

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035964**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.07

(21) Номер заявки
201692279

(22) Дата подачи заявки
2015.06.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(54) **СПОСОБ УМЕНЬШЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ БЕЛКА И ПЕПТИДА**(31) **10-2014-0068660**(32) **2014.06.05**(33) **KR**(43) **2017.05.31**(86) **PCT/KR2015/005651**(87) **WO 2015/186988 2015.12.10**

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

(72) Изобретатель:
**Парк Сун Хи, Ким Сун Су, Лим
Хьюнг Кю, Чой Дже Хёк, Чой Ин Янг,
Квон Се Чан (KR)**

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

(56) **KR-A-1020100105494**

LIANG et al., "Immunity against a therapeutic xenoprotein/Fc construct delivered by gene transfer is reduced through binding to the inhibitory receptor FcγRIIb", *The Journal of Gene Medicine*, Vol. 13, Issue 9, pp. 470-477 (2011), see abstract; pages 471-471, 473-475; and figures 1-4.

CZAJKOWSKY et al., "Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives", *EMBO Molecular Medicine*, Vol. 4, Issue 10, pp. 1015-1028 (2012), see the whole document.

GLAESNER et al., "Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein", *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, Vol. 26, Issue 4, pp. 287-296 (2010), see the whole document.
WO-A2-02066514

CHOI et al., "A Long-acting exendin-4 analog conjugate to the human Fc fragment reveals low immunogenic potential", In: *American Diabetes Association's 74th Annual Scientific Sessions*, poster No. 1009-P (14 June 2014), see the whole document.

(57) Изобретение относится к способу увеличения времени полуэлиминации белка или пептида в сыворотке и уменьшения их иммуногенности посредством сайт-специфического связывания носителя с белком или пептидом, а также к их применению. Конъюгат физиологически активного белка или пептида по изобретению может значительно уменьшать иммуногенность в организме человека и, таким образом, снижать уровень продуцирования антител против этого белка или пептида. Следовательно, преимуществом настоящего конъюгата является то, что явление уменьшения клинического эффекта физиологически активного белка или пептида является низким и он может быть эффективно использован в разработке длительно действующих композиций, обладающих высокой устойчивостью к иммунному ответу.

035964
B1

035964
B1

Область изобретения

Изобретение относится к способу увеличения времени полуэлиминации белка или пептида в сыворотке и уменьшения их иммуногенности посредством сайт-специфического связывания носителя с белком или пептидом и к их применению.

Предшествующий уровень техники

Иммунные реакции на биологические терапевтические средства могут широко индуцироваться в отношении как нечеловеческих, так и человеческих белков. Эти реакции могут ослаблять клинические эффекты, ограничивать эффективность и иногда приводить к патологическим заболеваниям и даже вызывать смерть пациента. В частности, продуцирование нейтрализующих антител, которые нацелены на рекомбинантный собственный белок, может индуцировать перекрестную реакцию с природным белком организма пациента и, таким образом, приводить к серьезным последствиям (см., Lim L.C. *Hematology* 2005 10(3):255-9). Проблемы биофармацевтических средств, таких как моноклональные антитела, были значительно уменьшены с развитием молекулярной биологии. Однако многие рекомбинантные белковые фармацевтические средства идентичны последовательностям белков, которые экспрессируются в организме, и, таким образом, все еще остается возможность индукции нейтрализующей иммунной реакции (см., Namaka M. et al., *Curr. Med. Res. Opin.* 2006 22(2):223-39). Хотя механизм, посредством которого можно вызвать иммуногенность, не вполне понятен, известно, что устойчивость к собственным белкам может быть нарушена продуктами, вводимыми пациенту, и различными факторами пациента (рассмотрены в Chester K., Baker M.P. and Mayer A. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2005 1(4): 549-559, Baker M.P. and Jones T.D. *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.*, 2007 10(2):219-227). Факторы иммуногенности включают дозу, частоту и способ введения, иммуномодулирующую способность белковых лекарственных средств, их получение и тому подобное. Наиболее важным фактором индукции иммунной реакции является наличие сайта распознавания антигена (эпитоп), который эффективно стимулирует CD4 + Т-клеточный ответ (рассмотрены в Baker M.P. and Jones T.D. *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.*, 2007 10(2):219-227).

С другой стороны, эксендин-4 представляет собой природный пептид, обнаруженный в слюнной железе аризонского ядозуба, и имеет 52% сходство последовательности с человеческим GLP-1 (глюкагоноподобным пептидом-1). Эксендин-4 и GLP-1 имеют сходное функционирование секреции инсулина. Однако GLP-1 быстро дезактивируется дипептидилпептидазой-IV (DPP-IV) и, таким образом, имеет короткое время полуэлиминации, в то время как эксендин-4 сохраняет устойчивость к DPP-IV благодаря присутствию глицина вместо аланина во второй аминокислотной последовательности и, таким образом, может быть более эффективным в качестве терапевтического агента для лечения диабета II типа. Кроме того, инсулин или его аналоги, а также двойные агонисты GLP-1/глюкагона также используются в качестве терапевтических средств для диабета и ожирения. Однако присутствие этих нечеловеческих аминокислотных последовательностей может действовать как антиген-распознающий сайт Т-клеток. Эксенатид (Баета), который был одобрен в качестве лекарственного средства при диабете II типа в виде синтетического эксендина-4, продуцировал антитела к эксенатиду у более чем 30% пациентов, которым вводили эксенатид в течение одного года клинических испытаний. Недавно одобренный ликсисенатид продуцирует антитела у примерно 60-71% пациентов (см., Zinman B. et al., *Annals of Internal Medicine*, 2007 146(7): 477-486; Schnabel C.A. et al., *Peptides* 2006 27:1902-1910; DeFronzo R.A. et al., *Diabetes Care* 2005 28:1092-1100; Buse J.B. et al., *Diabetes Care* 2004 27:2628-2635). Т.е. эксенатид распознавался как *in vivo* чужеродное вещество, на которое следует воздействовать, и вызывал образование антител. По этой причине все более превалирует проблема сложности достоверного ожидания терапевтического эффекта.

Таким образом, в случае физиологически активного белка или пептида, который вводят в организм с целью лечения или предупреждения в течение длительного периода времени, очень важно контролировать иммуногенность. В частности, зрелые, связанные с заболеванием физиологически активные белки или пептиды, такие как инсулин или инсулиноподобный пептид и белок против ожирения, часто готовят в виде композиций пролонгированного действия, способных длительно сохраняться в организме после введения. Кроме того, даже если они не являются композициями с пролонгированным действием, во многих случаях они должны быть введены несколько раз в течение длительного периода времени. Таким образом, актуальной проблемой является отсутствие индукции иммунной реакции.

В этих обстоятельствах авторы настоящего изобретения провели многочисленные исследования и эксперименты по разработке фармацевтических композиций белка или пептида, которые не индуцируют иммунной реакции. В результате авторы настоящего изобретения обнаружили, что, когда носитель сайт-специфически связывается с белком или пептидом, иммуногенность может быть уменьшена по сравнению с иммуногенностью белка или пептида, с которыми носитель не был связан, таким образом подытоживая настоящее изобретение.

Описание изобретения

Техническая проблема.

Одной целью настоящего изобретения является предложение способа уменьшения иммуногенности физиологически активных белков или пептидов.

Другой целью настоящего изобретения является предложение композиции, содержащей конъюгат физиологически активного белка или пептида, в котором носитель связан с неконцевым, внутренним

остатком физиологически активного белка или пептида посредством непептидильного линкера.

Другой целью настоящего изобретения является предложение способа получения конъюгата физиологически активного белка или пептида, в котором носитель связан с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида.

Решение проблемы.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ уменьшения иммуногенности физиологически активного белка или пептида по сравнению с иммуногенностью физиологически активного белка или пептида, с которыми не связан носитель, который включает связывание носителя с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида.

В одном конкретном воплощении изобретения вышеуказанный носитель характеризуется тем, что он выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, жирной кислоты, холестерина, альбумина или его фрагмента, альбумин-связывающего вещества, полимера, имеющего повторяющиеся звенья с определенной аминокислотной последовательностью, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, *in-vivo* соединительной ткани или ее производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, эластин-подобного полипептида (ELP), полипептида XTEN (удлинённый рекомбинантный полипептид), карбоксиконцевого пептида (CTP), структуро-индуцирующего зонда (SIP), сахара и высокомолекулярного полимера.

В другом конкретном воплощении изобретения FcRn-связывающее вещество отличается тем, что оно включает Fc-область иммуноглобулина.

В другом конкретном воплощении изобретения физиологически активный белок или пептид и носитель характеризуются тем, что они связаны линкером, расположенным между ними.

В другом конкретном воплощении изобретения линкер характеризуется тем, что он представляет собой непептидильный линкер.

