

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038544

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.13

(21) Номер заявки
201891360

(22) Дата подачи заявки
2016.12.30

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

(54) ТРОЙНОЙ АГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮКАГОНА/GLP-1/GIP

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

(32) 2015.12.31; 2016.12.02

(33) KR

(43) 2018.12.28

(86) PCT/KR2016/015554

(87) WO 2017/116204 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., Игнатьев
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 тройному агонисту, обладающему активностью в отношении всех из указанных рецепторов: глюкагона, GLP-1 и GIP, а также к его применениям.

038544 B1

038544 B1

038544

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к тройному агонисту, обладающему активностью в отношении всех из указанных рецепторов: глюкагона, GLP-1 и GIP, а также к его применениям.

Предшествующий уровень техники

Ожирение и диабет, включая диабет 2 типа, являются репрезентативными метаболическими заболеваниями, распространенными в современном обществе. Эти заболевания считают угрожающими здоровью факторами мирового масштаба, а экономические затраты, связанные с их возникновением, в настоящее время быстро увеличиваются.

Глюкагонподобный пептид (GLP-1) и глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (GIP) являются репрезентативными гормонами желудочно-кишечного тракта и гормонами нервной системы и представляют собой вещества, задействованные в контролировании уровней глюкозы в крови в зависимости от приема пищи. Глюкагон представляет собой пептидный гормон, секретируемый поджелудочной железой, который задействован в контролировании уровней глюкозы в крови наряду с двумя описанными выше веществами.

GLP-1 представляет собой гормон, секретируемый тонкой кишкой в ответ на прием пищи. GLP-1 стимулирует секрецию инсулина в поджелудочной железе в зависимости от уровня глюкозы в крови и подавляет секрецию глюкагона, таким образом способствуя снижению уровней глюкозы в крови. Кроме того, GLP-1 играет роль в замедлении пищеварения в желудочно-кишечном тракте, действуя как фактор насыщения и снижая количество принимаемой пищи, замедляя время опорожнения желудочно-кишечного тракта от переваренной пищи. Помимо этого, опубликованы данные, что введение GLP-1 крысам подавляло прием пищи и снижало массу тела, и указанное действие отмечалось как в норме, так и при ожирении, демонстрируя потенциал GLP-1 в качестве агента для лечения ожирения.

GIP, один из гормонов желудочно-кишечного тракта, стимулом к секреции которого служит прием пищи, как и в случае GLP-1, представляет собой гормон, состоящий из 42 аминокислот, секретируемых К-клетками кишечника. Опубликованы данные, что GIP выполняет функции, стимулирующие секрецию инсулина в поджелудочной железе в зависимости от уровня глюкозы в крови и способствующие снижению уровней глюкозы, таким образом усиливая активацию GLP-1, оказывая противовоспалительное действие и т.д.

Глюкагон образуется в поджелудочной железе при падении уровней глюкозы в крови под воздействием лекарственных препаратов, заболеваний, дефицита гормонов или ферментов и т.д. Глюкагон посылает сигнал к распаду гликогена в печени, вызывающий высвобождение глюкозы, и повышает уровни глюкозы в крови до нормальных значений. Кроме повышения уровней глюкозы в крови, глюкагон подавляет аппетит у животных и человека и активирует гормон-чувствительную липазу адипоцитов, способствуя липолизу и расходованию энергии, таким образом оказывая препятствующее ожирению действие.

Поэтому проводили исследования для разработки GLP-1 в качестве терапевтического агента для лечения диабета и ожирения, основанные на его контролирующем уровне глюкозы в крови и снижающем массу тела действии. В настоящее время эксендин-4, полученный из яда ящерицы и имеющий аминокислотную последовательность, демонстрирующую приблизительно 50% гомологию с GLP-1, находится в стадии разработки в качестве терапевтического агента для лечения тех же видов заболеваний. При этом показано, что терапевтические агенты, содержащие GLP-1 и эксендин-4, вызывали побочные эффекты, такие как рвота и тошнота (Syed Y.Y., *Drugs*, 2015 Jul; 75 (10): 1141 -52).

Кроме того, для максимизации снижения массы тела и в качестве альтернативы вышеописанному терапевтическому веществу на основе GLP-1 сфокусировали исследования на двойных агонистах, обладающих активностью как в отношении рецепторов GLP-1, так и в отношении рецепторов глюкагона, и показали, что они более эффективны по сравнению с терапией только существующим GLP-1 для снижения массы тела благодаря активации рецепторов глюкагона (Jonathan W. et al., *Nat Chem Bio.*, 2009 Oct (5); 749-757).

Кроме того, в исследовании тройных агонистов, обладающих активностью в отношении рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона одновременно, были предприняты попытки увеличить период полувыведения тройных агонистов путем замены аминокислотной последовательности для увеличения устойчивости к дипептидил-пептидазе-IV (DPP-IV), осуществляющей деградацию гормонов желудочно-кишечного тракта для устранения их активности, с последующим добавлением ацильной группы к их конкретному участку (Finan B. et al., *Nat. Med.*, 2015 Jan; 21 (1): 27-36). Однако их активирующее действие в отношении трех различных видов рецепторов оказалось несущественным, и ни у одного из тройных агонистов не было различного соотношения активности к ним.

Таким образом, существует необходимость в разработке нового вещества, которое может значительно активировать рецепторы GLP-1, GIP и глюкагона и проявлять контролирующее уровни глюкозы в крови и снижающее массу тела действие, не вызывая каких-либо побочных эффектов, таких как рвота и тошнота.

Кроме того, также существует необходимость в разработке нового вещества, которое имеет различное соотношение активностей в отношении рецепторов GLP-1, GIP и глюкагона. Например, существует

возрастающая потребность в разработке вещества, которое обладает действием, снижающим массу тела, но значительно более выраженным действием, контролирующим уровни глюкозы в крови благодаря высокой активности GLP-1 и GIP, но сравнительно низкой активностью глюкагона для гипогликемического действия; или вещества, обладающего высокой активностью GLP-1, GIP и глюкагона, таким образом, обладающего выраженным действием, снижающим массу тела.

Краткое изложение сущности изобретения

Техническая задача.

Задачей настоящего изобретения является обеспечение выделенного пептида, обладающего активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP).

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение полинуклеотида, кодирующего выделенный пептид, рекомбинантного экспрессирующего вектора, включающего полинуклеотид, и трансформанта, включающего полинуклеотид или рекомбинантный экспрессирующий вектор.

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение способа получения выделенного пептида.

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение композиции, содержащей выделенный пептид.

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение способа для лечения целевого заболевания, который включает введение выделенного пептида или композиции, содержащей выделенный пептид, субъекту, которому это необходимо.

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение применения выделенного пептида или композиции для применения в изготовлении лекарственного средства.

Техническое решение.

Для выполнения указанной задачи в одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP).

