(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 036479 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.16

(21) Номер заявки
201791498

(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) ПЕПТИД, АКТИВИРУЮЩИЙ РЕЦЕПТОР ГПП-1 И РЕЦЕПТОР ГЛЮКАГОНА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ОЖИРЕНИЯ

(31) **10-2014-0193691**
(32) **2014.12.30**
(33) **KR**
(43) **2017.10.31**
(86) **PCT/KR2015/014481**
(87) **WO 2016/108617 2016.07.07**

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

(72) Изобретатель:
Дзунг Сунг Юб, Парк Йоунг Дзин, Ли Дзонг Сук, Чой Дзае Хиук, Лим Чанг Ки, Квон Се Чанг (KR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2012169798
KR-A-1020120052973
KR-A-1020090096498
US-A1-20130035285
WO-A1-2009058734

(57) Изобретение относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 12, 13 или 14, где пептид активирует рецептор ГПП-1 и рецептор глюкагона. Изобретение также относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения ожирения, содержащей указанный пептид в качестве активного агента. Изобретение также относится к способу профилактики или лечения ожирения, включающему введение субъекту указанного пептида или указанной фармацевтической композиции, а также к применению указанного пептида или указанной фармацевтической композиции для профилактики или лечения ожирения. Пептид в соответствии с настоящим изобретением является более эффективным в отношении активации как рецепторов глюкагоноподобного пептида-1, так рецепторов глюкагона по сравнению с нативным глюкагоном и, таким образом, может найти широкое применение в качестве эффективного агента для лечения ожирения.

036479 B1

036479 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым производным глюкагона, имеющим превосходный эффект как в отношении рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), так и в отношении рецепторов глюкагона, и к композиции для профилактики или лечения ожирения, содержащей в качестве активного ингредиента производное глюкагона.

Уровень техники

Современные экономические успехи и изменение образа жизни сопровождались большими изменениями в привычках питания. В частности, современные деловые люди набирают избыточный вес и страдают ожирением из-за высококалорийной пищи и недостаточной физической нагрузки. Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более одного миллиарда взрослых во всем мире имеют избыточный вес, среди них более трех миллионов - с клиническим диагнозом тяжелого ожирения, а 250 000 человек в Европе и 2,5 миллиона людей во всем мире ежегодно умирают от избыточного веса или ожирения (World Health Organization, Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 2004).

Избыточный вес и ожирение повышают кровяное давление и уровень холестерина в крови, что становится причиной различных заболеваний, включая заболевания сердца, диабет, артрит и т.д., или приводят к осложнениям. Кроме того, избыточный вес и ожирение являются одними из основных причин, повышающих риск таких заболеваний, как артериосклероз, гипертония, гиперлипидемия и сердечные заболевания у детей и подростков, а также у взрослых.

Таким образом, сегодня ожирение признано серьезным недугом, распространенным во всем мире и являющимся причиной различных заболеваний. Однако, поскольку считается, что вылечить ожирение можно, приложив собственные усилия, пациенты, страдающие ожирением, оцениваются как люди с низким уровнем самоконтроля. Тем не менее, ожирение не является легко излечимым заболеванием, поскольку оно тесно связано с механизмами контроля аппетита и энергетического метаболизма. Соответственно для лечения ожирения одновременно требуются как приложение усилий самого пациента для контроля аппетита, так и лечение аномального механизма действия энергетического метаболизма. В связи с этим возникла необходимость в разработке лекарственного средства, способного лечить аномальный механизм действия.

В результате указанных выше усилий были разработаны лекарства против ожирения, такие как Римонабант (Sanofi-Aventis), Сибутрамин (Abbott), Контрав (Takeda), Орлистат (Roche) и т.д. Однако эти лекарства имели недостатки, такие как фатальные побочные реакции или небольшая эффективность лечения ожирения. Например, прием Римонабанта вызывает такую неблагоприятную реакцию, как расстройство центральной нервной системы, прием Сибутрамина и Контрава вызывает неблагоприятные реакции сердечно-сосудистой системы, а прием Орлистата приводит к снижению массы тела только примерно на 4 кг после его применения в течение года. Соответственно можно с уверенностью утверждать, что отсутствует лекарство против ожирения, которое можно безопасно назначать страдающим ожирением пациентам.

В этой связи были проведены активные исследования для разработки нового фармацевтического препарата, который позволил бы решить проблемы, возникающие при приеме обычных препаратов против ожирения, при этом в последнее время большое внимание уделяется производным глюкагона. Глюкагон секретируется поджелудочной железой, когда уровень глюкозы в крови падает в результате, например, медикаментозного лечения, заболевания, действия гормонов или дефицита фермента. Глюкагон сигнализирует печени о необходимости разложения гликогена до глюкозы и повышения уровня глюкозы в крови до нормального. Кроме того, имеются сообщения о том, что глюкагон является эффективным против ожирения, дополнительно к эффекту повышения уровня глюкозы в крови, за счет подавления аппетита и активации гормон-чувствительной липазы в жировых клетках, тем самым способствуя разложению жира.

