

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037956**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.15

(21) Номер заявки
201892383

(22) Дата подачи заявки
2013.11.06

(51) Int. Cl. *A61K 38/26* (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТА ИЛИ ДИАЖИРЕНИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ
КОНЬЮГАТ АНАЛОГА ОКСИНТОМОДУЛИНА**

(31) 10-2012-0124724

(32) 2012.11.06

(33) KR

(43) 2019.03.29

(62) 201590759; 2013.11.06

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

(72) Изобретатель:
**Ким Чин Сун, Ким Дэ Джин, Ли Сан
Хюн, Чун Сун Юб, Квон Се Чан (KR)**

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

(56) US-A1-20120003712

SANTOPRETE et al.: "DPP-IVD resistant,
long-acting oxyntomodulin derivat ives", Journal of
Peptide Science, Vol. 17, No. 4, pp. 270-280 (2011),
See the whole document, especially Figure 1 and Table
2.

WO-A1-2010096052

VOROBIEV et al.: "Chemical polysialylation:
design of conjugated human oxyntomodulin with a
prolonged anorexic effect in vivo", Biochimie, Vol.9 5,
pp. 264-270 (Epub 27 September 2012), See the whole
document.

US-A1-20100330108

(57) Изобретение относится к композиции для предупреждения или лечения диабета, диажирения или осложнений диабета, содержащей конъюгат аналога оксинтомодулина в качестве активного ингредиента, а также к способу лечения диабета, диажирения или осложнений диабета, включающему введение субъекту фармацевтически эффективного количества конъюгата аналога оксинтомодулина. Аналог оксинтомодулина обладает высокой способностью к активации рецептора GLP-1 (глюкагоноподобного пептида-1) и рецептора глюкагона по сравнению с нативным оксинтомодулином, индуцирует развитие бета-клеток и повышает секрецию инсулина, снижая в результате этого уровни глюкозы в крови, которые были повышены вследствие высококалорийного рациона с высоким содержанием жира. Аналог оксинтомодулина индуцирует снижение массы тела и уменьшение приема пищи с повышением чувствительности к инсулину и дает возможность поддержания уровней глюкозы в крови, которые не контролируются вследствие инсулинорезистентности, на нормальных уровнях. Следовательно, конъюгат аналога оксинтомодулина можно эффективно применять для предупреждения или лечения диабета и родственных заболеваний.

037956 B1

037956 B1

Настоящее изобретение относится к композиции для предупреждения или лечения диабета, диажирения или осложнений диабета, содержащей конъюгат аналога оксинтомодулина в качестве активного ингредиента. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения диабета, диажирения или осложнений диабета, включающему введение субъекту фармацевтически эффективного количества конъюгата аналога оксинтомодулина.

Предшествующий уровень техники

В последние годы в Корею поступление жиров из пищевых продуктов возросло вследствие экономического роста и вестернизации привычек питания, и возросло количество метаболических заболеваний, вызванных недостатком физической активности, таких как гиперлипидемия, ожирение, диабет, гипертензия, атеросклероз и жировая болезнь печени.

Диабет представляет собой вид метаболического заболевания, при котором секреция инсулина недостаточна или нормальные функции не выполняются (DeFronzo, 1988). Диабет характеризуется повышенными уровнями глюкозы в крови, вызывающими различные состояния и синдромы. В случае диабета глюкоза выводится с мочой. В последние годы вследствие возрастания ожирения, в частности абдоминального ожирения, заболеваемость диабетом резко возросла.

По оценкам число пациентов с диабетом во всем мире в 2000 г. составляло 170 млн, и ожидают, что к 2030 г. оно достигнет 370 млн. Тем не менее, недавний отчет показал, что число заболеваний диабетом во всем мире к 2008 г. уже достигло приблизительно 350 млн. (Danaei et al., 2011), и, следовательно, это число значительно больше, чем ожидалось. Сообщали, что приблизительно 80% или более пациентов с диабетом типа 2 страдали ожирением, тогда как лишь менее 10% пациентов с ожирением страдали диабетом (Harris et al., 1987). Данное соотношение между диабетом и ожирением связано с тем, что жирные кислоты накапливаются в бета-клетках или в чувствительных к инсулину тканях, таких как почки, печень или сердце, за счет нерегулярной секреции адипокинов и свободных жирных кислот, что приводит к липотоксичности.

Если хроническое гипергликемическое состояние не лечить надлежащим образом, оно приводит к различным патологическим состояниям в организме. В характерном случае оно повышает риск ретинопатии, дисфункции почек, нейропатии, удара, вызванного сосудистым расстройством, заболеваний почек или сердца, язвы, связанной с синдромом диабетической стопы, и сердечнососудистого заболевания. Такие осложнения снижают качество жизни и, в конечном счете, сокращают среднюю продолжительность жизни пациентов с диабетом. Следовательно, для предупреждения осложнений диабета необходим эффективный контроль уровней глюкозы в крови.

Современные способы, применяемые для контроля уровней глюкозы в крови, включают модификацию образа жизни (диетотерапию или лечебную физкультуру) и фармакотерапию. Тем не менее, диетотерапию или лечебную физкультуру трудно контролировать и строго выполнять, и их терапевтический эффект также недостаточен. Следовательно, большинство пациентов с диабетом полагаются на модификацию образа жизни вместе с контролем уровней глюкозы в крови за счет лекарственных средств, таких как инсулин, стимуляторы секреции инсулина, усилители чувствительности к инсулину и агенты, снижающие уровень глюкозы в крови.

Инсулин, который получают рекомбинантными методами, является необходимым лекарственным средством для пациентов с диабетом типа 1 и пациентов с диабетом типа 2, у которых уровни глюкозы в крови не контролируются, и обладает преимуществом для контроля уровня глюкозы в крови. Тем не менее, он имеет недостатки, включающие чувство страха перед подкожными иглами, трудности при введении, риск гипогликемии и увеличение массы тела.

Меглитиниды, являющиеся стимуляторами секреции инсулина, представляют собой лекарственные средства, обладающие очень быстрым действием, их принимают перед едой, и они включают НовоНорм (репаглинид), Fastic (натеглинид), Glufast (митиглинид) и т.д. Усилители чувствительности к инсулину характеризуются тем, что они не вызывают гипогликемии или вызывают лишь небольшую гипогликемию, когда их принимают отдельно, и их примеры включают метформин, представляющий собой бигуанидное лекарственное средство, тиазолидиндионовые лекарственные средства, такие как Авандия (розиглитазон), Актос (пиоглитазон) и т.д.

Лекарственные средства, которые были разработаны недавно, включают агонисты GLP-1, разработанные на основе действия глюкагоноподобного пептида-1, представляющего собой гормон, который стимулирует секрецию инсулина, и примеры агонистов GLP-1 включают эксенатид и лираглутид. Кроме того, ингибиторы DPP-4 (дипептидилпептидаза-4) также представляют собой недавно разработанные новые лекарственные средства, которые ингибируют активность DPP-4, представляющей собой фермент, быстро инактивирующий GLP-1, и их характерные примеры включают Янувию (ситаглиптин).

Тем не менее, сообщают, что указанные лекарственные средства обладают побочными эффектами, включающими гепатотоксичность, желудочно-кишечное расстройство, сердечнососудистое заболевание и канцерогенез, и стоимость лечения диабета в год также высока, и, следовательно, существует препятствие при лечении диабета. Действительно, затраты, связанные с преддиабетом и диабетом, достигли около 200 триллионов вон в США в 2007 г. (Dall et al., 2010), и затраты, связанные с ожирением, также достигли 150 триллионов вон в США в 2008 г. (Finkelstein et al., 2009).

Таким образом, существует неотложная необходимость в разработке лекарственных средств, которые можно применять для лечения как диабета, так и диатирения, посредством снижения массы тела и эффективного снижения уровней глюкозы в крови, и которые, в то же время, имеют меньшие побочные эффекты.

В качестве кандидата на такие лекарственные средства недавно привлек внимание оксинтомодулин. Оксинтомодулин продуцируется из предшественника пре-глюкагона, и представляет собой пептид, который может связываться как с глюкагоноподобным пептидом-1 (GLP-1), так и с рецептором глюкагона, выполняя двойную функцию. В связи с такими характеристиками оксинтомодулин был исследован с различными целями, включающими лечение ожирения, диабета, гиперлипидемии и жировой болезни печени.

Тем не менее, оксинтомодулин имеет проблему, состоящую в том, что его следует вводить в высокой дозе, поскольку он обладает коротким периодом полувыведения *in vivo*, и его активность недостаточна для применения при лечении ожирения, диабета, гиперлипидемии и жировой болезни печени.

Описание изобретения

Техническая задача

Авторы настоящего изобретения разработали конъюгат аналога оксинтомодулина, обладающий повышенной активностью по сравнению с нативным оксинтомодулином, и обнаружили, что указанный конъюгат аналога оксинтомодулина снижает уровни глюкозы в крови, повышает толерантность к глюкозе и повышает долю гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в модели мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира (HF DIO) и в модели мышей с диабетом (db/db), вызванным мутацией в рецепторе лептина, что указывает на то, что конъюгат аналога оксинтомодулина можно эффективно применять для лечения диабета, диатирения и осложнений диабета, и, таким образом, было выполнено настоящее изобретение.

Техническое решение

Согласно настоящему изобретению предложена композиция для предупреждения или лечения диабета, диатирения или осложнений диабета, содержащая конъюгат аналога оксинтомодулина в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый носитель, где конъюгат аналога оксинтомодулина содержит

аналог оксинтомодулина, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4-5, 23, 27-28, 32-34;

участок Fc иммуноглобулина и

непептидный полимер,

где непептидный полимер ковалентно связывает аналог оксинтомодулина и участок Fc иммуноглобулина и где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля или поливиниловый спирт, предпочтительно полиэтиленгликоль.

