

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040348**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.23

(21) Номер заявки
201692282

(22) Дата подачи заявки
2015.06.01

(51) Int. Cl. *A61K 38/28* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМБИНАЦИЯ И СПОСОБ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА**

(31) **10-2014-0066554**

(32) **2014.05.30**

(33) **KR**

(43) **2017.10.31**

(86) **PCT/KR2015/005455**

(87) **WO 2015/183054 2015.12.03**

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

(72) Изобретатель:
**Джун Сун Юб, Хванг Санг Юн, Ким
Сун Су, Чой Ин Янг, Квон Се Чан
(KR)**

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

(56) LORENZ et al., 'Recent progress and future options in the development of GLP-1 receptor agonists for the treatment of diabetes' Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol.23, No.14, pp.4011-4018 (2013) See abstract; pages 4011, 4015-4016; Figure 3.
WO-A2-2012169798
KR-B1-101058290
WO-A1-2013110069
US-A-5175145
US-A1-20050288248

(57) Данное изобретение относится к фармацевтической комбинации для лечения или предупреждения сахарного диабета, содержащей конъюгат инсулина длительного действия, где инсулин связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидного полимера, и конъюгат двойного агониста GLP-1(глюкагон-подобный пептид-1)/глюкагона длительного действия, где двойной агонист GLP-1/глюкагона связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидного полимера, где инсулин представляет собой аналог инсулина, в котором аминокислота в положении 14 А-цепи инсулина (SEQ ID NO 37) заменена глутаминовой кислотой, и двойной агонист GLP-1/глюкагона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 40, 63 и 64, и одновременно активирует рецептор GLP-1 и рецептор глюкагона. Согласно данному изобретению также предложен способ предупреждения или лечения диабета, включающий введение указанной комбинации субъекту, подверженному высокому риску сахарного диабета или страдающему сахарным диабетом.

B1**040348****040348****B1**

Область техники

Данное изобретение относится к комбинации для лечения или предупреждения сахарного диабета, содержащей конъюгат инсулина длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1)/глюкагона длительного действия, и к способу предупреждения или лечения сахарного диабета, включающему введение указанной комбинации.

Предшествующий уровень техники

Инсулин представляет собой пептид, секретируемый бета-клетками поджелудочной железы, который играет важную роль в регуляции уровня сахара крови в организме. Сахарный диабет представляет собой метаболическое заболевание, при котором секреция инсулина недостаточна или он не выполняет свои нормальные функции, что приводит к повышению уровней глюкозы крови. При диабете 2 типа инсулин не секретируется должным образом или секретируемый инсулин не подвергается нормальному процессингу в организме и уровни глюкозы в крови не контролируются, вследствие чего происходит их повышение. Диабет 2 типа обычно лечат с помощью гипогликемических агентов, содержащих в качестве активного ингредиента химическое вещество, а некоторых пациентов лечат путем введения инсулина. Напротив, при диабете 1 типа введение инсулина является необходимым.

Инсулинотерапия, которая широко применяется в настоящее время, представляет собой способ, при котором инсулин вводят путем инъекции до и после приема пищи. В настоящее время инсулин выпускают в виде инъекций и главным образом вводят путем подкожной инъекции, при этом способ введения отличается в зависимости от продолжительности действия. Введение инсулина обеспечивает более быстрый гипогликемический эффект, чем прием лекарств, и может безопасно применяться даже в условиях, когда лекарства недоступны. Кроме того, нет ограничения размера дозы, однако введение инсулина необходимо осуществлять три раза в сутки. Таким образом, существуют такие недостатки, как страх пациента перед иглами, неудобство введения, симптомы гипогликемии и набор лишнего веса вследствие введения инсулина на протяжении длительного времени. Набор лишнего веса повышает риск сердечно-сосудистых заболеваний, что может привести к побочному эффекту, заключающемуся в сниженной функции контроля глюкозы крови.

Двойной агонист, способный связываться с рецепторами двух пептидов, GLP-1 и глюкагона, в настоящее время изучается как механизм одновременного лечения и диабета, и ожирения. Двойной агонист GLP-1 и глюкагона снижает потребление пищи, как GLP-1, обеспечивает чувство насыщения, обладает липолитической функцией, как глюкагон, способствует снижению уровня сахара крови и демонстрирует высокую эффективность в отношении снижения массы тела, и, таким образом, высока возможность его применения в качестве нового терапевтического агента.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что инсулин и двойной агонист неудобны в связи с необходимостью ежедневного введения пациенту из-за короткого периода полувыведения, и для решения указанных проблем, предложили в качестве способа поддержания активности белкового препарата и в то же время достижения повышенной стабильности, белковый конъюгат длительного действия, в котором обычный физиологически активный полипептид и Fc-область иммуноглобулина ковалентно связаны друг с другом посредством непептидного полимерного линкера (патент Кореи №10-0725315). В частности, авторы изобретения подтвердили, что устойчивость эффектов *in vivo* как конъюгата инсулина длительного действия, так и конъюгата двойного агониста длительного действия значительно повышается (патент Кореи № 10-1058290, заявка на патент Кореи № 10-2014-0022909 и заявка на патент Кореи № 10-2012-0139579).

Однако, такие побочные эффекты, как набор лишнего веса при введении двойного агониста GLP-1/глюкагона, представляют проблему. Таким образом, по-прежнему сохраняется необходимость в разработке терапевтического агента для лечения диабета, вызывающего меньше побочных эффектов, который можно вводить реже и в меньшей дозировке.

Сущность изобретения

Техническая задача

Авторы изобретения приложили множество усилий для разработки терапевтического агента для диабета, который может снижать высокие уровни глюкозы крови, подавлять набор лишнего веса и снижать риск гипогликемии, что требуется для лечения диабета. В результате авторы данного изобретения попробовали комбинированное введение, при котором одновременно вводят инсулин и двойной агонист рецепторов GLP-1/глюкагона и конкретно обнаружили, что комбинированное введение инсулина длительного действия и GLP-1/глюкагона длительного действия может максимизировать соблюдение пациентом схемы лечения, уменьшить дозу лекарственного средства инсулина, снизить риск гипогликемии и помогает снизить уровень глюкозы в крови и массу тела, и таким образом, пришли к данному изобретению.

