

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040165**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.26

(51) Int. Cl. *A61K 38/26* (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890058

(22) Дата подачи заявки
2016.06.29

(54) **ПРОИЗВОДНОЕ ГЛЮКАГОНА И КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ДЛИТЕЛЬНО
ДЕЙСТВУЮЩИЙ КОНЬЮГАТ ЭТОГО ПРОИЗВОДНОГО**

(31) **10-2015-0093265**

(56) US-B2-8703701

(32) **2015.06.30**

WO-A2-2012011752

(33) **KR**

KR-A-10-20120052973

(43) **2018.07.31**

US-B2-8450270

(86) **PCT/KR2016/006984**

KR-A-1020090096498

(87) **WO 2017/003191 2017.01.05**

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

(72) Изобретатель:
**Ким Чон Кук, Пак Юн Джин, Чхой Ин
Юнг, Чун Сун Юб (KR)**

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

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения метаболических синдромов, содержащей производное глюкагона и по меньшей мере одно соединение, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома; к производному глюкагона; к выделенному полинуклеотиду, кодирующему такое производное глюкагона; к экспрессионному вектору, содержащему выделенный полинуклеотид; к длительно действующему конъюгату производного глюкагона; а также к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения метаболического синдрома и к фармацевтической композиции для лечения или предупреждения гликемии, содержащим выделенное производное глюкагона или его конъюгат.

B1

040165

040165

B1

Область техники

Изобретение относится к производному глюкагона, длительно действующему конъюгату этого производного глюкагона и их применению.

Предшествующий уровень техники

В связи с недавним экономическим ростом и изменением привычного рациона питания и т.д. число случаев заболеваний, связанных с метаболическим синдромом, включающих различные заболевания, такие как ожирение, гиперлипидемия, гипертензия, артериосклероз, гиперинсулинемия, диабет и заболевания печени, быстро возрастает. Эти заболевания могут возникать независимо, но, как правило, они возникают в тесной взаимосвязи друг с другом и сопровождаются различными симптомами.

В частности, согласно данным Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization (WHO)) более одного миллиарда взрослых по всему миру имеют избыточный вес, из них свыше 3 миллионов являются клинически тучными, и 250000 людей умирают каждый год в Европе и более 2,5 миллионов людей во всем мире умирают каждый год из-за связанных с избыточным весом заболеваний.

Избыточный вес и ожирение ответственны за повышение кровяного давления и уровней холестерина и возникновение или усугубление различных заболеваний, таких как болезни сердца, диабет, артрит и т.д. Кроме того, проблема ожирения становится также основной причиной увеличения числа случаев артериосклероза, гипертензии, гиперлипидемии или болезней сердца не только у взрослых, но и у детей или подростков.

Хотя ожирение является тяжелым состоянием, которое является причиной различных заболеваний во всем мире, как указано выше, считается, что его можно побороть, прикладывая индивидуальные усилия, и считается также, что у пациентов с ожирением отсутствует самоконтроль. Однако ожирение трудно лечить, поскольку оно представляет собой сложное заболевание, связанное с механизмами контроля аппетита и энергетического метаболизма. Соответственно, лечение ожирения требует не только усилий пациентов с ожирением, но и способа, способного лечить аномальные механизмы, связанные с контролем аппетита и энергетическим метаболизмом. Поэтому были предприняты усилия по разработке лекарственных средств для лечения аномальных механизмов.

В результате этих усилий были разработаны такие лекарственные средства, как Rimonabant® (Sanofi-Aventis), Sibutramin® (Abbott), Contrave® (Takeda), Orlistat® (Roche) и т.д., но их недостатками являются серьезные неблагоприятные эффекты или очень слабые эффекты против ожирения. Например, согласно сообщению, Rimonabant® оказывает побочные эффекты в виде нарушений центральной нервной системы, Sibutramine® и Contrave® оказывают сердечно-сосудистые побочные эффекты, и Orlistat® демонстрирует потерю массы тела лишь примерно 4 кг при приеме в течение одного года. Соответственно, не существует терапевтических агентов против ожирения, которые безопасно могут принимать пациенты с ожирением.

Проведено много всесторонних исследований с целью разработки новых терапевтических агентов против ожирения, которые могут решить проблемы общепринятых лекарственных средств против ожирения. Недавно большое внимание привлекли производные глюкагона. Глюкагон продуцируется поджелудочной железой, когда уровни глюкозы в крови падают в результате приема других лекарственных средств, или заболеваний, или дефицита гормонов или ферментов. Глюкагон посылает сигнал для распада гликогена в печени и последующего высвобождения глюкозы и участвует в увеличении уровней глюкозы в крови до нормального диапазона. Помимо эффекта повышения уровней глюкозы в крови глюкагон снижает аппетит и активирует чувствительную к гормонам липазу адипоцитов, способствуя липолизу и за счет этого оказывает эффект против ожирения. Однако применение глюкагона в качестве терапевтического агента ограничено, поскольку он имеет низкую растворимость и осаждается при нейтральном pH.

Соответственно, глюкагон с улучшенными свойствами сам может быть эффективно использован для лечения тяжелой гипогликемии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), дислипидемии и т.д. благодаря его активности в расщеплении жира и β -окислении в печени.

Одно из производных глюкагона, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), находится в разработке в качестве терапевтического агента для лечения гипергликемии у пациентов с диабетом. GLP-1 имеет функции стимулирования синтеза и секреции инсулина, ингибирования секреции глюкагона, замедления опорожнения желудка, увеличения утилизации глюкозы и торможения всасывания питательных веществ.

Сообщалось также, что эксендин-4, получаемый из яда ящериц и имеющий гомологию аминокислотной последовательности примерно 50% с GLP-1, активирует рецептор GLP-1, тем самым контролируя гипергликемию у пациентов с диабетом (J. Biol. Chem. 1992 Apr 15; 267 (11): 7402-5). Однако сообщается, что лекарственные средства против ожирения, содержащие GLP-1, оказывают побочные эффекты, такие как тошнота и рвота.

Поэтому в качестве альтернативы GLP-1 много внимания было уделено оксинтомодулину, который может связываться с рецепторами двух пептидов, GLP-1 и глюкагона. Оксинтомодулин представляет собой пептид, полученный из предшественника глюкагона, пре-глюкагона, и имеет функции ингибирования всасывания питательных веществ и усиления насыщения GLP-1 и обладает липолитической активностью по-

добно глюкагону, что повышает его силу действия в терапии, направленной против ожирения.

Однако оксинтомодин или его производные имеют серьезный недостаток в том, что необходимо вводить избыточное количество лекарственного средства ежедневно, поскольку оно имеет низкую эффективность и короткий период полувыведения *in vivo*.

Кроме того, при наличии активности GLP-1 и активности глюкагона в одном пептиде соотношение этих активностей становится фиксированным, и поэтому трудно использовать агонист двойного действия в различных соотношениях. Соответственно, комбинированная терапия, позволяющая использовать различные соотношения активностей путем регулирования содержания GLP-1 и глюкагона, может быть более эффективной. Однако для комбинированной терапии требуется улучшение физических характеристик глюкагона, который агрегируется при нейтральном pH и осаждается со временем, демонстрируя таким образом плохую растворимость.

С учетом этих обстоятельств авторами настоящего изобретения были разработаны производные глюкагона с частичными модификациями аминокислотной последовательности глюкагона для повышения терапевтических эффектов глюкагона при гипогликемии и ожирении за счет улучшения физических свойств глюкагона, и было обнаружено, что эти производные глюкагона, благодаря измененным значениям pI, которые отличаются от значений pI нативного глюкагона, имеют улучшенную растворимость и более высокую стабильность при нейтральном pH, и было подтверждено, что разработанные производные глюкагона активируют его рецепторы в анализе *in vitro*, тем самым осуществляя изобретение.

Описание изобретения

Техническая задача.

Задача настоящего изобретения заключается в создании фармацевтической композиции для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащей производное глюкагона и по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома.

Задача настоящего изобретения также заключается в создании новых производных глюкагона.

Задача настоящего изобретения также еще заключается в создании выделенного полинуклеотида, кодирующего производное глюкагона, вектора, включающего в себя полинуклеотид, и выделенной клетки, включающей в себя полинуклеотид или вектор.

Задача настоящего изобретения также заключается в создании выделенного конъюгата, в котором производное глюкагона и биосовместимое вещество, которое способно увеличивать период полувыведения *in vivo*, связаны.

Задача настоящего изобретения также заключается в создании композиции, содержащей производное глюкагона и выделенный конъюгат.

Задача настоящего изобретения также заключается в создании фармацевтической композиции для лечения или предупреждения гипогликемии или метаболического синдрома, содержащей производное глюкагона или выделенный конъюгат.

Задача настоящего изобретения также заключается в создании способа предупреждения или лечения гипогликемии или метаболического синдрома, включающего введение нуждающемуся в этом субъекту вышеуказанной композиции.

Задача изобретения также заключается в обеспечении применения производного глюкагона, или выделенного конъюгата, или композиции в получении лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения гипогликемии или метаболического синдрома.

Решение технической задачи

С целью решения вышеуказанных задач в одном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащая производное глюкагона и по меньшей мере одно соединение или вещество, которое обладает терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома.

Более конкретно, в одном из аспектов настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащая: 1) пептид, содержащий аминокислотную последовательность нижеприведенной общей формулы 1, и 2) по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома:

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-

X24-W-L-X27-X28-X29-X30 (общая формула 1, SEQ ID NO: 45).

В общей формуле 1

X1 представляет собой гистидин, дезаминогистидил, N-диметилгистидил, β-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, β-карбоксиимидазопропионил, триптофан или тирозин или отсутствует;

X2 представляет собой α-метилглутаминовую кислоту, аминокислоту (Aib), D-аланин, глицин, Ser (N-метилглицин), серин или D-серин;

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

- X12 представляет собой лизин или цистеин;
 X13 представляет собой тирозин или цистеин;
 X14 представляет собой лейцин или цистеин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин, α -метилглутаминовую кислоту или цистеин или отсутствует;
 X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин или отсутствует;
 X18 представляет собой аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин, валин или цистеин или отсутствует;
 X19 представляет собой аланин, аргинин, серин, валин или цистеин или отсутствует;
 X20 представляет собой лизин, гистидин, глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин, аргинин, α -метил-глутаминовую кислоту или цистеин или отсутствует;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лейцин, валин или цистеин или отсутствует;
 X23 представляет собой изолейцин, валин или аргинин или отсутствует;
 X24 представляет собой валин, аргинин, аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин, α -метил-глутаминовую кислоту или лейцин или отсутствует;
 X27 представляет собой изолейцин, валин, аланин, лизин, метионин, глутамин или аргинин или отсутствует;
 X28 представляет собой глутамин, лизин, аспарагин или аргинин или отсутствует;
 X29 представляет собой лизин, аланин, глицин или треонин или отсутствует; и
 X30 представляет собой цистеин или отсутствует; при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1, тогда она исключена.
- В другом конкретном воплощении в общей формуле 1
- X1 представляет собой гистидин, триптофан или тирозин или отсутствует;
 X2 представляет собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);
 X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;
 X10 представляет собой тирозин или цистеин;
 X12 представляет собой лизин или цистеин;
 X13 представляет собой тирозин или цистеин;
 X14 представляет собой лейцин или цистеин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;
 X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин;
 X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;
 X19 представляет собой аланин или цистеин;
 X20 представляет собой глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лейцин, валин или цистеин;
 X22 представляет собой изолейцин, валин или аргинин;
 X24 представляет собой валин, аргинин, аланин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин или лейцин;
 X27 представляет собой изолейцин, валин, аланин, метионин, глутамин или аргинин;
 X28 представляет собой глутамин, лизин, аспарагин или аргинин;
 X29 представляет собой треонин; и
 X30 представляет собой цистеин или отсутствует.
- В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1
- X1 представляет собой гистидин, триптофан или тирозин или отсутствует;
 X2 представляет собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);
 X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;
 X10 представляет собой тирозин или цистеин;
 X12 представляет собой лизин или цистеин;
 X13 представляет собой тирозин или цистеин;
 X14 представляет собой лейцин или цистеин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;
 X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин;
 X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;
 X19 представляет собой аланин или цистеин;

X20 представляет собой глутамин, аспарагиновую кислоту или лизин;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;
 X23 представляет собой валин;
 X24 представляет собой валин или глутамин;
 X27 представляет собой изолейцин или метионин;
 X28 представляет собой аспарагин или аргинин;
 X29 представляет собой треонин; и
 X30 представляет собой цистеин или отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении в общей формуле 1

X1 представляет собой тирозин;
 X2 представляет собой аминокислотную кислоту (Aib);
 X7 представляет собой треонин;
 X10 представляет собой тирозин;
 X12 представляет собой лизин;
 X13 представляет собой тирозин;
 X14 представляет собой лейцин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;
 X17 представляет собой лизин или аргинин;
 X18 представляет собой аргинин;
 X19 представляет собой аланин;
 X20 представляет собой глутамин, цистеин или лизин;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, цистеин, валин или глутаминовую кислоту;
 X23 представляет собой валин;
 X24 представляет собой валин или аргинин;
 X27 представляет собой метионин;
 X28 представляет собой аспарагин или аргинин;
 X29 представляет собой треонин; и
 X30 отсутствует.

