

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038431**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.27</p> <p>(21) Номер заявки
201692159</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2015.05.29</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 38/28</i> (2006.01)
<i>A61K 38/26</i> (2006.01)
<i>A61K 47/48</i> (2006.01)
<i>A61K 47/30</i> (2006.01)</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТА, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЬЮГАТ НА ОСНОВЕ АНАЛОГА ИНСУЛИНА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ И КОНЬЮГАТ НА ОСНОВЕ АНАЛОГА ИНСУЛИНОТРОПНОГО ПЕПТИДА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(31) 10-2014-0065072</p> <p>(32) 2014.05.29</p> <p>(33) KR</p> <p>(43) 2017.06.30</p> <p>(86) PCT/KR2015/005424</p> <p>(87) WO 2015/183038 2015.12.03</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)</p> <p>(72) Изобретатель:
Ким Джун Гук, Ким Дае Джин, Хо Ён Хо, Чой Инь Ян, Джун Сун Юб, Квон Се Чан (KR)</p> <p>(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев А.В. (RU)</p> | <p>(56) KR-A-1020120135123
KR-A-1020110084956
JP-A-2012229214
KR-A-1020110092253
KR-A-1020110137819</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

- (57) Настоящее изобретение относится к композиции для предупреждения или лечения сахарного диабета, включающей конъюгат на основе инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, и к способу лечения сахарного диабета. Более конкретно, введение в комбинации конъюгата на основе аналога длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия подавляет увеличение веса, обусловленное введением инсулина, рвоту и тошноту, обусловленные введением инсулинотропного пептида, а также снижает требуемые дозы инсулина, улучшая тем самым в значительной степени комплаентность лекарственного средства. Кроме того, настоящее изобретение относится к введению фармацевтической композиции для уменьшения побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы у пациентов с сахарным диабетом, включающей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе аналога инсулинотропного пептида длительного действия, и к способу уменьшения побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы у пациентов с сахарным диабетом, включающему стадию введения композиции. В частности, настоящее изобретение характеризуется уменьшением побочных эффектов, таких как нарушение функции бета-клеток поджелудочной железы, ассоциированных с развитием сахарного диабета, снижение массы бета-клеток поджелудочной железы, липотоксичность или глюкотоксичность.

038431
B1

038431
B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к композиции для предупреждения или лечения диабета, включающей конъюгат на основе инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, и к способу лечения диабета, включающему стадию введения композиции.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для уменьшения побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы у пациентов с сахарным диабетом, включающей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, и к способу уменьшения побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы у пациентов с сахарным диабетом, включающему стадию введения композиции. В частности, настоящее изобретение характеризуется уменьшением побочных эффектов, таких как нарушение функции бета-клеток поджелудочной железы, ассоциированных с развитием диабета, снижение количества бета-клеток поджелудочной железы и липотоксичность или глюкотоксичность.

Предпосылки создания изобретения

Инсулин представляет собой пептид, секретируемый бета-клетками поджелудочной железы, и он играет важную роль в регуляции уровня глюкозы в крови в организме. Диабетом называется заболевание обмена веществ, связанное с повышенным уровнем глюкозы в крови вследствие недостаточности секреции инсулина или нарушения функции инсулина. Если повышенный уровень глюкозы в крови возникает из-за недостаточности секреции инсулина поджелудочной железой, то это состояние называют диабетом 1 типа, а если повышенный уровень глюкозы в крови возникает из-за нарушения секреции инсулина или нарушения функции секретируемого инсулина в организме, то это состояние называют диабетом 2 типа. Пациентов с диабетом 2 типа, как правило, лечат с помощью пероральных гипогликемических средств, в которых химические вещества являются основным ингредиентом, а в ряде случаев им вводят инсулин, тогда как пациенты с диабетом 1 типа главным образом нуждаются в лечении инсулином.

Наиболее типичной существующей инсулинотерапией является инъекция инсулина до и/или после приема пищи. В настоящее время инъекционная форма инсулина доступна на рынке, и обычно ее вводят посредством подкожной инъекции. Способ введения варьирует в зависимости от продолжительности действия инсулина. Инъекция инсулина демонстрирует более быстрое наступление гипогликемического эффекта, чем пероральное введение, и ее можно с уверенностью использовать, если пероральное введение является невозможным. Также в случае применения инсулина не существует предела дозы. Однако применение инсулина три раза в день на протяжении длительного периода может являться причиной неблагоприятных состояний, таких как проявление неприязни к иглам, трудности в обращении с инъектором, гипогликемия и увеличение веса тела вследствие длительного применения инсулина.

Увеличение веса тела может увеличивать риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и возникновения побочного эффекта в виде инсулинорезистентности. Между тем, было предпринято множество усилий для максимального повышения эффективности путем поддержания длительности действия, повышенных уровней лекарственных средств на основе инсулинового пептида после абсорбции в организме. Например, для реализации на рынке были разработаны составы инсулина длительного действия, такие как Lantus (инсулин гларгин; Sanofi Aventis) и Levemir (инсулин детемир; Novo Nordisk). В отличие от инсулина NPH (нейтральный протамин Хагедорна), эти лекарственные средства длительного действия уменьшают риск возникновения гипогликемии в период сна, и, в частности, Levemir ассоциировался с несколько меньшим увеличением веса тела. Однако данные лекарственные формы также имеют недостаток, заключающийся в том, что их необходимо вводить раз или два раза в день.

Между тем, один инсулинотропный пептид, глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1), представляет собой гормон класса инкретинов, секретируемый L-клетками подвздошной и толстой кишки. Функция глюкагон-подобного пептида-1 проявляется в увеличении выброса инсулина и индуцировании глюкозо-зависимой секреции, что, таким образом, предупреждает приступы гипогликемии. Благодаря этому свойству он привлек внимание в качестве перспективного вида лечения диабета 2 типа. Однако главным препятствием для использования GLP-1 в качестве терапевтического средства является его исключительно короткий период полужизни в крови, составляющий менее 2 мин. В настоящее время эксендин-4 коммерчески доступен в качестве агониста рецептора глюкагон-подобного пептида-1, и он представляет собой аналог глюкагон-подобного пептида-1, выделенный из слюнной железы ядозуба. Эксендин-4 характеризуется устойчивостью к DPP IV (дипептидил-пептидазе-4) и более высокой физиологической активностью, чем глюкагон-подобный пептид-1. Таким образом, он имеет период полужизни *in vivo* от 2 до 4 ч, что больше, чем у глюкагон-подобного пептида-1 (патент США № 5424286). Однако при использовании способа повышения устойчивости только к DPP IV нельзя ожидать поддержания достаточной физиологической активности, и, например, в случае доступного на рынке эксендина-4 (эксенадина) по-прежнему остается проблема, заключающаяся в том, что его необходимо вводить пациенту дважды в день и что введение вызывает побочные эффекты, такие как рвота и тошнота, которые значительно обременяют пациента.

Такие заболевания, связанные с диабетом, хотя и в разное время, обычно инициируют снижение массы бета-клеток поджелудочной железы вследствие потери функции и апоптоза бета-клеток поджелу-

дочной железы.

Когда в течение длительного времени в крови повышаются уровни глюкозы, бета-клетки поджелудочной железы увеличивают секрецию инсулина путем повышения их функции и увеличения массы бета-клеток для поддержания уровней глюкозы в крови *in-vivo*, но такая активность с увеличением секреции имеет предел. То есть, если количество инсулина, требующееся для поддержания уровней глюкозы в крови *in-vivo*, в норме больше количества инсулина, которое способны продуцировать бета-клетки поджелудочной железы, то вследствие этого уровни глюкозы в крови в конечном итоге повышаются, и тогда серьезно прогрессирует диабет 2 типа.

Клинически диабет 2 типа прогрессирует в порядке возникновения инсулинорезистентности, снижения секреции инсулина и нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы, а также снижения массы бета-клеток поджелудочной железы. В частности, нарушению функции бета-клеток и снижению массы бета-клеток поджелудочной железы способствует повышенный уровень липидов и глюкозы в крови. Концентрация этих липидов в крови и глюкозы будет индуцировать липотоксичность и/или глюкозотоксичность, и, таким образом, ослаблять как функцию бета-клеток, так и действия инсулина, и в конечном итоге будет ухудшать прогноз по диабету 2 типа. Соответственно подавление липотоксичности и глюкозотоксичности может в значительной степени ограничивать прогрессирование диабета 2 типа посредством сохранения функции бета-клеток и их массы, а также посредством уменьшения инсулинорезистентности.

Инсулин представляет собой пептид, секретируемый бета-клетками поджелудочной железы, и он играет роль в регуляции уровня глюкозы в крови в организме. Соответственно нарушение функции инсулина и снижение массы бета-клеток тесно связаны с повышением уровней глюкозы в крови вследствие уменьшения количества инсулина в организме. Таким образом, пациента с диабетом с пониженной секрецией инсулина можно подвергнуть лечению с использованием экзогенного инсулина. В соответствии с предыдущими исследованиями известно, что введение экзогенного инсулина не только демонстрирует превосходные эффекты в отношении коррекции уровней глюкозы в крови, но также подавляет возникновение стресса вследствие избыточной секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы.

Однако введение экзогенного инсулина имеет существенный недостаток, проявляющийся в индуцировании увеличения веса тела, а такое увеличение веса тела подразумевает повышение уровней липидов в крови. Соответственно это может ухудшить прогноз диабета.

Известно, что агонист рецептора глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1), который является разновидностью инсулинотропного пептида, включающего эксендин-4, характеризуется эффектами регуляции уровней глюкозы в крови и снижением веса тела у пациентов с диабетом 2 типа. Кроме того, агонист рецептора GLP-1 может увеличивать массу бета-клеток путем регуляции восстановления, пролиферации и дифференциации бета-клеток, а также апоптоза бета-клеток.

В действительности на модели грызунов с индуцированным диабетом 2 типа было подтверждено, что введение GLP-1 или эксендина-4 стимулирует рост и дифференциацию бета-клеток, увеличивая тем самым массу бета-клеток. Однако агонист рецептора GLP-1 в течение длительного времени стимулирует секрецию инсулина в бета-клетках поджелудочной железы, что таким образом подразумевает возможность ухудшения нарушенной функции вследствие повышения стресса бета-клеток.

Для решения описанных выше проблем авторы настоящего изобретения предлагают конъюгат на основе белка длительного действия, в котором физиологически активный полипептид соединен с Fc-участком иммуноглобулина посредством непептидильного полимера в качестве линкера с помощью ковалентной связи, поддерживая тем самым активность и одновременно улучшая стабильность лекарственного средства на основе белка (патент Южной Кореи № 10-0725315). В частности, они установили, что каждый из конъюгата на основе инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия проявляет значительно повышенную эффективность *in vivo* (патенты Южной Кореи №№ 10-1058209 и 10-1330868).

