	99,8	84,7	99,9
3 недели	99,2	99,4	79,2	99,5
4 недели	98,4	98,6	76,0	98,8

Таблица 9

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	98,9	98,7	90,0	98,4
2 недели	96,0	95,6	80,6	95,0
3 недели	94,0	93,6	75,2	92,9
4 недели	92,6	91,1	70,0	90,1

Как видно из таблиц 6-9 выше, конъюгат оксинтомодулина длительного действия был более стабильным в манните или сорбите, чем в глицерине, при одной и той же концентрации. Результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат оксинтомодулина длительного действия был немного стабильнее в манните, чем в сорбите. Кроме того, стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия значимо не различалась в зависимости от присутствия и отсутствия хлорида натрия в качестве изотонического средства.

**Пример 5: Оценка стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации сахарного спирта**

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние концентрации сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя цитратный буфер (pH 5,6) и маннит, выбранные в приведенных выше Примерах, конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в таблице 10 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В таблицах 11, 12 и 13 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 11 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 12 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в таблице 13 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 10

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	2% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#2	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	5% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#4	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	15% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл

Таблица 11

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	79,7	98,7	98,8	79,0
2 недели	57,6	97,6	97,9	61,0
3 недели	39,8	97,1	97,2	49,2
4 недели	34,9	95,5	95,5	43,4

Таблица 12

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,3	99,4	100,0	99,5
2 недели	89,0	99,4	99,8	95,4
3 недели	79,4	99,3	99,4	90,5
4 недели	74,7	98,4	99,1	83,5

Таблица 13

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	89,8	93,2	98,2	95,2
2 недели	80,3	85,3	94,7	90,9
3 недели	71,9	78,5	91,1	84,1
4 недели	66,0	71,0	89,1	76,5

Как видно из таблиц 10-13, конъюгат оксинтомодулина длительного действия был стабилен в присутствии 5% маннита или 10% маннита. Однако, в присутствии 2% маннита или 15% маннита образовывался осадок белка. Результаты ИО-ВЭЖХ или Э-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия был сходным между 10% маннитом и 5% маннитом. Результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия была выше в 10% маните, чем в 5% манните.

**Пример 6: Оценка стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации поверхностно-активного вещества и присутствием или отсутствием аминокислоты**

Авторы настоящего изобретения протестировали влияние концентрации поверхностно-активного вещества в качестве стабилизатора и присутствия или отсутствия аминокислоты на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. Используя цитратный буфер (pH 5,6) и цитратный буфер и 10% маннит, выбранные в приведенных выше Примерах, конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в таблице 14 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В таблицах 15, 16 и 17 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 15 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 16 показана площадь (%) Э-

ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в таблице 17 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 14

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#2	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,05% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#4	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл метионин	10 мг/мл

Таблица 15

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	96,0	96,5	96,4	96,2
2 недели	95,1	94,7	95,1	95,3
3 недели	92,7	92,0	92,2	92,7
4 недели	89,7	89,1	89,2	89,7

Таблица 16

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,4	99,7	99,7	99,6
2 недели	99,3	99,5	99,2	99,3
3 недели	98,3	98,1	98,3	99,1
4 недели	97,3	97,1	97,3	97,9

Таблица 17

	RP-HPLC (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,3	97,8	98,1	97,4
2 недели	79,2	79,2	77,5	79,7
3 недели	71,5	71,6	69,5	73,3
4 недели	65,1	65,0	65,0	67,8

Как видно из результатов в таблицах 14-17, конъюгат оксинтомодулина длительного действия был наиболее стабильным в композиции, содержащей 0,02% полисорбат 20 и 0,1 мг/мл метионина.

**Пример 7: Оценка стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH и концентрации сахарного спирта**

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние pH и концентрации сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя 0,02% полисорбат 20 и 0,1 мг/мл метионина, выбранных в описанных выше Примерах, конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в таблице 18 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В таблицах 19, 20 и 21 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 19 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 20 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в таблице 21 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 18

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,2	20 мМ Na-	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл

		Цитрат						
#2	5,2	20 мМ Na- Цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#3	5,2	20 мМ Na- Цитрат	-	15% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#4	5,6	20 мМ Na- Цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#5	5,6	20 мМ Na- Цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#6	5,6	20 мМ Na- Цитрат	-	15% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#7	6,0	20 мМ Na- Цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#8	6,0	20 мМ Na- Цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	
#9	6,0	20 мМ Na- Цитрат	-	15% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл	

Таблица 19

	ИО-ВЭЖХ (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,4	99,6	97,1	97,2	97,6	98,0	90,6	92,9	93,4
2 недели	97,5	97,8	90,5	93,8	94,1	93,2	81,5	83,6	85,6
3 недели	93,0	93,6	82,6	86,0	86,9	87,1	71,2	74,6	77,0
4 недели	90,0	90,5	71,1	85,0	85,6	85,7	62,7	66,3	68,9

Таблица 20

	Э-ВЭЖХ (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	98,8	99,5	98,8	99,5	99,3	98,5	99,6	100,0	100,7
2 недели	98,8	99,1	91,1	98,4	97,1	96,9	97,3	98,3	97,9
3 недели	97,7	98,3	96,4	98,1	98,4	98,2	98,1	99,1	100,8
4 недели	98,0	98,5	94,9	97,9	98,3	98,3	97,6	98,2	99,0

Таблица 21

	ОФ-ВЭЖХ (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	78,2	78,2	42,1	88,2	90,7	89,4	99,9	99,1	100,7
2 недели	60,7	58,6	-	80,4	80,2	80,6	96,8	93,4	92,0
3 недели	47,5	41,9	-	79,4	77,3	69,8	97,6	92,8	93,6
4 недели	34,8	28,0	-	72,8	65,0	62,6	96,9	91,1	88,9

Как видно из результатов в приведенных выше таблицах, результаты ИО-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия была выше при значениях рН порядка рН 5,2, рН 5,6 и рН 6,0. Результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия была выше при значениях рН порядка рН 6,0, рН 5,6 и рН 5,2. Результаты Э-ВЭЖХ показали, что стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия значительно не различаются при рН 5,2, рН 5,6 и рН 6,0. Иными словами, результаты ИО-ВЭЖХ, ОФ-ВЭЖХ и Э-ВЭЖХ показали, что конъюгат оксинтомодулина длительного действия был стабилен при рН 5,6.

В то же время, результаты ИО-ВЭЖХ и Э-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия значительно не различаются между концентрациями маннита при рН 5,6. Однако, результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат оксинтомодулина длительного действия был более стабильным в 5% манните, чем в 10% или 15% манните при рН 5,6.

#### **Пример 8: Оценка стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия в зависимости от рН и вида буфера**

Авторы настоящего изобретения исследовали влияния рН и вида буфера в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя 0,02% полисорбат 20, 0,1 мг/мл метионина и 5% маннит, выбранные в приведенных выше Примерах, конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в таблице 22 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ.

В таблицах 23, 24 и 25 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%)

показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 23 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 24 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в таблице 25 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 22

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,8	20 мМ Na-Цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#3	5,8	20 мМ Na-Ацетат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#4	5,8	10 мМ Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#5	5,8	10 мМ Na-Фосфат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл

Таблица 23

	ИО-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,6	96,8	96,5	97,2	96,1
2 недели	93,9	91,4	90,6	92,6	89,6
3 недели	90,4	88,1	86,9	89,2	84,4
4 недели	90,1	87,0	84,8	87,4	81,7

Таблица 24

	Э-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

1 неделя	99,4	99,8	99,8	99,7	99,7
2 недели	100,5	100,2	100,0	100,0	99,3
3 недели	100,4	100,2	99,1	99,6	98,2
4 недели	100,1	99,2	99,0	98,8	97,7

Таблица 25

	ОФ-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,1	97,2	99,4	99,5	99,0
2 недели	97,6	97,7	99,4	99,8	99,3
3 недели	96,1	98,7	97,2	98,9	97,4
4 недели	98,0	96,6	97,6	98,3	98,1

Как видно из результатов в таблицах 23-25, результаты Э-ВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия значимо не различается между рН 5,6 и рН 5,8. Результаты ИО-ВЭЖХ показали, что конъюгат оксинтомодулина длительного действия был более стабильным при рН 5,6, чем при рН 5,8. Результаты Э-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия значимо не различается между буферами при одном и том же рН. Кроме того, результаты ИО-ВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат оксинтомодулина длительного действия был наиболее стабильным в гистидине при одном и том же рН.

**Пример 9: Оценка влияний присутствия или отсутствия консерванта и концентрации конъюгата оксинтомодулина длительного действия на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия**

Авторы настоящего изобретения исследовали влияния присутствия или отсутствия консерванта в качестве стабилизатора и конъюгата оксинтомодулина длительного действия на стабильность конъюгата оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя гистидиновый буфер (рН 5,6), 0,02% полисорбат 20, 0,1 мг/мл метионина и 5% маннит, выбранные в приведенных выше Примерах, конъюгат оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в таблице 26

ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В таблицах 27, 28 и 29 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В таблице 27 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, в таблице 28 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в таблице 29 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 26

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	10 мМ Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,6	10 мМ Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин 0,27% мета-крезол	10 мг/мл
#3	5,6	10 мМ Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	40 мг/мл
#4	5,6	10 мМ Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин 0,27% мета-крезол	40 мг/мл

Таблица 27

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,9	98,2	97,7	97,1
2 недели	95,3	95,7	95,1	94,3
3 недели	93,6	92,9	93,4	91,8
4 недели	91,3	90,4	90,2	88,4

Таблица 28

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,7	99,6	99,5	99,4
2 недели	99,3	99,1	99,0	97,9
3 недели	99,1	98,9	98,7	97,0
4 недели	98,8	98,0	98,0	95,4

Таблица 29

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	100,1	100,0	99,8	99,7
2 недели	99,4	99,5	99,2	99,1
3 недели	98,3	98,3	98,8	98,5
4 недели	98,8	97,9	97,7	97,4

Как видно в таблицах 26-29, результаты ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгат оксинтомодулина длительного действия не изменилась даже в присутствии консерванта и не различалась в зависимости от его концентрации.

Хотя в иллюстративных целях раскрыты предпочтительные воплощения настоящего изобретения, специалистам в данной области техники понятно, что возможны различные модификации, дополнения и замены без отклонения от объема и сущности изобретения, раскрытого в прилагаемой формуле изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД.

<120> ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ БЕЛКОВОГО КОНЬЮГАТА, СОДЕРЖАЩЕГО  
ОКСИНТОМОДУЛИН И ФРАГМЕНТ ИММУНОГЛОБУЛИНА

<130> 106132.000147

<140> 201590758

<141> 2013-11-06

<150> РСТ/KR2013/009986

<151> 2013-11-06

<150> KR 10-2012-0124725

<151> 2012-11-06

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(37)

<223> Оксинтомодулин

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 2

<211> 37

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<400> 2

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 3  
<211> 39  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 3  
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

<210> 4  
<211> 39  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 4  
His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

<210> 5  
<211> 39  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 5  
His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

<210> 6  
<211> 42  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 6  
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr  
20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp  
35 40

<210> 7  
<211> 30  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys  
20 25 30

<210> 8

<211> 29

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Lys  
20 25

<210> 9

<211> 37

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)

<223> Альфа-метил-глутаминовая кислота

<400> 9

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu



<210> 12  
 <211> 38  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 4-имидазоацетил

<400> 12  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met  
 20 25 30

Glu Glu Glu Ala Val Lys  
 35

<210> 13  
 <211> 30  
 <212> ПРТ  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 4-имидазоацетил

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Альфа-метил-глутаминовая кислота

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Альфа-метил-глутаминовая кислота

<400> 13  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Val Glu Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys  
 20 25 30

<210> 14  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Альфа-метил-глутаминовая кислота

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (24)..(24)  
<223> Альфа-метил-глутаминовая кислота

<400> 14  
His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Glu Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 15  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (24)..(24)  
<223> Альфа-метил-глутаминовая кислота

<400> 15  
His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 16  
<211> 34  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 16  
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly  
1 5 10 15

Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu  
20 25 30

Glu Lys

<210> 17  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 17  
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 18  
<211> 40  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 18  
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

<210> 19  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Образование кольца между остатками

<400> 19  
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 20  
<211> 40  
<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Образование кольца между остатками

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu  
1                   5                   10                   15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser  
                 20                   25                   30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
          35                   40

<210> 21

<211> 37

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu  
1                   5                   10                   15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn  
                 20                   25                   30

Arg Asn Asn Ile Ala  
          35

<210> 22

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Дезамино-гистидил

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Образование кольца между остатками

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys  
20 25 30

<210> 23

<211> 29

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 23

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr  
20 25

<210> 24

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<400> 24

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys  
20 25 30

<210> 25

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Образование кольца между остатками

<400> 25

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys  
20 25 30

<210> 26

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(16)

<223> Образование кольца между остатками

<400> 26

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys  
20 25 30

<210> 27  
<211> 29  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Aib

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Образование кольца между остатками

<400> 27  
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1                   5                   10                   15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr  
                  20                   25

<210> 28  
<211> 29  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Aib

<400> 28  
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1                   5                   10                   15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
                  20                   25

<210> 29  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> D-Ser

<400> 29  
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 30  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<400> 30  
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 31  
<211> 37  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
полипептидный конструктор производного оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 4-имидазоацетил

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)

<223> D-Ser

<400> 31

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

<210> 32

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическое полипептидное производное оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 4-имидазоацетил

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> Образование кольца между остатками

<400> 32

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys  
20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетическое полипептидное производное оксинтомодулина

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Образование кольца между остатками

<400> 33  
His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys  
20 25 30

<210> 34  
<211> 30  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетическое  
полипептидное производное оксинтомодулина

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Aib

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Образование кольца между остатками

<400> 34  
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys  
20 25 30

<210> 35  
<211> 8  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический  
пептидный конструктор группы R2

<400> 35  
Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala  
1 5

<210> 36  
<211> 10  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы R2

<400> 36

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы R2

<400> 37

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
1 5 10

<210> 38

<211> 15

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы R2

<400> 38

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp  
1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы R2

400> 39

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys  
1 5 10 15

<210> 40

<211> 20

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы R2

<400> 40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Lys  
20

<210> 41

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 41

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg  
1 5 10 15

Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
20 25

<210> 42

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 42

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr  
20 25

<210> 43

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 43

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg  
1 5 10 15

Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr  
20 25

<210> 44

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 44

Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly  
20 25

<210> 45

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 45

Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly  
20 25

<210> 46

<211> 26

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 46

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala  
20 25

<210> 47

<211> 28

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 47

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly  
20 25

<210> 48  
<211> 24  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы А или В

<400> 48  
Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp  
20

<210> 49  
<211> 14  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептидный конструктор группы В

<400> 49  
Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp  
1 5 10

<210> 50  
<211> 60  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Гистидин, дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Aib (аминоизомаляная кислота), d-аланин, глицин, Sar (N-метилглицин), серин или d-серин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Глутаминовая кислота или глутамин

<220>  
<221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)  
<223> Лейцин или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Серин или аланин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Лизин или аргинин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> Глутамин или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> Лейцин или метионин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)..(15)  
<223> Аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Глутаминовая кислота, серин, альфа-метил-глутаминовая кислота  
или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Глутамин, глутаминовая кислота, лизин, аргинин, серин  
или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18)..(18)  
<223> Аланин, аргинин, валин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)..(19)  
<223> Аланин, аргинин, серин, валин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Лизин, глутамин, аргинин, альфа-метил-глутаминовая кислота  
или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (21)..(21)  
<223> Аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин или не присутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)

