

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038524

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.09

(21) Номер заявки
201891359

(22) Дата подачи заявки
2016.12.30

(51) Int. Cl. C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(54) ДЛИТЕЛЬНО ДЕЙСТВУЮЩИЙ КОНЬЮГАТ ТРОЙНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ
ГЛЮКАГОНА/GLP 1/GIP

(31) 10-2015-0191082; 10-2016-0163737

(32) 2015.12.31; 2016.12.02

(33) KR

(43) 2019.01.31

(86) PCT/KR2016/015555

(87) WO 2017/116205 2017.07.06

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

(72) Изобретатель:
О Ых Лим, Ли Чон Сок, Пак Юн
Джин, Лим Чан Ки, Чун Сун Юб,
Квон Се Чан (KR)

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

(56) US-A1-20130203659

US-A-20120329715

WO-A2-2004093823

KR-A-1020140018462

DRUCKER et al., "The Incretin System:
Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and
Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes",
The Lancet, 2006, vol. 368, no. 11, pages 1696-1705,
see abstract; and figure 2

(57) Изобретение относится к длительно действующему конъюгату тройного активатора, активирующего рецепторы глюкагона, GLP-1 и GIP, и к применениям длительно действующего конъюгата.

038524 B1

038524 B1

038524

B1

Область изобретения

Изобретение относится к длительно действующему конъюгату тройного агониста, обладающего активностью в отношении рецепторов глюкагона, GLP-1 и GIP, и к его применениям.

Предшествующий уровень техники

Ожирение и диабет, включая диабет 2-го типа, являются типичными метаболическими заболеваниями, распространенными в современном обществе. Во всем мире эти заболевания рассматриваются как факторы, угрожающие здоровью, а экономические издержки, обусловленные этими заболеваниями, в настоящее время быстро растут.

Глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (GIP) являются типичными желудочно-кишечными гормонами и нейрогормонами и представляют собой вещества, вовлеченные в регуляцию уровней глюкозы в крови в соответствии с потреблением пищи. Глюкагон представляет собой пептидный гормон, секретируемый поджелудочной железой, и вовлечен в регуляцию уровней глюкозы в крови совместно с двумя веществами, описанными выше.

GLP-1 представляет собой гормон, секретируемый тонким кишечником при его стимуляции приемом пищи. GLP-1 стимулирует секрецию инсулина в поджелудочной железе в зависимости от уровня глюкозы в крови и ингибирует секрецию глюкагона, способствуя тем самым снижению уровней глюкозы в крови. Кроме того, GLP-1 замедляет пищеварение в желудочно-кишечном тракте, действуя как фактор насыщения, и уменьшает количество потребляемой пищи, замедляя эвакуацию переваренной пищи из желудочно-кишечного тракта. Более того, согласно сообщениям, введение GLP-1 крысам приводило к снижению потребления корма и уменьшению массы тела, и эти эффекты были подтверждены в равной степени как в норме, так и при ожирении, продемонстрировав таким образом потенциал GLP-1 как агента для лечения ожирения.

GIP, один из желудочно-кишечных гормонов, секретируемых при стимуляции приемом пищи, как и в случае GLP-1, представляет собой гормон, состоящий из 42 аминокислот, секретируемый К-клетками кишечника. Согласно сообщениям, GIP стимулирует секрецию инсулина в поджелудочной железе в зависимости от глюкозы крови и способствует снижению уровней глюкозы в крови, посредством чего он усиливает эффекты активации GLP-1, противодействует воспалению и так далее.

Глюкагон образуется в поджелудочной железе при падении уровней глюкозы в крови по таким причинам, как прием лекарственных средств, заболевания, дефицит гормонов или ферментов и так далее. Глюкагон передает сигнал, приводящий к распаду гликогена в печени с высвобождением глюкозы и повышением уровней глюкозы в крови до нормального уровня. Помимо повышения уровней глюкозы в крови, глюкагон подавляет аппетит у животных и людей и активирует гормоночувствительную липазу адипоцитов, стимулируя липолиз и расходование энергии, за счет этого препятствует ожирению.

Поэтому, исходя из регуляции уровней глюкозы в крови и уменьшения массы тела под действием GLP-1, проводятся активные исследования по использованию GLP-1 в качестве терапевтического агента для лечения диабета и ожирения. В настоящее время эксендин-4, полученный из яда ящерицы и имеющий приблизительно 50% аминокислотную гомологию с GLP-1, проходит исследования как терапевтический агент для лечения тех же типов заболеваний. Тем не менее, согласно сообщениям, терапевтические агенты, содержащие GLP-1 и эксендин-4, демонстрируют побочные эффекты, такие как рвота и тошнота (Syed Y.Y., *Drugs*, 2015 Jul; 75 (10): 1141-52).

Кроме того, для максимального уменьшения массы тела и в качестве альтернативы указанным выше терапевтическим веществам на основе GLP-1 проводятся исследования, сосредоточенные на двойных агонистах, обладающих активностью как в отношении рецепторов GLP-1, так и в отношении рецепторов глюкагона, и было показано, что благодаря активации рецепторов глюкагона они уменьшают массу тела эффективнее, чем при использовании существующего GLP-1 самого по себе (Jonathan W. et al., *Nat. Chem. Bio.*, 2009 Oct (5): 749-757).

Кроме того, в недавнем исследовании, посвященном тройным агонистам, обладающим активностью в отношении рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона, были предприняты усилия по увеличению периода полувыведения тройных агонистов заменой в аминокислотной последовательности, повышающей устойчивость к дипептидилпептидазе-IV (DPP-IV), расщепляющей желудочно-кишечные гормоны, устраняя их активность, с последующим присоединением ацильной группы к определенной области указанной последовательности (Finan B. et al., *Nat. Med.*, 2015 Jan; 21 (1): 27-36). Тем не менее, их эффекты по активации трех разных типов рецепторов были незначительными, и ни один из тройных агонистов не продемонстрировал различных коэффициентов активности в отношении указанных рецепторов.

Соответственно, существует потребность в разработке нового вещества, способного в значительной степени активировать рецепторы GLP-1, GIP и глюкагона и позволяющего регулировать уровни глюкозы в крови и уменьшать массу тела, не вызывая каких-либо побочных эффектов, таких как рвота и тошнота.

Кроме того, существует также потребность в разработке нового вещества, имеющего различные коэффициенты активности в отношении рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона. Например, существует растущая потребность в разработке вещества, уменьшающего массу тела, но в значительно большей степени регулирующего уровни глюкозы в крови, благодаря высокой активности в отношении GLP-1 и GIP, но с относительно низкой активностью в отношении глюкагона, для обеспечения гипогликемического эффек-

та; или вещества, обладающего высокой активностью в отношении GLP-1, GIP и глюкагона, обеспечивающего за счет этого значительное уменьшение массы тела.

Кроме того, GLP-1, GIP и глюкагон обладают низкой стабильностью *in vivo*, и поэтому их недостатком при терапевтическом применении у людей является необходимость введения один или два раза в сутки.

Описание изобретения

Техническая проблема.

Задачей изобретения является обеспечение конъюгата пептида, обладающего активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP).

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение полинуклеотида, кодирующего указанный конъюгат, вектора, содержащего указанный полинуклеотид, и трансформанта, содержащего указанный полинуклеотид или указанный вектор.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение композиции, содержащей указанный конъюгат.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение способа лечения целевого заболевания, включающего введение указанного конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат, субъекту, нуждающемуся в этом.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение применения указанного конъюгата или его композиции для использования в изготовлении лекарственного средства.

Техническое решение.

Для решения указанных выше задач в одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен конъюгат пептида, обладающего активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP).

В одном конкретном воплощении конъюгат представлен химической формулой 1, приведенной ниже: [химическая формула 1]



где X представляет собой пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP);

L представляет собой линкер;

a представляет собой 0 или положительное целое число, при условии, что, когда a представляет собой 2 или более, каждый L не зависит от другого(их) L; и

F представляет собой вещество, способное увеличивать период полувыведения X.

В другом конкретном воплощении X представляет собой аналог нативного глюкагона с вариацией, выбранной из группы, состоящей из замены, присоединения, делеции, модификации по меньшей мере одной аминокислоты в последовательности нативного глюкагона и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении аминокислотная последовательность с присоединением имеет происхождение от аминокислотной последовательности нативного GLP-1, аминокислотной последовательности нативного GIP или аминокислотной последовательности нативного эксендина-4.

В еще одном конкретном воплощении X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 1, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-

Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-

Xaa30-R1 (общая формула 1, SEQ ID NO:103),

где в общей формуле 1 Xaa1 представляет собой гистидин (His, H), 4-имидазоацетил (CA) или тирозин (Tyr, Y);

Xaa2 представляет собой глицин (Gly, G), α -метилглутаминовую кислоту или Aib (аминоизомасляную кислоту);

Xaa3 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E) или глутамин (Gln, Q);

Xaa7 представляет собой треонин (Thr, T) или изолейцин (Ile, I);

Xaa10 представляет собой лейцин (Leu, L), тирозин (Tyr, Y), лизин (Lys, K), цистеин (Cys, C) или валин (Val, V);

Xaa12 представляет собой лизин (Lys, K), серин (Ser, S) или изолейцин (Ile, I);

Xaa13 представляет собой глутамин (Gln, Q), тирозин (Tyr, Y), аланин (Ala, A) или цистеин (Cys, C);

Xaa14 представляет собой лейцин (Leu, L), метионин (Met, M) или тирозин (Tyr, Y);

Xaa15 представляет собой цистеин (Cys, C), аспарагиновую кислоту (Asp, D), глутаминовую кислоту (Glu, E) или лейцин (Leu, L);

Xaa16 представляет собой глицин (Gly, G), глутаминовую кислоту (Glu, E) или серин (Ser, S);

Xaa17 представляет собой глутамин (Gln, Q), аргинин (Arg, R), изолейцин (Ile, I), глутаминовую ки-

слоту (Glu, E), цистеин (Cys, C) или лизин (Lys, K);

Хаа18 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H);

Хаа19 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), цистеин (Cys, C) или валин (Val, V);

Хаа20 представляет собой лизин (Lys, K), глутамин (Gln, Q) или аргинин (Arg, R);

Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E), глутамин (Gln, Q), лейцин (Leu, L), цистеин (Cys, C) или аспарагиновую кислоту (Asp, D);

Хаа23 представляет собой изолейцин (Ile, I) или валин (Val, V);

Хаа24 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), цистеин (Cys, C), аспарагин (Asn, N), аспарагиновую кислоту (Asp, D) или глутаминовую кислоту (Glu, E);

Хаа27 представляет собой валин (Val, V), лейцин (Leu, L), лизин (Lys, K) или метионин (Met, M);

Хаа28 представляет собой цистеин (Cys, C), лизин (Lys, K), аланин (Ala, A), аспарагин (Asn, N) или аспарагиновую кислоту (Asp, D);

Хаа29 представляет собой цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), глутамин (Gln, Q), треонин (Thr, T), глутаминовую кислоту (Glu, E) или гистидин (His, H);

Хаа30 представляет собой цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), лизин (Lys, K) или гистидин (His, H) или отсутствует; и

R1 представляет собой цистеин (Cys, C), GKKNWVKHNIT (SEQ ID NO:106), m-SSGAPPPS-n (SEQ ID NO:107) или m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO:108) или отсутствует,

где m представляет собой -Cys-, -Pro- или -Gly-Pro-,

n представляет собой -Cys-, -Gly-, -Ser- или -His-Gly- или отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа14 представляет собой лейцин или метионин; и

Хаа15 представляет собой цистеин, аспарагиновую кислоту или лейцин.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Хаа7 представляет собой треонин;

Хаа10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;

Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;

Хаа13 представляет собой тирозин, аланин, глутамин или цистеин;

Хаа14 представляет собой лейцин, цистеин или метионин;

Хаа15 представляет собой цистеин, лейцин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;

Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, цистеин, глутаминовую кислоту или лизин;

Хаа18 представляет собой аланин, глутамин, аргинин или гистидин;

Хаа19 представляет собой аланин, глутамин, валин или цистеин;

Хаа20 представляет собой лизин, аргинин или глутамин;

Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту, глутамин, лейцин, цистеин или аспарагиновую кислоту;

Хаа23 представляет собой изолейцин или валин;

Хаа24 представляет собой цистеин, аланин, глутамин, аспарагин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту; и

Хаа27 представляет собой лейцин или лизин.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Хаа7 представляет собой треонин;

Хаа10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;

Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;

Хаа13 представляет собой тирозин, аланин или цистеин;

Хаа14 представляет собой лейцин или метионин;

Хаа15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;

Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, цистеин или лизин;

Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;

Хаа19 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;

Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;

Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;

Хаа23 представляет собой валин;

Хаа24 представляет собой аланин, глутамин, цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту; и

Хаа27 представляет собой лейцин или лизин.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Хаа7 представляет собой треонин;

Хаа10 представляет собой тирозин или цистеин;
 Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;
 Хаа13 представляет собой тирозин, аланин или цистеин;
 Хаа14 представляет собой лейцин или метионин;
 Хаа15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глутаминовую кислоту;
 Хаа17 представляет собой аргинин, изолейцин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой глутамин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа27 представляет собой лейцин; и
 Хаа28 представляет собой цистеин, аланин, аспарагин или аспарагиновую кислоту.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа1 представляет собой гистидин или 4-имидазоацетил;
 Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа3 представляет собой глутамин;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин;
 Хаа12 представляет собой изолейцин;
 Хаа13 представляет собой аланин или цистеин;
 Хаа14 представляет собой метионин;
 Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глутаминовую кислоту;
 Хаа17 представляет собой изолейцин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин;
 Хаа21 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой аспарагин;
 Хаа27 представляет собой лейцин;
 Хаа28 представляет собой аланин или аспарагин;
 Хаа29 представляет собой глутамин или треонин; и
 Хаа30 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа3 представляет собой глутамин;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;
 Хаа12 представляет собой лизин;
 Хаа13 представляет собой тирозин;
 Хаа14 представляет собой лейцин;
 Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глицин, глутаминовую кислоту или серин;
 Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой аланин или глутамин;
 Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Хаа27 представляет собой лейцин или лизин; и
 Хаа29 представляет собой глицин, глутамин, треонин или гистидин.