Один аспект изобретения составляет композиция по изобретению, где аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 или 24 и 28 аналога оксинтомодулина образуют кольцо.

Предпочтительно в композиции по изобретению, как она определена выше, один конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой участка Fc иммуноглобулина, а другой конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой аналога оксинтомодулина.

В еще одном аспекте композиция по изобретению, как она определена выше, дополнительно содержит фармацевтический агент, проявляющий превентивные или терапевтические эффекты против диабета, диатирения или осложнений диабета.

Предпочтительно диабет представляет собой инсулинозависимый диабет типа 1 или инсулиннезависимый диабет типа 2.

Также согласно изобретению предложен способ лечения диабета, диатирения или осложнений диабета, включающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества конъюгата аналога оксинтомодулина, где конъюгат аналога оксинтомодулина содержит

аналог оксинтомодулина, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4-5, 23, 27-28, 32-34;

участок Fc иммуноглобулина и

непептидный полимер,

где непептидный полимер ковалентно связывает аналог оксинтомодулина и участок Fc иммуноглобулина и где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля или поливиниловый спирт, предпочтительно полиэтиленгликоль.

В одном аспекте изобретения аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 или 24 и 28 аналога оксинтомодулина образуют кольцо.

В еще одном предпочтительном аспекте один конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой участка Fc иммуноглобулина, а другой конец непептидного полимера

связан с аминной группой или тиольной группой аналога оксинтомодулина.

В еще одном аспекте способ по изобретению, как он определен выше, дополнительно включает введение фармацевтического агента, проявляющего превентивные или терапевтические эффекты против диабета, диажирения или осложнений диабета.

В предпочтительном воплощении диабет представляет собой инсулинозависимый диабет типа 1 или инсулиннезависимый диабет типа 2.

Полезные эффекты изобретения

Конъюгат аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению обладает более высокой активностью активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона по сравнению с нативным оксинтомодулином. Кроме того, конъюгат аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению индуцирует развитие бета-клеток и повышает секрецию инсулина, снижая в результате этого уровни глюкозы в крови, которые были повышены вследствие высококалорийного рациона с высоким содержанием жира. Кроме того, конъюгат аналога оксинтомодулина индуцирует снижение массы тела и уменьшение потребления пищи с повышением чувствительности к инсулину и дает возможность поддержания уровней глюкозы в крови, которые не контролируются вследствие инсулинорезистентности, на нормальных уровнях. Таким образом, конъюгат аналога оксинтомодулина можно эффективно применять для предупреждения или лечения диабета и родственных заболеваний.

Описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой графическую диаграмму, показывающую изменение массы тела, вызванное введением конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия мышам с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира в течение длительного периода времени (26 недель). Изменение массы тела выражено в виде процента относительно массы тела, измеренной в сутки 0.

Фиг. 2 представляет собой графическую диаграмму, показывающую AUC (площадь под кривой) изменения уровня глюкозы в крови, вызванного введением конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия у мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира, в течение длительного периода времени (26 недель).

Фиг. 3 представляет собой графическую диаграмму, показывающую 4-недельное изменение массы тела, вызванное 4-недельным введением конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия в модели мышей с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина.

Фиг. 4 представляет собой графическую диаграмму, показывающую AUC (площадь под кривой) изменения уровня глюкозы в крови, вызванного 4-недельным введением конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия в модели мышей с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина.

Наилучшее техническое выполнение изобретения

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена композиция для предупреждения или лечения диабета, диажирения и осложнений диабета, содержащая конъюгат аналога оксинтомодулина в качестве активного ингредиента.

При использовании здесь термин "оксинтомодулин" относится к пептиду, продуцируемому из предглюкагона, являющегося предшественником глюкагона. В настоящем изобретении подразумевают, что оксинтомодулин включает нативный оксинтомодулин и его предшественник, аналог, фрагменты и варианты. Предпочтительно оксинтомодулин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNIA).

При использовании здесь термин "вариант оксинтомодулина" представляет собой пептид, имеющий один или более аминокислотных остатков, отличающихся от остатков аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина, и обладает функцией активации GLP-1 и рецепторов глюкагона. Вариант оксинтомодулина может быть получен любым путем из замены некоторых аминокислот нативного оксинтомодулина, их добавления, делеции, модификации или комбинации перечисленного.

При использовании здесь термин "аналог оксинтомодулина" относится к пептиду, производному пептида или пептидомиметику, который получен путем добавления, делеции или замены некоторых аминокислот нативного оксинтомодулина, и может в более высокой степени активировать и рецептор GLP-1, и рецептор глюкагона по сравнению с нативным оксинтомодулином.

При использовании здесь термин "фрагмент оксинтомодулина" относится к фрагменту, имеющему добавление или делецию одной или более аминокислот на amino- или карбоксиконце нативного оксинтомодулина, в котором добавленные аминокислоты могут также представлять собой неприродные аминокислоты (например, аминокислоту D-типа). Эти фрагменты оксинтомодулина обладают функцией регулирования уровней глюкозы в крови *in vivo*.

Способы получения варианта, аналога и фрагмента оксинтомодулина можно применять по отдельности или в комбинации. Например, настоящее изобретение включает пептид, имеющий одну или более чем одну аминокислоту, отличающуюся от аминокислот нативного пептида, имеющий дезаминированные аминокислотные остатки на N-конце и обладающий функцией активации как рецептора GLP-1, так и рецептора глюкагона.

Аминокислоты, упоминаемые в данном описании, сокращают согласно правилам номенклатуры

IUPAC-IUB, как описано ниже:

Аланин А; Аргинин R;
Аспарагин N; Аспарагиновая кислота D;
Цистеин C; Глутаминовая кислота E;
Глутамин Q; Глицин G;
Гистидин H; Изолейцин I;
Лейцин L; Лизин K;
Метионин M; Фенилаланин F
Пролин P; Серин S;
Треонин T; Триптофан W;
Тирозин Y; Валин V.

В настоящем изобретении аналог оксинтомодулина включает любой пептид, который получен путем замены, добавления, делеции или посттрансляционной модификации (например, метилирования, ацилирования, убиквитинирования или внутримолекулярного ковалентного связывания) аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и может активировать как рецептор глюкагона, так и рецептор GLP-1. При замене или добавлении аминокислот можно использовать не только 20 аминокислот, обычно присутствующих в белках человека, но также атипичные или неприродные аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот включают фирмы Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, включающие эти аминокислоты, и атипичные пептидные последовательности могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например American Peptide Company или Bachem (USA) или Anygen (Korea).

Как он раскрыт в данном описании, аналог оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность следующей формулы 1: R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (SEQ ID NO:54) Формула 1,

где

R1 представляет собой гистидин, дезаминогистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксимимидазопропионил, 4-имидзаоацетил, бета-карбоксимимидазопропионил или тирозин;

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

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или альфа-метилглутаминовую кислоту или делетирован;

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

X11 представляет собой аланин, аргинин или валин или делетирован;

X12 представляет собой аланин, аргинин, серии или валин или делетирован;

X13 представляет собой лизин, глутамин, аргинин или альфа-метилглутаминовую кислоту или делетирован;

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

X15 представляет собой фенилаланин или делетирован;

X16 представляет собой изолейцин или валин или делетирован;

X17 представляет собой аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин или альфа-метилглутаминовую кислоту или делетирован;

X18 представляет собой триптофан или делетирован;

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

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

X21 представляет собой аспарагин или делетирован;

X22 представляет собой аланин, глицин или треонин или делетирован;

X23 представляет собой цистеин или лизин или делетирован;

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

R2 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO:40) или делетирован (за исключением случая,

где аминокислотная последовательность формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1).

Для повышения активности оксинтомодулина дикого типа по отношению к рецептору глюкагона и к рецептору GLP-1 аналог оксинтомодулина по настоящему изобретению может быть замещен 4-имидазоацетиллом, полученным путем делеции альфа-углерода гистидина в положении 1 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, дезаминогистидилом, полученным путем делеции N-концевой аминокислотной группы, диметил-гистидилом (N-диметил-гистидилом), полученным путем модификации N-концевой аминокислотной группы двумя металльными группами, бета-гидроксиимидазопропионилом, полученным путем замещения N-концевой аминокислотной группы гидроксильной группой, или бета-карбоксиимидазопропионилом, полученным путем замещения N-концевой аминокислотной группы карбоксильной группой. Кроме того, рецептор-связывающий участок GLP-1 может быть замещен аминокислотами, усиливающими гидрофобные и ионные связи, или их комбинацией. Кроме того, часть последовательности оксинтомодулина может быть замещена аминокислотной последовательностью GLP-1 или эксендина-4, чтобы повысить активность рецептора GLP-1.

Кроме того, часть последовательности оксинтомодулина может быть замещена последовательностью, усиливающей альфа-спираль. Предпочтительно аминокислоты в положениях 10, 14, 16, 20, 24 и 28 аминокислотной последовательности формулы 1 могут быть замещены аминокислотами или производными аминокислот, состоящими из следующих: Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO₂), Phe(4-NH₂), Phg, Pal, Nal, Ala(2-тиенил) и Ala(бензотиенил), о которых известно, что они стабилизируют альфа-спираль, и тип и число встраиваемых аминокислот или производных аминокислот, стабилизирующих альфа-спираль, не ограничено. Предпочтительно аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24, и 24 и 28 аминокислотной последовательности могут быть также замещены глутаминовой кислотой или лизином, чтобы образовать кольца, и число встраиваемых колец не ограничено. Наиболее предпочтительно аналог оксинтомодулина может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из формул 2-6.