<223> Может присутствовать или не присутствовать

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(23)

<223> Изолейцин, валин или не присутствует

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)

<223> Аланин, цистеин, глутаминовая кислота, лизин, глутамин, альфа-метил-глутаминовая кислота или не присутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Может присутствовать или не присутствовать

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (26)..(26)

<223> Аланин, изолейцин, лейцин, серин, валин или не присутствует

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Аланин, лизин, метионин, глутамин, аргинин или не присутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Может присутствовать или не присутствовать

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (29)..(29)

<223> Аланин, глицин, треонин или не присутствует

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> Цистеин, лизин или не присутствует

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (31)..(40)

<223> Аланин, глицин, серин или не присутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (31)..(40)

<223> Эта область может охватывать от 2 до 10 аминокислот, где некоторые положения могут отсутствовать

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (41)..(60)

<223> Эта область может охватывать от 8 до 20 аминокислот, включая "KRNRRNNIA", или "GPSSGAPPPS", или "GPSSGAPPPSK", или "HSQGTFTSDYSKYLD", или "HSQGTFTSDYSRYLDK", или "HGEFTFTSDLSKQMEEEAVK," где некоторые или все положения могут отсутствовать

<220>

<223> Смотри описание, как оно было подано, в отношении подробного раскрытия замен и предпочтительных воплощений

<400> 50

Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

Xaa  
35 40 45

Xaa  
50 55 60

<210> 51

<211> 40

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Гистидин, дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(29)

<223> Эта область может охватывать от 26 до 28 аминокислот, включая "SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT", или "SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT", или "SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT", или "GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG", или "GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG",

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(29)

<223> Продолжение вышеприведенного; или "GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA", или "SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG," где некоторые положения могут отсутствовать

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(40)

<223> Эта область может охватывать от 8 до 11 аминокислот, включая "KRNRNNIA", или "GPSSGAPPPS", или "GPSSGAPPPSK," где некоторые положения могут отсутствовать

<220>

<223> Смотри описание, как оно было подано, в отношении подробного раскрытия замен и предпочтительных воплощений

<400> 51

Xaa  
1 5 10 15

Xaa  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
35 40

<210> 52

<211> 59

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Гистидин, дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксимимдазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионило или тирозин

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(29)

<223> Эта область может охватывать от 14 до 28 аминокислот, включая "SQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNT", или "SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT", или "SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT", или "GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG", или "GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG",

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(29)

<223> Продолжение вышеприведенного; или "GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA", или "SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG", или "GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW", или "SQGTFTSDYSRYLD," где некоторые положения могут отсутствовать

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(39)

<223> Аланин, глицин, серин или не присутствует

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (30)..(39)

<223> Эта область может охватывать от 2 до 10 аминокислот, где некоторые положения могут отсутствовать

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (40)..(59)

<223> Эта область может охватывать от 15 до 20 аминокислот, включая "HSQGTFTSDYSKYLD", или "HSQGTFTSDYSRYLDK", или "HGETFTSDLSKQMEEEAVK," где некоторые положения могут отсутствовать

<220>  
<223> Смотри описание, как оно было подано, в отношении подробного раскрытия замен и предпочтительных воплощений

<400> 52  
Хаа  
1 5 10 15

Хаа  
20 25 30

Хаа  
35 40 45

Хаа  
50 55

<210> 53  
<211> 40  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Гистидин, Дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Серин, глутаминовая кислота или аргинин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Аргинин, глутаминовая кислота или серин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18)..(18)  
<223> Аргинин, аланин или валин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)..(19)  
<223> Аргинин, валин или серин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Глутамин, аргинин или лизин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (26)..(26)  
<223> Изолейцин, валин или серин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (27)..(27)  
<223> Метионин, аргинин или глутамин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (29)..(29)  
<223> Треонин, глицин или аланин

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (30)..(40)  
<223> Эта область может охватывать от 8 до 11 аминокислот, включая "KRNRNNIA", или "GPSSGAPPPS", или "GPSSGAPPPSK," где некоторые положения могут отсутствовать

<220>  
<223> Смотри описание, как оно было подано, в отношении подробного раскрытия замен и предпочтительных воплощений

<400> 53  
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Phe Val Gln Trp Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
35 40

<210> 54  
<211> 41  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Гистидин, дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Серин, Aib, саркозин, d-аланин или d-серин

<220>

<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Серин или глутаминовая кислота

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Аргинин или лизин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Глутамин или лизин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (21)..(21)  
<223> Аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (24)..(24)  
<223> Глутамин, цистеин или лизин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (30)..(30)  
<223> Цистеин, лизин или не присутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(41)  
<223> Эта область может охватывать от 8 до 11 аминокислот, включая "KRNRNNIA", или "GPSSGAPPPS", или "GPSSGAPPPSK," где некоторые или все положения могут отсутствовать

<220>  
<223> Смотри описание, как оно было подано, в отношении подробного раскрытия замен и предпочтительных воплощений

<400> 54  
Xaa Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
1 5 10 15

Xaa Arg Ala Xaa Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
35 40

<210> 55  
<211> 60  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Гистидин, дезамино-гистидил, 4-имидазоацетил или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Aib (аминоизомасляная кислота), глицин или серин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Глутаминовая кислота или глутамин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Лейцин или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Серин или аланин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Лизин или аргинин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> Глутамин или тирозин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> Лейцин или метионин

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)..(15)  
<223> Аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Глутаминовая кислота, альфа-метил-глутаминовая кислота или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Глутамин, глутаминовая кислота, лизин, аргинин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18)..(18)  
<223> Аланин, аргинин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)..(19)  
<223> Аланин, валин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Лизин, глутамин, аргинин, альфа-метил-глутаминовая кислота  
или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (21)..(21)  
<223> Аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин или не присутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (22)..(22)  
<223> Может присутствовать или не присутствовать

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (23)..(23)  
<223> Изолейцин, валин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (24)..(24)  
<223> Аланин, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин,  
альфа-метил-глутаминовая кислота или не присутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (25)..(25)  
<223> Может присутствовать или не присутствовать

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (26)..(26)  
<223> Аланин, изолейцин, лейцин, валин или не присутствует

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (27)..(27)  
<223> Аланин, лизин, метионин, аргинин или не присутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (28)..(29)  
<223> Может присутствовать или не присутствовать

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (30)..(30)  
<223> Цистеин, лизин или не присутствует

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31)..(40)  
<223> Эта область может охватывать от 2 до 10 остатков, где некоторые  
положения могут не присутствовать

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (41)..(60)  
<223> Эта область может охватывать от 8 до 20 аминокислот, включая  
"KRNRNNIA", или "GPSSGAPPPS", или "GPSSGAPPPSK", или

"HSQGTFTSDYSKYLD", или "HSQGTFTSDYSRYLDK", или  
"HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVK," где некоторые или все положения могут  
отсутствовать

<220>

<223> Смотри описание, как оно было подано, в отношении подробного  
раскрытия замен и предпочтительных воплощений

<400> 55

Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Asn Thr Xaa Gly Gly  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
35 40 45

Xaa  
50 55 60

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### для выделенной заявки

1. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащая:

фармакологически активное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где этот конъюгат производного оксинтомодулина содержит

производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

область Fc иммуноглобулина (Ig); и

непептидильный полимер, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля, поливиниловый спирт, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA), полимолочно-гликолевую кислоту (PLGA); липидный полимер; гиалуроновую кислоту или их комбинацию, и где этот непептидильный полимер ковалентно связывает производное оксинтомодулина и область Fc Ig;

и не содержащий альбумин стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

2. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 1, где стабилизатор дополнительно содержит один/одну или более изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов или аминокислот.

3. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 1 или 2, где область Fc Ig представляет собой область Fc IgG4, предпочтительно область Fc агликозилированного IgG4 человека.

4. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-3, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

5. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-4, где сахарный спирт представляет

собой один или более чем один из маннита, сорбита или глицерина.

**6.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 5, где концентрация сахарного спирта в жидкой композиции составляет 2-15% (масс./об.).

**7.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-6, где буфер представляет собой один или более чем один из цитратного, ацетатного, гистидинового или фосфатного буфера.

**8.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-7, где буфер имеет рН в диапазоне от 4,5 до 7,0.

**9.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 2-8, где изотонический агент представляет собой хлорид натрия.

**10.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-9, где неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер.

**11.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 10, где концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества в жидкой композиции составляет 0,001-0,1% (масс./об.).

**12.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 2-11, где аминокислота представляет собой метионин.

**13.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-12, где стабилизатор содержит буфер, имеющий рН в диапазоне от 4,8 до 6,0, один или более чем один из маннита или сорбита, и полисорбат 20.

**14.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-13, дополнительно содержащая один или более чем один консервант, где этот консервант представляет собой *мета*-крезол, фенол или бензиловый спирт, предпочтительно *мета*-крезол.

**15.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 14, где концентрация консерванта в жидкой композиции составляет 0,001-1% (масс./об.).

**16.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 14, представляющая собой композицию для введения многократных доз.

**17.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащая:

фармакологически эффективное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где этот конъюгат производного оксинтомодулина содержит

производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

область Fc Ig; и

непептидильный полимер, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля, поливиниловый спирт, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA), полимолочно-гликолевую кислоту (PLGA); липидный полимер; гиалуроновую кислоту или их комбинацию, и где этот непептидильный полимер ковалентно связывает производное оксинтомодулина и область Fc Ig;

и 5-50 мМ гистидина; 2-15% (масс./об.) маннита; 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (масс./об.) полисорбата 20.

**18.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п. 17, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

**19.** Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 17 или 18, дополнительно содержащая 0,001-1% (масс./об.) *мета*-крезола.

**20.** Способ получения жидкой композиции по любому из п.п. 1-13, включающий следующие стадии:

а) получение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия; и

б) смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии а), с не содержащим альбумин стабилизатором, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное

поверхностно-активное вещество.

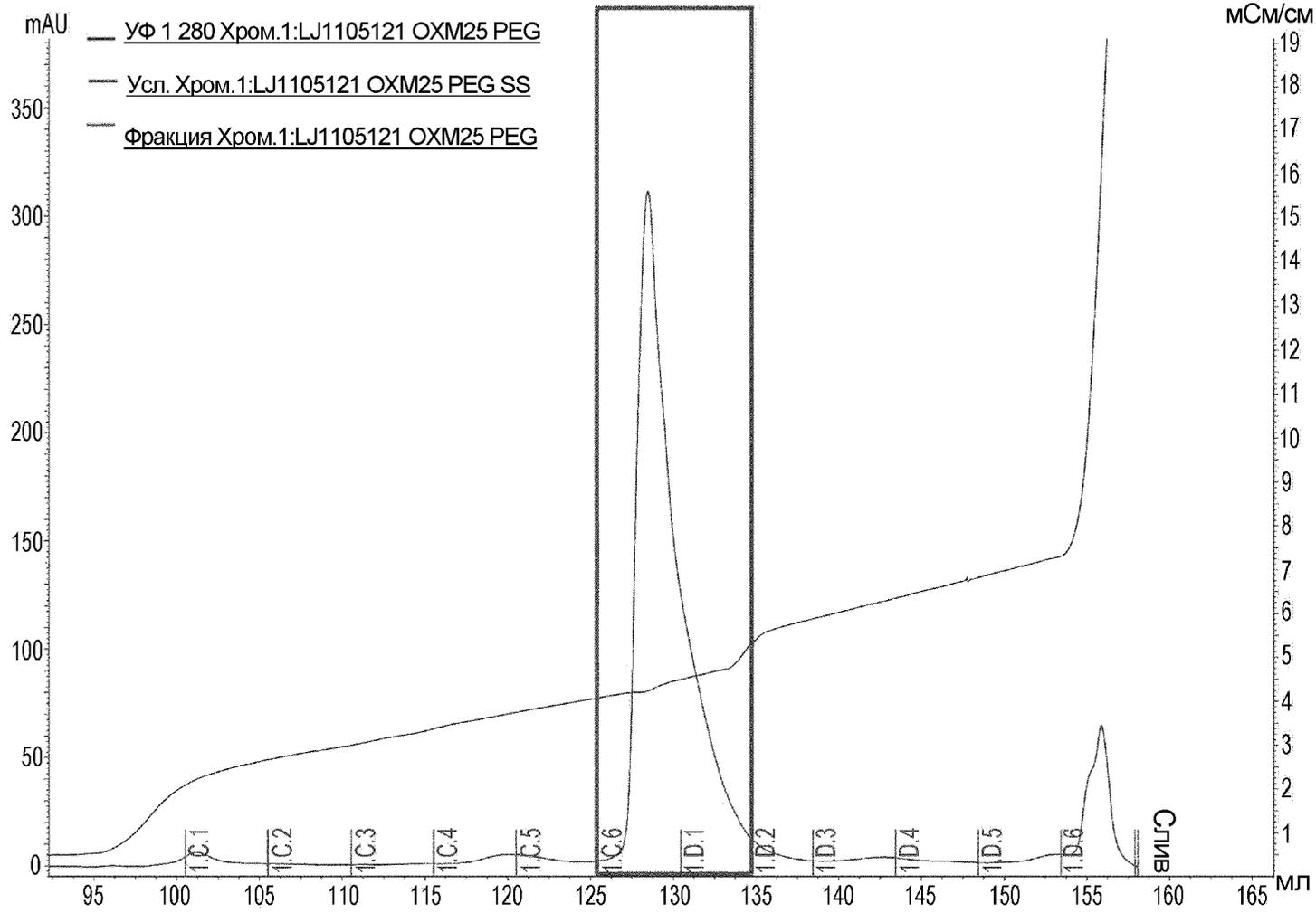
**21.** Способ получения жидкой композиции по п. 17 или 18, включающий следующие стадии:

а) получение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия; и

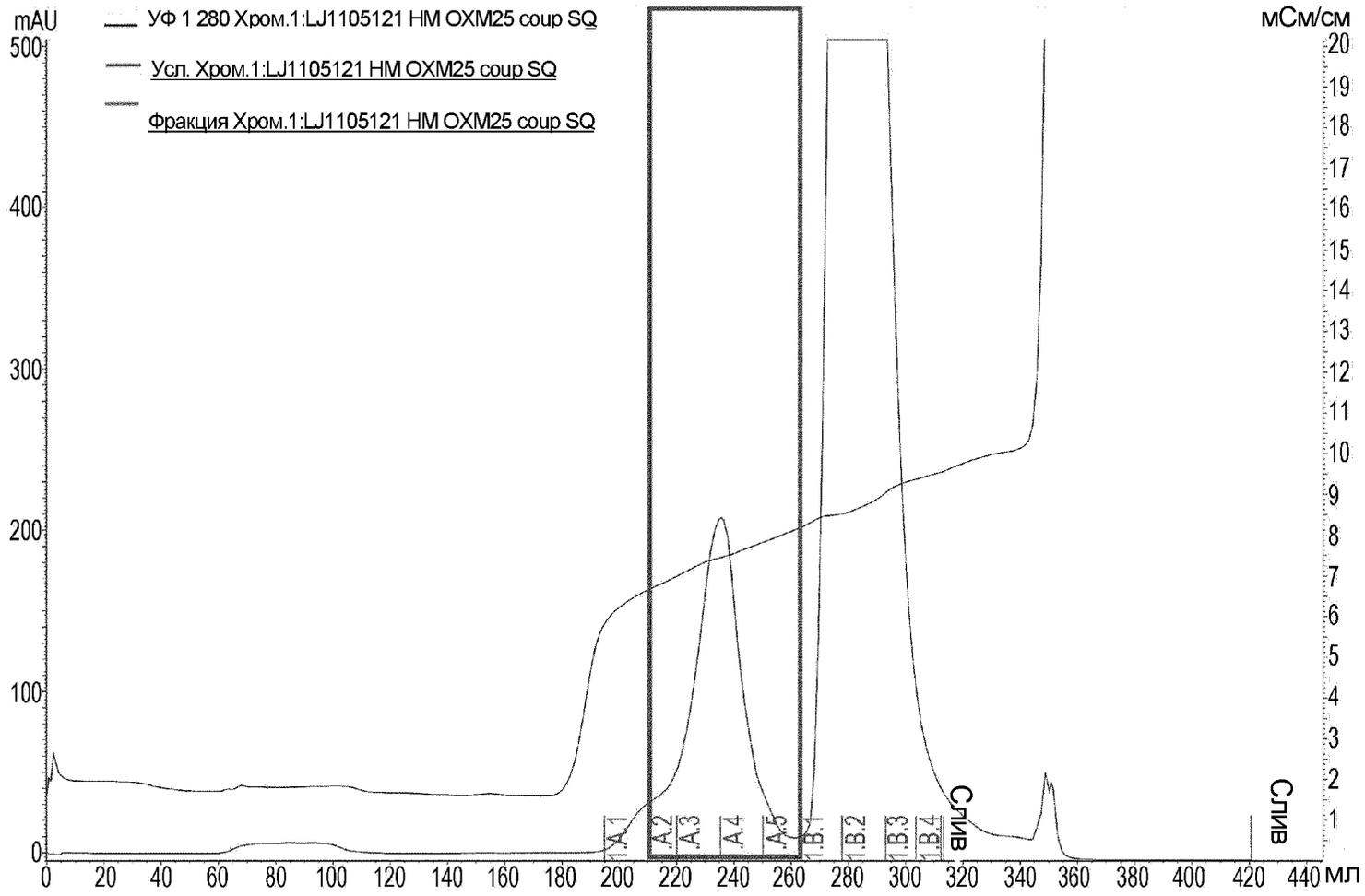
б) смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии а), с 5-50 мМ гистидина; 2-15% (масс./об.) маннита; 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (масс./об.) полисорбата 20.