Однако по-прежнему существуют проблемы, связанные с увеличением веса тела или рвотой и тошнотой, если инсулин или эксендин-4 вводят в количестве, которое поддерживает устойчивый уровень глюкозы в крови. Таким образом, существует острая необходимость в разработке терапевтического способа, демонстрирующего превосходные терапевтические эффекты в отношении диабета при пониженных дозах и меньшей частоте использования лекарственного средства. Кроме того, данные исследования были направлены на увеличение *in-vivo* периода полужизни физиологически активного пептида, а исследования способа, который способен обращать потерю функции бета-клеток поджелудочной железы и/или уменьшение массы бета-клеток поджелудочной железы вследствие апоптоза бета-клеток поджелудочной железы, которые представляют собой побочный эффект, являющийся причиной неблагоприятного прогноза диабета у пациентов, не завершены.

Раскрытие

Техническая проблема

Авторы настоящего изобретения провели множество исследований и экспериментов для разработки средства для терапии диабета, которое характеризовалось бы длительной терапевтической эффективностью и одновременно уменьшало побочные эффекты, такие как рвота и тошнота, и средства для терапии

диабета, которое может сохранять и повышать функцию бета-клеток поджелудочной железы и массу клеток, а также обеспечивать защиту от возможного стресса бета-клеток. Они осуществили попытку введения в комбинации конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия и конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия, которые одновременно стимулируют рецептор глюкагон-подобного пептида-1 и инсулиновый рецептор. В результате они установили, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия увеличивает продолжительность эффекта и стабильность и существенно снижает дозы данных двух лекарственных средств, приводящих к устойчивому уровню глюкозы в крови. Они также установили, что это введение уменьшает побочные эффекты, такие как рвота и тошнота, индуцированные агонистом глюкагон-подобного пептида-1 и эксендином-4 или их производными, и применение конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия снижает увеличение веса тела, вызываемое применением инсулина. Кроме того, они установили, что оно может в значительной степени уменьшать липотоксичность и глюкотоксичность, являющиеся основной причиной пониженной функции и массы бета-клеток, а также могут уменьшать прогрессирование диабета. Настоящее изобретение было создано исходя из этих данных.

Техническое решение

Целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для предупреждения или лечения диабета, включающей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа предупреждения или лечения диабета, включающего введение композиции субъекту с диабетом или с риском возникновения диабета.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности, нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и уменьшения бета-клеток поджелудочной железы у пациентов с диабетом, включающей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности, нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и снижения массы бета-клеток, у субъекта с диабетом, включающего стадию введения композиции субъекту, страдающему диабетом, или с риском возникновения диабета.

Полезные эффекты

Конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе эксендина-4 длительного действия по настоящему изобретению демонстрируют превосходные терапевтические эффекты в отношении диабета, и в частности введение их в комбинации одновременно стимулирует инсулиновые рецепторы и рецепторы глюкагон-подобного пептида-1 с улучшением *in vivo* продолжительности ее эффекта и стабильности, и существенным снижением требующихся доз лекарственных средств, и устойчиво поддерживает уровень глюкозы в крови на постоянном уровне, что приводит к уменьшению гипогликемии и увеличению веса тела. Кроме того, эта комбинация подавляет рвоту и тошноту и характеризуется улучшенной комплаентностью лекарственного средства в качестве средства для терапии диабета. В частности, комбинация характеризуется значительно улучшенной стабильностью в крови и *in vivo* продолжительностью эффекта, что обеспечивает возможность снижения частоты введения и обеспечивает удобство для пациента.

Кроме того, конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия в соответствии с настоящим изобретением проявляют превосходную эффективность в лечении диабета, особенно при введении в комбинации, и одновременно стимулируют инсулиновые рецепторы и рецепторы глюкагон-подобного пептида-1, повышая, таким образом, *in-vivo* продолжительность и стабильность, и дополнительно улучшают функцию бета-клеток, а также повышают их массу посредством уменьшения липотоксичности и глюкотоксичности, представляющие собой побочные эффекты, являющиеся причиной прогрессирования диабета. Кроме того, настоящее изобретение может обеспечивать композицию, в которой недостатки препарата на основе инсулина были уменьшены за счет уменьшения низких уровней глюкозы в крови и увеличения веса тела.

Описание графических материалов

На фиг. 1 представлен график, показывающий уровни гликозилированного гемоглобина (HbA1c), которые измеряли для оценки контроля уровней глюкозы в крови, осуществляемого путем введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия мышам db/db (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 путем множественного сравнения согласно тесту Даннета против среды-носителя) († P<0,05, †† P<0,01, ††† P<0,001 путем множественного сравнения согласно тесту Даннета против однократного введения конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия).

На фиг. 2 представлен график, показывающий изменения веса тела (BW) после введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия мышам db/db (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 путем множественного сравнения согласно тесту Даннета) († P<0,05, †† P<0,01, ††† P<0,001 путем множественного сравнения согласно тесту Даннета против однократного введения аналога инсулина длительного действия).

На фиг. 3 представлен график, на котором в числовом выражении показан эффект в отношении увеличения массы бета-клеток, оказываемый введением в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия (конъюгата на основе производного инсулина длительного действия) и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия мышам db/db (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 посредством однофакторного дисперсионного анализа против среды-носителя).

На фиг. 4 представлен график, на котором приведены показатели триглицеридов в сыворотке крови на 12-й неделе введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия мышам db/db (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 посредством однофакторного дисперсионного анализа против среды-носителя).

На фиг. 5 представлен график, показывающий уровни гликозилированного гемоглобина (HbA1c), которые измеряли для оценки контроля уровней глюкозы в крови, осуществляемого введением в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата эксендина-4 длительного действия мышам db/db.

Лучший вариант

Согласно одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения диабета, включающую конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулиноподобного пептида длительного действия, которые имеют одинаковый период полужизни *in vivo*. Композиция по настоящему изобретению характеризуется введением в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулиноподобного пептида длительного действия.

Более подробно, данная композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения диабета, включающую конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия, в котором аналог инсулина соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность его активности, посредством линкера или ковалентной связи; и конъюгат на основе инсулиноподобного пептида длительного действия, в котором инсулиноподобный пептид соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность его активности, посредством линкера или ковалентной связи.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности, нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и уменьшения массы бета-клеток поджелудочной железы у пациентов с диабетом, содержащую конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулиноподобного пептида длительного действия, которые имеют одинаковый период полужизни *in vivo*. Композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулиноподобного пептида длительного действия вводят в комбинации.

Более конкретно, композиция по настоящему изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию для уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности, нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и снижения массы бета-клеток у пациентов с сахарным диабетом, содержащую

конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия, в котором аналог инсулина соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность действия аналога инсулина, посредством линкера или ковалентной связи,

конъюгат на основе инсулиноподобного пептида длительного действия, в котором инсулиноподобный пептид соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность действия инсулиноподобного пептида, посредством линкера или ковалентной связи.

Композиция по настоящему изобретению может одновременно снижать липотоксичность, глюкотоксичность, нарушение функций бета-клеток поджелудочной железы и снижать массу бета-клеток поджелудочной железы.

Поскольку инсулиноподобные пептиды, такие как аналог инсулина и глюкагон-подобный пептид-1, контролируют уровни глюкозы в крови посредством разных механизмов действия, проводили только те исследования их применения в качестве терапевтических средств для контроля уровней глюкозы в крови, которые основывались на данных, что их эффективность можно максимально увеличить при введении в комбинации. Однако не было исследований, которые подтверждали, что введение в комбинации улучшает функцию и массу бета-клеток посредством снижения и взаимодополняющего действия по от-

ношению к липотоксичности и глюкотоксичности, снижая тем самым побочные эффекты по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, которые могут возникать при отдельном введении инсулина или инсулинотропного пептида. Новое применение, описанное выше, было впервые раскрыто авторами настоящего изобретения.

Композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что она может не только снижать побочные эффекты по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, но также уменьшать концентрацию триглицеридов в крови, уменьшая тем самым токсичность липидов, контролировать функцию глюкозы в крови, уменьшая тем самым глюкотоксичность, и поддерживать и/или увеличивать массу бета-клеток поджелудочной железы, подавляя тем самым прогрессирование диабета. Соответственно композиция по настоящему изобретению может уменьшать прогрессирование диабета.

Описанная выше композиция характеризуется тем, что она улучшает прогноз диабета у субъекта с диабетом, которому ее вводили.

В данной композиции молярное соотношение конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия: конъюгата на основе аналога инсулина может быть в диапазоне 1:0,01~1:50. Примером конъюгата на основе инсулинотропного пептида может быть конъюгат на основе эксендина, но не ограничиваться им.

Вариант согласно настоящему изобретению

Используемое в данном документе выражение "конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия" или "конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия" означает конъюгат, в котором аналог инсулина или инсулинотропный пептид соединен с биологически совместимым материалом или носителем посредством ковалентной связи или нековалентной связи, и образование конъюгата пролонгирует продолжительность активности соответствующего аналога инсулина или инсулинотропного пептида по сравнению с неконъюгированным аналогом или инсулинотропным пептидом.

Введение конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия снижает требуемые дозы лекарственных средств, а также уменьшает побочные эффекты, такие как увеличение веса тела, рвота и тошнота, по сравнению с нативным инсулином.

Согласно настоящему изобретению средство, способное повышать период полужизни и биологическую доступность аналога инсулина и инсулинотропного пептида или поддерживать их активность, может представлять собой носитель, который непосредственно связан с аналогом инсулина и инсулинотропным пептидом посредством ковалентной связи, или оно относится к средству, способному повышать *in vivo* активность аналога инсулина даже без прямого образования ковалентной связи.

Используемый в данном документе термин "биологически совместимый материал или носитель", представляет собой материал, способный пролонгировать продолжительность активности аналога инсулина или инсулинотропного пептида, если он соединен с соответствующим аналогом или пептидом посредством ковалентной или нековалентной связи с образованием конъюгата. Например, материал, способный пролонгировать *in vivo* период полужизни соответствующего аналога или пептида путем образования конъюгата, может представлять собой биологически совместимый материал или носитель в соответствии с настоящим изобретением. Биологически совместимый материал, способный связываться с аналогом инсулина и инсулинотропного пептида, можно проиллюстрировать разными биологически совместимыми материалами, включающими полиэтиленгликоль, жирную кислоту, холестерин, альбумин и его фрагмент, материалы, связывающие альбумин, полимер с повторяющимися звеньями определенной аминокислотной последовательности, антитело, фрагменты антител, FcRn-связывающий материал, соединительные ткани, нуклеотиды, фибронектин, трансферрин, сахараиды или полимеры, которые образуют ковалентную или нековалентную связь для пролонгирования *in vivo* периода полужизни. Кроме того, связь между аналогом инсулина или инсулинотропным пептидом и биологически совместимым материалом, способным к пролонгированию *in vivo* периода полужизни, включает генетическую рекомбинацию и *in vitro* конъюгацию с использованием высоко- или низкомолекулярного соединения, но не ограничена каким-либо способом связывания.

FcRn-связывающим материалом может быть Fc-участок иммуноглобулина.

Используемое в данном документе выражение "аналог инсулина (или аналог)" означает пептид, содержащий вариант из одной или нескольких аминокислот нативной последовательности.