В другом конкретном воплощении изобретения непептидильный линкер характеризуется тем, что он выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

Другое конкретное воплощение изобретения характеризуется тем, что физиологически активный белок или пептид связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидильного полимера, который выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В другом конкретном воплощении изобретения физиологически активный белок или пептид характеризуется тем, что он выбран из группы, состоящей из пептида против ожирения, инсулинотропного пептида или его аналога, лептина, инсулина, аналога инсулина, глюкагона, гормона роста человека, рилизинг-гормона гормона роста, рилизинг-пептида гормона роста, интерферона, рецептора интерферона, колониестимулирующего фактора, глюкагоноподобного пептида, такого как GLP-1, двойного агониста GLP-1/глюкагона, желудочного ингибиторного полипептида (GIP), сопряжённого с G-белком рецептора, интерлейкина, рецептора интерлейкина, фермента, интерлейкин-связывающего белка, цитокин-связывающего белка, фактора активации макрофагов, макрофагального пептида, В-клеточного фактора, Т-клеточного фактора, белка А, фактора подавления аллергии, гликопротеина клеточного некроза, иммунотоксина, лимфотоксина, фактора некроза опухоли, фактора ингибирования опухоли, фактора роста метастазов, α -1-антитрипсина, альбумина, α -лактальбумина, аполилопротеина-Е, фактора эритропоэза, высокогликозилированного фактора эритропоэза, ангиопоэтина, гемоглобина, тромбина, пептида активации рецептора тромбина, тромбомодулина, факторов крови VII, VIIa, VIII, IX и XIII, фактора активации плазминогена, фибрин-связывающего пептида, урокиназы, стрептокиназы, гирудина, белка С, С-реактивного белка, ингибитора ренина, ингибитора коллагеназы, супероксиддисмутазы, тромбоцитарного фактора роста, эпителиального фактора роста клеток, эпидермального фактора роста, ангиостатина, ангиотензина, фактора роста кости, костного стимулирующего белка, кальцитонина, атриопептина, хрящевого индуцирующего фактора, элкатонина, активирующего фактора соединительной ткани, ингибитора пути тканевого фактора, фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона, фактора роста нервов, паратиреоидного гормона, релаксина, секретина, соматомедина, инсулиноподобного фактора роста, адренокортикального гормона, глюкагона, холецистокинина, панкреатического полипептида, гастрин-высвобождающего пептида, кортикотропин-высвобождающего фактора, тиреостимулирующего гормона, аутоактина, лактоферрина, миостатина, рецептора, антагониста рецептора, антигена клеточной поверхности, вирусного вакцинного антигена, моноклонального антитела, поликлонального антитела и фрагмента антитела.

В другом конкретном воплощении изобретения физиологически активный белок или пептид характеризуется тем, что он выбран из группы, состоящей из эксендина-4, производного эксендина-4, агониста GLP-1, инсулина и двойного агониста GLP-1/глюкагона.

В другом конкретном воплощении изобретения производное эксендина-4 характеризуется тем, что он является производным эксендина-4, в котором заряд N-конца эксендина-4 модифицирован, который выбран из группы, состоящей из производного эксендина-4, в котором N-концевая аминная группа эксендина-4 удалена, производного эксендина-4, в котором N-концевая аминная группа эксендина-4 заменена гидроксильной группой, производного эксендина-4, в котором N-концевая аминная группа эксендина-4 заменена карбоксильной группой, производного эксендина-4, в котором N-концевая аминная группа эксендина-4 модифицирована диметильной группой, и производного эксендина-4, в котором удален α -углерод N-концевого гистидинового остатка эксендина-4.

В другом конкретном воплощении изобретения вышеуказанный внутренний остаток отличается тем, что он представляет собой лизин в положении 12 или 27 производного эксендина-4, в котором модифицирован N-концевой заряд эксендина-4.

В другом конкретном воплощении изобретения вышеуказанный внутренний остаток характеризуется тем, что он представляет собой остаток лизина в положении 27 производного эксендина-4, в котором N-концевой заряд эксендина-4 модифицирован.

В другом конкретном воплощении изобретения производное эксендина-4, в котором изменен заряд на N-конце эксендина-4, характеризуется тем, что оно представляет собой производное эксендина-4, в котором α -углерод N-концевого остатка гистидина в эксендине-4 удален.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая конъюгат физиологически активного белка или пептида, в котором носитель связан с неконцевым внутренним остатком физиологически активного белка или пептида посредством непептидильного линкера, где конъюгат демонстрирует пониженную иммуногенность по сравнению с иммуногенностью физиологически активного белка или пептида, с которым не связан носитель.

В одном конкретном воплощении изобретения вышеуказанный конъюгат характеризуется тем, что он обладает пониженной иммуногенностью, которая является побочным эффектом препарата продолжительного действия.

В другом конкретном воплощении изобретения непептидильный линкер характеризуется тем, что он представляет собой полиэтиленгликоль.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата физиологически активного белка или пептида, в котором носитель связан с неконцевым внутренним остатком физиологически активного белка или пептида.

Преимущественные эффекты изобретения.

Конъюгат физиологически активного белка или пептида по настоящему изобретению может значительно уменьшить иммуногенность в человеческом организме и, таким образом, уменьшить уровень продуцирования антител против белков или пептидов. Следовательно, преимуществами настоящего конъюгата является то, что явление уменьшения клинических эффектов физиологически активного белка или пептида является низким и он может быть эффективно использован в разработке композиций пролонгированного действия, имеющих высокую устойчивость к иммунному ответу.

Краткое описание графических материалов

На фигуре представлена диаграмма, показывающая сравнение частоты генотипа HLA-DR донора в тесте Т-клеточной активности *ex vivo* с этим же параметром для населения во всем мире, Европе и Северной Америке.

Наилучший вариант осуществления изобретения.

Настоящее изобретение относится к способу уменьшения иммуногенности физиологически активного белка или пептида по сравнению с иммуногенностью белка или пептида, с которым носитель не был связан, который включает стадию связывания носителя с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида.

В изобретении авторы обнаружили способ уменьшения иммуногенности физиологически активного белка или пептида, в котором непептидный линкер и Fc-фрагмент связаны с внутренним остатком, а не с концевым остатком физиологически активного белка или пептида, таким образом ингибируя механизм, в котором этот нужный белок или пептид действует как антиген. Авторы настоящего изобретения установили, что в случае использования способа, описанного выше, активация Т-клеток и реакция продуцирования антител у животных значительно ингибируется по сравнению со способом получения конъюгата путем модификации других сайтов, таких как N-конец пептида. В результате авторы настоящего изобретения обнаружили, что конъюгат физиологически активного белка или пептида, используемый в качестве обычного белкового фармацевтического препарата, имеет новое применение в качестве композиции и способа уменьшения иммуногенности физиологически активного белка или пептида.

Уменьшение иммуногенности в организме может быть измерено без ограничения посредством известного способа. Например, разница в иммуногенности может быть подтверждена способом измерения активности Т-клеток *ex-vivo*, который включает соединение каждого из носителей с N-концом или с сайтами, отличными от N-конца, включающими C-конец. Альдегидная реакционноспособная группа селективно реагирует с N-концом при низком pH, а также она может образовать ковалентную связь с остатком

лизина при условии высокого рН, например рН 9,0. Реакцию пегилирования проводят при изменении рН реакционного раствора, и затем позиционные изомеры могут быть выделены из реакционной смеси с использованием ионообменной колонки.

Когда соединение выполняют в положении, отличном от N-конца, который является важным участком в активности белка или пептида *in vivo*, в положение модифицируемого аминокислотного остатка можно вводить реакционноспособную тиольную группу, таким образом формируя ковалентную связь между белком или пептидом и малеимидной группой непептидильного полимера.

Когда соединение выполнено в положении, отличном от N-конца, который является важным участком в активности белка или пептида *in vivo*, в положение модифицируемого аминокислотного остатка вводят аминогруппу, таким образом формируя ковалентную связь между белком или пептидом и альдегидной группой непептидильного полимера.

Способ защиты N-терминального конца включает метилирование, дезаминирование или ацетилирование в дополнение к диметилированию, но не ограничивается ими.

В настоящем изобретении "физиологически активный белок или пептид" относится к белку или пептиду, который может контролировать генетическую экспрессию или физиологическую функцию. Физиологически активный белок или пептид может быть включен, без ограничения, в объем настоящего изобретения, при условии что носитель связан с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида по настоящему изобретению, таким образом, демонстрируя уменьшенную иммуногенность по сравнению с иммуногенностью белка или пептида, с которым носитель не связан. Как описано ниже, носитель может быть связан посредством линкера, более конкретно непептидильного линкера, с физиологически активным белком или пептидом.

Кроме того, физиологически активный белок или пептид включает, в дополнение к нативному биологически активному белку или пептиду, его производные, варианты или фрагменты.

Примеры физиологически активного белка или пептида включают пептид против ожирения, инсулинотропный пептид или его аналог, лептин, инсулин, аналог инсулина, глюкагон, гормон роста человека, рилизинг-гормон гормона роста, рилизинг-пептид гормона роста, интерферон, рецептор интерферона, колониестимулирующий фактор, глюкагоноподобный пептид (GLP-1 и т.п.), двойной агонист GLP-1/глюкагона, желудочный ингибиторный полипептид (GIP), сопряженный с G-белком рецептор, интерлейкин, рецептор интерлейкина, фермент, интерлейкин-связывающий белок, цитокин-связывающий белок, фактор активации макрофагов, макрофагальный пептид, фактор В-клеток, фактор Т-клеток, белок А, фактор подавления аллергии, гликопротеин клеточного некроза, иммунотоксин, лимфотоксин, фактор некроза опухолей, фактор ингибирования опухоли, фактор роста метастазов, α -1-антитрипсин, альбумин, α -лактальбумин, аполипопротеин-Е, фактор эритропоэза, высокогликозилированный фактор эритропоэза, ангиопоэтин, гемоглобин, тромбин, пептид активации тромбинового рецептора, тромбомодулин, факторы крови VII, VIIa, VIII, IX и XIII, фактор активации плазминогена, фибрин-связывающий пептид, урокиназу, стрептокиназу, гирудин, белок С, С-реактивный белок, ингибитор ренина, ингибитор коллагеназы, супероксиддисмутазу, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста эпителиальных клеток, фактор роста клеток эпидермиса, ангиостатин, ангиотензин, фактор роста кости, костный морфогенетический белок, кальцитонин, атриопептин, хрящевой индуцирующий фактор, элкатонин, фактор активации соединительной ткани, ингибитор пути тканевого фактора, фолликулолестимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, рилизинг-гормон лютеинизирующего гормона, фактор роста нервов, паратиреоидный гормон, релаксин, секретин, соматомедин, инсулиноподобный фактор роста, адренокортикальный гормон, глюкагон, холецистокинин, панкреатический полипептид, гастрин-высвобождающий пептид, кортикотропин-высвобождающий фактор, тиреостимулирующий гормон, аутоаксин, лактоферрин, миостатин, рецептор, антагонист рецептора, антиген клеточной поверхности, вирусный вакцинный антиген, моноклональное антитело, поликлональное антитело и фрагмент антитела, без ограничения ими.