Техническое решение

Согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая комбинация для лечения или предупреждения сахарного диабета, содержащая конъюгат инсулина длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1(глюкагон-подобный пептид-1)/глюкагона длительного действия, где конъюгат инсулина длительного действия представляет собой конъюгат, в котором инсулин связан с Fc-областью

иммуноглобулина посредством непептидного полимера; где конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия представляет собой конъюгат, в котором двойной агонист GLP-1/глюкагона связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидного полимера, где инсулин представляет собой аналог инсулина, в котором аминокислота в положении 14 А-цепи (SEQ ID NO 37) инсулина заменена глутаминовой кислотой; и где двойной агонист GLP-1/глюкагона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 40, 63 и 64, и одновременно активирует рецептор GLP-1 и рецептор глюкагона.

В одном воплощении настоящего изобретения указанная комбинация дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В другом воплощении настоящего изобретения двойной агонист рецепторов глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1)/глюкагона длительного действия в комбинации по изобретению имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO.40, а аминокислоты в положениях 16 и 20 образуют кольцо.

В еще одном воплощении настоящего изобретения непептидный полимер в комбинации по изобретению выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биodeградируемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

Согласно еще одному воплощению Fc-область иммуноглобулина в комбинации по изобретению является агликозилированной.

В другом воплощении настоящего изобретения Fc-область иммуноглобулина в комбинации по изобретению содержит от одного до четырех участков, выбранных из группы, состоящей из доменов CH1, CH2, CH3 и CH4; и возможно Fc-область иммуноглобулина дополнительно содержит шарнирный участок.

В предпочтительном воплощении Fc-область иммуноглобулина в указанной комбинации представляет собой Fc-область, имеющую происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM; и возможно каждый из доменов Fc-области иммуноглобулина представляет собой гибрид доменов, имеющих разное происхождение, выбранное из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В предпочтительном воплощении Fc-область иммуноглобулина в указанной комбинации представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных полипептидов, состоящих из доменов, имеющих одинаковое происхождение.

Согласно еще одному воплощению настоящего изобретения, непептидный полимерный линкер в комбинации по настоящему изобретению представляет собой PEG (полиэтиленгликоль).

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ предупреждения или лечения диабета, включающий введение комбинации, как определено выше, субъекту, подверженному высокому риску сахарного диабета или страдающему сахарным диабетом.

В одном воплощении стадию введения в указанном способе осуществляют путем комбинированного введения конъюгата инсулина длительного действия и конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия.

В предпочтительном воплощении указанное комбинированное введение осуществляют путем одновременного, последовательного введения или введения в обратном порядке конъюгата инсулина длительного действия и конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия.

Полезный эффект изобретения

Конъюгат инсулина или его аналога длительного действия и конъюгат агониста GLP-1/глюкагона длительного действия демонстрируют превосходный терапевтический эффект в отношении диабета, в частности, комбинированное введение эффективно в качестве терапевтического средства против диабета, которое способно одновременно стимулировать два пептидных рецептора, рецептор инсулина и GLP-1 и глюкагона, для повышения устойчивости и стабильности *in vivo*, значительного снижения вводимой дозы, уменьшения гипогликемии и набора веса благодаря стабильному контролю уровней глюкозы крови, а также обеспечивающего соблюдение схемы лечения. В частности, данное изобретение может существенно улучшить стабильность в крови, обеспечивает устойчивый эффект лекарственного средства и уменьшает частоту введения, таким образом обеспечивая максимальное удобство для пациента.

Описание графических материалов

На фиг. 1 представлен график AUC (площадь под кривой), демонстрирующий изменение глюкозы натощак, измеренное при подкожном введении двойного агониста GLP/глюкагона длительного действия, конъюгированного с Fc иммуноглобулина, и аналога инсулина, конъюгированного с Fc, мышам db/db один раз каждые два дня в течение 4 недель в отдельности или при комбинированном введении.

На фиг. 2 представлен график, демонстрирующий изменение массы тела, которую измеряли до и после подкожного введения двойного агониста GLP/глюкагона длительного действия, конъюгированного с Fc иммуноглобулина, и аналога инсулина, конъюгированного с Fc, мышам db/db один раз каждые два дня в течение 4 недель в отдельности или при комбинированном введении.

Предпочтительное воплощение изобретения

Для решения вышеописанных задач в одном аспекте согласно данному изобретению предложена комбинация для лечения сахарного диабета, содержащая инсулин и двойной агонист GLP-1/глюкагона.

Вышеуказанный инсулин представляет собой конъюгат длительного действия, в котором инсулин и биосовместимое вещество или носитель связаны посредством линкера. Двойной агонист GLP-1/глюкагона представляет собой двойной агонист GLP-1/глюкагона длительного действия и может быть конъюгатом двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия, в котором двойной агонист GLP-1/глюкагона и биосовместимое вещество или носитель связаны посредством линкера. Комбинация по данному изобретению отличается комбинированным введением инсулина и двойного агониста GLP-1/глюкагона. Инсулин и двойной агонист GLP-1/глюкагона по данному изобретению отличаются длительным характером действия.

В комбинации по данному изобретению молярное соотношение двойного агониста GLP-1/глюкагона и инсулина может варьировать от 1: 0,05 до 1:50, но не ограничивается этим соотношением, при условии, что эффект данного изобретения сохраняется. Предпочтительно, инсулин и двойной агонист GLP-1/глюкагона имеют длительный характер действия и находятся в форме конъюгата, в котором биосовместимое вещество или носитель присоединены.

В данном изобретении инсулин представляет собой аналог инсулина, представляющий собой вещество, полученное посредством замены аминокислоты в положении 14 А-цепи (SEQ ID NO 37) инсулина глутаминовой кислотой. В данном изобретении инсулин представляет собой инсулин длительного действия, действующий технологии длительного действия для преодоления короткого периода полувыведения. Предпочтительно, он может представлять собой аналог инсулина длительного действия, который можно вводить раз в неделю.