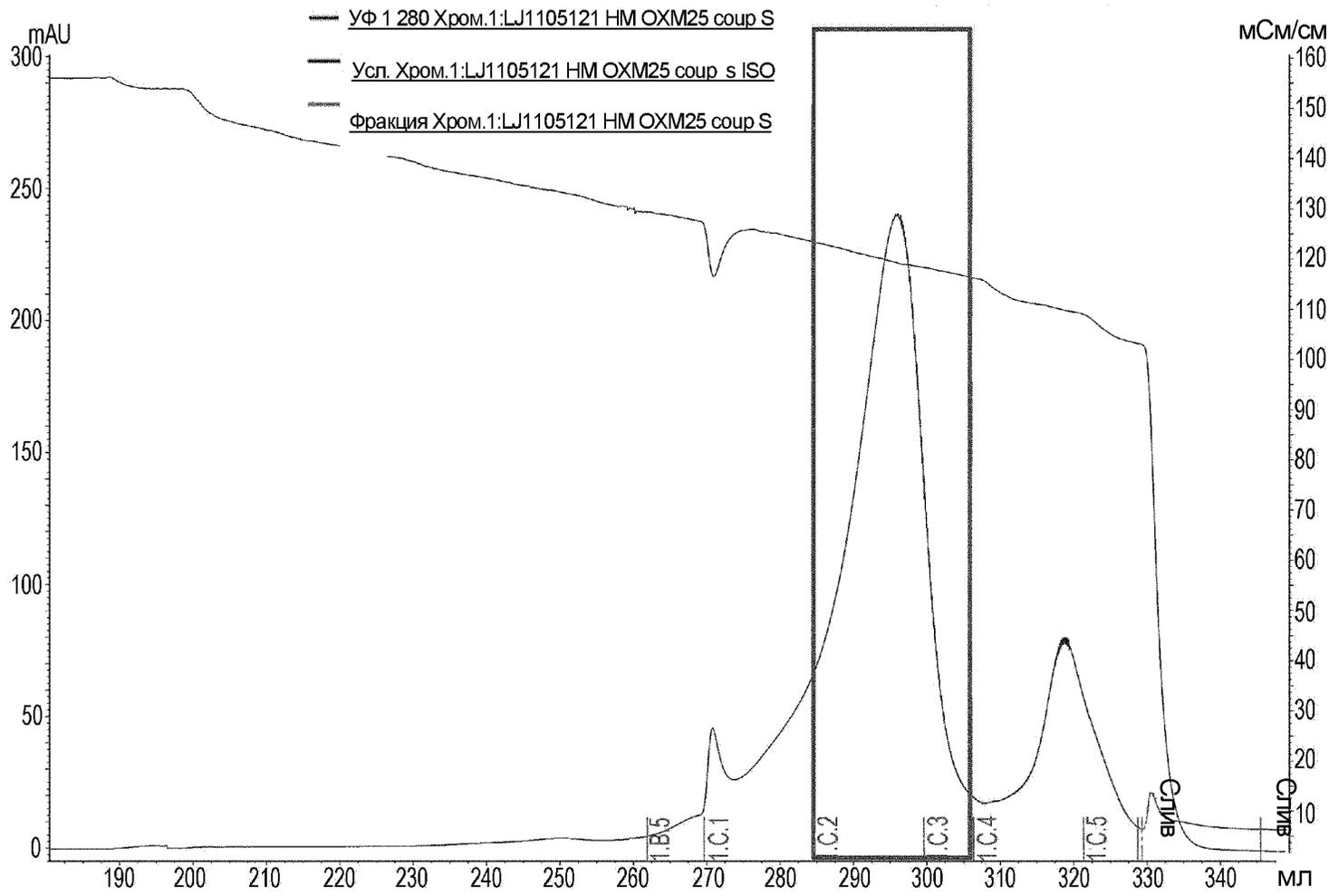
**22.** Способ по п. 20 или 21, дополнительно включающий смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии а), с одним/одной или более изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов, аминокислот, консервантов или их комбинацией.

