

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035527**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.06.30**

**(21)** Номер заявки  
**201791333**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.12.30**

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

---

**(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ГЛЮКАГОНА С УЛУЧШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ**

---

**(31)** **10-2014-0193800**

**(32)** **2014.12.30**

**(33)** **KR**

**(43)** **2017.12.29**

**(86)** **PCT/KR2015/014422**

**(87)** **WO 2016/108586 2016.07.07**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Ким Джун Гук, Ли Джон Мин, Ким Сан Юн, Бэ Сан Мин, Джун Сун Юб, Квон Се Чан (KR)**

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

**(56)** **WO-A1-2011117415**

**WO-A1-2014170496**

**CHABENNE et al., "A Glucagon Analog Chemically stabilized for Immediate Treatment of Life Threatening Hypoglycemia" Molecular Metabolism, Vol. 3, pp. 293-300 (January 2014). See the entire document**

**US-B2-8507428**

**JP-B2-5476304**

---

**(57)** Изобретение относится к новому пептиду - производному глюкагона и к композиции для предупреждения или лечения гипогликемии и ожирения, содержащей этот пептид в качестве активного ингредиента. Производное глюкагона по настоящему изобретению сохраняет активность в отношении рецепторов глюкагона и обладает улучшенными физическими свойствами благодаря измененной изоэлектрической точке (pI) и, таким образом, может улучшать соблюдение пациентом режима и схемы лечения при использовании в качестве лекарственного средства против гипогликемии и пригодно для введения в комбинации с другими лекарственными средствами против ожирения. Соответственно, производное глюкагона по настоящему изобретению может быть эффективно использовано в предупреждении или лечении гипогликемии и ожирения.

---

**B1**

**035527**

**035527**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к новым производным глюкагона, обладающим улучшенными физическими свойствами благодаря изменению изоэлектрической точки (pI), и к композиции для предупреждения или лечения гипогликемии и ожирения, содержащей такое производное в качестве активного ингредиента.

### Предшествующий уровень техники

Последние экономические достижения и изменения образа жизни сопровождаются большими изменениями в пищевых привычках. В частности, занятые люди сегодня имеют избыточную массу тела и ожирение из-за высококалорийной пищи и недостаточной физической нагрузки. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщает, что более одного миллиарда взрослых во всем мире имеют избыточную массу тела, среди них более трех миллионов пациентов имеют клинический диагноз тяжелое ожирение, и 25000 человек ежегодно умирают от заболеваний, связанных с избыточной массой тела или ожирением (World Health Organization, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

Избыточная масса тела и ожирение отвечают за повышение уровней артериального давления и холестерина и вызывают или ухудшают различные заболевания, такие как сердечные заболевания, диабет, артрит и т.д. Кроме того, проблема ожирения также становится основной причиной увеличения заболеваемости атеросклерозом, гипертонией, гиперлипидемией или сердечными заболеваниями у детей или подростков, а также у взрослых. Однако ожирение нелегко лечить, потому что оно является сложным заболеванием, связанным с механизмами контроля аппетита и энергетическим обменом. Соответственно, для лечения ожирения требуются не только собственные усилия пациента, но и способ, способный лечить аномальные механизмы, связанные с контролем аппетита и энергетическим обменом. Таким образом, были предприняты усилия по разработке лекарственных средств для лечения аномальных механизмов.

В результате этих усилий были разработаны такие лекарственные средства, как Rimonabant (Sanofi-Aventis), Sibutramin (Abbott), Contrave (Takeda) и Orlistat (Roche), но они имеют такие недостатки, как серьезные нежелательные явления или очень слабое действие против ожирения. Например, согласно сообщениям, Rimonabant приводит к нежелательному явлению в виде расстройства центральной нервной системы, Sibutramine и Contrave продемонстрировали сердечно-сосудистые нежелательные явления и Orlistat обеспечивал только примерно 4 кг потери массы тела при приеме в течение 1 года. Соответственно, не существует терапевтических средств против ожирения, которые можно безопасно назначать пациентам с ожирением.

Было проведено множество обширных исследований для разработки новых терапевтических средств против ожирения, которые могут решить проблемы традиционных препаратов против ожирения. В последнее время большое внимание привлекают производные глюкагона. Глюкагон продуцируется поджелудочной железой, когда уровни глюкозы в крови снижаются в результате действия других лекарственных средств или заболеваний или недостатков гормонов или ферментов. Глюкагон стимулирует расщепление гликогена в печени и облегчает высвобождение глюкозы для повышения уровня глюкозы в крови до нормального диапазона. В дополнение к эффекту повышения уровня глюкозы в крови глюкагон подавляет аппетит и активирует гормоночувствительную липазу адипоцитов для облегчения липолиза, тем самым демонстрируя эффект против ожирения. Однако использование глюкагона в качестве терапевтического агента ограничено из-за его низкой растворимости и его свойства осаждаться при нейтральном pH.

Одно из производных глюкагона, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), разрабатывается как терапевтический агент для лечения гипергликемии у пациентов с диабетом. GLP-1 обладает функциями стимулирования синтеза и секреции инсулина, ингибирования секреции глюкагона, замедления опорожнения желудка, увеличения утилизации глюкозы и снижение потребления пищи.

Сообщалось также, что эксендин-4, полученный из яда ящерицы и имеющий примерно 50%-ную гомологию аминокислот с GLP-1, активирует рецептор GLP-1, тем самым уменьшая гипергликемию у пациентов с диабетом. Однако сообщалось, что препараты против ожирения, содержащие GLP-1, демонстрируют такие нежелательные явления, как рвота и тошнота.