Более конкретно, физиологически активный белок или пептид может включать инсулин, инсулинотропный пептид или двойной агонист GLP-1/глюкагона, но не ограничен ими.

В настоящем изобретении термин "инсулин" включает все пептиды или модифицированные пептиды, которые оказывают стимулирующее действие на рецепторы инсулина. Инсулин может представлять собой, например, природный инсулин, быстродействующий инсулин, базальный инсулин, аналог инсулина, в котором любая аминокислота природного инсулина изменена посредством любого способа, выбранного из замещения, добавления, делеции и модификации или комбинации этих способов или может быть его фрагментом. Инсулин, используемый в настоящем изобретении, также может быть длительно действующим инсулином, к которому применили методы длительного действия для преодоления короткого времени полуэлиминации. В частности, инсулин может быть длительно действующим инсулином или аналогом длительно действующего инсулина, который можно вводить один раз в неделю, но не ограничен ими.

Некоторые конкретные примеры инсулина по настоящему изобретению включают инсулин или аналог инсулина и его длительно действующий тип, как описано в патенте Кореи 10-1058290 (или в международной публикации WO 2008-082274) или в публикации патентной заявки Кореи 2014-0106452

(или в международной публикации WO 2014-133324), полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки, но не ограничены ими.

Используемый в данном документе термин "аналог инсулина" относится к веществу, которое сохраняет такую же функцию контролирования уровня глюкозы в крови *in vivo*, что и природный инсулин. В частности, аналоги инсулина включают такие, в которых модифицирована одна или более аминокислот в последовательности природного инсулина. Аналог инсулина может быть аналогом инсулина, в котором изменена аминокислота цепи А или цепи В природного инсулина. Аминокислотная последовательность природного инсулина является следующей.

Цепь А

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Ty

r-Cys-Asn (SEQ ID NO: 1)

Цепь В

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-

Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO: 2)

В частности, по меньшей мере одна аминокислота в природном инсулине может иметь модификацию, выбранную из группы, состоящей из замещения, добавления, делеции, модификации и их комбинации, но не ограниченную ими.

В случае замены или добавления аминокислот могут быть использованы 20 аминокислот, которые обычно наблюдаются в человеческом белке, а также нетипичные или не встречающиеся в природе аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот могут включать фармацевтические средства Sigma-Aldrich, ChemPer и Genzyme. Пептиды, включающие такие аминокислоты и типичную последовательность пептида, могут быть синтезированы или приобретены в коммерческих компаниях по синтезу пептидов, например в American peptide company. Inc. и Bachem (США) или Apygen (Корея).

В частности, вышеуказанные аналоги инсулина включают инвертированный инсулин, вариант инсулина, фрагмент инсулина, агонист инсулина, производное инсулина и тому подобные и способ их получения включает генетическую рекомбинацию, а также твердофазный метод, но не ограничен ими.

Термин "производное инсулина" показывает гомологию аминокислотной последовательности с А-цепью и В-цепью природного инсулина при сохранении функции контроля за уровнем глюкозы в крови организма и включает пептидную форму, которая может иметь некоторые группы на аминокислотных остатках, которые химически замещены (например α -метилованием, α -гидроксилированием), удалены (например, дезаминированием) или изменены (например, N-метилованием). Кроме того, производное инсулина включает пептидный имитатор и низкомолекулярное или высокомолекулярное соединение, которое может связываться с рецептором инсулина, чтобы контролировать уровень глюкозы в крови в организме, даже без гомологии с природным инсулином и аминокислотной последовательностью.

Используемый здесь термин "фрагмент инсулина" относится к фрагменту инсулина, где одна или более аминокислот добавлены или удалены. Добавленная аминокислота может представлять собой аминокислоту, которая отсутствует в нативном состоянии (например аминокислоту D-типа). Такой фрагмент инсулина сохраняет функцию контролирования в организме уровня глюкозы в крови.

При использовании здесь, термин "вариант инсулина" представляет собой пептид, имеющий одну или более аминокислотных последовательностей, отличных от последовательностей инсулина и сохраняющий функцию контролирования в организме уровня глюкозы в крови.

Способы получения агониста, производного, фрагмента и варианта инсулина по настоящему изобретению соответственно могут быть использованы по отдельности и в комбинации. Например, настоящее изобретение включает пептид, который имеет одну или более аминокислотных последовательностей, отличных от последовательностей нативного инсулина, имеет дезаминирование в концевом аминокислотном остатке и сохраняет функцию контролирования в организме уровня глюкозы в крови.

Данное описание агонистов, производных, фрагментов и вариантов может быть применено к другим типам белков или пептидов.

В частности, аналоги инсулина могут быть такими, в которых одна или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислот в положении 1, аминокислот в положении 2, аминокислот в положении 3, аминокислот в положении 5, аминокислот в положении 8, аминокислот в положении 10, аминокислот в положении 12, аминокислот в положении 16, аминокислот в положении 23, аминокислот в положении 24, аминокислот в положении 25, аминокислот в положении 26, аминокислот в положении 27, аминокислот в положении 28, аминокислот в положении 29, аминокислот в положении 30 цепи В; аминокислот в положении 1, аминокислот в положении 2, аминокислот в положении 5, аминокислот в положении 8, аминокислот в положении 10, аминокислот в положении 12, аминокислот в положении 14, аминокислот в положении 16, аминокислот в положении 17, аминокислот в положении 18, аминокислот в положении 19 и аминокислот в положении 21 цепи А, заменены другими аминокислотами и более конкретно такими, в которых одна или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислот в положении 8, аминокислот в положении 23, аминокислот в положении 24, аминокислот в положении 25 цепи В; аминокислот в положении 1, аминокислот в положении 2, аминокислот в положении 14 и

аминокислот в положении 19 цепи А заменены другими аминокислотами.

В частности, среди вышеуказанных аминокислот те, в которых 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, более 15, 16 или более, 17 или более, 18 или более, 19 или более, 20 или более, 21 или более, 22 или более, 23 или более, 24 или более, 25 или более, 26 или более, или 27 или более аминокислот, замененных другими аминокислотами, могут быть использованы, но не ограничены ими.

Аминокислотные остатки в вышеуказанных положениях могут быть заменены аланином, глутаминовой кислотой, аспарагином, изолейцином, валином, глутамином, глицином, лизином, гистидином, цистеином, фенилаланином, триптофаном, пролином, серином, треонином и/или аспарагиновой кислотой.

В настоящем изобретении "инсулинотропный пептид" относится к пептиду, который сохраняет функцию секреции инсулина. Инсулинотропный пептид может стимулировать синтез или экспрессию инсулина в β -клетках поджелудочной железы. В частности, инсулинотропный пептид представляет собой GLP (глюкагоноподобный пептид)-1, эксендин-3 или эксендин-4, но не ограничен ими. Инсулинотропный пептид включает природные инсулинотропные пептиды, их предшественники, их агонисты, их производные, их фрагменты и их варианты. Кроме того, может быть включена их комбинация, как описано выше.

GLP-1 представляет собой гормон, секретируемый тонким кишечником, и, как правило, способствует биосинтезу и секреции инсулина, ингибирует секрецию глюкагона и способствует усвоению глюкозы клетками. В тонком кишечнике предшественник глюкагона распадается на три пептида, т.е. глюкагон, GLP-1 и GLP-2. Здесь, под GLP-1 подразумевается GLP-1 (1-37), который исходно находится в форме, не имеющей инсулинотропной функции, но затем обрабатывается и превращается в активированные формы GLP-1 (7-37).

Эксендин-4 относится к пептидам, имеющим 39 аминокислот, которые демонстрируют 53% гомологию аминокислотной последовательности с GLP-1. Эксендин-4 может иметь следующую последовательность, без ограничения ею.

Эксендин-4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val
Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
(SEQ ID NO: 3)

В то же время эксендин-3 представляет собой полипептид, имеющий аминокислоты в положениях 2 и 3, отличные от аминокислот эксендина-4. Эксендин-3 представляет собой такой эксендин, в котором аминокислоты в положениях 2 и 3 эксендина-4 заменены серином и аспарагиновой кислотой соответственно, и он может быть представлен в виде Ser²Asp³-эксендин-4 (1-39). В частности, эксендин-3 может иметь следующую последовательность, без ограничения ею.

Эксендин-3

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val
Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
(SEQ ID NO: 4)

Описанное выше производное инсулинотропного пептида может быть таким, в котором N-конец инсулинотропного пептида модифицирован. Более конкретно, производное инсулинотропного пептида может вызывать быструю диссоциацию рецептора путем изменения заряда на N-конце, и он может представлять собой производное, в котором положительный заряд на N-конце изменен на нейтральный или чистый отрицательный заряд.

Производное инсулинотропного пептида по настоящему изобретению может включать дезаминогистидильное производное, где удалена N-концевая амино (или аминная) группа инсулинотропного пептида, β -гидроксиимидазолпропионильное производное, где аминогруппа заменена гидроксильной группой, диметил-гистидильное производное, где аминогруппа модифицирована двумя метильными группами, β -карбоксиимидазолпропионильное производное, где N-концевая аминогруппа заменена карбоксильной группой, или имидазацетильное производное, где α -углерод N-концевого остатка гистидина удален с сохранением только имидазацетильной группы и, таким образом, положительный заряд аминогруппы удален, а также другие производные с модификацией N-концевой аминогруппы включены в объем настоящего изобретения.