В еще одном конкретном воплощении вышеуказанный пептид отличается тем, что он представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность нижеприведенной общей формулы 2

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X

30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;
 X10 представляет собой тирозин или цистеин;
 X12 представляет собой лизин или цистеин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;
 X17 представляет собой лизин или аргинин;
 X20 представляет собой глутамин или лизин;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;
 X24 представляет собой валин или глутамин; и
 X30 представляет собой цистеин или отсутствует,

где из числа пептидов, содержащих аминокислотную последовательность общей формулы 2, пептиды, соответствующие SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31 и 33, могут быть исключены.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, отличается тем, что он имеет значение pI, отличающееся от значения pI нативного глюкагона, например pI 6,5 или ниже или pI 7,0 или выше.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, отличается тем, что по меньшей мере одна пара аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28 в общей формуле 1 заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые способны образовывать кольцо, соответственно.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, отличается тем, что пара аминокислот X12 и X16 или пара аминокислот X16 и X20 соответственно заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые способны образовывать кольцо.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, отличается тем, что по меньшей мере одна пара аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28 в общей формуле 1 образует кольцо (например, лактамное кольцо).

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность

общей формулы 1, отличается тем, что С-конец пептида амидирован.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 1, отличается тем, что он представляет собой производное глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона.

В еще одном конкретном воплощении пептид отличается тем, что он содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-44.

В еще одном конкретном воплощении пептид отличается тем, что он содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-13, 15, 17, 20-24, 26-30 и 32-44.

В еще одном конкретном воплощении, пептид отличается тем, что он содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 20.

В еще одном конкретном воплощении соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, отличается тем, что оно выбрано из группы, состоящей из инсулинотропного пептида, агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста рецептора лептина, ингибитора дипептидилпептидазы-IV (DPP-IV), антагониста рецептора Y5, антагониста рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агониста рецептора Y2/4, агониста меланокортинового рецептора 3/4 (MC 3/4), ингибитора желудочной/панкреатической липазы, агониста рецептора 5-гидрокситриптамина 2C (5HT2C), агониста рецептора β 3A, агониста рецептора амилина, антагониста грелина, антагониста рецептора грелина, агониста активируемого пролифератором пероксисом рецептора альфа (PPAR α), агониста активируемого пролифератором пероксисом рецептора дельта (PPAR δ), агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), ингибитора ацетил-СоА-карбоксилазы, пептида YY, холецистокинина (CCK), ксенина, глицентина, обестатина, секретина, несфатина, инсулина и глюкозозависимого инсулинотропного пептида (GIP).

В еще одном конкретном воплощении инсулинотропный пептид отличается тем, что он выбран из группы, состоящей из GLP-1, эксендина-3, эксендина-4, их агониста, их производного, их фрагмента, их варианта и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении инсулинотропный пептид отличается тем, что он представляет собой производное инсулинотропного пептида, в котором N-концевой остаток гистидина инсулинотропного пептида заменен остатком, выбранным из группы, состоящей из дезаминогистидила, N-диметилгистидила, β -гидроксиимидазопропионила, 4-имидазоацетила и β -карбоксиимидазопропионила.

В еще одном конкретном воплощении инсулинотропный пептид отличается тем, что он выбран из группы, состоящей из нативного эксендина-4; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 удалена; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 заменена гидроксильной группой; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 модифицирована диметильной группой; производного эксендина-4, в котором α -углерод 1-й аминокислоты эксендина-4, гистидина, удален; производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена серином, и производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена аргинином.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, отличается тем, что пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, находится в форме длительно действующего конъюгата, с которым связано биосовместимое вещество, способное увеличивать период полувыведения пептида *in vivo*; и инсулинотропный пептид находится в форме длительно действующего конъюгата, с которым связано биосовместимое вещество, способное увеличивать период полувыведения инсулинотропного пептида *in vivo*.

В еще одном конкретном воплощении биосовместимое вещество отличается тем, что оно выбрано из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn (неонатальный Fc-рецептор)-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или их производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара и полимера.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, и инсулинотропный пептид отличаются тем, что они соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении биосовместимое вещество отличается тем, что оно представляет собой FcRn-связывающее вещество, и пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, и инсулинотропный пептид соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством пептидного линкера или непептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из поли-

этиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, поливинил-этилового эфира, декстрана, био-разлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В еще одном конкретном воплощении FcRn-связывающее вещество отличается тем, что оно представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

В еще одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина отличается тем, что она агликозилирована.

В еще одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина отличается тем, что она выбрана из группы, состоящей из:

- (а) домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4;
- (б) домена CH1 и домена CH2;
- (в) домена CH1 и домена CH3;
- (г) домена CH2 и домена CH3;
- (д) комбинации между одним или двумя или более доменами из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной областью или частью шарнирной области иммуноглобулина; и
- (е) димера между каждым доменом константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

В еще одном конкретном воплощении полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, находится в форме димера.

В еще одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина отличается тем, что она представляет собой производное нативной Fc, в котором область, способная образовывать дисульфидную связь, удалена, производное нативной Fc, в котором часть аминокислот(ы) на N-конце удалена, производное нативной Fc, в котором к N-концу добавлен метионин, производное нативной Fc, в котором комплементсвязывающий сайт удален, или производное нативной Fc, в котором сайт антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) удален.

В еще одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина отличается тем, что она представляет собой Fc-область, имеющую происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В еще одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина отличается тем, что она представляет собой Fc-область IgG4.

В еще одном конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина отличается тем, что она представляет собой агликозилированную Fc-область человеческого IgG4.

В еще одном конкретном воплощении непептидный линкер отличается тем, что он связан с цистеиновым остатком пептида, содержащего аминокислотную последовательность общей формулы 1.

В еще одном конкретном воплощении непептидный линкер отличается тем, что оба конца непептидного линкера соответственно связаны с аминокислотной или тиольной группой пептида, который содержит аминокислотную последовательность общей формулы 1, или инсулинотропного пептида и биосовместимым веществом.

В еще одном конкретном воплощении метаболический синдром отличается тем, что он выбран из группы, состоящей из нарушенной толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ожирения, диабета, гипертонии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), атеросклероза, вызванного дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца и инсульта.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено новое производное глюкогаона.

В конкретном воплощении производное глюкогаона отличается тем, что оно представляет собой выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 2
Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X

30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46)

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X20 представляет собой глутамин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X24 представляет собой валин или глутамин; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует,

где из числа пептидов, содержащих аминокислотную последовательность общей формулы 2, пептиды, соответствующие SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31 и 33, могут быть исключены.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2, отличается тем, что пара аминокислот X16 и X20 заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые способны образовывать кольцо.

В еще одном конкретном воплощении пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2, отличается тем, что С-конец пептида амидирован.

В еще одном конкретном воплощении пептид отличается тем, что он представляет собой производное глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона.

В еще одном конкретном воплощении пептид отличается тем, что он содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44.

В еще одном конкретном воплощении пептид отличается тем, что он содержит аминокислотную последовательность of SEQ ID NO: 12.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены выделенный полинуклеотид, кодирующий производное глюкагона, вектор, включающий в себя полинуклеотид, и выделенная клетка, включающая в себя полинуклеотид или вектор.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный конъюгат, в котором производное глюкагона и биосовместимое вещество, способное увеличивать период полувыведения *in vivo*, связаны.

В конкретном воплощении биосовместимое вещество отличается тем, биосовместимое вещество выбрано из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или их производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара и полимера.

В конкретном воплощении выделенный пептид отличается тем, что он связан с биосовместимым веществом посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В конкретном воплощении биосовместимое вещество отличается тем, что оно представляет собой FcRn-связывающее вещество, и выделенный пептид и инсулинотропный пептид соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством пептидного линкера или непептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, поливинил-этилового эфира, декстрана, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) или полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В конкретном воплощении FcRn-связывающее вещество отличается тем, что оно представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая производное глюкагона или выделенный конъюгат.

В конкретном воплощении композиция отличается тем, что она представляет собой фармацевтическую композицию для лечения или предупреждения гипогликемии или метаболического синдрома.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения гипогликемии или метаболического синдрома, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение производного глюкагона, или выделенного конъюгата, или композиции в получении лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения гипогликемии или метаболического синдрома.

Преимущественные эффекты изобретения.

Производные глюкагона по настоящему изобретению имеют улучшенные физические свойства по сравнению со свойствами нативного глюкагона и поэтому могут быть эффективно использованы в качестве терапевтических агентов для лечения гипогликемии за счет улучшения соблюдения пациентом режима и схемы лечения. Дополнительно, производные глюкагона по настоящему изобретению могут быть эффективно использованы для предупреждения и лечения гипогликемии и метаболического синдрома, такого как ожирение, диабет и неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен график, иллюстрирующий изменения массы тела животных моделей ожирения (крысы), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, во время отдельного или совместного введения крысам длительно действующего конъюгата инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующим

шего конъюгата производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным SEQ ID NO: 12) с использованием установленной дозы крысам с интервалами 3 суток в течение 15 суток;

на фиг. 2 - результат, иллюстрирующий количество брыжеечного жира животных моделей ожирения (крыс), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, во время отдельного или совместного введения длительно действующего конъюгата инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным SEQ ID NO: 12) с использованием установленной дозы крысам в течение 15 суток (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ относительно носителя при анализе методом ANOVA (дисперсионный анализ));

на фиг. 3 - результат, иллюстрирующий разницу в массе печени животных моделей ожирения (крыс), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, во время отдельного или совместного введения длительно действующего конъюгата инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным SEQ ID NO: 12) с использованием установленной дозы крысам в течение 15 суток ($\times p < 0,01$, $\times p < 0,001$ относительно носителя при анализе методом ANOVA);

на фиг. 4 - график изменения массы тела (MT) животных моделей ожирения (мышей), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, после отдельного или совместного введения крысам длительно действующего конъюгата инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным SEQ ID NO: 20) с использованием установленной дозы крысам в течение 22 суток;

на фиг. 5 - результат, иллюстрирующий изменения содержания холестерина в крови животных моделей ожирения (мышей), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, после отдельного или совместного введения длительно действующего конъюгата инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным SEQ ID NO: 20) с использованием установленной дозы крысам в течение 22 суток.

Лучший вариант осуществления изобретения.

Конкретные подробности настоящего изобретения могут быть разъяснены нижеследующим образом. В частности, разъяснения и воплощения, раскрытые в настоящем изобретении, применимы к другим разъяснениям и воплощениям соответственно. То есть все комбинации различных элементов, раскрытых в настоящем изобретении, входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, объем настоящего изобретения не ограничен конкретными признаками, описанными ниже.

По всему тексту описания настоящего изобретения использованы не только общепринятые 1-буквенные коды и 3-буквенные коды для природных аминокислот, но и такие 3-буквенные коды, как Aib (α -аминоизомаляновая кислота), Sar (N-метилглицин), обычно используемые для других аминокислот. Помимо этого, аминокислоты, указанные сокращенно в настоящем описании изобретения, описаны согласно номенклатуре IUPAC-IUB.

аланин A	аргинин R
аспарагин N	аспарагиновая кислота D
цистеин C	глутаминовая кислота E
глутамин Q	глицин G
гистидин H	изолейцин I
лейцин L	лизин K
метионин M	фенилаланин F
пролин P	серин S
треонин T	триптофан W
тирозин Y	валин V

В одном из аспектов настоящего изобретения предложена композиция, содержащая производное глюкагона и по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, и, более конкретно, предложена фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащая производное глюкагона и по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома.

Производное глюкагона согласно настоящему изобретению включает пептид, имеющий по меньшей мере одно отличие в аминокислотной последовательности по сравнению с нативным глюкагоном; пептид, в котором последовательность нативного глюкагона модифицирована посредством модификации

нативного глюкагона; и миметик нативного глюкагона, который может активировать рецепторы глюкагона подобно нативному глюкагону.

Такое производное глюкагона может представлять собой производное глюкагона, имеющее улучшенные физические свойства за счет того, что оно имеет измененное значение pI по сравнению с нативным глюкагоном. Дополнительно, производное глюкагона может представлять собой производное глюкагона с улучшенной растворимостью, сохраняющее при этом активность активирования рецепторов глюкагона, но этим не ограничено.

Дополнительно, производное глюкагона может представлять собой глюкагон, не встречающийся в природе.

В частности, нативный глюкагон может иметь следующую аминокислотную последовательность:

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

Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1)

Использованный в данном документе термин "pI" или "изоэлектрическая точка" относится к значению pH, при котором макромолекула, такая как полипептид, не имеет никакого суммарного заряда (0). В случае полипептида с различными заряженными функциональными группами суммарный заряд полипептида в целом равен "0" в точке, где значение pH является таким же, как значение pI. Суммарный заряд полипептида при pH выше, чем pI, будет отрицательным, а суммарный заряд полипептида при pH ниже, чем pI, будет положительным.

Значения pI могут быть определены в геле с фиксированным градиентом pH, состоящем из полиакриламида, крахмала или агарозы, методом изоэлектрического электрофореза или могут быть определены, например, исходя из аминокислотной последовательности с использованием инструмента pI/MW (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) на сервере ExPASy.

Использованный в данном документе термин "измененная pI" относится к pI, которая отличается от pI нативного глюкагона вследствие замены части аминокислотной последовательности нативного глюкагона аминокислотным остатком, имеющим отрицательный заряд или положительный заряд, т.е. к пониженному или повышенному значению pI. Пептид с такой измененной pI может проявлять улучшенную растворимость и высокую стабильность при нейтральном pH в виде производного глюкагона.

Более конкретно, производное глюкагона может иметь измененное значение pI, но не значение pI (6,8) нативного глюкагона, и еще более конкретно может иметь значение pI менее 6,8, конкретнее 6,7 или менее, конкретнее 6,5 или менее и дополнительно значение pI, превышающее 6,8, 7 или выше, более конкретно 7,5 или выше, но не ограничивается этими значениями, и любое значение pI, отличающееся от значения pI нативного глюкагона, будет входить в объем настоящего изобретения. В частности, когда значение pI отличается от значения pI нативного глюкагона и поэтому проявляет улучшенную растворимость при нейтральном pH по сравнению с растворимостью нативного глюкагона, демонстрируя за счет этого низкий уровень агрегации, тогда это производное будет входить в объем настоящего изобретения.