Аналог инсулина может представлять собой аналог инсулина, который содержит вариант аминокислоты в В-цепи или А-цепи инсулин, и по сравнению с нативным инсулином характеризуется пониженной концентрацией инсулина и/или пониженной аффинностью связывания с рецепторами инсулина. Аминокислотная последовательность нативного инсулина представляет собой следующее.

А-цепь:

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

Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 37)

В-цепь:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-
Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr

(SEQ ID NO: 38).

Используемый в примерах по настоящему изобретению инсулин может представлять собой аналог инсулина, полученный посредством технологии на основе генетической рекомбинации, но настоящее изобретение им не ограничивается. Данный инсулин включает все виды инсулина, обладающие пониженным титром *in-vitro* и/или пониженной аффинностью связывания с рецепторами инсулина. Предпочтительно инсулин включает инвертированные виды инсулина, варианты инсулина, фрагменты инсулина и т.д., при этом его можно получить с помощью твердофазного способа, а также способа генетической рекомбинации, но не ограничиваясь ими.

Аналог инсулина представляет собой пептид, который сохраняет функцию контроля уровня глюкозы в крови в организме, которая соответствует такой активности инсулина, при этом такой пептид включает агонисты, производные, фрагменты, варианты инсулина и т.д.

Агонист инсулина по настоящему изобретению относится к соединению, которое связывается с рецептором инсулина для проявления биологической активности, соответствующей такой активности у инсулина, но которая не соответствует структуре инсулина.

Аналог инсулина по настоящему изобретению означает пептид, характеризующийся гомологией по соответствующим аминокислотным последовательностям с А-цепью и В-цепью нативного инсулина, который может иметь по меньшей мере один аминокислотный остаток, измененный посредством альтерации, выбранной из группы, состоящей из замены (например, альфа-метиляции, альфа-гидроксилирования), делеции (например, дезаминирования), модификации (например, N-метиляции) и их комбинаций, и характеризующийся функцией регуляции уровня глюкозы в крови в организме.

Согласно настоящему изобретению аналог инсулина означает пептид-имитатор или низко- или высокомолекулярное соединение, которое связывается с инсулиновым рецептором для регуляции уровня глюкозы в крови, даже если его аминокислотная последовательность не имеет гомологии с такой последовательностью нативного инсулина.

Фрагмент инсулина по настоящему изобретению означает фрагмент, имеющий одну или несколько аминокислот, добавленных к инсулину или делегированных в инсулине, при этом добавленные аминокислоты могут представлять собой не встречающиеся в природе аминокислоты (например, аминокислота D-типа), и данный фрагмент инсулина обладает функцией регулирования уровня глюкозы в крови в организме.

Вариант инсулина по настоящему изобретению представляет собой пептид, имеющий одну или несколько аминокислотных последовательностей, отличающихся от таких последовательностей инсулина, и он означает пептид, который сохраняет функцию регулирования уровня глюкозы в крови в организме.

Каждый из способов получения агонистов, производных, фрагментов и вариантов инсулина по настоящему изобретению можно использовать отдельно или в комбинации. Например, настоящее изобретение включает пептид, который имеет одну или несколько разных аминокислот и дезаминирование по N-концевому аминокислотному остатку, а также характеризуется функцией регулирования уровня глюкозы в крови в организме.

Более конкретно, аналог инсулина может характеризоваться заменой одной или нескольких аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислот в положениях 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 16, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 В-цепи и в положениях 1, 2, 5, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19 и 21 А-цепи, другими аминокислотами, в частности аланином, глутаминовой кислотой, аспарагином, изолейцином, валином, глутамином, глицином, лизином, гистидином, цистеином, фенилаланином, триптофаном, пролином, серином, треонином, аспарагиновой кислотой. Кроме того, аналог инсулина, характеризующийся делецией одной или нескольких аминокислот, может также охватываться объемом настоящего изобретения, но без ограничения по аналогу инсулина.

Аналог инсулина может представлять собой аналог инсулина, характеризующийся повышенным периодом полужизни, чем нативный инсулин, когда его связывают с биологически совместимым материалом или носителем. Аналог инсулина может представлять собой аналоги инсулина, раскрытые в патентах Южной Кореи №№ 2014-0022909 и 2014-0006938, но не ограничен ими.

Используемое в данном документе выражение "конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия", означает инсулинотропный пептид, соединенный с Fc-участком иммуноглобулина посредством непептидильного линкера.

Используемый в данном документе термин "инсулинотропный пептид", означает пептид, который сохраняет функцию по высвобождению инсулина и стимулирует синтез или экспрессию инсулина в бета-клетках поджелудочной железы. Более конкретно, инсулинотропный пептид представляет собой GLP (глюкагон-подобный пептид)-1, эксендин-3 или эксендин-4, но не ограничен ими. Инсулинотропный

пептид включает нативные инсулинотропные пептиды, их предшественники, их агонисты, их производные, их фрагменты и их варианты.

Производное инсулинотропного пептида по настоящему изобретению может включать производное дезамино-гистидила, где N-концевая аминокетильная группа инсулинотропного пептида делетирована, бета-гидроксимидазопропил-производное, где аминокетильная группа заменена гидроксильной группой, производное диметил-гистидила, где аминокетильная группа модифицирована двумя метильными группами, бета-карбоксимидазопропионил-производное, где N-концевая аминокетильная группа заменена карбоксильной группой, или имидзаоацетил-производное, где альфа-атом углерода N-концевого гистидинового остатка делетирован для сохранения только имидзаоацетильной группы и удаления, таким образом, позитивного заряда группы и т.д. Другие производные с мутацией в N-концевой аминокетильной группе включены в объем настоящего изобретения.

Согласно настоящему изобретению производное инсулинотропного пептида может представлять собой производное эксендина-4, характеризующегося N-концевой аминокетильной группой или аминокетильным остатком, в которых мутацию индуцировали химическим путем, еще более конкретно производное эксендина-4, которое получено путем удаления или замены альфа-аминокетильной группы, присутствующей на альфа-атоме углерода N-концевого остатка His1 эксендина-4, или путем удаления или замены альфа-атома углерода. Еще более конкретно дезамино-гистидил-эксендин-4 (DA-эксендин-4) с удаленной N-концевой аминокетильной группой, бета-гидроксимидазопропил-эксендин-4 (HY-эксендин-4), полученный путем замены гидроксильной группой, бета-карбоксимидазопропил-эксендин-4 (CX-эксендин-4), полученный путем замены карбоксильной группой, диметил-гистидил-эксендин-4 (DM-эксендин-4), полученный путем модификации двумя метильными остатками, или имидзаоацетил-эксендин-4 (CA-эксендин-4) с удаленным альфа-атомом в N-концевом гистидиновом остатке, но не ограничивается ими.

GLP-1 представляет собой гормон, секретируемый в тонком кишечнике, и он, как правило, стимулирует биосинтез и секрецию инсулина, подавляя секрецию глюкагона, и стимулирует захват глюкозы клетками. В тонком отделе кишечника предшественник глюкагона расщепляется на три пептида, а именно глюкагон, GLP-1 и GLP-2. В данном случае GLP-1 означает GLP-1 (1-37), который в исходной форме не обладает инсулинотропной функцией, но затем процессируется и превращается в активные формы GLP-1 (7-37). Аминокетильная последовательность GLP-1 (7-37) является следующей.

GLP-1 (7-37):

HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFLAW LVKGR G (SEQ ID NO: 39).

Производное GLP-1, означающее пептид, который проявляет по меньшей мере 80% гомологию аминокетильной последовательности с аминокетильной последовательностью GLP-1, может быть в химически модифицированной форме и проявлять инсулинотропную функцию, которая, по меньшей мере, эквивалентна такой функции GLP-1 или превышает ее.

Фрагмент GLP-1 относится к форме фрагмента, в которой одна или несколько аминокетильных добавлены или делетированы на N-конце или C-конце нативного GLP-1, в котором добавленная аминокетильная предположительно представляет собой не встречающуюся в природе аминокетильную (например, аминокетильную D-типа).

Вариант GLP-1 относится к пептиду, обладающему инсулинотропной функцией, который характеризуется одной или несколькими аминокетильными последовательностями, отличающимися от таких последовательностей нативного GLP-1.

Эксендин-3 и эксендин-4 являются инсулинотропными пептидами, состоящими из 39 аминокетильных, которые характеризуются 53% гомологией аминокетильной последовательности с GLP-1.

Аминокетильные последовательности эксендина-3 и эксендина-4 представляют собой следующее.

Эксендин-3:

HSDGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (SEQ ID NO:

40);

Эксендин-4:

HGEGT FTSDL SKQME EEAVR LFIEW LKNGG PSSGA PPPS (SEQ ID NO:

41);

Агонист эксендина относится к соединению, связывающему рецепторы эксендина *in vivo* и характеризующемуся биологической активностью, которая эквивалентна активности эксендина, которая не связана со структурой эксендина, при этом производное эксендина относится к пептиду, характеризующемуся по меньшей мере 80% гомологией аминокетильной последовательности с нативным эксендином, который может иметь несколько групп в аминокетильном остатке, которые химически заменены (например, альфа-метилирование, альфа-гидроксилирование), делетированы (например, дезаминирование) или модифицированы (например, N-метилирование), и характеризуется инсулинотропной функцией.

Фрагмент эксендин относится к фрагменту, имеющему одну или несколько аминокетильных, добав-

ленных или делетированных на N-конце или C-конце нативного эксендина, в который могут быть добавлены не встречающиеся в природе аминокислоты (например, аминокислота D-типа) и который характеризуется инсулинотропной функцией.

Вариант эксендина относится к пептиду, имеющему по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, отличающуюся от такой последовательности нативного эксендина, который характеризуется инсулинотропной функцией, при этом вариант эксендина включает пептиды, в которых лизин в положении 12 эксендина-4 заменен серином или аргинином.

Каждый из способов получения агонистов, производных, фрагментов и вариантов эксендина по настоящему изобретению можно использовать отдельно или в комбинации. Например, настоящее изобретение включает инсулинотропный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере одной отличающейся аминокислотой и характеризующуюся аминокислотным остатком, дезаминированным на N-конце.

Согласно иллюстративному варианту осуществления нативный инсулинотропный пептид и модифицированный инсулинотропный пептид, используемые в настоящем изобретении, можно синтезировать с использованием способа твердофазного синтеза, и большинство нативных пептидов, в том числе нативный инсулинотропный пептид, можно получить с помощью технологии на основе рекомбинации.

Конъюгат на основе аналога инсулина и конъюгат на основе инсулинотропного пептида можно представить следующей формулой:



где X представляет собой аналог инсулина или инсулинотропный пептид, при этом аналог инсулина получен посредством модификации одной или нескольких аминокислот B-цепи или A-цепи инсулина, L представляет собой линкер, а представляет собой 0 или натуральное число (если a равняется 2 или выше, каждый L является независимым), F выбран из полиэтиленгликоля, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, в частности из аминокислотной последовательности, антитела или его фрагмента, FcRn-связывающего материала, фибронектина, сахара и т.д.