В качестве примера, производное инсулинотропного пептида может представлять собой производное, в котором N-концевая амино (или аминная) группа или аминокислотный остаток эксендина-4 химически модифицированы. В частности, оно представляет собой производное эксендина-4, полученное посредством замены или удаления α -аминогруппы, присутствующей на α -углероде N-концевого гистидинового остатка (первая аминокислота) эксендина-4. Более конкретно, оно может включать дезаминогистидил-эксендин-4 (ОА-эксендин-4) с удалением N-концевой аминогруппы, β -гидроксиимидазопропил-эксендин-4 (НУ-эксендин-4), полученный посредством замены N-концевой аминогруппы гидро-

кисильной группой, β -карбоксамидазопропил-эксендин-4 (CX-эксендин-4), полученный посредством замены N-концевой аминогруппы карбоксильной группой, диметил-гистидил-эксендин-4 (DM-эксендин-4), полученный посредством модификации N-концевой аминогруппы двумя метильными группами, или имидзаоацетил-эксендин-4 (CA-эксендин-4) с удалением α -углерода N-концевого остатка гистидина и тому подобное.

Очевидно, что инсулинотропный пептид, описанный в публикации патентной заявки Кореи 10-2012-0135123 (или международной публикации WO 2012/165915) или в международной публикации WO 2014/107035, также включен в объем настоящего изобретения. Полное содержание этих публикаций включено в настоящее описание посредством ссылки.

В настоящем изобретении "двойной агонист GLP-1/глюкагона" включает пептиды или их фрагменты, предшественники, варианты или производные, которые имеют двойную активность GLP-1/глюкагона, подобно оксинтомодулину, природному двойному агонисту GLP-1/глюкагона. В настоящем изобретении двойной агонист GLP-1/глюкагона может быть двойным агонистом GLP-1/глюкагона, к которому применены методы длительного действия для преодоления короткого времени полуэлиминации, и предпочтительно длительно действующим двойным агонистом GLP-1/глюкагона, который можно вводить один раз в неделю, но не ограничен ими.

Двойной агонист GLP-1/глюкагона включает оксинтомодулин.

"Оксинтомодулин" относится к пептиду, полученному из пре-глюкагона, предшественника глюкагона. В настоящем изобретении оксинтомодулин включает природный оксинтомодулин, его предшественник, его производное, его фрагмент, его вариант и тому подобное, как описано выше.

Оксинтомодулин может иметь, в частности, аминокислотную последовательность HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNIA (SEQ ID NO: 5), но не ограничен ею.

Производное оксинтомодулина включает пептид, производное пептида или пептидный имитатор, который получают путем добавления, делеции или замены любой аминокислоты в последовательностях оксинтомодулина, и который может активировать как рецептор GLP-1, так и рецептор глюкагона, и, в частности, может активировать каждый рецептор на более высоком уровне по сравнению с уровнем, активируемым природным оксинтомодулином.

Некоторые конкретные примеры двойного агониста GLP-1/глюкагона по настоящему изобретению включают двойной агонист GLP-1/глюкагона и его производное или его длительно действующий тип, как описано в публикации патентной заявки Кореи 10-20125-01372771 (или в международной публикации WO 2012-169798) и 10-2012-01639579 (или в международной публикации WO 2012-173422), полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

В настоящем изобретении носитель, который связан с физиологически активным белком или пептидом, может представлять собой вещество, которое может увеличивать время полуэлиминации физиологически активного белка или пептида *in vivo*.

Примеры физиологически активного белка или пептида включают различные вещества, способные уменьшать почечный клиренс физиологически активного белка или пептида, например полиэтиленгликоль, жирные кислоты, холестерин, альбумин или его фрагмент, альбумин-связывающее вещество, полимер из повторяющихся единиц определенной аминокислотной последовательности, антитело, фрагмент антитела, FcRn-связывающее вещество, *in-vivo* соединительная ткань или ее производное, нуклеотид, фибронектин, трансферрин, эластин-подобный полипептид (ELP), полипептид XTEN, карбоксиконцевой пропептид (СТР), структуро-индуцирующий зонд (SIP), сахарид, высокомолекулярный полимер, определенная аминокислотная последовательность, полимер из повторяющихся единиц определенной аминокислотной последовательности и тому подобное. Кроме того, связь между физиологически активным белком или пептидом и носителем включает генетическую рекомбинацию и связь *in vitro*, но не ограничивается ими.

Носитель может быть ковалентно или нековалентно связан с физиологически активным белком или пептидом. Вышеописанное FcRn-связывающее вещество может представлять собой Fc-область иммуноглобулина, например Fc IgG.

При использовании полиэтиленгликоля в качестве носителя может быть использован метод Recode фирмы Ambrx Inc., который позволяет осуществить сайт-специфическое связывание с полиэтиленгликолем. Также может быть использован метод гликопегилирования компании Neose, который позволяет осуществить сайт-специфическое связывание с гликозилированной группировкой. Кроме того, можно использовать метод высвобождаемого PEG, в котором полиэтиленгликоль медленно удаляется из организма, без ограничения им. Кроме того, способы, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают методы, которые увеличивают биодоступность при использовании PEG. Кроме того, непептидные полимеры, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахариды, декстран, поливинилэтиловый эфир, биоразлагаемый полимер, липидный полимер, хитины или гиалуроновая кислота также могут быть связаны с физиологически активным белком или пептидом с использованием вышеуказанных методов.

При использовании альбумина в качестве носителя метод, который можно использовать в настоящем изобретении, включает метод, в котором альбумин или фрагменты альбумина могут быть непосредственно ковалентно связаны с физиологически активным белком или пептидом для увеличения стабильности *in vivo*. Даже если альбумин не связан непосредственно, можно использовать метод, в котором альбумин-связывающие вещества, например альбумин-специфическое связывающее антитело или фрагмент антитела, связываются с физиологически активным белком или пептидом, чтобы таким образом связать их с альбумином, а также можно использовать метод, в котором определенный пептид/белок, обладающий аффинностью связывания с альбумином, связывается с физиологически активным белком или пептидом. Кроме того, можно использовать, без ограничения им, метод, в котором жирные кислоты, обладающие аффинностью связывания с альбумином, связываются с физиологически активным белком или пептидом. Может быть включен любой способ или метод связывания, который может увеличить стабильность *in vivo* с использованием альбумина.

Способ связывания с физиологически активным белком или пептидом путем использования антитела или фрагмента антитела в качестве носителя для увеличения времени полуэлиминации *in vivo* также может быть включен в настоящее изобретение. Может быть использовано антитело или фрагмент антитела, имеющий FcRn-связывающий сайт, и может быть использован любой фрагмент антитела, не содержащий FcRn-связывающего сайта, такой как Fab. Метод CovX-body компании CovX с использованием каталитического антитела и метод увеличения времени полуэлиминации *in vivo* с использованием Fc-области иммуноглобулина могут быть включены в настоящее изобретение.

При использовании Fc-области иммуноглобулина линкер, связывающийся с Fc-областью и физиологически активным белком или пептидом, и метод его связывания может включать пептидную связь или полиэтиленгликоль или тому подобное, но не ограничены ими, и может быть пригодным любой химический метод связывания. Кроме того, отношение связывания Fc-области и аналога инсулина может составлять 1:1 или 1:2, но не ограничено ими.

Константная область иммуноглобулина, включающая Fc-область, представляет собой биоразлагаемый полипептид, который может метаболизироваться *in vivo* таким образом, что его можно безопасно использовать в качестве носителя лекарственного средства. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина является более предпочтительной с точки зрения производства, очистки и выхода комплекса, чем целая молекула иммуноглобулина благодаря своей относительно низкой молекулярной массе. Также, вследствие отсутствия Fab, проявляющего высокую неоднородность из-за различия аминокислотной последовательности у разных антител, один Fc иммуноглобулина обеспечивает комплекс с существенно увеличенной гомогенностью и снижает возможность индуцирования антигенности крови.

Кроме того, вышеуказанный PEG неспецифически связан с конкретным сайтом и различными сайтами целевого пептида и тем самым увеличивает молекулярную массу пептида. Следовательно, PEG является эффективным в подавлении почечного клиренса и предотвращении гидролиза и, кроме того, он не вызывает специфических побочных эффектов. К тому же, когда PEG связан с экзогенным пептидом, он может ингибировать распознавание иммунными клетками антигенных сайтов, присутствующих в экзогенном пептиде. В частности, PEG может ингибировать фагоцитоз пептида антигенпредставляющей клеткой и его протеолиз. Таким образом, он способен снизить потенциальную возможность действия пептида в качестве антигена, в частности, для экзогенного белка для стимуляции активации CD4+T-клеток в качестве антигена, примерно 14-24 коротких пептидов, связанных с MHC II класса, должны быть представлены на антиген-представляющих клетках. Это может быть подавлено в ходе уменьшения молекулы до подходящего размера в зависимости от сайта связывания PEG.

В одном воплощении настоящего изобретения носитель и физиологически активный белок или пептид связаны посредством линкера, в частности непептидильного линкера.

В настоящем изобретении непептидильный линкер относится к биологически совместимому полимеру, включающему два или более повторяющихся звеньев, где повторяющиеся звенья связаны друг с другом любой ковалентной связью за исключением пептидной связи. Непептидильный линкер может использоваться взаимозаменяемо с непептидильным полимером.

Непептидильный линкер, пригодный в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации. Используемый в данном изобретении биоразлагаемый полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахарид, декстран, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA) или полимолочную-гликолевую кислоту (PLGA). В одном конкретном воплощении настоящего изобретения непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль. Кроме того, его производные, известные в данной области техники, и производные, легко получаемые способом, известным в данной области, могут быть включены в объем настоящего изобретения.

Пептидный линкер, который используется в слитом белке, полученном посредством обычного метода слияния в рамке считывания, имеет недостатки, заключающиеся в том, что он легко расщепляется *in vivo* протеолитическим ферментом и поэтому с помощью носителя нельзя получить достаточного эффекта увеличения времени полуэлиминации активного лекарственного средства в сыворотке, как ожидалось.