Более конкретно, производное глюкагона может иметь значение pI от 4 до 6,5 и/или от 7 до 9,5, конкретно от 7,5 до 9,5 и конкретнее от 8,0 до 9,3, но значение pI не ограничено этими значениями. В этом случае благодаря более низкому или более высокому значению pI по сравнению с нативным глюкагоном, может быть продемонстрирована улучшенная растворимость и высокая стабильность при нейтральном pH по сравнению с растворимостью и стабильностью нативного глюкагона.

Конкретно, производное нативного глюкагона может быть модифицировано любым способом замены, добавления, делеции и модификации или их комбинации аминокислоты нативного глюкагона.

Примеры производных глюкагона, полученных комбинацией вышеуказанных способов, включают пептид, который отличается по меньшей мере одним аминокислотным остатком аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью нативного глюкагона, и в котором N-концевой аминокислотный остаток дезаминирован, имеющий функцию активирования рецептора глюкагона, без ограничения, и производные нативного глюкагона могут быть получены в результате осуществления комбинации различных способов получения производных.

Дополнительно, такая модификация с целью получения производных нативного глюкагона может включать все модификации с использованием аминокислот L-типа или D-типа и/или аминокислот ненативного типа; и/или модификацию нативной последовательности, например, модификацию функциональной группы, межмолекулярное ковалентное связывание (например, образование кольца боковыми цепями), метилирование, ацилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, аминогексанирование, биотинилирование и т.д.

Дополнительно, модификация может также включать все модификации, когда одну или более аминокислот добавляют к амино- и/или карбоксиконцу нативного глюкагона.

В ходе замены или добавления аминокислот могут быть использованы не только 20 аминокислот, обычно присутствующих в белках человека, но и атипичные или не встречающиеся в природе аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот могут включать Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, содержащие эти аминокислоты, и атипичные пептидные последовательности могут быть синтезированы и могут быть приобретены у коммерческих поставщиков, например

American Peptide Company, Bachem (США) или Anygen (Корея).

Поскольку глюкагон имеет рН примерно 7, он не растворяется в растворе, имеющем физиологический рН (рН 4-8) и имеет тенденцию осаждаться при нейтральном рН. В водном растворе с рН 3 или ниже глюкагон растворяется на начальной стадии, но осаждается через час с образованием геля. Поскольку гелеобразный глюкагон состоит в основном из β-структурных фибрилл, введение осажденного таким образом глюкагона через инъекционную иглу или посредством внутривенной инъекции будет блокировать сосуды, и, следовательно, он будет непригоден для использования в качестве инъекционного агента. Для того чтобы замедлить процесс осаждения, обычно используют кислотные (рН 2-4) препараты, и в этом случае глюкагон может оставаться в относительно неагрегированном состоянии в течение короткого периода времени. Однако глюкагон может образовывать фибриллы очень быстро при низких значениях рН, и поэтому такие кислотные препараты после их приготовления нельзя инъецировать.

В этой связи, авторы настоящего изобретения разработали производные глюкагона с профилями длительного действия в результате модификации рI нативного глюкагона посредством замены аминокислотных остатков, имеющих отрицательные заряды и положительные заряды. Производные глюкагона по настоящему изобретению, имеющие измененную рI по сравнению с рI нативного глюкагона, характеризуются улучшенной растворимостью и/или высокой стабильностью при нейтральном рН по сравнению с нативным глюкагоном.

В конкретном воплощении изобретения производное глюкагона может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 1

X1-X2-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-F-X23-X24-W

-L-X27-X28-X29-X30 (общая формула 1, SEQ ID NO: 45).

В вышеуказанной формуле

X1 представляет собой гистидин, дезаминогистидил, N-диметилгистидил, β-гидроксиимидазо-пропионил, 4-имидазоацетил, β-карбоксиимидазопропионил, триптофан или тирозин или отсутствует;

X2 представляет собой α-метилглутаминовую кислоту, аминокислотную кислоту (Aib), D-аланин, глицин, Sar (N-метилглицин), серин или D-серин;

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин, α-метилглутаминовую кислоту или цистеин или отсутствует;

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин или отсутствует;

X18 представляет собой аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин, валин или цистеин или отсутствует;

X19 представляет собой аланин, аргинин, серин, валин или цистеин или отсутствует;

X20 представляет собой лизин, гистидин, глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин, аргинин, α-метил-глутаминовую кислоту или цистеин или отсутствует;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лейцин, валин или цистеин или отсутствует;

X23 представляет собой изолейцин, валин или аргинин или отсутствует;

X24 представляет собой валин, аргинин, аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин, α-метил-глутаминовую кислоту или лейцин или отсутствует;

X27 представляет собой изолейцин, валин, аланин, лизин, метионин, глутамин или аргинин или отсутствует;

X28 представляет собой глутамин, лизин, аспарагин или аргинин или отсутствует;

X29 представляет собой лизин, аланин, глицин или треонин или отсутствует; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует;

при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1, тогда она исключена.

В вышеизложенном, когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична любой аминокислотной последовательности, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, и, в частности, аминокислотной последовательности любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 15, 36 и 38-43, тогда возможно, что пептид может быть исключен из объема пептидов, которые содержат аминокислотную последовательность общей формулы 1, но не ограничивается этим.

Более конкретно, в общей формуле 1

X1 представляет собой гистидин, триптофан или тирозин или отсутствует;

- X2 представляет собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);
 X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;
 X10 представляет собой тирозин или цистеин;
 X12 представляет собой лизин или цистеин;
 X13 представляет собой тирозин или цистеин;
 X14 представляет собой лейцин или цистеин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;
 X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин;
 X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;
 X19 представляет собой аланин или цистеин;
 X20 представляет собой глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лейцин, валин или цистеин;
 X22 представляет собой изолейцин, валин или аргинин;
 X24 представляет собой валин, аргинин, аланин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин или лейцин;
 X27 представляет собой изолейцин, валин, аланин, метионин, глутамин или аргинин;
 X28 представляет собой глутамин, лизин, аспарагин или аргинин;
 X29 представляет собой треонин; и
 X30 представляет собой цистеин или отсутствует при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1, тогда она исключена.

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-44, и конкретно пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-44, но не ограничивается этим.

Кроме того, хотя в настоящем изобретении пептид описан как "пептид, состоящий из конкретной SEQ ID NO", такое выражение не исключает мутацию в пептиде, которая может иметь место в результате не имеющего значения добавления последовательности слева или справа от аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, или встречающуюся в природе мутацию или молчащую мутацию, при условии, что пептид, имеющий такую мутацию, обладает активностью, такой же, как активность пептида, который состоит из аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO или соответствующей активности этого пептида. Даже когда имеет место добавление последовательности или мутация, пептид очевидным образом входит в объем настоящего изобретения.

И наоборот, в другом аспекте, когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, и в частности любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 15, 36 и 38-43, пептид возможно может быть исключен из объема пептидов, которые содержат аминокислотную последовательность общей формулы 1, но не ограничивается этим. То, что описано выше, может быть применено также к другим конкретным воплощениям или аспектам, но без ограничения.

Конкретно, в общей формуле 1

- X1 представляет собой гистидин, триптофан или тирозин или отсутствует;
 X2 представляет собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);
 X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;
 X10 представляет собой тирозин или цистеин;
 X12 представляет собой лизин или цистеин;
 X13 представляет собой тирозин или цистеин;
 X14 представляет собой лейцин или цистеин;
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;
 X17 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин;
 X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;
 X19 представляет собой аланин или цистеин;
 X20 представляет собой глутамин, аспарагиновую кислоту или лизин;
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;
 X23 представляет собой валин;
 X24 представляет собой валин или глутамин;
 X27 представляет собой изолейцин или метионин;
 X28 представляет собой аспарагин или аргинин;
 X29 представляет собой треонин; и
 X30 представляет собой цистеин или отсутствует;

при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1, тогда она исключена.

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-13, 15, 17, 20-24, 26-30 и 32-44, и конкретно пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-13, 15, 17, 20-24, 26-30 и 32-44, но не ограничивается этим.

Конкретно, в общей формуле 1

X1 представляет собой тирозин;

X2 представляет собой аминокислотную кислоту;

X7 представляет собой треонин;

X10 представляет собой тирозин;

X12 представляет собой лизин;

X13 представляет собой тирозин;

X14 представляет собой лейцин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X18 представляет собой аргинин;

X19 представляет собой аланин;

X20 представляет собой глутамин, цистеин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту, цистеин, валин или глутаминовую кислоту;

X23 представляет собой валин;

X24 представляет собой валин или аргинин;

X27 представляет собой метионин;

X28 представляет собой аспарагин или аргинин;

X29 представляет собой треонин; и

X30 отсутствует.

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 18, 19, 25 и 31, и конкретно пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 16, 18, 19, 25 и 31, но не ограничивается этим.

Более конкретно, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность следующей общей формулы 2:

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-X

30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X20 представляет собой глутамин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X24 представляет собой валин или глутамин; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует,

при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична любой из SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31 и 33, тогда она может быть исключена, но без ограничения этим.

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, и конкретно пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, но не ограничивается этим. Более конкретно, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 20 или (по существу) состоит из соответствующей аминокислотной последовательности, но не ограничивается этим.

Дополнительно, пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или общей формулы 2, может представлять собой пептид, в котором по меньшей мере одна пара аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28 в общей формуле 1 или общей формулы 2 может быть заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые способны образовывать кольцо, соответственно, но не ограничивается этим.

Более конкретно, пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или

общей формулы 2, может представлять собой пептид, в котором пара аминокислот X12 и X16 или пара аминокислот X16 и X20 соответственно заменена глутаминовой кислотой или лизином, которые способны образовывать кольцо.

Более конкретно, по меньшей мере одна пара аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28 может представлять собой пептид, который образует кольцо (например, лактамное кольцо), но не ограничивается этим.

В частности, пептид может быть модифицирован в его аминоконце или карбоксикольце или защищен различными органическими группами для защиты пептида от расщепляющих белок ферментов *in vivo*, одновременно с увеличением его стабильности, например может представлять собой пептид, в котором его С-конец амидирован.

Дополнительно, пептид по настоящему изобретению может быть синтезирован способом, известным в данной области, согласно его длине, например с использованием автоматического синтезатора пептидов, и может быть получен по генно-инженерной технологии.

Конкретно, пептид по настоящему изобретению может быть получен стандартным способом синтеза с использованием рекомбинантной экспрессионной системы или любым другим способом, известным в данной области. Соответственно, производное глюкагона по настоящему изобретению может быть синтезировано различными способами, включающими, например, способы, описанные ниже:

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

(б) способ экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, в клетке-хозяине и выделения продукта экспрессии из культуры клетки-хозяина; или

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

способ получения фрагментов пептида путем осуществления любой комбинации способов (а), (б) и (в) с получением пептида посредством связывания фрагментов пептида и затем выделения пептида.

В более конкретном примере описанное производное глюкагона может быть получено в результате генетической манипуляции, которая включает получение гена слияния, кодирующего слитый белок, включая партнер слияния и производное глюкагона, трансформирование полученного продукта в клетку-хозяин, экспрессию в форме слитого белка и очистку производного глюкагона из слитого белка с использованием протеазы или соединения, которое способно расщеплять белок, с последующим разделением. С этой целью, например, кодирующая аминокислотный остаток последовательность ДНК, которая может быть очищена протеазой, такой как Фактор Ха или энтерокиназа, CNBγ или соединением, таким как гидроксилламин, может быть вставлена между партнером слияния и полинуклеотидом, кодирующим производное глюкагона.

В конкретном воплощении настоящего изобретения подтверждено, что пептид по настоящему изобретению имеет другую *pI* по сравнению с *pI* нативного глюкагона (см. таблицу). В результате, пептид по настоящему изобретению имеет улучшенную растворимость и более высокую стабильность при нейтральном *pH*. Соответственно, пептид по настоящему изобретению может способствовать соблюдению пациентами режима и схемы лечения при использовании его в качестве гипогликемического агента, а также является пригодным для совместного введения с другими агентами против ожирения и поэтому может быть эффективно использован для предупреждения и лечения гипогликемии и ожирения.

В связи с этим, пептид по настоящему изобретению может предоставлять привлекательный терапевтический выбор, касающийся гипогликемии, ожирения или связанных с ними заболеваний.

Например, пептид по настоящему изобретению является основным гормоном, контролирующим инсулиновый ответ, и он может быть эффективно использован для лечения тяжелой гипогликемии у пациентов, страдающих диабетом.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению можно применять в качестве фармацевтического лекарственного средства не только для предупреждения увеличения массы тела, стимулирования снижения массы тела, сокращения лишнего веса и ожирения, в том числе нездорового ожирения (например, посредством контролирования аппетита, приема пищи, всасывания питательных веществ, потребления калорий и/или потребления энергии), но также для лечения связанного с ожирением воспаления, связанного с ожирением заболевания желчного пузыря и вызванного ожирением апноэ во сне, но без ограничения этим, и может быть использован для лечения ассоциированных заболеваний или состояний здоровья.