Глюкагоноподобный пептид-1 (далее называемый "ГПП-1"), производное глюкагона, представляет собой вещество, находящееся на стадии разработки в качестве лекарственного средства для лечения гипергликемии у больных диабетом. ГПП-1 увеличивает синтез инсулина и способствует его секреции, подавляет секрецию глюкагона, подавляет опорожнение желудка, улучшает эффективность потребления глюкозы и подавляет желание приема пищи. Также известно, что эксендин-4, который секретируется ядовитой ящерицей и имеет аминокислотную последовательность, гомологичную примерно на 50% последовательности ГПП-1, облегчает состояние гипергликемии у больных диабетом, активируя рецептор ГПП-1. Однако существуют указания, что лекарства против ожирения, содержащие ГПП-1 или эксендин-4, имеют побочные эффекты, такие как рвота и тошнота.

В связи с этим внимание привлек оксинтомодулин в качестве альтернативы ГПП-1, который может связываться как с ГПП-1, так и с глюкагоном. Оксинтомодулин представляет собой пептид, полученный из преглюкагона, предшественника глюкагона, и имеет такое же действие, как ГПП-1, а именно подавляет желание приема пищи, усиливает ощущение насыщения и способствует разложению жира, что повышает его потенциал в качестве средства против ожирения.

Однако недостаток оксинтомодулина или его производных заключается в необходимости ежедневного введения высоких доз этого вещества, что связано с коротким периодом его полувыведения in vivo

и низкой эффективностью.

Раскрытие изобретения

Техническая задача.

Авторы настоящего изобретения, стремясь улучшить эффективность лечения ожирения одновременно уменьшая дозы, разработали производное глюкагона с частичной модификацией его аминокислотной последовательности и подтвердили его эффективное действие как на рецепторы глюкагона, так и на рецепторы ГПП-1, тем самым создав настоящее изобретение.

Решение проблемы

Настоящее изобретение создано с учетом вышеуказанных проблем, возникающих в предшествующем уровне техники, и целью настоящего изобретения является создание нового пептида, который является очень эффективным при лечении ожирения.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление композиции, содержащей этот пептид, для профилактики или лечения ожирения.

Преимущества, обеспечиваемые изобретением

Новый пептид по настоящему изобретению может существенно активировать как ГПП-рецепторы, так и рецепторы глюкагона по сравнению с нативным глюкагоном и является эффективным против ожирения даже при введении в небольших количествах и, следовательно, может найти широкое применение в качестве безопасного и эффективного средства для лечения ожирения.

Наилучшие варианты осуществления изобретения

Для достижения вышеуказанных целей в одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к пептиду, содержащему аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 12, 13 или 14, где пептид активирует рецептор ГПП-1 и рецептор глюкагона.

В одном из вариантов осуществления изобретения пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В одном из вариантов осуществления изобретения пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В одном из вариантов осуществления изобретения пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В одном из вариантов осуществления изобретения пептид является эффективным против ожирения.

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислоты в положениях 12 и 16 или 16 и 20 пептида образуют кольцо.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения ожирения, содержащей указанный пептид в качестве активного агента, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтические ингредиенты, проявляющие профилактический или терапевтический эффект в отношении ожирения. В некоторых вариантах осуществления изобретения другие фармацевтические ингредиенты, проявляющие профилактический или терапевтический эффект в отношении ожирения, представляют собой агонист рецептора ГПП-1, агонист рецептора лептина, ингибитор ДПП-IV, антагонист рецептора Y5, антагонист рецептора меланин-концентрирующего гормона (MCH), агонист рецептора Y2/3, агонист рецептора MC3/4, ингибитор липазы желудка/поджелудочной железы, агонист 5HT2c, агонист 3A-рецептора, агонист рецептора амилина, антагонист грелина или антагонист рецептора грелина.

Настоящее изобретение также относится к способу профилактики или лечения ожирения, включающему введение субъекту указанного пептида или указанной фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также относится к применению указанного пептида для профилактики или лечения ожирения, а также к применению указанной фармацевтической композиции для профилактики или лечения ожирения.

Пептид по настоящему изобретению может включать пептиды, производные пептида и его пептиды-миметики, которые могут активировать как рецепторы ГПП-1, так и рецепторы глюкагона вследствие модификации части аминокислоты(аминокислот) путем замещения.

Используемый в настоящем описании термин "нативный глюкагон" относится к нативному человеческому глюкагону, имеющему аминокислотную 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).

Настоящее изобретение относится к пептидам, определенным выше в качестве производных нативного глюкагона, и определение пептидов, представленных в настоящем изобретении, предполагает, что они отличаются от нативного глюкагона только в положении(положениях) X в последовательностях, в которых имеется изменение(изменения).

В последовательности, представленной формулой 1, в соответствии с настоящим изобретением аминокислоты можно считать последовательно пронумерованными, начиная с первой аминокислоты до 29-й аминокислоты в обычном направлении от N-конца до C-конца. Соответственно описание "положения" в последовательности формулы 1 следует интерпретировать так же, как в описаниях положений нативного человеческого глюкагона и других молекул.

Используемый в настоящем описании термин "пептид" относится к соединению, представленному

двумя или более аминокислотами, связанными пептидной связью(связями). Для целей настоящего изобретения пептид может относиться к пептиду, который является эффективным против ожирения за счет активации как рецепторов ГПП-1, так и рецепторов глюкагона.