Однако поскольку непептидный полимер по настоящему изобретению представляет собой вещество, которое не имеет пептидной связи, он может, по существу, обладать устойчивостью к протеолитическому ферменту, таким образом увеличивая время полуэлиминации пептида в сыворотке. Молекулярная масса непептидного полимера, который можно использовать в настоящем изобретении, варьируется более определенно от 1 до 100 кДа и более конкретно от 1 до 20 кДа. Непептидный полимер по настоящему изобретению, связанный с Fc-областью иммуноглобулина, может являться одним типом полимера или комбинацией разных типов полимеров.

В настоящем изобретении носитель характеризуется тем, что он связан с неконцевым внутренним остатком физиологически активного белка или пептида. В этом случае, как описано выше, носитель может быть связан с неконцевым внутренним остатком физиологически активного белка или пептида посредством линкера.

Неконцевой внутренний остаток физиологически активного белка или пептида включает, без ограничения, любой остаток, который может, когда носитель связан с физиологически активным белком или пептидом, уменьшать его иммуногенность по сравнению с иммуногенностью белка или пептида, с которым носитель не связан, или с белком или пептидом, где носитель связан с концевым сайтом этого белка или пептида.

Неконцевая внутренняя аминокислота физиологически активного белка или пептида может представлять собой лизин, цистеин или тому подобное.

Более конкретно, когда физиологически активный белок или пептид представляет собой инсулинотропный пептид, в частности эксендин-4 или производное эксендина-4, его внутренний остаток может быть остатком лизина в положениях 12 и 27, но не ограничен ими.

Кроме того, при использовании альдегидного линкера в качестве непептидного полимера, N-конец взаимодействует с аминогруппой в остатке лизина, и для увеличения выхода реакции может быть использована модифицированная форма инсулинотропного пептида. Например, реакционноспособная аминогруппа может быть сохранена в нужном положении с использованием метода блокирования N-конца, метода замены остатка лизина, метода введения аминогруппы, а также пегилирования, и выход реакции сочетания может быть увеличен.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения конъюгат инсулинотропного пептида, в котором носитель связан с неконцевым внутренним остатком инсулинотропного пептида по изобретению, относится к конъюгату инсулинотропного пептида, в котором Fc-область иммуноглобулина специфически связана с аминогруппой, отличной от N-конца инсулинотропного пептида.

В одном конкретном воплощении, авторы настоящего изобретения провели серию экспериментов; т.е. в способе селективного связывания PEG с остатком лизина инсулинотропного пептида при связывании PEG с природным эксендином-4, реакцию выполняли при pH 9,0, таким образом индуцируя пегилирование лизинового остатка; в то время как в другом способе при связывании PEG с производным эксендина-4 в форме с удаленным или защищенным N-концом, реакцию проводили при pH 7,5, таким образом индуцируя пегилирование лизинового остатка. В результате было подтверждено, что в отличие от связывания с N-концом, при связывании с остатком лизина, активности T-клеток *ex vivo* были значительно подавлены (табл. 2-4).

Кроме того, термин "Fc-область иммуноглобулина", используемый здесь, относится к константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области 3 тяжелой цепи 3 (CH3) иммуноглобулина, исключая переменные области тяжелой и легкой цепи, константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и константную область 1 легкой цепи 1 (CL1) иммуноглобулина. Он также может включать шарнирную область в константной области тяжелой цепи.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может содержать часть или всю Fc-область, включая константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константную область 1 легкой цепи (CL1), за исключением переменных областей тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, пока он обладает физиологическим эффектом, который, по существу, аналогичен эффекту природного белка или лучше эффекта природного белка. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может быть фрагментом, имеющим делецию в относительно длинной части аминокислотной последовательности CH2 и/или CH3. Т.е. Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может содержать: 1) CH1-домен, CH2-домен, CH3-домен и CH4-домен, 2) CH1-домен и CH2-домен, 3) CH1-домен и CH3-домен, 4) CH2-домен и CH3-домен, 5) комбинацию одного или более доменов и шарнирную область иммуноглобулина (или часть шарнирной области), и 6) димер каждого домена константных областей тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению включает природную аминокислотную последовательность, а также его производную (мутантную) последовательность. Производная аминокислотная последовательность имеет другую последовательность из-за удаления, вставки, неконсервативной или консервативной замены одного или более аминокислотных остатков природных аминокислотных последовательностей или их комбинаций. Например, в Fc IgG аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, являются важными для связывания, могут быть использованы в качестве подходящей мишени для модификации. Кроме того, воз-

можно различные виды производных, включая такие, в которых удалена область, способная образовывать дисульфидную связь, или определенные аминокислотные остатки удалены на N-конце природной формы Fc, или к нему добавлен остаток метионина. Кроме того, для удаления эффекторных функций может быть осуществлена делеция в комплемент-связывающем сайте, таком как C1q-связывающий сайт и сайт антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Методы получения таких производных последовательностей Fc-области иммуноглобулина раскрыты в международных публикациях WO 97/34631, WO 96/32478 и подобных.

В данной области известны аминокислотные замены в белках и пептидах, которые не изменяют полностью активность молекул, (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающиеся обмены представляют собой обмены аминокислотных остатков Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly.

Кроме того, Fc-область, если это необходимо, может быть модифицирована посредством фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и тому подобного.

Вышеуказанные производные Fc могут быть производными, которые демонстрируют такую же биологическую активность, что и Fc-область по настоящему изобретению, или улучшают структурную стабильность Fc-области к нагреванию, pH или тому подобному.

Кроме того, эти Fc-области могут быть получены из природных форм, выделенных из людей и других животных, в том числе коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомячков, крыс или морских свинок, или могут быть рекомбинантами или их производными, полученными из трансформированных животных клеток или микроорганизмов. В данном случае способ получения из природного иммуноглобулина включает выделения целых иммуноглобулинов из организмов человека или животных с последующей обработкой их протеолитическим ферментом. Обработка папаином приводит к расщеплению природного иммуноглобулина на Fab и Fc, а обработка пепсином приводит к получению фрагментов pFc' и F(ab)₂. Эти фрагменты могут быть подвергнуты эксклюзионной хроматографии и тому подобному для выделения фрагментов Fc или pFc'.

В частности, Fc-область человеческого происхождения представляет собой рекомбинантную Fc-область иммуноглобулина, которая получена из микроорганизма.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может находиться в форме, имеющей природные сахарные цепи, увеличенные сахарные цепи по сравнению с природной формой или уменьшенные сахарные цепи по сравнению с природной формой, или может находиться в дегликозилированной форме. Увеличение, уменьшение или удаление сахарных цепей Fc-области иммуноглобулина может быть достигнуто способами, известными в данной области, такими как химический способ, ферментативный способ и метод геной инженерии с использованием микроорганизмов. Удаление сахарных цепей из Fc-области иммуноглобулина приводит к резкому уменьшению аффинности связывания с частью C1q компонента комплемента и к уменьшению или подавлению антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, в результате чего не индуцируются ненужные иммунные реакции *in vivo*. В связи с этим Fc-область иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной форме может быть более подходящей для цели настоящего изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

Используемый здесь термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных группировок из Fc-области и термин "агликозилирование" означает, что Fc-область получают в негликозилированной форме посредством прокариота, в частности *E. coli*.

При этом Fc-область иммуноглобулина может происходить из людей или других животных, включающих коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомячков, крыс и морских свинок, и предпочтительно из людей.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc-область, которую получают из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, или которую получают путем их комбинаций или их гибридов. В частности, она получена из IgG или IgM, которые входят в число наиболее распространенных белков в крови человека, и наиболее конкретно из IgG, который, как известно, увеличивает время полуэлиминации лиганд-связывающих белков, без ограничения ими.

С другой стороны, термин "комбинация", используемый здесь, означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные Fc-области иммуноглобулинов того же происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Т.е. димер или мультимер может быть образован двумя или более фрагментами, выбранными из группы, состоящей из фрагментов IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc и IgE Fc.

В настоящем изобретении термин "гибрид" означает, что последовательность, соответствующая по меньшей мере двум Fc-фрагментам разного происхождения, присутствует в одноцепочечной Fc-области иммуноглобулина. В настоящем изобретении доступны различные типы гибридов. Т.е. гибриды, состоящий из 1-4 доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 из IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc и IgD Fc, доступен и может включать шарнир. С другой стороны, IgG также можно разделить

на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и в настоящем изобретении возможна их комбинация или гибридизация. Именно подклассы IgG2 и IgG4 и более конкретно Fc-область IgG4 редко имеют эффекторную функцию, такую как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

Т.е. Fc-область иммуноглобулина для носителя лекарственного средства по настоящему изобретению может представлять собой, например, агликозилированную Fc-область, полученную из человеческого IgG4, но не ограничена ею. Fc-область, полученная из человека, является предпочтительной по сравнению с Fc-областью нечеловеческого происхождения, которая может вызывать нежелательные иммунные реакции, например реакции, которые могут действовать в качестве антигена в человеческом организме с получением нового антитела.

Непептидный полимер, используемый в одном конкретном воплощении настоящего изобретения, имеет реакционноспособную группу, способную связываться с Fc-областью иммуноглобулина и физиологически активным белком или пептидом. В другом конкретном воплощении эта реакционноспособная группа расположена на обоих терминальных концах. Обе концевые реакционноспособные группы непептидного полимера предпочтительно выбраны из группы, состоящей из реакционноспособной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного. Сукцинимидное производное может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, когда непептидный полимер имеет реакционноспособную группу реакционной альдегидной группы на своих обоих терминальных концах, он является эффективным в связывании на обоих терминальных концах с физиологически активным полипептидом и иммуноглобулином с минимальными неспецифическими реакциями. Конечный продукт, полученный путем восстановительного алкилирования посредством альдегидной связи, является намного более стабильным, чем связанный амидной связью. Альдегидная реакционноспособная группа селективно взаимодействует на N-конце при низком pH и образует ковалентную связь с остатком лизина при высоком pH, таком как pH 9,0.