Fc-участок иммуноглобулина является безопасным для использования в качестве носителя лекарственного средства, поскольку он является биологически разлагаемым полипептидом, который метаболизируется в организме. Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина характеризуется относительно небольшой молекулярной массой по сравнению с целыми молекулами иммуноглобулинов и, таким образом, является предпочтительным для получения, очистки и выхода конъюгата. Fc-участок иммуноглобулина не содержит Fab-фрагмент, который является в значительной степени неоднородным вследствие разных аминокислотных последовательностей в соответствии с подклассами антител, и, таким образом, можно ожидать, что Fc-участок иммуноглобулина может значительно повышать однородность веществ и быть менее антигенным.

Используемое в данном документе выражение "Fc-участок иммуноглобулина" относится к белку, который содержит константный участок 2 тяжелой цепи (CH2) и константный участок 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина, за исключением переменных участков тяжелых и легких цепей, константного участка 1 тяжелой цепи (CH1) и константного участка 1 легкой цепи (CL1) иммуноглобулина. Он может дополнительно содержать шарнирный участок в константном участке тяжелой цепи. Также Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой удлиненный Fc-участок, содержащий часть или весь константный участок 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константный участок 1 легкой цепи (CL1), кроме переменных участков тяжелой и легкой цепей, при условии, что он характеризуется физиологической функцией, в значительной степени подобной такой функции у нативного иммуноглобулина, или лучшей, чем такая функция у нативного иммуноглобулина. Также Fc-участок иммуноглобулина может представлять собой участок с делецией в относительно длинной части аминокислотной последовательности CH2 и/или CH3.

Иными словами, Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать 1) CH1-домен, CH2-домен, CH3-домен и CH4-домен, 2) CH1-домен и CH2-домен, 3) CH1-домен и CH3-домен, 4) CH2-домен и CH3-домен, 5) комбинацию одного или нескольких доменов и шарнирный участок иммуноглобулина (или часть шарнирного участка) и 6) димер из каждого домена константных участков тяжелой цепи и константного участка легкой цепи.

Fc-участок иммуноглобулина по настоящему изобретению включает нативную аминокислотную последовательность и вариант этой последовательности (мутантный). Вариант аминокислотной последовательности представляет собой последовательность, которая отличается от нативной аминокислотной последовательности вследствие делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены или их комбинации одного или нескольких аминокислотных остатков. Например, в Fc IgG аминокислотные остатки, которые, как известно, играют важную роль в связывании, в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331 можно использовать в качестве подходящей мишени для модификации.

Также возможны иные различные варианты, включающие вариант, в котором делетирован участок, способный образовывать дисульфидную связь, или определенные аминокислотные остатки удалены на N-конце нативной формы Fc, или в него добавлен остаток метионина. Кроме того, для устранения эф-

факторных функций может иметь место делеция в сайте связывания с комплементом, таком как C1q-связывающий сайт и сайт ADCC (антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности). Методики получения таких производных последовательностей Fc-участка иммуноглобулина раскрыты в публикациях международных заявок WO 97/34631 и WO 96/32478.

В данной области техники известны аминокислотные замены в белках и пептидах, которые, как правило, не изменяют активность молекул (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются

Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn,
Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile,
Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly,

в обоих направлениях.

Кроме того, Fc-участок, если это необходимо, можно модифицировать фосфорилированием, сульфатированием, акрилизацией, гликозилизацией, метилированием, фарнезилизацией, ацетилированием, амидированием и т.д.

Вышеуказанные Fc-варианты являются вариантами, которые характеризуются биологической активностью, идентичной таковой активности у Fc-участка по настоящему изобретению, или улучшенной структурной стабильностью, например, по отношению к теплу, pH и т.д.

Кроме того, эти Fc-участки можно получать из нативных форм, выделенных из человека и других животных, в том числе из коров, овец, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, или они могут быть рекомбинантами или их производными, полученными из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. В данном документе их можно получать из нативного иммуноглобулина путем выделения целых иммуноглобулинов из организма человека и животных и их обработки протеолитическим ферментом. Папаин расщепляет нативный иммуноглобулин в Fab- и Fc-участках, а обработка пепсином приводит к получению pF'c и F(ab)₂. Эти фрагменты можно подвергать эксклюзионной хроматографии с выделением Fc или pF'c.

Fc-участок иммуноглобулина может представлять рекомбинантный Fc-участок иммуноглобулина, который представляет собой человеческий Fc-участок, полученный из микроорганизма.

Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина может быть в форме с наличием цепей нативных сахаров, увеличенных цепей сахаров по сравнению с нативной формой или уменьшенных цепей сахаров по сравнению с нативной формой, или может быть в дегликозилированной форме. Увеличения, уменьшения или удаления цепей сахаров Fc-участка иммуноглобулина можно достичь с помощью способов, общепринятых в данной области, таких как химический способ, ферментативный способ и способ генетической инженерии с использованием микроорганизма. В данном документе удаление цепей сахаров из Fc-участка приводит к резкому снижению аффинности связывания с комплементом (c1q) и снижению или потере антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, не индуцируя тем самым нежелательных иммунных ответов *in vivo*. В этом отношении Fc-участок иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной форме может быть более подходящим для цели настоящего изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

Используемый в данном документе термин "дегликозилирование" означает ферментативное удаление фрагментов сахаров из Fc-участка, а агликозилирование означает, что Fc-участок получают в негликозилированной форме с использованием прокариота, в частности *E. coli*.

Между тем, Fc-участок иммуноглобулина можно получать от людей или других животных, в том числе коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, но главным образом от человека. Кроме того, Fc-участок иммуноглобулина может представлять собой Fc-участок, который получают из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM или который образуется в результате их комбинаций или их гибридов. В частности, его получают из IgG или IgM, которые входят в число наиболее многочисленных белков крови человека, и более предпочтительно из IgG, который, как известно, продлевает периоды полужизни лиганд-связывающих белков.

С другой стороны, используемая в данном документе комбинация означает связь между полипептидом, кодирующим Fc-участок одноцепочечного иммуноглобулина такого же происхождения, и одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Иными словами, димер или мультимер можно получать из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из фрагментов Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD и Fc IgE.

Термин "гибрид", используемый в данном документе, означает присутствие последовательностей, кодирующих два или более фрагментов Fc-участков иммуноглобулинов разного происхождения, в Fc-участке одноцепочечного иммуноглобулина. Согласно настоящему изобретению возможны различные типы гибридов. Иными словами, гибриды доменов могут состоять из одного - четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE и Fc IgD, и могут включать шарнирный участок.

С другой стороны, IgG разделен на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и настоящее изобретение

включает их комбинации и гибриды. Можно использовать подклассы IgG2 и IgG4, а более конкретно можно использовать Fc-участок IgG4, который крайне редко обладает эффекторными функциями, такими как комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Иными словами, в качестве носителя лекарственного средства по настоящему изобретению может выступать негликозилированный Fc-участок, полученный из человеческого IgG4, который можно использовать в качестве Fc-участка иммуноглобулина. Fc-участок, полученный от человека, является более предпочтительным, чем Fc-участок другого происхождения, который может выступать в роли антигена в организме человека и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как образование нового антитела к антигену.

Согласно настоящему изобретению непептидный полимер означает биологически совместимый полимер, включающий две или более повторяющиеся единицы, связанные друг с другом любой ковалентной связью, кроме пептидной связи. Такой непептидный полимер может иметь два конца или три конца.

Непептидный полимер, применяемый в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из биологически разлагаемого полимера, такого как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахарид, декстран, поливинилэтиловый эфир, полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидный полимер, хитин, гиалуроновая кислота и их комбинация, и в частности полиэтиленгликоль. Кроме того, в объем настоящего изобретения можно включить известные в данной области техники их производные и производные, которые с легкостью получают с помощью известного в данной области способа.

Пептидный линкер, который используют в белке слияния, полученном при помощи стандартного способа слияния с сохранением рамки считывания, обладает недостатками, проявляющимися в том, что он легко расщепляется протеолитическим ферментом *in vivo*, и, таким образом, невозможно получить достаточный эффект увеличения периода полужизни в крови активного лекарственного средства за счет носителя, как ожидается. Однако согласно настоящему изобретению непептидный линкер, а также пептидный линкер можно использовать для получения конъюгата. В непептидном линкере можно использовать полимер, устойчивый к протеолитическому ферменту, для поддержания периода полужизни пептида, являющегося подобным периоду полужизни носителя. Таким образом, без ограничения можно использовать любой непептидный полимер, при условии, что он представляет собой полимер с вышеуказанной функцией, то есть полимер, устойчивый к протеолитическому ферменту *in vivo*. Непептидный полимер характеризуется молекулярной массой, которая находится в диапазоне от 1 до 100 кДа, а предпочтительно от 1 до 20 кДа.

Непептидный полимер по настоящему изобретению, связанный с Fc-участком иммуноглобулина, может представлять собой один полимер или комбинацию различных типов полимеров.

Непептидный полимер, используемый в настоящем изобретении, имеет реакционноспособную группу, способную связываться с Fc-участком иммуноглобулина и белковым лекарственным средством.

Непептидный полимер имеет реакционноспособную группу на обоих концах, которую предпочтительно выбирают из группы, состоящей из реакционноспособной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и производного сукцинимиды. Производное сукцинимиды может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, если непептидный полимер имеет реакционноспособную альдегидную группу на обоих своих концах, он является эффективным в связывании на обоих концах с физиологически активным полипептидом и иммуноглобулином при минимальных неспецифических реакциях. Конечный продукт, полученный при восстановительном алкилировании альдегидной связи, является намного более стабильным, чем продукт, связанный амидной связью. Альдегидная реакционноспособная группа избирательно связывается с N-концом при низком значении pH, и связывается с остатком лизина с образованием ковалентной связи при высоком значении pH, таком как pH 9,0.

Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного полимера могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Например, непептидный полимер может иметь малеимидную группу на одном конце и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце. Если в качестве непептидного полимера используется полиэтиленгликоль с реакционноспособной гидроксигруппой на его обоих концах, то гидроксигруппу можно активировать до различных реакционноспособных групп с помощью известных химических реакций, или можно использовать коммерчески доступный полиэтиленгликоль с модифицированной реакционноспособной группой с тем, чтобы получить конъюгат по настоящему изобретению.

Разновидность и способ получения конъюгата на основе секреторного пептида длительного действия подробно описаны в патентах Южной Кореи №№ 10-1058290, 10-1231431 и 10-1058315.

Согласно одному варианту осуществления по настоящему изобретению лизин (Lys) в имидазоацетил-эксендин-4 (СА эксендин-4) модифицировали с помощью PEG, и PEG-модифицированный эксендин-4 соединили с Fc-участком иммуноглобулина, получив тем самым конъюгат на основе эксендин-4 длительного действия (пример 9).

Такой конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулино-тропного пептида длительного действия по настоящему изобретению в значительной степени увеличивают продолжительность эффективности *in vivo* и проявляют схожий период полужизни *in vivo*. Таким образом, их введение в комбинации является эффективным в лечении диабета.

Введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия по настоящему изобретению может демонстрировать исключительную эффективность в контроле уровня глюкозы в крови и улучшать липидный профиль в крови по сравнению с введением по отдельности. Согласно одному варианту осуществления по настоящему изобретению было подтверждено, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия (т.е. эксендина-4) может ослаблять липотоксичность и глюкотоксичность, сохраняя, таким образом, массу бета-клеток и дополнительно подавляя прогрессирование диабета. Такие результаты указывают на то, что комбинированная композиция конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия в соответствии с настоящим изобретением или введение в комбинации данных конъюгатов может существенно снижать липотоксичность, ассоциированную с повышением уровней липидов в крови, и глюкотоксичность, ассоциированную с повышением уровней глюкозы в крови, вследствие недостаточного контроля уровней глюкозы в крови, которые являются побочными эффектами, возникающим у некоторых пациентов с диабетом при введении инсулина или инсулинотропного пептида по отдельности, и, помимо этого, можно в значительной степени замедлить прогрессирование диабета за счет предупреждения нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и/или увеличения массы бета-клеток поджелудочной железы, что, таким образом, приводит к улучшению состояния, излечению диабета и предупреждает возникновение диабета, а также улучшает прогноз при диабете.

Композиция по настоящему изобретению характеризуется введением в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия.

Если осуществляют введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия по настоящему изобретению, то одновременно конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия оказывает действие на инсулиновые рецепторы, а конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия оказывает действие на рецептор глюкагон-подобного пептида-1, вызывая, таким образом, снижение уровня глюкозы в крови и поддерживая стабильный уровень глюкозы в крови по сравнению с их введением по отдельности. Введение конъюгатов в комбинации вызывает эффекты, проявляющиеся в снижении риска возникновения гипогликемии и увеличения веса тела, что может быть индуцировано при отдельном введении инсулина, а также снижает дозу общего инсулина благодаря действию инсулинотропного пептида. Также преимущество состоит в том, что дозу инсулинотропного пептида, такого как эксендин-4, также можно снизить для предупреждения побочных эффектов, таких как тошнота или рвота, возникающих при отдельном введении эксендина-4. Применение конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия в значительной степени увеличивает период полужизни в крови и *in vivo* продолжительность эффекта, что таким образом снижает частоту применения лекарственного средства с улучшением качества жизни у хронических больных, которые испытывают неудобства из-за ежедневных инъекций. Таким образом, данное применение является исключительно полезным для лечения диабета. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению демонстрирует превосходную продолжительность эффекта *in vivo* и титры, при этом дозу можно существенно снизить при введении в комбинации.

Более того, в отличие от стандартных составов, композиция по настоящему изобретению характеризуется тем, что она может уменьшать потерю функции бета-клеток поджелудочной железы и снижение массы бета-клеток поджелудочной железы вследствие апоптоза бета-клеток поджелудочной железы, возникающего у пациентов с диабетом. Эта композиция может уменьшать снижение функции и массы бета-клеток посредством уменьшения и взаимодополняющего действия по отношению к липотоксичности и глюкотоксичности, подавляя, таким образом, прогрессирование диабета. Тем самым композиция по настоящему изобретению может уменьшать побочные эффекты по отношению к клеткам поджелудочной железы у пациентов с диабетом.

Конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия можно вводить одновременно, последовательно или в обратном порядке, и можно вводить одновременно при соответствующем сочетании эффективных доз. В частности, конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия можно хранить по отдельности в индивидуальных контейнерах, а затем вводить одновременно, последовательно или в обратном порядке.

Кроме того, конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия в качестве композиции для введения в комбинации по настоящему изобретению может быть в форме набора для терапии диабета, который включает конъюга-

ты в одном контейнере или по отдельности в индивидуальных контейнерах. Набор может включать фармацевтически приемлемый носитель и инструкцию для применения набора.

Кроме того, конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия можно вводить в комбинации с инсулинотропным пептидом и инсулином соответственно. Конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия можно вводить в комбинации с инсулинотропным пептидом, таким как агонисты GLP-1 (например, эксенатид, лираглутид, ликсисенатид), а конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия можно вводить в комбинации с инсулином и аналогом инсулина, базальным инсулином.

Используемый в данном документе термин "диабет" или "сахарный диабет" относится к заболеванию обмена веществ, вызванному недостаточностью секреции инсулина или нарушением функции инсулина. Введение субъекту в комбинации композиции по настоящему изобретению осуществляют для контроля уровней глюкозы в крови, таким образом, для лечения диабета. Также композицию по настоящему изобретению можно использовать в качестве терапевтического средства для диабета, которое может поддерживать и повышать функцию и клеточную массу бета-клеток поджелудочной железы и обеспечивать защиту от побочных эффектов, таких как возможный стресс бета-клеток. Кроме того, композиции по настоящему изобретению могут в значительной степени уменьшать липотоксичность и глюкотоксичность, которые вызывают снижение функции и массы бета-клеток, а также могут уменьшать прогрессирование диабета. Соответственно композиция по настоящему изобретению может в значительной степени уменьшать побочные эффекты традиционных лекарственных средств.

Используемое в данном документе выражение "предупреждение" означает все действия, за счет которых возникновение диабета или побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы задерживается или замедляется при введении в комбинации композиции по настоящему изобретению, а выражение "лечение" означает все действия, за счет которых симптомы диабета или побочные эффекты по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы были улучшены или положительно изменены при введении в комбинации композиции по настоящему изобретению. Лечение диабета и предупреждение или лечение побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы можно применять по отношению к любому млекопитающему с диабетом, и их примеры включают людей и приматов, а также домашних животных, таких как без ограничения корова, свинья, овца, лошадь, собака и кошка, и в частности человек.

Используемое в данном документе выражение "введение" означает введение пациенту заранее определенного количества вещества с помощью определенного подходящего способа. Композицию можно вводить посредством любого из известных путей, при условии, что она сможет достигнуть необходимой ткани. Рассматривается множество путей введения, в том числе интраперитонеальный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, пероральный, местный, интраназальный, внутрилегочный и ректальный, но настоящее изобретение не ограничивается этими иллюстративными путями введения. Вместе с тем, поскольку пептиды расщепляются при пероральном введении, активные ингредиенты композиции для перорального введения необходимо покрывать или составлять для защиты от распада в желудке. В частности, композицию по настоящему изобретению можно вводить в инъекционной форме. Кроме того, средство длительного действия можно вводить при помощи определенного устройства, способного транспортировать активные ингредиенты в клетку-мишень.

Кроме того, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно определять несколькими связанными факторами, в том числе типами заболеваний, подлежащих лечению, путями введения, возрастом, полом и весом пациента, тяжестью болезни, а также типами лекарственного средства в качестве активного компонента.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать фармацевтически приемлемый носитель. Используемое в данном документе выражение "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю или разбавителю, которые не вызывают существенного раздражения в организме и не подавляют биологическую активность и свойства вводимого соединения. Для перорального применения фармацевтически приемлемый носитель может включать связующее вещество, смазывающее вещество, разрыхлитель, вспомогательное средство, растворитель, диспергирующее средство, стабилизатор, суспендирующее средство, красящее вещество или ароматизирующее вещество. Для инъекционных форм фармацевтически приемлемый носитель может включать буферное средство, консервант, анальгетик, растворитель, изотоническое средство и стабилизатор. Для форм для местного применения фармацевтически приемлемый носитель может включать основу, вспомогательное средство, смазывающее средство и консервант. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно составлять в виде множества лекарственных форм в комбинации с упомянутыми выше фармацевтически приемлемыми носителями. Например, для перорального введения фармацевтическую композицию можно создавать в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов или облаток. Для инъекционных форм фармацевтическую композицию можно составлять в виде ампулы с разовой дозой или многодозового контейнера. Фармацевтическую композицию можно также составлять в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул и препаратов длительного действия.

С другой стороны, примеры носителей, вспомогательных средств и разбавителей для составления

включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, арабийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральные масла. Кроме того, фармацевтические составы могут дополнительно включать наполнители, антикоагулянты, смазывающие вещества, увлажнители, ароматизирующие вещества и антисептики.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение обеспечивает способ предупреждения или лечения диабета, включающий стадии введения композиции, включающей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, субъекту с диабетом или с риском возникновения диабета.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности, нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и уменьшения массы бета-клеток поджелудочной железы у пациентов с диабетом, включающий стадии введения композиции, содержащей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, пациентам, страдающим диабетом.

Стадию введения можно осуществлять без ограничения путем одновременного, последовательного введения или введения в обратном порядке в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия, и конъюгаты можно вводить одновременно при соответствующем сочетании эффективных доз.

Несмотря на введение только один раз в неделю, композиция, включающая как конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия, так и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия по настоящему изобретению, может проявлять исключительное уменьшение уровней глюкозы в крови и не вызывает побочных эффектов в виде увеличения веса тела, и, таким образом, данную композицию можно использовать для предупреждения или лечения диабета.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ уменьшения и/или снижения липотоксичности и/или глюкотоксичности у пациентов с диабетом, включающий стадию введения указанной композиции, содержащей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, пациенту, страдающему диабетом.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ улучшения функции бета-клеток поджелудочной железы, и/или сохранения, и/или повышения массы бета-клеток поджелудочной железы, включающий стадию введения указанной композиции, содержащей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, пациентам, страдающим диабетом.

Далее в данном документе настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Однако данные примеры предназначены только для иллюстративных целей, и не предполагаются ограничение настоящего изобретения данными примерами.

Пример 1. Получение вектора, экспрессирующего одноцепочечный аналог инсулина.

Для получения аналогов (аналога) инсулина каждый аналог с вариантом одной аминокислоты в А-цепи или В-цепи синтезировали с использованием в качестве матрицы вектора, экспрессирующего инсулин, прямых и обратных олигонуклеотидов (табл.2), а затем проводили ПЦР для амплификации гена соответствующего аналога.

Каждую из аминокислотных последовательностей модифицировали в А-цепи или В-цепи и название каждому аналогу давали согласно следующей табл.1. То есть аналог 1 характеризовался заменой глицина на аланин в положении 1 А-цепи, а аналог 4 характеризовался заменой глицина на аланин в положении 8 В-цепи.

Таблица 1

Аналог	Модифицированная последовательность
Аналог 1	A ¹ G → A
Аналог 2	A ² I → A
Аналог 3	A ¹⁹ Y → A
Аналог 4	B ⁸ G → A
Аналог 5	B ²³ G → A
Аналог 6	B ²⁴ F → A
Аналог 7	B ²⁵ F → A
Аналог 8	A ¹⁴ Y → E
Аналог 9	A ¹⁴ Y → N

Праймеры для амплификации генов аналогов инсулина приведены в следующей табл.2.