Фиг. 1а



Фиг. 1b

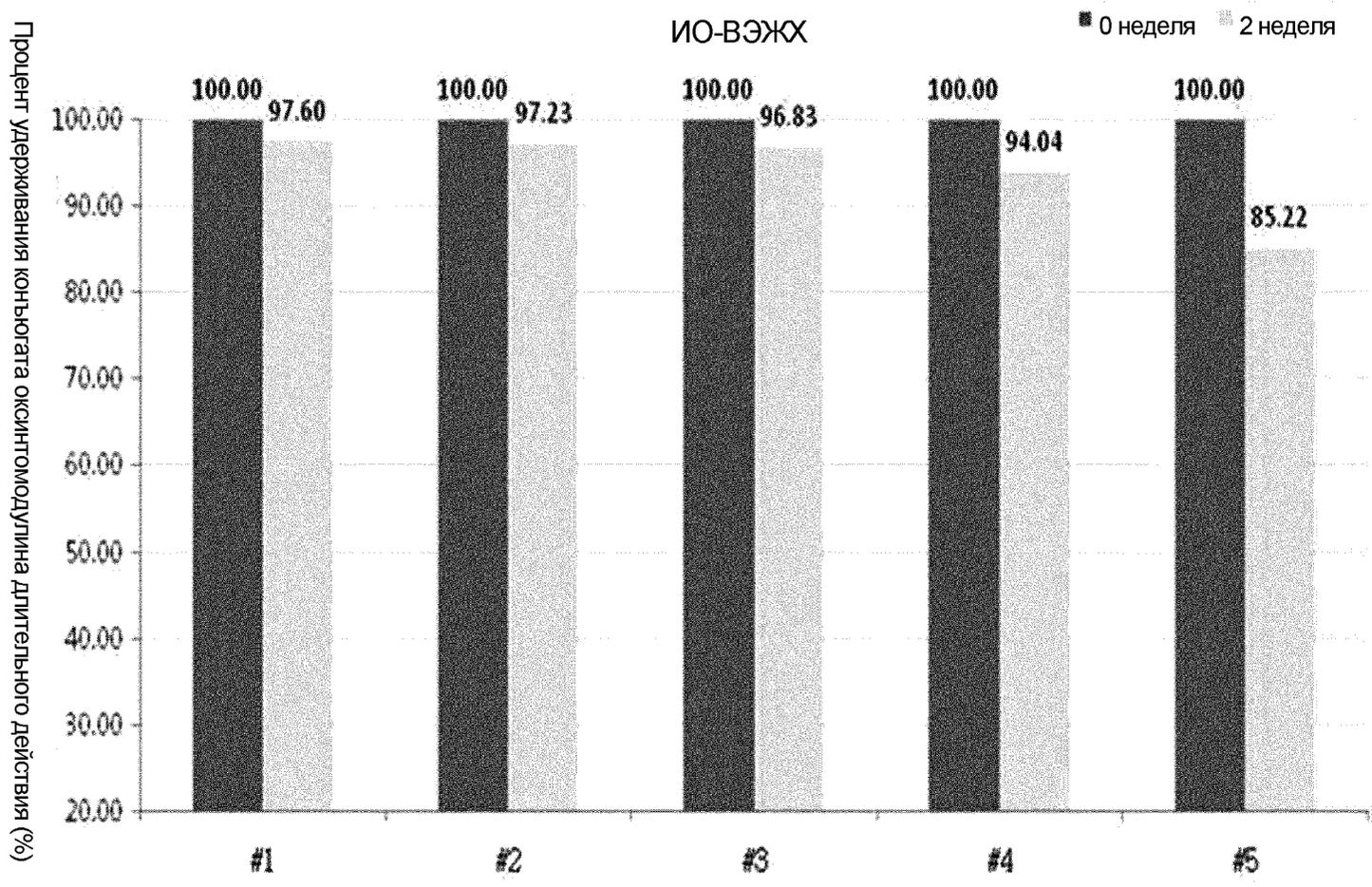


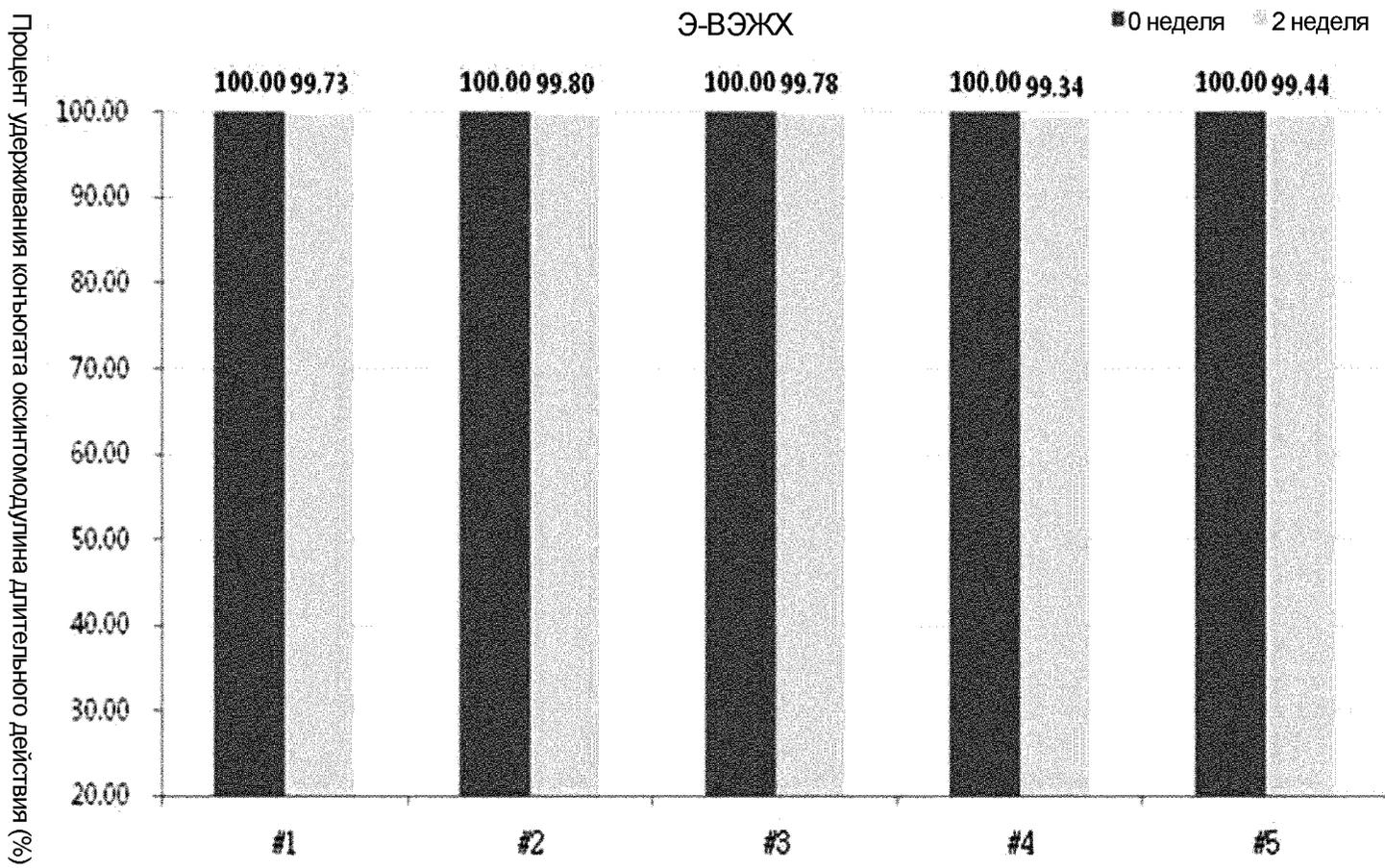


Фиг. 1с

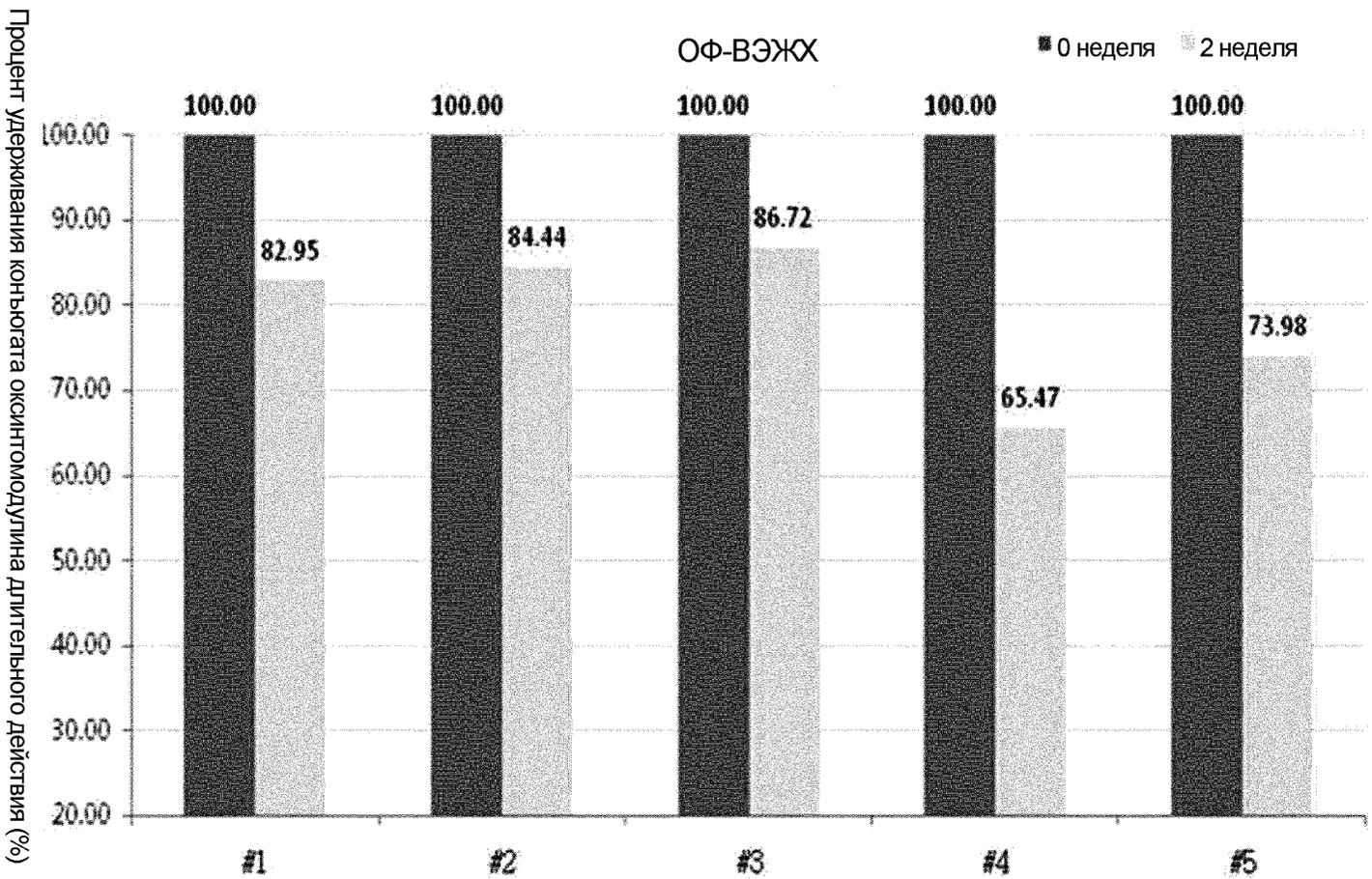
3/24 Жидкая композиция белкового коньюгата,  
 содержащего окситомодулин и фрагмент иммуноглобулина

Фиг. 2а



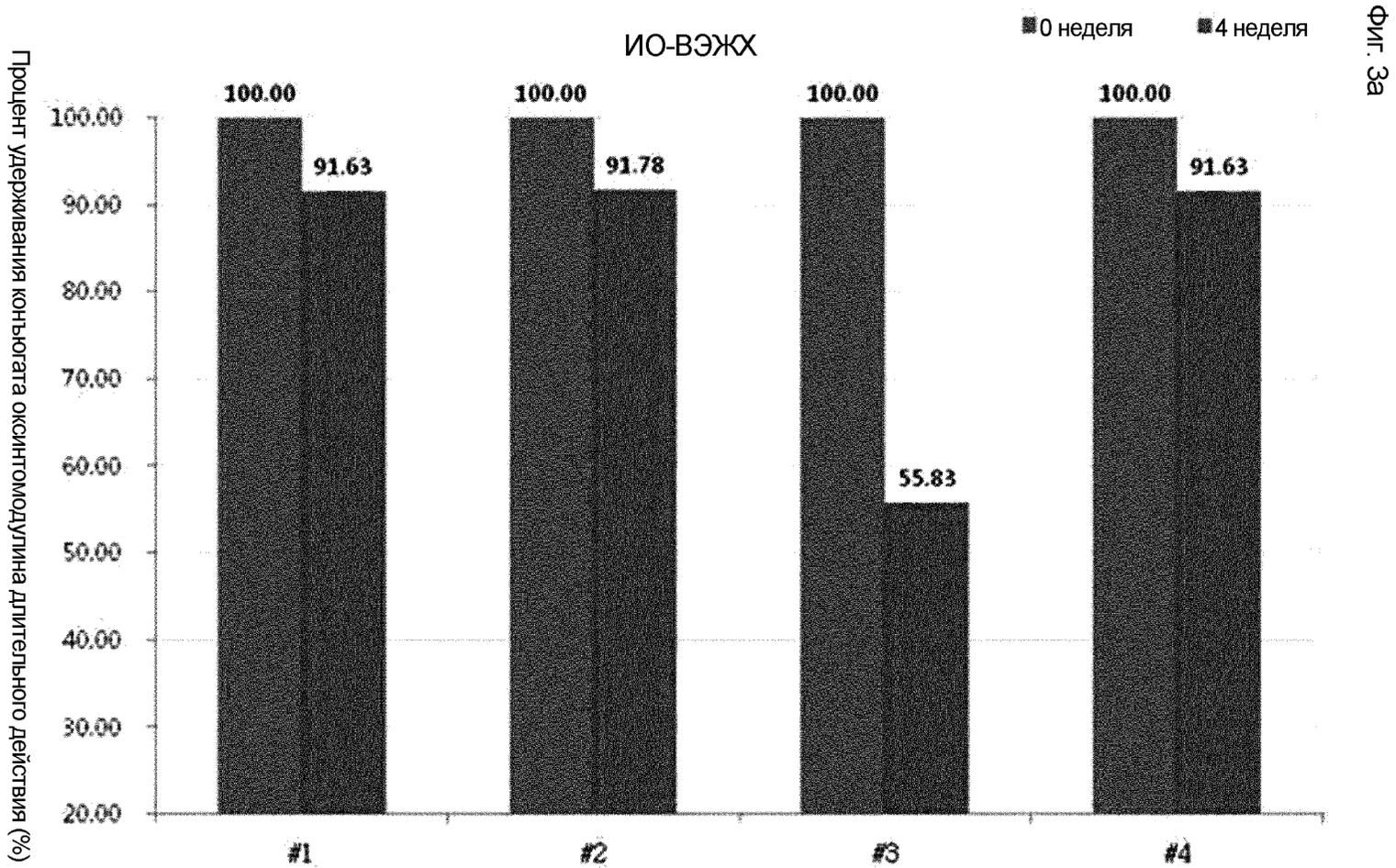


Фиг. 2b



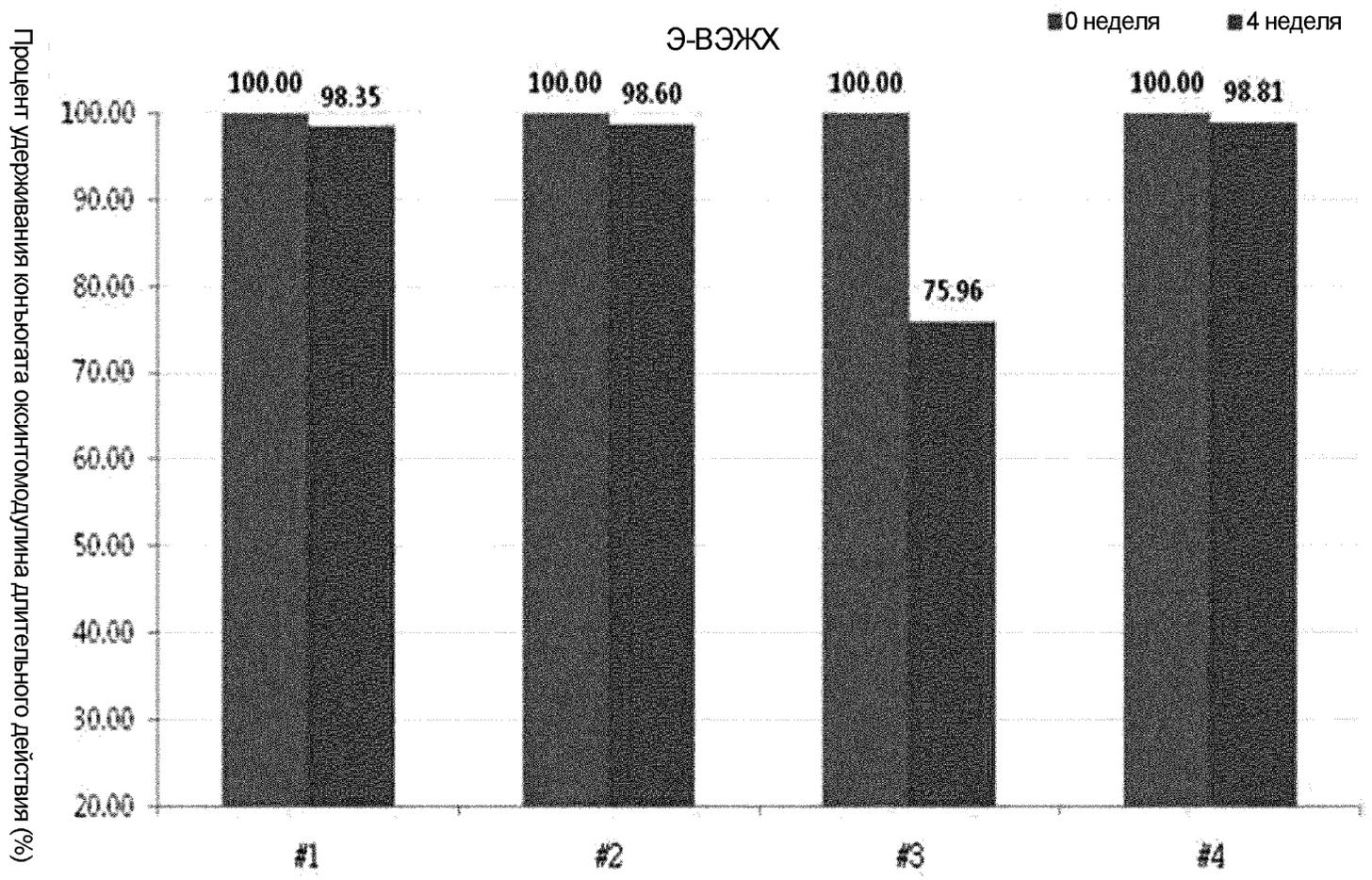
Фиг. 2с

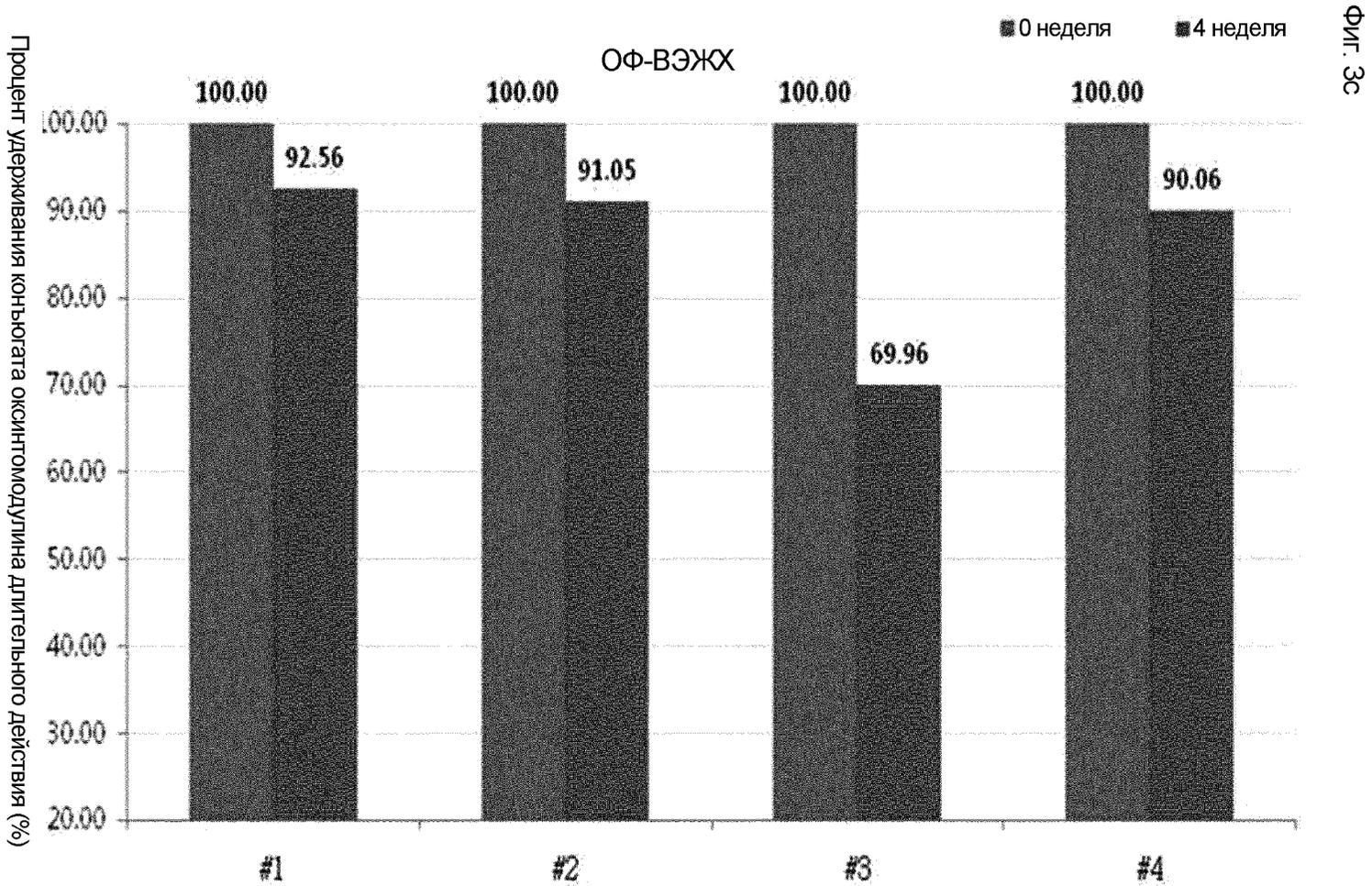
6/24 Жидкая композиция белкового конъюгата,  
содержащего окситомодулин и фрагмент иммуноглобулина