В еще одном конкретном воплощении X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 2, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-

Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (общая формула 2, SEQ ID NO:104).

В общей формуле 2

Xaa1 представляет собой 4-имидазоацетил, гистидин или тирозин;

Xaa2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Xaa10 представляет собой тирозин или цистеин;

Xaa13 представляет собой аланин, глутамин, тирозин или цистеин;

Xaa14 представляет собой лейцин, метионин или тирозин;

Xaa15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или лейцин;

Xaa16 представляет собой глицин, глутаминовую кислоту или серин;

Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, глутаминовую кислоту, цистеин или лизин;

Xaa18 представляет собой аланин, глутамин, аргинин или гистидин;

Xaa19 представляет собой аланин, глутамин, цистеин или валин;

Xaa20 представляет собой лизин, глутамин или аргинин;

Xaa21 представляет собой цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин, лейцин или аспарагиновую кислоту;

Xaa23 представляет собой изолейцин или валин;

Xaa24 представляет собой цистеин, аланин, глутамин, аспарагин или глутаминовую кислоту;

Xaa28 представляет собой лизин, цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;

Xaa29 представляет собой глицин, глутамин, цистеин или гистидин;

Xaa30 представляет собой цистеин, глицин, лизин или гистидин;

Xaa31 представляет собой пролин или цистеин; и

Xaa40 представляет собой цистеин или отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 2

Xaa13 представляет собой аланин, тирозин или цистеин;

Xaa15 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;

Xaa18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;

Xaa21 представляет собой цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин или аспарагиновую кислоту;

Xaa23 представляет собой изолейцин или валин;

Xaa24 представляет собой цистеин, глутамин или аспарагин;

Xaa28 представляет собой цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;

Xaa29 представляет собой глутамин, цистеин или гистидин; и

Xaa30 представляет собой цистеин, лизин или гистидин.

В еще одном конкретном воплощении X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 3, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-

Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-

Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (общая формула 3, SEQ ID NO:105).

В общей формуле 3

Xaa1 представляет собой гистидин или тирозин;

Xaa2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Xaa13 представляет собой аланин, тирозин или цистеин;

Xaa17 представляет собой аргинин, цистеин или лизин;

Xaa18 представляет собой аланин или аргинин;

Xaa19 представляет собой аланин или цистеин;

Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;

Xaa24 представляет собой глутамин или аспарагин;

Xaa28 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;

Xaa29 представляет собой цистеин, гистидин или глутамин;

Xaa30 представляет собой цистеин или гистидин;

Xaa31 представляет собой пролин или цистеин; и

Xaa40 представляет собой цистеин или отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении R1 представляет собой цистеин, GKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), CSSGQPPPS (SEQ ID NO: 109), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110), GPSSGAPPPSC (SEQ ID NO: 111), PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112), PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 113), PSSGAPPPSHG (SEQ ID NO: 114), PSSGAPPPSS (SEQ ID NO: 115), PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 116) или PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 117) или

отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении в общих формулах 1-3 16-я аминокислота и 20-я аминокислота с N-конца вместе образуют кольцо.

В еще одном конкретном воплощении X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102.

В еще одном конкретном воплощении F выбран из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, связывающегося с альбумином вещества, полимера из повторяющихся единиц определенных аминокислотных последовательностей, антитела, фрагмента антитела, вещества, связывающегося с FcRn, соединительной ткани *in vivo*, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и эластина.

В еще одном конкретном воплощении F представляет собой полимер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении F представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

В еще одном конкретном воплощении F представляет собой Fc-область IgG.

В еще одном конкретном воплощении L выбран из группы, состоящей из пептида, жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении L представляет собой полимер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении L представляет собой полиэтиленгликоль.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотид, кодирующий указанный конъюгат, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и трансформант, содержащий указанные полинуклеотид или вектор.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая указанный конъюгат.

В одном конкретном воплощении композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

В другом конкретном воплощении композиция предназначена для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

В еще одном конкретном воплощении метаболический синдром может включать нарушение толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемия, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, вызванный дислипидемией артериосклероз, атеросклероз, артериосклероз или ишемическую болезнь сердца.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения целевого заболевания, включающий введение указанного конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат, субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном конкретном воплощении заболевание представляет собой метаболический синдром.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение указанного конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат, в изготовлении лекарственного средства.

В одном конкретном воплощении лекарственное средство предназначено для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

Полезные эффекты изобретения.

Конъюгат тройного агониста по настоящему изобретению обладает активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиноотропного полипептида (GIP) и поэтому может быть применен для лечения метаболического синдрома.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена гистограмма, на которой показаны результаты измерения изменения массы тела в модели ожирения у животных (мышей) с интервалами по двое суток во время введения мышам длительно действующего конъюгата тройного агониста с жирным кормом один раз в двое суток на протяжении 28 суток ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, сравнение с наполнителем с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA));

на фиг. 2 - гистограмма, на которой показаны результаты измерения количества брыжеечного жира в модели ожирения у животных (мышей) с интервалами по двое суток во время введения мышам длительно действующего конъюгата тройного агониста с жирным кормом один раз в двое суток на протяжении 28 суток ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, сравнение с наполнителем посредством однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)).

Подробное описание изобретения

Далее изобретение будет описано более подробно.

Каждое из объяснений и типичных воплощений, раскрытых здесь, вместе с тем применимо к другим объяснениям и типичным воплощениям. Т.е. объем настоящего изобретения включает все комбинации различных факторов, раскрытых здесь. Кроме того, объем настоящего изобретения не следует ограничивать конкретным описанием, представленным ниже.

Во всем описании настоящего изобретения использованы не только традиционные однобуквенные и трехбуквенные коды встречающихся в природе аминокислот, но также трехбуквенные коды, обычно используемые для других аминокислот, таких как α -аминоизомасляная кислота (Aib), Sar (N-метилглицин) и α -метилглутаминовая кислота.

Кроме того, аминокислоты, указанные здесь, обозначены сокращениями, соответствующими правилам номенклатуры IUPAC-IUB, как показано ниже:

аланин (Ala, A)	аргинин (Arg, R)
аспарагин (Asn, N)	аспарагиновая кислота (Asp, D)
цистеин (Cys, C)	глутаминовая кислота (Glu, E)
глутамин (Gln, Q)	глицин (Gly, G)
гистидин (His, H)	изолейцин (Ile, I)
лейцин (Leu, L)	лизин (Lys, K)
метионин (Met, M)	фенилаланин (Phe, F)
пролин (Pro, P)	серин (Ser, S)
треонин (Thr, T)	триптофан (Trp, W)
тирозин (Tyr, Y)	валин (Val, V)

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат пептида, обладающего активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP).

В настоящем изобретении конъюгат пептида, обладающего активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP, может быть представлен в форме, в которой с пептидом конъюгировано биологически совместимое вещество, увеличивающее период полувыведения пептида *in vivo*. В настоящем изобретении биологически совместимое вещество может быть использовано взаимозаменяемо с носителем.

В настоящем изобретении конъюгат пептида может демонстрировать эффективность дольше, чем пептид без конъюгированного носителя, и указанный конъюгат назван здесь "длительно действующим конъюгатом".

В то же время такой конъюгат может не встречаться в природе.

В одном конкретном воплощении настоящего изобретения конъюгат представляет собой конъюгат, представленный химической формулой 1, приведенной ниже:

[химическая формула 1]

X - La - F,

где X представляет собой пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP);

L представляет собой линкер;

a представляет собой 0 или положительное целое число при условии, что, когда a представляет собой 2 или более, каждый L не зависит от другого(их) L; и

F представляет собой вещество, способное увеличивать период полувыведения X.

В настоящем изобретении "пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP", может соответствовать структуре одной группировки, составляющей указанный выше конъюгат. Конкретно, пептид соответствует X в химической формуле 1, приведенной выше.

В настоящем изобретении пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP, может быть использован взаимозаменяемо с тройным агонистом.

Пептид может содержать различные вещества (например, различные пептиды), обладающие существенным уровнем активности в отношении рецепторов глюкагона, GLP-1 и GIP.

Тройной агонист, обладающий существенным уровнем активности в отношении рецепторов глюкагона, GLP-1 и GIP, может демонстрировать *in vitro* активность, составляющую 0,1% или более, 1% или более, 2% или более, 3% или более, 4% или более, 5% или более, 6% или более, 7% или более, 8% или более, 9% или более, 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 60% или более, 70% или более, 80% или более, 90% или более и 100% или более, в отношении одного или более рецепторов, конкретно, двух или более рецепторов и, конкретнее, всех трех рецепторов из рецеп-

торов глюкагона, GLP-1 и GIP, по сравнению с нативными лигандами соответствующих рецепторов (нативным глюкагоном, нативным GLP-1 и нативным GIP), без ограничения указанными вариантами.

Способ измерения активности тройного агониста *in vitro* может соответствовать экспериментальному примеру 1 настоящего изобретения, но не ограничен им.

В то же время тройной агонист характеризуется наличием одной или более, двух или более и, конкретно, всех трех из следующих видов активности (1)-(3), конкретно, существенными уровнями указанных видов активности:

(1) активации рецептора GLP-1; (2) активации рецептора глюкагона; и (3) активации рецептора GIP.

В частности, активация рецепторов может включать, например, случаи, когда активность пептида *in vitro* составляет 0,1% или более, 1% или более, 2% или более, 3% или более, 4% или более, 5% или более, 6% или более, 7% или более, 8% или более, 9% или более, 10% или более, 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 60% или более, 70% или более, 80% или более, 90% или более и 100% или более по сравнению с нативными лигандами соответствующих рецепторов, но активация не ограничена указанными вариантами.

Кроме того, тройной агонист может представлять собой тройной агонист, имеющий увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с любым из нативного GLP-1, нативного глюкагона и нативного GIP, но не ограничен указанным вариантом.

Указанный выше аналог глюкагона может представлять собой аналог, не встречающийся в природе, но не ограничен указанным вариантом.

Конкретно, выделенный пептид может представлять собой аналог нативного глюкагона, но не ограничен указанным вариантом.

Аналог нативного глюкагона по настоящему изобретению может включать пептиды, имеющие по меньшей мере одно отличие в аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного глюкагона; пептиды, модифицированные посредством модификации последовательности нативного глюкагона; и миметики нативного глюкагона.

В то же время нативный глюкагон может иметь, без ограничения, следующую аминокислотную последовательность:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-

Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO:118).

Конкретно, выделенный пептид может представлять собой аналог нативного глюкагона с вариацией, выбранной из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации по меньшей мере одной аминокислоты в последовательности нативного глюкагона и их комбинации, но не ограничен указанным вариантом.

Кроме того, замена аминокислоты может включать как замену на аминокислоту, так и замену на ненативное соединение.

Кроме того, добавление может быть проведено на N-конце и/или C-конце пептида. В то же время длина аминокислот для добавления не ограничена, но могут быть добавлены 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более и 11 или более аминокислот, и, в широком смысле, добавление может включать добавление полипептида, но не ограничено им.

Конкретнее, аналог глюкагона может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 16 или более, 17 или более, 18 или более, 19 или более или 20 аминокислот, выбранные из группы, состоящей из аминокислот в положениях 1, 2, 3, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 и 29, в аминокислотной последовательности нативного глюкагона заменены другими аминокислотами, и, кроме того, может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более или 11 или более аминокислот независимо или дополнительно добавлены к его C-концу, без ограничения указанными вариантами.

Еще конкретнее, аналог глюкагона может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 16 или более, 17 или более, 18 или более или 19 аминокислот, выбранные из группы, состоящей из аминокислот в положениях 1, 2, 3, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 и 29, в аминокислотной последовательности нативного глюкагона заменены другими аминокислотами, и, кроме того, может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более или 11 или более аминокислот независимо или дополнительно добавлены к его C-концу, без ограничения указанными вариантами.

Еще конкретнее, аналог глюкагона может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 16 или более или 17

аминокислот, выбранные из группы, состоящей из аминокислот в положениях 1, 2, 3, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 28 и 29, в аминокислотной последовательности нативного глюкагона заменены другими аминокислотами, и, кроме того, может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более или 11 или более аминокислот независимо или дополнительно добавлены к его С-концу, без ограничения указанными вариантами.

Конкретнее, аналог глюкагона может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более, 14 или более, 15 или более, 16 или более, 17 или более, 18 или более, 19 или более или 20 аминокислот, выбранные из группы, состоящей из аминокислот в положениях 1, 2, 3, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 и 29, в аминокислотной последовательности нативного глюкагона заменены другими аминокислотами, и, кроме того, может представлять собой аналог глюкагона, где 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более, 10 или более или 11 или более аминокислот независимо или дополнительно добавлены к его С-концу, без ограничения указанными вариантами.

Аминокислоты для включения в указанный выше нативный глюкагон могут быть выбраны из группы, состоящей из тирозина, α -метилглутаминовой кислоты, Aib, метионина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, лейцина, изолейцина, глутамина, валина, глицина, аланина, цистеина, серина, аланина, аспарагиновой кислоты и аргинина, без ограничения указанными вариантами.

Например, аминокислотная последовательность (последовательности) для добавления может представлять собой по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, имеющую происхождение от аминокислотной последовательности нативного GLP-1, нативного GIP или нативного эксендина-4.