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

В другом конкретном воплощении аминокислотная последовательность с добавлением является производной аминокислотной последовательности нативного GLP-1, аминокислотной последовательности нативного GIP или аминокислотной последовательности нативного эксендина-4.

В еще одном конкретном воплощении пептид представляет собой выделенный пептид, включающий в себя аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 1:

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 -метил-глутаминовую 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 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; 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 другом 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 -метил-глутаминовую 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 пептид включает в себя аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 2:

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-Хаа28-Хаа29-Хаа30-Хаа31-Ser-Ser-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Ser-Хаа40 (общая формула 2, SEQ ID NO: 104).

В общей формуле 2

Хаа1 представляет собой 4-имидазоацетил, гистидин или тирозин;

Хаа2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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 2

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;
 Хаа29 представляет собой глутамин, цистеин или гистидин; и
 Хаа30 представляет собой цистеин, лизин или гистидин.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой α -метил-глутаминовую 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 -метил-глутаминовую 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;

Xaa23 представляет собой валин;
 Xaa24 представляет собой аспарагин;
 Xaa27 представляет собой лейцин;
 Xaa28 представляет собой аланин или аспарагин;
 Xaa29 представляет собой глутамин или треонин; и
 Xaa30 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует.
 В другом конкретном воплощении в общей формуле 1
 Xaa2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую кислоту или Aib;
 Xaa3 представляет собой глутамин;
 Xaa7 представляет собой треонин;
 Xaa10 представляет собой тирозин, цистеин или валин;
 Xaa12 представляет собой лизин;
 Xaa13 представляет собой тирозин;
 Xaa14 представляет собой лейцин;
 Xaa15 представляет собой аспарагиновую кислоту;
 Xaa16 представляет собой глицин, глутаминовую кислоту или серин;
 Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;
 Xaa18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Xaa19 представляет собой аланин или глутамин;
 Xaa20 представляет собой лизин или глутамин;
 Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa23 представляет собой валин;
 Xaa24 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Xaa27 представляет собой лейцин или лизин; и
 Xaa29 представляет собой глицин, глутамин, треонин или гистидин.

В еще одном конкретном воплощении пептид представляет собой пептид, включающий в себя аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 3:

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 -метил-глутаминовую 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, 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 шестнадцатая аминокислота и двадцатая аминокислота с N-конца вместе образуют кольцо.

В еще одном конкретном воплощении пептид включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102.

В еще одном конкретном воплощении пептид обладает по меньшей мере одной из следующих активностей i)-iii):

- i) активация рецептора GLP-1;
- ii) активация рецептора глюкагона и
- iii) активация рецептора GIP.

В еще одном конкретном воплощении пептид имеет увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с периодом полувыведения любого из: нативного GLP-1, нативного глюкагона и нативного GIP.

В другом конкретном воплощении C-конец пептида амидирован.

В другом аспекте данного изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий выделенный пептид, рекомбинантный экспрессирующий вектор, включающий полинуклеотид и трансформант, включающий полинуклеотид или рекомбинантный экспрессирующий вектор.

В следующем аспекте данного изобретения предложен способ получения выделенного пептида.

В еще одном аспекте данного изобретения предложена композиция, включающая выделенный пептид.

В конкретном воплощении композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

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

В еще одном конкретном воплощении метаболический синдром включает нарушенную толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемию, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, артериосклероз вследствие дислипидемии, атеросклероз, артериосклероз или ишемическую болезнь сердца.

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение способа для лечения целевого заболевания, который включает введение выделенного пептида или композиции, содержащей выделенный пептид, субъекту, которому это необходимо.

Задачей настоящего изобретения также является обеспечение применения выделенного пептида или композиции для применения в изготовлении лекарственного средства.

Преимущества изобретения.

Пептид по настоящему изобретению обладает активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP) и, следовательно, может применяться для лечения метаболического синдрома.

Подробное описание изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

При этом каждое из объяснений и воплощений, приведенных в качестве примера в данном документе, может быть справедливо и для других объяснений и приведенных в качестве примера воплощений. Таким образом, все комбинации различных факторов, описанных в данном документе, входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, объем настоящего изобретения не ограничивается конкретным описанием, приведенным ниже.

По ходу описания настоящего изобретения используются не только стандартные однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислот естественного происхождения, но также и трехбуквенные коды, обычно разрешенные для других аминокислот, таких как α -аминоизомасляная кислота (Aib), Sar (N-метилглицин) и α -метил-глутаминовая кислота.

Кроме того, аминокислоты, упомянутые в данном документе, обозначаются следующими аббревиатурами согласно правилам номенклатуры IUPAC-IUB:

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)

В одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP).

В настоящем изобретении выделенный пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP), может использоваться взаимозаменяемо с тройным агонистом.

Тройной агонист может включать в себя различные вещества (например, различные пептиды), которые обладают существенной активностью в отношении рецепторов глюкагона, GLP-1 и GIP.

Тройной агонист, обладающий существенным уровнем активности в отношении рецепторов глюкагона, GLP-1 и GIP, может проявлять активность *in vitro*, равную 0,1% или выше, 1% или выше, 2% или выше, 3% или выше, 4% или выше, 5% или выше, 6% или выше, 7% или выше, 8% или выше, 9% или выше, 10% или выше, 20% или выше, 30% или выше, 40% или выше, 50% или выше, 60% или выше, 70%

или выше, 80% или выше, 90% или выше и 100% или выше к одному или более рецепторам, в частности к двум или более рецепторам и более конкретно ко всем трем рецепторам из рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP в сравнении с нативными лигандами соответствующих рецепторов (нативным глюкагоном, нативным GLP-1 и нативным GIP), без конкретного ограничения.

Способ определения активностей тройного агониста *in vitro* может относиться к примеру 2 настоящего изобретения, без конкретного ограничения.

При этом тройной агонист характеризуется тем, что он обладает одной или более из следующих активностей от i) до iii), в частности существенной(ыми) активностью(ями):

i) активацией рецептора GLP-1; ii) активацией рецептора глюкагона и iii) активацией рецептора GIP.

В частности, активация рецепторов может, например, включать такие случаи, когда активность *in vitro* равна 0,1% или выше, 1% или выше, 2% или выше, 3% или выше, 4% или выше, 5% или выше, 6% или выше, 7% или выше, 8% или выше, 9% или выше, 10% или выше, 20% или выше, 30% или выше, 40% или выше, 50% или выше, 60% или выше, 70% или выше, 80% или выше, 90% или выше и 100% или выше в сравнении с нативными лигандами соответствующих рецепторов, без конкретного ограничения.

Кроме того, тройной агонист может иметь увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с периодом полувыведения любого из нативного GLP-1, нативного глюкагона и нативного GIP, без конкретного ограничения.

Указанный выше аналог глюкагона может иметь искусственное происхождение, но не ограничиваться таковым.