Обе концевые реакционноспособные группы непептидного полимера могут быть одинаковыми или отличными друг от друга.

Например, непептидный полимер может иметь малеимидную группу на одном терминальном конце и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом терминальном конце. Когда полиэтиленгликоль, имеющий реакционноспособную гидроксигруппу на обоих своих терминальных концах, используется в качестве непептидного полимера, гидроксигруппа может быть активирована в различные реакционноспособные группы посредством известных химических реакций, или полиэтиленгликоль, имеющий коммерчески доступную модифицированную реакционноспособную группу, может быть использован, чтобы приготовить таким образом конъюгат физиологически активного белка или пептида, в частности конъюгат инсулинотропного пептида по настоящему изобретению.

Конъюгат инсулинотропного пептида по изобретению может не только поддерживать *in vivo* активности обычного инсулинотропного пептида, такие как стимулирование синтеза и секреции инсулина, подавление аппетита, потеря веса, увеличение чувствительности β -клеток к глюкозе крови, стимулирование пролиферации β -клеток или задержка опорожнения желудка, но он также может значительно увеличивать время полужизни пептида в сыворотке инсулинотропного пептида и, следовательно, длительные эффекты пептида *in vivo*. Соответственно, этот конъюгат инсулинотропного пептида полезен в лечении сахарного диабета, ожирения, остро коронарного синдрома или синдрома поликистоза яичников.

В другом воплощении настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая конъюгат физиологически активного белка или пептида, в котором носитель связан с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида посредством непептидного линкера, где конъюгат демонстрирует пониженную иммуногенность по сравнению с иммуногенностью физиологически активного белка или пептида, не связанного с носителем.

В частности, вышеуказанный конъюгат характеризуется тем, что он уменьшает иммуногенность, которая является побочным эффектом длительно действующего препарата.

Кроме того, непептидный линкер может представлять собой полиэтиленгликоль.

Физиологически активный белок или пептид, линкер и конъюгат являются такими, как описано выше.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата физиологически активного белка или пептида.

Более подробно, в настоящем изобретении предложен способ получения конъюгата физиологически активного белка или пептида, который включает следующие стадии:

(1) ковалентное связывание непептидного полимера, имеющего альдегидную, малеимидную или сукцинимидную реакционноспособные группы на обоих терминальных концах, с аминоксигруппой или тильной группой физиологически активного белка или пептида;

(2) выделение физиологически активного белка или пептида, ковалентно связанного с непептидным полимером через сайт, отличный от N-терминального конца физиологически активного белка

или пептида, из реакционной смеси со стадии (1); и

(3) ковалентное связывание Fc-области иммуноглобулина с другим терминальным концом непептидильного полимера, ковалентно связанного с физиологически активным белком или пептидом, с получением конъюгата физиологически активного белка или пептида, в котором оба терминальных конца непептидильного полимера связаны с Fc-областью иммуноглобулина и физиологически активным белком или пептидом соответственно.

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения белкового конъюгата, включающий следующие стадии:

(1) ковалентное связывание непептидильного полимера, имеющего альдегидные реакционноспособные группы на обоих терминальных концах, с остатком лизина физиологически активного белка или пептида;

(2) выделение физиологически активного белка или пептида, ковалентно связанного с непептидильным полимером через остаток лизина физиологически активного белка или пептида, из реакционной смеси со стадии (1); и

(3) ковалентное связывание Fc-области иммуноглобулина с другим терминальным концом непептидильного полимера, ковалентно связанного с физиологически активным белком или пептидом, с получением конъюгата, в котором оба терминальных конца непептидильного полимера связаны с Fc-областью иммуноглобулина и физиологически активным белком или пептидом соответственно.

Более конкретно, непептидильный полимер со стадии (1) и остаток лизина инсулинотропного пептида, который представляет собой физиологически активный белок или пептид, связывают при pH 7,5 или выше.

Вариант осуществления изобретения.

Ниже настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью следующих примеров. Однако следующие примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, а не для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Пегилирование эксендина-4 и выделение позиционного изомера пегилированного эксендина-4.

Для пегилирования N-конца природного эксендина-4 (American Peptides) с помощью 3.4K PropionALD (2) PEG (PEG с двумя пропиональдегидными группами с молекулярной массой 3,4 кДа, IDB Inc., Корея), пептид и PEG подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:15 с концентрацией пептида 3 мг/мл при 4°C в течение 90 мин. В это время проводили реакцию в 100 мМ буфере NaOAc (pH 4,0) и к нему добавляли восстанавливающий агент 20 мМ SCB (NaCNBH₃).

Также для пегилирования лизина (Lys) эксендина-4 с помощью 3.4K PropionALD (2) PEG, пептид и PEG подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:30 с концентрацией пептида 3 мг/мл при 4°C в течение 3 ч. При этом реакцию проводили в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 9,0) и к нему добавляли восстанавливающий агент, 20 мМ SCB. Монопегилированный пептид сначала очищали из реакционного раствора на SOURCE Q (XK 16 мл, Amersham Biosciences) и изомер выделяли на SOURCES (XK 16 мл, Amersham Biosciences). Можно видеть, что раньше появляется пик с пегилированным N-концом и затем появляются по порядку два лизина (Lys)-пегилированных пика. Пегилированные сайты подтверждали в элюированных пиках методом пептидного картирования.

Сначала элюировался Lys12-пегилированный конъюгат и затем элюировался Lys27-пегилированный конъюгат в последней порции. Было возможным идеальное разделение пиков N-концевого позиционного изомера и Lys12-позиционного изомера

Колонка : SOURCE Q (XK 16 мл, Amersham Biosciences) 58-27

Скорость потока : 2,0 мл/мин

Градиент : A 0 → 40% 80 мин B (A: 20 мМ трис, pH 8,5, B: A + 0,5 M NaCl)

Колонка : SOURCE S (XK 16 мл, Amersham Biosciences)

Скорость потока: 2,0 мл/мин

Градиент : A 0 → 100% 50 мин B (A: 20 мМ лимонная кислота, pH 3,0, B : A

+ 0,5 M KCl)

Пример 2. Пегилирование лизинового остатка CA-эксендина-4 и выделение позиционного изомера.

Для пегилирования остатка лизина (Lys) CA-эксендина-4 (American Peptides) с помощью 3.4K PropionALD (2) PEG, CA-эксендин-4 и PEG подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:30 с концентрацией CA-эксендина-4, равной 3 мг/мл при 4°C в течение 3 ч. CA-эксендин-4 представляет собой эксендин-4 с модифицированным N-концом, где α-углерод удален из N-концевого гистидинового остатка природного эксендина и β-углерод боковой цепи непосредственно связан с карбоксильным углеродом. При этом реакцию проводили в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 9,0) и к нему добавляли восстанавливающий агент, 20 мМ SCB. Монопегилированный пептид был сначала очищен из реакционного раствора на SOURCE Q (XK 16 мл, Amersham Biosciences), и изомер был выделен на SOURCES (XK 16 мл, Amersham Biosciences).

Можно видеть, что появились два лизин(Lys)-пегелированных пика. Пегелированные сайты подтверждали в элюированных пиках методом пептидного картирования.

Сначала элюировался Lys12-пегелированный конъюгат и затем Lys27-пегелированный конъюгат элюировался в последней порции. Было возможным идеальное разделение пиков N-концевого позиционного изомера и Lys12 позиционного изомера

Колонка : SOURCE Q (ХК 16 мл, Amersham Biosciences)

Скорость потока : 2,0 мл/мин

Градиент : А 0 → 40% 80 мин В (А: 20 мМ трис рН 8,5, В: А + 0,5 М NaCl)

Колонка : SOURCE S (ХК 16 мл, Amersham Biosciences)

Скорость потока : 2,0 мл/мин

Градиент : А 0 → 100% 50 мин В (А : 20 мМ лимонная кислота рН 3,0, В : А

+ 0,5 М KCl)

Пример 3. Получение конъюгата имидазоацетил-эксендин-4 (Lys27)-Fc иммуноглобулина.

3.4K ProrionALD(2) PEG подвергали взаимодействию с Lys CA-эксендина-4 с использованием имидазоацетил-эксендина-4 (CA-эксендин-4, AP, США) так же, как в примере 2. Затем проводили реакцию сочетания, используя последний пик изомера (позиционный изомер Lys 27), который демонстрирует большую реакционную способность и легко отличим от N-концевого изомера, из двух пиков Lys-изомеров. Пептид и Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:8, и с общей концентрацией белка 60 мг/мл при 4°C в течение 20 ч. Реакцию проводили в растворе 100 мМ К-Р (рН 6,0) и к нему добавляли восстанавливающий агент, 20 мМ SCB. После реакции сочетания двухстадийная очистка с использованием 16 мл SOURCE Q и 16 мл SOURCE ISO была такой же, как в примере 2. Результат анализа посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ показал чистоту 95,8%.

Пример 4. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) для ex vivo теста и выбора доноров.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли в пределах 24 ч из крови здоровых доноров. Донорская кровь была предоставлена британской национальной службой переливания крови UK National Blood Transfusion Service (Addenbrooke Hospital, Cambridge, UK). Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из лейкоцитарной плёнки, полученной методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием Lymphoprep™ (Axis-shield, Dundee, Scotland). Из них были удалены CD8+ Т-клетки с использованием CD8+ RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, London, UK). Мононуклеарные клетки периферической крови каждого донора хранили в жидком азоте вплоть до использования. Гаплоидный генотип HLA-DR клеток донора анализировали, используя набор для HLA-тканевого типирования на основе SSP-PCR (ПЦР с сиквенспецифическими праймерами) (Biotest, Solihull, UK). Реакционную способность Т-клеток тестировали, используя KLH (Keyhole Limpet Haemocyanin, Pierce (Perbio), Northumberland, UK), который представляет собой антигенный пептид, происходящий из гриппа А и вируса Эпштейна-Барр.