В данном описании термин "аналог инсулина" относится к пептиду, имеющему замену одной аминокислоты нативной последовательности.

Аналог инсулина представляет собой аналог инсулина с заменой аминокислоты А-цепи, имеющий более низкий инсулиновый порог и пониженную аффинность связывания с рецептором инсулина по сравнению с диким типом. Аминокислотная последовательность нативного инсулина следующая. А цепь:

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

Cys-Asn (SEQ ID NO: 37)

В цепь:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-

Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO: 38)

Несмотря на то, что инсулин, применяемый в воплощении изобретения, представляет собой аналог инсулина, полученный при помощи генетической рекомбинации, данное изобретение им не ограничивается. Предпочтительно, способ получения аналога инсулина включает генетическую рекомбинацию, а также твердофазный способ, но не ограничивается ими.

Аналог инсулина представляет собой пептид, имеющий такую же функциональную способность контролировать содержание глюкозы в крови *in vivo*, как инсулин.

Агонист инсулина по данному изобретению относится к веществу, которое проявляет такую же биологическую активность, как инсулин, связываясь с рецептором инсулина *in vivo*, независимо от структуры инсулина.

Аналог инсулина по данному изобретению демонстрирует гомологию аминокислотной последовательности с А-цепью и В-цепью нативного инсулина, соответственно, и по меньшей мере один аминокислотный остаток может быть измененной формой, выбранной из группы, состоящей из замены (например, альфа-метилования, альфа-гидроксилирования), делеции (например, дезаминирования) или модификации (например, N-метилования) и их комбинаций, и может относиться к пептиду, способному контролировать уровень глюкозы в крови.

Вариант инсулина по данному изобретению относится к пептиду, имеющему одну аминокислотную последовательность, отличную от таковой инсулина, и обладающему функцией контроля уровня глюкозы крови в организме.

Способы получения варианта инсулина можно применять по отдельности или в комбинации. Например, данное изобретение охватывает пептид, имеющий одну аминокислоту, отличную от аминокислоты нативного пептида, имеющий дезаминированный концевой аминокислотный остаток и обладающий функцией контроля уровня глюкозы крови в организме.

Конкретно, аналог инсулина является таким, в котором аминокислота в положении 14 цепи А была заменена другой аминокислотой, а именно заменена глутаминовой кислотой. Кроме того, в объеме данного изобретения входит аналог инсулина, имеющий делецию по меньшей мере одной аминокислоты, но может входить любой аналог инсулина, без ограничений.

Аналог инсулина по настоящему изобретению комбинирован с биосовместимым веществом или носителем для увеличения периода полувыведения по сравнению с инсулином дикого типа.

В данном изобретении двойной агонист GLP-1/глюкагона представляет собой производные оксинтомодулина, нативного двойного агониста GLP-1/глюкагона, которые обладают двойной активностью GLP-1/глюкагона. В данном изобретении двойной агонист GLP-1/глюкагона представляет собой двойной агонист GLP-1/глюкагона, действующий технологией длительного действия для преодоления короткого периода полувыведения и, предпочтительно, двойной агонист GLP-1/глюкагона длительного действия, который можно вводить один раз в неделю.

В данном описании термин "оксинтомодулин" обозначает пептид, имеющий происхождение от предшественника глюкагона, пре-глюкагона, и включает нативный оксинтомодулин, его предшественники, производные, фрагменты и варианты. Предпочтительно, он может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNIA).

Термин "производное оксинтомодулина" включает пептиды, производные пептидов или пептидомиметики, которые получены путем добавления, делеции или замены аминокислот оксинтомодулина для высокого уровня активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона по сравнению с нативным оксинтомодулином. Предпочтительно, производное оксинтомодулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No. 40 и, более предпочтительно, его 16-я и 20-я аминокислоты образуют кольцо.

Каждый из способов получения производных оксинтомодулина можно применять в отдельности или в комбинации. Например, данное изобретение охватывает пептид, имеющий одну или более аминокислот, отличных от аминокислот нативного пептида, имеющий дезаминированный N-концевой аминокислотный остаток и обладающий функцией активации как рецептора GLP-1, так и рецептора глюкагона.

Согласно данному изобретению, инсулин и двойной агонист GLP-1/глюкагона длительного действия находятся в форме конъюгата, в котором биосовместимое вещество или носитель присоединены к инсулину или двойному агонисту посредством линкера. Представитель указанного инсулина или двойного агониста GLP-1/глюкагона с длительным действием может увеличивать период полувыведения или биодоступность по сравнению с формой, в которой последовательность инсулина или двойного агониста не относится к длительному типу действия, но в остальном такая же. Согласно данному изобретению, инсулин длительного действия находится в форме, в которой Fc-область иммуноглобулина соединена с аналогом инсулина, в котором аминокислота в положении 14 A-цепи инсулина заменена глутаминовой кислотой, посредством непептидильного полимера в качестве линкера. Двойной агонист GLP-1/глюкагона длительного действия может быть, без ограничения, композицией, в которой Fc-область иммуноглобулина соединена с аминокислотами в положении 30 двойного агониста GLP-1/глюкагона посредством непептидильного полимера в качестве линкера.

Авторы данного изобретения обнаружили, что комбинированное введение инсулина и двойного агониста GLP-1/глюкагона может предотвращать набор лишнего веса, ассоциированный с введением инсулина в отдельности, риск гипогликемии может быть снижен благодаря снижению количества инсулина, а также комбинированное введение двух лекарственных средств может уменьшать побочные эффекты и оказывать усиленное влияние по сравнению с введением каждого лекарственного средства в отдельности для проявления лучшего эффекта снижения уровней глюкозы в крови по сравнению с введением двойного агониста в отдельности. Авторы изобретения также подтвердили, что комбинацию для комбинированного введения можно применять в качестве эффективного терапевтического средства, при этом уменьшая побочные эффекты обычных терапевтических средств для диабета.