Поэтому в качестве альтернативы GLP-1 большое внимание было уделено оксинтомодулину, который может связываться с обоими рецепторами двух пептидов, GLP-1 и глюкагона. Оксинтомодулин представляет собой пептид, полученный из предшественника глюкагона, преглюкагона, и имеющий функции снижения потребления пищи и повышения чувства насыщения от GLP-1, а также обладающий липолитической активностью как глюкагон, что тем самым увеличивает его эффективность в терапии против ожирения.

Однако оксинтомодулин или его производные имеют серьезный недостаток, заключающийся в том, что для лечения ожирения ежесуточно следует вводить избыточное количество лекарственного средства из-за его низкой эффективности и короткого периода полувыведения *in vivo*.

Кроме того, когда обе активности GLP-1 и глюкагона присутствуют в одном пептиде, соотношение их активностей становится фиксированным и поэтому трудно использовать двойной агонист с различными соотношениями. Соответственно, комбинированная терапия, способная использовать различные

соотношения активностей путем регулирования содержания GLP-1 и глюкагона, может быть более эффективной.

Однако для комбинированной терапии требуется улучшить физические характеристики глюкагона, который агрегирует при нейтральном pH и выпадает в осадок с течением времени, при этом демонстрируя слабую растворимость.

В этих обстоятельствах авторы настоящего изобретения разработали производные глюкагона с частичными модификациями аминокислотной последовательности глюкагона для улучшения терапевтических эффектов глюкагона на гипогликемию и ожирение путем улучшения физических свойств глюкагона и обнаружили, что эти производные глюкагона имеют улучшенную растворимость и более высокую стабильность при нейтральном pH, тем самым завершая настоящее изобретение.

### **Описание изобретения**

#### **Техническая задача**

Задачей настоящего изобретения является предложение нового производного глюкагона с улучшенными физическими свойствами.

Другой задачей настоящего изобретения является предложение композиции для предупреждения или лечения гипогликемии, содержащей производное глюкагона в качестве активного ингредиента.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение композиции для предупреждения или лечения ожирения, содержащей производное глюкагона в качестве активного ингредиента.

#### **Техническое решение**

Для достижения вышеуказанных целей в одном аспекте настоящего изобретения предлагается новое производное глюкагона, которое включает аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1 и имеет изоэлектрическую точку (pI), которая изменена, т.е. отличается от изоэлектрической точки нативного глюкагона:

X1-X2-QGTF-X7-SDYS-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T  
(общая формула 1),

где в общей формуле 1

X1 представляет собой гистидин, дезаминагистидин, N-диметилгистидин, β-гидроксиимидазопропионовую кислоту, 4-имидазоуксусную кислоту, β-карбоксимидазопропионовую кислоту, триптофан или тирозин либо удален;

X2 представляет собой α-метил-глутаминовую кислоту, аминокислотную кислоту (Aib), D-аланин, глицин, Sar (N-метилглицин), серин или D-серин;

X7 представляет собой треонин или валин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин, α-метил-глутаминовую кислоту или цистеин;

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, валин или цистеин;

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;

X19 представляет собой аланин или цистеин;

X20 представляет собой лизин, глутаминовую кислоту, глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, валин или цистеин;

X23 представляет собой валин или аргинин;

X24 представляет собой валин, лейцин, глутамин или аргинин;

X27 представляет собой изолейцин или метионин;

X28 представляет собой аргинин или аспарагин

(при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1, она исключена).

Производное глюкагона по настоящему изобретению включает пептид, производное пептида или пептидный миметик, которые обладают улучшенными физическими свойствами, имея pI, отличную от pI нативного глюкагона в результате модификации части аминокислот(ы) нативного глюкагона.

При использовании здесь термин "нативный глюкагон" относится к нативному человеческому глюкагону, имеющему последовательность His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln -Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1).

В отношении последовательности общей формулы 1 по настоящему изобретению аминокислоты представлены от N-конца слева к C-концу справа в соответствии с обычным способом описания. Соответственно, когда "положение" какого-либо конкретного остатка упоминается в последовательности об-

шей формулы 1, его следует интерпретировать так же, как при упоминании любого положения в нативном глюкагоне или других молекулах.

Во всем описании настоящего изобретения используются не только обычные однобуквенные или трехбуквенные коды для природных аминокислот, но также трехбуквенные коды, обычно используемые для других аминокислот, таких как  $\alpha$ -аминоизомасляная кислота (Aib), Sar(N-метилглицин) и  $\alpha$ -метилглутаминовая кислота.

Кроме того, названия упоминаемых здесь аминокислот сокращены в соответствии с правилами номенклатуры IUPAC-IUB следующим образом:

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; и	Валин	V.

При использовании здесь термин "пептид" относится к соединению из двух или более нативных и ненативных аминокислот или производных аминокислот, таких как  $\alpha$ -аминокислоты, связанных пептидной связью. При использовании здесь термин "производное глюкагона" относится к пептиду, включающему последовательность общей формулы 1 или его производному, аналогу или его модифицированному продукту. Пептид по настоящему изобретению включает пептидомиметики, у которых изменена pI по сравнению с pI нативного глюкагона посредством модификации части аминокислот(ы) глюкагона в форме замещения и т.д. В типичном воплощении настоящего изобретения производное глюкагона имеет изоэлектрическую точку, отличную от изоэлектрической точки нативного глюкагона, при сохранении активности рецептора глюкагона. В более конкретном типичном воплощении настоящего изобретения производное глюкагона относится к пептиду с улучшенной растворимостью по сравнению с нативным глюкагоном при физиологическом pH при сохранении активности рецептора глюкагона.

При использовании здесь термин "pI" или "изоэлектрическая точка" относится к значению pH, при котором макромолекула, такая как полипептид, не имеет суммарного заряда (0). В случае полипептида с различными заряженными функциональными группами суммарный заряд всего полипептида равен "0" в точке, где значение pH является таким же, как pI. Суммарный заряд полипептида при pH выше, чем pI, будет отрицательным, тогда как суммарный заряд полипептида при pH ниже, чем pI, будет положительным.