Пептид по настоящему изобретению можно также применять для лечения метаболического синдрома, иного чем ожирение, т.е. связанных с ожирением заболеваний, таких как нарушенная толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемия, дислипидемия, ожирение, диабет, гипертензия, неалкогольный стеатогепатит (неалкогольный стеатогепатит, NASH), атеросклероз, вызванный дислипидемией, атеросклероз, артериосклероз, коронарная болезнь сердца, инсульт, гипогликемия и т.д. Тем не менее, эффекты пептида по настоящему изобретению могут быть опосредованы полностью или частично эффектами, связанными с массой тела, описанными выше, или могут быть независимыми от них.

Примеры соединения или вещества, обладающего терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома и предназначенного для включения в совместное введение или композицию по

настоящему изобретению, могут включать инсулинотропный пептид, агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агонист рецептора лептина, ингибитор дипептидилпептидазы-IV (DPP-IV), антагонист рецептора Y5, антагонист рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агонист рецептора Y2/4, агонист меланокортинового рецептора 3/4 MC 3/4), ингибитор желудочной/панкреатической липазы, агонист рецептора 5-гидрокситриптамина 2C (5HT2C), агонист рецептора β3A, агонист рецептора амилина, антагонист грелина, антагонист рецептора грелина, агонист активируемого пролифератором пероксисом рецептора альфа (PPARα), агонист активируемого пролифератором пероксисом рецептора дельта (PPARδ), агонист фарнезоидного X-рецептора (FXR), ингибитор ацетил-CoA-карбоксилазы, пептид YY, холецистокинин (CCK), ксенин, глицентин, обестатин, секретин, несфатин, инсулин и глюкозозависимый инсулинотропный пептид (GIP), но не ограничиваются ими. Дополнительно, все лекарственные средства, которые являются эффективными для лечения ожирения, и лекарственные средства, способные ингибировать печеночное воспаление и фиброз, могут быть включены.

Конкретно, инсулинотропный пептид может быть выбран из группы, состоящей из GLP-1, эксендина-3, эксендина-4, их агониста, их производного, их фрагмента, их варианта и их комбинации.

Более конкретно, инсулинотропный пептид может представлять собой производное инсулинотропного пептида, в котором N-концевой гистидин инсулинотропного пептида заменен остатком, выбранным из группы, состоящей из дезаминогистидила, N-диметилгистидила, β-гидроксиимидазопропионила, 4-имидазоацетила и β-карбоксиимидазопропионила, но не ограничивается ими.

Более конкретно, инсулинотропный пептид может быть выбран из группы, состоящей из нативного эксендина-4; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 удалена; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 заменена гидроксильной группой; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 модифицирована диметильной группой; производного эксендина-4, в котором α-углерод 1-й аминокислоты эксендина-4, гистидин, исключен; производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена серином, и производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена аргинином, но не ограничивается ими.

Необходимо отметить, что в качестве примера инсулинотропного пептида или его длительно действующего конъюгата, полное описание публикации заявки на патент США № 2010-0105877 раскрыто в настоящем изобретении в виде ссылки.

В более конкретном воплощении производное глюкагона, например пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или общей формулы 2, может находиться в форме длительно действующего конъюгата, с которым связано биосовместимое вещество, способное увеличивать период полувыведения *in vivo*, но не ограничивается этим. Биосовместимое вещество может быть взаимозаменяемым образом использовано с носителем.

Дополнительно, инсулинотропный пептид может также находиться в форме длительно действующего конъюгата, с которым связано биосовместимое вещество, способное увеличивать период полувыведения *in vivo*, но не ограничивается этим.

В конкретном воплощении настоящего изобретения продолжительность действия вышеуказанного конъюгата увеличивается по сравнению с нативным глюкагоном или производным глюкагона, с которым носитель не связан. В настоящем изобретении конъюгат белка называется "длительно действующим конъюгатом".

Примеры биосовместимого вещества могут включать полиэтиленгликоль, жирную кислоту, холестерин, альбумин и его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, полимер из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитело, фрагмент антитела, FcRn-связывающее вещество, соединительная ткань *in vivo* или их производное, нуклеотид, фибронектин, трансферрин, сахарид и полимер, но не ограничиваются ими. Например, по меньшей мере одна аминокислотная боковая цепь в пептиде по настоящему изобретению может быть присоединена к биосовместимому веществу с целью увеличения растворимости *in vivo*, и/или периода полувыведения, и/или увеличения его биодоступности. Эти модификации, как известно, снижают клиренс терапевтических белков и пептидов.

Для биосовместимого полимера подходящими являются растворимые (амфипатические или гидрофильные), нетоксичные и фармацевтически инертные полимеры, и они могут включать, например, ПЭГ (полиэтиленгликоль), гомополимеры или сополимеры ПЭГ, метил-замещенные полимеры (мПЭГ) и поли-аминокислоты, такие как поли-лизин, поли-аспарагиновая кислота и поли-глутаминовая кислота, но не ограничиваются ими.

Известным фактом для специалиста в данной области является то, что модифицированное таким образом производное глюкагона будет оказывать лучший терапевтический эффект по сравнению с нативным глюкагоном. Соответственно, варианты производного глюкагона, как описано выше, также входят в объем настоящего изобретения.

В более конкретном воплощении производное глюкагона, например пептид, который содержит аминокислотную последовательность общей формулы 1 или общей формулы 2, и инсулинотропный пептид могут быть соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством линкера, выбранного

из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации, но без ограничения ими.

В еще более конкретном воплощении биосовместимое вещество может представлять собой FcRn-связывающее вещество, и производное глюкагона, например пептид, который содержит аминокислотную последовательность общей формулы 1 или общей формулы 2, и инсулинотропный пептид могут быть соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством пептидного линкера или непептидного линкера, но без ограничения этим.

В качестве конкретного примера FcRn-связывающее вещество может представлять собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

В данном документе "непептидный линкер" включает биосовместимый полимер, с которым связаны по меньшей мере два повторяющихся звена. Повторяющиеся звенья связаны друг с другом произвольной ковалентной связью вместо пептидной связи. Непептидный линкер может представлять собой одну структуру, которая образует группировку длительно действующего конъюгата по настоящему изобретению.

Использованный в данном документе термин "непептидный линкер" может быть использован взаимозаменяемым образом с "непептидным полимером".

Дополнительно, в конкретном воплощении конъюгат может представлять собой конъюгат, в котором белковое лекарственное средство ковалентно связано с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидного линкера, содержащего реакционноспособную группу, которая может связываться с Fc-областью иммуноглобулина и белковым лекарственным средством по обоим концам конъюгата.

Без конкретного ограничения непептидный линкер может представлять собой непептидный линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, полисахарида и их комбинации. В более конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, но не ограничивается им. Дополнительно, производные, которые уже известны в данной области, и производные, которые легко могут быть получены по известным в данной области технологиям, входят в объем настоящего изобретения.

Непептидный линкер, который используется в настоящем изобретении, может представлять собой любой полимер, который устойчив к протеазам *in vivo*, без ограничения. Молекулярная масса непептидного полимера может находиться в диапазоне от 1 до 100 кДа и конкретно от 1 до 20 кДа, но не ограничена этими значениями. Дополнительно, непептидный линкер по настоящему изобретению, который связан с полипептидом, содержащим Fc-область иммуноглобулина, может включать не только единственный тип полимера, но и комбинацию разных типов полимеров.

В конкретном воплощении оба конца непептидного линкера могут быть соответственно связаны с аминокислотной группой или тиольной группой пептида, который содержит аминокислотную последовательность общей формулы 1, или инсулинотропного пептида и биосовместимым веществом.

Конкретно, непептидный полимер может содержать реакционноспособную группу на обоих концах, соответственно, которая может связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулина и производным глюкагона или инсулинотропным пептидом; и конкретно, реакционноспособная группа может быть связана с аминокислотной группой N-конца лизина или тиольной группой цистеина производного глюкагона, или инсулинотропного пептида, или Fc-фрагмента иммуноглобулина.

Дополнительно, реакционноспособная группа непептидного полимера, которая может связываться с Fc-областью иммуноглобулина, производным глюкагона и инсулинотропным пептидом, может быть выбрана из группы, состоящей из альдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного, но не ограничивается ими.

В вышеизложенном примеры альдегидной группы могут включать пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу, но не ограничиваются ими.

В вышеизложенном в качестве сукцинимидного производного могут быть использованы сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропианоат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропианоат, N-гидроксисукцинимид, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат, но без ограничения ими.

Дополнительно, конечный продукт, полученный в результате восстановительного алкилирования посредством альдегидной связи, является более стабильным, чем продукт, связанный посредством амидной связи. Альдегидная реакционноспособная группа селективно взаимодействует с N-концом при низком pH, хотя она может образовывать ковалентную связь с остатком лизина при высоких pH, например при pH 9,0.

Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного линкера могут быть одинаковыми

или могут отличаться друг от друга, например малеимидная реакционноспособная группа может находиться на одном конце, а альдегидная группа, пропиональдегидная группа или бутиральдегидная группа может находиться на другом конце. Однако если Fc-область иммуноглобулина и производное глюкогона или инсулинотропный пептид могут быть конъюгированы по каждому концу непептидного линкера, то это не является конкретным ограничением.

Например, непептидный полимер может иметь малеимидную группу на одном конце и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце.

При использовании в качестве непептидного полимера полиэтиленгликоля, имеющего реакционноспособную гидроксигруппу на обоих его концах, гидроксигруппа может быть активирована превращением ее в различные реакционноспособные группы в результате известных химических реакций, или же для получения длительно действующего конъюгата белка по настоящему изобретению может быть использован коммерчески доступный полиэтиленгликоль, имеющий модифицированную реакционноспособную группу.

В конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой непептидный полимер, который может связываться с цистеиновым остатком производного глюкогона и конкретнее с группой -SH цистеина, но не ограничивается этим.

В конкретном воплощении конъюгат может представлять собой конъюгат, в котором пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 20, связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидного полимера, и, в частности, непептидный полимер может представлять собой непептидный полимер, который связан с цистеиновым остатком, находящимся в 30-м положении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, или цистеиновым остатком, находящимся в 17-м положении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, но не ограничивается этим.

При использовании малеимид-ПЭГ-альдегида малеимидная группа может быть связана с группой -SH производного глюкогона посредством тиоэфирной связи, и альдегидная группа может быть связана с -NH₂ Fc иммуноглобулина посредством восстановительного алкилирования, но не ограничивается этим, и вышеизложенное является только лишь воплощением.

В настоящем изобретении "Fc-область иммуноглобулина" относится к области, содержащей константную область тяжелой цепи 2 (CH2) и/или константную область тяжелой цепи 3 (CH3), за исключением вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина. Fc-область иммуноглобулина может представлять собой структуру, которая создает группировку конъюгата белка по настоящему изобретению.

Fc-область иммуноглобулина может содержать шарнирную область в константной области тяжелой цепи, но не ограничивается этим. Дополнительно, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой расширенную Fc-область, содержащую часть или всю константную область тяжелой цепи 1 (CH1) и/или константную область легкой цепи 1 (CL1), за исключением вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при условии, что Fc-область иммуноглобулина оказывает действие, по существу такое же или улучшенное по сравнению с нативным типом. Дополнительно, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой достаточно длинная часть аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3, удалена.

Например, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой 1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 и домен CH4; 2) домен CH1 и домен CH2; 3) домен CH1 и домен CH3; 4) домен CH2 и домен CH3; 5) комбинацию между одним или двумя или более доменами из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4 и шарнирной областью иммуноглобулина (или частью шарнирной области); и 6) димер между каждым доменом константной области тяжелой цепи и константной областью легкой цепи, но не ограничивается ими.

Дополнительно, в конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина может быть в димерной форме, и одна молекула производного глюкогона или инсулинотропного пептида может быть ковалентно связана с Fc-областью в димерной форме, и, в частности, Fc иммуноглобулина и производное глюкогона или инсулинотропный пептид могут быть связаны посредством непептидного полимера. Кроме того, две молекулы производного глюкогона или инсулинотропного пептида возможно могут быть конъюгированы симметричным образом с единственной Fc-областью в димерной форме. В частности, Fc иммуноглобулина и производное глюкогона или инсулинотропный пептид могут быть связаны посредством непептидного линкера, но описанное выше воплощение не является ограничением.

Дополнительно, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению содержит не только нативную аминокислотную последовательность, но и производное этой последовательности. Производное аминокислотной последовательности относится к аминокислотной последовательности, которая отличается по меньшей мере одним аминокислотным остатком вследствие делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены или их комбинации.

Например, аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, связываются с Fc иммуноглобулина, могут быть использованы в качестве подходящих сай-

тов для модификации.

Дополнительно, возможны другим различные производные, в том числе производное, которое имеет делецию области, способной образовывать дисульфидную связь, или делецию некоторых аминокислотных остатков на N-конце нативной Fc, или добавление остатка метионина на N-конце нативной Fc. Кроме того, для удаления эффекторных функций делеция может иметь место в комплементсвязывающем сайте, таком как C1q-связывающий сайт и сайт антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Методы получения таких производных последовательности Fc-области иммуноглобулина раскрыты в публикациях международных патентных заявок WO 97/34631, WO 96/32478 и др.

Аминокислотные замены в белках и пептидах, которые обычно не изменяют активность белков или пептидов, известны в данной области (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). В большинстве случаев обычными заменами являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly в обоих направлениях. Кроме того, Fc-область может, при необходимости, быть модифицирована фосфорилированием, сульфанированием, акрилизацией, гликозилированием, метилированием, фарнезилацией, ацетилированием, амидированием и т.д.

Описанные выше производные Fc демонстрируют биологическую активность, идентичную активности Fc-области по настоящему изобретению, и имеют повышенную структурную стабильность по отношению к нагреву, pH и т.д.