В данном документе термин "биосовместимое вещество" или "носитель" относится к веществам, которые могут увеличивать продолжительность действия инсулина или аналога инсулина или двойного агониста GLP-1/глюкагона, когда биосовместимое вещество и носитель напрямую или опосредовано ковалентно или нековалентно связаны с инсулином или аналогом инсулина или двойным агонистом GLP-1/глюкагона по данному изобретению для образования конъюгата. Например, при образовании конъюгата вещество, способное увеличивать период полувыведения инсулина или аналога инсулина или двойного агониста GLP-1/глюкагона *in vivo*, может представлять собой биосовместимое вещество или носитель по данному изобретению. Биосовместимое вещество или носитель, который можно использовать для увеличения периода полувыведения представляет собой вещества, связывающиеся с неонатальным Fc рецептором (FcRn). Биосовместимое вещество или носитель представляет собой биосовместимое вещество, которое увеличивает период полувыведения *in vivo* благодаря ковалентной или нековалентной связи.

В данном изобретении способы, которыми биосовместимое вещество или носитель присоединяют к инсулину или двойному агонисту, включают способы генетической рекомбинации, а также присоединение *in vivo* с помощью полимеров или низкомолекулярных химических веществ, но не ограничиваются ими. Вещество, связывающееся с FcRn, представляет собой Fc-область иммуноглобулина.

В данном изобретении используют методику связывания с пептидом с использованием в качестве носителя антитела или фрагмента антитела для увеличения периода полувыведения *in vivo*. Можно использовать антитело или фрагмент антитела, имеющий сайт связывания FcRn. В данном изобретении можно использовать методику CovX-body, разработанную компанией CovX, в которой используют каталитическое антитело, и методику, которая увеличивает период полувыведения *in vivo* с использованием

Fc-фрагментов. Когда используют Fc-фрагмент, линкер, связывающийся с Fc-фрагменту и пептиду, и способ его связывания могут включать, без ограничения, полиэтиленгликоль или ему подобное, однако возможен любой способ химического связывания. Кроме того, соотношение связывания Fc-фрагмента и инсулина по данному изобретению может составлять 1:1 или 1:2, но не ограничиваться такими соотношениями.

Используемые типы линкеров и способ связывания могут представлять собой присоединение полиэтиленгликоля и тому подобного, но не ограничиваться ими, и также возможны любые способы химического присоединения.

Линкер, связывающийся с носителем, который применяют для увеличения периода полувыведения *in vivo*, может включать полиэтиленгликоли, жирные кислоты, сахара, полимеры, низкомолекулярные соединения, нуклеотиды и их комбинации и может представлять собой любую химическую связь, такую как нековалентная химическая связь или ковалентная химическая связь, без ограничений.

Композиция, которая может увеличивать биодоступность или непрерывно поддерживать активность, может включать композицию с замедленным высвобождением микрочастицами, наночастицами и тому подобным, с использованием PLGA (сополимер молочной и гликолевой кислот), гиалуроновой кислоты, хитозана и тому подобного.

Кроме того, в различных аспектах композиция, способная повышать биодоступность или непрерывно поддерживать активность, может представлять собой такую композицию, как импланты, средства для ингаляции, трансназальные композиции или пластыри.

В данном изобретении инсулин, вводимый в комбинации с двойным агонистом GLP-1/глюкагона, представляет собой аналог инсулина.

В данном изобретении примеры двойного агониста GLP-1/глюкагона, которые можно вводить в комбинации с инсулином или аналогом инсулина и его композицией длительного действия, включают производные оксинтомодулина.

Вещество-носитель, которое можно применять в данном изобретении представляет собой Fc-область иммуноглобулина. В приведенном в качестве примера воплощении данного изобретения двойной агонист GLP-1/глюкагона длительного действия связан с носителем посредством непептидильного полимера в качестве линкера. В другом приведенном в качестве примера воплощении изобретения вещество-носитель, связанное с непептидильным полимерным линкером, представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина.

В данном изобретении конъюгат инсулина длительного действия (или, для краткости, конъюгат инсулина) или двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия (для краткости, конъюгат двойного агониста) представлен формой, в которой инсулин или двойной агонист связан с Fc-областью иммуноглобулина и демонстрирует устойчивость и безопасность. Связывание Fc-области иммуноглобулина с инсулином или двойным агонистом представляет собой связывание с использованием непептидильного полимера в качестве линкера. В данном изобретении Fc иммуноглобулина можно использовать взаимозаменяемо с фрагментами иммуноглобулина.

Термин "непептидильный полимер" относится к биосовместимому полимеру, включающему два или более повторяющихся блоков, связанных друг с другом посредством любой ковалентной связи, за исключением пептидной связи. В данном изобретении непептидильный полимер можно использовать взаимозаменяемо с непептидильным линкером.

Непептидильный полимер, полезный в данном изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из биодegradуемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации. Биодegradуемый полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахарид, декстран, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA) или сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) и предпочтительно представляет собой полиэтиленгликоль. Кроме того, в объем данного изобретения могут входить их производные, известные в области техники, и производные, легко получаемые способом, известным в области техники.

Пептидный линкер, который используют в слитом белке, полученном стандартным способом слияния в рамке считывания, имеет недостатки, состоящие в том, что он легко расщепляется *in vivo* протеолитическим ферментом и, таким образом, ожидаемый эффект, состоящий в увеличении носителем периода полувыведения активного лекарственного средства из сыворотки не достигается в достаточной мере. Напротив, в данном изобретении для поддержания периода полувыведения пептида из сыворотки можно использовать полимер, обладающий устойчивостью к протеолитическим ферментам, схожий с таковой носителя. Таким образом, в данном изобретении можно использовать любой непептидильный полимер без ограничений, при условии, что он представляет собой полимер, обладающий указанной функцией, то есть полимер, обладающий устойчивостью к протеолитическому ферменту *in vivo*. Непептидильный полимер имеет молекулярную массу в диапазоне от 1 до 100 кДа, предпочтительно от 1 до 20 кДа. Непептидильный полимер согласно данному изобретению, связанный с Fc-областью иммуноглобулина, может представлять собой один тип полимера или комбинацию различных типов полимеров. Непептидильный полимер, используемый в данном изобретении, имеет реакционноспособную группу, спо-