Значения pI могут быть измерены или оценены обычным способом, используемым в данной области техники. Например, значения pI могут быть измерены на иммобилизованном pH-градиентном геле, состоящем из полиакриламида, крахмала или агарозы, с помощью изоэлектрического электрофореза или, например, могут быть оценены по аминокислотной последовательности с использованием инструмента pI/MW ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html); Gasteiger et al., 2003) на сервере ExPASy.

В конкретном воплощении настоящего изобретения производное глюкагона, содержащее аминокислотную последовательность общей формулы 1, включает любой пептид, который получают посредством замены, добавления, делеции или посттрансляционной модификации (например метилирования, ацилирования, убиквитинирования или внутримолекулярного ковалентного связывания) аминокислот(ы) в аминокислотной последовательности нативного глюкагона, представленной в SEQ ID NO: 1, который проявляет улучшенную растворимость в соответствии с pH раствора из-за отличия его pI от pI нативного глюкагона при сохранении активностей рецептора глюкагона, и благодаря этому имеет улучшенную химическую стабильность *in vivo*.

При замещении или добавлении аминокислот можно использовать не только 20 аминокислот, обычно встречающихся в белках человека, но также атипичные или неприродные аминокислоты и их производные. Коммерческие источники атипичных аминокислот могут включать Sigma-Aldrich, Chem-Per Inc., Genzyme Pharmaceuticals и т.д. Пептиды, включающие эти аминокислоты и последовательности атипичного пептида, могут быть синтезированы и куплены у коммерческих поставщиков, например в American Peptide Company, Bachem (USA) или Anygen (Korea). Аналогичным образом могут быть получены производные аминокислот, например дезаминогистидин,  $\beta$ -гидроксиимидазопропионовая кислота, 4-имидазоуксусная кислота или  $\beta$ -карбоксиимидазопропионовая кислота.

Поскольку глюкагон имеет значение pH примерно 7, он нерастворим в растворе, имеющем pH 6-8, и имеет тенденцию осаждаться при нейтральном pH. В водном растворе с pH 3 или ниже глюкагон сна-

чала растворяется, но в течение одного часа осаждается с образованием геля. Поскольку желированный глюкагон в основном состоит из  $\beta$ -сладчатых фибрилл, введение осажденного таким образом глюкагона через инъекционную иглу или посредством внутривенной инъекции блокирует кровеносные сосуды и, следовательно, он не подходит для использования в качестве инъекционного агента. Для того чтобы замедлить процесс осаждения обычно используют кислые композиции (pH 2-4), посредством чего глюкагон можно поддерживать в относительно неагрегированном состоянии в течение короткого периода времени. Однако глюкагон может образовывать фибриллы очень быстро при низком pH и, таким образом, эти кислые композиции должны быть инъекцированы непосредственно после приготовления.

В данной области техники широко известно, что растворимость, активность и стабильность белка в растворе может варьировать в зависимости от pI (Shaw, K.L. et al., Protein Science 10, pp. 1206-1215, 2001).

Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали производные глюкагона с повышенной стабильностью и функциональными эффектами путем модификации последовательности нативного глюкагона, тем самым изменяя его pI. Производные глюкагона по настоящему изобретению, имеющие измененную pI по сравнению с pI нативного глюкагона, характеризуются улучшенной растворимостью и стабильностью в соответствии с pH заданного раствора по сравнению с растворимостью и стабильностью нативного глюкагона.

В конкретном воплощении настоящего изобретения производное глюкагона может представлять собой пептид, в котором в аминокислотной последовательности общей формулы 1

X1 представляет собой гистидин, триптофан, тирозин или делетирован;

X2 представляет собой серин или аминокислоту (Aib);

X7 представляет собой треонин или валин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин или цистеин;

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, валин или цистеин;

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;

X19 представляет собой аланин или цистеин;

X20 представляет собой лизин, глутаминовую кислоту, глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, валин или цистеин;

X23 представляет собой валин или аргинин;

X24 представляет собой валин, лейцин или глутамин;

X27 представляет собой изолейцин или метионин; и

X28 представляет собой аргинин или аспарагин

(при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1, она исключена).

Более предпочтительно производное глюкагона по настоящему изобретению может представлять собой пептид, включающий любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2-34.

Пептид, включающий производное глюкагона по настоящему изобретению, может быть получен при помощи стандартного способа синтеза, рекомбинантной экспрессионной системой или любого другого способа в данной области техники. Соответственно, аналог глюкагона по настоящему изобретению может быть синтезирован многими способами, включающими описанные ниже способы:

(а) способ синтеза пептида твердофазным или жидкофазным методом поэтапно или с помощью сборки фрагментов с последующим выделением и очисткой конечного пептидного продукта; или

(б) способ экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид в клетке-хозяине, и выделение продукта экспрессии из культуры клетки-хозяина; или

(в) способ выполнения *in vitro* бесклеточной экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, и выделение продукта экспрессии; или

(г) способ получения пептидных фрагментов посредством любой комбинации способов (а), (б) и (в), получение пептида путем связывания пептидных фрагментов и затем выделение пептида.

В типичном аспекте настоящего изобретения подтверждено, что производное глюкагона по настоящему изобретению имеет pI, отличающуюся от pI нативного глюкагона (см. табл. 1). В результате, производное глюкагона по настоящему изобретению имеет улучшенную растворимость и более высокую стабильность в соответствии с pH заданного раствора по сравнению с нативным глюкагоном. Соответственно, производное глюкагона по настоящему изобретению может повысить соблюдение пациентом режима и схемы лечения при использовании его в качестве гипогликемического средства, а также пригодно для комбинированного введения в комбинации с другими агентами против ожирения и, таким обра-

зом, может быть эффективно использовано для предупреждения и лечения гипогликемии и ожирения.