Как он раскрыт в данном описании, аналог оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 2, полученной путем замещения аминокислотной последовательности оксинтомодулина последовательностью эксендина или GLP-1:

R1-A-R3 (SEQ ID NO:55) Формула 2

Как он раскрыт в данном описании, аналог оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 3, полученную путем связывания части аминокислотной последовательности оксинтомодулина и части аминокислотной последовательности эксендина или GLP-1 посредством соответствующего аминокислотного линкера:

R1-B-C-R4 (SEQ ID NO:56) Формула 3

Как он раскрыт в данном описании, аналог оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 4, где часть аминокислотной последовательности оксинтомодулина замещена аминокислотой, усиливающей гидрофобное связывание с рецептором GLP-1. Например, он представляет собой пептид, где Leu в положении 26 замещен аминокислотой Ile или Val, усиливающей гидрофобность.

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (SEQ ID NO:57) Формула 4

Как он раскрыт в данном описании, аналог оксинтомодулина представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 5, где часть аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина делетирована, добавлена или замещена другими аминокислотами для повышения способностей нативного оксинтомодулина к активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона:

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5 (SEQ ID NO:58) Формула 5

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

A выбран из группы, состоящей из

SQGTFTSDYSKYLD-SRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41),

SQGTFTSDYSKYLD-EEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42),

SQGTFTSDYSKYLD-ERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43),

GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44),

GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45),

GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46) и

SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47);

B выбран из группы, состоящей из

SQGTFTSDYSKYLD-SRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO:41),

SQGTFTSDYSKYLD-EEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42),

SQGTFTSDYSKYLD-ERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43),

GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44),

GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45),

GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46),

SQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47),

GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO: 48) и

SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO: 49);

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

D1 представляет собой серии, глутаминовую кислоту или аргинин;

D2 представляет собой аргинин, глутаминовую кислоту или серии;

D3 представляет собой аргинин, аланин или валин;

D4 представляет собой аргинин, валин или серин;

D5 представляет собой глутамин, аргинин или лизин;

D6 представляет собой изолейцин, валин или серин;

D7 представляет собой метионин, аргинин или глутамин;

D8 представляет собой треонин, глицин или аланин;

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

E2 представляет собой серин или глутаминовую кислоту;

E3 представляет собой аргинин или лизин;

E4 представляет собой глутамин или лизин;

E5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

E6 представляет собой глутамин, цистеин или лизин;

E7 представляет собой цистеин или лизин или делетирован;

R3 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35),

GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) или GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37);

R4 представляет собой HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38),

HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) или

HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVK (SEQ ID NO: 40); и

R5 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35),

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

Предпочтительно аналог оксинтомодулина, как он раскрыт в данном описании, может представлять собой новый пептид приведенной ниже формулы 6:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (SEQ ID NO: 59) Формула 6

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

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

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту или альфа-метилглутаминовую кислоту или делетирован;

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

X11 представляет собой аланин или аргинин или делетирован;

X12 представляет собой аланин или валин или делетирован;

X13 представляет собой лизин, глутамин, аргинин или альфа-метилглутаминовую кислоту или делетирован;

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

X15 представляет собой фенилаланин или делетирован;

X16 представляет собой изолейцин или валин или делетирован;

X17 представляет собой аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин или альфа-метилглутаминовую кислоту или делетирован;

X18 представляет собой триптофан или делетирован;

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

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

X21 представляет собой аспарагин или делетирован;

X22 представляет собой треонин или делетирован;

X23 представляет собой цистеин, лизин или делетирован;

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

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

Более предпочтительно аналог окситомодулина как он раскрыт в данном описании, может быть выбран из группы, состоящей из пептидов SEQ ID NO: 2-34. Еще более предпочтительно аналог окситомодулина, как он раскрыт в данном описании, может представлять собой аналог окситомодулина, описанный в табл. 1 примера 2-1.

В примере настоящего изобретения были получены аналоги окситомодулина, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2-34, соответственно, и было обнаружено, что аналоги окситомодулина проявляли превосходную способность активировать рецептор GLP-1 и рецептор глюкагона по сравнению с нативным окситомодулином (пример 2). Иными словами, из указанных выше результатов видно, что аналог окситомодулина как он раскрыт в данном описании, проявляет превосходные эффекты при предупреждении или лечении диабета, диатриения и/или осложнений диабета по сравнению с традиционным окситомодулином посредством активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона.

Аналоги окситомодулина по настоящему изобретению находятся в форме конъюгатов, включающих различные полимеры для повышения терапевтического эффекта и периода полувыведения аналогов *in vivo*.

Конъюгаты по настоящему изобретению обладают более длительными действиями, чем нативный окситомодулин, и конъюгаты длительного действия включают окситомодулин, полученный путем модификации, замены, добавления или делеции аминокислот нативного окситомодулина, окситомодулин, конъюгированный с биоразлагаемым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), окситомодулин, конъюгированный с альбумином, антителом, эластином, фибронектином или полисахаридом, таким как хитин, или с белком длительного действия, таким как фрагмент иммуноглобулина, окситомодулин, конъюгированный с жирной кислотой, обладающей способностью к связыванию с альбумином *in vivo*, или окситомодулин, инкапсулированный в биоразлагаемых наночастицах, и тип конъюгата длительного действия, применяемого в настоящем изобретении, не ограничен.

Предпочтительно конъюгат представляет собой конъюгат, где аналог окситомодулина, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4-5, 23, 27-28, 32-34, связан с участком Fc иммуноглобулина посредством непептидного полимера.

Участок Fc иммуноглобулина представляет собой биоразлагаемый полипептид, метаболизируемый *in vivo*, и, следовательно, безопасен для применения в качестве носителя для лекарственного средства. Участок Fc иммуноглобулина имеет низкую молекулярную массу по сравнению с полноразмерной молекулой иммуноглобулина, и, следовательно, обладает преимуществом в отношении получения, очистки и выхода конъюгатов. Кроме того, поскольку аминокислотная последовательность различается между антителами, участок Fab, проявляющий высокую неомогенность, удаляют, и, следовательно, гомогенность вещества может быть значительно увеличена, и возможность индуцирования антигенности в крови может быть также уменьшена.

При использовании здесь термин "участок Fc иммуноглобулина" относится к белку, содержащему константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина, исключая переменные участки тяжелой цепи и легкой цепи, константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и константную область 1 легкой цепи (CL1) иммуноглобулина. Он может дополнительно включать шарнирную область при константной области тяжелой цепи. Участок Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может также представлять собой расширенный участок Fc, частично или полностью включающий константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константную область 1 легкой цепи (CL1), исключая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, если он обладает эффектом, по существу равным или лучшим по сравнению с нативным белком. Кроме того, участок Fc иммуноглобулина может представлять собой участок, имеющий делецию части относительно длинной аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3. В частности, участок Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать следующие участки: 1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 и домен CH4, 2) домен CH1 и домен CH2, 3) домен CH1 и домен CH3, 4) домен CH2 и домен CH3, 5) комбинацию одного или более доменов и шарнирную область иммуноглобулина (или часть шарнирной области), либо 6) димер каждого домена константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

Участок Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению включает нативную аминокислотную последовательность и ее производное (мутант). При использовании здесь термин "производное аминокислотной последовательности" относится к последовательности, отличающейся от нативной аминокислотной последовательности вследствие делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены или их комбинации одного или более аминокислотных остатков нативной аминокислотной последовательности. Например, в случае IgG Fc аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, известные как важные для связывания, можно использовать в качестве подходящих сайтов

для модификации.

Кроме того, возможны другие различные производные, включая производное, имеющее делецию участка, способного к образованию дисульфидной связи, либо делецию некоторых аминокислотных остатков на N-конце нативного Fc, либо добавление остатка метионина на N-конце нативного Fc. Кроме того, чтобы удалить эффекторные функции, делеция может происходить в сайте связывания компонента, таком как C1q-связывающий сайт, и в сайте ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность). Способы получения таких производных последовательности участка Fc иммуноглобулина раскрыты в Международных заявках на патенты WO 97/34631, WO 96/32478 и т.д.

Аминокислотные замены в белках и пептидах, в целом не изменяющие активность белков или пептидов, известны в данной области техники (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются следующие: Ala/Ser, Val/De, 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, в обоих направлениях. Кроме того, участок Fc может быть при необходимости модифицирован посредством фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и тому подобному.

Описанные выше производные Fc проявляют биологическую активность, идентичную активности участка Fc по настоящему изобретению, или обладают повышенной структурной стабильностью по отношению к нагреванию, pH или тому подобному.

Кроме того, указанный участок Fc может быть получен из нативных форм, выделенных от человека и других животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, либо может представлять собой их рекомбинанты или производные, полученные из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. В данном изобретении участок Fc может быть получен из нативного иммуноглобулина путем выделения полноразмерного иммуноглобулина из живого организма человека или животного и обработки выделенного иммуноглобулина протеиназой. При обработке полноразмерного иммуноглобулина папаином он расщепляется на участки Fab и Fc, а при обработке полноразмерного иммуноглобулина пепсином он расщепляется на фрагменты pF'c и F(ab)₂. Участок Fc или pF'c можно выделить, используя эксклюзионную хроматографию или тому подобное. Предпочтительно участок Fc человеческого происхождения представляет собой рекомбинантный участок Fc иммуноглобулина, полученный из микроорганизма.

Кроме того, участок Fc иммуноглобулина может находиться в форме, имеющей нативные сахарные цепи, либо увеличенные или уменьшенные сахарные цепи по сравнению с нативной формой, либо может находиться в дегликозилированной форме. Увеличение, уменьшение или удаление сахарных цепей участка Fc иммуноглобулина может быть достигнуто общепринятыми способами, такими как химический способ, ферментативный способ и генно-инженерный способ с использованием микроорганизма. Участок Fc, полученный путем удаления сахарных цепей из Fc, проявляет значительное снижение аффинности связывания с участком C1q и к снижению или утрате антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, и, следовательно, не индуцирует нежелательные иммунные ответы *in vivo*. В этом отношении участок Fc иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной форме может быть более подходящим для задач настоящего изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

При использовании здесь термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных группировок из участка Fc, и термин "агликозилирование" относится к негликозилированному участку Fc, продуцируемому в прокариоте, предпочтительно в *E. coli*.