В настоящем изобретении трехбуквенные коды, обычно используемые для обозначения различных аминокислот, таких как α-аминоизомасляная кислота (Aib), Sar(N-метилглицин) и α-метил-глутаминовая кислота, используются наряду с обычными однобуквенными или трехбуквенными кодами, обозначающими встречающиеся в природе аминокислоты.

Кроме того, аминокислоты, описанные в настоящем изобретении, имеют приведенные ниже сокращенные обозначения в соответствии с номенклатурой IUPAC-IUB.

Алании (A). Аргинин (R).

Аспарагин (N). Аспарагиновая кислота (D).

Цистеин (C) Глутаминовая кислота (E)

Глютамин (Q). Глицин (G).

Гистидин (H). Изолейцин (I).

Лейцин (L). Лизин (K).

Метионин (M). Фенилаланин (F).

Пролин (P). Серин (S).

Треонин (T). Триптофан (W).

Тирозин (Y). Валин (V).

Пептид, который имеет аминокислотную последовательность, представленную формулой 1, в соответствии с настоящим изобретением может включать любой пептид, который может активировать как рецепторы глюкагона, так и рецепторы ГПП-1 и который получен путем замещения, добавления, делеции или модификации после трансляции (например, метилированием, ацилированием, убиквитинированием и с помощью внутримолекулярных ковалентных связей) в аминокислотной последовательности глюкагона, приведенной в SEQ ID NO: 1.

Для замещения или добавления аминокислот можно использовать нетипичные или не встречающиеся в природе аминокислоты дополнительно к 20 аминокислотам, встречающимся в белках человека. Коммерческие поставщики нетипичных аминокислот включают Sigma-Aldrich, ChemPep, Genzyme Pharmaceuticals и т.д. Последовательности пептидов, включающие эти нетипичные аминокислоты и аминокислоты типичных пептидов, могут быть синтезированы или приобретены у коммерческих компаний-производителей пептидов, например у компании American Peptide или Bachem (USA) или Anygen (Korea) и т.д.

Для усиления действия пептида по настоящему изобретению на рецепторы глюкагона и рецепторы ГПП-1 в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, первая аминокислота, гистидин, может быть замещена 4-имидазоацетилом путем удаления α-углерода гистидина, дезаминогистилидом путем удаления N-концевой аминогруппы, N-диметилгистидилом путем модификации N-концевой аминогруппы двумя метильными группами, β-гидроксиимидазопропионилом путем замещения N-терминальной аминогруппы гидроксильной группой, β-карбоксиимидазопропионилом путем замещения N-концевой аминогруппы карбоксильной группой или тирозином.

Кроме того, в домене, который связывается с рецептором ГПП-1, может быть произведена замена на аминокислоту, которая может усилить гидрофобную связь и ионную связь. Кроме того, часть последовательности глюкагона может быть замещена аминокислотной последовательностью ГПП-1 или аминокислотной последовательностью эксендина-4 для увеличения активности рецептора ГПП-1.

Часть последовательности глюкагона также может быть замещена последовательностью, которая может усилить α-спираль. Предпочтительно аминокислота(аминокислоты) формулы 1 в положениях 10, 14, 16, 20, 24 и 28 может быть замещена аминокислотой(аминокислотами), такими как Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO_2), Phe(4-NH_2), Phg, Pal, Nal, Ala(2-тиенил) или Ala (бензотиенил), которые, как известно, способствуют образованию α-спирали, или их производными. Вид и количество аминокислот или их производных, добавляемых с этой целью, не ограничены.

Кроме того, предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна аминокислота по меньшей мере в одной аминокислотной паре в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 и 24 и 28 аминокислотной последовательности формулы 1 могла быть замещена глутаминовой кислотой или лизином, образуя в результате пару глутаминовая кислота-лизин, которая может образовывать кольцо, при этом количество вводимых таким образом колец также не ограничено.

В иллюстративном варианте осуществления аминокислотная последовательность глюкагона может быть замещена последовательностью, способной связываться с рецепторами ГПП-1, таким образом, чтобы пептид мог быть эффективным как в отношении рецепторов ГПП-1, так и в отношении рецепторов глюкагона.

Предпочтительно пептид по настоящему изобретению может быть пептидом аминокислотной последовательности формулы 1, в которой

X1 представляет собой гистидин;

X2 представляет собой α-метил-глутаминовую кислоту;
X15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
X16 представляет собой серин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;
X17 представляет собой аргинин, лизин, глутаминовую кислоту или цистеин;
X18 представляет собой цистеин, валин или аргинин;
X19 представляет собой аланин или валин;
X20 представляет собой глутамин, лизин или гистидин;
X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или лейцин;
X23 представляет собой изолейцин или валин;
X24 представляет собой аргинин, глутаминовую кислоту или глутамин;
X27 представляет собой валин, лизин или метионин;
X28 представляет собой глутамин, лизин или аспарагин; и
X29 представляет собой лизин, глицин или треонин;
при условии, что аминокислотная последовательность, идентичная SEQ ID NO: 1, исключена.

Более предпочтительно пептид по настоящему изобретению может представлять собой пептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2-14.