собную связываться с Fc-областью иммуноглобулина и белковым лекарственным средством. Непептидный полимер имеет реакционноспособную группу на обоих концах, которая предпочтительно выбрана из группы, состоящей из реакционноспособной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного. Сукцинимидное производное может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, когда непептидный полимер имеет реакционноспособную группу, представленную реакционноспособной альдегидной группой на обоих своих концах, он эффективно связывается обоими концами с физиологически активным полипептидом и иммуноглобулином с минимальными неспецифическими реакциями. Конечный продукт, полученный посредством восстановительного алкилирования с помощью альдегидной связи, является более стабильным, чем тот, который присоединен амидной связью. Альдегидная реакционноспособная группа избирательно реагирует по N-концу при низких значениях pH и связывается с остатком лизина с образованием ковалентной связи при высоких значениях pH, таких как pH 9,0. Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного полимера могут быть одинаковыми или различаться между собой. Например, непептидный полимер может иметь малеимидную группу на одном конце и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце. Когда в качестве непептидного полимера используют полиэтиленгликоль, имеющий на обоих своих концах реакционноспособную гидроксигруппу, гидроксигруппу можно активировать в различные реакционноспособные группы при помощи известных химических реакций или можно использовать имеющийся в продаже полиэтиленгликоль, имеющий модифицированные реакционноспособные группы для получения конъюгата GLP-1/глюкагона длительного действия по данному изобретению.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина обладает преимуществами в том, что касается получения, очистки и выхода конъюгата, поскольку молекулярная масса относительно невелика по сравнению с общей молекулярной массой, а также благодаря значительному увеличению однородности материала и снижению потенциальной возможности индуцировать антигенность в крови, поскольку аминокислотные последовательности у каждого антитела отличаются, а Fab-фрагмент, обладающий резко выраженной неоднородностью, удален.

Термин "Fc-область иммуноглобулина", используемый в данном документе, означает константный участок 2 тяжелой цепи (CH2) и константный участок 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина, не включая переменные области тяжелой и легкой цепей, константный участок 1 тяжелой цепи (CH1) и константный участок 1 легкой цепи (CL1) иммуноглобулина. Он может также включать шарнирный участок в константной области тяжелой цепи. Также Fc-область иммуноглобулина по данному изобретению может содержать всю или часть Fc-области, включая константный участок 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константный участок 1 легкой цепи (CL1), не включая переменные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, при условии, что он обладает физиологическим эффектом, по существу схожим или превосходящим таковой нативного белка. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой фрагмент, имеющий делецию относительно большей части аминокислотной последовательности CH2 и/или CH3. Это означает, что Fc-область иммуноглобулина по данному изобретению может включать (1) CH1 домен, CH2 домен, CH3 домен и CH4 домен, (2) CH1 домен и CH2 домен, (3) CH1 домен и CH3 домен, (4) CH2 домен и CH3 домен, (5) комбинацию одного или нескольких доменов и шарнирного участка иммуноглобулина (или части шарнирного участка) и (6) димер каждого домена константных областей тяжелой цепи и константной области легкой цепи. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по данному изобретению включает нативную аминокислотную последовательность, а также производное этой последовательности (мутированную последовательность). Производное аминокислотной последовательности имеет отличающуюся последовательность в результате делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены одного или нескольких аминокислотных остатков нативной последовательности или их комбинации. Например, подходящей мишенью для модификации могут служить аминокислотные остатки Fc IgG в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, важны для связывания.

Кроме того, возможны различные виды производных, включая такую, в которой удален участок, способный образовывать дисульфидную связь, или удалены некоторые аминокислотные остатки на N-конце нативной Fc-формы или к нему добавлен остаток метионина. Кроме того, для устранения эффекторных функций может быть произведена делеция сайта связывания комплемента, такого как сайт связывания C1q и сайта ADCC (антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность). Методики получения таких производных последовательности Fc-области иммуноглобулина изложены в международных публикациях WO97/34631 и WO 96/32478. В области техники известны аминокислотные замены в белках и пептидах, которые не изменяют полностью активность молекулы (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly, в обоих направлениях. Кроме того, при желании Fc-область может быть модифицирована путем фосфорилирования, сульфатирования, акрилатирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и тому подобного. Описанные выше

производные Fc представляют собой производные, проявляющие биологические активности, идентичные Fc-области по данному изобретению или улучшенную структурную стабильность, например, к нагреванию, pH и так далее, в сравнении с Fc-областью.

Кроме того, указанные Fc-области могут быть получены из нативных форм, выделенных от человека и других животных, включая крупный рогатый скот, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс или морских свинок, или могут быть рекомбинантными или представлять собой производные, полученные из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. Так, они могут быть получены из нативного иммуноглобулина путем выделения целого иммуноглобулина из организма человека или животного и последующей обработки их протеолитическим ферментом. Папаин разрезает нативный иммуноглобулин на фрагменты Fab и Fc, а обработка пепсином приводит к образованию фрагментов pFc' и F(ab)₂. Эти фрагменты можно подвергать, например, эксклюзионной хроматографии для выделения фрагментов Fc или pFc'. Предпочтительно, Fc-область человеческого происхождения представляет собой Fc-область рекомбинантного иммуноглобулина, полученного из микроорганизма.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может быть представлена формой, имеющей нативные углеводные цепи, повышенное количество углеводных цепей по сравнению с нативной формой или пониженное количество углеводных цепей по сравнению с нативной формой или может быть представлен дегликозилированной формой. Увеличение, уменьшение или удаление углеводных цепей Fc иммуноглобулина может достигаться способами, обычно используемыми в области техники, такими как химический способ, ферментативный способ и генно-инженерный способ с использованием микроорганизмов. Удаление углеводных цепей в Fc-области приводит к резкому снижению аффинности связывания с частью C1q первого компонента комплемента C1 и снижению или потере антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или комплемент-зависимой цитотоксичности, таким образом, не индуцируя ненужных иммунных ответов *in vivo*. В связи с этим Fc-область иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной форме может быть более подходящей для задач данного изобретения в качестве носителя лекарственного средства.