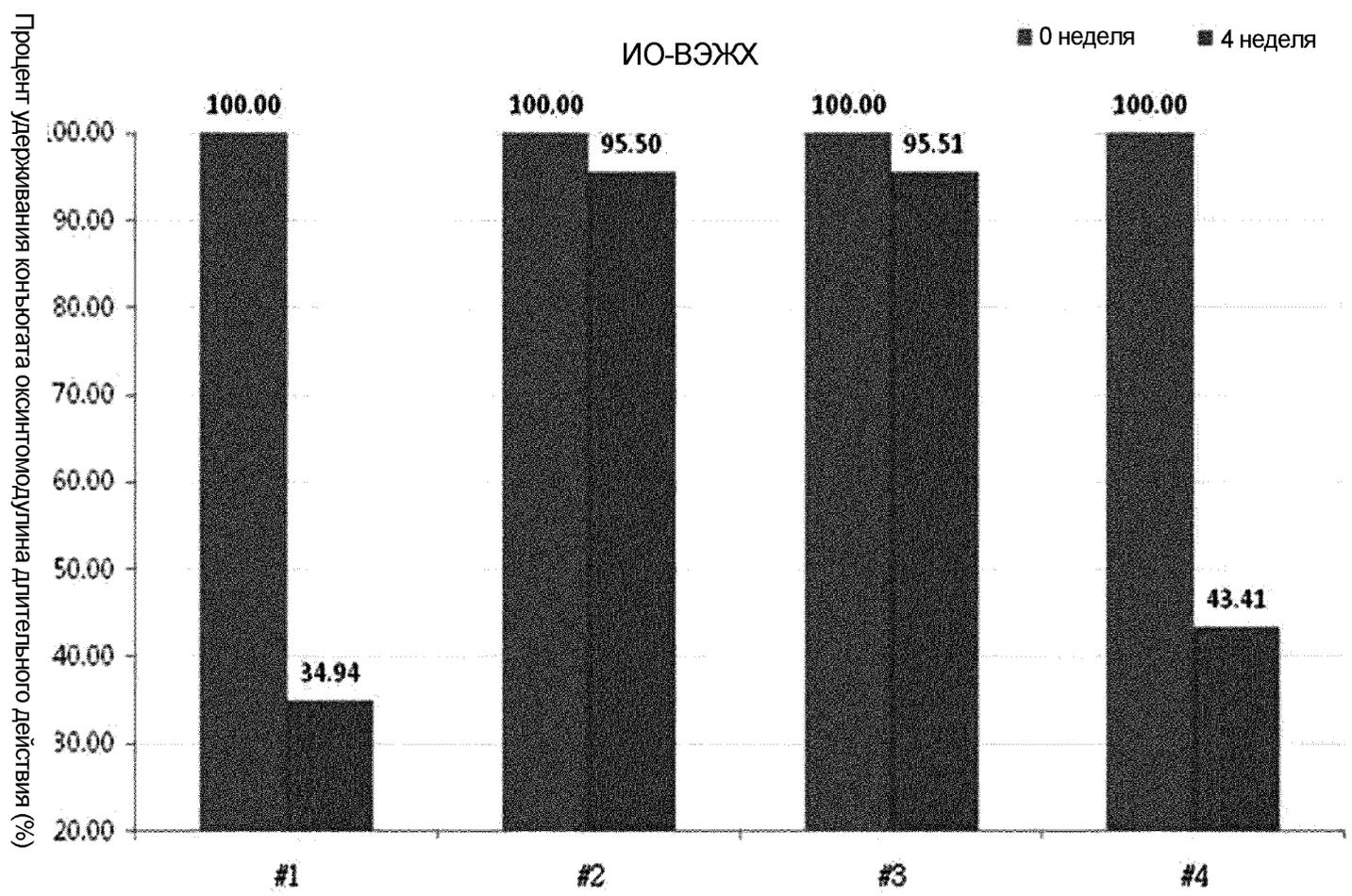
Фиг. 3а

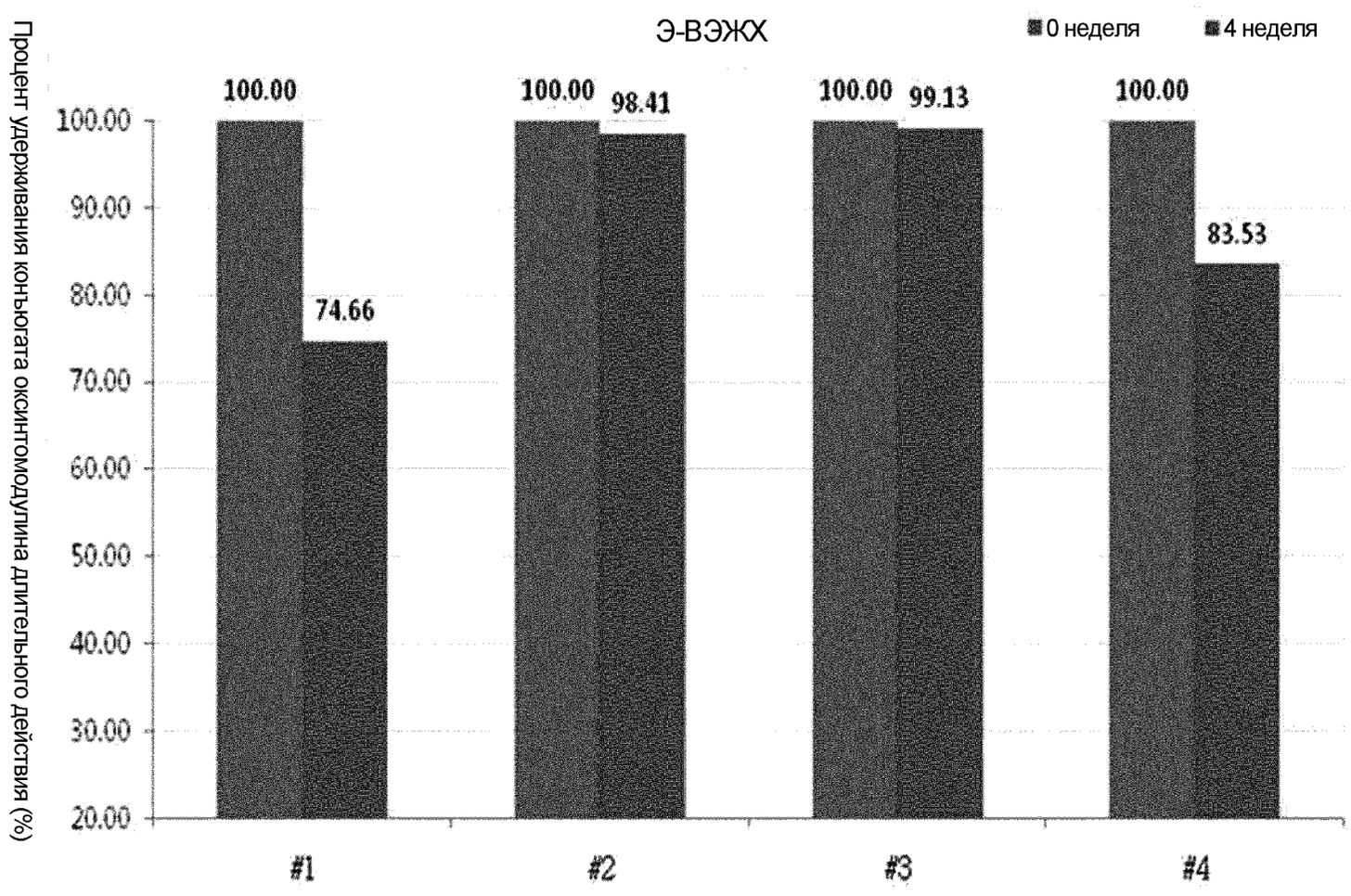
Фиг. 3б





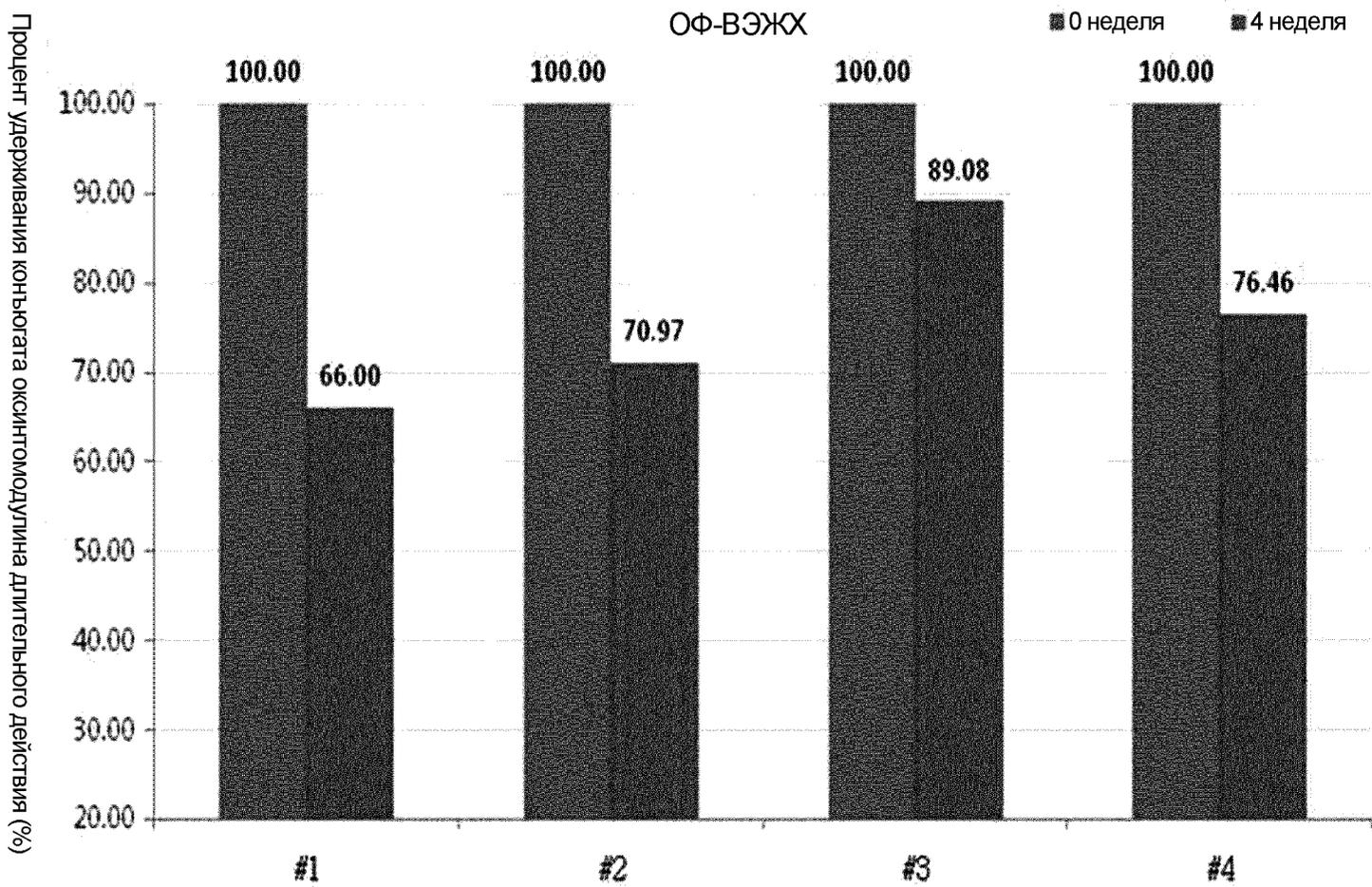
Фиг. 4а

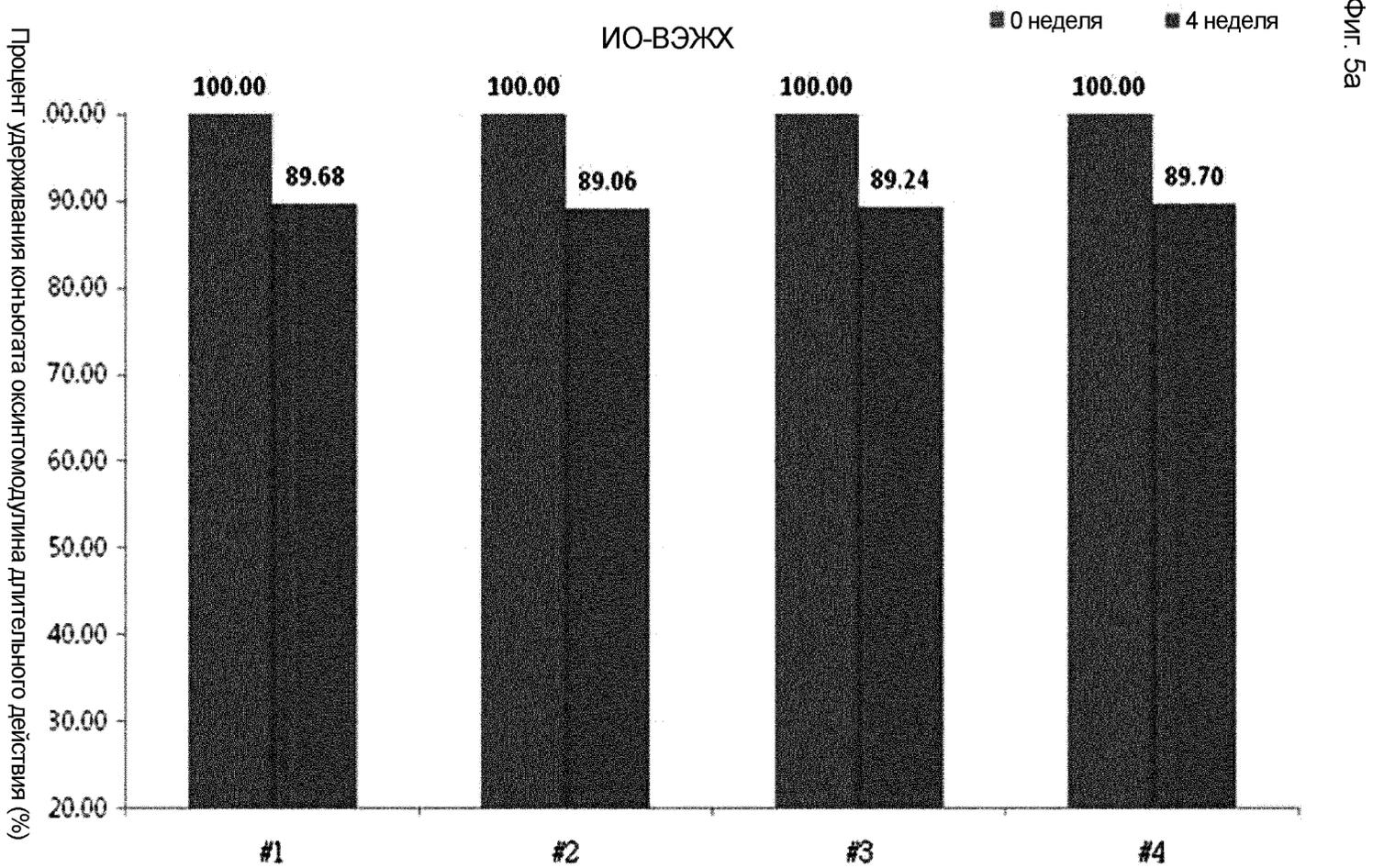


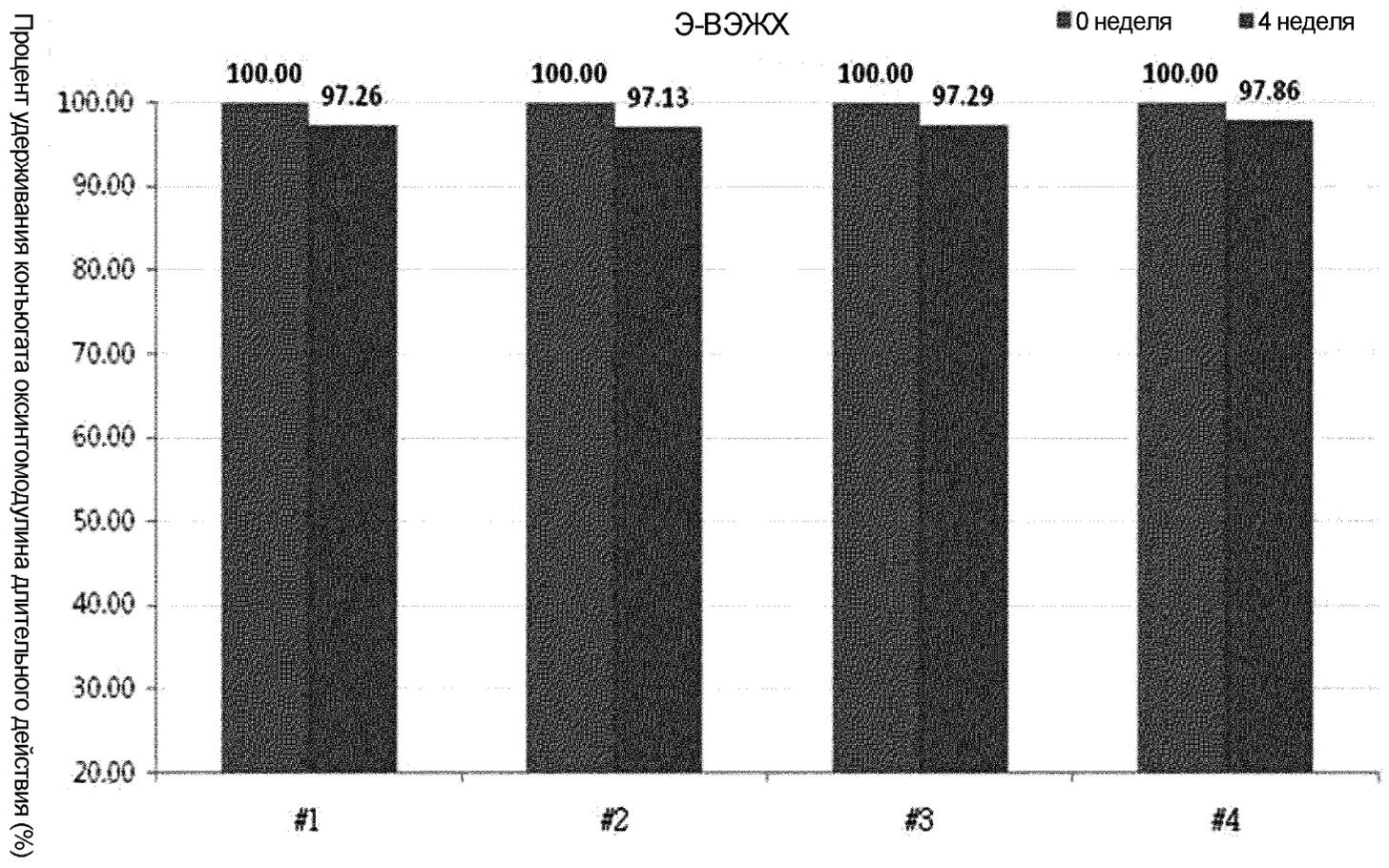


Фиг. 4b

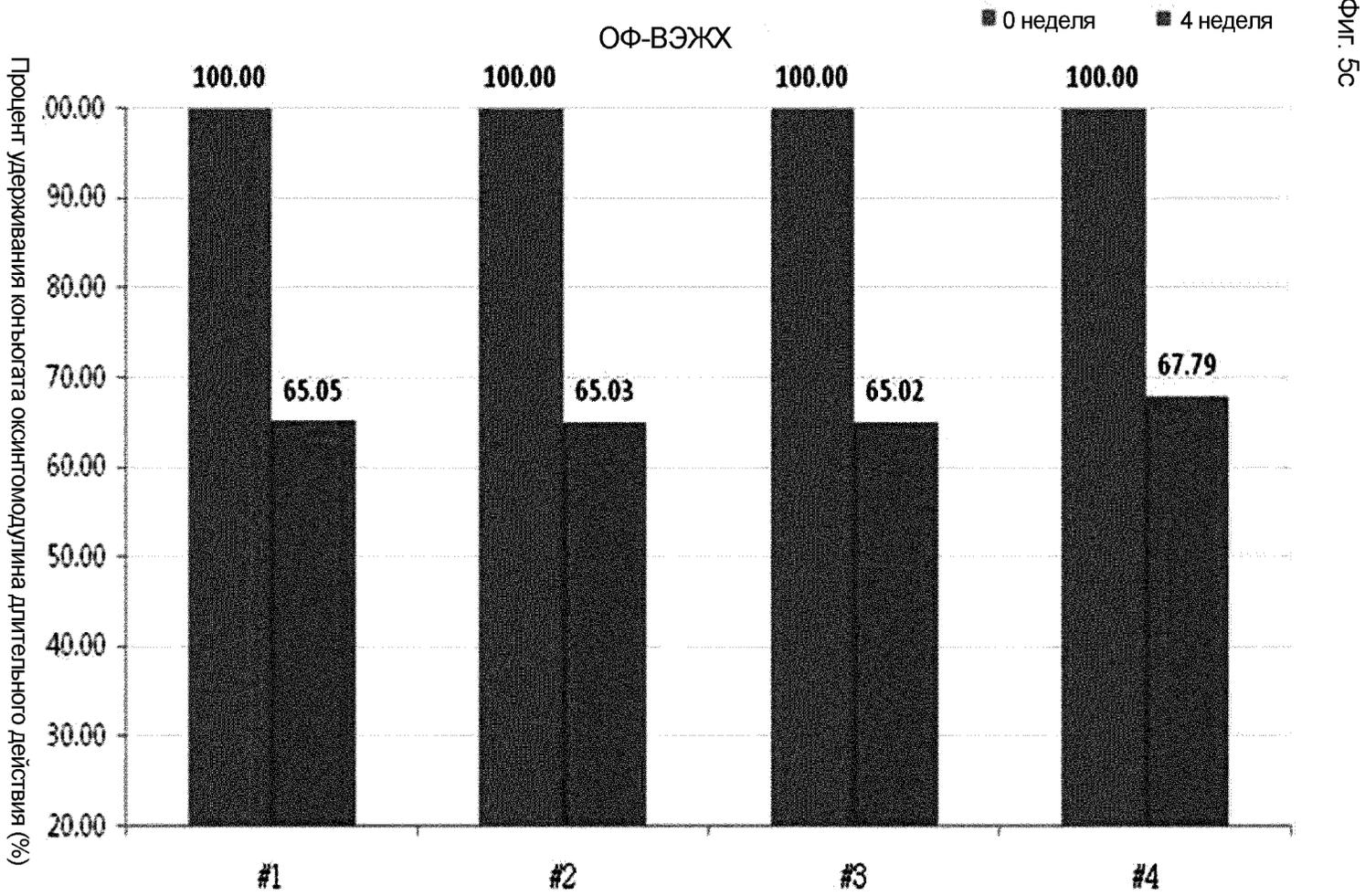
Фиг. 4с