В то же время участок Fc иммуноглобулина может быть выделен от человека или других животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок. Предпочтительно он выделен от человека.

Кроме того, участок Fc иммуноглобулина может быть выделен из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации или гибрида. Предпочтительно он выделен из IgG или IgM, являющихся самыми обильными белками в крови человека, и наиболее предпочтительно из IgG, о котором известно, что он увеличивает периоды полувыведения лиганд-связывающих белков.

При использовании здесь термин "комбинация" означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные участки Fc иммуноглобулинов одинакового происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. В частности, димер или мультимер может быть образован из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из фрагментов IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc и IgE Fc.

При использовании здесь термин "гибрид" означает, что в одноцепочечном участке Fc иммуноглобулина присутствуют последовательности, соответствующие двум или более фрагментам Fc иммуноглобулина различного происхождения. В настоящем изобретении возможны различные формы гибрида. Иными словами, возможен гибрид, состоящий из доменов в количестве от 1 до 4, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc и IgD Fc, и он может включать шарнирную область.

В то же время IgG может быть также разделен на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и в настоящем

изобретении также возможна комбинация или гибрид этих подклассов. Предпочтительно IgG относится к подклассам IgG2 и IgG4, и наиболее предпочтительно он представляет собой участок Fc IgG4, в котором по существу отсутствуют эффекторные функции, такие как комплементзависимая цитотоксичность (CDC).

Иными словами, наиболее предпочтительным участком Fc иммуноглобулина, используемым в качестве носителя лекарственного средства в настоящем изобретении, является участок Fc, выделенный из IgG4 человека. Участок Fc человеческого происхождения более предпочтителен, чем участок Fc происхождения, отличающегося от человеческого, который может действовать в качестве антигена в организме человека и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как продуцирование нового антитела против антигена.

При использовании здесь термин "непептидный полимер" относится к биосовместимому полимеру, включающему два или более повторяющихся звеньев, связанных друг с другом любой ковалентной связью вместо пептидной связи. В настоящем изобретении непептидный полимер можно использовать взаимозаменяемо с непептидным линкером.

Непептидный полимер, который можно использовать в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля/пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахаридов, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемых полимеров, таких как PLA (полимолочная кислота) и PLGA (сополимер молочной и гликолевой кислот), липидных полимеров, хитинов, гиалуроновой кислоты и их комбинаций. Предпочтительно непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль. Кроме того, его производные, известные в данной области техники, и производные, которые могут быть легко получены способом, известным в данной области техники, также находятся в пределах объема настоящего изобретения.

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

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

Производное сукцинимиды может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, когда непептидный полимер имеет активную альдегидную группу на его обоих концах, неспецифические взаимодействия можно свести к минимуму, и физиологически активный полипептид и иммуноглобулин могут быть эффективно связаны с обоими концами непептидного полимера, соответственно. Конечный продукт, образованный путем восстановительного алкилирования альдегидной связью, значительно более стабилен, чем связанный амидной связью. Альдегидная активная группа селективно связывается с N-концом при низком pH и может образовывать ковалентную связь с остатком лизина при высоком pH, таком как pH 9,0.

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

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

Кроме того, в настоящем изобретении оба конца непептидного полимера включают активные группы, с которыми может связываться участок Fc иммуноглобулина и белковое лекарственное средство.

во. Примеры активных групп включают, без ограничения, альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу, малеимидную группу, производное сукцинимид (сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилпропионаткарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат) и тому подобное.

Активные группы на обоих концах линкера, то есть непептидильного полимера, могут быть одинаковыми или разными. Например, непептидильный полимер может иметь на одном конце малеимидную группу, а на другом конце альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу. Например, когда непептидильный полимер имеет активную альдегидную группу на одном конце и активную малеимидную группу на другом конце, неспецифические взаимодействия можно свести к минимуму, и физиологически активный полипептид и иммуноглобулин могут быть эффективно связаны с обоими концами непептидильного полимера. В примере настоящего изобретения конъюгат синтезировали путем связывания оксинтомодулина или его аналога с участком Fc иммуноглобулина посредством ковалентной связи, используя непептидильный полимер ПЭГ, включающий одну пропиональдегидную группу или как малеимидную группу, так и альдегидную группу.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять для предупреждения или лечения диабета, диажирения и/или осложнений диабета.

При использовании здесь термин "предупреждение" относится ко всем действиям, ингибирующим или замедляющим развитие заболевания-мишени. В частности, термин "предупреждение" означает введение конъюгата аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению для контроля уровней глюкозы в крови до нормальных уровней, в результате чего ингибируют или замедляют развитие диабета, диажирения или осложнений диабета.

При использовании здесь термин "лечение" относится ко всем действиям, облегчающим, улучшающим или ослабляющим симптомы развившегося заболевания. В частности, термин "лечение" означает введение конъюгата аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению для поддержания уровней глюкозы в крови на нормальных уровнях, в результате чего облегчают, улучшают или ослабляют состояния диабета, диажирения или осложнений диабета.

При использовании здесь термин "диабет" представляет собой вид метаболического заболевания, при котором секреция инсулина недостаточна или нормальные функции не выполняются. Диабет характеризуется повышенными уровнями глюкозы в крови, вызывающими различные состояния и синдромы. В случае диабета глюкоза выводится с мочой.

При использовании здесь термин "диажирение" относится к диабету, которому сопутствуют состояния ожирения, в частности к диабету типа 2, или к состояниям ожирения, которые, как правило, встречаются у пациентов с диабетом типа 2. Приблизительно 80-90% пациентов с диабетом типа 2 страдают состояниями ожирения, и для них характерна инсулинорезистентность. Надлежащая лечебная физкультура, диетотерапия и фармакотерапия могут предотвратить диажирение и облегчить состояния диажирения. В настоящем изобретении диажирение может означать диажирение в результате ожирения.

При использовании здесь термин "осложнения диабета" относится к различным патологическим состояниям, встречающимся в организме вследствие гипергликемических состояний, сохраняющихся в течение длительного периода времени. Примеры осложнений диабета включают, без ограничения, ретинопатию, дисфункцию почек, нейропатию, удар, вызванный сосудистым расстройством, заболевания почек или сердца, язву, связанную с синдромом диабетической стопы, и сердечно-сосудистое заболевание. Если гипергликемическое состояние сохраняется в течение длительного периода времени, оно приводит к различным патологическим состояниям в организме. Как правило, оно повышает риск ретинопатии, дисфункции почек, нейропатии, удара, вызванного сосудистым расстройством, заболеваний почек или сердца, язвы, связанной с синдромом диабетической стопы, и сердечно-сосудистого заболевания. Таким образом, для предупреждения осложнений диабета необходим эффективный контроль уровней глюкозы в крови.

Соответственно фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять для предупреждения или лечения диабета, диажирения или осложнений диабета.

В примере настоящего изобретения конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению был получен путем ковалентного связывания аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению с участком Fc иммуноглобулина посредством полиэтиленгликоля, и полученный конъюгат вводили в модели мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира, и в модели мышей с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина. В результате было показано, что масса тела и прием пищи группы, которой вводили конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению, были значимо снижены по сравнению с уровнями модели животных с индуцированным ожирением (фиг. 1), и что уровень глюкозы в крови значимо снижался (фиг. 2). Кроме того, конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению проявлял эффект снижения глюкозы в крови, равный или более высокий, чем имеющийся в продаже конъюгат аналога GLP-1 длительного действия Виктоза® (фиг. 2).

В примере настоящего изобретения конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия был получен путем ковалентного связывания аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению с участ-

ком Fc иммуноглобулина, и полученный конъюгат вводили в модели мышей с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина. В результате было показано, что в группе, которой вводили конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия, увеличение массы тела было значимо ингибировано по сравнению с контрольной группой (фиг. 3), и уровень глюкозы в крови значимо снижался (фиг. 4), и данный конъюгат также показал лучший эффект снижения глюкозы в крови по сравнению с имеющимся в продаже аналогом GLP-1 длительного действия Виктоза® (фиг. 4).

Иными словами, конъюгат аналога оксинтомодулина согласно настоящему изобретению выполняет функцию индуцирования развития бета-клеток *in vivo* с повышением секреции инсулина, улучшая посредством этого способность к контролю уровня глюкозы в крови. Кроме того, конъюгат аналога оксинтомодулина согласно настоящему изобретению индуцирует снижение массы тела с улучшением чувствительности к инсулину и предотвращает развитие сердечнососудистых заболеваний, включая атеросклероз, гиперлипидемию и гипертензию, которые могут развиваться вследствие инсулинорезистентности. Соответственно, конъюгат аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению можно эффективно применять в качестве агента для лечения диабета, диабетического ожирения и осложнений диабета. Кроме того, конъюгат по настоящему изобретению обладает высокой способностью к активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона по сравнению с нативным оксинтомодулином и проявляет увеличенный период полувыведения в крови *in vivo* за счет связанного с ним участка Fc, и, следовательно, его активность может поддерживаться *in vivo* в течение увеличенного периода времени.

Композиция по настоящему изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтический агент, проявляющий превентивное или терапевтическое действие против диабета, диабетического ожирения или осложнений диабета. Для введения конъюгата аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению в комбинации с фармацевтическим агентом, известным в качестве терапевтического агента против диабета, диабетического ожирения или осложнений диабета, композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать этот известный фармацевтический агент.