В частности, выделенный пептид может представлять собой аналог нативного глюкагона, но не ограничиваться таковым.

Нативный аналог глюкагона по настоящему изобретению может включать пептиды, которые имеют по меньшей мере одно отличие в аминокислотной последовательности при сравнении с нативным глюкагоном; пептиды, модифицированные посредством модификации последовательности нативного глюкагона, и миметики нативного глюкагона.

При этом нативный глюкагон может иметь следующую аминокислотную последовательность, без конкретного ограничения:

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).

В частности, выделенный пептид может представлять собой аналог нативного глюкагона с вариацией, выбранной из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации и их комбинации, по меньшей мере одной аминокислоты последовательности нативного глюкагона, без конкретного ограничения.

Кроме того, замена аминокислоты может включать как замену аминокислотой, так и замену соединением, не являющимся нативным.

Кроме того, добавление может осуществляться на N-конце и/или C-конце пептида. При этом длина аминокислотной вставки не имеет конкретного ограничения, может быть добавлено 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, а в широком смысле добавление может включать добавление полипептида, без конкретного ограничения.

Более конкретно аналог глюкагона может представлять собой аналог, в котором 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, выбранных 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, в котором 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 конкретного ограничения.

Еще более конкретно аналог глюкагона может представлять собой аналог, в котором 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, выбранных 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, в котором 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 конкретного ограничения.

Еще более конкретно аналог глюкагона может представлять собой аналог, в котором 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, выбранных 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, в котором 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 конкретного ограничения.

Еще более конкретно аналог глюкагона может представлять собой аналог, в котором 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 или 14 аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислот в положениях 1, 2, 13, 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, в котором 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 конкретного ограничения.

Аминокислоты, которые подлежат введению в указанный выше нативный глюкагон, могут быть выбраны из группы, состоящей из тирозина, α -метил-глутаминовой кислоты, Aib, метионина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, лейцина, изолейцина, глутамина, валина, глицина, аланина, цистеина, серина, аланина, аспарагиновой кислоты и аргинина, без конкретного ограничения.

Например, аминокислотная(ые) последовательность(и), подлежащая(ие) добавлению, может(могут) представлять собой по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, производную аминокислотной последовательности нативного GLP-1, нативного GIP или нативного эксендина-4.

Аналог глюкагона или тройной агонист может включать в себя внутримолекулярный мостик (например, ковалентную сшивку или нековалентную сшивку) и, в частности, находится в форме, включающей кольцо, например в форме, где кольцо образовано между 16-й аминокислотой и 20-й аминокислотой аналога глюкагона или тройного агониста, без конкретного ограничения.

Не являющийся исчерпывающим пример кольца может включать лактамный мостик (или лактамное кольцо).

Кроме того, аналог глюкагона или тройной агонист включает все те из них, которые модифицированы таким образом, чтобы включать в себя кольцо или включать в себя аминокислоту, способную образовывать кольцо в заданной позиции.

Например, аналог глюкагона или тройной агонист может быть таким, где аминокислотная пара, состоящая из 16-й и 20-й аминокислот, заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые могут образовывать кольцо, соответственно, однако аналог глюкагона или тройной агонист не ограничиваются таковыми.

Кольцо может быть образовано между аминокислотами боковых цепей в составе аналога глюкагона или тройного агониста, например, они могут находиться в форме лактамного кольца между боковой цепью лизина и боковой цепью глутаминовой кислоты, однако не ограничивается таковым.

Примеры аналога глюкагона, полученные путем комбинации указанных способов, могут включать пептиды, аминокислотные последовательности которых отличаются от таковых нативного глюкагона по меньшей мере одной аминокислотой, и у которых α -углерод на N-конце удален, при этом обладающие активностями в отношении рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP и т.д., но не ограничиваются ими, и аналоги нативного глюкагона, которые могут найти применение в настоящем изобретении, могут быть получены путем комбинации различных способов получения аналогов.

Кроме того, применительно к тройным агонистам по настоящему изобретению часть аминокислот может быть заменена другими аминокислотами или соединениями искусственного происхождения во избежание распознавания пептидазами для увеличения периода полувыведения *in vivo* тройного агониста, однако тройной агонист не ограничивается таковыми.

В частности, пептид может представлять собой пептид, у которого период полувыведения *in vivo* увеличен благодаря ускользанию от распознавания пептидазой в результате замены 2-й аминокислотной последовательности среди аминокислотных последовательностей тройного агониста, но в объем изобретения входит любая замена или модификация аминокислот во избежание распознавания пептидазой *in vivo*, без ограничения.

Кроме того, указанная модификация для получения аналогов нативного глюкагона может включать все модификации с применением аминокислот L-типа или D-типа и/или аминокислот искусственного происхождения; и/или модификацию нативной последовательности, например модификацию боковой цепи функциональной группы, внутримолекулярное ковалентное связывание (например, образование кольца между боковыми цепями), метилирование, ацилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, введение аминокислотной группы, биотинилирование и т.д.

Кроме того, модификация может также включать все те модификации, где одна или более аминокислот добавлены к амино- и/или карбоксиконцу нативного глюкагона.

При замене или добавлении аминокислот можно использовать не только 20 аминокислот, обычно

встречающихся в белках человека, но также и атипичные или имеющие искусственное происхождение аминокислоты. Коммерческими источниками атипичных аминокислот могут быть компании Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, включающие указанные аминокислоты, и типичные пептидные последовательности можно синтезировать и приобретать у коммерческих поставщиков, например, American Peptide Company, Bachem (США) или Anygen (Корея).

Производные аминокислот можно получать таким же образом, и в качестве одного из таких примеров можно использовать 4-имидазоуксусную кислоту.

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению могут быть в виде варианта, у которого амино- и/или карбоксиконец и т.д. пептида химически модифицирован или защищен органическими группами, или к концу пептида могут быть добавлены аминокислоты для его защиты от протеаз *in vivo*, тем самым увеличивая его стабильность.

В частности, в случае химически синтезированного пептида его N- и C-концы несут электрический заряд и поэтому N- и C-концы пептида могут быть ацетилированы и/или амидированы, но пептид не ограничивается этими конкретными вариантами.

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

Тип соли не ограничивается каким-либо конкретным. Однако соль предпочтительно представляет собой безопасную и эффективную для субъекта, например млекопитающего, но не ограничивается конкретными солями.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу, которое можно эффективно применять по целевому назначению в рамках медико-фармацевтического решения, не вызывая избыточной токсичности, раздражения, аллергических ответов и т.д.

В данном описании термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, производной фармацевтически приемлемых неорганических кислот, органических кислот или оснований. Примеры подходящих солей могут включать соляную кислоту, бромную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, перхлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-п-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафтаден-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и т.д. Примеры солей, являющихся производными подходящих оснований, могут включать соли щелочных металлов, таких как натрий, калий и т.д., щелочно-земельных металлов, таких как магний, аммоний и т.д.