Пептид по настоящему изобретению может быть получен стандартным синтетическим способом, с помощью системы экспрессии рекомбинантных генов или любым способом, известным в данной области. Соответственно аналог глюкагона в соответствии с настоящим изобретением может быть синтезирован множеством способов, включая следующие:

(a) поэтапный синтез пептида методом твердофазного или жидкофазного синтеза или путем сборки фрагментов, выделения конечного пептида с последующей очисткой;

(b) экспрессию конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид в клетке-хозяине, и выделение продукта экспрессии из культуры клеток-хозяев;

(c) осуществление экспрессии конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, в пробирке, не содержащей клетки, и извлечение продукта экспрессии; или

способ получения фрагментов пептида случайной комбинацией (a), (b) и (c), связывания фрагментов, тем самым восстанавливая соответствующий пептид.

Авторы настоящего изобретения подтвердили в экспериментах in vitro, что пептид по настоящему изобретению оказывает превосходное действие на рецепторы ГПП-1 и рецепторы глюкагона по сравнению с нативным глюкагоном (см. табл. 2). Кроме того, в экспериментах in vitro было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению является очень эффективным в отношении подавления желания приема пищи на животной модели ожирения, тем самым демонстрируя, что пептид по настоящему изобретению может быть эффективным для лечения ожирения даже при введении в небольших количествах.

Соответственно пептид по настоящему изобретению является двойным агонистом, способным стимулировать образование цАМФ как в рецепторах ГПП-1, так и в рецепторах глюкагона и, предполагается, что он будет очень эффективным для лечения ожирения по сравнению с существующим глюкагоном. В этом отношении пептид по настоящему изобретению может быть более привлекательным при выборе средства для лечения ожирения и связанных с ожирением заболеваний.

Пептид по настоящему изобретению, являющийся двойным агонистом, может сочетать эффект ГПП-1 при приеме пищи и эффект глюкагона в метаболизме липидов и, таким образом, действовать синергически, ускоряя удаление скоплений липидов и приводя к непрерывному снижению массы тела. Синергический эффект двойного агониста может позволить снизить факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как высокий уровень холестерина и ЛПНП, которые могут не оказывать никакого эффекта на массу тела.

Соответственно пептид по настоящему изобретению может быть использован в качестве фармацевтического лекарственного средства для профилактики увеличения веса, для снижения веса, снижения избыточного веса и для лечения не только ожирения, включая болезненное ожирение (например, путем регулирования аппетита, процесса еды, приема пищи, потребления калорий и/или потребления энергии), но также и связанных с ожирением заболеваний, включая, без ограничения, воспаление, связанное с ожирением, заболевание желчного пузыря, связанное с ожирением, вызванное ожирением апноэ во сне и состояние здоровья. Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть использован для лечения заболеваний, которые могут быть ассоциированы с ожирением, таких как метаболический синдром, гипертония, индуцирующая артериосклероз дислипидемия, атеросклероз, артериосклероз, ишемическая болезнь сердца, инсульт и т.д. Однако в отношении этих симптомов пептид по настоящему изобретению может действовать полностью или частично опосредовано через эффекты, связанные с весом тела, или может действовать независимо от них.

Для улучшения терапевтического эффекта производного глюкагона по настоящему изобретению его можно модифицировать с помощью традиционных способов в данной области техники, таких как модификация полимеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гликаны и т.д., или слияние с альбумином, перенос, использование жирных кислот, иммуноглобулина и т.д. Например, по меньшей мере одна

боковая цепь аминокислоты в соединении по настоящему изобретению может быть конъюгирована с полимером in vivo с тем, чтобы увеличить растворимость и/или период полувыведения и/или биодоступность. Известно, что эти модификации уменьшают клиренс терапевтических белков и пептидов.

Предпочтительно полимер может быть водорастворимым (амфипатическим или гидрофильным), нетоксичным и фармацевтически неактивным и более предпочтительно может включать ПЭГ, гомополимер или сополимер ПЭГ, монометилзамещенный полимер ПЭГ (мПЭГ) или полиаминокислоту, такую как полилизин, полиаспарагиновую кислоту и полиглутаминовую кислоту.

Специалистам в данной области очевидно, что модифицированные таким образом производные глюкагона обладают лучшим терапевтическим эффектом, чем нативный глюкагон. Соответственно варианты производных глюкагона также включены в объем настоящего изобретения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему указанный пептид.

Используемый в настоящем описании термин "гомология" в отношении полинуклеотидов, относится к сходству с аминокислотной последовательностью дикого типа и нуклеотидной последовательностью дикого типа и включает последовательности генов по меньшей мере с 75% гомологией полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95%. Эти оценки гомологичности можно выполнять невооруженным глазом или с помощью коммерчески доступной программы сравнения. Компьютерные программы, доступные на рынке, могут рассчитать процентную гомологию между двумя или более последовательностями. Гомологию (%) можно рассчитать по соседним последовательностям.

Пептид можно получить в большом количестве путем введения полинуклеотида, кодирующего пептид, в вектор с последующей его экспрессией.

Для экспрессии рекомбинантного вектора такого типа полинуклеотид по настоящему изобретению обычно вводят в соответствующий вектор с образованием клонирующего или рекомбинантного вектора, содержащего полинуклеотид, причем этот вектор также включен в объем настоящего изобретения.