В данном документе термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению углеводных группировок в Fc-области, а термин "агликозилирование" означает, что Fc-область продуцируется в негликозилированной форме прокариотом, предпочтительно, *E. coli*.

При этом, Fc-область иммуноглобулина может иметь происхождение из человека или других животных, включая крупный рогатый скот, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, и предпочтительно из человека.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может представлять собой Fc-область, имеющую происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, или созданную из их комбинаций или быть их гибридом. Предпочтительно, она имеет происхождение из IgG или IgM, которые являются наиболее распространенными белками в крови человека и, наиболее предпочтительно, из IgG, который, как известно, увеличивает период полувыведения лиганд-связывающих белков, но не ограничивается ими.

С другой стороны, термин "комбинация" в данном документе означает, что полипептиды, кодирующие Fc-области одноцепочечных иммуноглобулинов одного происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Это означает, что димер или мультимер могут быть образованы из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из фрагментов Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD и Fc IgE.

В данном описании термин "гибрид" означает, что в Fc-области одноцепочечного иммуноглобулина присутствует последовательность, соответствующая по меньшей мере двум Fc-фрагментам различного происхождения. В данном изобретении возможны различные типы гибридов. Это означает, что возможен гибрид, состоящий из 1-4 доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE и Fc IgD, и может включать шарнирный участок.

С другой стороны, IgG может также подразделяться на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и в данном изобретении возможна их комбинация или гибридизация. Предпочтительными являются подклассы IgG2 и IgG4, и наиболее предпочтительна Fc-область IgG4, обладающая выраженной эффекторной функцией, такой как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

Это означает, что Fc-область иммуноглобулина для носителя лекарственного средства по данному изобретению может быть, например, агликозилированной Fc-областью, имеющей происхождение из IgG4 человека, но не ограничиваться ей. Fc-область, имеющая происхождение из человека, является предпочтительной по сравнению с Fc-областью, имеющей происхождение из источников, отличных от человека, которая может вызывать нежелательные иммунные ответы, например может выступать в качестве антигена в человеческом организме для образования нового антитела.

Способ получения инсулина длительного действия по данному изобретению не имеет конкретных ограничений. Например, детали способа получения и их эффекты описаны, например, в патентах Кореи 10-1330868, 10-1324828, 10-1058290, опубликованных заявках на патент Кореи 10-2011-0111267 и заявке на патент Кореи 10-2014-0022909.

В воплощении данного изобретения конъюгат аналога инсулина длительного действия получали путем осуществления моно-пегилирования Fc-области иммуноглобулина по N-концу и такой же моди-

фикации фенилананина в положении 1 цепи В инсулина и аналога инсулина (Пример 8).

Способ получения двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия по данному изобретению не имеет конкретных ограничений. Например, детали способа получения и их эффекты описаны, например, в заявке на патент Кореи 10-2012-0139579. В воплощении данного изобретения конъюгат аналога инсулина длительного действия получали путем осуществления моно-пегилирования Fc-области иммуноглобулина по N-концу и такой же модификации остатка цистеина в положении 30 двойного агониста GLP-1/глюкагона.

В другом аспекте данного изобретения предложена комбинация, содержащая инсулин длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия.

Когда такой конъюгат инсулина длительного действия и двойной агонист GLP-1/глюкагона длительного действия вводят в комбинации, конъюгат инсулина длительного действия действует на рецептор инсулина, а конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона одновременно действует на рецептор глюкагон-подобного пептида-1 и рецептор глюкагона для снижения уровней глюкозы в крови по сравнению с введением каждого из них в отдельности и демонстрирует стабильное изменение. Также комбинированное введение указанных выше конъюгатов может снизить опасность гипогликемии, которая может возникнуть при введении одного инсулина, и снизить общую дозу инсулина благодаря пептиду, стимулирующему секрецию инсулина. Применение конъюгата инсулина длительного действия и двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия имеет большое преимущество, заключающееся в том, что позволяет значительно снизить число введений пациентам с хроническим заболеванием, которым в противном случае необходимы ежедневные введения, благодаря увеличению периода полувыведения из крови и устойчивости *in vivo*, и, таким образом, повысить качество жизни пациента. Таким образом, это очень эффективно в лечении диабета. Фармацевтическая комбинация по данному изобретению имеет превосходную устойчивость *in vivo* и пороговую дозу и позволяет значительно снизить дозировку, используемую при комбинированном введении.

Конъюгат инсулина длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия можно вводить одновременно, последовательно или в обратном порядке, и вводить одновременно в комбинации соответствующего эффективного количества. Также, предпочтительно, конъюгат инсулина длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия можно вводить одновременно, последовательно или в обратном порядке после хранения в отдельных контейнерах.

Конъюгат инсулина длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия, которые представляют собой комбинацию для комбинированного введения по данному изобретению, могут быть в форме набора для лечения диабета, который либо включен в один контейнер, либо хранится в отдельных контейнерах. Такой набор может включать в себя фармацевтически приемлемый носитель и инструкцию по применению набора.

В данном изобретении термин диабет относится к метаболическим заболеваниям, при которых секреция инсулина недостаточна или не осуществляются его нормальные функции, которые отличаются повышенными уровнями глюкозы крови. Комбинированное введение комбинации по данному изобретению субъекту может контролировать уровни глюкозы крови для лечения сахарного диабета.

В данном документе термин "предупреждение" относится ко всем действиям, которые подавляют или замедляют развитие диабета благодаря комбинированному введению комбинации по данному изобретению. "Лечение" относится ко всем действиям, которые смягчают, улучшают или облегчают симптомы диабета благодаря комбинированному введению комбинации по данному изобретению. Лечение диабета применимо к любому млекопитающему, которое страдает сахарным диабетом, и его примеры включают не только человека и приматов, но также крупный рогатый скот, например коров, свиней, овец, лошадей, собак и кошек, без каких-либо ограничений, предпочтительно к человеку.