Были выбраны 50 доноров, представляющих частотность типа HLA-DR среди населения мира, которые составили одну группу. Гаплоидные генотипы MHC класса II и реакционная способность Т-клеток для каждого из доноров, составляющих эту группу, показаны в табл. 1 ниже. Частотность генотипа донора сравнивали с частотностью среди населения мира и результаты представлены на фигуре. В табл. 1 ниже показаны генотипы HLA-DR и реактивность Т-клеток на антигенные пептиды KLH (гемоцианин лимфы улитки) для каждого донора.

Таблица 1

Номер донора	Гаплотип	KLH	
		Тест 1	HAN03
1	DRB1*01,DRB1*13;DRB3*	2,25	18,69
2	DRB1*07,DRB1*12;DRB3*;DRB4*	1,11	1,60
3	DRB1*03,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	2,66	2,87
4	DRB1*01,DRB1*07;DRB3*;DRB4*	5,54	7,54
5	DRB1*03,DRB1*16;DRB3*;DRB5*	7,02	3,46
6	DRB1*01,DRB1*13;DRB3*	4,36	14,17
7	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	4,45	9,98
8	DRB1*03,DRB1*13;DRB3*	8,85	4,37
9	DRB1*01,DRB1*12;DRB3*	4,79	8,45
10	DRB1*01,DRB1*13;DRB3*	2,53	3,14
11	DRB1*07,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	3,00	10,29
12	DRB1*04,DRB1*13;DRB3*;DRB4*	2,70	9,31
13	DRB1*01,DRB1*12;DRB3*	2,55	15,07
14	DRB1*11,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	0,27	1,55
15	DRB1*07,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	3,03	8,78
16	DRB1*10,DRB1*13;DRB3*	4,08	4,65
17	DRB1*07,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	1,13	5,80
18	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	0,61	5,34
19	DRB1*03,DRB1*13;DRB3*	2,42	12,17
20	DRB1*04,DRB1*12;DRB3*;DRB4*	2,76	6,51
21	DRB1*15;DRB5*	3,38	3,27
22	DRB1*04,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	2,11	3,55
23	DRB1*04,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	1,93	3,28
24	DRB1*13,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	8,93	6,66
25	DRB1*11,DRB1*13;DRB3*	2,02	2,99
26	DRB1*04,DRB1*07;DRB4*	2,42	1,97
27	DRB1*11,DRB1*13;DRB3*	5,55	1,20
28	DRB1*04,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	3,97	3,93
29	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	2,00	6,76
30	DRB1*03,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	1,22	13,32
31	DRB1*15,DRB1*16;DRB5*	3,95	5,75
32	DRB1*03,DRB1*11;DRB3*	2,82	3,74
33	DRB1*13,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	2,43	1,97
34	DRB1*04,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	3,79	4,70
35	DRB1*01,DRB1*04;DRB4*	9,24	8,67
36	DRB1*03,DRB1*04;DRB3*;DRB4*	2,21	3,06
37	DRB1*10,DRB1*15;DRB5*	12,11	4,03
38	DRB1*08,DRB1*13;DRB3*	4,85	3,22
39	DRB1*04,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	5,37	6,43
40	DRB1*01,DRB1*16;DRB5*	3,22	4,15
41	DRB1*08,DRB1*15;DRB5*	2,24	2,92
42	DRB1*14;DRB1*15;DRB3*;DRB5*	20,58	13,67
43	DRB1*15,DRB1*16;DRB5*	3,50	4,88
44	DRB1*15;DRB5*	2,01	7,01
45	DRB1*07,DRB1*11;DRB3*;DRB4*	1,93	13,71
46	DRB1*01,DRB1*04;DRB4*	29,18	19,33
47	DRB1*03,DRB1*07;DRB3*;DRB4*	2,31	3,49
48	DRB1*07,DRB1*15;DRB4*;DRB5*	2,20	29,21
49	DRB1*03,DRB1*07;DRB3*;DRB4*	0,94	1,72
50	DRB1*03,DRB1*15;DRB3*;DRB5*	0,73	3,27

В указанной выше табл. 1 выделенная жирным шрифтом ячейка (доноры 17, 18, 27, 30 и 50) указывает случаи, когда реактивность с KLH до и после оттаивания клеток донора значительно отличается.

Пример 5. Тест пролиферации Т-клеток *ex vivo* EpiScreen™.

Для того чтобы идентифицировать механизм подавления иммуногенности в зависимости от пегелированных сайтов инсулинотропных пептидов, которые представляют типичный физиологически активный белок или пептид, сравнивали Т-клеточные пролиферативные способности несвязанного природного эксендина-4 и несвязанного СА-эксендина-4, СА-эксендина-4 (СА Эксендин-4-РЕС(внутренний)), пегелированного на остатке лизина и природного эксендина-4 (Эксендин-4-РЕС(N-концевой)), пегелированного на N-конце. При этом, поскольку СА-эксендин-4 не имеет N-концевого остатка, который может быть пегелирован, N-концевой пегелированный СА-эксендин-4 не был получен для СА-эксендина-4.

Для анализа пролиферации Т-клеток мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) донора оттаивали для измерения количества и жизнеспособности клеток. Клетки разбавляли до $4-6 \times 10^6$ клеток/мл в культуральной среде AIM-V. После перенесения клеток каждого донора в 24-луночные культуральные планшеты добавляли тестируемые образцы до конечной концентрации 50 мкг/мл ($n=3$). Группу, обработанную антигенным пептидом KLH, помещали для определения способности к размножению каждой донорской клетки. Все тестируемые группы и контрольные группы культивировали при 37°C и в условиях 5% CO₂ инкубатора в течение 8 суток. Часть клеток отбирали на 5-, 6-, 7- и 8-е сутки и помещали в 96-луночные культуральные планшеты для измерения скорости пролиферации клеток. Для измерения скорости пролиферации клеток, 0,75 мк [³H]-тимидина (Perkin Elmer Buckinghamshire, UK) добавляли в лунку и культивировали в течение 18 ч и затем собирали клетки с помощью 96-луночных фильтровальных планшетов, используя устройство для сбора клеток TomTec Mach III.

Радиоактивность каждой лунки (число импульсов в минуту, имп./мин) измеряли, используя жидкостной сцинтилляционный счетчик 1450 Microbeta Wallac Trilux Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer Buckinghamshire, UK). Результаты были определены на основе экспериментальных пороговых значений индекса стимуляции (SI), где SI два или более ($SI \geq 2$, $p < 0,05$) является положительным. В случае включения граничных значений, соответствующих $SI \geq 1,9$, это указывали отдельно, как (P*). В результате СА-эксендин-4 и эксендин-4 являются положительными у 12 и 10% доноров соответственно. Однако СА-эксендин-4, пегелированный по внутреннему остатку пептида, был негативными у всех доноров. С другой стороны, эксендин-4, пегелированный по N-концу, был положительным у 6% доноров. Соответственно, если пегелированию подвергался внутренний остаток лизина пептида, а не N-конец, иммуногенность пептида была в значительной степени подавлена (табл. 2). В табл. 2 показана пролиферация Т-клеток и секреция интерлейкина-2 (IL-2).

Таблица 2

	СА- Эксендин-4	Эксендин-4	СА- Эксендин-4-PEG (внутр.)	Эксендин-4- PEG (N-концевой)	Гуманизи- рованный A33	KLH
Донор 1	PE	E				PE
Донор 2						E
Донор 3					E	PE
Донор 4				P	E*	PE
Донор 5						PE
Донор 6						PE
Донор 7				E*	P*E	PE
Донор 8						P
Донор 9	PE*	PE			E*	PE
Донор 10						P
Донор 11						PE
Донор 12						PE
Донор 13				PE		PE
Донор 14						E
Донор 15						P
Донор 16		PE		PE*		PE
Донор 17	P	PE			PE	PE
Донор 18					PE*	PE
Донор 19						PE
Донор 20						PE
Донор 21		E	E		PE	PE
Донор 22					PE	PE
Донор 23	E					PE
Донор 24						PE
Донор 25						PE
Донор 26						P*E
Донор 27	PE	P*E				E
Донор 28						PE
Донор 29	PE*					PE
Донор 30						P
Донор 31						PE

Донор 32						PE*
Донор 33					P*E	P*E
Донор 34						PE
Донор 35						PE
Донор 36					PE	PE
Донор 37						PE
Донор 38						P
Донор 39						PE
Донор 40					E*	PE
Донор 41					P*E	PE
Донор 42						P
Донор 43	PE				PE	PE
Донор 44					PE	PE
Донор 45						PE
Донор 46					P*E	PE
Донор 47						PE
Донор 48		PE				PE
Донор 49						
Донор 50		E				PE
% пролиферации	12	10	0	6	22	92
ELISpot %	12	16	2	6	30	86
Пролиферация и ELISpot %	10	10	0	4	22	80
Корреляция %	83	100	N/A	67	100	87

В табл.3 показана величина и частотность Т-клеточного пролиферативного ответа (включая граничное значение SI \geq 1,9).

Таблица 3

	Среднее SI	Стандартное отклонение	Частота ответа (%)
СА Эксендин-4	2,09	0,2	12
Эксендин-4	2,68	1,46	10
СА-Эксендин-4-PEG (внутр.)	N/A	N/A	0
Эксендин-4-PEG(N-конц.)	2,33	0,17	6
Гуманизированный A33	2,17	0,28	22
KLH	5,16	3,94	92

Вышеуказанные результаты позволяют предположить, что иммуногенность физиологически активного белка или пептида, соединенного с непептидным полимером, в частности с PEG, через внутренний остаток, отличный от концевой остатка физиологически активного белка или пептида, ингибируется.