Используемый в настоящем описании термин "рекомбинантный вектор" относится к ДНК-конструкции, которая включает нуклеотидную последовательность полинуклеотида, кодирующего целевой пептид, которая функционально связана с соответствующей регуляторной последовательностью, способной экспрессировать целевой пептид в подходящей клетке-хозяине. Регуляторная последовательность может включать промотор, способный инициировать транскрипцию, операторную последовательность для регулирования транскрипции, последовательность, кодирующую соответствующий мРНК домен, связывающий рибосому, и последовательность регуляции терминации транскрипции и трансляции. Рекомбинантный вектор после введения в подходящую клетку-хозяина может реплицироваться или функционировать независимо от генома хозяина и может быть интегрирован непосредственно в геном.

Рекомбинантный вектор, используемый в настоящем изобретении, не ограничен особыми условиями, если он реплицируется в клетке-хозяине, и может быть сконструирован с помощью любого вектора, известного в данной области. Примерами обычных векторов, которые могут быть использованы, включают дикого типа или рекомбинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Например, в качестве вектора на основе фага или космиды могут быть использованы pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, Charon21A и т.д. В качестве плазмидного вектора можно использовать плазмиды на основе pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL и плазмиду на основе pET. Векторы, используемые в настоящем изобретении, не ограничены конкретными векторами, может использоваться любой вектор, известный в данной области.

Рекомбинантный вектор может быть использован для трансформации клетки-хозяина для получения пептида по настоящему изобретению. Помимо этого, в качестве части настоящего изобретения трансформированную клетку можно использовать для амплификации фрагментов нуклеиновых кислот или репликации векторов по настоящему изобретению или можно использовать культивируемую клеточную линию или клеточную линию, используемую для продуцирования рекомбинантного пептида по настоящему изобретению.

Используемый в настоящем описании термин "трансформация" относится к введению рекомбинантного вектора, включающего полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку-хозяина таким образом, что целевой белок, кодируемый полинуклеотидом, может быть экспрессирован в клетке-хозяине. Не имеет значения, вставлен ли полинуклеотид в хромосому или находится вне хромосомы, если трансформированный полинуклеотид может быть экспрессирован в клетке-хозяине.

Кроме того, полинуклеотид включает ДНК и РНК, которые кодируют целевой белок. Полинуклеотид можно вводить в любом виде, если полинуклеотид может быть экспрессирован после введения в клетку-хозяина. Например, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина в виде кассеты экспрессии, которая представляет собой геномную структуру, включающую все существенные функции, необходимые для самоэкспрессии. Кассета экспрессии, как правило, включает промотор, который функционально связан с полинуклеотидом, сигнал терминации транскрипции, домен, связывающий рибосому, и сигнал терминации трансляции. Кассета экспрессии может представлять собой самореплицирующийся

вектор экспрессии. Кроме того, сам полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина и функционально связан с последовательностью, необходимой для его экспрессии в клетке-хозяине, без ограничений.

Кроме того, используемый в настоящем описании термин "функционально связанный" относится к состоянию, в котором промоторная последовательность, инициирующая и опосредующая транскрипцию целевого белка, кодирующего полинуклеотид, функционально связана с последовательностью гена.

Клетка-хозяин, подходящая для настоящего изобретения, не ограничена конкретными клетками, при условии, что клетка-хозяин может экспрессировать полинуклеотид по настоящему изобретению. Примеры клеток-хозяев, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают Escherichia sp., такие как E. coli; Bacillus sp., такие как Bacillus subtilis; Pseudomonas sp., такие как Pseudomonas putida; дрожжи, такие как Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae и Schizosaccharomyces pombe; клетки насекомых, таких как Spodoptera frugiperda (SF9); и клетки животных, такие как CHO, COS, BSC и т.д.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения ожирения, содержащей указанный пептид в качестве активного ингредиента.

Используемый в настоящем описании термин "профилактика" относится к любому действию, приводящему к подавлению или задержке начала развития ожирения путем введения пептида или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, а термин "лечение" относится к любому действию, приводящему к улучшению симптоматики ожирения или благоприятному изменению путем введения пептида или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Используемый здесь термин "введение" означает введение конкретного вещества пациенту соответствующим образом. Путь введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, хотя и не имеет особых ограничений, может быть любым традиционным путем введения, если фармацевтическая композиция может достигать целевой ткани в организме, например внутрибрюшинным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, внутрикожным, пероральным, местным, интраназальным, внутримышечным, интраректальным введением и т.д.