В данном описании термин "сольват" относится к комплексу, образованному между пептидом по настоящему изобретению или его солью и молекулой растворителя.

В конкретном воплощении пептид может представлять собой выделенный пептид, который включает в себя аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 1

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 -метил-глутаминовую 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 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), цис-

теин (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;

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 быть таким, который включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102; и таким, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102, но не ограничивается таковыми.

Кроме того, описание пептида в настоящем изобретении "пептид, состоящий из конкретной SEQ ID NO" не исключает мутацию, которая может возникнуть при добавлении незначительной последовательности до или после аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, или мутацию, которая может возникнуть естественным образом, или молчащую мутацию, при условии, что пептид обладает такой же или соответствующей активностью, как и пептид, который состоит из аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, и даже когда имеет место добавление или мутация последовательности, пептид безусловно входит в объем настоящего изобретения.

Вышеуказанное справедливо и для других конкретных воплощений или аспектов настоящего изобретения, без ограничения.

В частности, в приведенной выше общей формуле Хаа14 может быть лейцином или метионином, и Хаа15 может быть цистеином, аспарагиновой кислотой или лейцином.

Примеры пептида могут включать пептид, который включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-12, 14-17 и 21-102, или пептид, который (по существу) состоит из нее, но не ограничиваются таковыми.

Пептид может вызывать существенную активацию по меньшей мере одного из рецептора глюкагона, рецептора GLP-1 и рецептора GIP, но не обязательно ограничивается таковыми. В частности, пептид может быть пептидом, который вызывает существенную активацию рецептора GLP-1 или дополнительно рецептора глюкагона и/или рецептора GIP, но не ограничивается таковыми.

Еще более конкретно пептид может представлять собой в общей формуле 1, приведенной выше,

Хаа2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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, но не обязательно ограничивается таковыми.

Еще более конкретно в общей формуле 1, приведенной выше,

Хаа2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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, но не ограничивается таковыми.
 Еще более конкретно в общей формуле 1, приведенной выше,
 Хаа2 представляет собой α -метил-глутаминовую 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 частности, в общей формуле 1, приведенной выше,
 Хаа1 представляет собой гистидин или 4-имидазоацетил;
 Хаа2 представляет собой α -метил-глутаминовую 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.
 Более конкретно в общей формуле 1, приведенной выше,
 Хаа2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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;

Xaa17 представляет собой глутамин, аргинин, цистеин или лизин;
 Xaa18 представляет собой аланин, аргинин или гистидин;
 Xaa19 представляет собой аланин или глутамин;
 Xaa20 представляет собой лизин или глутамин;
 Xaa21 представляет собой глутаминовую кислоту, цистеин или аспарагиновую кислоту;
 Xaa23 представляет собой валин;
 Xaa24 представляет собой аланин, глутамин или цистеин;
 Xaa27 представляет собой лейцин или лизин; и
 Xaa28 представляет собой глицин, глутамин, треонин или гистидин;
 но не обязательно ограничивается таковыми.

Эти пептиды могут соответствовать случаю, когда пептид вызывает существенную активацию как рецептора GLP-1, так и рецептора глюкагона, или более выраженную активацию по сравнению с активацией рецептора GIP; случаю, когда пептид вызывает существенную активацию и рецептора GLP-1, и рецептора глюкагона, и рецептора GIP; или случаю, когда пептид вызывает существенную активацию как рецептора GLP-1, так и рецептора GIP и более выраженную активацию по сравнению с активацией рецептора глюкагона; без конкретного ограничения.

Когда пептид вызывает существенную активацию как рецептора GLP-1, так и рецептора GIP, а также более выраженную активацию по сравнению с активацией рецептора глюкагона, можно обеспечить пептид с улучшенной способностью контролировать уровни глюкозы в крови наряду со снижающим массу тела действием, тогда как если пептид вызывает существенную активацию рецептора GLP-1, рецептора глюкагона и рецептора GIP, преимуществом является то, что снижающее массу тела действие может быть максимизировано, без конкретного ограничения таковым.

Примеры пептида могут включать пептид, который включает в себя 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, который (по существу) состоит из нее, но не обязательно ограничиваются таковыми.

В конкретном воплощении пептид может включать в себя аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 2

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-Ser-Xaa40 (общая формула 2, SEQ ID NO: 104).

В общей формуле 2, приведенной выше,

Xaa1 представляет собой 4-имидазоацетил, гистидин или тирозин;
 Xaa2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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.

Более конкретно в общей формуле 2, приведенной выше,

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;

Хаа29 представляет собой глутамин, цистеин или гистидин; и

Хаа30 представляет собой цистеин, лизин или гистидин.

Примеры пептида могут включать пептид, который включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 42, 43, 50, 64-77 и 95-102; более конкретно пептид, который включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 21, 22, 42, 43, 50, 64-77 и 96-102; или пептид, который (по существу) состоит из нее, но не обязательно ограничиваются таковыми.

В конкретном воплощении пептид может включать в себя аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 3

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,

Хаа1 представляет собой гистидин или тирозин;

Хаа2 представляет собой α -метил-глутаминовую 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.

Примеры пептида могут включать пептид, который включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 42, 43, 50, 64-71, 75-77 и 96-102; или пептид, который (по существу) состоит из нее, но не обязательно ограничиваются таковыми.

Кроме того, в общей формуле 1, приведенной выше, R1 может представлять собой цистеин, GKKNWVKHNIT (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 отсутствовать, но не обязательно ограничивается таковыми.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий выделенный пептид, рекомбинантный экспрессирующий вектор, включающий в себя полинуклеотид, и трансформант, включающий в себя полинуклеотид или рекомбинантный экспрессирующий вектор.

Пептид является таким же, как описано выше.

Кроме того, в рамках настоящего изобретения выделенный полинуклеотид, кодирующий пептид, включает в себя полинуклеотидную последовательность, идентичную соответствующей последовательности на 75% или более, в частности на 85% или более, более конкретно на 90% или более и еще более конкретно на 95% или более.

В данном описании термин "гомология" указывает на сходство с аминокислотной последовательностью дикого типа или нуклеотидной последовательностью дикого типа, а сравнение с целью поиска гомологии можно осуществлять невооруженным глазом или с помощью доступных для приобретения программ для сравнения. С применением доступной для приобретения компьютерной программы гомологию между двумя или более последовательностями можно выразить в процентах (%) и можно рассчитать гомологию (%) между смежными последовательностями.

В данном описании термин "рекомбинантный вектор" относится к ДНК-конструкции, в которой полинуклеотид, кодирующий целевой пептид, например, пептид, функционально связан с соответствующей регуляторной последовательностью для обеспечения экспрессии целевого пептида, например пептида в клетке-хозяине.