В этом отношении производное глюкагона по настоящему изобретению может обеспечить перспективный терапевтический выбор в отношении гипогликемии, ожирения или ассоциированных с ними заболеваний.

Например, производное глюкагона по настоящему изобретению представляет собой основной гормон, контролирующей инсулиновую реакцию, и может быть эффективно использовано для лечения тяжелой гипогликемии у пациентов с диабетом.

Кроме того, производное глюкагона по настоящему изобретению может быть использовано в качестве фармацевтического лекарственного средства не только для предупреждения увеличения массы тела, стимуляции снижения массы тела, уменьшения избыточной массы тела и разных типов ожирения, включая патологическое ожирение (например, посредством контролирования аппетита, всасывания, потребления пищи, потребления калорий и/или потребления энергии), но также и для лечения связанного с ожирением воспаления, связанного с ожирением заболевания желчного пузыря и вызываемого ожирением апноэ во сне, без ограничения ими, и может быть использовано для лечения ассоциированных заболеваний или состояний здоровья. Производное глюкагона по настоящему изобретению также можно использовать для лечения состояний здоровья, которые могут быть ассоциированы с ожирением, таких как метаболический синдром, гипертензия, атеросклероз-индуцированная дислипидемия, артериосклероз, артериальная анемия, ишемическая болезнь сердца, инсульты и т.д. Однако влияние производного глюкагона по настоящему изобретению может быть полностью или частично опосредовано воздействиями на массу тела, описанными выше, или может не зависеть от них.

При этом для улучшения терапевтических эффектов производного глюкагона по настоящему изобретению производное глюкагона можно модифицировать, используя типичные в данной области методы, включая модификацию с помощью полимеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG) и сахарные цепи, или слияния с альбумином, трансферрином, жирными кислотами и иммуноглобулином и т.д. Например, по меньшей мере одна аминокислотная боковая цепь в соединениях по настоящему изобретению может быть присоединена к полимеру для увеличения растворимости *in vivo* и/или периодов полувыведения и/или для увеличения их биодоступности. Известно, что эти модификации уменьшают клиренс терапевтических белков и пептидов.

Для этих полимеров подходят растворимые (амфипатические или гидрофильные), нетоксичные и фармацевтически инертные полимеры, и предпочтительно они могут включать PEG, гомополимеры или сополимеры PEG, монометилзамещенные полимеры (mPEG) и полиаминокислоты, такие как полилизин, полиаспарагиновая кислота и полиглутаминовая кислота.

Варианты производного глюкагона, как описано выше, также входят в объем настоящего изобретения.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, кодирующие описанные выше производные глюкагона.

Термин "гомология" при использовании здесь для полинуклеотида включает степень сходства с аминокислотной последовательностью дикого типа и последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа и включает последовательность гена, которая на 75% или более, предпочтительно на 85% или более, более предпочтительно на 90% или более и еще более предпочтительно на 95% или более идентична полинуклеотидной последовательности кодирующего производные глюкагона. Оценку гомологии можно осуществлять невооруженным глазом или с использованием имеющейся в продаже программы. Используя имеющуюся в продаже компьютерную программу, гомологию между двумя или более последовательностями можно выразить как процент (%) и можно оценить гомологию (%) между соседними последовательностями. Полинуклеотид, кодирующий производные глюкагона, может быть встроен в вектор и экспрессироваться с получением большого количества производных глюкагона.

Для этой рекомбинантной экспрессии полинуклеотида по настоящему изобретению обычно встраивают в подходящие векторы для создания клонирующих векторов или рекомбинантных векторов, содержащих эти полинуклеотиды, и эти векторы также входят в объем настоящего изобретения.

При использовании здесь термин "рекомбинантный вектор" относится к конструкции ДНК, включающей последовательность полинуклеотида, кодирующего целевой пептид, которая функционально связана с подходящей регуляторной последовательностью, чтобы обеспечить экспрессию целевого пептида, например производного глюкагона, в клетке-хозяине. Регуляторная последовательность включает промотор, способный инициировать транскрипцию, любую последовательность оператора для регуляции транскрипции, последовательность, кодирующую соответствующий мРНК рибосомсвязывающий домен, и последовательность, регулирующую окончание транскрипции и трансляции. Рекомбинантный вектор, после трансформации в подходящую клетку-хозяин, может быть реплицирован, или функционирует независимо от генома хозяина, или может быть интегрирован в сам геном хозяина.

Рекомбинантный вектор, используемый в настоящем изобретении, может быть конкретно не ограниченным при условии, что вектор является реплицируемым в клетке-хозяине и может быть сконструирован с использованием любого вектора, известного в данной области техники. Примеры векторов могут включать природные или рекомбинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Например, в

качестве фагового вектора или космидного вектора могут быть использованы pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A и т.д., и в качестве плазмидного вектора можно использовать векторы на основе pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET и т.д. Векторы, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, конкретно не ограничены, и может быть использован любой известный экспрессионный вектор.

Рекомбинантный вектор используется для трансформации клетки-хозяина для получения производных глюкогона по настоящему изобретению. Кроме того, эти трансформированные клетки как часть настоящего изобретения могут быть использованы для амплификации нуклеинокислотных фрагментов и векторов или могут представлять собой культивируемые клетки или клеточные линии, используемые в рекомбинантном продуцировании производных глюкогона по настоящему изобретению.

При использовании здесь термин "трансформация" относится к процессу введения рекомбинантного вектора, включающего полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку-хозяин, тем самым обеспечивая возможность экспрессии полинуклеотида, кодирующего белок, в клетке-хозяине. Для трансформированного полинуклеотида не имеет значения, встроен он в хромосому клетки-хозяина и расположен в ней или находится за пределами хромосомы, при условии, что он может экспрессироваться в клетке-хозяине, поэтому включены оба случая.