Используемый здесь термин "ожирение" относится к состоянию здоровья, при котором в организме накапливается избыточный жир, при этом человек считается тучным, когда индекс массы тела (ИМТ, значение, полученное путем деления веса человека в килограммах, на квадрат роста, измеренный в метрах) равен 25 или выше. Ожирение обычно вызвано дисбалансом энергии вследствие превышения потребления калорий над расходом энергии. Ожирение является метаболическим заболеванием, которое может вызывать развитие диабета и гиперлипидемии, повысить риск возникновения сексуальной дисфункции, артрита и сердечно-сосудистых заболеваний, а в некоторых случаях также связано с возникновением рака.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый" относится к достаточному количеству, которое может демонстрировать терапевтический эффект, при этом не вызывая появления каких-либо неблагоприятных реакций, и может быть легко определено специалистами в данной области по показателям, известным в области медицины, таким как тип заболеваний, подлежащих лечению, возраст пациента, вес, пол, чувствительность к лекарствам, путь введения, количество введений, лекарственное средство(средства), которое следует комбинировать или принимать одновременно с другими и т.д.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать фармацевтически приемлемый носитель. Для перорального введения фармацевтически приемлемый носитель может включать, без ограничения, связующее, лубрикант, дезинтегратор, наполнитель, солюбилизатор, диспергирующий агент, стабилизатор, суспендирующий агент, краситель и отдушки. Для введения в виде инъекций смесь также может содержать буферный агент, консервант, анальгетик, солюбилизатор, изотонический агент и стабилизатор. Для местного введения фармацевтически приемлемый носитель может включать основание, наполнитель, лубрикант, консервант и т.д.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть составлена в виде различных лекарственных форм в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Например, для перорального введения фармацевтическая композиция может быть составлена в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.д. Для введения с помощью инъекций фармацевтическая композиция может быть приготовлена в ампулах в виде стандартной лекарственной формы или в виде мультидозовой препаративной формы. Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул и препаратов длительного действия.

С другой стороны, примеры носителей, наполнителей и разбавителей, подходящих для фармацевтической композиции по настоящему изобретению, могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксибензоат, пропилгидроксибензоат, тальк, стеарат магния, минеральные масла и т.д. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать наполнители, антикоагулянты, лубриканты, увлажнители, отдушки, антисептики и т.д.

Помимо этого, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде лекарственной

формы, выбранной из группы, состоящей из таблеток, пилюль, порошков, гранул, капсул, суспензий, жидкого лекарственного средства для внутреннего применения, эмульсий, сиропов, стерильных водных растворов и на основе неводных растворителей, лиофилизированных составов и суппозиториев.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде лекарственной формы, подходящей для однократного введения в тело пациента традиционным способом, предпочтительно в виде препарата, пригодного для введения пептидного лекарственного средства, и может быть введена перорально или парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, внутрилегочно, внутрикожно, подкожно, внутрибрюшинно, интраназально, внутрижелудочно, локально, сублингвально, внутривагинально или интраректально согласно традиционному методу введения, без ограничения.

Пептид также можно использовать в смеси с различными носителями, такими как солевой раствор или органический растворитель, разрешенными для применения в фармацевтических препаратах. Для повышения стабильности или абсорбции пептид можно использовать вместе с углеводами, такими как глюкоза, сахароза или декстран, или антиоксидантами, такими как глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы и т.д.

Объем введений и количество введений фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть определены в соответствии с типом лекарственного средства, используемого в качестве активного ингредиента, наряду с другими факторами, такими как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст пациента, пол, вес, тяжесть заболевания и т.д.

Общая эффективная доза композиции по настоящему изобретению может вводиться пациенту в виде разовой дозы или в виде многократной дозы в течение длительного периода времени в соответствии с используемым протоколом лечения. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может иметь различное содержание активного ингредиента в зависимости от тяжести заболевания. Предпочтительно общая доза пептида по настоящему изобретению может составлять от 0,0001 мкг до 500 мг на 1 кг веса тела пациента. Однако, что касается дозы пептида, то эффективная доза определяется с учетом различных факторов, таких как возраст пациента, вес, состояние здоровья, пол, тяжесть заболевания, диета и скорость экскреции и т.д. Специалисты в данной области могут определить соответствующую эффективную дозу, исходя из конкретного применения композиции по настоящему изобретению.

Лекарственные формы, пути введения и способы введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению не имеют конкретных ограничений при условии, что фармацевтическая композиция проявляет эффект согласно настоящему изобретению.

Так как для фармацевтической композиции по настоящему изобретению характерны длительное действие и хороший титр in vivo, то количество и частота введений фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть значительно уменьшены.

Фармацевтическая композиция может вводиться отдельно или в комбинации с другими фармацевтическими препаратами, проявляющими профилактический или терапевтический эффект в отношении ожирения. Фармацевтическая композиция, проявляющая профилактический или терапевтический эффект в отношении ожирения, может включать, без ограничения, агонист рецептора ГПП-1, агонист рецептора лептина, ингибитор ДПП-IV, антагонист рецептора Y5, антагонист рецептора меланин-концентрирующего гормона (MCH), агонист рецептора Y2/3, агонист рецептора MC3/4, ингибитор липазы желудка/поджелудочной железы, агонист 5HT2c, агонист 3A-рецептора, агонист рецептора амилина, антагонист грелина и/или антагонист рецептора грелина и т.д.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения ожирения, включающему введение субъекту пептида или фармацевтической композиции, содержащей пептид.

Используемый здесь термин "субъект" относится к субъекту с подозрением на ожирение или находящемуся под угрозой развития ожирения и, в частности, к млекопитающим, включая людей, крыс и крупный рогатый скот, при этом субъектом может быть, без ограничений, любой субъект, которого можно лечить пептидом по настоящему изобретению. Введение фармацевтической композиции, содержащей пептид по настоящему изобретению, может приводить к эффективному лечению субъекта с подозрением на ожирение, причем ожирение является таким, как описано выше.