Таким образом, композицию по настоящему изобретению можно применять отдельно или вводить в комбинации с другими лекарственными средствами для предупреждения или лечения диабета, диабетического ожирения или осложнений диабета.

При использовании здесь термин "введение" означает введение данного вещества пациенту любым подходящим способом. Конъюгат аналога по настоящему изобретению можно вводить любым обычным путем, если он может достичь ткани-мишени. В частности, конъюгат аналога по настоящему изобретению можно вводить интраперитонеально, внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутрикожно, перорально, локально, интраназально, внутрилегочным путем или интаректально, но путь введения не ограничен ими. Тем не менее, поскольку пептид расщепляется при пероральном введении, пероральную композицию предпочтительно готовят таким образом, чтобы активный ингредиент был покрыт или защищен от разложения в желудке. Предпочтительно композицию по настоящему изобретению можно вводить в инъекционной форме. Кроме того, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить, используя любую систему, способную к доставке активного ингредиента в клетки-мишени.

Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Для перорального введения фармацевтически приемлемые носители включают связующее вещество, смазывающее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизатор, диспергирующий агент, стабилизатор, суспендирующий агент, краситель и корригент. Для инъекционных препаратов фармацевтически приемлемые носители включают буфер, консервант, анальгетик, солюбилизатор, изотонический агент и стабилизатор. Для местного введения фармацевтически приемлемые носители включают основу, эксципиент, смазывающее вещество и консервант. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно готовить в различных дозируемых формах, используя упомянутые выше фармацевтически приемлемые носители. Например, для перорального введения фармацевтическую композицию можно готовить в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток или тому подобного. Для инъекционных препаратов фармацевтическая композиция может быть представлена в виде ампулы, содержащей стандартную дозу, или контейнера, содержащего множественные дозы. Кроме того, фармацевтическую композицию можно также включать в растворы, суспензии, таблетки, пилюли, капсулы и препараты пролонгированного высвобождения.

Кроме того, примеры носителя, эксципиента и разбавителя, подходящего для приготовления, включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральные масла. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать наполнители, антикоагулянты, смазывающие вещества, увлажняющие агенты, корригенты, консервант и тому подобное.

Дозу фармацевтической композиции по настоящему изобретению определяют в соответствии с ви-

дом активного ингредиента вместе с различными факторами, такими как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст пациента, пол и масса тела, а также тяжесть заболевания. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет длительный период полувыведения *in vivo* и превосходную биодоступность, и, следовательно, число и частоту введения фармацевтической композиции можно значительно уменьшить.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ предупреждения или лечения диабета, диабета или осложнений диабета, включающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества конъюгата аналога оксинтомодулина.

Конъюгат аналога оксинтомодулина, диабет, диабет и осложнения диабета являются здесь такими, как определено выше.

При использовании здесь термин "субъект" относится к субъекту с подозрением на диабет, диабет или осложнения диабета. В частности, этот термин означает млекопитающих, включая людей, крыс и домашних животных, страдающих описанным выше заболеванием или имеющих риск развития описанного выше заболевания. Кроме того, субъект может представлять собой любого субъекта, которого можно лечить конъюгатом аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению.

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

Также в настоящем изобретении раскрыто применение конъюгата аналога оксинтомодулина по настоящему изобретению при получении лекарственного средства для предупреждения или лечения диабета, диабета или осложнений диабета.

Также в настоящем изобретении раскрыт способ получения конъюгата аналога оксинтомодулина.

Способ получения согласно настоящему изобретению может включать следующие стадии: (1) ковалентное связывание непептидильного полимера, содержащего активную альдегидную, малеимидную или сукцинимидную группу на обоих концах, с аминной или тиольной группой пептида-аналога оксинтомодулина; (2) выделение конъюгата, включающего пептид-аналог оксинтомодулина, содержащего непептидильный полимер, ковалентно связанный с этим аналогом в положениях, отличающихся от аминоконцевого положения, из реакционной смеси стадии (1); и (3) ковалентное связывание участка Fc иммуноглобулина с другим концом связанного непептидильного полимера выделенного конъюгата, в результате чего получают пептидный конъюгат, включающий участок Fc иммуноглобулина и пептид-аналог оксинтомодулина, связанные с обоими концами непептидильного полимера соответственно.

Более конкретно способ получения может включать следующие стадии: (1) ковалентное связывание непептидильного полимера, содержащего активную альдегидную группу и активную малеимидную группу на каждом его конце, с остатком цистеина аналога оксинтомодулина; (2) выделение конъюгата, включающего конъюгат аналога оксинтомодулина, содержащего непептидильный полимер, ковалентно связанный с остатком цистеина, из реакционной смеси стадии (1); и (3) ковалентное связывание участка Fc иммуноглобулина с другим концом связанного непептидильного полимера выделенного конъюгата, в результате чего получают пептидный конъюгат, включающий участок Fc иммуноглобулина и аналог оксинтомодулина, связанные с обоими концами непептидильного полимера, соответственно.

Техническое выполнение изобретения

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

Пример 1: Получение линии клеток для активации *in vitro*

Пример 1-1: Получение линии клеток, демонстрирующей cAMP(циклический аденозинмонофосфат)-ответ на GLP-1

Используя участок, соответствующий ORF (открытая рамка считывания), кДНК (комплементарная ДНК) (OriGene Technologies, Inc. USA) гена рецептора GLP-1 человека в качестве матрицы, проводили PCR (полимеразная цепная реакция), используя прямые и обратные праймеры, включающие сайт рестрикции HindIII и сайт рестрикции EcoRI соответственно, с получением в результате продукта PCR.

Прямой праймер: 5'-CCCGGCCCGCCGCGCGCTATTTCGAAATAC-3' (SEQ ID NO: 50)

Обратный праймер: 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3' (SEQ ID NO: 51)

Продукт PCR клонировали в известный экспрессионный вектор животных клеток x0GC/dhfr, в результате чего сконструировали рекомбинантный вектор x0GC/GLP-1R.

Рекомбинантный вектор x0GC/GLP-1R вводили в линию клеток CHO DG44, культивировали в среде DMEM/F12 (10% фетальная бычья сыворотка (FBS)), используя липофектамин (Invitrogene, USA), с получением трансформанта. Трансформант инкубировали в селективной среде, содержащей 1 мг/мл G418 и 10 нМ метотрексат, и от него отбирали моноклональные линии клеток. Затем, наконец, из моноклональных линий клеток отбирали линию клеток, демонстрирующую надлежащий зависимый от концентрации сАМР-ответ на GLP-1.

Пример 1-2. Получение линии клеток, демонстрирующей сАМР-ответ на глюкагон

Используя участок, соответствующий ORF (открытая рамка считывания), кДНК (OriGene Technologies, Inc. USA) гена рецептора глюкагона человека в качестве матрицы, проводили PCR, используя прямые и обратные праймеры, включающие сайт рестрикции EcoRI и сайт рестрикции XhoI, соответственно, с получением в результате продукта PCR.

Прямой праймер: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO: 52)

Обратный праймер: 5'-СТААССГАСТСТСГГГГААГАСТГАСТСГСС-3' (SEQ ID NO: 53)

Продукт PCR клонировали в известный экспрессионный вектор животных клеток x0GC/dhfr, в результате чего сконструировали рекомбинантный вектор x0GC/GCGR.

Рекомбинантный вектор x0GC/GCGR вводили в линию клеток CHO DG44, культивировали в среде DMEM/F12 (10% фетальная бычья сыворотка (FBS)), используя липофектамин (Invitrogene, USA), с получением трансформанта. Трансформант инкубировали в селективной среде, содержащей 1 мг/мл G418 и 10 нМ метотрексат, и от него отбирали моноклональные линии клеток. Затем, наконец, из моноклональных линий клеток отбирали линию клеток, демонстрирующую надлежащий зависимый от концентрации сАМР-ответ на глюкагон.

Пример 2. Активность аналогов окситомодулина in vitro

Пример 2-1. Синтез аналогов окситомодулина

Для измерения активностей аналогов окситомодулина in vitro синтезировали аналоги окситомодулина, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Окситомодулин и аналоги окситомодулина

SEQ ID NO	Последовательность
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAVLKNTPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNTPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNTPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 6	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD
SEQ ID NO: 7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 8	CA-SQGTFTSDLSRQLEEEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID NO: 9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 11	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYLDK
SEQ ID NO: 12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGHGEGTFTSDLSKQMEEEAVK
SEQ ID NO: 13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIXWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 16	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGHSGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID NO: 17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 19	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 20	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTK
SEQ ID NO: 23	HaibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID NO: 24	HaibQGTFTSDY SKYLDEKRAK EFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 25	HaibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 26	HaibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 27	HaibQGTFTSDYSKYLDEQAQKEFICWLMNT
SEQ ID NO: 28	HaibQGTFTSDY SKYLDEKRAK EFVQWLMNT
SEQ ID NO: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA

SEQ ID NO: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 33	HAibQGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 34	YAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

В табл. 1 выше аминокислоты, указанные жирным шрифтом, означают образование кольца, и аминокислоты, обозначенные как X, означают альфа-метил-глутаминовые кислоты, представляющие собой не нативные аминокислоты. Кроме того, CA представляет собой 4-имидазоацетил, DA представляет собой дезамино-гистидил, и (d)S представляет собой d-серин.

Пример 2-2. Измерение активностей аналогов оксинтомодулина *in vitro*

Для измерения эффектов пептидов, полученных в примере 2-1 выше, измеряли активности пептидов в клетках *in vitro*, используя трансформанты, полученные в примерах 1-1 и 1-2.

Каждый из трансформантов трансформировали таким образом, чтобы они экспрессировали каждый из генов: рецептора GLP-1 человека и рецептора глюкагона человека - в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и подходили для измерения активностей GLP-1 и глюкагона. Таким образом, активность каждого из аналогов оксинтомодулина измеряли, используя каждый из трансформантов.