Далее, Fc-область иммуноглобулина может быть получена из нативных форм, выделенных *in vivo* из людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомячки, крысы, морские свинки и т.д., или может представлять собой ее рекомбинанты или производные, полученные из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. Здесь Fc-область может быть получена из нативного иммуноглобулина путем выделения полного иммуноглобулина из живого организма человека или животного и обработки выделенного иммуноглобулина протеазой. При обработке полного иммуноглобулина папаином он расщепляется на области Fab и Fc, а при обработке полного иммуноглобулина пепсином он расщепляется на фрагменты pF'c и F(ab)₂. Fc или pF'c могут быть выделены методом эксклюзионной хроматографии и т.д. В более конкретном воплощении Fc-область человека представляет собой рекомбинантную Fc-область иммуноглобулина, полученную из микроорганизма.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может иметь природные гликаны с повышенным или пониженным содержанием гликанов по сравнению с природным типом или могут быть в дегликозилированной форме. Повышение, понижение содержания или удаление гликанов Fc иммуноглобулина может быть осуществлено стандартными методами, такими как химический метод, ферментативный метод и генно-инженерный метод с использованием микроорганизма. Fc-область иммуноглобулина, полученная путем удаления гликанов из Fc-области, демонстрирует значительное снижение аффинности связывания с C1q частью и снижение или утрату антителозависимой цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, и поэтому она не индуцирует нежелательные иммунные ответы *in vivo*. В этой связи, Fc-область иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной Fc-области иммуноглобулина может представлять собой более стабильную форму, отвечающую первоначальной задаче настоящего изобретения, в качестве носителя лекарственного средства.

Использованный в данном документе термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных группировок из Fc-области, а термин "агликозилирование" относится к негликозилированной Fc-области, продуцируемой в прокариотах, более конкретно в *E.coli*.

В то же время, Fc-область иммуноглобулина может быть выделена из людей или других животных, включающих коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомячков, крыс и морских свинок. В более конкретном воплощении она выделена из людей.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина (Ig) может иметь происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации или гибрида. В более конкретном воплощении она имеет происхождение из IgG или IgM, которые находятся среди самых распространенных белков в крови человека, и в еще более конкретном воплощении, она имеет происхождение из IgG, который, как известно, увеличивает период полувыведения лигандсвязывающих белков. В еще более конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область IgG4, и в наиболее конкретном воплощении Fc-область IgG4 представляет собой агликозилированную Fc-область из человеческого IgG4, но не ограничивается этим.

В частности, использованный в данном документе термин "комбинация" означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные Fc-области иммуноглобулина одинакового происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. То есть димер или мультимер может быть образован из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fc-фрагментов IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc и IgE.

Композиция по настоящему изобретению может быть использована для предупреждения или лечения гипогликемии или метаболических синдромов.

Использованный в данном документе термин "предупреждение" относится ко всем видам действий, связанным с торможением или замедлением возникновения гипогликемии или метаболического синдрома, при введении пептида или композиции, а термин "лечение" относится ко всем видам действий, свя-

занным с улучшением состояния или благотворными изменениями симптомов гипогликемии или метаболического синдрома, при введении пептида или композиции.

Использованный в данном документе термин "введение" относится к введению конкретного вещества пациенту подходящим способом. Композицию можно вводить обычным путем, который обеспечивает доставку композиции в ткань-мишень *in vivo*, например интраперитонеальным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, интрадермальным, пероральным, местным, интраназальным, легочным и интаректальным введением, но конкретно не ограничивается ими.

Использованный в данном документе термин "метаболический синдром" относится к симптомам однократного или комплексного возникновения различных заболеваний вследствие хронического метаболического расстройства, и, в частности, примеры метаболического синдрома могут включать нарушенную толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемию, дислипидемию, ожирение, диабет, гипертензию, неалкогольный стеатогепатит (NASH), атеросклероз, вызванный дислипидемией, атеросклероз, артериосклероз, коронарную болезнь сердца, инсульт и т.д., но не ограничивается ими.

Использованный в данном документе термин "ожирение" относится к медицинскому состоянию с избыточным жиром в организме, и лицо, имеющее индекс массы тела (BMI; масса тела (кг), деленная на квадрат роста (м)) 25 или выше, диагностируется как имеющее ожирение. Ожирение обычно возникает из-за долговременного энергетического дисбаланса, при котором потребление энергии превышает расходование энергии. Ожирение является метаболическим заболеванием, которое поражает весь организм, увеличивает риск диабета, гиперлипидемии, сексуальной дисфункции, артрита и сердечно-сосудистого заболевания, и в некоторых случаях оно связано с возникновением рака.

"Гипогликемия" может представлять собой острый симптом диабета.

Использованный в данном документе термин "гипогликемия" относится к острому симптому диабета, при котором уровни глюкозы в крови ниже, чем у нормальных людей, и, как правило, относится к состоянию, когда уровни глюкозы в крови составляют 50 мг/дл или менее. Гипогликемия часто возникает, когда лицо, которое принимает пероральный гипогликемический агент или инсулин, ест меньше, чем обычно, или осуществляет деятельность или физические упражнения больше, чем обычно. Кроме того, гипогликемия может возникать из-за приема лекарственных средств, понижающих уровень глюкозы, тяжелых физических заболеваний, недостаточности гормонов, таких как гормоны коры надпочечников и глюкагон, из-за опухоли поджелудочной железы, продуцирующей инсулин, аутоиммунного инсулинового синдрома у пациентов, перенесших гастрэктомию, наследственного нарушения метаболизма углеводов и т.д.

Симптомы гипогликемии включают слабость, дрожь, бледную кожу, холодный пот, головокружение, возбуждение, тревогу, сердцебиение, голодный желудок, головную боль, усталость и т.д. В случае персистентной гипогликемии она может приводить к конвульсиям или судорожным припадкам и может вызывать шок и потерю сознания.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Использованный в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к свойствам наличия достаточного количества, чтобы проявлять терапевтический эффект, не вызывая неблагоприятных эффектов, и специалист в данной области без труда сможет определить это, основываясь на факторах, общеизвестных в области медицины, таких как вид заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол, чувствительность к лекарственным средствам у пациента, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственное средство, которое смешивают или вводят одновременно в комбинации и т.д.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая пептид по настоящему изобретению, дополнительно может содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать: для перорального введения связывающее вещество, глидант, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизующий агент, диспергирующий агент, стабилизирующий агент, суспендирующий, окрашивающий агент, корригент и т.д.; для инъекций буферный агент, консервант, анальгетик, солюбилизующий агент, изотонический агент, стабилизирующий агент и т.д., которые могут быть использованы совместно; и для местного введения основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант и т.д., хотя ими не ограничивается.

Различные лекарственные формы композиции по настоящему изобретению могут быть получены путем объединения с фармацевтически приемлемым носителем, который описан выше. Например, для перорального введения композиция может быть приготовлена в таблетках, троше, капсулах, эликсирах, суспензиях, сиропах, облатках и т.д. Для инъекций композиция может быть приготовлена в однодозовых ампулах или многодозовых контейнерах. Композиция может быть также приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, капсул и препаратов длительного высвобождения.

При этом примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритритол, мальтитол, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.д. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель,

антикоагулянт, смазывающее вещество, увлажняющее вещество, корригент, консервант и т.д.

Дополнительно, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в лекарственных формах любого типа, выбранных из группы, состоящей из таблеток, пилюль, порошков, гранул, капсул, суспензий, жидких лекарственных средств для употребления внутрь, эмульсий, сиропов, стерильных инъекционных раствором, неводных растворителей, лиофилизированных препаратов и суппозиториях.

Дополнительно, композиция может быть приготовлена в форме однократной дозировки, подходящей для организма пациента, и предпочтительно в виде препарата, полезного для пептидных лекарственных средств, типичным способом, используемым в фармацевтической области, для введения пероральным или парентеральным путем, таким как через кожу, внутривенно, внутримышечно, внутриаартериально, интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, в легкие, трансдермально, подкожно, интраперитонеально, интраназально, в желудок, местно, сублингвально, вагинально или ректально, но без ограничения ими.

Дополнительно, пептид можно использовать путем смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, такими как физиологический раствор или органические растворители. Для повышения стабильности и всасываемости могут быть использованы углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион; хелатирующие агенты; низкомолекулярные белки; или другие стабилизаторы.

Дозу и частоту введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению определяют по типу активного(ых) ингредиента(ов) в совокупности с различными факторами, такими как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст, пол и масса тела пациента и тяжесть заболевания.

Общую эффективную дозу композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в однократной дозе или можно вводить в течение длительного периода времени множественными дозами согласно протоколу дробного лечения. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного(ых) ингредиента(ов) может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. Конкретно, предпочтительная суммарная суточная доза пептида по настоящему изобретению может составлять приблизительно от 0,0001 мкг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Однако эффективную дозу пептида определяют с учетом различных факторов, включающих возраст, массу тела, состояние здоровья, пол пациента, тяжесть заболевания, диету и скорость выведения, а также путь и частоту введения фармацевтической композиции. В этой связи, специалисты в данной области без труда смогут определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не ограничена конкретной лекарственной формой, конкретным путем и способом введения при условии, что она оказывает эффекты настоящего изобретения.

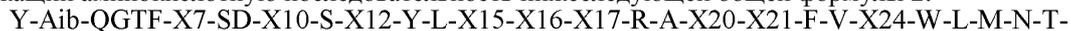
Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению демонстрирует *in vivo* очень хорошую продолжительность эффективности и титр, и поэтому количество и частота введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть значительно сокращены.

В частности, поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит в качестве активного ингредиента производное глюкагона, имеющего измененную pI, отличающуюся от pI нативного глюкагона, она демонстрирует улучшенную растворимость и высокую стабильность в зависимости от pH данного раствора, и поэтому фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть эффективно использована в получении стабильного препарата глюкагона для лечения гипогликемии или ожирения.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено новое производное глюкагона.

Производное глюкагона является таким, как разъяснено выше.

Более конкретно, это производное отличается тем, что оно представляет собой выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 2:



X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X20 представляет собой глутамин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X24 представляет собой валин или глутамин; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует,

при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 2 идентична любой из

SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31 и 33, тогда она может быть исключена.

Более конкретно, пара аминокислот X16 и X20 в общей формуле 2 может быть заменена глутаминовой кислотой или лизином соответственно, которые способны образовывать кольцо, тем самым образуя кольцо (например, лактамное кольцо) парой аминокислот X16 и X20, но не ограничивается этим.

Дополнительно, С-конец пептида, содержащего аминокислотную последовательность общей формулы 2, может быть амидирован, но не ограничивается этим.

Дополнительно, пептид может представлять собой производное глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона, но не ограничивается этим.

Более конкретно, пептид может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, но не ограничивается ими.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены выделенный полинуклеотид, кодирующий производное глюкагона, вектор, включающий в себя полинуклеотид, и выделенная клетка, включающая в себя полинуклеотид или вектор.

Производное глюкагона является таким, как разъяснено выше.

Дополнительно, выделенный полинуклеотид, кодирующий производное глюкагона, включает в пределах объема настоящего изобретения полинуклеотидную последовательность, имеющую гомологию 75% или выше, конкретно 85% или выше, более конкретно 90% или выше и еще более конкретно 95% или выше с соответствующей последовательностью.

Использованный в данном документе термин "гомология" означает сходство последовательностей аминокислотной последовательности дикого типа или нуклеотидной последовательности дикого типа, и сравнение гомологии может быть сделано невооруженным глазом или с использованием коммерчески доступной программы сравнения. Используя коммерчески доступную программу сравнения, гомология между двумя или более последовательностями может быть выражена в процентах (%), и % гомологии между расположенными напротив последовательностями может быть вычислен.

Использованный в данном документе термин "рекомбинантный вектор" относится к конструкции ДНК, содержащей последовательность полинуклеотида, кодирующего целевой пептид, например производное глюкагона, который функционально связан с соответствующей регуляторной последовательностью для обеспечения экспрессии целевого пептида, например производного глюкагона, в клетке-хозяине.

Регуляторная последовательность содержит промотор, способный инициировать транскрипцию, любую последовательность-оператор для регуляции транскрипции, последовательность, кодирующую подходящий рибосомасвязывающий домен иРНК, и последовательность, регулирующую терминацию транскрипции и трансляции. Рекомбинантный вектор после его трансформации в подходящую клетку-хозяин может быть реплицирован, или может быть функционально независимым от генома хозяина, или может быть интегрирован в сам геном хозяина.

Рекомбинантный вектор, используемый в настоящем изобретении, не может быть конкретно ограничен при условии, что вектор может быть реплицирован в клетке-хозяине, и он может быть сконструирован с использованием любого вектора, известного в данной области. Примеры обычно используемого вектора могут включать природные или рекомбинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Векторы, используемые в настоящем изобретении, могут представлять собой любой экспрессионный вектор, известный в данной области.

Рекомбинантный вектор используют для трансформации клетки-хозяина с целью продуцирования производных глюкагона по настоящему изобретению. Дополнительно, эти трансформированные клетки, как часть настоящего изобретения, могут быть использованы для амплификации фрагментов нуклеиновых кислот и векторов или могут представлять собой культивируемые клетки или клеточные линии, используемые в рекомбинантном продуцировании производных глюкагона по настоящему изобретению.

Использованный в данном документе термин "трансформация" относится к процессу введения рекомбинантного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку-хозяин, тем самым обеспечивая экспрессию белка, кодируемого полинуклеотидом, в клетке-хозяине. Что касается трансформированного полинуклеотида, не имеет значения, вставлен ли он в хромосому клетки-хозяина и локализован там или локализован вне хромосомы, в то же время он может быть экспрессирован в клетке-хозяине, и оба случая охвачены.