Кроме того, полинуклеотид включает ДНК и РНК, которые кодируют целевой белок. Полинуклеотид может быть встроен в любой форме, если он может быть введен в клетку-хозяин и экспрессироваться в ней. Например, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяин в виде экспрессионной кассеты. Экспрессионная кассета может обычно включать промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, сигнал терминации транскрипции, домен связывания с рибосомой и сигнал терминации трансляции. Экспрессионная кассета может находиться в форме экспрессионного вектора, способного самореплицироваться. Кроме того, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина как есть и функционально связан с последовательностью, необходимой для его экспрессии в клетке-хозяине, без ограничения этим. Кроме того, используемый здесь термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между последовательностью промотора, который инициирует и опосредует транскрипции полинуклеотида, кодирующего целевой белок по настоящему изобретению, и указанной выше последовательностью гена.

Подходящий хозяин для использования в настоящем изобретении может быть не особенно ограниченным, если в нем возможна экспрессия полинуклеотида по настоящему изобретению. Примеры подходящего хозяина могут включать бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, такие как *E.coli*, бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*, бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas*, такие как *Pseudomonas putida*, дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, клетки насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), и клетки животных, такие как CHO, COS и BSC.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения гипогликемии или ожирения, содержащая производные глюкогона.

При использовании здесь термин "профилактика" относится к любому действию, приводящему к подавлению или задержке возникновения ожирения посредством введения производных глюкогона или фармацевтической композиции, а термин "лечение" относится к любому действию, приводящему к улучшению симптомов ожирения или к полезному изменению путем введения производных глюкогона или фармацевтической композиции.

При использовании здесь термин "введение" относится к введению конкретного вещества пациенту подходящим способом, и композиция может быть введена любым традиционным путем, при условии, что композиция может достичь целевой ткани. Например, введение может быть осуществлено внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутрикожно, перорально, местно, интраназально, внутривлагалищно, ректально и т.д.

При использовании здесь термин "гипогликемия" относится к острому симптому диабета, при котором уровни глюкозы в крови ниже, чем у нормальных людей и, в целом, относится к состоянию, когда уровни глюкозы в крови составляют 50 мг/дл или менее. Гипогликемия часто бывает вызвана тем, что человек, перорально принимающий гипогликемический агент, ест меньше чем обычно или выполняет больше чем обычно разные виды деятельности или упражнений. Кроме того, гипогликемия может возникать из-за использования препаратов для снижения уровня глюкозы, тяжелых физических заболеваний, дефицита гормонов, таких как гормоны коры надпочечников, и глюкогона, опухоли инсулин-продуцирующей поджелудочной железы, аутоиммунного инсулинового синдрома, гастрэктомии у пациентов, врожденного нарушения углеводного обмена и т.д.

Симптомы гипогликемии включают слабость, дрожь, бледную кожу, холодный пот, головокружение, волнение, беспокойство, сердцебиение, пустой желудок, головную боль, усталость и т.д. В случае стойкой гипогликемии это может привести к судорогам или конвульсии и может вызвать шок и, таким образом, потерю сознания.

При использовании здесь термин "ожирение" относится к нарушению здоровья с избыточным содержанием телесного жира в организме, и когда человек имеет индекс массы тела (ИМТ; масса тела (кг),

деленная на квадрат высоты тела (м)), равный 25 или более, у него диагностируют ожирение. Ожирение обычно происходит из-за долговременного дисбаланса энергии, при котором поступление энергии превышает затраты энергии. Ожирение представляет собой метаболическое заболевание, которое поражает весь организм, что увеличивает риск диабета, гиперлипидемии, сексуальной дисфункции, артрита и сердечно-сосудистых заболеваний, и в некоторых случаях оно также ассоциировано с возникновением рака.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. При использовании здесь термин "фармацевтически приемлемый" относится к свойствам наличия достаточного количества для проявления терапевтического эффекта без проявления нежелательных явлений и может быть легко определен специалистом в данной области на основе факторов, хорошо известных в медицинской области, таких как вид заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол, чувствительность пациента к лекарственным средствам, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственное средство, которое необходимо смешивать или вводить одновременно в комбинации, и т.д.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая производное глюкагона по настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать для перорального введения - связывающее вещество, скользящее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизующий агент, диспергирующее вещество, стабилизатор, суспендирующий агент, краситель, ароматизатор и т.д.; для инъекции - буферный агент, консервант, болеутоляющее средство, солюбилизующий агент, изотонический агент, стабилизатор и т.д., которые могут быть скомбинированы для использования; и для местных введений - основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант и т.д., но без ограничения ими.

Тип препарата для композиции по настоящему изобретению может быть приготовлен по-разному путем комбинирования с фармацевтически приемлемым носителем, как описано выше. Например, для перорального введения композиция может быть приготовлена в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.д. Для инъекций композиция может быть приготовлена в виде ампул с однократной дозой или многодозовых контейнеров. Композицию можно также приготовить в виде растворов, суспензий, таблеток, капсул и композиций с замедленным высвобождением.

При этом примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.д. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, увлажнитель, ароматизатор, консервант и т.д.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в любом типе композиции, выбранном из группы, состоящей из таблеток, пилюль, порошков, гранул, капсул, суспензий, микстур для внутреннего применения, эмульсий, сиропов, стерильных инъекционных растворов, неводных растворителей, лиофилизированных составов и суппозиторий.