В данном документе термин "введение" относится к введению пациенту количества заданного вещества подходящим способом. Комбинацию по данному изобретению можно вводить любым стандартным способом, при условии, что она способна достигнуть нужной ткани. Например, это может быть внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрикожное, пероральное, местное, интраназальное, внутрилегочное или ректальное введение, не ограничиваясь приведенным списком. Однако, поскольку пептиды при пероральном введении подвергаются перевариванию, активные ингредиенты комбинации для перорального введения должны иметь покрытие или защиту от деградации в желудке. Предпочтительно, комбинацию можно вводить в форме инъекций. Кроме того, комбинацию длительного действия можно вводить с помощью любого устройства, которое может транспортировать активное вещество в клетку-мишень.

Помимо различных факторов, таких как заболевание, которое необходимо лечить, путь введения, возраст, пол, масса тела пациента и тяжесть заболевания, вводимая доза и частота введения фармацевтической комбинации по данному изобретению определяются типом активного ингредиента.

Фармацевтическая комбинация по данному изобретению может дополнительно включать в себя фармацевтически приемлемый носитель. В данном изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к разбавителю или носителю, который не подавляет биологическую активность и

свойства вводимого соединения и не вызывает раздражения организма. Для перорального введения носитель может включать связывающий агент, смазывающий агент, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизирующий агент, диспергирующий агент, стабилизатор, суспендирующий агент, краситель и корригент. В инъекционных препаратах носитель может включать забуферивающий агент, консервант, анальгетик, солюбилизирующий агент, изотонический агент и стабилизатор. Для препаратов для местного введения носитель может включать основу, эксципиент, смазывающий агент и консервант.

Комбинации по данному изобретению могут быть изготовлены в виде различных лекарственных форм в комбинации с вышеупомянутыми фармацевтически приемлемыми носителями. Например, фармацевтическая комбинация для перорального введения может быть изготовлена в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов или облаток. Фармацевтическая комбинация для инъекций может быть изготовлена в виде однодозовых ампул или в многодозовом контейнере. Фармацевтическая комбинация также может быть изготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул и препаратов длительного действия.

С другой стороны, примеры носителя, эксципиента и разбавителя, подходящих для фармацевтических комбинаций, включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральные масла. Кроме того, фармацевтические комбинации могут дополнительно включать наполнители, противосвертывающие агенты, смазывающие агенты, увлажняющие агенты, корригенты и антисептики.

В другом аспекте данного изобретения предложен способ предупреждения или лечения диабета, включающий введение комбинации, содержащей инсулин и двойной агонист GLP-1/глюкагона, субъекту, подверженному высокому риску сахарного диабета или страдающему сахарным диабетом.

Комбинация и сахарный диабет являются такими, как описано выше.

Стадию введения можно осуществлять, без ограничения, путем комбинированного введения конъюгата инсулина длительного действия и конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия. Каждый из них можно вводить одновременно, последовательно или в обратном порядке, и вводить одновременно в соответствующем эффективном количестве.

Комбинация по данному изобретению, включающая и конъюгат инсулина длительного действия, и конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия может значительно снижать уровни глюкозы крови и не вызывает побочных эффектов набора веса, несмотря на введение раз в неделю, и таким образом, ее можно применять в предупреждении и лечении диабета.

Далее данное изобретение будет описано более подробно на примерах. Данные примеры предназначены исключительно для иллюстрации данного изобретения, объем которого не ограничивается данными примерами. ПРИМЕР 1. Получение векторов, экспрессирующих одноцепочечный аналог инсулина.

Для получения аналога инсулина, в котором заменена аминокислота А-цепи или В-цепи инсулина, используя в качестве матрицы вектор, экспрессирующий нативный инсулин, синтезировали прямой и обратный олигонуклеотиды (табл. 2) и затем провели PCR (полимеразная цепная реакция), таким образом амплифицируя ген соответствующего аналога.

Измененные последовательности аминокислот А-цепи или В-цепи и обозначения соответствующих аналогов представлены в табл.1. Так, аналог 1 представляет собой форму, в которой глицин в положении 1 А-цепи заменен на аланин, а аналог 4 представляет собой форму, в которой глицин в положении 8 В-цепи заменен на аланин.

Таблица 1

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

Праймеры для амплификации аналогов инсулина представлены в табл. 2.

Таблица 2

Аналог	Последовательность	SEQ ID NO
Аналог 1	5' GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCATTGTGGAACAATGCTGT 3'	SEQ ID NO 1
	5' ACAGCATTGTTCCACAATCGCACGCTTCTGCAGGGACCC 3'	SEQ ID NO 2
Аналог 2	5' TCCCTGCAGAAGCGTGGCGCGGTGGAACAATGCTGTACC 3'	SEQ ID NO 3
	5' GGACAGCATTGTTCCACCGGCCACGCTTCTGCAGGGA 3'	SEQ ID NO 4
Аналог 3	5' CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAACTGAGGATCC 3'	SEQ ID NO 5
	5' GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	SEQ ID NO 6
Аналог 4	5' GTTAACCAACACTTGTGTGCGTACACCTGGTGGAAAGCT 3'	SEQ ID NO 7
	5' AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTGGTTAAC 3'	SEQ ID NO 8
Аналог 5	5' CTAGTGTGCGGGGAACGAGCGTCTTCTACACACCCAAG 3'	SEQ ID NO 9
	5' CTTGGGTGTGTAGAAGAACGCTCGTTCCTCCGCACACTAG 3'	SEQ ID NO 10
Аналог 6	5' GTGTGCGGGGAACGAGGCGGTTCTACACACCCAAGACC 3'	SEQ ID NO 11
	5' GGTCTTGGGTGTGTAGAACGCGCCTCGTTCCTCCGCACAC 3'	SEQ ID NO 12
Аналог 7	5' TCGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCAAGACCCGC 3'	SEQ ID NO 13
	5' GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCCTCCGCA 3'	SEQ ID NO 14
Аналог 8	5'-CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3'	SEQ ID NO 15
	5'-Cagtagttccagctgttcgagggagcagatgctgg-3'	SEQ ID NO 16
Аналог 9	5'-CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3'	SEQ ID NO 17
	5'-Gtagttccagctgttcgagggagcagatgctg-3'	SEQ ID NO 18

Условия PCR для амплификации аналога инсулина: 95°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 68°C в течение 6 мин, с повторением данной процедуры 18 раз. Фрагмент аналога инсулина, полученный в указанных условиях, встраивали в экспрессирующий вектор рЕТ22b для экспрессии в клетке в форме телец включения. Полученный таким образом экспрессирующий вектор обозначили рЕТ22b-аналоги Инсулина 1-9. Экспрессирующий вектор включает в себя нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность аналогов инсулина с 1 по 9 под контролем промотора T7; экспрессирующий вектор экспрессировался в хозяине в форме телец включения.