Дополнительно, полинуклеотид включает ДНК и РНК, которые кодируют целевой белок. Полинуклеотид может быть вставлен в любой форме, если он может быть введен в клетку-хозяин и экспрессирован в ней. Например, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяин в форме экспрессионной кассеты, которая представляет собой генетическую конструкцию, содержащую все основные элементы, необходимые для само-экспрессии. Экспрессионная кассета обычно может содержать промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, терминатор транскрипции, рибосомасвязывающий домен терминатор трансляции. Экспрессионная кассета может быть в форме экспрессионного вектора, способного к саморепликации. Дополнительно, полинуклеотид может быть введен в клетку-хозяин, когда он функционально связан с последовательностью, необходимой для его экспрессии в клетке-хозяине, но не ограничивается этим.

Дополнительно, использованный в данном документе термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между последовательностью промотора, которая инициирует и опосредует транскрипцию полинуклеотида, кодирующего целевой пептид по настоящему изобретению, и вышеуказанной последовательностью гена.

Подходящий хозяин для использования в настоящем изобретении не может быть конкретно ограничен при условии, что он может экспрессировать полинуклеотид по настоящему изобретению. Примеры подходящего хозяина могут включать бактерии рода *Escherichia*, такие как *E.coli*; бактерии рода *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis*; бактерии рода *Pseudomonas*, такие как *Pseudomonas putida*; дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*; клетки насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (Sf9), и клетки животных, такие как CHO, COS и BSC.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный конъюгат, в котором производное глюкогона и биосовместимое вещество, которое способно увеличивать период полувыведения *in vivo*, связаны. Конъюгат может представлять собой длительно действующий конъюгат.

Что касается производного глюкогона, биосовместимого вещества и строения конъюгата, все то, что описано выше, применимо к ним.

Конкретно, биосовместимое вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, жирной кислоты, холестерина, альбумина и их фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или их производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара и полимера, но не ограничивается ими.

Дополнительно, выделенный пептид может быть связан с биосовместимым веществом посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации, но не ограничивается ими.

Дополнительно, биосовместимое вещество может представлять собой FcRn-связывающее вещество, и выделенный пептид может быть связан с биосовместимым веществом посредством пептидного линкера или непептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации, но не ограничивается ими.

Дополнительно, FcRn-связывающее вещество может представлять собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, но не ограничивается им.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая производное глюкогона или выделенный конъюгат.

Производное глюкогона и выделенный конъюгат являются такими, как разъяснено выше.

Конкретно, композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для лечения или предупреждения гипогликемии или метаболического синдрома, но не ограничивается ими. Фармацевтическая композиция является такой, как описано выше.

Дополнительно, композиция может представлять собой композицию, содержащую пептид из аминокислотной последовательности нижеследующей общей формулы 2:

Y-Aib-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-

X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X20 представляет собой глутамин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X24 представляет собой валин или глутамин; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует,

при условии, что когда аминокислотная последовательность общей формулы 1 идентична любой из SEQ ID NO: 14, 19, 20, 25, 27, 31 и 33, тогда она может быть исключена.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ предупреждения или лечения гипогликемии

или метаболического синдрома, включающий введение субъекту вышеуказанной композиции.

Композиция, гипогликемия, метаболический синдром, предупреждение и лечение являются такими, как разъяснено выше.

В настоящем изобретении термин "субъект" относится к субъектам, у которых подозревают гипогликемию или метаболический синдром, и этот термин означает млекопитающих, включающих людей, мышей и домашний скот, имеющих гипогликемию или метаболический синдром или имеющих риск гипогликемии или метаболического синдрома. Однако любой субъект, подлежащий лечению производным глюкагона по настоящему изобретению или композицией, содержащей производное глюкагона, входит в объем изобретения без ограничения. Кроме того, субъекта, у которого подозревают гипогликемию или ожирение, можно эффективно лечить путем введения фармацевтической композиции, содержащей производное глюкагона по настоящему изобретению. Гипогликемия и ожирение являются такими, как разъяснено выше.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтической композиции, содержащей пептид в фармацевтически эффективном количестве. Общую суточную дозу определяет лечащий врач по результатам соответствующей медицинской оценки, и ее вводят однократно или несколько раз разделенными дозами. Что касается объектов настоящего изобретения, конкретную терапевтически эффективную дозу для каждого конкретного пациента предпочтительно можно применять по-разному в зависимости от различных факторов, общеизвестных в медицине, включающих вид и степень ответной реакции, которую требуется достичь, конкретные композиции, содержащие другие агенты или нет, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания пациента, время и путь введения, скорость секреции композиции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, использованные в комбинации или параллельно с композицией по настоящему изобретению, и подобные факторы, известные в медицине.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение производного глюкагона, или выделенного конъюгата, или композиции в изготовлении лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения гипогликемии или метаболического синдрома.

Производное глюкагона, выделенный конъюгат, композиция, гипогликемия и метаболический синдром такие, как разъяснено выше.

Осуществление изобретения.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на приведенные ниже примеры и экспериментальные примеры. Однако приведенные ниже примеры и экспериментальные примеры представлены только в иллюстративных целях, и объем настоящего изобретения никоим образом не ограничен ими.

Пример 1. Получение клеточной линии, демонстрирующей cAMP (циклический аденозинмонофосфат)-ответ на глюкагон.

ПЦР (полимеразная цепная реакция) осуществляли с использованием области, соответствующей открытой рамке считывания (ORF) в кДНК (OriGene Technologies, Inc., USA) гена рецептора глюкагона человека, в качестве матрицы вместе с указанными ниже прямым и обратным праймерами (SEQ ID NO: 47 и 48 соответственно), каждый из которых содержит сайты рестрикции EcoRI и XhoI.

В частности, ПЦР осуществляли в течение в общей сложности 30 циклов в следующих условиях: денатурация при 95°C в течение 60 с, отжиг при 55°C в течение 60 с и полимеризация при 68°C в течение 30 с. Амплифицированные продукты PCR подвергали электрофорезу в 1,0% агарозном геле, и в результате элюирования была получена полоса 450 п.о. (пар оснований).

Прямой праймер (SEQ ID NO: 47)

5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'

Обратный праймер (SEQ ID NO: 48):

5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'

Продукт ПЦР клонировали в известный экспрессионный вектор для клеток животных, x0GC/dhfr (дигидрофолатредуктаза), с получением рекомбинантного вектора x0GC/GCGR.

Линию клеток CHO DG44 (линия клеток яичников китайского хомячка, дефектных по dhfr), культивированную в среде DMEM/F12 (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла с питательной смесью Хэма F12) (10% FBS (фетальная бычья сыворотка), трансфицировали рекомбинантным вектором x0GC/GLPIR с использованием Lipofectamine® (липофектамин) (Invitrogen, USA) и культивировали в селективной среде, содержащей G418 (1 мг/мл) и метотрексат (10 нМ). Из нее отбирали клеточные линии из одного клона, используя метод предельных разведений, и из них окончательно отбирали клеточную линию, демонстрирующую превосходный цАМФ-ответ на глюкагон в зависимости от концентрации.

Пример 2. Синтез производного глюкагона.

Для получения производных глюкагона с улучшенными физическими свойствами в аминокислотной последовательности нативного глюкагона SEQ ID NO: 1 производили замены аминокислотными остатками, имеющими положительный и отрицательный заряды, и таким образом синтезировали производные глюкагона, которые представлены в приведенной ниже таблице. Относительную активность in

vitro, указанную ниже, измеряли методом, описанным в примере 4.

Аминокислотные последовательности нативного глюкагона и производных глюкагона

SEQ ID NO	Пептидная последовательность	Образование кольца	pI	Активность <i>in vitro</i> (относительная активность SEQ ID NO: 1, %)
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDF VQWLMNT	-	6,8	100
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDF VQWLMNT	-	4,56	0,6
SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDF VQWLMNT	-	4,66	6,1
SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDF VQWLMNT	-	4,13	< 0,1
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDF VQWLMNT	-	4,22	0,3
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDF VQWLMNT	-	4,03	< 0,1
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDF VQWLMNT	-	3,71	< 0,1
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDF VQWLINT	-	3,77	< 0,1
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDF VVWLINT	-	3,77	< 0,1

SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDADDF VVWLINT	-	3,66	< 0,1
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEF VQWLMNT	-	4,78	4,6
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEF VQWLMNTC	образовано кольцо	6,20	56,3
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSCYLDSTRRAQDF VQWLMNT	-	4,43	5,2
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEF VQWLMNT	-	8,12	18,1
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDF VVWLINT	-	6,11	1,1
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQVF VQWLMRT	-	9,11	4,2
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDF VQWLMRT	-	6,03	23,2
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDF RLWLMNT	-	8,15	< 0,1
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEF VQWLMNT	образовано кольцо	8,12	12,1
SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLDECRRAKEF VQWLMNT	образовано кольцо	4,78	299,7
SEQ ID NO: 21	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEF VQWLMNT	образовано кольцо	4,78	57,8
SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLDEKRCKEF VQWLMNT	образовано кольцо	6,20	147,8
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEF VQWLMNT	образовано кольцо	6,20	76,8
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEF VQWLMNT	образовано кольцо	6,21	58,0
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKCF VQWLMNT	образовано кольцо	8,12	46,9
SEQ ID	WXQGTFTSDYSKYLDECRRAKDF	образовано	4,68	1,0

NO: 26	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfVSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> DF	образовано	4,68	93,6
NO: 27	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	WXQGTfVSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> D	образовано	4,68	< 0,1
NO: 28	FVQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfTSDYSKCLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> DF	образовано	6,15	61,3
NO: 29	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	WXQGTfTSDYSKCLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> DF	образовано	4,44	0,3
NO: 30	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfTSDYSKYLD <u>C</u> <u>K</u> RA <u>K</u> <u>E</u> F	образовано	8,12	6,3
NO: 31	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	-SQGTfTSDYSKYLD <u>E</u> CRA <u>K</u> EFV	образовано	4,78	0,7
NO: 32	QWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfTSDYSKYLD <u>S</u> RRRAQDF	-	6,04	108,2
NO: 33	VQWLMNT			
SEQ ID	WXQGTfTSDYSKYCD <u>E</u> ERRA <u>K</u> EF	образовано	6,21	0,2
NO: 34	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfTSDYSKYCD <u>E</u> ERRA <u>K</u> EF	образовано	6,2	17,7
NO: 35	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfTSDCSKYLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> EF	образовано	6,21	9,9
NO: 36	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfTSDYSKYLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> EF	образовано	6,21	225,5
NO: 37	VQWLMNTC	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfCSDYSKYLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> EF	образовано	6,15	167,3
NO: 38	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfVSDCSKYLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> DF	образовано	6,15	3,7
NO: 39	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfVSDYSKYLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> DF	образовано	6,15	40,8
NO: 40	VQWLMNTC	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfCSDYSKYLD <u>E</u> ERRA <u>K</u> DF	образовано	6,03	45,2
NO: 41	VQWLMNT	кольцо		
SEQ ID	YXQGTfCSDYSKYLD <u>S</u> RRRAQDF	-	6,03	37,9
NO: 42	VQWLMNT			
SEQ ID	YXQGTfTSDCSKYLD <u>S</u> RRRAQDF	-	6,03	1,6
NO: 43	VQWLMNT			
SEQ ID	YXQGTfTSDYSKYLD <u>S</u> RRRAQDF	-	6,21	75,4
NO: 44	VQWLMNTC			

В аминокислотных последовательностях, указанных в таблице, аминокислота, обозначенная "X", представляет собой ненативную аминокислоту, аминокислоту (Aib); подчеркнутые аминокислотные остатки означают образование кольца; и "-" в аминокислотной последовательности указывает на то, что в соответствующем положении никакого аминокислотного остатка нет.

Пример 3. Измерение pI производных глюкогона.

С целью измерения улучшенных физических свойств производных глюкогона, синтезированных в примере 2, вычисляли значения pI, исходя из аминокислотных последовательностей, с использованием инструмента pI/Mw (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) на сервере ExPASy.

Как показано в приведенной выше таблице, тогда как нативный глюкогон SEQ ID NO: 1 имеет pI 6,8, некоторые производные глюкогона по настоящему изобретению показали значения pI в диапазоне от

примерно 4 до примерно 6. Поскольку производные глюкагона по настоящему изобретению имеют значения pI ниже или выше, чем значение pI нативного глюкагона, они могут проявлять улучшенную растворимость и более высокую стабильность в условиях нейтрального pH по сравнению с нативным глюкагоном.

Соответственно, при использовании производных глюкагона по настоящему изобретению в качестве терапевтического агента для лечения гипогликемии они могут улучшать соблюдение пациентами режима и схемы лечения, а также подходят для введения в комбинации с другими агентами против ожирения или агентами против диабета, и поэтому производные глюкагона по настоящему изобретению можно эффективно применять в качестве терапевтических агентов для лечения гипогликемии и метаболических синдромов, включающих ожирение, диабет, неалкогольный стеатогепатит (NASH), дислипидемию и коронарную болезнь сердца.

Пример 4. Измерение сАМР активности производных глюкагона.

Активность производных глюкагона, синтезированных в примере 2, измеряли в клеточных линиях, имеющих рецепторы глюкагона человека, полученных в примере 1.