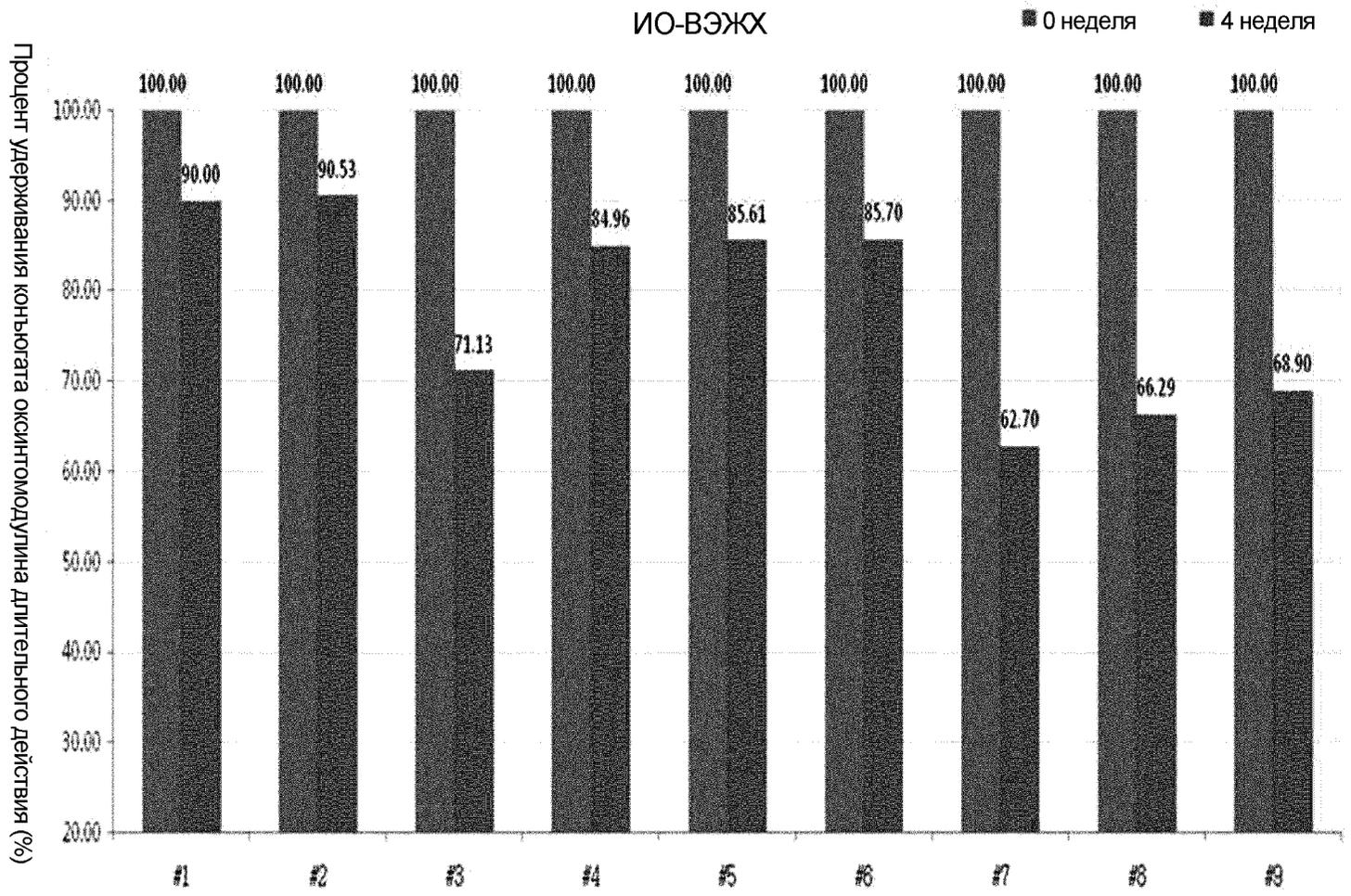






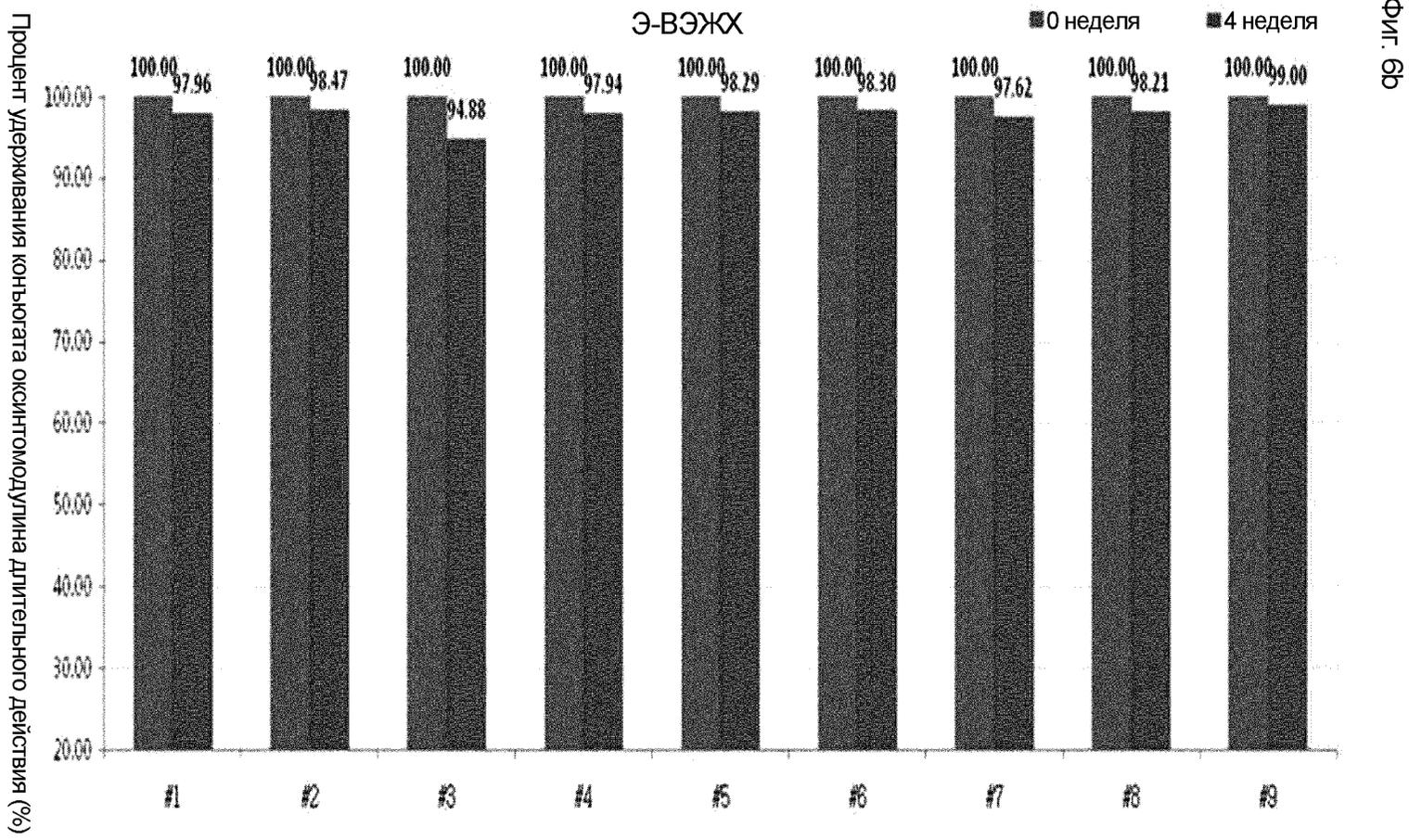
Фиг. 5б

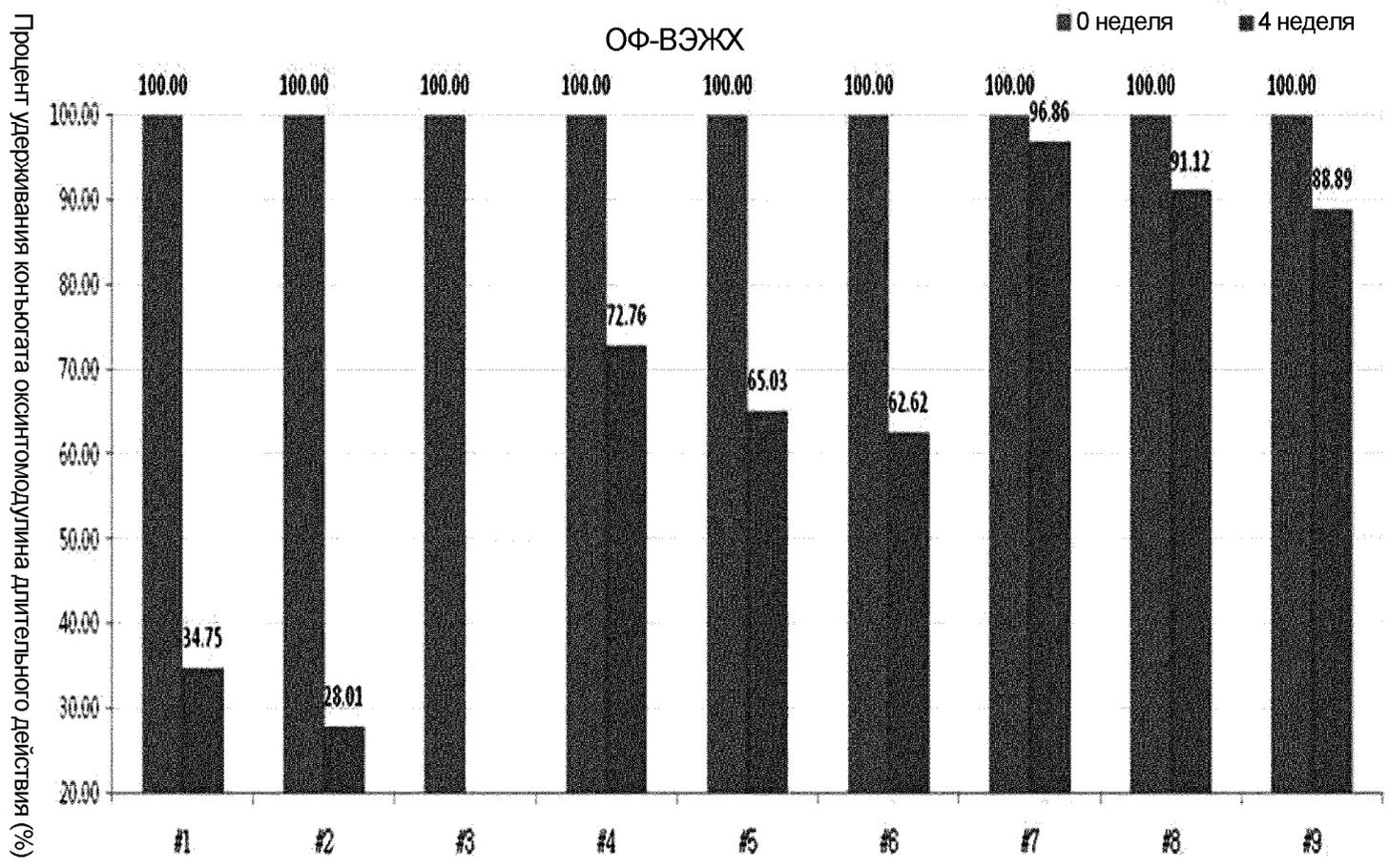




Фиг. 6а

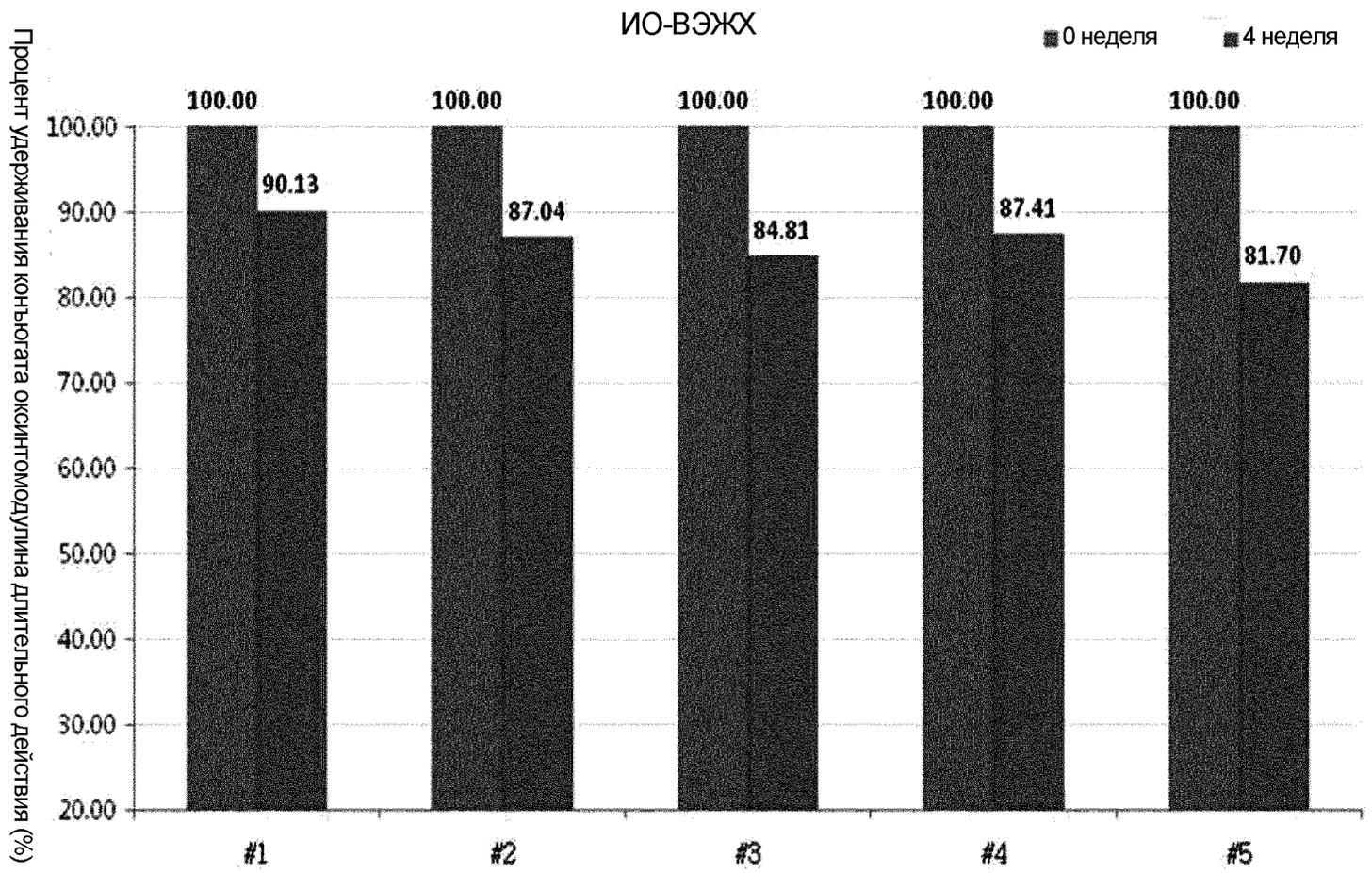
16/24 Жидкая композиция белкового конъюгата,  
содержащего оксимодоулин и фрагмент иммуноглобулина





Фиг. 6С

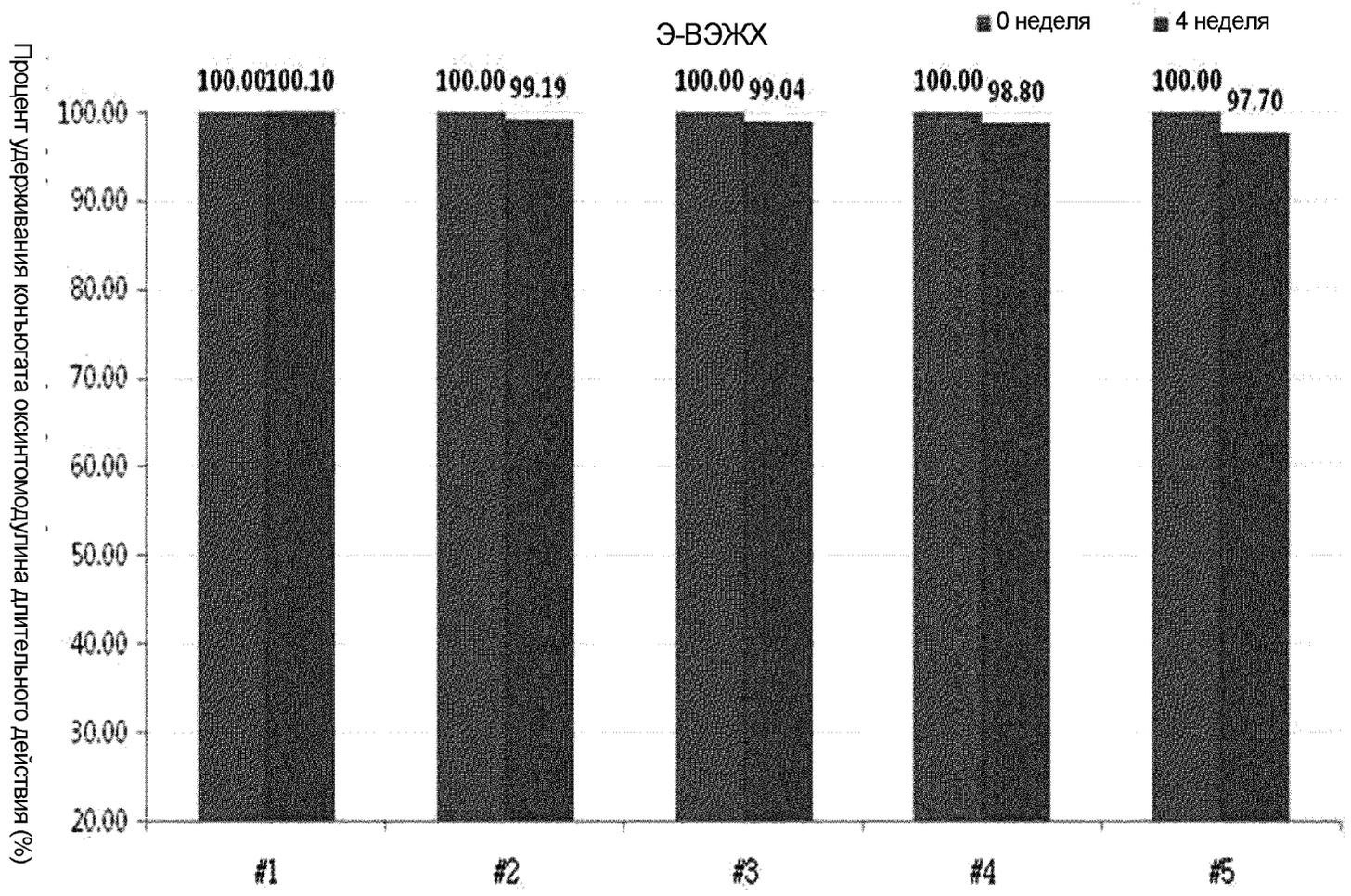