Терапевтический способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид. Общая суточная доза композиции может быть определена врачом в результате соответствующего медицинского осмотра, и композицию можно вводить один раз или в виде нескольких дробных доз. Однако с учетом цели настоящего изобретения конкретная терапевтически эффективная доза композиции для любого конкретного пациента может варьировать в зависимости от различных факторов, хорошо известных в области медицины, включая тип и степень ответа, которые должны быть получены, конкретные композиции в зависимости от того, используются ли с ними другие агенты, возраст пациента, массу тела, состояние здоровья, пол и диету, время и путь введения, скорость выведения композиции, продолжительность лечения, другие препараты, используемые в комбинации или одновременно с композицией по настоящему изобретению, и другие факторы, известные в области медицины.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению пептида для получения фарма-

цевтического лекарственного средства для профилактики или лечения ожирения.

Режимы выполнения изобретения

Далее настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на приведенные ниже примеры. Однако эти примеры даны только в качестве иллюстрации, и изобретение не ограничивается этими примерами.

Пример 1. Получение клеточных линий для активации in vivo.

Получение клеточных линий, демонстрирующих ответ цАМФ на ГПП-1.

Реакцию ПЦР проводили с использованием открытой рамки считывания (ОРС) кДНК (OriGene Technologies, Inc., USA) гена рецептора человека ГПП-1, используемой в качестве матрицы, вместе с прямым и обратным праймерами, представленными в SEQ ID NO: 15 и 16, которые включают сайты рестрикции для HindIII и EcoRI соответственно.

В частности, проводили реакцию ПЦР (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), включающую 30 циклов. Продукт ПЦР подвергали электрофорезу в 1,0%-ном агарозном геле и из него элюировали фрагмент размером 405 п.о.

Прямой праймер 5'-CCCGGCCCCCGCGGCCGCTATTCGAAATAC-3'.

Обратный праймер 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3'.

Продукт ПЦР клонировали в известный вектор для экспрессии генов в клетках животных, x0GC/dhfr (патент Кореи № 10-0880509, также упоминаемый далее), для конструирования рекомбинантного вектора x0GC/GLP1R.

Полученный таким образом рекомбинантный вектор x0GC/GLP1R трансформировали в клетки клеточной линии яичников китайского хомячка CHO DG44, которые культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, с использованием липофектамина (Invitrogene, USA), после чего проводили отбор и культивирование в селективной среде, содержащей G418 (1 мг/мл) и метотрексат (10 нМ). Из них отбирали линии моноклональных клеток, из которых окончательно отбирали линии клеток, демонстрирующие хороший ответ цАМФ на ГПП-1 в дозозависимом режиме.

Получение клеточных линий, демонстрирующих ответ цАМФ на глюкагон.

Реакцию ПЦР проводили с использованием открытой рамки считывания (ОРС) кДНК (OriGene Technologies, Inc., USA) гена рецептора глюкагона человека, используемой в качестве матрицы, вместе с прямым и обратным праймерами, представленными в SEQ ID NO: 17 и 18, которые включают сайты рестрикции для EcoRI и XhoI соответственно.

В частности, проводили реакцию ПЦР (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), включающую 30 циклов. Продукт ПЦР подвергали электрофорезу в 1,0%-ном агарозном геле и из него элюировали фрагмент размером 435 п.о.

Прямой праймер 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCCGTACTTAAGGCC-3'.

Обратный праймер 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'.

Продукт ПЦР клонировали в известный вектор для экспрессии генов в клетках животных x0GC/dhfr для конструирования рекомбинантного вектора x0GC/GCCR.

Полученный таким образом рекомбинантный вектор x0GC/GCCR трансформировали в клетки клеточной линии яичников китайского хомячка CHO DG44, которые культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% FBS, с использованием липофектамина (Invitrogene, USA), после чего проводили отбор и культивирование в селективной среде, содержащей G418 (1 мг/мл) и метотрексат (10 нМ). Из них отбирали линии моноклональных клеток, из которых окончательно отбирали линии клеток, демонстрирующие хороший ответ цАМФ на глюкагон в дозозависимом режиме.

Пример 2. Синтез производных глюкагона.

Для разработки производного глюкагона с хорошим действием как на рецепторы GLP-1, так и на рецепторы глюкагона в аминокислотной последовательности нативного глюкагона, представленной в SEQ ID NO: 1, выполняли замещения для получения аминокислотной последовательности, которая имеет способность связываться с ГПП-1, и синтезировали производные глюкагона, представленные в приведенной ниже табл. 1.

Таблица 1

SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT
SEQ ID NO: 2	HXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFIQWLVNT
SEQ ID NO: 3	HXQGTFTSDYSKYLDEKCVKLFIQWLVNT
SEQ ID NO: 4	HXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVEWLVNT
SEQ ID NO: 5	HXQGTFTSDYSKYLDEKCAHEFVEWLVNT
SEQ ID NO: 6	HXQGTFTSDYSKYLDSKCAHEFVEWLVNT
SEQ ID NO: 7	HXQGTFTSDYSKYLDSKCVHEFIEWLKNT
SEQ ID NO: 8	HXQGTFTSDYSKYLDSKCAHEFIEWLKNK
SEQ ID NO: 9	HXQGTFTSDYSKYLDSECAHEFIEWLKQG
SEQ ID NO: 10	HXQGTFTSDYSKYLDDKCAHEFVEWLVNT
SEQ ID NO: 11	HXQGTFTSDYSKYLDEECAKEFIRWLKKG
SEQ ID NO: 12	HXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID NO: 13	HXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLMNT
SEQ ID NO: 14	HXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT

В приведенной выше табл. 1 аминокислота, обозначенная как "X" в последовательностях SEQ ID NO: 2-14, представляет собой α-метилглутаминовую кислоту, которая является не встречающейся в природе аминокислотой, а остаток лизина в этих последовательностях может образовывать кольцо с остатком глутаминовой кислоты.