Аналог глюкагона или тройной агонист может включать внутримолекулярную связь (например, ковалентную поперечную сшивку или нековалентную поперечную сшивку) и, конкретно, представлен в форме, содержащей кольцо, например, в форме, где кольцо образовано между 16-й аминокислотой и 20-й аминокислотой аналога глюкагона или тройного агониста, без ограничения указанным вариантом.

Неограничивающий пример кольца может включать лактамную связь (лактамное кольцо).

Кроме того, аналог глюкагона или тройной агонист включает все аналоги глюкагона или тройные агонисты, модифицированные с включением кольца или включением аминокислоты, способной образовывать кольцо в целевом положении.

Например, аналог глюкагона или тройной агонист могут представлять собой аналог глюкагона или тройной агонист, где аминокислотная пара из 16- и 20-й аминокислот заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые могут образовывать кольцо, соответственно, но аналог глюкагона или тройной агонист не ограничен указанным вариантом.

Кольцо может быть образовано между боковыми цепями аминокислот аналога глюкагона или тройного агониста; например, оно может быть представлено в форме лактамного кольца между боковой цепью лизина и боковой цепью глутаминовой кислоты, но кольцо не ограничено указанным вариантом.

Примеры аналога глюкагона, полученного комбинацией этих способов, могут включать пептиды, аминокислотные последовательности которых отличаются от аминокислотной последовательности нативного глюкагона по меньшей мере одной аминокислотой и у которых удален α -углерод N-конца, обладающие, в то же время, активностью в отношении рецептора GLP-1, рецептора GIP и так далее, без ограничения указанными вариантами, и аналоги нативного глюкагона, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены комбинированием различных способов получения аналогов.

Кроме того, применительно к тройному агонисту по настоящему изобретению, часть аминокислот может быть заменена другими аминокислотами или синтетическими соединениями во избежание распознавания пептидазой для увеличения периода полувыведения тройного агониста *in vivo*, но тройной агонист не ограничен указанными вариантами.

Конкретно, пептид может представлять собой пептид, где период полувыведения *in vivo* был увеличен, благодаря избежанию распознавания пептидазой посредством замены 2-й аминокислоты аминокислотной последовательности тройного агониста, но изобретение включает любую, без ограничения, замену или модификацию аминокислот, позволяющую избежать распознавания пептидазой *in vivo*.

Кроме того, такая модификация для получения аналогов нативного глюкагона может включать все модификации с использованием аминокислот L-типа или D-типа и/или синтетических аминокислот; и/или модификацию нативной последовательности, например модификацию функциональной группы боковой цепи, образование внутримолекулярных ковалентных связей (например, образование кольца между боковыми цепями), метилирование, ацилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, аминоксанирование, биотинилирование и так далее.

Кроме того, модификация может также включать все модификации с добавлением одной или более чем одной аминокислоты к N- и/или С-концу нативного глюкагона.

При замене или добавлении аминокислот могут быть использованы не только 20 аминокислот, обычно обнаруживаемые в человеческих белках, но также атипичные или не встречающиеся в природе

аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот могут включать Sigma-Aldrich, Chem-Pep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, содержащие эти аминокислоты, и обычные пептидные последовательности могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например, American Peptide Company, Bachem (США) и Anygen (Корея).

Производные аминокислот могут быть получены сходным образом, и, в качестве одного такого примера, может быть использована 4-имидазолуксусная кислота.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть представлен в форме варианта, где N- и/или C-конец и так далее пептида химически модифицирован или защищен органическими группами или к концу пептида могут быть добавлены аминокислоты для его защиты от протеаз *in vivo* с повышением его стабильности.

В частности, в случае химически синтезированного пептида его N- и C-концы электрически заряжены, и поэтому N- и C-концы пептида могут быть ацетилированы и/или амидированы, но пептид не ограничен указанными вариантами.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может включать все пептиды в форме собственно пептида, его соли (например, его фармацевтически приемлемой соли) или его сольвата. Кроме того, пептид может быть представлен в любой фармацевтически приемлемой форме.

Существенных ограничений по типу соли нет. Тем не менее, соль предпочтительно представляет собой, без ограничения, соль, безопасную и эффективную для субъекта, например млекопитающего.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу, которое может быть эффективно использовано для предполагаемого применения в рамках фармако-медицинского решения, не приводя к чрезмерной токсичности, раздражению, аллергическим реакциям и так далее.

При использовании в настоящем описании термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, имеющей происхождение от фармацевтически приемлемых неорганических кислот, органических кислот или оснований. Примеры подходящих кислот могут включать соляную кислоту, бромноватую кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, ортофосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и так далее. Примеры подходящих оснований для получения солей могут включать щелочные металлы, такие как натрий, калий и так далее; щелочно-земельные металлы, такие как магний; аммоний и так далее.

При использовании в настоящем описании термин "сольват" относится к комплексу, образованному пептидом по настоящему изобретению или его солью и молекулой растворителя.

В одном конкретном воплощении X может представлять собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 1, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-

Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-

Xaa30-R1 (общая формула 1, SEQ ID NO:103)

В общей формуле 1, приведенной выше,

Xaa1 представляет собой гистидин (His, H), 4-имидазоацетил (CA) или тирозин (Tyr, Y);

Xaa2 представляет собой глицин (Gly, G), α-метилглутаминовую кислоту или Aib;

Xaa3 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E) или глутамин (Gln, Q);

Xaa7 представляет собой треонин (Thr, T) или изолейцин (Ile, I);

Xaa10 представляет собой лейцин (Leu, L), тирозин (Tyr, Y), лизин (Lys, K), цистеин (Cys, C) или валин (Val, V);

Xaa12 представляет собой лизин (Lys, K), серин (Ser, S) или изолейцин (Ile, I);

Xaa13 представляет собой глутамин (Gln, Q), тирозин (Tyr, Y), аланин (Ala, A) или цистеин (Cys, C);

Xaa14 представляет собой лейцин (Leu, L), метионин (Met, M) или тирозин (Tyr, Y);

Xaa15 представляет собой цистеин (Cys, C), аспарагиновую кислоту (Asp, D), глутаминовую кислоту (Glu, E) или лейцин (Leu, L);

Xaa16 представляет собой глицин (Gly, G), глутаминовую кислоту (Glu, E) или серин (Ser, S);

Xaa17 представляет собой глутамин (Gln, Q), аргинин (Arg, R), изолейцин (Ile, I), глутаминовую кислоту (Glu, E), цистеин (Cys, C) или лизин (Lys, K);

Xaa18 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H);

Xaa19 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), цистеин (Cys, C) или валин (Val, V);

Xaa20 представляет собой лизин (Lys, K), глутамин (Gln, Q) или аргинин (Arg, R);

Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E), глутамин (Gln, Q), лейцин (Leu, L), цистеин (Cys, C) или аспарагиновую кислоту (Asp, D);

Xaa23 представляет собой изолейцин (Ile, I) или валин (Val, V);

Xaa24 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), цистеин (Cys, C), аспарагин (Asn, N),

аспарагиновую кислоту (Asp, D) или глутаминовую кислоту (Glu, E);

Хаа27 представляет собой валин (Val, V), лейцин (Leu, L), лизин (Lys, K) или метионин (Met, M);

Хаа28 представляет собой цистеин (Cys, C), лизин (Lys, K), аланин (Ala, A), аспарагин (Asn, N) или аспарагиновую кислоту (Asp, D);

Хаа29 представляет собой цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), глутамин (Gln, Q), треонин (Thr, T), глутаминовую кислоту (Glu, E) или гистидин (His, H);

Хаа30 представляет собой цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), лизин (Lys, K) или гистидин (His, H) или отсутствует;

R1 представляет собой цистеин (Cys, C), GKKNWVKHNIT (SEQ ID NO: 106), m-SSGAPPPS-n (SEQ ID NO: 107) или m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO: 108) или отсутствует,

где m представляет собой -Cys-, -Pro- или -Gly-Pro-;

n представляет собой -Cys-, -Gly-, -Ser- или -His-Gly- или отсутствует.

Например, тройной агонист может представлять собой тройной агонист, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102; и тройной агонист, состоящий (главным образом) из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102, но не ограничен указанными вариантами.

Кроме того, несмотря на то что он описан в настоящем изобретении как "пептид, состоящий из определенной SEQ ID NO", это не исключает мутацию, которая может произойти в результате добавления незначительной последовательности выше или ниже аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, или мутацию, которая может произойти естественным образом, или "молчащую" мутацию, при условии, что рассматриваемый пептид обладает активностью, идентичной или соответствующей активности пептида, состоящего из аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, и даже при наличии добавления или мутации последовательности он очевидным образом входит в объем настоящего изобретения.

Изложенное выше может быть применимо к другим конкретным воплощениям или аспектам настоящего изобретения, но не ограничено ими.

Конкретно, в общей формуле 1, приведенной выше, Хаа14 может представлять собой лейцин или метионин и Хаа15 может представлять собой цистеин, аспарагиновую кислоту или лейцин.

Примеры пептида могут включать пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-12, 14-17 и 21-102, или пептид, состоящий (главным образом) из такой аминокислотной последовательности, но не ограничены указанными вариантами.

Пептид может существенно активировать по меньшей мере один из рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP, но не ограничен ими. Конкретно, пептид может представлять собой пептид, существенно активирующий рецептор GLP-1 или, дополнительно, рецептор глюкагона и/или рецептор GIP, без ограничения указанными вариантами.

Еще конкретнее, пептид может представлять собой следующее:

в общей формуле 1, приведенной выше,

Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Хаа7 представляет собой треонин;

Хаа10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;

Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;

Хаа13 представляет собой тирозин, аланин, глутамин или цистеин;

Хаа14 представляет собой лейцин, цистеин или метионин;

Хаа15 представляет собой цистеин, лейцин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;

Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, цистеин, глутаминовую кислоту или лизин;

Хаа18 представляет собой аланин, глутамин, аргинин или гистидин;

Хаа19 представляет собой аланин, глутамин, валин или цистеин;

Хаа20 представляет собой лизин, аргинин или глутамин;

Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту, глутамин, лейцин, цистеин или аспарагиновую кислоту;

Хаа23 представляет собой изолейцин или валин;

Хаа24 представляет собой цистеин, аланин, глутамин, аспарагин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту; и

Хаа27 представляет собой лейцин или лизин, без ограничения указанными вариантами.

Еще конкретнее, в общей формуле 1, приведенной выше,

Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Хаа7 представляет собой треонин;

Хаа10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;

Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;

Хаа13 представляет собой тирозин, аланин или цистеин;

Хаа14 представляет собой лейцин или метионин;

Хаа15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой аланин, глутамин, цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту; и
 Хаа27 представляет собой лейцин или лизин, без ограничения указанными вариантами.
 Еще конкретнее, в общей формуле 1, приведенной выше,
 Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин или цистеин;
 Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;
 Хаа13 представляет собой тирозин, аланин или цистеин;
 Хаа14 представляет собой лейцин или метионин;
 Хаа15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глутаминовую кислоту;
 Хаа17 представляет собой аргинин, изолейцин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой глутамин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа27 представляет собой лейцин; и
 Хаа28 представляет собой цистеин, аланин, аспарагин или аспарагиновую кислоту.
 Конкретно, в общей формуле 1, приведенной выше,
 Хаа1 представляет собой гистидин или 4-имидазоацетил;
 Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа3 представляет собой глутамин;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин;
 Хаа12 представляет собой изолейцин;
 Хаа13 представляет собой аланин или цистеин;
 Хаа14 представляет собой метионин;
 Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глутаминовую кислоту;
 Хаа17 представляет собой изолейцин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин;
 Хаа21 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой аспарагин;
 Хаа27 представляет собой лейцин;
 Хаа28 представляет собой аланин или аспарагин;
 Хаа29 представляет собой глутамин или треонин; и
 Хаа30 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует.
 Конкретнее, в общей формуле 1, приведенной выше,
 Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа3 представляет собой глутамин;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;
 Хаа12 представляет собой лизин;
 Хаа13 представляет собой тирозин;
 Хаа14 представляет собой лейцин;
 Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глицин, глутаминовую кислоту или серин;
 Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;

Хаа19 представляет собой аланин или глутамин;
 Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Хаа27 представляет собой лейцин или лизин; и
 Хаа29 представляет собой глицин, глутамин, треонин или гистидин;
 без ограничения указанными вариантами.

Эти пептиды могут соответствовать случаю, когда пептид обладает существенными уровнями активации как рецептора GLP-1, так и рецептора глюкагона или более высокими уровнями активации по сравнению с уровнем активации рецептора GIP; случаю, когда пептид обладает существенными уровнями активации рецептора GLP-1, рецептора глюкагона и рецептора GIP; или случаю, когда пептид обладает существенными уровнями активации как рецептора GLP-1, так и рецептора GIP и более высокими уровнями активации по сравнению с уровнем активации рецептора глюкагона; без ограничения указанными вариантами.

Когда пептид обладает существенными уровнями активации как рецептора GLP-1, так и рецептора GIP, а также более высокими уровнями активации по сравнению с уровнем активации рецептора глюкагона, можно обеспечить пептид с улучшенной способностью к регуляции уровней глюкозы в крови наряду с уменьшением массы тела, а когда пептид обладает существенными уровнями активации рецептора GLP-1, рецептора глюкагона и рецептора GIP, преимущество состоит в возможности максимального уменьшения массы тела, но эффекты не ограничены указанными вариантами.

Примеры пептида могут включать пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, 9, 21-37, 39, 42, 43, 49-61, 64-83, 85, 86, 88, 89, 91-93 и 95-102, или пептид, состоящий (главным образом) из такой аминокислотной последовательности, но не ограничены указанными вариантами.