В частности, каждый из трансформантов субкультивировали два или три раза в неделю, и клетки распределяли в каждую лунку 96-луночного планшета при плотности 1×10^5 клеток/лунка и культивировали в течение 24 ч.

Культивированные клетки промывали буфером KRB, суспендировали в 40 мл буфера KRB, содержащего 1 мМ изобутилметилксантин (IBMX), а затем давали стоять при комнатной температуре в течение 5 мин. Каждый из оксинтомодулина (SEQ ID NO: 1) и аналогов оксинтомодулина (SEQ ID NO: 2-6, 8, 10-13, 17, 18, 23-25, 27, 28 и 32-34) серийно разводили в пять раз от 1000 до 0,02 нМ и 40 мл каждого из разведений добавляли к клеткам, после чего эти клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 1 ч. Затем добавляли 20 мл буфера для лизиса клеток, чтобы лизировать клетки, и концентрацию цАМФ в каждом из клеточных лизатов измеряли, используя набор для анализа cAMP (Molecular Device, USA). На основании результатов измерения вычисляли значения EC₅₀ и сравнивали друг с другом (табл. 2).

Таблица 2. Сравнение активностей аналогов оксинтомодулина в отношении рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона *in vitro*

SEQ ID NO	EC ₅₀ (нМ)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
SEQ ID NO: 1	50 - 210	10 - 43
SEQ ID NO: 2	51,8	12,8
SEQ ID NO: 3	>1000	637,7
SEQ ID NO: 4	5,5	>1000
SEQ ID NO: 5	5,9	>1000
SEQ ID NO: 6	500,1	>1000
SEQ ID NO: 8	419,6	>1000
SEQ ID NO: 10	>1000	>1000
SEQ ID NO: 11	>1000	>1000
SEQ ID NO: 12	>1000	>1000
SEQ ID NO: 13	>1000	>1000
SEQ ID NO: 17	97,9	>1000
SEQ ID NO: 18	96,3	>1000
SEQ ID NO: 23	2,46	5,8
SEQ ID NO: 24	1,43	6,95
SEQ ID NO: 25	1,9	1,3
SEQ ID NO: 27	2,8-5,5	3,1-5,6
SEQ ID NO: 28	3,1	0,3
SEQ ID NO: 32	41,3	17,7
SEQ ID NO: 33	2,2	80,2
SEQ ID NO: 34	12,5	1,04

Как видно в табл. 2 выше, аналоги оксинтомодулина показали превосходные активности *in vitro* в отношении рецептора GLP-1 и глюкагона по сравнению с оксинтомодулином SEQ ID NO: 1.

Известно, что оксинтомодулин обладает эффектом лечения ожирения, гиперлипидемии, жировой болезни печени или атеросклероза посредством активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона. Аналоги оксинтомодулина согласно настоящему изобретению обладают высокой способностью к активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона *in vitro* по сравнению с нативным оксинтомодулином, что позволяет предположить, что эти аналоги оксинтомодулина в высокой степени эффективны при лечении

диабета, диабегения или осложнений диабета по сравнению с нативным оксинтомодулином.

Пример 3. Получение конъюгата, включающего аналог оксинтомодулина (SEQ ID NO: 23) и иммуноглобулин Fc (иммуноглобулин Fc-конъюгированного аналога оксинтомодулина 23)

Для ПЭГилирования MAL-10K-ALD ПЭГ (NOF., Japan) при остатке цистеина в положении 24 аминокислотной последовательности аналога оксинтомодулина (SEQ ID NO: 23) этому аналогу оксинтомодулина (SEQ ID NO: 23) и MAL-10K-ALD ПЭГ давали возможность взаимодействовать друг с другом при молярном отношении 1:3 при концентрации белка 3 мг/мл при комнатной температуре в течение 3 ч. Эту реакцию проводили в 50 мМ Трис буфере (pH 8,0), содержащем 1 М гуанидин. После завершения взаимодействия реакционный раствор наносили на SOURCE S в описанных ниже условиях, в результате чего очищали аналог оксинтомодулина, моно-ПЭГилированный при остатке цистеина. Колонка: SOURCE S, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 -> 100% 50 мин B (A: 20 мМ Na цитрат (pH 3,0) + 45% этанол, B: A + 1 М KCl).

Затем очищенному моно-ПЭГилированному аналогу оксинтомодулина (SEQ ID NO: 23) и иммуноглобулину Fc давали возможность взаимодействовать друг с другом при молярном отношении 1:5, при концентрации белка 20 мг/мл при 4°C в течение 16 ч. Реакцию проводили в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 20 мМ SCB (цианоборгидрид натрия) в качестве восстанавливающего агента. После завершения взаимодействия реакционный раствор наносили на колонку для очистки SOURCE (колонка: SOURCE 15Q, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 -> 4% 1 мин, B -> 20% 80 мин B (A: 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, B: A + 1 М NaCl)) и колонку Source ISO (колонка: SOURCE ISO, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: B 0 -> 100% 100 мин A, (A: 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, B: A + 1,1 М сульфат аммония (CA)), в результате чего очищали конъюгат, содержащий аналог оксинтомодулина (SEQ ID NO: 23) и иммуноглобулин Fc.

Пример 4. Получение конъюгата, содержащего аналог оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и иммуноглобулин Fc (иммуноглобулин Fc-конъюгированный аналог оксинтомодулина 25)

Для ПЭГилирования MAL-10K-ALD ПЭГ при остатке цистеина в положении 30 аминокислотной последовательности аналога оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) аналогу оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и MAL-10K-ALD ПЭГ давали возможность взаимодействовать друг с другом при молярном отношении 1:3, при концентрации белка 3 мг/мл при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проводили в 50 мМ Трис-буфере (pH 8,0), содержащем 1 М гуанидин. После завершения взаимодействия реакционный раствор наносили на SOURCE S в описанных ниже условиях, в результате чего очищали аналог оксинтомодулина, моно-ПЭГилированный при остатке цистеина: колонка: SOURCE S, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 -> 100% 50 мин B (A: 20 мМ Na-цитрат (pH 3,0) + 45% этанол, B: A + 1 М KCl).

Затем очищенному моно-ПЭГилированному аналогу оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и иммуноглобулину Fc давали возможность взаимодействовать друг с другом при молярном отношении 1:5, при концентрации белка 20 мг/мл, при 4°C в течение 16 ч. Реакцию проводили в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 20 мМ SCB в качестве восстанавливающего агента. После завершения взаимодействия реакционный раствор наносили на колонку SOURCE 15Q (колонка: SOURCE 15Q, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 -> 4% 1 мин B -> 20% 80 мин B (A: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), B: A + 1 М NaCl)) и колонку Source ISO (колонка: SOURCE ISO, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: B 0 -> 100% 100 мин A (A: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), B: A + 1,1 М CA)), в результате чего очищали конъюгат, содержащий аналог оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и иммуноглобулин Fc.

Пример 5. Получение конъюгата, содержащего аналог оксинтомодулина (SEQ ID NO: 27) и иммуноглобулин Fc (иммуноглобулин Fc-конъюгированный аналог оксинтомодулина 27)

Для ПЭГилирования MAL-10K-ALD ПЭГ при остатке цистеина в положении 30 аминокислотной последовательности аналога оксинтомодулина (SEQ ID NO: 27) аналогу оксинтомодулина (SEQ ID NO: 27) и MAL-10K-ALD ПЭГ давали возможность взаимодействовать друг с другом при молярном отношении 1:3, при концентрации белка 3 мг/мл при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проводили в 50 мМ Трис-буфере (pH 8,0), содержащем 1 М гуанидин. После завершения взаимодействия реакционный раствор наносили на SOURCE S в описанных ниже условиях, в результате чего получили аналог оксинтомодулина, моно-ПЭГилированный при остатке цистеина: колонка: SOURCE S, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 -> 100% 50 мин B (A: 20 мМ Na-цитрат (pH 3,0) + 45% этанол, B: A + 1 М KCl).

Затем очищенному моно-ПЭГилированному аналогу оксинтомодулина (SEQ ID NO: 27) и иммуноглобулину Fc давали возможность взаимодействовать друг с другом при молярном отношении 1:5, при концентрации белка 20 мг/мл при 4°C в течение 16 ч. Реакцию проводили в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6,0), содержащем 20 мМ SCB в качестве восстанавливающего агента. После завершения взаимодействия реакционный раствор наносили на колонку SOURCE 15Q (колонка: SOURCE 15Q, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0 -> 4% 1 мин B -> 20% 80 мин B (A: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), B: A + 1 М NaCl)) и колонку Source ISO (колонка: SOURCE ISO, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: B 0 -> 100% 100 мин A (A: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), B: A + 1,1 М CA)), в результате чего очищали конъюгат, содержащий аналог оксинтомодулина (SEQ ID NO: 27) и иммуноглобулин Fc.

Пример 6. Эффекты конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия на снижение массы тела и уровня глюкозы в крови мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира (HF DIO)

Пример 6-1. Экспериментальный метод

6-недельных мышей (C57BL/6, 120-130 г) приобретали у фирмы OrientBIO (Korea). Приобретенные мыши C57BL/6 являются животными, часто используемыми при исследованиях по ожирению и диабету, поскольку ожирение у них можно относительно легко индуцировать посредством рациона с высоким содержанием жира. Мыши HF DIO являются грызунами, часто используемыми в исследованиях диабета, и у них естественным путем проявляется ожирение и диабетические состояния, подобные таким состояниям у людей, в результате внесения в организм корма с высоким содержанием жира без генетических манипуляций, в отличие от мышей db/db с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина. По этой причине в настоящем изобретении данных животных использовали для изучения эффектов композиции по настоящему изобретению на снижение массы тела и уровней глюкозы в крови при диатирении.