Таблица 2

Аналог	Последовательность	SEQ ID NO
Аналог 1	5' GGGTCCCTGTCAGAAAGCGTGGCAGTGTGTGGAAACAATGCTGT 3'	SEQ ID NO 1
	5' ACAGCATTGTTCACACATGGCAGCGTTCTGTCAGGGACCC 3'	SEQ ID NO 2
Аналог 2	5' TCCTGTCAGAAAGCGTGGCGGGTGGAAACAATGCTGTACC 3'	SEQ ID NO 3
	5' GGTACAGCATTGTTCACACCGCGCCACGGTTCTGTCAGGGAA 3'	SEQ ID NO 4
Аналог 3	5' CTCACCCAGCTGGAAAACCGCTGTAACTGAGGATCC 3'	SEQ ID NO 5
	5' GGATCCCTCAGTTACACCGCTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	SEQ ID NO 6
Аналог 4	5' GTTAAACCAACACTTGTGTGCGTCCACACTGGTGGAAAGCT 3'	SEQ ID NO 7
	5' AGCTTCCACCAGGTTGTGACCCACACAAAGTGTGGTTAAC 3'	SEQ ID NO 8
Аналог 5	5' CTAGTGTGCGGGAAACGAGCGTCTTCTACACACCCCAAG 3'	SEQ ID NO 9
	5' CTGGGGTGTGTAGAAGAAACGCTCCGTTCCCGGCACACTAG 3'	SEQ ID NO 10
Аналог 6	5' GTGTGCGGGAAACGAGCGGCTTCTACACACCCCAAGACC 3'	SEQ ID NO 11
	5' GGTCTGGGTGTGTAGAAGCGCGCTCCGTTCCCGGCACAC 3'	SEQ ID NO 12
Аналог 7	5' TCGGGGAAACGAGGCTTCGCGTACACACCCCAAGACCCGC 3'	SEQ ID NO 13
	5' GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCCCGGCA 3'	SEQ ID NO 14
Аналог 8	5' -CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3'	SEQ ID NO 15
	5' -Cagtagttctccagctgttccgagggagcagatgctgg-3'	SEQ ID NO 16
Аналог 9	5' -CAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3'	SEQ ID NO 17
	5' -Gtagttctccagctgttccgagggagcagatgctgg-3'	SEQ ID NO 18

Реакцию ПЦР для амплификации генов аналогов инсулина проводили при условиях 95°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 68°C в течение 6 мин в течение 18 циклов. Для экспрессии генов фрагментов аналогов инсулина, полученных в условиях в виде внутриклеточных телец-включений, каждый из них встраивали в вектор pET22b, и полученные таким образом векторы экспрессии обозначали как pET22b-аналоги инсулина 1-9 соответственно. Соответствующие векторы экспрессии включали нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности аналогов инсулина 1-9 под контролем промотора T7, и аналоги инсулина в виде белков экспрессировали в виде телец включения в клетках-хозяевах соответственно.

Последовательности ДНК и белковые последовательности аналогов инсулина 1-9 приведены в следующей табл.3.

Таблица 3

Аналог	Последовательность		SEQ ID NO
Аналог 1	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GCG ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	19
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	20
Аналог 2	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	21
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	22
Аналог 3	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	23
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ala Cys Asn	24

Аналог 4	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	25
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	26
Аналог 5	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	28
Аналог 6	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	29
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	30

Аналог 7	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	32
Аналог 8	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34
Аналог 9	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36

Пример 2. Экспрессия рекомбинантных пептидов слияния, представляющих собой аналог инсулина.

Экспрессию рекомбинантных аналогов инсулина проводили под контролем промотора T7. E. coli BL21-DE3 (E. coli B F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal DE3; Novagen) трансформировали каждым из векторов, экспрессирующих рекомбинантные аналоги инсулина. Трансформацию проводили согласно процедурам, рекомендованным Novagen. Отдельные колонии, трансформированные соответствующими рекомбинантными векторами экспрессии, высевали в среду на основе 2X бульона Лурия (LB), содержащую ампициллин (50 /мл), и культивировали при 37°C в течение 15 ч. Каждую бульонную культуру с рекомбинантным штаммом и 2X среду LB, содержащую 30% глицерина, смешивали в соотношении 1:1 (об./об.) и по 1 мл этой смеси вносили в криопробирку и хранили при -140°C. Данные образцы использовали в качестве исходного клеточного материала для получения рекомбинантных белков слияния.

Для экспрессии рекомбинантных аналогов инсулина каждый 1 флакон исходного клеточного материала размораживали и инокулировали в 500 мл 2X бульона Лурия, а затем культивировали при встряхивании при 37°C в течение 14-16 ч. Если значение OD600 достигало 5,0 или выше, культивирование завершали и бульонную культуру использовали в качестве культур для посева. Эту культуру для посева инокулировали в ферментер объемом 50 л (MSJ-U2, В.Е. MARUBISHI, Япония), содержащий 17 л ферментационной среды, и начинали ферментацию первой партии. Условия культивирования поддерживали при температуре 37°C, скорости потока воздуха 20 л/мин (1 vvm - единица объема на объем в минуту), скорости перемешивания 500 об./мин и при значении pH 6,70 с использованием аммиака. Ферментацию осуществляли в режиме периодического культивирования с подпиткой посредством дополнительного добавления питательного раствора, когда запас питательных веществ в бульонной культуре истощался. Рост клеток контролировали по измерению OD. При значении OD более 100 или выше IPTG вводили в конечной концентрации 500 М. После введения культивирование дополнительно проводили в течение

приблизительно 23-25 ч. После завершения культивирования рекомбинантные штаммы собирали путем центрифугирования и хранили при -80°C до использования.

Пример 3. Извлечение и рефолдинг рекомбинантных аналогов инсулина.

Для превращения рекомбинантных аналогов инсулина, экспрессируемых в примере 2, в растворимые формы, клетки разрушали с последующим рефолдингом. 100 Г (вес во влажном состоянии) клеточной массы ресуспендировали в 1 л лизирующего буфера (50 мМ Tris-HCl (pH 9,0), 1 мМ EDTA (pH 8,0), 0,2 М NaCl и 0,5% Triton X-100). Клетки разрушали при помощи микрофлюидайзера M-110EH (AC Technology Corp., модель M1475C) при рабочем давлении 15000 фунтов/кв. дюйм. Разрушенный таким образом клеточный лизат центрифугировали при 7000 об./мин и 4°C в течение 20 мин. Супернатант сливали и массу ресуспендировали в 3 л отмывочного буфера (0,5% Triton X-100 и 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 М NaCl, 1 мМ EDTA). После центрифугирования при 7000 об./мин и 4°C в течение 20 мин клеточную массу ресуспендировали в дистиллированной воде с последующим центрифугированием подобным способом. Полученную таким образом массу ресуспендировали в 400 мл буфера (1 М глицин, 3,78 г цистеина-HCl, pH 10,6) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Для извлечения ресуспендированных таким образом рекомбинантных аналогов инсулина добавляли 400 мл 8 М мочевины и перемешивали при 40°C в течение 1 ч. Для рефолдинга растворенных рекомбинантных аналогов инсулина проводили центрифугирование при 7000 об./мин и 4°C в течение 30 мин и собирали супернатант. К нему добавляли 2 л дистиллированной воды при помощи перистальтического насоса при скорости потока 1000 мл/ч при перемешивании при 4°C в течение 16 ч.

Пример 4. Очистка катионообменной хроматографией.

Подвергнутый рефолдингу образец загружали в колонку Source S (GE healthcare), уравновешенную с помощью 20 мМ цитратного (pH 2,0) буфера, содержащего 45% этанола, а затем белки, представляющие собой аналоги инсулина, элюировали в линейном градиентном режиме в 10 объемах колонки в от 0 до 100% 20 мМ цитратного (pH 2,0) буфера, содержащего 0,5 М хлорид натрия и 45% этанол.

Пример 5. Обработка трипсином и карбоксипептидазой В.

Соли удаляли из элюированных образцов с помощью колонки для деминерализации и проводили замену буфера на буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 8,0). К полученному образцу белка добавляли трипсин, соответствующий молярному соотношению 1000, и карбоксипептидазу В, соответствующую молярному соотношению 2000, а затем перемешивали при 16°C в течение 16 ч. Для завершения реакции использовали 1 М цитрат натрия (pH 2,0) для снижения значения pH до 3,5.

Пример 6. Очистка катионообменной хроматографией.

Подвергнутый таким образом реакции образец загружали в колонку Source S (GE healthcare), уравновешенную с помощью 20 мМ цитратного (pH 2,0) буфера, содержащего 45% этанола, а затем белки, представляющие собой аналоги инсулина, элюировали в линейном градиентном режиме в 10 объемах колонки от 0 до 100% 20 мМ цитратного (pH 2,0) буфера, содержащего 0,5 М хлорид натрия и 45% этанол.

Пример 7. Очистка анионообменной хроматографией.

Соли удаляли из элюированного образца с помощью колонки для деминерализации и проводили замену буфера на буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 7,5). Для выделения чистых аналогов инсулина из образца, полученного в примере 6, образец загружали в анионообменную колонку (Source Q: GE healthcare), уравновешенную 10 мМ буфером Tris (pH 7,5), и белок, представляющий аналог инсулина, элюировали в 10 объемах колонки линейным градиентом от 0 до 100% 10 мМ буфера Tris (pH 7,5), содержащего 0,5 М хлорид натрия.

Чистоту очищенного таким образом аналога инсулина анализировали при помощи электрофореза белков (SDS-PAGE) и хроматографии высокого давления (HPLC), а модификации аминокислот идентифицировали при помощи пептидного картирования и анализа молекулярной массы каждого пика.

В результате было обнаружено, что каждый аналог инсулина имел требуемое изменение в своей аминокислотной последовательности.

Пример 8. Получение аналога инсулина длительного действия.

В данном примере получали конъюгат длительного действия конъюгат на основе последовательности аналога (Glu в положении 14 А-цепи) нативного инсулина в качестве образцового аналога инсулина.

Для пэггилирования N-конца бета-цепи аналога инсулина при помощи 3,4К ALD2 PEG (NOF, Япония) проводили реакцию аналога инсулина и PEG при молярном соотношении 1:4 при концентрации аналога инсулина 5 мг/мл при $4-8^{\circ}\text{C}$ в течение приблизительно 2 ч. При этом реакцию проводили в 50 мМ цитрате натрия при pH 6,0 и 40-60% изопропанол. В качестве восстанавливающего средства добавляли 3,0-20,0 мМ цианоборогидрида натрия и проводили реакцию. Реакционный раствор очищали на колонке SP-HP (GE Healthcare, США) с использованием буфера, содержащего цитрат натрия (pH 3,0) и этанол, а также градиент концентрации KCl.

Для получения конъюгата на основе аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина проводили реакцию с очищенным монопэггилированным аналогом инсулина и Fc-фрагментом иммуноглобулина при молярном соотношении 1:1-1:2 и при 25°C в течение 16 ч, при общей концентрации белка приблизительно 20 мг/мл. При этом условия реакционного буфера составляли 100 мМ HEPES при pH 8,2, а в качестве восстанавливающего средства к нему добавляли 20 мМ цианоборогидрида натрия. Таким образом, полу-

чали конъюгат на основе аналога инсулина, РЕГирированный на N-конце Fc-фрагмента.

После завершения реакции реакционный раствор загружали в колонку Q HP (GE Healthcare, США) с буфером Tris-HCl (pH 7,5) и градиентом концентрации NaCl для осуществления первичной очистки конъюгата на основе аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина.

После чего использовали Source 15ISO (GE Healthcare, США) в качестве вторичной колонки для получения конъюгата на основе аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина. При этом инсулин конъюгат на основе аналога и Fc-фрагмента иммуноглобулина элюировали с использованием градиента концентраций сульфата аммония, содержащего Tris-HCl (pH 7,5).