Регуляторная последовательность включает промотор, способный инициировать транскрипцию, любую последовательность оператора для регуляции транскрипции, последовательность, кодирующую соответствующий связывающий рибосому домен мРНК и последовательность для регуляции терминации транскрипции и трансляции. Рекомбинантный вектор после трансформации подходящей клетки-хозяина может реплицироваться или функционировать независимо от генома хозяина или может интегрироваться в геном самого хозяина.

Рекомбинантный вектор, использованный в настоящем изобретении, может не ограничиваться конкретными векторами, при условии, что вектор способен реплицироваться в клетке-хозяине, и его можно конструировать с использованием любого известного в области техники вектора. Примеры обычно используемых векторов могут включать плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги естественного проис-

хождения или рекомбинантные. Векторы для применения по настоящему изобретению не ограничиваются какими-либо конкретными, но могут применяться любые известные в области техники векторы.

Рекомбинантный вектор применяют для трансформации клетки-хозяина для получения пептидов по настоящему изобретению. Кроме того, эти трансформированные клетки, как часть настоящего изобретения, можно использовать для амплификации фрагментов нуклеиновых кислот и векторов, или они могут представлять собой культивируемые клетки или клеточные линии, используемые для рекомбинантной продукции пептидов по настоящему изобретению.

В данном описании термин "трансформация" относится к процессу внедрения рекомбинантного вектора, включающего в себя полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку хозяина, тем самым делая возможной экспрессию белка, кодируемого полинуклеотидом, в клетке-хозяине. Для трансформированного полинуклеотида не имеет значения, встроен ли он в хромосому клетки-хозяина и находится в ней или находится за пределами хромосомы, при условии, что он может экспрессироваться в клетке-хозяине, в рамки изобретения входят оба варианта.

Кроме того, полинуклеотид включает ДНК и РНК, которые кодируют целевой белок. Полинуклеотид может быть внедрен в любой форме, при условии, что он может внедряться в клетку-хозяина и экспрессироваться в ней. Например, полинуклеотид может быть внедрен в клетку-хозяина в форме экспрессионной кассеты, которая представляет собой генную конструкцию, включающую в себя незаменимые элементы, необходимые для собственной экспрессии. Экспрессионная кассета обычно может включать в себя промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, сигнал терминации транскрипции, связывающий рибосому домен и сигнал терминации трансляции. Экспрессионная кассета может быть в форме экспрессирующего вектора, способного к саморепликации. Кроме того, полинуклеотид может быть внедрен в клетку-хозяина как таковой и функционально связан с последовательностью, незаменимой для его экспрессии в клетке-хозяине, без конкретного ограничения.

Кроме того, в данном описании термин "функционально связан" относится к функциональной связи между последовательностью промотора, который инициирует и опосредует транскрипцию полинуклеотида, кодирующего целевой пептид по настоящему изобретению, и указанной выше последовательностью гена.

Подходящий хозяин для применения в настоящем изобретении не ограничивается какими-либо конкретными, при условии, что он может экспрессировать полинуклеотид по настоящему изобретению. Примеры подходящих хозяев могут включать бактерии, относящиеся к роду *Escherichia*, такие как *E. coli*; бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии, относящиеся 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.

В следующем аспекте настоящего изобретения предложен способ получения выделенного пептида.

Пептид является таким же, как описано выше.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть синтезирован способом, хорошо известным в области техники, в соответствии с его длиной, например, при помощи автоматического пептидного синтезатора и может быть получен при помощи генно-инженерных методов.

В частности, пептид по настоящему изобретению может быть получен стандартным способом синтеза, при помощи рекомбинантной экспрессирующей системы или любым другим способом, известным в области техники. Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть синтезирован множеством способов, включая, например, способы, описанные ниже:

(а) способ синтеза пептида твердофазным или жидкофазным методом поэтапно или путем сборки фрагментов с последующим выделением и очисткой конечного пептидного продукта или

(б) способ экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, в клетке-хозяине и выделение продукта экспрессии из культуры клеток-хозяев или

(в) способ осуществления бесклеточной экспрессии *in vitro* нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, и выделение продукта экспрессии или

способ получения фрагментов пептида при помощи любой комбинации способов (а), (б) и (в), получение пептида посредством соединения фрагментов пептида и затем выделение пептида.

В более конкретном примере целевой пептид может быть получен при помощи манипуляций с генами, которые включают получение слитого гена, кодирующего слитый белок, включающий партнера по слиянию и пептид, трансформацию полученным клетки-хозяина, экспрессии слитого белка и отщепления пептида от слитого белка при помощи протеазы или соединения и последующего выделения. Для этого между партнером по слиянию и полинуклеотидом, кодирующим пептид, можно встроить, например, последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность, которая может расщепляться протеазой, такой как фактор Ха или энтерокиназа, CNBr, или соединением, таким как гидроксилламин.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, включающая в себя выделенный пептид.

Пептид является таким же, как описано выше.

В частности, композиция может представлять собой фармацевтическую композицию и более кон-

кретно фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

В данном описании термин "предупреждение" относится ко всем видам активности, подавляющей или отодвигающей возникновение метаболического синдрома благодаря введению указанного пептида или композиции, а термин "лечение" относится ко всем видам активности, улучшающей или благоприятным образом изменяющей симптомы метаболического синдрома благодаря введению указанного пептида или композиции.

В данном описании термин "введение" относится к введению конкретного вещества субъекту соответствующим способом, а путь введения композиции может представлять собой любой стандартный способ, который позволяет доставлять композицию к мишени, например внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, интритрахеальное введение, ректальное введение и т.д., но не ограничивается ими.

В данном описании термин "метаболический синдром" относится к проявлению, когда различные заболевания, возникающие вследствие хронического метаболического нарушения, возникают отдельно или в комбинации. В частности, примеры заболеваний, которые относятся к метаболическому синдрому, могут включать нарушенную толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемию, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, атеросклероз вследствие дислипидемии, атеросклероз, атеросклероз или ишемическую болезнь сердца, но не ограничиваются ими.

В данном описании термин "ожирение" относится к медицинскому состоянию с избыточным накоплением жира в организме, и людей обычно считают имеющими ожирение, когда их индекс массы тела (ИМТ, показатель массы организма (кг) на рост (м), возведенный в квадрат) составляет 25 или выше. Ожирение чаще всего возникает вследствие нарушения энергетического баланса из-за избыточного приема пищи относительно расходуемой энергии в течение длительного периода времени. Ожирение, будучи метаболическим заболеванием, влияющим на весь организм, повышает вероятность развития диабета и гиперлипидемии, повышает риск возникновения половой дисфункции, артрита и сердечно-сосудистого заболевания и в некоторых случаях ассоциировано с возникновением рака.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель могут иметь искусственное происхождение.