В одном конкретном воплощении пептид может содержать аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 2, приведенной ниже:

Хаа1-Хаа2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Хаа10-Ser-Lys-Хаа13-Хаа14-Хаа15-Хаа16-

Хаа17-Хаа18-Хаа19-Хаа20-Хаа21-Phe-Хаа23-Хаа24-Trp-Leu-Leu-Хаа28-Хаа29-Хаа30-

Хаа31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Ser-Хаа40 (общая формула 2, SEQ ID NO:104)

В общей формуле 2, приведенной выше,

Хаа1 представляет собой 4-имидазоацетил, гистидин или тирозин;

Хаа2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Хаа10 представляет собой тирозин или цистеин;

Хаа13 представляет собой аланин, глутамин, тирозин или цистеин;

Хаа14 представляет собой лейцин, метионин или тирозин;

Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или лейцин;

Хаа16 представляет собой глицин, глутаминовую кислоту или серин;

Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, глутаминовую кислоту, цистеин или лизин;

Хаа18 представляет собой аланин, глутамин, аргинин или гистидин;

Хаа19 представляет собой аланин, глутамин, цистеин или валин;

Хаа20 представляет собой лизин, глутамин или аргинин;

Хаа21 представляет собой цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин, лейцин или аспарагиновую кислоту;

Хаа23 представляет собой изолейцин или валин;

Хаа24 представляет собой цистеин, аланин, глутамин, аспарагин или глутаминовую кислоту;

Хаа28 представляет собой лизин, цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;

Хаа29 представляет собой глицин, глутамин, цистеин или гистидин;

Хаа30 представляет собой цистеин, глицин, лизин или гистидин;

Хаа31 представляет собой пролин или цистеин; и

Хаа40 представляет собой цистеин или отсутствует.

Конкретнее, в общей формуле 2, приведенной выше,

Хаа13 представляет собой аланин, тирозин или цистеин;

Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

Хаа17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;

Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;

Хаа21 представляет собой цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин или аспарагиновую кислоту;

Хаа23 представляет собой изолейцин или валин;

Хаа24 представляет собой цистеин, глутамин или аспарагин;

Хаа28 представляет собой цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;

Xaa29 представляет собой глутамин, цистеин или гистидин; и

Xaa30 представляет собой цистеин, лизин или гистидин.

Примеры пептида могут включать пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:21, 22, 42, 43, 50, 64-77 и 95-102; конкретнее, пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:21, 22, 42, 43, 50, 64-77 и 96-102; или пептид, состоящий (главным образом) из такой аминокислотной последовательности, но не ограничены указанными вариантами.

В одном конкретном воплощении пептид может содержать аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 3, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Xaa13-Leu-Asp-Glu-Xaa17-

Xaa18-Xaa19-Lys-Xaa21-Phe-Val-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-Xaa31-Ser-Ser-

Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (общая формула 3, SEQ ID NO:105)

В общей формуле 3, приведенной выше,

Xaa1 представляет собой гистидин или тирозин;

Xaa2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;

Xaa13 представляет собой аланин, тирозин или цистеин;

Xaa17 представляет собой аргинин, цистеин или лизин;

Xaa18 представляет собой аланин или аргинин;

Xaa19 представляет собой аланин или цистеин;

Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;

Xaa24 представляет собой глутамин или аспарагин;

Xaa28 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;

Xaa29 представляет собой цистеин, гистидин или глутамин;

Xaa30 представляет собой цистеин или гистидин;

Xaa31 представляет собой пролин или цистеин; и

Xaa40 представляет собой цистеин или отсутствует.

Примеры пептида могут включать пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:21, 22, 42, 43, 50, 64-71, 75-77 и 96-102, или пептид, состоящий (главным образом) из такой аминокислотной последовательности, но не ограничены указанными вариантами.

Кроме того, в общей формуле 1, приведенной выше, R1 может представлять собой цистеин, GKKNWDKHNIT (SEQ ID NO: 106), CSSGQPPPS (SEQ ID NO: 109), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110), GPSSGAPPPSC (SEQ ID NO: 111), PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112), PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 113), PSSGAPPPSHG (SEQ ID NO: 114), PSSGAPPPSS (SEQ ID NO: 115), PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 116) или PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 117) или отсутствует, но не ограничен указанными вариантами.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть синтезирован методом, хорошо известным в данной области, соответствующим его длине, например, автоматическим пептидным синтезатором, и может быть получен генно-инженерной технологией.

Конкретно, пептид по настоящему изобретению может быть получен методом стандартного синтеза, в системе рекомбинантной экспрессии или любым другим методом, известным в данной области. Соответственно, пептид по настоящему изобретению может быть синтезирован многими способами, включая, например, способы, описанные ниже:

(а) способ синтеза пептида твердофазным или жидкофазным методом, пошагово или сборкой фрагментов, с последующим выделением и очисткой конечного пептидного продукта; или

(б) способ экспрессии конструированной нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, в клетке-хозяине и выделения продукта экспрессии из культуры клеток-хозяев; или

(в) способ проведения бесклеточной экспрессии конструированной нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, *in vitro* и выделения продукта экспрессии; или

способ получения пептидных фрагментов любой комбинацией способов (а), (б) и (в), получения пептида связыванием пептидных фрагментов с последующим выделением пептида.

В описанном выше конъюгате F представляет собой вещество, которое может увеличивать период полувыведения X, т.е. пептида, обладающего активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP, и оно соответствует структуре группировки, составляющей конъюгат по настоящему изобретению.

F и X могут быть связаны друг с другом ковалентной химической связью или нековалентной химической связью; или F и X могут быть связаны друг с другом через L посредством ковалентной химической связи, нековалентной химической связи или их комбинации.

Вещество, которое может увеличивать период полувыведения X, может представлять собой биологически совместимое вещество, например, выбранное из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, вещества, связывающегося с альбумином, полимера из по-

вторяющихся единиц определенных аминокислотных последовательностей, антитела, фрагмента антитела, вещества, связывающегося с FcRn, соединительной ткани *in vivo*, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахараида, гепарина и эластина, но не ограничено указанными вариантами.

Эластин может представлять собой человеческий тропозластин, являющийся водорастворимым предшественником, и может представлять собой определенную последовательность тропозластина или полимер из его определенных повторяющихся единиц, например, включая все полипептиды, аналогичные эластину, но не ограничен указанными вариантами.

Примеры полимера могут быть выбраны из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG), полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации, но не ограничены указанными вариантами.

Полиэтиленгликоль включает все формы гомополимеров этиленгликоля, сополимеры PEG и метил-замещенные полимеры PEG (mPEG), но не ограничен указанными вариантами.

Кроме того, биологически совместимое вещество может включать полиаминокислоты, такие как полилизин, полиаспарагиновая кислота и полиглутаминовая кислота, но не ограничено указанными вариантами.

Кроме того, жирная кислота может представлять собой жирную кислоту, имеющую аффинность связывания с альбумином *in vivo*, но не ограничена указанным вариантом.

В одном более конкретном воплощении вещество, связывающееся с FcRn, может представлять собой Fc-область иммуноглобулина и, конкретнее, Fc-область IgG, но не ограничено указанными вариантами.

С биологически совместимым веществом может быть соединена по меньшей мере одна боковая цепь аминокислоты пептида по настоящему изобретению для увеличения его растворимости и/или периода полувыведения *in vivo* и/или повышения биодоступности. Эти модификации могут снижать клиренс терапевтических белков и пептидов.

Биологически совместимый полимер может быть водорастворимым (амфипатичным или гидрофильным), и/или нетоксичным, и/или фармацевтически приемлемым.

F может быть связан с X напрямую (т.е. в химической формуле 1 а представляет собой 0) или может быть связан с ним через линкер (L).

Конкретно, L может представлять собой пептидный линкер или непептидный линкер, но не ограничен указанными вариантами.

Когда L представляет собой пептидный линкер, он может содержать одну или более чем одну аминокислоту, например, от 1 до 1000 аминокислот, но не ограничен указанными вариантами. В настоящем изобретении для связывания F и X могут быть использованы различные известные пептидные линкеры (например, включая линкер [GS]_x, линкер [GGGS]_x, линкер [GGGGS]_x и так далее, где x представляет собой натуральное число, составляющее по меньшей мере 1), однако пептидные линкеры не ограничены указанными вариантами.

В настоящем изобретении "непептидный линкер" включает биологически совместимый полимер, с которым связаны по меньшей мере две повторяющиеся единицы. Вместо пептидной связи повторяющиеся единицы связаны друг с другом любой ковалентной связью. Непептидный линкер может представлять собой одну структуру, составляющую группировку конъюгата по настоящему изобретению, и соответствовать L в химической формуле 1, приведенной выше.

В La химической формулы 1 а может представлять собой 1 или более и, когда а представляет собой 2 или более, каждый L может не зависеть от другого(их) L.

При использовании в настоящем описании термин "непептидный линкер" может быть использован взаимозаменяемо с "непептидным полимером".

Кроме того, в одном конкретном воплощении конъюгат может представлять собой конъюгат, в котором F и X ковалентно связаны друг с другом через непептидный линкер, имеющий две реакционно-способные концевые группы, связанные с X, конкретнее, с пептидным лекарственным средством, и с F, конкретнее, с Fc-областью иммуноглобулина, соответственно.

Конкретно, непептидный линкер может представлять собой непептидный линкер, выбранный из группы, состоящей из жирной кислоты, сахараида, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

Несмотря на отсутствие ограничений, непептидный линкер может представлять собой непептидный линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA), липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации. В одном более конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, но не ограничен им. Кроме того, объем настоящего изобретения включает производные указанных выше веществ, уже известные в данной области техники, и производные, которые могут легко быть получены с учетом технологического уровня в дан-

ной области.

Непептидный линкер для использования в настоящем изобретении может представлять собой, без ограничения, любой полимер, обладающий устойчивостью к протеазам *in vivo*. Молекулярная масса непептидного полимера может входить в диапазон от 1 до 100 кДа и, конкретно, от 1 до 20 кДа, но не ограничена указанными диапазонами. Кроме того, непептидный линкер по настоящему изобретению, связанный с полипептидом, соответствующим F, может включать не только один тип полимера, но также комбинацию разных типов полимеров.

В одном конкретном воплощении оба конца непептидного линкера могут быть соответственно связаны с аминогруппой или тиоловой группой F, например, Fc-области иммуноглобулина, или аминогруппой или тиоловой группой X.

Конкретно, непептидный полимер может содержать реакционноспособную группу, которая может быть связана с F (например, Fc-областью иммуноглобулина) и X, на обоих своих концах, соответственно, и, конкретно, реакционноспособную группу, которая может быть связана с аминогруппой, расположенной на N-конце или лизине, или тиоловой группой цистеина X, с аминогруппой, расположенной на N-конце или лизине, или тиоловой группой цистеина F (например, Fc-области иммуноглобулина), но реакционноспособная группа не ограничена указанными вариантами.

Кроме того, реакционноспособная группа непептидного полимера, которая может быть связана с Fc-областью иммуноглобулина и X, может быть выбрана из группы, состоящей из альдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного, но не ограничена указанными вариантами.

Примеры указанной выше альдегидной группы могут включать, без ограничения, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу.

В качестве указанного выше сукцинимидного производного могут быть использованы сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутанонат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутанонат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат, однако сукцинимидное производное не ограничено указанными вариантами.

Непептидный линкер может быть связан с X и F через эти реакционноспособные группы, но реакционноспособные группы не ограничены указанными вариантами.

Кроме того, конечный продукт, полученный восстановительным алкилированием через альдегидную связь, стабильнее продукта, связанного амидной связью. Альдегидная реакционноспособная группа селективно взаимодействует с N-концом в условиях низкого pH, в то время как при высоком pH (например, pH 9,0) она может образовывать ковалентную связь с лизиновым остатком.

Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного линкера могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга, например, на одном конце может присутствовать малеимидная реакционноспособная группа, в то время как на другом конце может присутствовать альдегидная группа, пропиональдегидная группа или бутиральдегидная группа. Тем не менее, при условии, что F, конкретно, Fc-область иммуноглобулина, может быть связано с X, существенных ограничений по реакционноспособным группам нет.

Например, непептидный линкер может иметь малеимидную группу в качестве реакционноспособной группы на одном конце, имея в то же время альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу и так далее на другом конце.

При использовании полиэтиленгликоля, имеющего реакционноспособную гидроксигруппу на обоих своих концах, в качестве непептидного полимера гидроксигруппа может быть активирована с образованием различных реакционноспособных групп известными химическими реакциями, или для получения длительно действующего белкового конъюгата по настоящему изобретению может быть использован полиэтиленгликоль с имеющейся в продаже модифицированной реакционноспособной группой.

В одном конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой непептидный полимер, который может быть связан с цистеиновым остатком X, и, конкретнее, с группой -SH цистеина, но не ограничен указанным вариантом.

При использовании малеимид-PEG-альдегида малеимидная группа может быть связана с группой -SH X тиоэфирной связью, а альдегидная группа может быть связана с F, конкретно, с -NH₂ Fc иммуноглобулина, восстановительным алкилированием, без ограничения указанными вариантами, и приведенное выше является лишь одним из воплощений.

Кроме того, в описанном выше конъюгате реакционноспособная группа непептидного полимера может быть связана с -NH₂, расположенной на N-конце Fc иммуноглобулина, но это является лишь одним из воплощений.

В настоящем изобретении термин "Fc-область иммуноглобулина" относится к области, содержащей константную область 2 тяжелой цепи (CH₂) и/или константную область 3 тяжелой цепи (CH₃) без вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина. Fc-область иммуноглобулина может представлять собой одну структуру, составляющую группировку белкового конъюгата по настоящему изобретению.