Пример 6. EpiScreen™ тест секреции интерлейкина-2 (IL-2) ex vivo.

Для того чтобы определить механизм подавления иммуногенности в зависимости от пегилированных сайтов инсулинотропных пептидов, которые являются типичным белком или пептидом, IL-2-секреторные способности несвязанного эксендина-4 и пегилированного эксендина-4 из примера 5 сравнивали и измеряли, используя донорские клетки и образцы, которые являются такими же, как в анализах пролиферации Т-клеток EpiScreen™. Антиинтерлейкин-2 антитело (R&D Systems, Abingdon, UK) связывали с ELISpot планшетами (Millipore, Herts, UK). Планшет промывали три раза PBS (фосфатно-солевым буферным раствором), затем добавляли PBS с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина и проводили реакцию. После промывания культуральной средой AIM-V донорские клетки, разбавленные средой AIM-V ($4-6 \times 10^6$ клеток/мл), распределяли по 100 мкл/лунка. Тестируемый образец добавляли в каждую из них по 50 мкл (n=6), так что конечная концентрация составляла 50 мкг/мл (n=6). После культивирования в течение 8 суток биотинилированное IL-2-детекторное антитело и стрептавидин-AP (R&D Systems, Abingdon, UK) связывали последовательно с планшетами ELISpot и затем к планшетам добавляли BCIP/NBT (R&D Systems, Abingdon, UK) для проявления пятна. Реакцию завершали промывкой дистиллированной водой и затем планшет сушили. Пятна на лунку (пят/лунка) сканировали и анализировали, используя Immunoscan Analyser. Результаты теста по измерению активности Т-клеток ex vivo определяли на основе экспериментального порогового значения индекса стимуляции (SI), где SI два или

более ($SI \geq 2$, $p < 0,05$) являлся положительными. В случае включения граничных значений, соответствующих $SI \geq 1,9$, это было отдельно обозначено как (P*). В результате СА-эксендин-4 и эксендин-4 являлись положительными у 12 и 16% доноров соответственно. Однако СА-эксендин-4, пегилированный по внутреннему остатку пептида, являлся положительным только у 2% доноров. С другой стороны, эксендин-4, пегилированный по N-концу, являлся положительным у 6% доноров. Соответственно, если пегилирование происходило на внутреннем лизине пептида, а не на N-конце, иммуногенность пептида была значительно подавлена (табл. 2-4). В табл. 4 показана величина и частотность Т-клеточного ответа в виде секреции интерлейкина-2 (IL-2) (включая граничное значение $SI \geq 1,9$).

Таблица 4

	Среднее SI	Стандартное отклонение	Частотность ответа (%)
СА-Эксендин-4	2,18	0,23	12
Эксендин-4	2,22	0,19	16
PEG-СА-Эксендин-4	2,35	N/A	2
3.4К PEG(N-конц.) Эксендин-4	2,09	0,17	6
Гуманизированный А33	2,24	0,43	30
KLH	3,79	1,84	86

Вышеуказанные результаты позволяют предположить, что иммуногенность физиологически активного белка или пептида, связанного с непептидным полимером, в частности с PEG, через внутренний остаток, отличный от концевой остатка физиологически активного белка или пептида, подавляется.

Пример 7. Получение антител против длительно действующих инсулинотропных пептидов у нормальных крыс.

Конъюгаты, в которых СА-эксендин-4 связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина через PEG, полученные в примере 3, вводили подкожно нормальным крысам Sprague Dawley раз в неделю в течение 26 недель (низкая, средняя или высокая дозировка), которых затем помещали на 4-недельный восстановительный период ($n = 40\sim 60$ /группа). Кровь собирали до и во время введения, в 13-, 19- и 26-ю неделю, и в конце восстановительного периода, из нее выделяли сыворотку. Определяли, продуцируются ли антитела против инсулинотропного пептида.

В результате, из 160 субъектов, которым вводили лекарственное средство, антитела были обнаружены только у двух после 13-недельного восстановительного периода. Однако было подтверждено, что эти антитела не являются нейтрализующими антителами для этого лекарственного средства (табл. 5). В табл. 5 показано продуцирование антител на 26-й неделе после введения крысам (SD Rat).

Таблица 5

Группа	Доза	число на группу	Положительные	Временная точка	% положительных	Нейтрализующее Ab
1	носитель	60	0	-	0	0
2	низкая доза	40	1	Неделя 13	2,5	0
3	средняя доза	40	0	-	0	0
4	высокая доза	60	1	восстановление	1,6	0
Всего		200	2		1,0	0

Пример 8. Тест по продуцированию антител против пептида длительной секреции инсулина у яванского макака.

Конъюгаты, в которых СА-эксендин-4 связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина через PEG, полученные в примере 3, подкожно вводили яванскому макаку один раз в неделю в течение 26 недель и затем помещали на 4-недельный период восстановления ($n=8\sim 12$ /группа). Кровь собирали до и во время введения на 13-, 19- и 26-ю неделю и в конце восстановительного периода, из нее выделяли сыворотку. Определяли, продуцируются ли антитела против инсулинотропного пептида.

В результате у всех субъектов не было обнаружено продуцирование антител (табл. 6). В табл. 6 показано продуцирование антител на 26-неделе введения у яванского макака.

Таблица 6

Группа	Доза	число на группу	положительные/общее	% положительных
1	носитель	12	0	0
2	низкая доза	8	0	0
3	средняя доза	8	0	0
4	высокая доза	12	0	0
Итого		40	0	0

Пример 9. Определение антитела к лекарственному средству в крови и оценка нейтрализующей способности.

Чтобы определить, продуцирует ли конъюгат из примера 3 антитело к лекарственному средству (ADA) в организме крысы или яванского макака, конъюгат проверяли посредством мостикового метода ELISA. Биотинилированный конъюгат из примера 3 связывали с 96-луночным микропланшетом, к дну которого был присоединен стрептавидин, и промывали водой. Дигоксигенин (DIG)-меченый конъюгат из примера 3 (ниже HM11260C) добавляли вместе с образцами сыворотки крыс или обезьян для взаимодействия и затем промывали водой. Затем добавляли анти-DIG антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (анти-DIG-POD антитело) и проявляли с помощью субстрата ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин).

Измеренная чувствительность в сыворотке крыс составляла 3,1 нг/мл и измеренная чувствительность в сыворотке обезьян составляла 12,5 нг/мл. Для оценки нейтрализующей способности против HM11260C обнаруженного анти-HM11260C антитела образцы сыворотки и HM11260C добавляли к человеческой клеточной линии, сверхэкспрессирующей GLP-1 (GLP-1R/CHO), и затем измеряли скорость ингибирования индукции цАМФ. Было подтверждено, что антитела, продуцируемые только двумя из 160 животных, не обладали нейтрализующей способностью.

Вышеуказанные результаты позволяют предположить, что иммуногенность физиологически активного белка или пептида уменьшалась в результате связывания непептидного линкера и Fc-фрагмента с внутренним остатком, отличным от конца физиологически активного белка или пептида, таким образом ингибируя механизм, в котором нужный пептид действует как антиген. Данные результаты также подтверждают, что при использовании способа продуцирования, описанного выше, активация Т-клеток и реакция продуцирования антител у животных значительно ингибировались.

Из приведенного выше описания специалистам в данной области техники понятно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без изменения технической сущности или существенных характеристик изобретения. При этом вышеуказанные воплощения представлены в иллюстративных целях, и их не следует рассматривать как ограничивающие. Это следует интерпретировать как включение всех изменений или модифицированных форм, полученных из значения и диапазона и их эквивалентов, указанных в прилагаемой формуле изобретения, а не вышеприведенном подробном описании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения иммуногенности физиологически активного белка или пептида, связанного с носителем, по сравнению с физиологически активным белком или пептидом, не связанным с носителем, который включает связывание носителя с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида посредством непептидного линкера,

где белок или пептид выбран из группы, состоящей из эксендина-4, производного эксендина-4, глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста GLP-1, инсулина и двойного агониста GLP-1/глюкагона; и

где носитель представляет собой полиэтиленгликоль, Fc-область иммуноглобулина или пегилированную Fc-область иммуноглобулина.

2. Способ по п.1, где непептидный линкер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

3. Способ по п.1, где белок или пептид представляет собой эксендин-4 или производное эксендина-4.

4. Способ по п.1, где производное эксендина-4 представляет собой эксендин-4, который имеет модифицированный заряд на N-конце, и указанное производное выбрано из группы, состоящей из эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа удалена, N-концевая аминокислотная группа заменена гидроксильной группой, N-концевая аминокислотная группа заменена карбоксильной группой, N-концевая аминокислотная группа модифицирована диметильной группой, или удален α -углерод N-концевого остатка гистидина эксендина-4.

5. Способ по п.1, где внутренний остаток представляет собой остаток лизина в положении 12 или 27

производного эксендина-4, в котором N-концевой заряд эксендина-4 модифицирован, и где α -углерод N-концевого гистидинового остатка эксендина-4 возможно удален.

6. Композиция, содержащая конъюгат физиологически активного белка или пептида, в котором носитель связан с неконцевым, внутренним остатком физиологически активного белка или пептида посредством непептидного линкера, где конъюгат имеет пониженную иммуногенность по сравнению с иммуногенностью указанного белка или пептида, который не связан с носителем,

где физиологически активный белок или пептид выбран из группы, состоящей из эксендина-4, производного эксендина-4, GLP-1, агониста GLP-1, инсулина и двойного агониста GLP-1/глюкагона;

где носитель представляет собой полиэтиленгликоль, Fc-область иммуноглобулина или пегилированную Fc-область иммуноглобулина; и

где непептидный линкер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

7. Композиция по п.6, где указанная иммуногенность является побочным эффектом длительно действующего препарата.

8. Композиция по п.6, где непептидный линкер представляет собой полиэтиленгликоль.