Кроме того, композиция может быть приготовлена в форме однократной дозировки, подходящей для организма пациента, и предпочтительно ее готовят в виде препарата, пригодного для пептидных лекарственных средств, в соответствии с типичным способом в фармацевтической области, так, чтобы вводить ее посредством перорального или парентерального введения, например, через кожу, внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, внутривенно, трансдермально, подкожно, внутривентрикулярно, интраназально, внутривентрикулярно, местно, сублингвально, вагинально или ректально, без ограничения ими.

Кроме того, производное глюкагона можно использовать путем смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, такими как физиологический раствор или органические растворители. Для увеличения стабильности или поглощаемости могут быть использованы углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы.

Доза и частота введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению определяется типом активного(ых) ингредиента(ов) наряду с различными факторами, такими как подлежащее лечению заболевание, путь введения, возраст, пол, масса тела и тяжесть заболевания.

Общую эффективную дозу композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в виде одной дозы или можно вводить в течение продолжительного периода времени в виде нескольких доз в соответствии с протоколом фракционированного лечения. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного(ых) ингредиента(ов) может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. Предпочтительно общая суточная доза пептида по настоящему изобретению может составлять приблизительно от 0,0001 мкг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Однако эффективная доза производного глюкагона определяется с учетом различных факторов, включающих возраст, массу тела, состояние здоровья, пол пациента, тяжесть заболевания, режим питания и скорость экскреции, в дополнение к пути введения фармацевтической композиции и периодичности лечения фармацевтической композицией. В этом отношении специалисты в данной области могут легко определить эффективную

дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению конкретно не ограничена составом и путем и способом введения, при условии, что она демонстрирует эффекты по настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению показывает превосходный период эффективности и титр *in vivo*, тем самым значительно уменьшая количество и частоту ее введения.

В частности, поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит в качестве активного ингредиента производное глюкагона, имеющее измененную *pI*, отличную от нативного глюкагона, она демонстрирует улучшенную растворимость и высокую стабильность в соответствии с *pH* данного раствора и, таким образом, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть эффективно использована в получении стабильной композиции глюкагона для лечения гипогликемии или ожирения.

Кроме того, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить саму по себе или в сочетании с другой(ими) фармацевтической(ими) композицией(ями), демонстрирующей(ими) профилактические или терапевтические воздействия на ожирение. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтическую композицию, демонстрирующую профилактические или терапевтические воздействия на ожирение.

Фармацевтические композиции, демонстрирующие профилактические или терапевтические воздействия на ожирение, конкретно не ограничены и могут включать агонист рецептора GLP-1, антагонист рецептора глюкозозависимого инсулилотропного пептида (GIP), агонист рецептора лептина, ингибитора DPP-IV (дипептидилпептидаза IV), антагонист рецептора Y5, антагонист рецептора меланиноконцентрирующего гормона (MCH), агонист рецептора Y2/3/4, агонист рецептора MC3/4, ингибитор желудочной/панкреатической липазы, агонист 5HT2c, агонист рецептора  $\beta$ 3A, агонист рецептора амилина, антагонист грелина и антагонист рецептора грелина, FGF1 (фактор роста фибробластов 1), агонист рецептора FGF21, агонист рецептора холецистокинина (CCK), агонист рецептора панкреатического полипептида (PP), ингибитор реабсорбции дофамина и т.д.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения гипогликемии или ожирения, включающий введение субъекту производного глюкагона или содержащей его фармацевтической композиции.

При использовании здесь термин "субъект" относится к тем, у кого предполагается гипогликемия или ожирение и кто является млекопитающим, включающим людей, мышей и домашний скот с гипогликемией или ожирением, или с возможностью возникновения гипогликемии или ожирения. Однако любой субъект, подлежащий лечению с помощью производных глюкагона или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, также включен без ограничения. Фармацевтическая композиция, содержащая производное глюкагона по настоящему изобретению, может быть введена субъекту с предполагаемым наличием гипогликемии или ожирения, и тем самым проведено эффективное лечение субъекта. Гипогликемия и ожирение являются такими, как описано выше.

Терапевтический способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтической композиции, содержащей производное глюкагона, в фармацевтически эффективном количестве. Предпочтительно общая суточная доза должна быть определена на основании соответствующего медицинского заключения врача и введена один или несколько раз. Принимая во внимание цели настоящего изобретения, конкретная терапевтически эффективная доза для любого конкретного пациента может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как тип и степень достигаемого ответа, от конкретных композиций, в том числе от использования или неиспользования другого(их) агента(ов) с ними, возраста, массы тела, состояния здоровья, пола и режима питания пациента, времени и пути введения, скорости секреции композиции, длительности терапии, других(ого) лекарственных(ого) средств(а), используемых(ого) в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и аналогичных факторов, хорошо известных в области медицины.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается использование производных глюкагона в получении фармацевтических лекарственных средств для предупреждения или лечения гипогликемии или ожирения.

#### **Полезные эффекты**

Новые производные глюкагона по настоящему изобретению обладают превосходной стабильностью и растворимостью в соответствии с *pH* заданного раствора, так как имеют *pI*, отличную от *pI* нативного глюкагона. Следовательно, при применении новых производных глюкагона по настоящему изобретению в качестве терапевтического агента для лечения гипогликемии, они могут повысить соблюдение больным режима и схемы лечения. Кроме того, новые производные глюкагона по настоящему изобретению пригодны для введения в комбинации с другими агентами против ожирения и, таким образом, их можно эффективно использовать для предупреждения или лечения гипогликемии и ожирения.

#### **Подробное описание изобретения**

Ниже настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Однако эти примеры приведены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Получение клеточной линии, имеющей сАМР-ответ на глюкагон.

ПЦР проводили с использованием в качестве матрицы области, соответствующей открытой рамке считывания (ORF) в кДНК (OriGene Technologies, Inc., USA) гена рецептора человеческого глюкагона, и следующие прямые и обратные праймеры SEQ ID NO: 35 и 36, включающей каждый из сайтов рестрикции HindIII и EcoRI.