Fc-область иммуноглобулина может содержать шарнирную область константной области тяжелой

цепи, но не ограничена указанным вариантом. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по изобретению может представлять собой расширенную Fc-область, содержащую часть или всю константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константную область 1 легкой цепи (CL1) без переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при условии, что Fc-область иммуноглобулина оказывает эффект, по существу идентичный или улучшенный по сравнению с нативным типом. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, из которой удалена протяженная часть аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3.

Например, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой: (1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 и домен CH4; (2) домен CH1 и домен CH2; (3) домен CH1 и домен CH3; (4) домен CH2 и домен CH3; (5) комбинацию одного или более чем одного домена из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной области иммуноглобулина (или части шарнирной области); и (6) димер каждого домена константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи; но не ограничена указанными вариантами.

Кроме того, в одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина может быть в димерной форме и одна молекула X может быть ковалентно связана с одной Fc-областью димерной формы, где Fc-область иммуноглобулина и X могут быть связаны друг с другом непептидным полимером. В то же время, две молекулы X могут также быть симметрично связаны с димерной формой Fc-области. Тем не менее, связывание не ограничено указанными вариантами.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению включает не только нативную аминокислотную последовательность, но также последовательности ее производных. Производное аминокислотной последовательности относится к аминокислотной последовательности, отличающейся по меньшей мере одним аминокислотным остатком по причине делеции, добавления, неконсервативной или консервативной замены или их комбинации.

Например, в качестве подходящих сайтов для модификации могут быть использованы аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, задействованы в конъюгации Fc-области иммуноглобулина.

Кроме того, возможны различные другие производные, включая производные с делецией области, способной образовывать дисульфидную связь, делецией нескольких аминокислотных остатков на N-конце нативного Fc или добавлением метионинового остатка к N-концу нативного Fc. Кроме того, для устранения эффекторных функций делеция может присутствовать в сайте связывания комплемента, таком как сайт связывания C1q, и сайте антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Методики получения таких производных последовательности Fc-области иммуноглобулина раскрыты в публикациях международных заявок на патенты № WO 97/34631, WO 96/32478 и так далее.

В данной области известны аминокислотные замены в белках и пептидах, не приводящие к полному изменению активности белков или пептидов (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 и Asp/Gly в обоих направлениях. В зависимости от конкретных случаев Fc-область может быть модифицирована фосфорилированием, сульфатированием, акрилизацией, гликозилизацией, метилированием, фарнезилацией, ацетилированием, амидированием и так далее.

Описанные выше производные Fc демонстрируют биологическую активность, идентичную биологической активности Fc-области по настоящему изобретению, и могут иметь улучшенную структурную стабильность при повышении температуры, изменении pH и так далее.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может быть получена из нативных форм, выделенных *in vivo* у людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и так далее, или может представлять собой рекомбинантную Fc-область иммуноглобулина, полученную из трансформированных клеток животных или микроорганизмов, или их производные. Fc-область может быть получена из нативного иммуноглобулина выделением полноразмерного иммуноглобулина из живого организма человека или животного и обработкой выделенного иммуноглобулина протеазой. При обработке полноразмерного иммуноглобулина папаином происходит его расщепление на Fab- и Fc-области, в то время как при обработке полноразмерного иммуноглобулина пепсином происходит его расщепление на pF'c- и F(ab)₂-фрагменты. Fc или pF'c могут быть выделены с применением эксклюзионной хроматографии и так далее. В более конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина представляет собой рекомбинантную Fc-область иммуноглобулина, полученную от микроорганизма, экспрессирующего Fc-область, имеющую происхождение от человека.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может быть в форме с естественным содержанием гликанов, повышенным или сниженным содержанием гликанов по сравнению с нативным типом или в дегликозилированной форме. Увеличение или уменьшение содержания гликанов или удаление гликанов Fc иммуноглобулина может быть проведено обычными методами, такими как химический метод, ферментный метод и генно-инженерный метод с использованием микроорганизма. Fc-область иммуноглобулина, полученная удалением гликанов из Fc-области, демонстрирует существенное снижение аффинности связывания с C1q и снижение или утрату антителозависимой цитотоксичности или комплемент-зависимой

цитотоксичности, и, таким образом, она не приводит к ненужным иммунным ответам *in vivo*. В этом отношении дегликозилированная или агликозилированная Fc-область иммуноглобулина может быть более подходящей формой для исходной задачи настоящего изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

При использовании в настоящем описании термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных группировок из Fc-области, а термин "агликозилирование" относится к негликозилированной Fc-области, полученной в прокариотах, конкретнее в *E.coli*.

В то же время Fc-область иммуноглобулина может иметь происхождение от людей или других животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок. В более конкретном воплощении она имеет происхождение от людей.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина (Ig) может иметь происхождение от IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации или гибрида. В более конкретном воплощении она имеет происхождение от IgG или IgM, являющихся одними из наиболее распространенных белков в человеческой крови, а в еще более конкретном воплощении она имеет происхождение от IgG, который, как известно, увеличивает период полувыведения лиганд-связывающих белков. В еще более конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область IgG4, а в наиболее конкретном воплощении Fc-область IgG представляет собой агликозилированную Fc-область, имеющую происхождение от человеческого IgG4, но не ограничена указанным вариантом.

В частности, при использовании в настоящем описании термин "комбинация" означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные Fc-области иммуноглобулинов одного и того же происхождения, соединены с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Т.е. возможно образование димера или мультимера из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fc-фрагмента IgG, Fc-фрагмента IgA, Fc-фрагмента IgM, Fc-фрагмента IgD и Fc-фрагмента IgE.

Кроме того, описанный выше конъюгат может иметь свойство улучшенного длительного эффекта по сравнению с нативным GLP-1, GIP или глюкагоном или по сравнению с X с немодифицированным F, и, помимо описанных выше, эти конъюгаты включают конъюгаты, заключенные в биоразлагаемые наночастицы.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотид, кодирующий указанный конъюгат, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и трансформант, содержащий указанный полинуклеотид или вектор, содержащий указанный полинуклеотид.

Конъюгат представляет собой такой же конъюгат, как объяснено выше.

Полинуклеотид может представлять собой полинуклеотид, кодирующий конъюгат в форме слитого белка.

Кроме того, в настоящем изобретении выделенный полинуклеотид, кодирующий конъюгат, включает полинуклеотидную последовательность, на 75% или более, конкретно на 85% или более, конкретнее на 90% или более и, еще конкретнее, на 95% или более идентичную соответствующей последовательности.

При использовании в настоящем описании термин "гомология" указывает на сходство последовательности с аминокислотной последовательностью дикого типа или последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа, и сравнение гомологии может быть проведено невооруженным глазом или с применением имеющейся в продаже программы для проведения сравнения. При использовании имеющейся в продаже компьютерной программы гомология двух или более последовательностей может быть выражена как процент (%) и может быть рассчитана гомология (%) смежных последовательностей.

При использовании в настоящем описании термин "рекомбинантный вектор" относится к ДНК-конструкции, в которой полинуклеотид, кодирующий целевой белок, например конъюгат, функционально связан с подходящей регуляторной последовательностью, что делает возможной экспрессию целевого белка, конъюгата, в клетке-хозяине.

Регуляторная последовательность включает промотор, способный инициировать транскрипцию, любую операторную последовательность для регуляции транскрипции, последовательность, кодирующую подходящий домен связывания рибосом на мРНК, и последовательность для регуляции терминации транскрипции и трансляции. После трансформации подходящей клетки-хозяина рекомбинантный вектор может быть реплицирован или функционировать независимо от генома хозяина или может быть интегрирован в сам геном хозяина.

Применительно к рекомбинантному вектору, используемому в настоящем изобретении, может не быть существенных ограничений при условии, что вектор может быть реплицирован в клетке-хозяине, и он может быть сконструирован с использованием любого вектора, известного в данной области. Примеры обычно используемого вектора могут включать естественные или рекомбинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Применительно к векторам, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, существенных ограничений нет, и может быть использован любой вектор экспрессии, известный в данной области.

Рекомбинантный вектор используют для трансформации клетки-хозяина с целью получения конъюгата по настоящему изобретению. Кроме того, эти трансформированные клетки, как часть настоящего

изобретения, могут быть использованы для амплификации фрагментов нуклеиновых кислот и векторов, или они могут представлять собой культивированные клетки или клеточные линии, используемые при рекомбинантном получении конъюгата по настоящему изобретению.

При использовании в настоящем описании термин "трансформация" относится к процессу введения рекомбинантного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку-хозяина, что позволяет экспрессировать белок, кодируемый полинуклеотидом, в клетке-хозяине. Независимо, введен ли полинуклеотид, используемый для трансформации, в хромосому клетки-хозяина, будучи расположен в ней, или расположен вне хромосомы, при условии что он может быть экспрессирован в клетке-хозяине, и изобретение включает оба эти случая.

Кроме того, полинуклеотид включает ДНК и РНК, кодирующие целевой белок. Полинуклеотид может быть введен в любой форме при условии, что он может быть введен в клетку-хозяина и экспрессирован в ней. Например, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина в форме экспрессионной кассеты, представляющей собой генную конструкцию, содержащую все обязательные элементы, необходимые для самостоятельной экспрессии. Обычно экспрессионная кассета может содержать промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, сигнал терминации транскрипции, домен связывания рибосом и сигнал терминации трансляции. Экспрессионная кассета может быть представлена в форме вектора экспрессии, способного к самостоятельной репликации. Кроме того, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяина сам по себе и функционально связан с последовательностью, необходимой для его экспрессии в клетке-хозяине, без ограничения указанным вариантом.

Кроме того, при использовании в настоящем описании термин "функционально связанный" относится к функциональной связи промоторной последовательности, инициирующей и опосредующей транскрипцию полинуклеотида, кодирующего целевой белок, например конъюгат по настоящему изобретению, с указанной выше генной последовательностью.

Применительно к подходящему хозяину, используемому в настоящем изобретении, может не быть существенных ограничений, при условии, что он может экспрессировать полинуклеотид по настоящему изобретению. Примеры подходящих хозяев могут включать бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, такие как *E.coli*; бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, принадлежащие к роду *Pseudomonas*, такие как *Pseudomonas putida*; дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*; клетки насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), и клетки животных, такие как CHO, COS и BSC.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая указанный конъюгат.

Конъюгат представляет собой такой же конъюгат, как объяснено выше.

Конкретно, композиция может представлять собой фармацевтическую композицию и, более конкретно, фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

При использовании в настоящем описании термин "предупреждение" относится к любой активности, ингибирующей или задерживающей развитие метаболического синдрома посредством введения указанного выше конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат, а термин "лечение" относится к любой активности, уменьшающей интенсивность или полезным образом изменяющей симптомы метаболического синдрома посредством введения указанного выше конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат.

При использовании в настоящем описании термин "введение" относится к введению определенного вещества субъекту подходящим способом, и путь введения композиции может представлять собой любой известный способ введения, позволяющий осуществлять доставку композиции к мишени *in vivo*, например, внутрибрюшинное введение, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, интритекальное введение, интратекальное введение и так далее.

При использовании в настоящем описании термин "метаболический синдром" относится к симптому, при котором различные заболевания, возникающие вследствие хронического метаболического расстройства, возникают сами по себе или в комбинации. В частности, примеры заболеваний, принадлежащих к метаболическому синдрому, могут включать нарушение толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемию, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, вызванный дислипидемией артериосклероз, атеросклероз, артериосклероз или ишемическую болезнь сердца, но не ограничены указанными заболеваниями.

При использовании в настоящем описании термин "ожирение" относится к медицинскому состоянию с избыточным накоплением жира в организме, и у людей ожирение обычно определяют как индекс массы тела (ИМТ; отношение массы тела (кг) к квадрату роста (м)) 25 или более. Ожирение чаще всего вызвано энергетическим дисбалансом вследствие избыточного приема пищи в сравнении с потреблением энергии на протяжении длительного периода времени. Ожирение, будучи метаболическим заболеванием, поражающим весь организм, повышает вероятность развития диабета и гиперлипидемии, повышает риск возникновения половой дисфункции, артрита и сердечно-сосудистых заболеваний и, в некоторых случаях, связано с развитием рака.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель может быть искусственным.

При использовании в настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый" относится к свойствам достаточного количества для оказания терапевтического эффекта без нежелательных эффектов и может легко быть определен специалистом в данной области по факторам, хорошо известным в медицинской области, таким как тип заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья пациента, его чувствительность к лекарственным средствам, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственное средство (средства) для совместного или одновременного введения и так далее.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая пептид по настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать, в случае перорального введения, связывающий агент, скользящий агент, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизирующий агент, диспергирующий агент, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, корригент и так далее; в случае инъекционного введения, буферный агент, консервант, анальгетик, солюбилизирующий агент, изотонический агент, стабилизирующий агент и так далее, которые могут быть использованы в комбинациях; и, в случае местного введения, основу, эксципиент, смазывающий агент, консервант и так далее.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена путем комбинирования с различными фармацевтически приемлемыми носителями, описанными выше. Например, для перорального введения композиция может быть изготовлена в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и так далее. Для инъекций композиция может быть изготовлена в форме однодозовых ампул или многодозовых контейнеров. Композиция может также быть изготовлена в форме растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, композиций с длительным высвобождением и так далее.

В то же время примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать 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, минеральное масло и так далее. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающий агент, увлажнитель, корригент, консервант и так далее.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена в любой форме, выбранной из группы, состоящей из таблеток, пилюль, порошков, гранул, капсул, суспензий, жидких лекарственных средств для приема внутрь, эмульсий, сиропов, стерильных водных растворов, неводных растворителей, лиофилизированных композиций и суппозиториях.