Пример 3. Измерение in vitro активности производных глюкагона.

Для измерения активности против ожирения производных глюкагона, синтезированных в примере 2, измеряли in vitro клеточную активность производных глюкагона с использованием трансформированных клеточных линий, полученных в примерах 1-1 и 1-2.

Трансформированные клеточные линии получали таким образом, чтобы ген рецептора ГПП-1 человека и ген рецептора глюкагона человека могли экспрессироваться в CHO соответственно с подходящей для измерения активностью ГПП-1 и глюкагона. Соответственно активность производных глюкагона, синтезированных в соответствии с настоящим изобретением, измеряли, используя трансформированные клеточные линии соответственно.

В частности, трансформированные клеточные линии субкультивировали два или три раза в неделю путем добавления в 96-луночный планшет аликвот в количестве 1×10^5 клеток/лунка и культивировали в течение 24 ч соответственно.

Клетки культуры промывали буферным раствором Кребса-Рингера, содержащим бикарбонат (КРБ), суспендировали в 40 мл буферного раствора KRB, содержащего 1 мМ 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), и оставляли при комнатной температуре на 5 мин.

Нативный глюкагон (SEQ ID NO: 1) или производные глюкагона (представленные пептидами с SEQ ID NO: 12-14) в соответствии с настоящим изобретением подвергали серийному 5-кратному разведению в диапазоне от 1000 до 0,02 нМ, добавляли туда 40 Мл вышеуказанных клеток и культивировали в CO_2 инкубаторе при 37°C в течение 1 ч.

Затем к соответствующим полученным растворам добавляли 20 мл буфера для лизиса клеток, и клеточные лизаты наносили на набор для анализа цАМФ (Molecular Device, USA) для измерения концентрации цАМФ, вычисляли значения EC_{50} и сравнивали между собой. Результаты показаны в приведенной ниже табл. 2.

Таблица 2

Тестовый материал	EC_{50} (нМ)	
	Рецепторы ГПП-1 человека	Рецепторы ГПП человека
ГПП-1	0,36	>1000
Глюкагон	>1000	1,48
SEQ ID NO:12	0,96	1,38
SEQ ID NO:13	0,27	0,23
SEQ ID NO:14	0,17	0,38

Как показано в приведенной выше табл. 2, производные глюкагона в соответствии с настоящим изобретением показали превосходные эффекты как в отношении рецепторов ГПП-1, так и в отношении рецепторов глюкагона по сравнению с нативным глюкагоном, представленным в SEQ ID NO: 1.

Известно, что глюкагон является эффективным в лечении ожирения благодаря активации рецепторов ГПП-1 и рецепторов глюкагона, тем самым подавляя аппетит, улучшая ощущение сытости и способствуя лизису жировых клеток. Поскольку как показано в настоящем описании, производные глюкагона согласно настоящему изобретению обладают превосходными эффектами in vitro как в отношении рецеп-

торов ГПП-1, так и в отношении рецепторов глюкагона по сравнению с нативным глюкагоном, эти производные глюкагона могут быть использованы в качестве более эффективного агента для лечения ожирения по сравнению с существующим глюкагоном.

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были раскрыты с целью иллюстрации, специалисты в данной области поймут, что возможны различные модификации, добавления и замены, не выходящие за рамки и сущность изобретения, раскрытую в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 12, 13 или 14, где пептид активирует рецептор ГПП-1 и рецептор глюкагона.

2. Пептид по п.1, в котором пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

3. Пептид по п.1, в котором пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

4. Пептид по п.1, в котором пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

5. Пептид по любому из предыдущих пунктов, где пептид является эффективным против ожирения.

6. Пептид по п.1, в котором аминокислоты в положениях 12 и 16 или 16 и 20 пептида образуют кольцо.

7. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения ожирения, содержащая пептид по любому из пп.1-6 в качестве активного агента и дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, дополнительно содержащая другие фармацевтические ингредиенты, проявляющие профилактический или терапевтический эффект в отношении ожирения.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где другие фармацевтические ингредиенты, проявляющие профилактический или терапевтический эффект в отношении ожирения, представляют собой агонист рецептора ГПП-1, агонист рецептора лептина, ингибитор ДПП-IV, антагонист рецептора Y5, антагонист рецептора меланин-концентрирующего гормона (MCH), агонист рецептора Y2/3, агонист рецептора MC3/4, ингибитор липазы желудка/поджелудочной железы, агонист 5HT2c, агонист 3A-рецептора, агонист рецептора амилина, антагонист грелина или антагонист рецептора грелина.

10. Способ профилактики или лечения ожирения, включающий введение субъекту пептида по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по любому из пп.7-9.

11. Применение пептида по любому из пп.1-6 для профилактики или лечения ожирения.

12. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.7-9 для профилактики или лечения ожирения.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2