В данном описании термин "фармацевтически приемлемый" относится к свойствам обладания достаточным количеством для проявления терапевтического действия, не вызывая побочных действий и может быть без затруднений установлено специалистом в области техники на основании факторов, хорошо известных в области медицины, таких как тип заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол, чувствительность пациента к лекарственному средству, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственные средства для смешивания или одновременного введения и т.д.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая пептид по настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать для перорального введения: связующее, лубрикант, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизующий агент, диспергирующий агент, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, корригент и т.д.; для инъекций: буферизующий агент, консервирующий агент, анальгетик, солюбилизующий агент, изотонический агент, стабилизирующий агент и т.д., которые можно комбинировать для применения; для местного введения: основу, эксципиент, лубрикант, консервирующий агент и т.д.

Композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде различных лекарственных форм путем комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, описанным выше. Например, для перорального введения композиция может быть представлена в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.д. Для инъекций композиция может быть приготовлена в виде однодозовых ампул или в виде многодозовых контейнеров. Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, препаратов пролонгированного действия и т.д.

При этом примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenzoат, пропилгидроксibenzoат, тальк, стеарат магния, минеральные масла и т.д. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, лубрикант, смачивающий агент, ароматизатор, консервант и т.д.

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

Кроме того, композиция может быть приготовлена в виде дозированной лекарственной формы,

подходящей для организма пациента и предпочтительно приготовлена в виде препарата, подходящего для пептидных лекарств в соответствии со стандартным способом в области фармацевтики для введения пероральным или парентеральным путем, таким как через кожу, внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, внутрилегочно, чрескожно, подкожно, внутрибрюшинно, интраназально, внутрижелудочно, местно, сублингвально, вагинально или ректально, без ограничения.

Кроме того, пептид можно применять путем смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, такими как физиологический раствор или органические растворители. Для повышения стабильности или абсорбируемости в качестве фармацевтических средств можно применять углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиокислители, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы.

Вводимая доза и частота введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению определяются типом активного(ых) ингредиента(ов) наряду с различными факторами, такими как заболевание, которое необходимо лечить, путь введения, возраст, пол и масса тела пациента и тяжесть заболевания.

Суммарную эффективную дозу композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в виде однократной дозы или можно вводить в течение длительного периода времени в виде многократных доз согласно протоколу лечения с дробным введением. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного(ых) ингредиента(ов) может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. В частности, общая суточная доза пептида по настоящему изобретению может составлять приблизительно от 0,0001 до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. При этом эффективную дозу пептида определяют с учетом различных факторов, включая, помимо пути введения и частоты введения фармацевтической композиции, возраст, массу тела, состояние здоровья, пол пациента, тяжесть заболевания, диету и скорость экскреции. В этой связи специалисты в области техники могут без труда определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не ограничивается конкретной композицией и способом и путем введения, при условии, что она демонстрирует действие, описанное в настоящем изобретении.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению превосходно сохраняет свою эффективность и титр *in vivo*, поэтому количество и частота введений фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть существенно сокращены.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ для лечения целевого заболевания, который включает введение выделенного пептида или композиции, содержащей выделенный пептид, субъекту, которому это необходимо. Целевым заболеванием может быть метаболический синдром.

Выделенный пептид или композиция, содержащая его, метаболический синдром и его лечение являются такими, как описано выше.

В данном описании термин "субъект" относится к субъекту, у которого подозревают наличие метаболического синдрома, а субъект, у которого подозревают наличие метаболического синдрома, относится к млекопитающим, включая человека, крыс, домашний скот и т.д., которые имеют метаболический синдром или подвержены риску его возникновения, однако охватывает любого субъекта, которого можно лечить указанным пептидом по настоящему изобретению или композицией, содержащей его, без ограничения.

Терапевтический способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид. Общая суточная доза композиции может быть определена на основании врачебного решения специалиста, композицию можно вводить один или несколько раз в сутки, поделив на дозы. При этом для целей настоящего изобретения определенная терапевтически эффективная доза композиции для любого конкретного пациента предпочтительно применяется по-разному, в зависимости от различных факторов, включая характер и степень достигаемого ответа, определенных композиций, в том числе в зависимости от того, применяют ли вместе с ними время от времени другие агенты, от возраста, массы тела, состояния здоровья, пола пациента и диеты, времени и пути введения, скорости секреции композиции, продолжительности лечения, других лекарственных средств, применяемых в комбинации или одновременно с конкретными композициями и аналогичных факторов, хорошо известных в области медицины.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложено применение выделенного пептида или композиции в изготовлении лекарственного средства. Лекарственное средство может быть предназначено для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

Выделенный пептид или композиция и метаболический синдром являются такими, как описано выше.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с ссылкой к следующим примерам. Однако указанные примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не ограничивают объем изобретения.

Пример 1. Получение тройных агонистов.

Получали тройные агонисты, демонстрирующие активность ко всем рецепторам GLP-1, GIP и глюкагона, их аминокислотные последовательности приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

SEQ ID NO	Последовательность	Информация
1	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFIWLKGC	
2	HXQGTFTSDVSSYLDGQAQKEFIWLKGC	
3	HXQGTFTSDVSSYLLGQAQKEFIWLKGGPSSGAPPPSC	
4	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIWLKGC	
5	HXQGTFTSDVSSYLLGQQQKEFIWLKGGPSSGAPPPSC	
6	HXQGTFTSDVSSYLDGQAAKEFVWLLKGC	
7	HXQGTFTSDVSKYLDGQAAKEFVWLLKGC	
8	HXQGTFTSDVSKYLDGQAQEFVWLLKGC	
9	HXQGTFTSDVSKYLDGQAQEFVWLLAGC	
10	HXQGTFTSDVSKYLDGQAQEFVWLLAGGPSSGAPPPSC	
11	CAGEGTFTSDLSKYLDLRRQQLFVWLKAGGPSSGAPPPSHG	
12	CAGEGTFTSDLSKYMDEQAVQLFVEWLMAGGPSSGAPPPSHG	
13	CAGEGTFTSDYSIQLDEIAVQDFVEWLLAQKPSSGAPPPSHG	
14	CAGQGTFTSDYSIQLDEIAVRDFVEWLKNGGPSSGAPPPSHG	
15	CAGQGTFTSDLSKQMDDEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSHG	
16	CAGQGTFTSDLSKQMDSEAAQLFIEWLKNGGPSSGAPPPSHG	
17	CAGQGTFTSDLSKQMDSEARAREFIEWLLAQKPSSGAPPPSHG	
18	CAGQGTFTSDLSKQMDSERAREFIEWLKN TGPPSSGAPPPSHG	
19	CAGQGTFTSDLSIQYDSEHQDFIEWLKDTGPSSGAPPPSHG	
20	CAGQGTFTSDLSIQYEEEAQQDFVEWLKDTGPSSGAPPPSHG	
21	YXQGTFTSDYSKYLDECRAK E EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
22	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAK E EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
23	YXQGTFTSDYSKYLDECRAK E EFVQWLLAQKGGKNDWKHNIT	Образование кольца
24	YXQGTFTSDYSKYLDECRAK E EFVQWLKN GGPSSGAPPPS	Образование кольца
25	HXQGTFTSDCSKYLDRAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
26	HXQGTFTSDCSKYLDSRAAQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
27	HXQGTFTSDYSKYLDERACQDFVQWLLD QGGPSSGAPPPS	
28	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAQEFVCWLLAQKGGKNDWKHNIT	
29	HXQGTFTSDYSKYLDEKAAK E EFVQWLLNTC	Образование кольца
30	HXQGTFTSDYSKYLDEKAAK E EFVQWLLDTC	Образование кольца
31	HXQGTFTSDYSKYLDEKACK E EFVQWLLAQ	Образование кольца
32	HXQGTFTSDYSKYLDEKACK E DFVQWLLDGGPSSGAPPPS	Образование кольца