18/24 Жидкая композиция белкового коньюгата,  
содержащего оксигномодулин и фрагмент иммуноглобулина

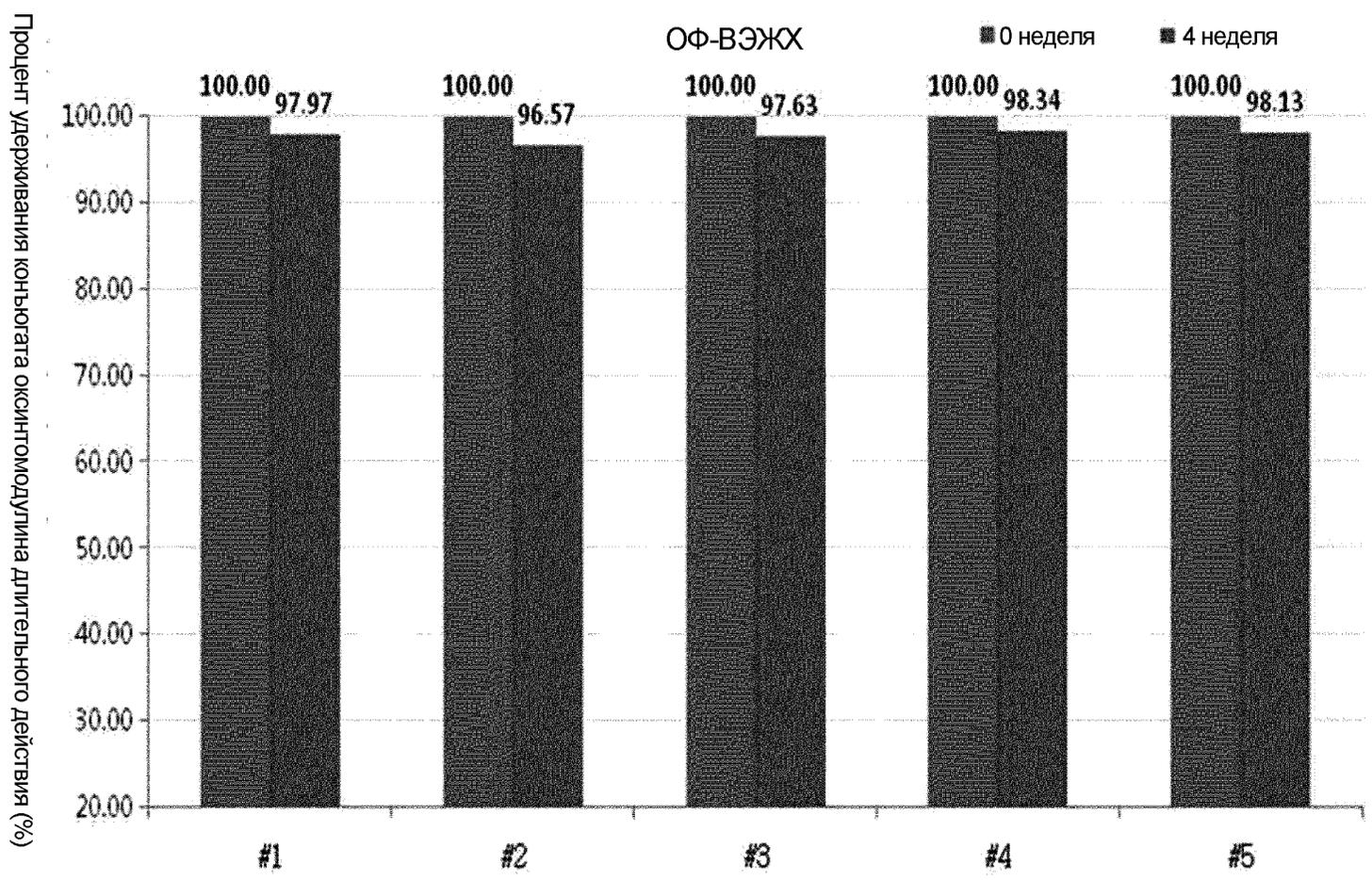


Фиг. 7а

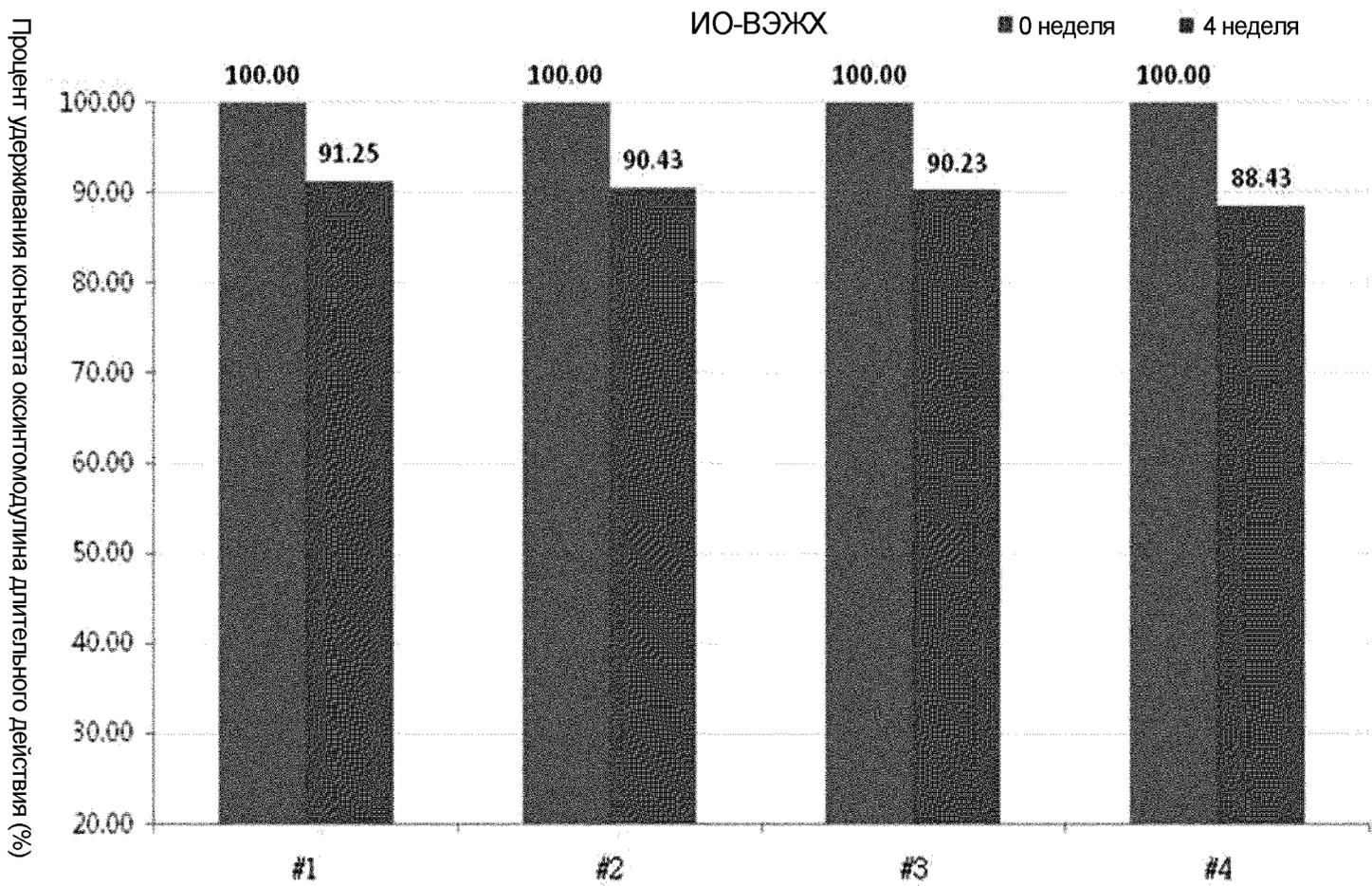
19/24 Жидкая композиция белкового конъюгата,  
содержащего оксимодолин и фрагмент иммуноглобулина