Кроме того, композиция может быть изготовлена в виде единичной лекарственной формы, подходящей для организма пациента, и, конкретно, изготовлена в виде препарата, применимого для белковых лекарственных средств, способом, обычным для фармацевтической области, для перорального или парентерального введения, такого как чрескожное, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интрамедуллярное, интратекальное, трансдермальное, подкожное, внутрибрюшинное, интраназальное, интрагастральное, местное, сублингвальное, вагинальное или ректальное, без ограничения указанными вариантами.

Кроме того, конъюгат может быть использован путем смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, одобренными в качестве фармацевтических лекарственных средств, такими как физиологический раствор или органические растворители. Для повышения стабильности или всасываемости в качестве фармацевтических лекарственных средств могут быть использованы углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, белки с малой молекулярной массой или другие стабилизаторы.

Вводимая доза и частота введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению определяются типом активного ингредиента (ингредиентов) и различными факторами, такими как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст, пол и масса тела пациента и тяжесть заболевания.

Общая эффективная доза композиции по настоящему изобретению может быть введена пациенту в виде одной дозы или может быть введена на протяжении длительного периода времени в виде множества доз в соответствии с протоколом фракционированного лечения. Содержание активного ингредиента (ингредиентов) в фармацевтической композиции по настоящему изобретению может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. Конкретно, общая суточная доза конъюгата по настоящему изобретению может составлять приблизительно от 0,0001 до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Тем не менее, эффективную дозу конъюгата определяют с учетом различных факторов, включая возраст, массу тела, состояние здоровья и пол пациента, тяжесть заболевания, питание и скорость выведения, наряду с путем и частотой введения фармацевтической композиции. В этом отношении специалисты в данной области могут легко определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Путь и способ введения, а также состав фармацевтической компо-

зиции по изобретению не ограничены, при условии обеспечения эффектов настоящего изобретения.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению демонстрирует отличное поддержание эффективности и титра *in vivo*, что позволяет существенно уменьшить число и частоту введений фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Согласно еще одному аспекту изобретения предложен способ лечения целевого заболевания, включающий введение указанного конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат, субъекту, нуждающемуся в этом. Целевое заболевание может представлять собой метаболический синдром.

Конъюгат или композиция, содержащая конъюгат, представляют собой такие же конъюгат и композицию, как объяснено выше.

Целевое заболевание может представлять собой метаболический синдром.

При использовании в настоящем описании термин "субъект" относится к субъекту, у которого подозревают метаболический синдром, а субъект, у которого подозревают метаболический синдром, относится к млекопитающим, включая людей, крыс, крупный рогатый скот и так далее, с наличием или риском развития метаболического синдрома, но данный термин включает любого, без ограничения, субъекта, которому могут быть введены конъюгат по настоящему изобретению или композиция, содержащая указанный конъюгат.

Способ по изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгат. Общая суточная доза может быть определена в рамках надлежащей компетенции лечащего врача, и композиция может быть введена один или несколько раз в сутки в виде отдельных доз. Тем не менее, в целях настоящего изобретения конкретную терапевтически эффективную дозу композиции для любого конкретного пациента предпочтительно применяют поразному в зависимости от различных факторов, включая тип и степень ответа, которых необходимо достичь, конкретные композиции, включая совместное применение других агентов, возраст, массу тела, состояние здоровья, пол и питание пациента, время и путь введения, скорость выведения композиции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с конкретными композициями, и сходные факторы, хорошо известные в медицинской области.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение указанного конъюгата или композиции, содержащей указанный конъюгат, в изготовлении лекарственного средства.

Конъюгат или композиция, содержащая конъюгат, представляют собой такие же конъюгат и композицию, как объяснено выше.

Лекарственное средство может быть предназначено для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Тем не менее, эти примеры приведены лишь в целях наглядности, и изобретение не следует ограничивать этими примерами.

Пример 1. Получение тройных агонистов.

Получали тройные агонисты, демонстрирующие активность в отношении рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона, и их аминокислотные последовательности показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1

SEQ ID NO:	Последовательность	Информация
1	H X Q G T F T S D V S S Y L D G Q A A K E F I A W L V K G C	
2	H X Q G T F T S D V S S Y L D G Q A Q K E F I A W L V K G C	
3	H X Q G T F T S D V S S Y L L G Q A A K Q F I A W L V K G G G P S S G A P P P S C	
4	H X Q G T F T S D V S S Y L L G Q Q Q K E F I A W L V K G C	
5	H X Q G T F T S D V S S Y L L G Q Q Q K E F I A W L V K G G G P S S G A P P P S C	

6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFVAWLL KGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVAWLL KGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLL KGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLL AGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAQEFVAWLL AGGGPSSGAPPPSC	
11	CAGEGTFTSDL SKYLD SRRQQLFVWLK AGGPSSGAPPPSHG	
12	CAGEGTFTSDL SKYMD EQAVQLFVEWLM AGGPSSGAPPPSHG	
13	CAGEGTFTSDYSIQLDEIAVQDFVEWLLA QKPSSGAPPPSHG	
14	CAGQGTFTSDYSIQLDEIAVRDFVEWLK NGGPSSGAPPPSHG	
15	CAGQGTFTSDL SKQMDEEAVRLFIEWLK NGGPSSGAPPPSHG	
16	CAGQGTFTSDL SKQMDSEAQQLFIEWLK NGGPSSGAPPPSHG	
17	CAGQGTFTSDL SKQMDEERAREFIEWLL AQKPSSGAPPPSHG	
18	CAGQGTFTSDL SKQMDSERAREFIEWLK NTGPSSGAPPPSHG	

19	CAGQGTFTSDLSIQYDSEHQ ^U RDFIEWLKD TGPSSGAPPPSHG	
20	CAGQGTFTSDLSIQYEEEAQQDFVEWLK DTGPSSGAPPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
22	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
23	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLL AQKGKKNDWKHNIT	Образование кольца
24	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLK NGGPSSGAPPPS	Образование кольца
25	HXQGTFTSDCSKYLDERA AQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
26	HXQGTFTSDCSKYLD SRAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
27	HXQGTFTSDYSKYLDERACQDFVQWLL DQGGPSSGAPPPS	
28	HXQGTFTSDYSKYLD EKRAQEFVCWLL AQKGKKNDWKHNIT	
29	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFVQWLL NTC	Образование кольца
30	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAA <u>K</u> EFVQWLL DTC	Образование кольца
31	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAC <u>K</u> EFVQWLL AQ	Образование кольца

32	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAC <u>K</u> DFVQWLL DGGPSSGAPPPS	Образование кольца
33	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA QKC	Образование кольца
34	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVNWLL AQKC	Образование кольца
35	HXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLN TKC	Образование кольца
36	HXQGTFTSDYSKYLC <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLL NGGPSSGAPPPSG	Образование кольца
37	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRQ <u>K</u> EFVQWLL NGGPSSGAPPPSG	Образование кольца
38	CAXQGTFTSDKSSYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCFVAWLL AGGGPSSGAPPPS	
40	HXQGTFTSDKSKYLDERACQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
41	HXQGTFTSDKSKYLDECAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLL DHHPSSGQPPPS	Образование кольца
43	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLL DHHCSSGQPPPS	Образование кольца
44	HGQGTFTSDCSKQLDGQAAQEFVAWLL AGGPSSGAPPPS	

45	HGQGTFTSDCSKYMDGQAAQDFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLDEQHAQEFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDFVNWLL AGGPSSGAPPPS	
49	CAXQGTFTSDYSICMDEIHQKDFVNWLL NTK	Образование кольца
50	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLL DHPSSGQPPSC	Образование кольца
51	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLL NTC	Образование кольца
52	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVQWLL DTC	Образование кольца
53	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLA QC	Образование кольца
54	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLA EC	Образование кольца
55	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLA QC	Образование кольца
56	HXQGTFTSDYSKYLDEKRQKEFVNWLL AQC	Образование кольца
57	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLN TC	Образование кольца

58	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLL NTKC	Образование кольца
59	CAXQGTFTSDYSICMDE <u>E</u> KHQ <u>K</u> DFVNWLL NTK	Образование кольца
60	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>E</u> KHC <u>K</u> DFVNWLL NTK	Образование кольца
61	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>E</u> IAC <u>K</u> DFVNWLL NTK	Образование кольца
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
64	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CAAK <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
65	HXQGTFTSDYSKCLDE <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
66	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
67	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CAAK <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
68	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>E</u> KAA <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
69	YXQGTFTSDYSKCLDERAA <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
70	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>E</u> KRA <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца

71	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RACK <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
72	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RAAK <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
73	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRAK <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
74	CAXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRAK <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
75	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAAK <u>K</u> EFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
76	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRAK <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
77	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KAAK <u>K</u> DFVQWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
78	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQK <u>K</u> EFVQWLL DTKC	Образование кольца
79	HXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQK <u>K</u> DFVNWLLA QKC	Образование кольца
80	HXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQK <u>K</u> DFVDWLLA EKC	Образование кольца
81	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQK <u>K</u> EFVQWLL NTC	Образование кольца
82	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQK <u>K</u> EFVQWLL DTC	Образование кольца
83	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQK <u>K</u> DFVNWLL AQC	Образование кольца

84	CAXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVDWLL AEC	Образование кольца
85	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL AQC	Образование кольца
86	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVNWLL AQC	Образование кольца
87	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL NTC	Образование кольца
88	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLL NTKC	Образование кольца
89	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVQWLL DTKC	Образование кольца
90	CAXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL AQKC	Образование кольца
91	CAXEGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVDWLL AEC	Образование кольца
92	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL AQKC	Образование кольца
93	CAXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RQ <u>K</u> EFVNWLL AQKC	Образование кольца
94	CAXQGTFTSDYSIAMDE <u>I</u> HQ <u>K</u> DFVNWLL NTKC	Образование кольца
95	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLL CHHPSSGQPPPS	Образование кольца
96	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLL DHCPSSGQPPPS	Образование кольца
97	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>K</u> RA <u>K</u> EFVQWLL DCHPSSGQPPPS	Образование кольца
98	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVNWLL DHHPSSGQPPPS	Образование кольца
99	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> DFVNWLL DHHPSSGQPPPS	Образование кольца
100	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVQWLL DQHPSSGQPPPS	Образование кольца
101	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> EFVNWLL DQHPSSGQPPPS	Образование кольца
102	YXQGTFTSDYSKALDE <u>K</u> AA <u>K</u> DFVNWLL DQHPSSGQPPPS	Образование кольца

В последовательностях, описанных в табл. 1, аминокислота, представленная как X, соответствует аминокислоте (Aib), которая представляет собой неприродную аминокислоту, а подчеркнутые аминокислоты соответствуют образованию кольца между подчеркнутыми аминокислотами. Кроме того, в табл. 1 SA соответствует 4-имидазоацетила, и Y соответствует тирозину.

Пример 2. Получение длительно действующих конъюгатов тройных агонистов.

Для пегилирования цистеинового остатка тройных агонистов (SEQ ID NO: 21, 22, 42, 43, 50, 77 и 96) по примеру 1 с использованием PEG (10 кДа), имеющего малеимидную группу и альдегидную группу на обоих концах, соответственно, т.е. малеимид-PEG-альдегида (10 кДа, NOF, Япония), тройные агонисты и малеимид-PEG-альдегид подвергали взаимодействию в молярном отношении от 1:1 до 1:3 при концентрации белка от 1 до 5 мг/мл при низкой температуре на протяжении 0,5-3 ч. В частности, взаимодействие проводили в среде с добавлением от 20 до 60% изопропанола в 50 мМ трис буфере (pH 7,5). По завершении взаимодействия взаимодействующие вещества переносили на SP Sepharose HP (GE Healthcare, США) для очистки тройных агонистов, монопегилированных по их цистеиновому остатку.

Затем очищенные монопегилированные тройные агонисты и Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию в молярном отношении от 1:1 до 1:5 при концентрации белка от 10 до 50 мг/мл при 4-8°C на протяжении 12-18 ч. Взаимодействие проводили в среде с добавлением от 10 до 50 мМ цианборгидрида натрия (NaCNBH_3), т.е. восстанавливающего агента, и от 10 до 30% изопропанола в буфер со 100 мМ фосфата калия (pH 6,0). По завершении взаимодействия взаимодействующие вещества переносили на колонку Butyl Sepharose FF (GE Healthcare, США) и колонку Source ISO (GE Healthcare, США) для очистки конъюгата, содержащего тройные агонисты и Fc иммуноглобулина.

После получения степень чистоты, проанализированная хроматографией с обращенной фазой, эксклюзионной хроматографией и ионообменной хроматографией, составляла 95% или более.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 21 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 21 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 21", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 22 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 22 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 22", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 42 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 42 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 42", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 43 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 43 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 43", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 50 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 50 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 50", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 77 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 77 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 77", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

В частности, конъюгат, в котором тройной агонист SEQ ID NO: 96 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством PEG был назван "конъюгатом, содержащим тройной агонист SEQ ID NO: 96 и Fc иммуноглобулина", или "длительно действующим конъюгатом SEQ ID NO: 96", и в настоящем изобретении эти названия могут быть использованы взаимозаменяемо.

Экспериментальный пример 1. Измерение активности тройных агонистов и их длительно действующих конъюгатов *in vitro*.

Активность тройных агонистов и их длительно действующих конъюгатов, полученных в примерах 1 и 2, оценивали методом измерения клеточной активности *in vitro* с использованием клеточных линий, трансформированных рецептором GLP-1, рецептором глюкагона (GCG) и рецептором GIP соответственно.

Каждая из указанных выше клеточных линий представляет собой клетки яичника китайского хомячка (CHO), трансформированные генами человеческого рецептора GLP-1, человеческого рецептора GCG и человеческого рецептора GIP, соответственно, в которых возможна экспрессия указанных рецепторов, и поэтому они являются подходящими для измерения активности GLP-1, GCG и GIP. Таким образом, каждый вид активности измеряли с использованием соответствующей трансформированной клеточной линии.