Пример 9. Получение конъюгата длительного действия на основе эксендина-4.

Проводили реакцию 3.4k PropionALD (2) PEG с лизином (Lys) SA эксендина-4 с использованием имидазо-ацетил-эксендина-4 (SA эксендин-4, AP, США). Среди двух пиков, соответствующих изомерам Lys, пик последнего изомера (позиционный изомер Lys27), который больше вступал в реакцию и который было проще отличить от пиков, соответствующих N-концевым изомерам, использовали для реакции связывания.

Реакцию проводили при молярном соотношении пептид:Fc-фрагмент иммуноглобулина 1:8 и общей концентрации белков 60/ при 4°C в течение 20 ч. Реакцию проводили в растворе 100 mM K-P (pH 6,0) и добавляли 20 mM SCB в качестве восстанавливающего средства. Раствор для реакции связывания очищали с помощью двух колонок для очистки. Сперва использовали SOURCE Q (XK 16 мл, Amersham Biosciences) для удаления большей части Fc-фрагмента иммуноглобулина, который не принимал участие в реакции связывания. При использовании 20 mM Tris (pH 7,5) и 1 M NaCl с градиентами солей первым элюировали Fc-фрагмент иммуноглобулина, характеризующийся относительно слабой силой связывания, а затем сразу после него элюировали эксендин-4-Fc-фрагмент иммуноглобулина. В ходе данного первого процесса очистки Fc-фрагмент иммуноглобулина удаляли до некоторой степени, но поскольку Fc-фрагмент иммуноглобулина и эксендин-4-Fc-фрагмент иммуноглобулина характеризуются аналогичной силой связывания друг с другом в ионообменной колонке, было невозможно полностью отделить их друг от друга. Соответственно вторую очистку проводили исходя из различий в гидрофобности между двумя материалами. Используя 20 mM Tris (pH 7,5) и 1,5 M сульфата аммония в SOURCE ISO (HR 16 мл, Amersham Biosciences), связывали первые очищенные образцы и элюировали смесь образцов с постепенным снижением концентрации сульфата аммония. В колонке HIC Fc-фрагмент иммуноглобулина, характеризующийся слабой силой связывания, элюировался первым, а после него элюировался образец эксендин-4-Fc-фрагмент иммуноглобулина, характеризующийся высокой силой связывания. Поскольку они обладают заметно отличающейся гидрофобностью, их можно легче отделить друг от друга, чем в ионообменной колонке.

Колонка: SOURCE Q (XK 16, Amersham Biosciences).

Скорость потока: 2,0/мин.

Градиент: А0 →25% 70 мин. В (А: 20 mM Tris, pH 7,5, В: А+1 M NaCl).

Колонка: SOURCE ISO (HR 16, Amersham Biosciences).

Скорость потока: 7,0/мин.

Градиент: В 100 →0% 60 мин В (А: 20 mM Tris, pH 7,5, В: А+1,5 M сульфат аммония).

Пример 10. Эффективность контроля уровня глюкозы крови и изменений веса тела (Δ веса тела) у мышей с диабетом 2 типа путем введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия.

Для испытаний *in vivo* эффективности путем введения композиций, включающих конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгат на основе эксендина-4 длительного действия, полученных в примерах 8 и 9, или путем введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия использовали мышей db/db с диабетом 2 типа. Поскольку мышь db/db с мутацией в гене рецептора лептина (мышь BKS. Cg- + Lep^{db}/+ Lep^{db}/OlaHsd) проявляла симптомы диабета, подобные таким симптомам у человека, ее использовали в этом примере.

Из хвостовой вены 8-недельной мыши db/db отбирали 1-2 капли крови с помощью шприца 26 G и уровень глюкозы в крови измеряли с использованием глюкометра (OneTouch Ultra, LifeScan, Inc., США). Индукцию диабета определяли путем измерения уровня глюкозы в крови (350-600/). Мышей с индуцированным диабетом разделяли на пять групп G1, G2, G3, G4 и G5, при этом в каждой группе было пять или шесть мышей.

Группы разделяли на контрольную необрабатываемую группу (среда-носитель), группу, обрабатываемую конъюгатом на основе аналога инсулина длительного действия (8,8 нмоль/кг), группу, обрабатываемую конъюгатом на основе эксендина-4 длительного действия (0,36 нмоль/кг), группу, обрабатываемую конъюгатом на основе аналога инсулина длительного действия (2,2 нмоль/кг) и конъюгатом на основе эксендина-4 длительного действия (0,36 нмоль/кг), и группу, обрабатываемую конъюгатом на основе аналога инсулина длительного действия (8,8 нмоль/кг) и конъюгатом на основе эксендина-4 длительного действия (0,36 нмоль/кг). После повторного введения вышеуказанных испытуемых материалов в течение 5 недель, в каждой группе измеряли уровни гликозилированного гемоглобина (HbA1c). В норме гликозилированный гемоглобин образуется в эритроцитах посредством реакции глюкозы с гемоглоби-

ном. Если уровни глюкозы в крови сохраняются высокими, уровни гликозилированного гемоглобина также увеличиваются. У мыши уровень гликозилированного гемоглобина отражает средний уровень глюкозы в крови за 4~5 недель и, таким образом, представляет собой эффективный показатель способности испытуемого материала контролировать уровень глюкозы в крови. Кроме того, рассчитывали изменения веса тела (ABW) испытуемого животного до обработки лекарственным средством и в последний день эксперимента.

В итоге, введение комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия продемонстрировало снижение уровня гликозилированного гемоглобина (фиг. 1), что является значительным улучшением по сравнению с введением конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия или конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия по отдельности. Кроме того, хотя вводимую дозу конъюгата на основе аналога инсулина снизили на 1/4, эффект введения в комбинации сохранился.

Результаты измерения Δ веса тела показали, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия продемонстрировало эффект уменьшения увеличения веса по сравнению с введением конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия (фиг. 2) в отдельности. Кроме того, когда вводимую дозу конъюгата на основе аналога длительного действия инсулина снижали на 1/4, эффект уменьшения увеличения веса значительно возрастал.

Эти результаты показывают, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия по настоящему изобретению проявляет превосходный эффект в контроле уровня глюкозы в крови по сравнению с их введением по отдельности. Кроме того, эффект контроля уровня глюкозы в крови при введении их в комбинации сохранялся, даже при снижении вводимой дозы конъюгата на основе аналога инсулина. Кроме того, поскольку вводимую дозу конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия снижали на 1/4, увеличение веса значительно снижалось, свидетельствуя о том, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия значительно снижает риск возникновения гипогликемии, а также увеличения веса за счет снижения дозы инсулина.

Пример 11. Эффективность поддержания массы бета-клеток у мышей с диабетом 2 типа путем введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия.

Для испытаний *in vivo* эффективности путем введения композиции, включающей конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия (конъюгат на основе производного инсулина длительного действия) и конъюгат на основе эксендина-4 длительного действия (пример инсулинотропного пептида длительного действия) или путем введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия, использовали мышей db/db с диабетом 2 типа.

В данном примере в качестве аналога инсулина использовали конъюгат на основе производного инсулина длительного действия, аналог 8 ($A^{14}Y \rightarrow E$) в табл.1 использовали в качестве инсулинотропного пептида длительного действия и в качестве инсулинотропного пептида длительного действия использовали конъюгат на основе эксендина-4 длительного действия, включающий имидазо-ацетил-эксендин-4 (СА эксендин-4). Лизин в эксендине-4 модифицировали с помощью PEG и PEG-модифицированный эксендин-4 соединяли с Fc-фрагментом иммуноглобулина с получением конъюгата эксендина-4 длительного действия. В частности, реакцию между СА эксендином-4 и аналогом инсулина 8 проводили при молярном соотношении от 1,01 до 1:50 с получением их конъюгата.

Поскольку мышь db/db с мутацией в гене рецептора лептина (мышь BKS.Cg-+Lep^{db}/+Lep^{db}/OlaHsd) проявляла симптомы диабета, подобные таким симптомам у людей с мутацией в гене рецептора лептина, данную мышь использовали в этом примере.

Из хвостовой вены 12-недельной мыши db/db отбирали 1-2 капли крови с помощью шприца 26G и уровень глюкозы в крови измеряли с использованием глюкозиметра (OneTouch Ultra, LifeScan, Inc., США). Индукцию диабета определяли путем измерения уровня глюкозы в крови (нормальный диапазон при отсутствии диабета составлял приблизительно 100~150 мг/дл, поэтому мышей с уровнем глюкозы в крови более 350 мг/дл отбирали и использовали для точности примера). Мышей с индуцированным диабетом разделяли на семь групп G1, G2, G3, G4, G5, G6 и G7, при этом в каждой группе было семь или восемь мышей.

Группы разделяли на контрольную необрабатываемую группу (среда-носитель), две группы, обрабатываемые конъюгатами на основе аналога инсулина длительного действия (4,2 нмоль/кг, 8,4 нмоль/кг), группу, обрабатываемую конъюгатом на основе эксендина-4 длительного действия (0,36 нмоль/кг), группу с введением в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия (4,2 нмоль/кг) и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия (0,36 нмоль/кг), и группу с введением в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия (8,4 нмоль/кг) и

конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия (0,36 нмоль/кг).

После повторного введения вышеуказанных испытуемых материалов в дозе, описанной выше, с двухдневными интервалами в течение 12 недель уровни гликозилированного гемоглобина (HbA1c) измеряли в каждой группе. Гликозилированный гемоглобин представляет собой форму гемоглобина, которая в норме присутствует в эритроцитах, с которой связана глюкоза. Если уровни глюкозы в крови сохраняются высокими, уровни гликозилированного гемоглобина также увеличиваются. У мыши уровень гликозилированного гемоглобина отражает средний уровень глюкозы в крови за 4~5 недель и, таким образом, представляет собой эффективный показатель способности испытуемых материалов контролировать уровень глюкозы в крови. После 12 недель повторяемого введения лекарственного средства кровь отбирали у мышей из глазничной вены и измеряли концентрацию сывороточных триглицеридов в собранной сыворотке крови. После аутопсии каждого субъекта отбирали поджелудочную железу для измерения массы бета-клеток.

В итоге, введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия продемонстрировало снижение уровня гликозилированного гемоглобина (фиг. 5), что является значительным улучшением по сравнению с введением конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия или конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия по отдельности.

Измеряли концентрацию триглицеридов в сыворотке крови, и результаты показали, что в группе введения в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия концентрация триглицеридов снижалась в зависимости от дозировки (фиг. 4).

Результаты сравнения массы бета-клеток в каждой группе, обработанной лекарственным средством, подтвердили, что группа, которую обрабатывали отдельно конъюгатом на основе аналога инсулина длительного действия, группа, которую обрабатывали отдельно конъюгатом на основе эксендина-4 длительного действия, и группа, которой вводили в комбинации два конъюгата, проявляли повышение массы бета-клеток по сравнению с контрольной группой (фиг. 3). Кроме того, по сравнению с группой, которую обрабатывали отдельно конъюгатом на основе аналога инсулина длительного действия или конъюгатом на основе эксендина-4 длительного действия, группа, которую обрабатывали введением в комбинации двух лекарственных средств, демонстрировала синергический эффект. Из данных результатов следует, что липотоксичность и глюкотоксичность уменьшались при введении в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия.