Фиг. 7б

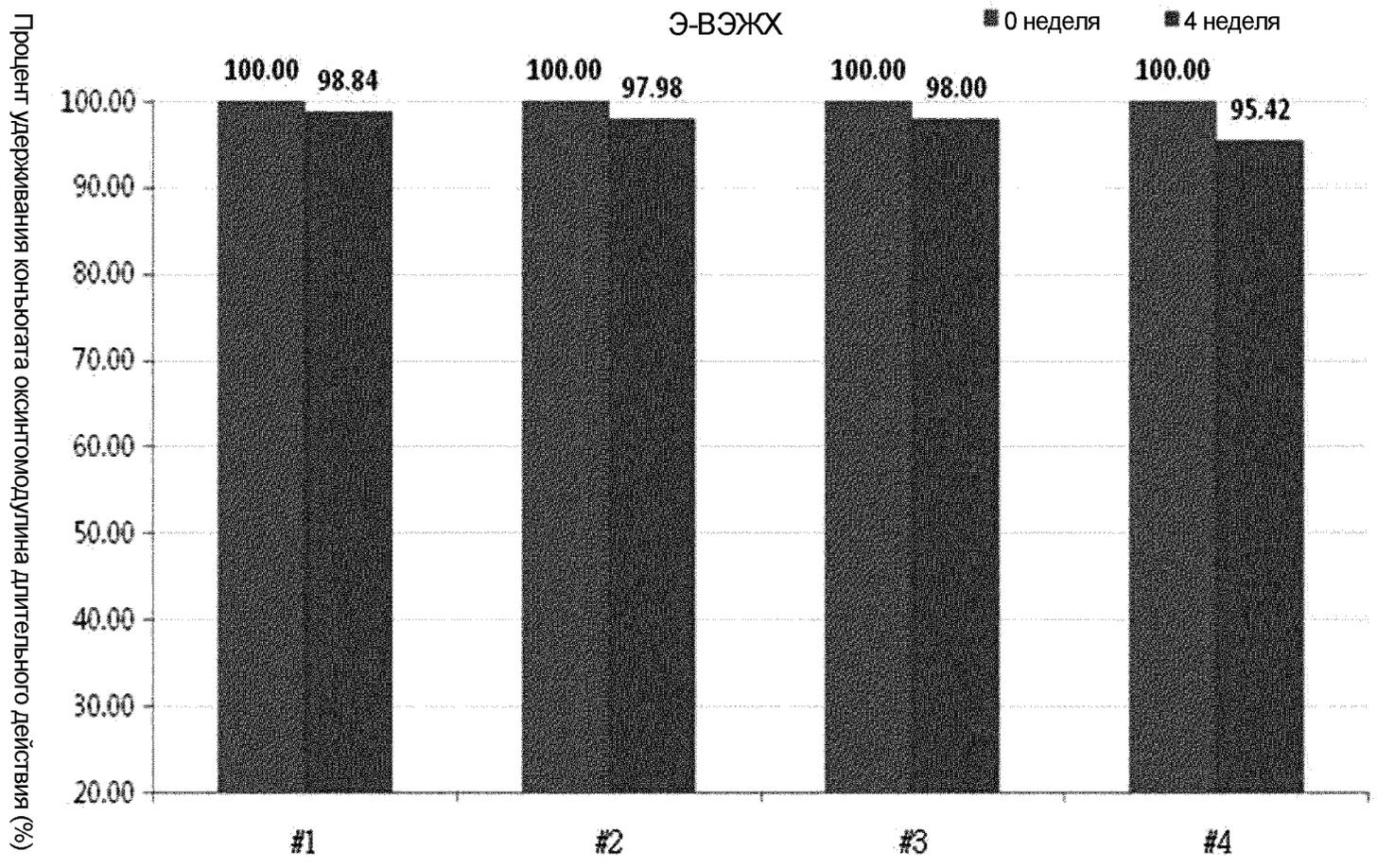




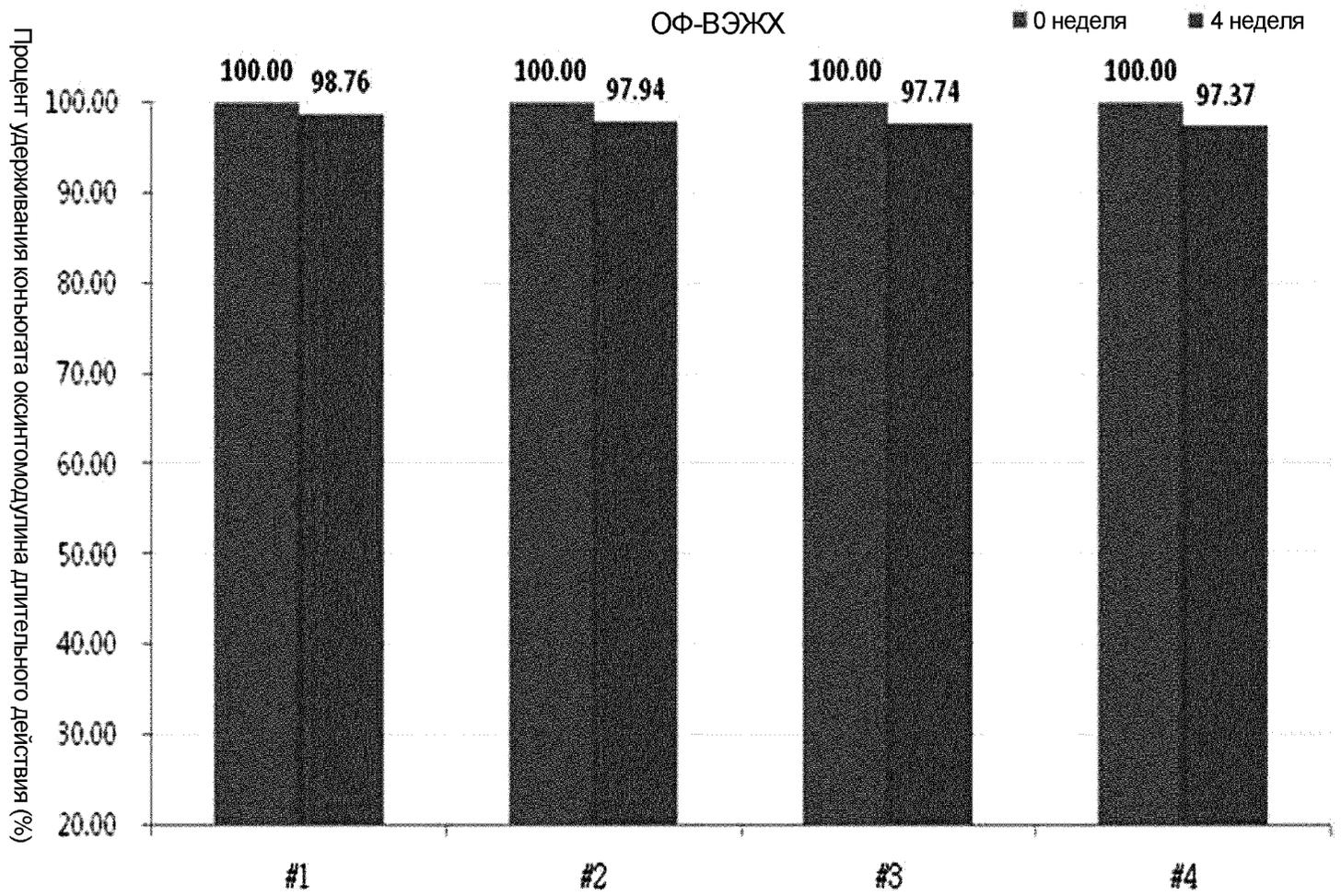
Фиг. 7С



Фиг. 8а



Фиг. 8в



Фиг. 8С

24/24 Жидкая композиция белкового конъюгата,  
содержащего оксимодулин и фрагмент иммуноглобулина

201791143

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/KR2013/009986**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 9/08(2006.01)i, A61K 38/26(2006.01)i, C07K 14/605(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/08; A61K 39/395; A61P 5/50; A61K 47/30; C07K 1/10; A61K 38/26; C07K 1/18; A61K 47/48; A61K 31/4164; C07K 14/605

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models  
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) &amp; Keywords: oxyntomodulin, conjugate, immunoglobulin, Fc region

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0043208 A (HANMI SCIENCE, INC) 4 May 2012 See abstract; paragraphs [0057]-[0064], [0098], [0099]; and claims 1-24.	1-31
A	US 8263084 B2 (SONG, D. H. et al.) 11 September 2012 See abstract; column 3, lines 50-67; and claims 1-6.	1-31
A	WO 2012-011752 A2 (HANMI HOLDINGS CO., LTD) 26 January 2012 See abstract and claims 1-45.	1-31
A	KR 10-2010-0105494 A (HANMI HOLDINGS CO., LTD) 29 September 2010 See abstract; paragraphs [0017]-[0019], [0047], [0048]; and claims 1-15.	1-31

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 2014 (29.01.2014)

Date of mailing of the international search report

29 January 2014 (29.01.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City,  
302-701, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-472-7140

Authorized officer

CHOI, Sung Hee

Telephone No. +82-42-481-8740



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/KR2013/009986**

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper  
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/009986

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-2012-0043208 A	04/05/2012	None	
US 8263084 B2	11/09/2012	AU 2004-282984 A1	14/07/2005
		AU 2004-282984 B2	14/07/2011
		AU 2004-282985 A1	30/06/2005
		AU 2004-282985 B2	14/08/2008
		AU 2008-330315 A1	04/06/2009
		CA 2512657 A1	26/05/2005
		CA 2512933 A1	26/05/2005
		CA 2512933 C	06/12/2011
		CA 2706627 A1	04/06/2009
		CN 101878036 A	03/11/2010
		CN 1723219 A	18/01/2006
		CN 1723219 B	26/05/2010
		CN 1723220 A	18/01/2006
		EP 1682581 A1	26/07/2006
		EP 1682581 B1	25/04/2012
		EP 1682582 A1	26/07/2006
		EP 1682582 B1	31/08/2011
		EP 1682583 A1	26/07/2006
		EP 1682583 B1	11/01/2012
		EP 1682584 A1	26/07/2006
		EP 1682584 B1	17/04/2013
		EP 2227243 A2	15/09/2010
		EP 2239273 A1	13/10/2010
		EP 2239273 B1	09/10/2013
		EP 2256134 A1	01/12/2010
		JP 2007-531513 A	08/11/2007
		JP 2007-532098 A	15/11/2007
		JP 2007-536211 A	13/12/2007
		JP 2007-537992 A	27/12/2007
		JP 2011-505355 A	24/02/2011
		JP 2012-001560 A	05/01/2012
		JP 2012-224635 A	15/11/2012
		JP 4762904 B2	31/08/2011
		JP 4870569 B2	08/02/2012
		JP 5216216 B2	19/06/2013
		JP 5226080 B2	03/07/2013
		KR 10-0725314 B1	07/06/2007
		KR 10-0725315 B1	07/06/2007
		KR 10-0775343 B1	08/11/2007
		KR 10-1135244 B1	24/04/2012
		KR 10-2005-0047030 A	19/05/2005
		KR 10-2006-0054252 A	22/05/2006
		US 2006-0269553 A1	30/11/2006
		US 2006-0275254 A1	07/12/2006
		US 2006-0276633 A1	07/12/2006
		US 2007-0041967 A1	22/02/2007
		US 2008-0085862 A1	10/04/2008

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/009986

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2008-0124347 A1	29/05/2008
		US 2009-0238838 A1	24/09/2009
		US 2010-0255014 A1	07/10/2010
		US 2010-0261248 A1	14/10/2010
		US 2010-0330108 A1	30/12/2010
		US 2011-0245472 A1	06/10/2011
		US 2013-0288333 A1	31/10/2013
		US 7736653 B2	15/06/2010
		US 7737260 B2	15/06/2010
		US 8029789 B2	04/10/2011
		US 8110665 B2	07/02/2012
		WO 2005-047334 A1	26/05/2005
		WO 2005-047335 A1	26/05/2005
		WO 2005-047336 A1	26/05/2005
		WO 2005-047337 A1	26/05/2005
		WO 2009-069983 A2	04/06/2009
		WO 2009-069983 A3	20/08/2009
WO 2012-011752 A2	26/01/2012	AR 082320 A1	28/11/2012
		EP 2595648 A2	29/05/2013
		JP 2013-537525 A	03/10/2013
		KR 10-2012-0010146 A	02/02/2012
		US 2013-122023 A1	16/05/2013
		WO 2012-011752 A3	31/05/2012
KR 10-2010-0105494 A	29/09/2010	AR 075913 A1	04/05/2011
		AU 2011-225523 A1	10/11/2011
		AU 225523 B2	24/05/2012
		CA 2755395 A1	23/09/2010
		CN 102369209 A	07/03/2012
		EP 2408800 A2	25/01/2012
		IL 215165 D	29/12/2011
		JP 2012-520873 A	10/09/2012
		KR 10-1164453 B1	11/07/2012
		MX 2011009803 A	30/09/2011
		SG 174320 A1	28/10/2011
		TW 201036640 A	16/10/2010
		US 2012-0003712 A1	05/01/2012
		WO 2010-107256 A2	23/09/2010
		WO 2010-107256 A3	17/03/2011