Конкретно, трансфицированную клеточную линию пересевали 3-4 раза в неделю, аликвотами вносили в 384-луночный планшет в количестве 6×10 клеток на лунку и культивировали в течение 24 ч. Нативный глюкагон и производные глюкагона суспендировали в сбалансированном солевом буферном растворе Хэнкса (HBSS), содержащем 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX), 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 5 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), с клеточными культурами в концентрациях 200 и 1600 нМ соответственно, непрерывно подвергали 4-кратному разведению 10 раз, использовали набор для анализа сАМР (LANCЕ сАМР 384 kit, PerkinElmer) и добавляли к культивированным клеткам, и измеряли их значение флуоресценции. После измерения наивысшее значение флуоресценции принимали за 100% и исходя из этого рассчитывали значения EC_{50} (50%-ная эффективная концентрация) производных глюкагона и сравнивали их с EC_{50} нативного глюкагона. Результаты представлены в приведенной выше таблице.

Пример 5. Получение конъюгата, содержащего производное глюкагона и Fc иммуноглобулина (конъюгат SEQ ID NO: 12 или 20 и Fc-области иммуноглобулина).

Для пэгиллирования цистеинового остатка производного глюкагона (SEQ ID NO: 12 и 20) с использованием ПЭГ 10 кДа, имеющего малеимидную группу и альдегидную группу соответственно на обоих концах (названного "малеимид-ПЭГ-альдегид", 10 кДа, NOF, Japan), производные глюкагона и малеимид-ПЭГ-альдегид подвергали взаимодействию в молярном соотношении от 1:1 до 1:5 при концентрации белка от 3 до 10 мг/мл при низкой температуре в течение 1-3 ч. В частности, реакцию проводили в среде, в которую добавляли 20-60% изопропанола. После завершения реакции реакцию смесь наносили на SP Sepharose HP (GE healthcare, USA) для очистки производных глюкагона, монопэгиллированных по цистеину.

Затем очищенные монопэгиллированные производные глюкагона и Fc-область иммуноглобулина подвергали взаимодействию в молярном соотношении от 1:2 до 1:10 при концентрации белка от 10 мг/мл до 50 мг/мл при температуре от 4 до 8°C в течение 12-18 ч. Эту реакцию проводили в среде, в которой цианоборгидрид натрия ($NaCNBH_3$), и от 10 до 20% изопропанола было добавлено в 100 мМ кальций-фосфатный буфер (pH 6,0). После завершения реакции реакцию смесь наносили на очистную колонку Butyl sepharose FF (GE healthcare, USA) и очистную колонку Source ISO (GE healthcare, USA) для очистки конъюгата, содержащего производное глюкагона и Fc-область иммуноглобулина.

После получения было показано, что чистота конъюгатов, проанализированная обращенно-фазовой хроматографией, эксклюзионной хроматографией и ионообменной хроматографией, составляет 95% или выше.

В частности, конъюгат, в котором производное глюкагона SEQ ID NO: 12 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством ПЭГ, был назван "конъюгатом, содержащим производное глюкагона SEQ ID NO: 12 и Fc иммуноглобулина" или "длительно действующим производным SEQ ID NO: 12", и в настоящем изобретении эти термины могут быть использованы взаимозаменяемым образом.

В частности, конъюгат, в котором производное глюкагона SEQ ID NO: 20 и Fc иммуноглобулина были связаны посредством ПЭГ, был назван "конъюгатом, содержащим производное глюкагона SEQ ID NO: 20 и Fc иммуноглобулина" или "длительно действующим производным SEQ ID NO: 20", и в настоящем изобретении эти термины могут быть использованы взаимозаменяемым образом.

Пример 6. Получение конъюгата, содержащего производное эксендина-4 и Fc-область иммуноглобулина.

ПЭГ 3,4 кДа, имеющий пропиональдегидную группу на обоих концах, т.е. 3.4k PropIonALD (2) PEG, подвергали взаимодействию с Lys CA эксендина-4, т.е. имидазо-ацетил-эксендина-4, где альфа-углерод N-концевого гистидина удален (CA эксендин-4, AP, USA), и затем проводили реакцию сочетания по изомерному пику на самой последней части (Lys27) между двумя пиками Lys, который является довольно реакционноспособным и четко отличается от N-концевого изомера.

Пептид и Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:8 при общей концентрации белка 60 мг/мл при 4°C в течение 20 ч. Реактантом был 100 мМ К-Р (калийфосфатный

буфер) (pH 6,0), и был добавлен восстановитель 20 мМ SCB (цианоборгидрид натрия). Реактанты сочетания очищали путем пропускания через две очистные колонки. Сначала удаляли большое количество Fc иммуноглобулина, не участвовавшего в реакции сочетания, с использованием SOURCE Q (XK 16 мл, Amersham Biosciences). После нанесения солевого градиента с использованием 1М NaCl при 20 мМ Tris (pH 7,5) сразу происходит элюирование Fc иммуноглобулина, который имеет относительно слабую аффинность связывания, затем незамедлительно происходит элюирование эксендин-4-Fc иммуноглобулина. В результате этой первичной очистки Fc иммуноглобулина удаляется до определенной степени, однако полное разделение не достигается на ионообменной колонке из-за небольшой разницы в аффинности связывания между Fc иммуноглобулина и эксендин-4-Fc иммуноглобулина. Соответственно, вторичную очистку осуществляли, используя гидрофобность двух разных веществ. Образец, прошедший первичную очистку, связывали с SOURCE ISO (HR 16 мл, Amersham Biosciences) с использованием 20 мМ Tris (pH 7,5) и 1,5М сульфата аммония и затем элюировали при постепенном понижении концентрации сульфата аммония. В результате, Fc-область иммуноглобулина, которая имеет слабую аффинность связывания с колонкой для HIC (хроматография гидрофобного взаимодействия), элюировалась первой, затем происходило элюирование образца эксендин-4-Fc иммуноглобулина, который имеет сильную аффинность связывания к хвостовой части. Разделение осуществлялось гораздо легче по сравнению с ионообменной колонкой благодаря большому различию в гидрофобности.

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

Скорость потока: 2,0 мл/мин.

Градиент: A 0 → 25% 70 мин B (A: 20 мМ Tris, pH 7,5; B: A + 1М NaCl).

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

Скорость потока: 7,0 мл/мин.

Градиент: B 100 → 0% 60 мин B [A: 20 мМ Tris (pH 7,5); B: A+1,5М сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄)].

Полученный таким способом конъюгат, в котором производное эксендина-4 и Fc-область иммуноглобулина связаны посредством ПЭГ, был назван "длительно действующим производным эксендина-4". Кроме того, этот термин в настоящем изобретении может быть взаимозаменяемым образом использован с "длительно действующим производным эксендина".

Экспериментальный пример 1. Эффект снижения массы тела у крыс с ожирением, вызванным кормом с высоким содержанием жиров.

В этом эксперименте использовали крыс с ожирением, вызванным кормлением кормом с высоким содержанием жиров, которые широко используются в качестве животных моделей ожирения. Масса тела крыс перед введением составляла примерно 600 г. Во время эксперимента крыс содержали по отдельности, и они имели неограниченный доступ к воде. Освещение не предоставлялось с 6 ч утра до 6 ч вечера.

Тестируемые группы, получавшие корм с высоким содержанием жиров, включали: группа 1, эксципиент (инъекция один раз каждые 3 суток) - контрольная группа; группа 2, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группа 3, длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 в дозе 1,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группа 4, длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 в дозе 3,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группа 5, длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 в дозе 6,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группа 6, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 в дозе 1,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток соответственно); группа 7, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 в дозе 3,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток соответственно); группа 8, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 в дозе 6,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток соответственно); группа 9, спаренное кормление с группой 4; и группа 10, спаренное кормление с группой 7. Эксперимент останавливали на 15-й день, и по ходу эксперимента изменения массы тела крыс в каждой группе измеряли с интервалами 3 суток. После остановки эксперимента и аутопсии измеряли количество брыжеечного жира и массу печени. Для сравнения группы, получавшей эксципиент (контрольная группа), и тестируемых групп осуществляли статистический анализ методом 1-однофакторного ANOVA (дисперсионный анализ).

В результате измерения изменений массы тела, которые подтверждены на фиг. 1, группы, которым вводили либо только длительно действующее производное эксендина, либо только длительно действующее производное SEQ ID NO: 12, показали снижение массы тела от -8 и -7 до -22% по сравнению с массой тела перед введением, а в группах, которым совместно вводили длительно действующее производное эксендина и длительно действующее производное SEQ ID NO: 12, эффект снижения массы тела дополнительно увеличился с -22 до -35%.

Кроме того, при сравнении эффекта снижения массы тела в группе, которой вводили только длительно действующее производное SEQ ID NO: 12, и в группе, которой вводили комбинацию длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного SEQ ID NO: 12, со снижением массы тела в группе спаренного кормления соответственно была показана разница примерно -11% и примерно -17% соответственно, что служит подтверждением того, что эффект снижения массы

тела имел место при введении производного глюкагона одного или при совместном введении в результате действий, иных чем потребление корма.

То есть было подтверждено, что длительно действующее производное глюкагона по настоящему изобретению может играть дополнительную роль в снижении массы тела помимо эффекта анорексии.

Дополнительно, в результате измерения количества брыжеечного жира и массы печени, что подтверждено на фиг. 2 и 3, совместное введение длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного SEQ ID NO: 12 показало значительное снижение жира в организме, а также снижение массы печени по сравнению с этими показателями в группе, которой вводили эксципиент. В частности, причиной увеличения/уменьшения массы печени обычно является увеличение/уменьшение жира, присутствующего в печени, и вышеуказанный эффект уменьшения массы печени свидетельствует об эффекте уменьшения жира в печени. Соответственно, измерение уменьшения жира в печени может служить способом измерения терапевтического эффекта в отношении метаболического синдрома, такого как ожирение, диабет, неалкогольный стеатогепатит и т.д.

Экспериментальный пример 2. Эффект снижения массы тела у мышей с ожирением, вызванным кормом с высоким содержанием жиров.

В этом эксперименте использовали мышей с ожирением, вызванным кормлением кормом с высоким содержанием жиров, которые широко используются в качестве животных моделей ожирения. Масса тела мышей перед введением составляла примерно 55 г. Во время эксперимента мыши были размещены по 7 мышей на каждую группу, и они имели неограниченный доступ к воде. Освещение не предоставляли с 6 ч утра до 6 ч вечера.

Тестируемые группы, получавшие корм с высоким содержанием жиров, включали: группа 1, эксципиент (инъекция один раз каждые 2 суток) - контрольная группа; группа 2, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группа 3, длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 в дозе 4,4 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группа 4, длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 в дозе 8,8 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группа 5, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг + длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 в дозе 4,4 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группа 6, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 2,1 нмоль/кг + длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 в дозе 6,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); и группа 7, длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 0,8 нмоль/кг + длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 в дозе 8,0 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток). Эксперимент останавливали на 22-й день, и по ходу эксперимента изменения массы тела мышей в каждой группе измеряли с интервалами 2 суток. После остановки эксперимента и аутопсии измеряли массу печени мышей.

В результате измерения изменений массы тела, которые подтверждены на фиг. 4, каждая из групп, которым вводили только длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг, инъекция один раз каждые 2 суток), показала снижение массы тела на -25 и -29% соответственно по сравнению с массой тела перед введением. Кроме того, было показано, что эффект снижения массы тела увеличивался дополнительно при введении в комбинации с длительно действующим производным эксендина. Было подтверждено также, что совместное введение длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного SEQ ID NO: 20 в соотношении 1:1, 1:3 и 1:10 дополнительно увеличивало эффект снижения массы тела на -50% или выше. Дополнительно, эффект снижения массы тела в зависимости от соотношения длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного SEQ ID NO: 20 был незначительным, однако эффект анорексии становился выше с увеличением процента длительно действующего производного эксендина, что свидетельствует о том, что длительно действующее производное глюкагона по настоящему изобретению может играть дополнительную роль в снижении массы тела помимо эффекта анорексии.

Дополнительно, в результате измерения общего холестерина в крови, что подтверждено на фиг. 5, каждая из групп, которым вводили длительно действующее производное эксендина (4,4 нмоль/кг, инъекция один раз каждые 2 суток) и длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг, инъекция один раз каждые 2 суток), показала снижение холестерина на -35% и -71% соответственно. Из вышеизложенного следует, что было подтверждено, что длительно действующее производное глюкагона по настоящему изобретению может играть дополнительную роль в снижении уровней холестерина в крови помимо эффекта анорексии. Для сравнения группы, получавшей эксципиент (контрольная группа), и тестируемых групп осуществляли статистический анализ методом 1-однофакторного ANOVA.

Специалисты в данной области поймут, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его замысла или существенных признаков. Описанные воплощения должны рассматриваться во всех аспектах только как иллюстративные и не ограничительные. Объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не вышеизложенным описанием изобретения. Все изменения, которые возникают в пределах смыслового значения и диапазона эквивалентности формулы изобретения, входят в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения метаболических синдромов, содержащая: 1) пептид, содержащий аминокислотную последовательность нативного глюкагона SEQ ID NO: 1, имеющую одну или более замен в положениях 1, 2, 7, 10, 12, 15-17, 20-21, 24 и возможно содержащую цистеин в положении 30, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44; и 2) по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, где метаболический синдром выбран из группы, состоящей из нарушенной толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ожирения, гипертензии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), атеросклероза, вызванного дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца и инсульта.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, выбрано из группы, состоящей из инсулинотропного пептида, агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста рецептора лептина, ингибитора дипептидилпептидазы-IV (DPP-IV), антагониста рецептора Y5, антагониста рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агониста рецептора Y2/4, агониста меланокортинового рецептора 3/4 (MC 3/4), ингибитора желудочной/панкреатической липазы, агониста рецептора 5-гидрокси-триптамина 2C (5HT2C), агониста рецептора β 3A, агониста рецептора амилина, антагониста грелина, антагониста рецептора грелина, агониста активируемого пролифератором пероксисом рецептора альфа (PPAR α), агониста активируемого пролифератором пероксисом рецептора дельта (PPAR δ), агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), ингибитора ацетил-СоА-карбоксилазы, пептида YY, холецистокинина (ССК), ксенина, глицентина, обестатина, секретина, несфатина, инсулина и глюкозозависимого инсулинотропного пептида (GIP).