Для измерения активности тройных агонистов и длительно действующих конъюгатов, полученных

в примерах 1 и 2, в отношении GLP-1 проводили 4-кратное серийное разведение человеческого GLP-1 от 50 до 0,000048 нМ и 4-кратное серийное разведение тройных агонистов и их длительно действующих конъюгатов, полученных в примерах 1 и 2, от 400 до 0,00038 нМ. От культивированных клеток CHO, экспрессировавших человеческий рецептор GLP-1, отбирали культуральный раствор и каждое из серийных разведений добавляли к клеткам CHO в количестве 5 мкл соответственно. Затем к ним добавляли буферный раствор, содержащий антитело к cAMP, в количестве 5 мкл и проводили инкубацию при комнатной температуре на протяжении 15 мин. Затем к ним добавляли смесь для выявления, содержащую лизирующий буфер, в количестве 10 мкл для лизиса клеток и проводили взаимодействие при комнатной температуре на протяжении 90 мин. По завершении взаимодействия клеточные лизаты анализировали с использованием набора LANCE cAMP (PerkinElmer, США), рассчитывая значения EC₅₀ по накопленному cAMP, и полученные значения сравнивали друг с другом. Относительная активность в сравнении с человеческим GLP-1 показана в табл. 2 и 3 ниже.

Для измерения активности тройных агонистов и длительно действующих конъюгатов, полученных в примерах 1 и 2, в отношении GCG проводили 4-кратное серийное разведение человеческого GCG от 50 до 0,000048 нМ и 4-кратное серийное разведение тройных агонистов и их длительно действующих конъюгатов, полученных в примерах 1 и 2, от 400 до 0,00038 нМ. От культивированных клеток CHO, экспрессировавших человеческий рецептор GCG, отбирали культуральный раствор и каждое из серийных разведений добавляли к клеткам CHO в количестве 5 мкл соответственно. Затем к ним добавляли буферный раствор, содержащий антитело к cAMP, в количестве 5 мкл и проводили инкубацию при комнатной температуре на протяжении 15 мин. Затем к ним добавляли смесь для выявления, содержащую лизирующий буфер, в количестве 10 мкл для лизиса клеток и проводили взаимодействие при комнатной температуре на протяжении 90 мин. По завершении взаимодействия клеточные лизаты анализировали с использованием набора LANCE cAMP (PerkinElmer, США), рассчитывая значения EC₅₀ по накопленному cAMP, и полученные значения сравнивали друг с другом. Относительная активность в сравнении с человеческим GCG показана в табл. 2 и 3 ниже.

Для измерения активности тройных агонистов и длительно действующих конъюгатов, полученных в примерах 1 и 2, в отношении GIP проводили 4-кратное серийное разведение человеческого GIP от 50 до 0,000048 нМ и 4-кратное серийное разведение тройных агонистов и их длительно действующих конъюгатов, полученных в примерах 1 и 2, от 400 до 0,00038 нМ. От культивированных клеток CHO, экспрессировавших человеческий рецептор GIP, отбирали культуральный раствор и каждое из серийных разведений добавляли к клеткам CHO в количестве 5 мкл соответственно. Затем к ним добавляли буферный раствор, содержащий антитело к cAMP, в количестве 5 мкл и проводили инкубацию при комнатной температуре на протяжении 15 мин. Затем к ним добавляли смесь для выявления, содержащую лизирующий буфер, в количестве 10 мкл для лизиса клеток и проводили взаимодействие при комнатной температуре на протяжении 90 мин. По завершении взаимодействия клеточные лизаты анализировали с использованием набора LANCE cAMP (PerkinElmer, США), рассчитывая значения EC₅₀ по накопленному cAMP, и полученные значения сравнивали друг с другом.

Относительная активность в сравнении с человеческим GIP показана в табл. 2 и 3 ниже.

Таблица 2. Коэффициенты относительной активности тройных агонистов

SEQ ID NO:	Активность <i>in vitro</i> в сравнении с нативным пептидом (%)		
	в сравнении с GLP-1	в сравнении с глюкагоном	в сравнении с GIP
1	3,2	< 0,1	< 0,1
2	5,9	< 0,1	< 0,1
3	1,8	< 0,1	< 0,1
4	8,5	< 0,1	< 0,1
5	42,1	< 0,1	< 0,1
6	17,0	< 0,1	< 0,1
7	13,7	< 0,1	< 0,1
8	14,2	0,10	< 0,1
9	32,1	0,13	< 0,1
10	46,0	< 0,1	< 0,1
11	1,4	< 0,1	< 0,1
12	0,4	< 0,1	< 0,1
13	< 0,1	< 0,1	< 0,1
14	28,0	< 0,1	< 0,1
15	79,2	< 0,1	< 0,1
16	2,1	< 0,1	< 0,1
17	0,2	< 0,1	< 0,1
18	< 0,1	< 0,1	< 0,1
19	< 0,1	< 0,1	< 0,1
20	< 0,1	< 0,1	< 0,1
21	17,8	267	22,7
22	20,1	140	59,7
23	4,01	9,3	< 0,1
24	41,2	9,3	< 0,1
25	82,6	0,1	< 0,1
26	64,5	0,2	< 0,1
27	83,1	0,8	0,9
28	17,2	1,6	< 0,1

29	38,5	6,0	< 0,1
30	142	0,7	0,8
31	135	2,2	2,4
32	151	1,7	8,8
33	24,5	< 0,1	10,4
34	19,1	0,92	0,6
35	7,5	< 0,1	1,3
36	37,4	0,39	0,2
37	236	6,21	2,2
38	2,3	-	-
39	13,9	0,53	< 0,1
40	75,2	< 0,1	< 0,1
41	34,3	< 0,1	< 0,1
42	33,9	205,8	7,8
43	12,6	88,4	3,70
44	1,3	< 0,1	< 0,1
45	6,6	< 0,1	< 0,1
46	1,4	< 0,1	< 0,1
47	2,4	< 0,1	< 0,1
48	1,5	< 0,1	< 0,1
49	29,8	< 0,1	3,3
50	67,4	50,5	2,7
51	14,4	2,0	0,1
52	44,1	7,5	0,3
53	161	8,4	1,3
54	30,6	1,4	0,1
55	27,1	0,7	2,4
56	57,9	4,9	0,8
57	11,7	< 0,1	0,3
58	39,1	2,6	0,2
59	40,3	< 0,1	4,0
60	106,2	< 0,1	8,2
61	59,8	< 0,1	2,8

62	5,2	< 0,1	< 0,1
63	15,3	< 0,1	< 0,1
64	64,6	60,1	92,9
65	95,4	25,2	11,6
66	15,8	172	17,2
67	28,5	46,2	39,8
68	27,9	8,8	107
69	24,3	9,6	62,8
70	15,1	71,3	64,4
71	90,1	12,7	94,7
72	11,5	1,0	1,6
73	22,6	5,4	3,0
74	12,9	0,9	1,0
75	35,1	8,5	18,0
76	10,3	47,6	11,7
77	38,7	12,2	35,5
78	51,0	14,0	0,12
79	41,5	4,9	1,4
80	8,1	0,0	0,1
81	7,8	0,3	< 0,1
82	9,5	1,1	< 0,1
83	47,3	1,3	0,4
84	4,2	< 0,1	< 0,1
85	4,3	< 0,1	0,3
86	28,4	0,4	0,2
87	0,9	< 0,1	< 0,1
88	9,6	0,3	< 0,1
89	7,1	0,7	< 0,1
90	7,4	< 0,1	< 0,1
91	31,9	16,8	0,3
92	0,8	< 0,1	0,4
93	5,7	0,3	0,7
94	0,5	< 0,1	< 0,1
95	2,1	0,4	< 0,1
96	34,4	194,8	5,2
97	10,5	62,8	2,6
98	28,1	8,2	47,1
99	20,9	14,9	57,7
100	42,2	12,7	118,5
101	23,2	13,9	40,1
102	23,3	29,5	58,0

Таблица 3. Коэффициенты относительной активности длительно действующих конъюгатов тройных агонистов

Длительно действующие конъюгаты	Активность <i>in vitro</i> в сравнении с нативным пептидом (%)		
	в сравнении с GLP-1	в сравнении с глюкагоном	в сравнении с GIP
21	0,1	1,6	0,2
22	0,1	0,9	0,5
42	3,1	23,1	1,2
43	2,1	13,5	0,6
50	15,4	6,9	0,7
77	6,7	1,7	6,6
96	0,3	4,0	0,3

Длительно действующие конъюгаты тройных агонистов, полученные выше, обладают функциями тройных агонистов, которые могут активировать рецепторы GLP-1, рецепторы GIP и рецепторы глюкагона, и поэтому указанные длительно действующие конъюгаты тройных агонистов могут быть использованы в качестве терапевтических веществ для лечения пациентов с метаболическим синдромом, включая диабет и ожирение.

Экспериментальный пример 2. Оценка активности длительно действующих конъюгатов тройных агонистов *in vivo*.

В этом эксперименте были использованы мыши с ожирением, вызванным высоким содержанием жира в корме, широко используемые в качестве модели ожирения у животных. Масса тела мышей до введения входила в диапазон от приблизительно 40 г до приблизительно 60 г. Во время эксперимента мышей содержали группами и обеспечивали свободный доступ к воде. Освещения не было с 6 ч утра до 6 ч вечера.

Экспериментальные группы, получавшие корм с высоким содержанием жира, включали группу 1, эксципиент (инъекция один раз в 2 суток) - контрольная группа; группа 2, длительно действующий конъюгат SEQ ID NO: 42 в количестве 1,44 нмоль/кг (инъекция один раз в 2 суток); группа 3, длительно действующий конъюгат SEQ ID NO: 42 в количестве 2,88 нмоль/кг (инъекция один раз в 2 суток); группа 4, длительно действующий конъюгат SEQ ID NO: 43 в количестве 1,44 нмоль/кг (инъекция один раз в 2 суток); группа 5, длительно действующий конъюгат SEQ ID NO: 43 в количестве 2,88 нмоль/кг (инъекция один раз в 2 суток); группа 6, длительно действующий конъюгат SEQ ID NO: 50 в количестве 1,44 нмоль/кг (инъекция один раз в 2 суток); и группа 7, длительно действующий конъюгат SEQ ID NO: 50 в количестве 2,88 нмоль/кг (инъекция один раз в 2 суток). Эксперимент прекращали на 28 сутки и по ходу эксперимента изменения массы тела мышей в каждой группе оценивали с интервалом 2 суток. При аутопсии по завершении эксперимента оценивали количество брыжеечного жира. Проводили статистический анализ, сравнивая контрольную группу с группами введения с применением 1-факторного ANOVA.

По результатам оценки изменений массы тела, как подтверждено на фиг. 1, все группы, получавшие высокие дозы длительно действующих конъюгатов SEQ ID NO: 42, 43 и 50, продемонстрировали уменьшение массы тела на 56,9, 57,0 и 63,5%, соответственно, по сравнению с массой тела до введения.

Кроме того, по результатам оценки количества брыжеечного жира, как подтверждено на фиг. 2, все группы, получавшие высокие дозы длительно действующих конъюгатов SEQ ID NO: 42, 43 и 50, продемонстрировали существенное уменьшение количества брыжеечного жира по сравнению с группой, получавшей эксципиент.

Исходя из изложенного выше, специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение, будет ясно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без изменения технической концепции или существенных характеристик настоящего изобретения. В связи с этим типичные воплощения раскрыты в описании исключительно в целях наглядности, и их не следует толковать как ограничивающие объем изобретения. Напротив, подразумевают, что настоящее изобретение охватывает не только типичные воплощения, но также различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут быть включены в сущность и объем настоящего изобретения, как определено приложенной формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, обладающий функцией тройного агониста, который обладает активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP), представленный химической формулой 1, приведенной ниже:

[химическая формула 1]

X - La - F,

где X представляет собой пептид, обладающий функцией тройного агониста, который обладает активностью в отношении рецепторов глюкагона, GLP-1 и GIP;

L представляет собой линкер;

a представляет собой 0 или положительное целое число при условии, что, когда a представляет собой 2 или более, каждый L не зависит от другого(их) L; и

F представляет собой вещество, способное увеличивать период полувыведения X,

где X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 1, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Gly-Thr-Phe-Xaa7-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15-

Xaa16-Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Xaa27-Xaa28-Xaa29-

Xaa30-R1 (общая формула 1, SEQ ID NO:103),

где в общей формуле 1

Xaa1 представляет собой гистидин (His, H), 4-имидазоацетил (CA) или тирозин (Tyr, Y);

Xaa2 представляет собой глицин (Gly, G), α-метилглутаминовую кислоту или аминокислоту (Aib);

Xaa3 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E) или глутамин (Gln, Q);

Xaa7 представляет собой треонин (Thr, T) или изолейцин (Ile, I);

Xaa10 представляет собой лейцин (Leu, L), тирозин (Tyr, Y), лизин (Lys, K), цистеин (Cys, C) или валин (Val, V);

Xaa12 представляет собой лизин (Lys, K), серин (Ser, S) или изолейцин (Ile, I);

Xaa13 представляет собой глутамин (Gln, Q), тирозин (Tyr, Y), аланин (Ala, A) или цистеин (Cys, C);

Xaa14 представляет собой лейцин (Leu, L), метионин (Met, M) или тирозин (Tyr, Y);

Xaa15 представляет собой цистеин (Cys, C), аспарагиновую кислоту (Asp, D), глутаминовую кислоту (Glu, E) или лейцин (Leu, L);

Xaa16 представляет собой глицин (Gly, G), глутаминовую кислоту (Glu, E) или серин (Ser, S);

Xaa17 представляет собой глутамин (Gln, Q), аргинин (Arg, R), изолейцин (Ile, I), глутаминовую кислоту (Glu, E), цистеин (Cys, C) или лизин (Lys, K);

Xaa18 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H);

Xaa19 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), цистеин (Cys, C) или валин (Val, V);

Xaa20 представляет собой лизин (Lys, K), глутамин (Gln, Q) или аргинин (Arg, R);

Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту (Glu, E), глутамин (Gln, Q), лейцин (Leu, L), цистеин (Cys, C) или аспарагиновую кислоту (Asp, D);

Xaa23 представляет собой изолейцин (Ile, I) или валин (Val, V);

Xaa24 представляет собой аланин (Ala, A), глутамин (Gln, Q), цистеин (Cys, C), аспарагин (Asn, N), аспарагиновую кислоту (Asp, D) или глутаминовую кислоту (Glu, E);

Xaa27 представляет собой валин (Val, V), лейцин (Leu, L) или лизин (Lys, K);

Xaa28 представляет собой цистеин (Cys, C), лизин (Lys, K), аланин (Ala, A), аспарагин (Asn, N) или аспарагиновую кислоту (Asp, D);

Xaa29 представляет собой цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), глутамин (Gln, Q), треонин (Thr, T), глутаминовую кислоту (Glu, E) или гистидин (His, H);

Xaa30 представляет собой цистеин (Cys, C), глицин (Gly, G), лизин (Lys, K) или гистидин (His, H) или отсутствует; и

R1 представляет собой цистеин (Cys, C), GKKNWKNIT (SEQ ID NO: 106), m-SSGAPPPS-n (SEQ ID NO: 107) или m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO: 108) или отсутствует,

где m представляет собой -Cys-, -Pro- или -Gly-Pro-; и

n представляет собой -Cys-, -Gly-, -Ser- или -His-Gly- или отсутствует.