В частности, ПЦР проводили в течение суммарно 30 циклов, используя следующие условия: денатурация при 95°C в течение 60 с, отжиг при 55°C в течение 60 с и удлинение при 68°C в течение 30 с. Полученный таким образом продукт ПЦР подвергали электрофорезу в 1,0% агарозном геле и из него элюировали полоску размером 450 п.о.

Прямой праймер: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAAGGCC-3' (SEQ ID NO: 35).

Обратный праймер: 5'-СТААССГАСТСТСГГГГААГАСТГАСТСГСС-3' (SEQ ID NO: 36).

Продукт ПЦР клонировали в известный экспрессионный вектор x0GC/dhfr для животной клетки с получением рекомбинантного вектора x0GC/GCGR. Клеточную линию CHO DG44, культивируемую в среде DMEM/F12 (10% FBS), трансфицировали рекомбинантным вектором x0GC/GCGR, используя липофектамин, и селективно культивировали в среде для отбора, содержащей 1 мг/мл G418 и 10 нМ метотрексата. Из нее выбирали одноклоновые клеточной линии при помощи метода предельного разбавления и среди них в конечном итоге выбирали клеточную линию, показывающую превосходный ответ сАМР на глюкагонзависимым от концентрации образом.

Пример 2. Синтез производных глюкагона.

В данной области широко известно, что растворимость, активность и стабильность белка в растворе может варьироваться в соответствии с pI (Shaw, K.L. et al., Protein Science 10, pp. 1206-1215, 2001). Для получения производных глюкагона с улучшенными физическими свойствами аминокислотную последовательность нативного глюкагона, представленную в SEQ ID NO: 1, замещали аминокислотными остатками, имеющими положительные и отрицательные заряды, и таким образом синтезировали производные глюкагона, как показано в табл. 1 ниже.

Таблица 1

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	Образование кольца
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSQDAQDFVQWLINT	-
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSQDAQDFVQWLINT	-
SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSQDADDFVQWLINT	-
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLCRRRAQDFVQWLMRT	-
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLCVRAQDFVQWLMRT	-
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLSRRACDFRLWLMNT	-
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 21	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLDEKRCKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKCFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 26	WXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 27	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 28	WXQGTFTSDYSKYLDEKRAKDFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 29	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKDFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 30	WXQGTFTSDYSKCLDEKRAKDFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 31	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 32	-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 33	WXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо
SEQ ID NO: 34	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	образовано кольцо

Что касается SEQ ID NO: 8-31 и 33-34, показанных в табл. 1, аминокислота, представленная как X,

представляет собой неприродную аминокислоту, аминокислотную кислоту (Aib); "-" в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32 означает, что в соответствующем положении аминокислотный остаток отсутствует; и два жирных и подчеркнутых аминокислотных остатка означают образование кольца между двумя аминокислотными остатками.

Пример 3. Измерение pI у производных глюкагона.

Для измерения улучшенных физических свойств производных глюкагона, синтезированных в примере 2, значения pI подсчитывали на основании аминокислотных последовательностей с использованием инструмента pI/Mw ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html); Gasteiger et al., 2003) на сервере ExPASy.

Таблица 2

Производные глюкагона	pI
SEQ ID NO: 1	6,8
SEQ ID NO: 2	4,56
SEQ ID NO: 3	4,66
SEQ ID NO: 4	4,13
SEQ ID NO: 5	4,22
SEQ ID NO: 6	4,03
SEQ ID NO: 7	3,71
SEQ ID NO: 8	3,77
SEQ ID NO: 9	3,77
SEQ ID NO: 10	3,66
SEQ ID NO: 11	4,78
SEQ ID NO: 12	6,04
SEQ ID NO: 13	4,78
SEQ ID NO: 14	8,12
SEQ ID NO: 15	6,11
SEQ ID NO: 16	9,11
SEQ ID NO: 17	6,03
SEQ ID NO: 18	8,15
SEQ ID NO: 19	8,12
SEQ ID NO: 20	4,78
SEQ ID NO: 21	4,78
SEQ ID NO: 22	6,20
SEQ ID NO: 23	6,20
SEQ ID NO: 24	6,21
SEQ ID NO: 25	8,12
SEQ ID NO: 26	4,68
SEQ ID NO: 27	4,68
SEQ ID NO: 28	4,68
SEQ ID NO: 29	6,15
SEQ ID NO: 30	4,44
SEQ ID NO: 31	8,12
SEQ ID NO: 32	4,78
SEQ ID NO: 33	6,21
SEQ ID NO: 34	6,21

Как показано в табл. 2 выше, в то время как нативный глюкагон с SEQ ID NO: 1 имеет pI, равную 6,8, производные глюкагона по настоящему изобретению показывали значения pI в диапазоне от примерно 4 до примерно 9, вследствие чего демонстрировали улучшенные физические свойства. Поскольку производные глюкагона по настоящему изобретению имеют значения pI, отличные от значений pI нативного глюкагона, они могут проявлять улучшенную растворимость и более высокую стабильность в соответствии с условиями pH заданного раствора.

Соответственно, когда производные глюкагона по настоящему изобретению используют в качестве терапевтического средства для лечения гипогликемии, они могут улучшать соблюдение пациентом режима и схемы лечения, а также они пригодны для введения в комбинации с другими агентами против ожирения, например с антагонистом рецептора GLP-1, с антагонистом рецептора глюкозозависимого инсулиноподобного пептида (GIP) и т.д., и поэтому их можно эффективно использовать в качестве терапевтического средства для лечения гипогликемии и ожирения.

Специалисты в данной области техники понимают, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от его смысла или существенных характеристик.