Животным давали свободный доступ к корму с высоким содержанием жира (60% ккал за счет жира, D12492; Research Diets Inc.), стерилизованному облучением УФ-светом. Животным также давали свободный доступ к фильтрованной и стерилизованной УФ-облучением водопроводной воде, используя поилки с водой. Животных держали в виварии, удовлетворяющем стандартам GLP (надлежащая лабораторная практика), при цикле 12 ч свет/12 ч темнота (освещение: с 6.00 до 18.00), и все экспериментальные методы выполняли в соответствии со стандартным руководством по экспериментам на животных. Введение лекарственного средства начинали после 26 недель индуцирования ожирения, и животных делили на пять групп (n равно 6), как показано в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Группы	Вводимые лекарственные средства	Способы введения	
HF D10-индуцированная группа	Носитель (PBS)	S.C. (подкожно)	Один раз в неделю
HF D10-индуцированные группы с введением лекарственного средства	Виктоза® 100 нмоль/кг	S.C.	Один раз в сутки
	SEQ ID NO: 25-Fc конъюгат 1 нмоль/кг	S.C.	Один раз в неделю
	SEQ ID NO: 25-Fc конъюгат 3 нмоль/кг		
	SEQ ID NO: 25-Fc конъюгат 5 нмоль/кг		

В частности, группу 1 (HF DIO-индуцированная группа, контрольная группа) кормили кормом с высоким содержанием жира, и вводили подкожно 5 мл/кг (объем инъекции) забуференного фосфатом физиологического раствора, модифицированного по Дульбекко (DPBS, Sigma) один или более чем один раз в неделю. Для теста на толерантность к глюкозе в крови группе 1 вводили подкожно забуференный фосфатом физиологический раствор, модифицированный по Дульбекко (DPBS, Sigma) за 24 ч до теста и подвергали ее голоданию в течение 16 ч. Кровь собирали из хвостовой части, чтобы измерить уровень глюкозы натощак, и измеряли уровни глюкозы через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после внутрибрюшинного введения 1 г/кг глюкозы.

Группу 2 (HF DIO-индуцированная группа с введением 100 нмоль/кг Виктозы®) кормили рационом с высоким содержанием жира для индуцирования ожирения и гипергликемии, а затем вводили один раз в сутки подкожно 5 мл/кг (объем инъекции) имеющегося в продаже препарата Виктоза® (GSK). Для теста на толерантность к глюкозе в крови группу 2 подвергали голоданию в течение 16 ч перед тестом и вводили подкожно 100 нмоль/кг Виктоза® за 4 ч до теста. Кровь собирали из хвостовой части, чтобы измерить уровень глюкозы натощак, и измеряли уровни глюкозы в крови через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после внутрибрюшинного введения 1 г/кг глюкозы.

Группу 3 (HF DIO-индуцированная группа с введением 1 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) кормили рационом с высоким содержанием жира для индуцирования ожирения и гипергликемии, а затем вводили подкожно один раз в неделю 1 нмоль/кг (объем инъекции 5 мл/кг) конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc, полученного в примере 4. Для теста на толерантность к глюкозе в крови группу 3 подвергали голоданию в течение 24 ч перед тестом и вводили подкожно 1 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc за 24 ч до теста и подвергали голоданию в течение 16 ч. Кровь собирали из хвостовой части, чтобы измерить уровень глюкозы натощак, и измеряли уровни глюкозы в крови через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после внутрибрю-

шинного введения 1 г/кг глюкозы.

Группу 4 (HF DIO-индуцированная группа с введением 3 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) кормили рационом с высоким содержанием жира для индуцирования ожирения и гипергликемии, а затем вводили подкожно один раз в неделю 3 нмоль/кг (объем инъекции 5 мл/кг) конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc, полученного в примере 4. Для теста на толерантность к глюкозе в крови группу 3 подвергали голоданию в течение 24 ч перед тестом и вводили подкожно 3 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc за 24 ч до теста и подвергали голоданию в течение 16 ч. Кровь собирали из хвостовой части, чтобы измерить уровень глюкозы натощак, и измеряли уровни глюкозы в крови через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после внутривенного введения 1 г/кг глюкозы.

Группу 5 (HF DIO-индуцированная группа с введением 5 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) кормили рационом с высоким содержанием жира для индуцирования ожирения и гипергликемии, а затем вводили подкожно один раз в неделю 5 нмоль/кг (объем инъекции 5 мл/кг) конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc, полученного в примере 4. Для теста на толерантность к глюкозе в крови группу 5 подвергали голоданию в течение 24 ч перед тестом и вводили подкожно 5 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc за 24 ч до теста и подвергали голоданию в течение 16 ч. Кровь собирали из хвостовой части, чтобы измерить уровень глюкозы натощак, и измеряли уровни глюкозы в крови через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после внутривенного введения 1 г/кг глюкозы.

Для всех групп (n равно 6) физиологический раствор или каждое лекарственное средство вводили в течение 2 недель, а затем анализировали его эффекты на снижение массы тела и уровня глюкозы в крови.

Пример 6-2. Эффекты конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия на снижение массы тела и уровня глюкозы в крови мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира (HF DIO), которые являются стабильными моделями ожирения

Для исследования эффекта конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению на снижение уровня глюкозы в крови мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира (в течение 26 недель) (HF DIO), которые являются стабильными моделями ожирения, мышам DIO, классифицированным в примере 6-1, вводили подкожно конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия один раз в неделю в течение 2 недель. Массу тела и потребление пищи измеряли ежедневно, и кровь собирали из хвостовой части мышей DIO в сутки 0, 3, 7, 10 и 14, и изменение уровней глюкозы в крови анализировали, используя HITACHI 7020. Изменения массы тела и уровня глюкозы в крови показаны на фиг. 1 и 2.

На фиг. 1 показано изменение массы тела, а на фиг. 2 показана AUC (площадь под кривой) глюкозы в крови. Полученные результаты статистически обрабатывали и вычисляли средние значения и стандартные отклонения средних значений.

При проверке достоверности между группами (n равно 6) данные статистически обрабатывали, используя критерий Даннета однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, и значение p менее 0,05 считали статистически значимым.

В частности, результаты измерения изменения массы тела показали, что масса тела мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира в течение 26 недель, не снижалась, тогда как при введении мышам с ожирением конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) их масса тела снижалась дозозависимо (фиг. 1).

Результаты измерения уровня глюкозы в крови показали, что уровень глюкозы в крови мышей с ожирением дозозависимо снижался при введении этим мышам конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc). В частности, при введении мышам с ожирением 5 нмоль/кг конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) их уровень глюкозы в крови значимо снижался по сравнению с уровнем мышей DIO с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием, и эффект снижения уровня глюкозы в крови под действием 5 нмоль/кг конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгат SEQ ID NO: 25-Fc) был равным или лучшим по сравнению с имеющимся в продаже лекарственным средством Виктоза® для лечения диабета (фиг. 2).

На основании результатов примера 6-2 было обнаружено, что конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению, содержащий аналог оксинтомодулина, ковалентно связанный с участком Fc иммуноглобулина посредством ПЭГ, снижал массу тела и уровень глюкозы в крови мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жира (HF DIO), что позволяет предположить возможность его эффективного применения для лечения диабета, диабета или родственных заболеваний.

Пример 7. Эффекты конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия на снижение массы тела и уровня глюкозы в крови мышей db/db с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина

Пример 7-1. Экспериментальный метод

7-недельных самцов мышей BKS.Cg -/+ Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd (25 плюс/минус 3 г, Harlan U.S.A) приобретали у фирмы Doo Yeol Biotech (Korea). Мыши BKS.Cg -/+ Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd (далее обозначенные как мыши db/db) являются грызунами, чаще всего используемыми в исследованиях диабета вместе с мышами ob/ob, и у них естественным путем проявляется ожирение и диабетические состояния, по-

добные таким состояниям у людей посредством мутации в рецепторе лептина. По этой причине в настоящем изобретении этих животных использовали для изучения эффекта, снижающего уровень глюкозы в крови, агента по настоящему изобретению при разработке агента для лечения диабета.

Приобретенных животных акклиматизировали и адаптировали к условиям эксперимента в течение 1 недели, а затем случайно группировали в соответствии с их уровнями глюкозы.

Животным давали свободный доступ к твердому корму (Picolab Rodent diet 5053), стерилизованному облучением УФ-светом. Животным также давали свободный доступ к фильтрованной и стерилизованной УФ-облучением водопроводной воде, используя поилки с водой. Животных держали в виварии, удовлетворяющем стандартам GLP, при цикле 12 ч свет/12 ч темнота (освещение: с 6.00 до 18.00), и все экспериментальные методы выполняли в соответствии со стандартным руководством по экспериментам на животных. Животных делили на четыре группы (n равно 7) и вводили лекарственные средства, как показано в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Группы	Вводимые лекарственные средства	Способы введения	
Контрольная группа	Носитель (PBS)	S.C.	Один раз в неделю x 4
Группы с введением лекарственных средств	Виктоза® 60 нмоль/кг	S.C.	Один раз в сутки x 28
	Виктоза® 100 нмоль/кг		
	Конъюгат SEQ ID NO: 23-Fc 15 нмоль/кг	S.C.	Один раз в неделю x 4
	Конъюгат SEQ ID NO: 25-Fc 6 нмоль/кг		

В частности, группе 1 (носитель), представляющей собой контрольную группу, вводили подкожно 5 мл/кг забуференного фосфатом физиологического раствора, модифицированного по Дульбекко (DPBS, Sigma) один раз в неделю.

Группе 2 (группе с введением лекарственного средства 60 нмоль/кг Виктоза®) вводили подкожно один раз в сутки 60 нмоль/кг (доза для диабета; объем инъекции 5 мл/кг) имеющегося в продаже Виктоза® (GSK).