33	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLA QKC	Образование кольца
34	HXQGTFTSDYSKYLDEKROKEFVNWLLA QKC	Образование кольца
35	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLN TKC	Образование кольца
36	HXQGTFTSDYSKYLCEKROKEFVQWLLN GGPSSGAPPPSG	Образование кольца
37	HXQGTFTSDYSKYLDECRQKEFVQWLLN GGPSSGAPPPSG	Образование кольца
38	CAXQGTFTSDKSSYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
39	HXQGTFTSDYSKYLDGQHAQCFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
40	HXQGTFTSDKSKYLDERACQDFVQWLLD GGPSSGAPPPS	
41	HXQGTFTSDKSKYLDCAQDFVQWLLI. DGGPSSGAPPPS	
42	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
43	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLD HHCSSGQPPPS	Образование кольца
44	HGQGTFTSDCSKQLDGQAAQEFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
45	HGQGTFTSDCSKYMDGQAAQDFVAWLL AGGPSSGAPPPS	
46	HGQGTFTSDCSKYLDEQHAQEFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
47	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQEFVAWLLA GGPSSGAPPPS	
48	HGQGTFTSDCSKYLDGQRAQDFVNWLL AGGPSSGAPPPS	
49	CAXQGTFTSDYSICMDEIHQKDFVNWLL	Образование
	NTK	кольца
50	HXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
51	HXQGTFTSDYSKYLDEKROKEFVQWLLN TC	Образование кольца
52	HXQGTFTSDYSKYLDEKROKEFVQWLLD TC	Образование кольца
53	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLA QC	Образование кольца
54	HXEGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVDWLLA EC	Образование кольца
55	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLA QC	Образование кольца
56	HXQGTFTSDYSKYLDEKROKEFVNWLLA QC	Образование кольца
57	HXQGTFTSDYSIAMDEIHQKDFVNWLLN TC	Образование кольца
58	HXQGTFTSDYSKYLDEKROKEFVQWLLN TKC	Образование кольца
59	CAXQGTFTSDYSICMDEKHQKDFVNWLL NTK	Образование кольца
60	CAXQGTFTSDYSIAMDEKHCQKDFVNWLL NTK	Образование кольца
61	CAXQGTFTSDYSIAMDEIACQKDFVNWLL NTK	Образование кольца
62	CAXQGTFTSDKSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
63	CAXQGTFTSDCSKYLDERAAQDFVQWLL DGGPSSGAPPPS	
64	YXQGTFTSDYSKYLDECAAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
65	HXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца

66	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> DFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
67	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CA <u>A</u> <u>K</u> DFVQWLLD DHPSSGQPPPS	Образование кольца
68	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KA <u>A</u> <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
69	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> RA <u>A</u> <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
70	YXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> DFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
71	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RAC <u>K</u> DFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
72	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RA <u>A</u> <u>K</u> DFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
73	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFVQWLLD DHPSSGQPPPS	Образование кольца
74	CAXQGTFTSDYSKCLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLD DHPSSGQPPPS	Образование кольца
75	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KA <u>A</u> <u>K</u> EFVQWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца
76	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> DFVQWLLD DHPSSGQPPPS	Образование кольца
77	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KA <u>A</u> <u>K</u> DFVQWLLD DHPSSGQPPPS	Образование кольца
78	HXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLD TKC	Образование кольца
79	HXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA QKC	Образование кольца
80	HXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVDWLLA EKC	Образование кольца
81	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLD NTC	Образование кольца
82	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLD	Образование
	DTC	кольца
83	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA AQC	Образование кольца
84	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVDWLLA AEC	Образование кольца
85	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA AQC	Образование кольца
86	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVNWLLA AQC	Образование кольца
87	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA NTC	Образование кольца
88	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLD NTKC	Образование кольца
89	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVQWLLD DTKC	Образование кольца
90	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA AQC	Образование кольца
91	CAXEGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVDWLLA AEC	Образование кольца
92	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA AQC	Образование кольца
93	CAXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRQ <u>K</u> EFVNWLLA AQC	Образование кольца
94	CAXQGTFTSDYSIAMD <u>E</u> IHQ <u>K</u> DFVNWLLA NTKC	Образование кольца
95	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLC HHPSSGQPPPS	Образование кольца
96	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLD HCPSSGQPPPS	Образование кольца
97	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLLD CHPSSGQPPPS	Образование кольца
98	YXQGTFTSDYSKALD <u>E</u> KA <u>A</u> <u>K</u> EFVNWLLD HHPSSGQPPPS	Образование кольца

99	YXQGTFTSDYSKALDEKAAKDFVNWLL DHPSSGQPPPS	Образование кольца
100	YXQGTFTSDYSKALDEKAAKEFVQWLLD QHPSSGQPPPS	Образование кольца
101	YXQGTFTSDYSKALDEKAAKEFVNWLLD QHPSSGQPPPS	Образование кольца
102	YXQGTFTSDYSKALDEKAAKDFVNWLL DQHPSSGQPPPS	Образование кольца

В последовательностях, описанных в табл. 1, аминокислота, обозначенная X, означает аминокислоту (Aib), которая является аминокислотой искусственного происхождения, а подчеркнутые аминокислоты обозначают образование кольца между подчеркнутыми аминокислотами. Кроме того, в табл. 1 CA обозначает 4-имидазоацетил, а Y обозначает тирозин.

Пример 2. Определение активностей тройных агонистов *in vitro*.

Активности тройных агонистов, полученных в примере 1, определяли методом определения клеточной активности *in vitro*, с применением трансформированных клеточных линий, соответственно, в отношении рецептора GLP-1, рецептора глюкагона (GCG) и рецептора GIP.