Описанные воплощения следует рассматривать во всех отношениях только как иллюстративные, а не ограничительные. Таким образом, объем настоящего изобретения указан прилагаемой формулой изобретения, а не приведенным выше описанием. Все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, входят в объем настоящего изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Производное глюкогона, которое содержит аминокислотную последовательность следующей общей формулы 1 и имеет изоэлектрическую точку (pI), отличную от pI нативного глюкогона

X1-X2-QGTF-X7-SDYS-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W-L-X27-X28-T  
(общая формула 1),

где в общей формуле 1

X1 представляет собой дезаминогистидин, N-диметилгистидин, β-гидроксимидазопропионовую кислоту, 4-имидазоуксусную кислоту, β-карбоксимидазопропионовую кислоту, триптофан, тирозин или делетирован;

X2 представляет собой α-метил-глутаминовую кислоту, аминокислотную кислоту (Aib), D-аланин, глицин, Sar(N-метилглицин), серин или D-серин;

X7 представляет собой треонин или валин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин, α-метил-глутаминовую кислоту или цистеин;

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, валин или цистеин;

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;

X19 представляет собой аланин или цистеин;

X20 представляет собой лизин, глутаминовую кислоту, глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, валин или цистеин;

X23 представляет собой валин или аргинин;

X24 представляет собой валин, лейцин, глутамин или аргинин;

X27 представляет собой изолейцин или метионин и

X28 представляет собой аргинин или аспарагин

(при условии, что аминокислотная последовательность общей формулы 1 не является SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 12).

2. Производное глюкогона по п.1, где в аминокислотной последовательности общей формулы 1

X1 представляет собой триптофан, тирозин или делетирован;

X2 представляет собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);

X7 представляет собой треонин или валин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин или цистеин;

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, валин или цистеин;

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;

X19 представляет собой аланин или цистеин;

X20 представляет собой лизин, глутаминовую кислоту, глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, валин или цистеин;

X23 представляет собой валин или аргинин;

X24 представляет собой валин, лейцин или глутамин;

X27 представляет собой изолейцин или метионин и

X28 представляет собой аргинин или аспарагин

(при условии, что аминокислотная последовательность общей формулы 1 не является SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 12).

3. Производное глюкогона по п.1, которое обладает стимулирующей активностью в отношении рецептора глюкогона.

4. Производное глюкагона по п.1, которое содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 7-11 и 13-34.

5. Полинуклеотид, кодирующий производное глюкагона по любому из пп.1-4.

6. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения гипогликемии, содержащая производное глюкагона по любому из пп.1-4 в качестве активного ингредиента.

7. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения ожирения, содержащая производное глюкагона по любому из пп.1-4 в качестве активного ингредиента.

8. Фармацевтическая композиция по п.6, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

9. Фармацевтическая композиция по п.7, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

10. Фармацевтическая композиция по п.7, которую вводят отдельно или в комбинации с фармацевтическим агентом, обладающим эффектом предупреждения или лечения ожирения.

11. Фармацевтическая композиция по п.7, дополнительно содержащая фармацевтический агент, обладающий эффектом предупреждения или лечения ожирения.

12. Фармацевтическая композиция по п.10, где фармацевтический агент, обладающий эффектом предупреждения или лечения ожирения, выбран из группы, состоящей из агониста рецептора GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1), антагониста рецептора глюкозозависимого инсулилотропного пептида (GIP), агониста рецептора лептина, ингибитора DPP-IV (дипептидилпептидаза IV), антагониста рецептора Y5, антагониста рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агониста рецептора Y2/3/4, агониста рецептора MC3/4, ингибитора липазы желудка/поджелудочной железы, агониста 5HT2c, агониста рецептора β3A, агониста рецептора амилина, антагониста грелина, антагониста рецептора грелина, FGF1 (фактор роста фибробластов 1), агониста рецептора FGF21, агониста рецептора холецистокинина (CCK), агониста рецептора панкреатического полипептида (PP), ингибитора реабсорбции дофамина и их комбинации.

13. Фармацевтическая композиция по п.11, где фармацевтический агент, обладающий эффектом предупреждения или лечения ожирения, выбран из группы, состоящей из агониста рецептора GLP-1, антагониста рецептора глюкозозависимого инсулилотропного пептида (GIP), агониста рецептора лептина, ингибитора DPP-IV, антагониста рецептора Y5, антагониста рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агониста рецептора Y2/3/4, агониста рецептора MC3/4, ингибитора липазы желудка/поджелудочной железы, агониста 5HT2c, агониста рецептора β3A, агониста рецептора амилина, антагониста грелина, антагониста рецептора грелина, FGF1, агониста рецептора FGF21, агониста рецептора холецистокинина (CCK), агониста рецептора панкреатического полипептида (PP), ингибитора реабсорбции дофамина и их комбинации.

14. Способ предупреждения или лечения гипогликемии или ожирения, включающий введение производного глюкагона по любому из пп.1-4 или содержащей его фармацевтической композиции субъекту, нуждающемуся в этом.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий введение по меньшей мере одного фармацевтического агента, обладающего эффектом предупреждения или лечения ожирения.

16. Применение производного глюкагона по любому из пп.1-4 или содержащей его фармацевтической композиции в изготовлении фармацевтического лекарственного средства для предупреждения или лечения ожирения.

17. Производное глюкагона, которое содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 2-6.

18. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения гипогликемии, содержащая производное глюкагона по п.17 в качестве активного ингредиента.

19. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения ожирения, содержащая производное глюкагона по п.17 в качестве активного ингредиента.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, которую вводят отдельно или в комбинации с фармацевтическим агентом, обладающим эффектом предупреждения или лечения ожирения.

21. Фармацевтическая композиция по п.19, дополнительно содержащая фармацевтический агент, обладающий эффектом предупреждения или лечения ожирения.