Эти результаты показывают, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4 длительного действия по настоящему изобретению проявляет превосходный эффект в контроле уровней глюкозы в крови и улучшение липидного профиля в крови по сравнению с их введением по отдельности. Результаты свидетельствуют о том, что введение в комбинации конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе эксендина-4, представляющего собой инсулинотропный пептид длительного действия, может сохранять массу бета-клеток и подавлять прогрессирование диабета, что следует из уменьшения липотоксичности и глюкотоксичности. Кроме того, эти результаты указывают на то, что комбинированная композиция конъюгата на основе аналога инсулина длительного действия и конъюгата на основе инсулинотропного пептида длительного действия в соответствии с настоящим изобретением или введение в комбинации двух конъюгатов могут существенно снижать липотоксичность, ассоциированную с повышением уровней липидов, и глюкотоксичность, ассоциированную с повышением уровней глюкозы в крови, вследствие недостаточного контроля уровней глюкозы, которые являются побочными эффектами, возникающими у некоторых пациентов с диабетом при введении инсулина или инсулинотропного пептида по отдельности, и, помимо этого, можно в значительной степени замедлить прогрессирование диабета за счет предупреждения нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы и/или увеличения массы бета-клеток поджелудочной железы, что, таким образом, приводит к улучшению состояния, излечению диабета, предупреждает возникновение диабета и улучшает прогноз при диабете.

На основании приведенного выше описания специалистам в данной области будет понятно, что настоящее изобретение можно реализовать в другой конкретной форме без изменения технической сущности или его существенных характеристик. Таким образом, следует понимать, что вышеописанный вариант осуществления не является ограничивающим, но иллюстративным во всех аспектах и что все изменения и модификации, которые возникли из объекта, определенного в формуле изобретения, или их эквиваленты предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения сахарного диабета, содержащая конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия, в котором аналог инсулина соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность действия аналога инсулина, посредством линкера или ковалентной связи;
конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, в котором инсулинотропный

пептид соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность действия инсулинотропного пептида, посредством линкера или ковалентной связи,

где аналог инсулина характеризуется заменой аминокислоты в положении 14 А-цепи глутаминовой кислотой или аспарагином,

где биологически совместимый материал выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, холестерина, альбумина, антител, Fc-участка иммуноглобулина, фибронектина, трансферрина, и где инсулинотропный пептид представляет собой имидазо-ацетил-эксендин-4 (СА-эксендин-4).

2. Фармацевтическая композиция для уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности и нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы, у пациентов с диабетом, содержащая

конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия, в котором аналог инсулина соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность действия аналога инсулина, посредством линкера или ковалентной связи;

конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия, в котором инсулинотропный пептид соединен с биологически совместимым материалом, способным пролонгировать продолжительность действия инсулинотропного пептида, посредством линкера или ковалентной связи,

где аналог инсулина характеризуется заменой аминокислоты в положении 14 А-цепи глутаминовой кислотой или аспарагином,

где биологически совместимый материал выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, холестерина, альбумина, антител, Fc-участка иммуноглобулина, фибронектина, трансферрина, и где инсулинотропный пептид представляет собой имидазо-ацетил-эксендин-4 (СА-эксендин-4).

3. Композиция по п.1 или 2,

(а) где конъюгат на основе аналога инсулина длительного действия характеризуется тем, что аналог инсулина, в котором аминокислота в положении 14 А-цепи инсулина заменена глутаминовой кислотой, соединен с Fc-участком иммуноглобулина посредством непептидильного полимера в качестве линкера, а конъюгат на основе инсулинотропного пептида длительного действия характеризуется тем, что имидазо-ацетил-эксендин-4 в качестве инсулинотропного пептида соединен с Fc-участком иммуноглобулина посредством непептидильного полимера в качестве линкера;

(б) где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

4. Композиция по п.1 или 2, где аналог инсулина или инсулинотропный пептид соединен с биологически совместимым материалом посредством линкера, где линкер представляет собой пептидный линкер или непептидильный линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксипропиленгликоля, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинаций.

5. Композиция по п.1 или 2,

(а) где Fc-участок иммуноглобулина является агликозильрованным;

где Fc-участок иммуноглобулина состоит из одного - четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из доменов CH1, CH2, CH3 и CH4;

где Fc-участок иммуноглобулина включает шарнирный участок;

где Fc-участок иммуноглобулина представляет собой Fc-участок, полученный из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM;

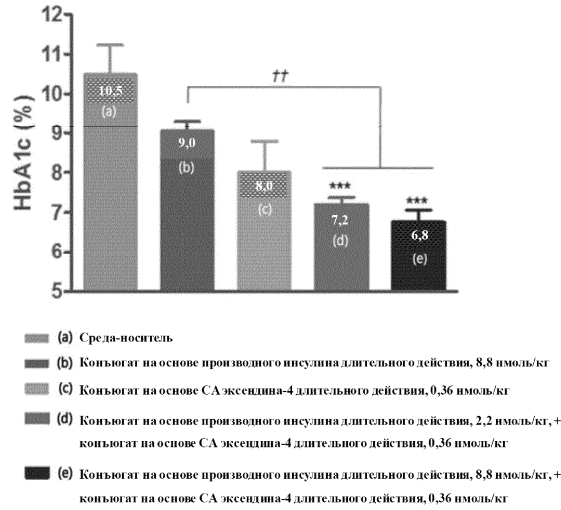
где Fc-участок иммуноглобулина представляет собой гибрид из доменов разного происхождения, выбранный из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, или

где Fc-участок иммуноглобулина представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов, состоящих из доменов одного и того же происхождения; или

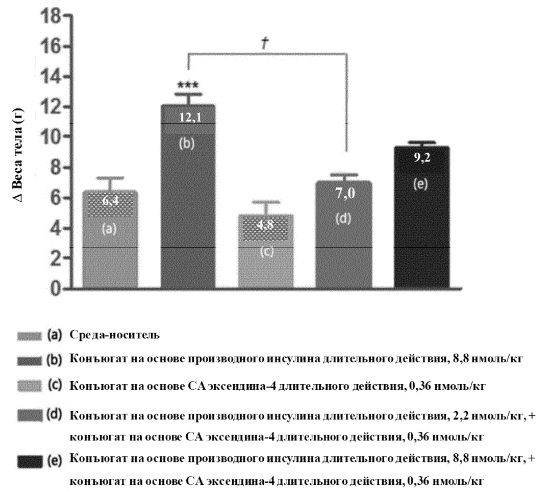
(б) где линкер представляет собой непептидильный линкер и каждый конец непептидильного линкера связывается с биологически совместимым материалом и амино- или тиоловой группой аналога инсулина или инсулинотропного пептида.

6. Способ предупреждения или лечения сахарного диабета, предусматривающий введение композиции по п.1 субъекту, страдающему сахарным диабетом или с риском возникновения сахарного диабета.

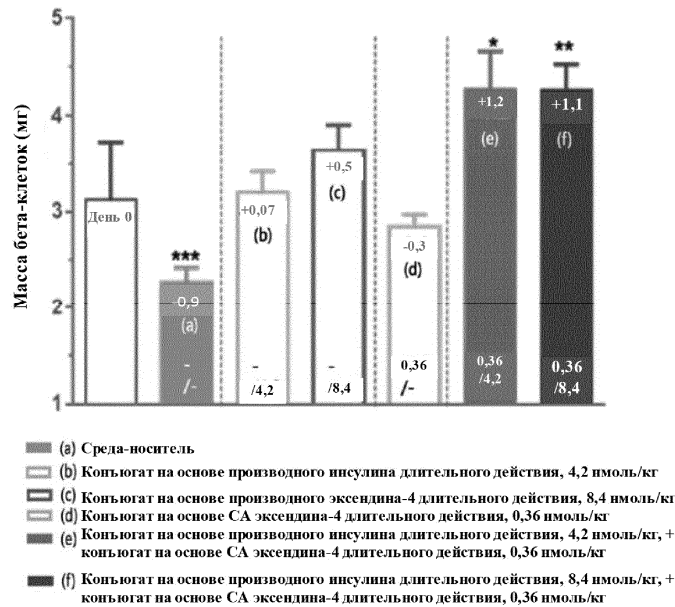
7. Способ уменьшения одного или нескольких побочных эффектов по отношению к бета-клеткам поджелудочной железы, выбранных из группы, состоящей из липотоксичности, глюкотоксичности и нарушения функции бета-клеток поджелудочной железы, у субъекта с диабетом, предусматривающий стадию введения композиции по п.2 субъекту, страдающему сахарным диабетом или с риском возникновения сахарного диабета.



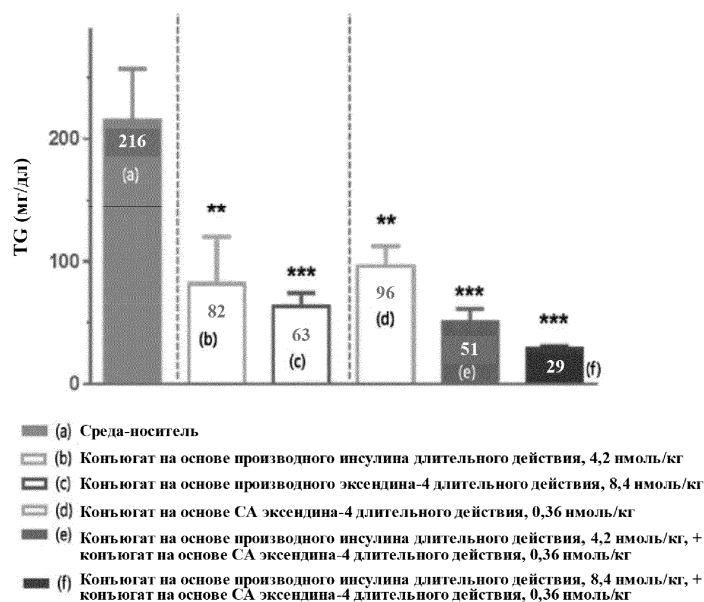
Фиг. 1



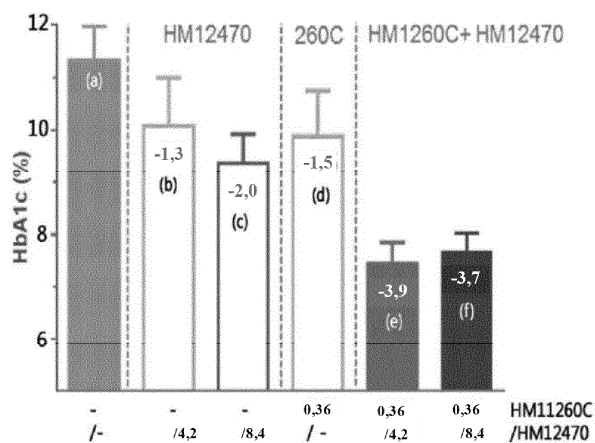
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