Группе 3 (группе с введением лекарственного средства 100 нмоль/кг Виктоза®) вводили подкожно один раз в сутки 100 нмоль/кг (доза для ожирения; объем инъекции 5 мл/кг) имеющегося в продаже Виктоза® (GSK).

Группе 4 (15 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 23-Fc), представляющей собой группу с введением лекарственного средства, вводили подкожно один раз в неделю 15 нмоль/кг (объем инъекции 5 мл/кг) конъюгата SEQ ID NO: 23-Fc, полученного в примере 4.

Группе 5 (6 нмоль/кг конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc), представляющей собой группу с введением лекарственного средства, вводили подкожно один раз в неделю 6 нмоль/кг (объем инъекции 5 мл/кг) конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc, полученного в примере 4.

Для всех групп (n равно 7) физиологический раствор или каждое лекарственное средство вводили в течение 4 недель, а затем анализировали его эффекты на снижение массы тела и уровня глюкозы в крови.

Пример 7-2. Анализ действий конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия на снижение массы тела и уровня глюкозы в крови мышей db/db с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина

Для изучения эффекта конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению на снижение уровня глюкозы в крови мышей db/db с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина, мышам db/db, классифицированным в примере 7-1, вводили подкожно конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия один раз в неделю в течение 4 недель. Изменение массы тела мышей измеряли два раза в неделю, и кровь собирали из хвостовой части мышей db/db (каждые сутки в недели 1 и 4, и два раза в неделю в недели 2 и 3), и изменение уровня глюкозы в крови анализировали, используя набор HITACHI 7020.

На фиг. 3 показано изменение массы тела, и на фиг. 4 показана AUC (площадь под кривой) глюкозы в крови. Полученные результаты статистически обрабатывали и вычисляли средние значения и стандартные отклонения средних значений. При проверке достоверности между группами (n равно 6) данные статистически обрабатывали, используя критерий Даннета однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, и значение p менее 0,05 считали статистически достоверным.

В частности, результаты измерения изменений массы тела продемонстрировали, что масса тела мышей db/db контрольной группы непрерывно возрастала со дня начала введения, тогда как при введении мышам конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгата SEQ ID NO: 23-Fc или конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) масса тела по существу не изменялась по сравнению с массой тела,

измеренной в сутки начала эксперимента, что позволяет предположить, что конъюгат проявляет значимый эффект ингибирования возрастания массы тела (фиг. 3).

Результаты измерений уровня глюкозы в крови показали, что при введении мышам конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгата SEQ ID NO: 23-Fc или конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) уровень глюкозы в крови значительно снижался по сравнению с контрольной группой. В частности, введение 6 нмоль/кг конъюгата аналога оксинтомодулина длительного действия (конъюгата SEQ ID NO: 25-Fc) показало эффект снижения глюкозы в крови по сравнению с имеющимся в продаже лекарственным средством Виктоза® для лечения диабета (фиг. 4).

На основании результатов примера 7 было обнаружено, что конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению, содержащий аналог оксинтомодулина, ковалентно связанный с участком Fc иммуноглобулина посредством ПЭГ, достоверно снижал уровень глюкозы в крови (индекс диабета) у мышей db/db с диабетом, индуцированным мутацией в рецепторе лептина, по сравнению с носителем и с Виктоза®, применяемым в качестве лекарственного средства для лечения диабета, что позволяет предположить, что конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению можно с высокой эффективностью применять для лечения диабета. Кроме того, конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению продемонстрировал значимый эффект ингибирования увеличения массы тела, что позволяет предположить, что он может уменьшить сердечнососудистые осложнения диабета.

На основании результатов примеров 6 и 7 видно, что конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению продемонстрировал превосходный эффект снижения глюкозы в крови, равный или лучший по сравнению с Виктоза®, обладающим, как известно, эффектом снижения глюкозы, а также превосходным эффектом снижения массы тела, что позволяет предположить, что конъюгат аналога оксинтомодулина длительного действия по настоящему изобретению можно эффективно применять в качестве агента для лечения диабета, диатирения и осложнений диабета благодаря его эффекту снижения уровня глюкозы в крови.

Обычному специалисту в данной области техники понятно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его сущности или существенных характеристик. Описанные воплощения следует рассматривать во всех отношениях только как иллюстративные и неограничивающие. Объем настоящего изобретения, таким образом, показан прилагаемой формулой изобретения, а не приведенным выше описанием. Все изменения, произведенные в пределах значения и серии эквивалентов формулы изобретения, следует включать в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для предупреждения или лечения диабета, диатирения или осложнений диабета, содержащая конъюгат аналога оксинтомодулина в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый носитель, где конъюгат аналога оксинтомодулина содержит

аналог оксинтомодулина, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4-5, 23, 27-28, 32-34;

участок Fc иммуноглобулина и
непептидный полимер,

где непептидный полимер ковалентно связывает аналог оксинтомодулина и участок Fc иммуноглобулина и где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля или поливиниловый спирт.

2. Композиция по п.1, где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

3. Композиция по любому из пп.1, 2, где аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 или 24 и 28 аналога оксинтомодулина образуют кольцо.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где один конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой участка Fc иммуноглобулина, а другой конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой аналога оксинтомодулина.

5. Композиция по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая фармацевтический агент, проявляющий превентивные или терапевтические эффекты против диабета, диатирения или осложнений диабета.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где диабет представляет собой инсулинозависимый диабет типа 1 или инсулинонезависимый диабет типа 2.

7. Способ лечения диабета, диатирения или осложнений диабета, включающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества конъюгата аналога оксинтомодулина, где конъюгат аналога оксинтомодулина содержит

аналог оксинтомодулина, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4-5, 23, 27-28, 32-34;

участок Fc иммуноглобулина и
непептидный полимер,

где непептидный полимер ковалентно связывает аналог окситоцидина и участок Fc иммуноглобулина и где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля или поливиниловый спирт.

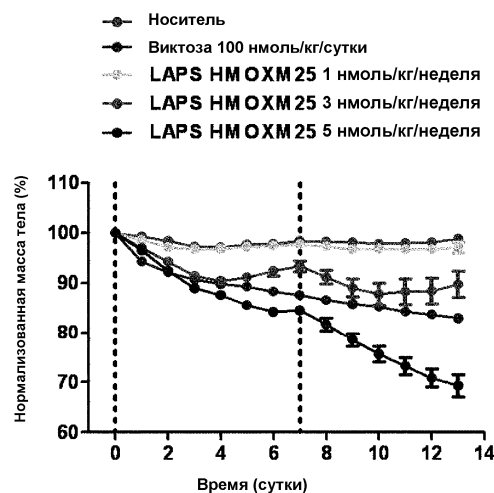
8. Способ по п.7, где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

9. Способ по любому из пп.7, 8, где аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 или 24 и 28 аналога окситоцидина образуют кольцо.

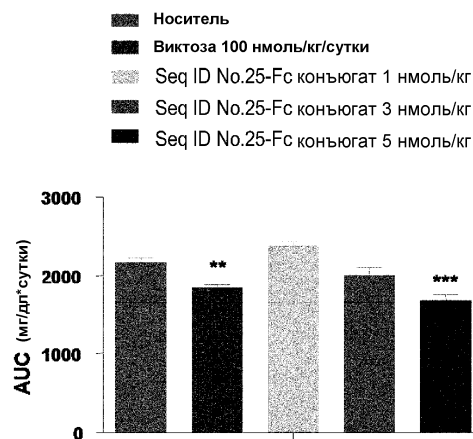
10. Способ по любому из пп.7-9, где один конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой участка Fc иммуноглобулина, а другой конец непептидного полимера связан с аминной группой или тиольной группой аналога окситоцидина.

11. Способ по любому из пп.7-10, дополнительно включающий введение фармацевтического агента, проявляющего превентивные или терапевтические эффекты против диабета, диатриения или осложнений диабета.

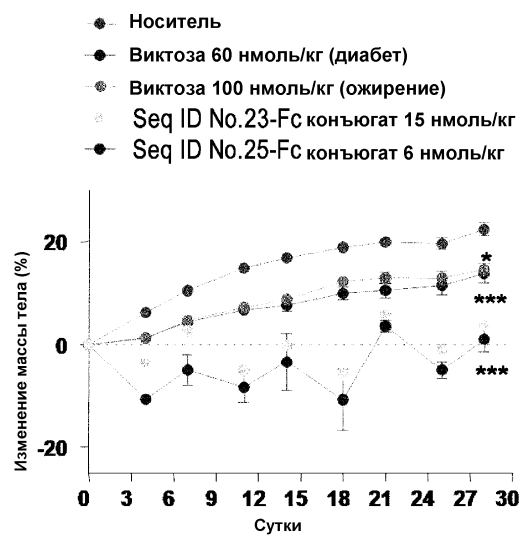
12. Способ по любому из пп.7-11, где диабет представляет собой инсулинозависимый диабет типа 1 или инсулинонезависимый диабет типа 2.



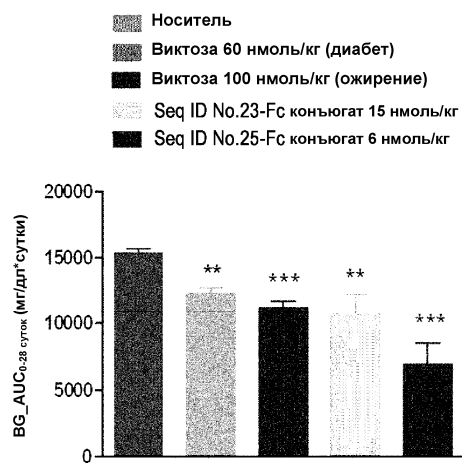
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