3. Фармацевтическая композиция по п.2, где инсулинотропный пептид выбран из группы, состоящей из GLP-1, эксендина-3, эксендина-4, их агониста и их комбинации.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, где инсулинотропный пептид представляет собой производное инсулинотропного пептида, в котором N-концевой остаток гистидина заменен остатком, выбранным из группы, состоящей из дезаминогистидила, N-диметилгистидила, β -гидроксиимидазопропионила, 4-имидазоацетила и β -карбоксиимидазопропионила.

5. Фармацевтическая композиция по п.3, где инсулинотропный пептид выбран из группы, состоящей из нативного эксендина-4; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 удалена; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 заменена гидроксильной группой; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 модифицирована диметильной группой; производного эксендина-4, в котором α -углерод 1-й аминокислоты эксендина-4, гистидина, удален; производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена серином; и производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена аргинином.

6. Фармацевтическая композиция по п.2, где

пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44, связан с биосовместимым веществом, способным увеличивать период полувыведения пептида *in vivo*, с образованием тем самым длительно действующего конъюгата, продолжительность действия которого увеличена по сравнению с нативным глюкагоном; и

инсулинотропный пептид связан с биосовместимым веществом, способным увеличивать период полувыведения инсулинотропного пептида *in vivo*, с образованием тем самым длительно действующего конъюгата, продолжительность действия которого увеличена по сравнению с нативным инсулинотропным пептидом.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, где биосовместимое вещество представляет собой FcRn (неонатальный Fc-рецептор)-связывающее вещество.

8. Фармацевтическая композиция по п.6, где пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44, и инсулинотропный пептид соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством линкера, представляющего собой полиэтиленгликоль.

9. Фармацевтическая композиция по п.6, где биосовместимое вещество представляет собой FcRn-связывающее вещество, и пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44, и инсулинотропный пептид соответственно связаны с биосовместимым веществом посредством пептидного линкера или непептидного линкера, представляющего собой полиэтиленгликоль.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, где FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, где Fc-область иммуноглобулина агликозилирована.

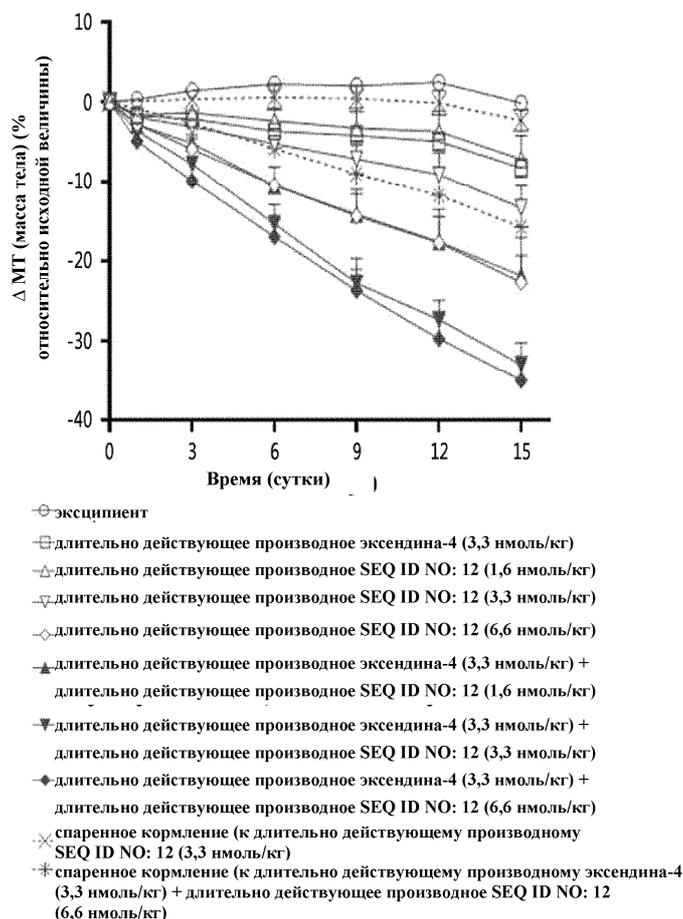
12. Фармацевтическая композиция по п.10, где Fc-область иммуноглобулина выбрана из группы, состоящей из:

- (а) домена СН1, домена СН2, домена СН3 и домена СН4;
 - (б) домена СН1 и домена СН2;
 - (в) домена СН1 и домена СН3;
 - (г) домена СН2 и домена СН3;
 - (д) комбинации между одним или по меньшей мере двумя доменами из домена СН1, домена СН2, домена СН3 и домена СН4 и шарнирной областью или частью шарнирной области иммуноглобулина; и
 - (е) димера между каждым доменом константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.
13. Фармацевтическая композиция по п.10, где полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, находится в форме димера.
14. Фармацевтическая композиция по п.10, где Fc-область иммуноглобулина представляет собой производное нативной Fc, в котором область, способная образовывать дисульфидную связь, удалена, производное нативной Fc, в котором часть аминокислот(ы) в N-конце удалена, производное нативной Fc, в котором к N-концу добавлен метионин, производное нативной Fc, в котором комплементсвязывающий сайт удален, или производное нативной Fc, в котором сайт антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) удален.
15. Фармацевтическая композиция по п.10, где Fc-область иммуноглобулина имеет происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область IgG4.
17. Фармацевтическая композиция по п.10, где Fc-область иммуноглобулина представляет собой агликозилированную Fc-область, имеющую происхождение из человеческого IgG4.
18. Фармацевтическая композиция по п.9, где непептидный линкер связан с цистеиновым остатком пептида, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44.
19. Фармацевтическая композиция по п.9, где оба конца непептидного линкера соответственно связаны с аминокислотной группой или тиольной группой пептида, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44, или инсулинотропного пептида и биосовместимым веществом.
20. Выделенный пептид для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащий аминокислотную последовательность нативного глюкагона SEQ ID NO: 1, имеющую одну или более замен в положениях 1, 2, 7, 10, 12, 15-17, 20-21, 24 и возможно содержащую цистеин в положении 30, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44, где метаболический синдром выбран из группы, состоящей из нарушенной толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ожирения, гипертензии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), атеросклероза, вызванного дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца и инсульта.
21. Выделенный пептид по п.20, где C-конец пептида амидирован.
22. Выделенный пептид по п.20, где пептид представляет собой производное глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона.
23. Выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенный пептид по любому из пп.20-22.
24. Экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п.23.
25. Выделенный конъюгат для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащий выделенный пептид по п.20, связанный с биосовместимым веществом, способным увеличивать период полувыведения *in vivo*, где метаболический синдром выбран из группы, состоящей из нарушенной толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ожирения, гипертензии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), атеросклероза, вызванного дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца и инсульта.
26. Выделенный конъюгат по п.25, где биосовместимое вещество представляет собой FcRn-связывающее вещество.
27. Выделенный конъюгат по п.25, где пептид связан с биосовместимым веществом посредством линкера, представляющего собой полиэтиленгликоль.
28. Выделенный конъюгат по п.25, где биосовместимое вещество представляет собой FcRn-связывающее вещество, и выделенный пептид связан с биосовместимым веществом посредством пептидного линкера или непептидного линкера, представляющего собой полиэтиленгликоль.
29. Выделенный конъюгат по п.28, где FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.
30. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения метаболического синдрома, содержащая выделенный пептид по п.20 или выделенный конъюгат по п.25, где метаболический синдром выбран из группы, состоящей из нарушенной толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ожирения, гипертензии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), атеросклероза, вызванного дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца и инсульта.
31. Выделенный пептид для лечения или предупреждения гипогликемии, содержащий аминокис-

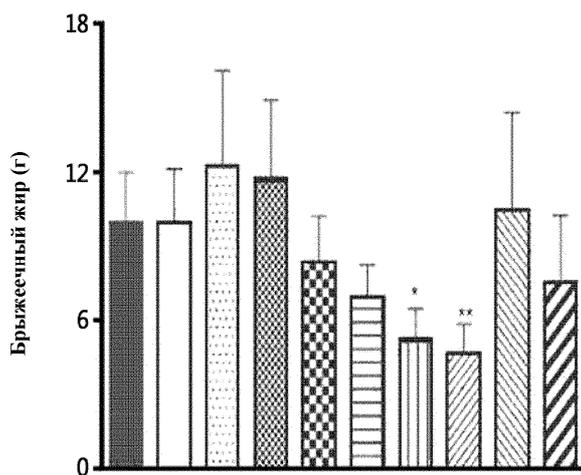
лотную последовательность нативного глюкагона SEQ ID NO: 1, имеющую одну или более замен в положениях 1, 2, 7, 10, 12, 15-17, 20-21, 24 и возможно содержащую цистеин в положении 30, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44.

32. Выделенный конъюгат для лечения или предупреждения гипогликемии, содержащий выделенный пептид по п.32, связанный с биосовместимым веществом, способным увеличивать период полувыведения *in vivo*.

33. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения гипогликемии, содержащая выделенный пептид по п.31 или выделенный конъюгат по п.32.

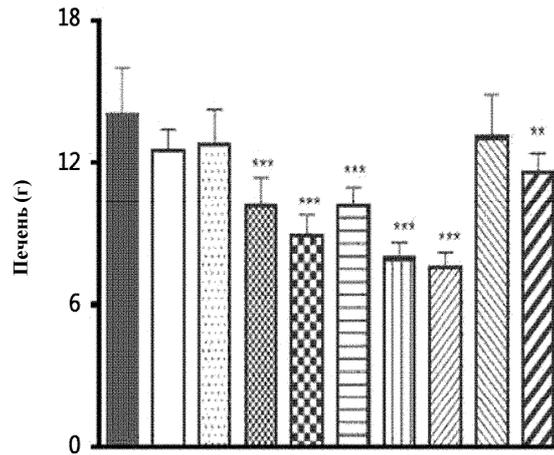


Фиг. 1



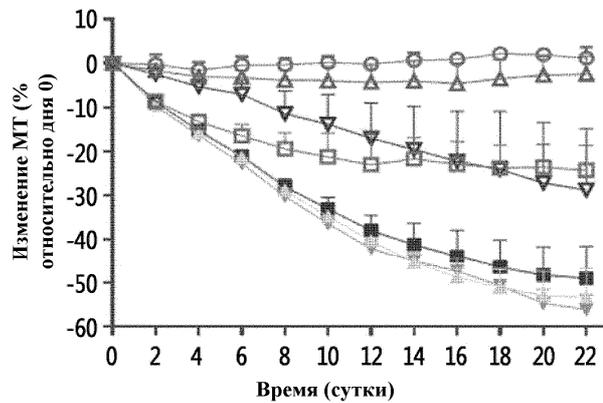
- эксципиент
- длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг)
- ▨ длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▩ длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ▧ длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▦ длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▥ длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ▤ длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▣ спаренное кормление (к длительно действующему производному SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))
- ▢ спаренное кормление (к длительно действующему производному эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг))

Фиг. 2



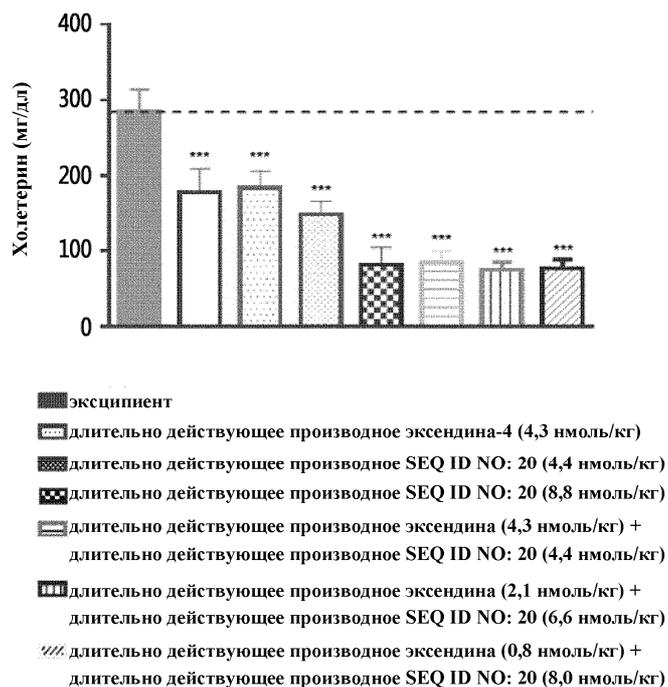
- эксципиент
- длительно действующее производное эксседины-4 (3,3 нмоль/кг)
- ▤ длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▥ длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ▧ длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▨ длительно действующее производное эксседины-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▩ длительно действующее производное эксседины-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- длительно действующее производное эксседины-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- спаренное кормление (к длительно действующему производному SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))
- ▬ спаренное кормление (к длительно действующему производному эксседины-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг))

Фиг. 3



- эксципиент
- длительно действующее производное эксседины-4 (4,3 нмоль/кг)
- ▴ длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (4,4 нмоль/кг)
- ▾ длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг)
- длительно действующее производное эксседины (4,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (4,4 нмоль/кг)
- длительно действующее производное эксседины (2,1 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (6,6 нмоль/кг)
- длительно действующее производное эксседины (0,8 нмоль/кг) + длительно действующее производное SEQ ID NO: 20 (8,0 нмоль/кг)

Фиг. 4



Фиг. 5