Каждая из указанных выше клеточных линий представляет собой линию клеток яичников китайского хомячка (CHO), в которых были трансформированы и в которых могли экспрессироваться гены человеческого рецептора GLP-1, человеческого рецептора GCG и человеческого рецептора GIP, соответственно, и таким образом, подходящую для измерения активностей GLP-1, GCG и GIP. Соответственно, активность каждой части измеряли с использованием соответствующей трансформированной клеточной линии.

Для измерения активности GLP-1 тройного агониста, полученного в примере 1, GLP-1 человека разводили в 4 раза от 50 до 0,000048 нМ и тройные агонисты, полученные в примере 1, разводили в 4 раза от 400 до 0,00038 нМ.

У культивируемых клеток CHO, в которых экспрессировали человеческий рецептор GLP-1, удаляли культуральную жидкость и к клеткам CHO добавляли каждое из серийно разведенных веществ в количестве 5 мкл соответственно. Затем к ним добавляли буферный раствор, содержащий антитело к cAMP, в количестве 5 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к ним добавляли детектирующую смесь, содержащую лизирующий клетки буфер, в количестве 10 мкл для лизиса клеток и оставляли прореагировать при комнатной температуре в течение 90 мин. После завершения реакции клеточные лизаты использовали в наборе LANCE cAMP (PerkinElmer, США) для расчета значения EC₅₀ по накопленному cAMP и значения сравнивали друг с другом. Относительные активности в сравнении с человеческим GLP-1 приведены ниже в табл. 2.

Для измерения активности GCG тройного агониста, полученного в примере 1, GCG человека разводили в 4 раза от 50 до 0,000048 нМ и тройные агонисты, полученные в примере 1, разводили в 4 раза от 400 до 0,00038 нМ.

У культивируемых клеток CHO, в которых экспрессировали человеческий рецептор GCG, удаляли культуральную жидкость и к клеткам CHO добавляли каждое из серийно разведенных веществ в количестве 5 мкл соответственно. Затем к ним добавляли буферный раствор, содержащий антитело к cAMP, в количестве 5 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к ним добавляли детектирующую смесь, содержащую лизирующий клетки буфер, в количестве 10 мкл для лизиса клеток и оставляли прореагировать при комнатной температуре в течение 90 мин. После завершения реакции клеточные лизаты использовали в наборе LANCE cAMP (PerkinElmer, США) для расчета значения EC₅₀ по накопленному cAMP и значения сравнивали друг с другом. Относительные активности в сравнении с человеческим GCG приведены ниже в табл. 2.

Для измерения активности GIP тройного агониста, полученного в примере 1, GIP человека разводили в 4 раза от 50 до 0,000048 нМ и тройные агонисты, полученные в примере 1, разводили в 4 раза от 400 до 0,00038 нМ.

У культивируемых клеток CHO, в которых экспрессировали человеческий рецептор GIP, удаляли культуральную жидкость и к клеткам CHO добавляли каждое из серийно разведенных веществ в количестве 5 мкл соответственно. Затем к ним добавляли буферный раствор, содержащий антитело к cAMP, в количестве 5 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к ним добавляли детектирующую смесь, содержащую лизирующий клетки буфер, в количестве 10 мкл для лизиса клеток и оставляли прореагировать при комнатной температуре в течение 90 мин. После завершения реакции клеточные лизаты использовали в наборе LANCE cAMP (PerkinElmer, США) для расчета значения EC₅₀ по накопленному cAMP и значения сравнивали друг с другом. Относительные активности в сравнении с человеческим GIP приведены ниже в табл. 2.

Таблица 2

	Активность <i>in vitro</i> в сравнении с нативным пептидом (%)		
SEQ ID NO	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

038544

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

Новые аналоги глюкагона, полученные выше, обладают функцией тройных агонистов, которые могут активировать все указанные рецепторы: рецепторы GLP-1, рецепторы GIP и рецепторы глюкагона, и, следовательно, аналоги глюкагона могут применяться в качестве терапевтических средств для лечения пациентов с метаболическим синдромом, включая диабет и ожирение.

На основании вышеизложенного материала специалисты в области техники поймут, что возможны и другие формы воплощения настоящего изобретения, не изменяющие технической концепции или существенных признаков настоящего изобретения. В этой связи приведенные в качестве примера воплощения служат исключительно для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Напротив, настоящее изобретение охватывает не только приведенные в качестве примера воплощения, но также и различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут быть в духе настоящего изобретения и входить в его объем, определяемый прилагающейся формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный пептид, обладающий активностью в отношении рецептора глюкагона, рецептора глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1) и рецептора глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP),

содержащий аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 1
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 -метил-глутаминовую 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);

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-; и

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

2. Выделенный пептид по п.1, где 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);

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

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

3. Выделенный пептид по п.1, где Хаа14 представляет собой лейцин или метионин; и Хаа15 представляет собой цистеин, аспарагиновую кислоту или лейцин.

4. Выделенный пептид по п.1, где в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой глицин, α-метил-глутаминовую 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, тирозин 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.

5. Выделенный пептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 2

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-Ser-Xaa40 (общая формула 2, SEQ ID NO: 104),

где в общей формуле 2

Хаа1 представляет собой 4-имидазоацетил, гистидин или тирозин;

Хаа2 представляет собой глицин, α-метил-глутаминовую 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.

6. Выделенный пептид по п.1, где в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой глицин, α -метил-глутаминовую 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.

7. Выделенный пептид по п.5, где в общей формуле 2

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;
 Хаа29 представляет собой глутамин, цистеин или гистидин; и
 Хаа30 представляет собой цистеин, лизин или гистидин.

8. Выделенный пептид по п.1, где в общей формуле 1

Хаа2 представляет собой α -метил-глутаминовую 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. Выделенный пептид по п.1, где в общей формуле 1

Хаа1 представляет собой гистидин или 4-имидазоацетил;
 Хаа2 представляет собой α -метил-глутаминовую 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. Выделенный пептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, представленную ниже общей формулой 3

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 -метил-глутаминовую 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. Выделенный пептид по п.1, где R1 представляет собой цистеин, GKKNWVKHNIT (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.

12. Выделенный пептид по любому из пп.1-11, где в общих формулах 1-3 шестнадцатая аминокислота и двадцатая аминокислота с N-конца вместе образуют кольцо.

13. Выделенный пептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-102.

14. Выделенный пептид по любому из пп.1-11 и 13, обладающий следующими активностями i)-iii):

- i) активация рецептора GLP-1;
- ii) активация рецептора глюкагона и
- iii) активация рецептора GIP.

15. Выделенный пептид по любому из пп.1-11 и 13, где C-конец пептида амидирован.

16. Полинуклеотид, кодирующий пептид по любому из пп.1-11 и 13.

17. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения метаболического синдрома, содержащая пептид по любому из пп.1-11 и 13, где метаболический синдром включает нарушенную толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемия, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, артериосклероз вследствие дислипидемии, атеросклероз, артериосклероз или ишемическую болезнь сердца.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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