2. Конъюгат по п.1, где R1 представляет собой цистеин (Cys, C), GKKNWKNIT (SEQ ID NO: 106), m-SSGAPPPS-n (SEQ ID NO: 107), или m-SSGQPPPS-n (SEQ ID NO: 108),

где m представляет собой -Cys-, -Pro- или -Gly-Pro-; и

n представляет собой -Cys-, -Gly-, -Ser- или -His-Gly- или отсутствует.

3. Конъюгат по п.1,

где Xaa14 представляет собой лейцин или метионин; и

Xaa15 представляет собой цистеин, аспарагиновую кислоту или лейцин.

4. Конъюгат по п.1, где в общей формуле 1

Xaa2 представляет собой глицин, α-метилглутаминовую кислоту или Aib;

Xaa7 представляет собой треонин;

Xaa10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;

Xaa12 представляет собой лизин или изолейцин;

Xaa13 представляет собой тирозин, аланин, глутамин или цистеин;
 Xaa14 представляет собой лейцин, тирозин или метионин;
 Xaa15 представляет собой цистеин, лейцин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;
 Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, цистеин, глутаминовую кислоту или лизин;
 Xaa18 представляет собой аланин, глутамин, аргинин или гистидин;
 Xaa19 представляет собой аланин, глутамин, валин или цистеин;
 Xaa20 представляет собой лизин, аргинин или глутамин;
 Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту, глутамин, лейцин, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa23 представляет собой изолейцин или валин;
 Xaa24 представляет собой цистеин, аланин, глутамин, аспарагин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту; и
 Xaa27 представляет собой лейцин или лизин.

5. Конъюгат по п.1, где X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 2, приведенной ниже:

Xaa1-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa10-Ser-Lys-Xaa13-Xaa14-Xaa15-Xaa16-

Xaa17-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Xaa21-Phe-Xaa23-Xaa24-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Xaa29-Xaa30-

Xaa31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Xaa40 (общая формула 2, SEQ ID NO:104),

где в общей формуле 2

Xaa1 представляет собой 4-имидазоацетил, гистидин или тирозин;
 Xaa2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Xaa10 представляет собой тирозин или цистеин;
 Xaa13 представляет собой аланин, глутамин, тирозин или цистеин;
 Xaa14 представляет собой лейцин, метионин или тирозин;
 Xaa15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или лейцин;
 Xaa16 представляет собой глицин, глутаминовую кислоту или серин;
 Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, глутаминовую кислоту, цистеин или лизин;
 Xaa18 представляет собой аланин, глутамин, аргинин или гистидин;
 Xaa19 представляет собой аланин, глутамин, цистеин или валин;
 Xaa20 представляет собой лизин, глутамин или аргинин;
 Xaa21 представляет собой цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин, лейцин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa23 представляет собой изолейцин или валин;
 Xaa24 представляет собой цистеин, аланин, глутамин, аспарагин или глутаминовую кислоту;
 Xaa28 представляет собой лизин, цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa29 представляет собой глицин, глутамин, цистеин или гистидин;
 Xaa30 представляет собой цистеин, глицин, лизин или гистидин;
 Xaa31 представляет собой пролин или цистеин; и
 Xaa40 представляет собой цистеин или отсутствует.

6. Конъюгат по п.1, где в общей формуле 1

Xaa2 представляет собой глицин, α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Xaa7 представляет собой треонин;
 Xaa10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;
 Xaa12 представляет собой лизин или изолейцин;
 Xaa13 представляет собой тирозин, аланин или цистеин;
 Xaa14 представляет собой лейцин или метионин;
 Xaa15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, изолейцин, цистеин или лизин;
 Xaa18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Xaa19 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Xaa20 представляет собой лизин или глутамин;
 Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa23 представляет собой валин;
 Xaa24 представляет собой аланин, глутамин, цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту; и
 Xaa27 представляет собой лейцин или лизин.

7. Конъюгат по п.5, где в общей формуле 2

Xaa13 представляет собой аланин, тирозин или цистеин;
 Xaa15 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;
 Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;
 Xaa18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;

Хаа21 представляет собой цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой изолейцин или валин;
 Хаа24 представляет собой цистеин, глутамин или аспарагин;
 Хаа28 представляет собой цистеин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа29 представляет собой глутамин, цистеин или гистидин; и
 Хаа30 представляет собой цистеин, лизин или гистидин.

8. Конъюгат по п.1, где в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин или цистеин;
 Хаа12 представляет собой лизин или изолейцин;
 Хаа13 представляет собой тирозин, аланин или цистеин;
 Хаа14 представляет собой лейцин или метионин;
 Хаа15 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глутаминовую кислоту;
 Хаа17 представляет собой аргинин, изолейцин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин или глутамин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой глутамин, аспарагин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа27 представляет собой лейцин; и
 Хаа28 представляет собой цистеин, аланин, аспарагин или аспарагиновую кислоту.

9. Конъюгат по п.1, где в общей формуле 1

Хаа1 представляет собой гистидин или 4-имидазоацетил;
 Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа3 представляет собой глутамин;
 Хаа7 представляет собой треонин;
 Хаа10 представляет собой тирозин;
 Хаа12 представляет собой изолейцин;
 Хаа13 представляет собой аланин или цистеин;
 Хаа14 представляет собой метионин;
 Хаа15 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа16 представляет собой глутаминовую кислоту;
 Хаа17 представляет собой изолейцин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин или гистидин;
 Хаа19 представляет собой глутамин или цистеин;
 Хаа20 представляет собой лизин;
 Хаа21 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Хаа23 представляет собой валин;
 Хаа24 представляет собой аспарагин;
 Хаа27 представляет собой лейцин;
 Хаа28 представляет собой аланин или аспарагин;
 Хаа29 представляет собой глутамин или треонин; и
 Хаа30 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует.

10. Конъюгат по п.1,

где X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную общей формулой 3, приведенной ниже:

Хаа1-Хаа2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Хаа13-Leu-Asp-Glu-Хаа17-

Хаа18-Хаа19-Lys-Хаа21-Phe-Val-Хаа24-Trp-Leu-Leu-Хаа28-Хаа29-Хаа30-Хаа31-Ser-Ser-

Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Хаа40 (общая формула 3, SEQ ID NO:105),

где в общей формуле 3

Хаа1 представляет собой гистидин или тирозин;
 Хаа2 представляет собой α -метилглутаминовую кислоту или Aib;
 Хаа13 представляет собой аланин, тирозин или цистеин;
 Хаа17 представляет собой аргинин, цистеин или лизин;
 Хаа18 представляет собой аланин или аргинин;
 Хаа19 представляет собой аланин или цистеин;
 Хаа21 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту;

Хаа24 представляет собой глутамин или аспарагин;
 Хаа28 представляет собой цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Хаа29 представляет собой цистеин, гистидин или глутамин;
 Хаа30 представляет собой цистеин или гистидин;
 Хаа31 представляет собой пролин или цистеин; и
 Хаа40 представляет собой цистеин или отсутствует.

11. Конъюгат по п.1, где R1 представляет собой цистеин, GKNDWKHNIT (SEQ ID NO: 106), CSSGQPPPS (SEQ ID NO: 109), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 110), GPSSGAPPPSC (SEQ ID NO: 111), PSSGAPPPS (SEQ ID NO: 112), PSSGAPPPSG (SEQ ID NO: 113), PSSGAPPPSHG (SEQ ID NO: 114), PSSGAPPPSS (SEQ ID NO: 115), PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 116) либо PSSGQPPPS (SEQ ID NO: 117) или отсутствует.

12. Конъюгат по любому из пп.1-11, где в общих формулах 1-3 16-я аминокислота и 20-я аминокислота с N-конца вместе образуют кольцо.

13. Конъюгат, представленный химической формулой 1, приведенной ниже:
 [химическая формула 1]

X - La - F,

где X представляет собой пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP);

L представляет собой линкер;

a представляет собой положительное целое число при условии, что, когда a представляет собой 2 или более, каждый L не зависит от другого(их) L; и

F представляет собой вещество, способное увеличивать период полувыведения X, где X представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102.

14. Конъюгат по любому из пп.1-11 и 13, где F выбран из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, вещества, связывающегося с альбумином, полимера из повторяющихся единиц определенных аминокислотных последовательностей, антитела, фрагмента антитела, вещества, связывающегося с FcRn (неонатальным рецептором Fc), соединительной ткани *in vivo*, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и эластина.

15. Конъюгат по п.14, где полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

16. Конъюгат по любому из пп.1-11 и 13, где F представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

17. Конъюгат по п.16, где F представляет собой Fc-область IgG.

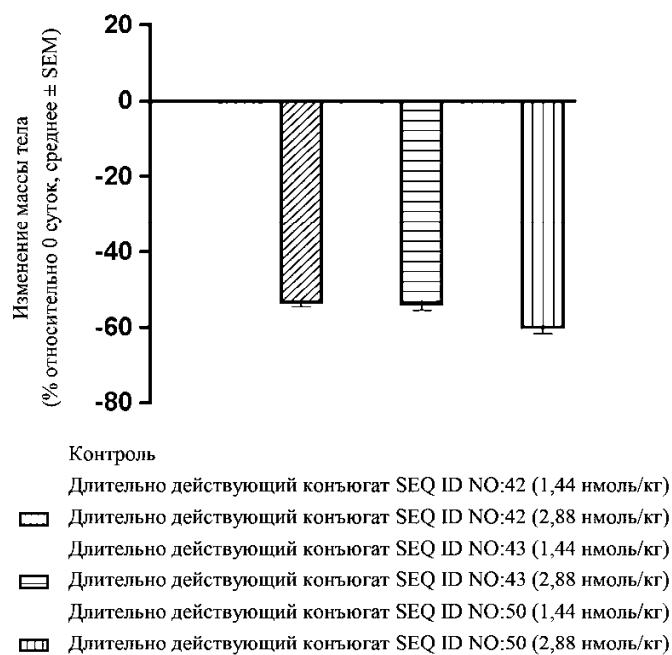
18. Конъюгат по любому из пп.1-11 и 13, где L представляет собой пептид, жирную кислоту, сахарид, полимер, низкомолекулярное соединение, нуклеотид или их комбинацию.

19. Конъюгат по п.18, где полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

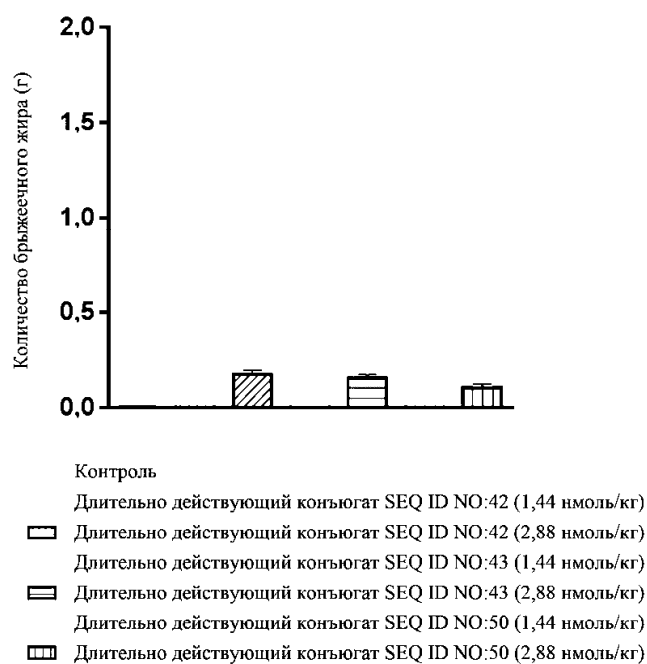
20. Конъюгат по любому из пп.1-11 и 13, где L представляет собой полиэтиленгликоль.

21. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения метаболического синдрома, содержащая конъюгат по любому из пп.1-11 и 13.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, где метаболический синдром включает нарушение толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемию, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, связанный с дислипидемией атеросклероз, атеросклероз, атеросклероз или ишемическую болезнь сердца.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2