Последовательности ДНК и белковые последовательности каждого из аналогов инсулина с 1 по 9 приведены ниже в табл. 3.

Таблица 3

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

		GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	22
Аналог 3	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	23
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Ala Cys Asn	24
Аналог 4	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC	25
		CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	26
Аналог 5	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	28
Аналог 6	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC	29

		CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Ala Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	30
Аналог 7	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu	32
		Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	
Аналог 8	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34
Аналог 9	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser	36
		Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	

Пример 2. Экспрессия слитых полипептидов рекомбинантных аналогов инсулина.

Экспрессию рекомбинантных аналогов инсулина осуществляли под контролем промотора T7. E. coli BL21-DE3 (E coli B F-dcm ompT hsdS (rB-mB)-gal DE3.); Nova Zen) трансформировали каждым век-

тором, экспрессирующим рекомбинантный аналог инсулина. Трансформацию проводили согласно способу, рекомендованному Novagene. Отдельные одиночные колонии, трансформированные каждым рекомбинантным экспрессирующим вектором, инокулировали в среду 2X Luria broth (LB), содержащую ампициллин (50/мл), и инкубировали при 37°C в течение 15 ч. Культуру рекомбинантного штамма и среду 2X LB, содержащую 30% глицерин, смешивали в соотношении 1:1 (об./об.). Затем разливали по 1 мл культуры в криопробирки и хранили при -140°C. Их использовали как исходные клетки для получения рекомбинантного химерного белка.

Для экспрессии рекомбинантного аналога инсулина растворяли 1 ампулу исходных клеток, инокулировали в 500 мл среды 2X Luria broth и культивировали при встряхивании при 37°C в течение 14-16 часов. При достижении OD₆₀₀ (оптическая плотность) значения 5,0 или выше культуру останавливали и использовали в качестве посевного материала. Посевной материал вносили в 17 л среды для ферментации, используя 50 л ферментер (MSJ-U2, BEMARUBISHI, Япония), и запускали ферментацию исходной партии. Условия культивирования: температура 37°C, объем воздуха 20 л/мин (об./об./мин), скорость перемешивания 500 об/мин, значение pH 6,7 поддерживали с помощью 30% водного раствора аммиака. Когда в процессе ферментации питательные элементы в культуральной среде становились ограниченными, осуществляли подпитку культуры путем добавления питательного раствора. За ростом штаммов следили по значениям OD и вносили IPTG (изопропилтиогалактозид) в конечной концентрации 500 М при значениях OD 100 или выше. После внесения культивирование осуществляли на протяжении от 23 до 25 часов. После завершения культивирования рекомбинантный штамм собирали путем центрифугирования и хранили при -80°C до применения.

Пример 3. Количество и рефолдинг рекомбинантных аналогов инсулина.

Чтобы перевести рекомбинантные аналоги инсулина, экспрессированные в Примере 2, в растворимую форму, их подвергали рефолдингу после разрушения клеток. 100 г (масса во влажном состоянии) клеточного осадка ресуспендировали в 1 л лизирующего буфера (50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 M NaCl и 0,5% Triton X-100). Клетки разрушали с помощью микрофлюидизатора M-110EH (AC Technology Corp. модель M1475C) под давлением 15000 psi (фунт на квадратный дюйм). Лизат разрушенных клеток центрифугировали при 7000 об/мин при 4°C в течение 20 минут для отделения супернатанта и ресуспендировали в 3 л отмывочного буфера (0,5% Triton X-100 и 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA). Осадок центрифугировали при 7000 об/мин при 4°C в течение 20 мин и ресуспендировали в дистиллированной воде и затем центрифугировали аналогичным образом. Собирали осадок, ресуспендировали в 400 мл буферного раствора (1 M глицин, 3,78 г цистеин-HCl, pH 10,6) и затем перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч). Чтобы собрать ресуспендированный рекомбинантный аналог инсулина, добавляли 400 мл 8M мочевины и затем перемешивали при 40°C в течение 1 ч. Для рефолдинга солюбилизированного рекомбинантного аналога инсулина его центрифугировали при 7000 об/мин при 4°C в течение 30 мин. Затем собирали супернатант, к которому добавляли 2 л дистиллированной воды при скорости тока 1000 мл/час с помощью перистальтического насоса и перемешивали при 4°C в течение 16 ч.

Пример 4. Очистка с помощью катионообменной хроматографии.

Прошедший рефолдинг образец наносили на колонку Source S (GE healthcare, Inc.), уравновешенную 20 mM цитратом натрия, содержащемся на месте, уравновешивали 45% этаноловым (pH 2,0) буфером, содержащим 4% этанол. Белок аналога инсулина элюировали линейным градиентом (0-100%) 20 mM буферного раствора цитрата натрия (pH 2,0), содержащего 45% этанол и 0,5 M хлорид калия (10 объемов колонки).

Пример 5. Обработка трипсином и карбоксипептидазой В.

Удаляли соль из образца посредством элюирования с обессоливающей колонки и заменяли буферным раствором (10 mM Tris-HCl, pH 8,0). К полученному образцу белка добавляли трипсин, взятый в молярном соотношении 1000, и карбоксипептидазу В, взятую в молярном соотношении 2000, и затем перемешивали при 16°C в течение 16 ч. Для завершения реакции снижали pH до 3,5 с помощью 1M цитрата натрия (pH 2,0).

Пример 6. Очистка с помощью катионообменной хроматографии.

После завершения реакции образец вновь наносили на колонку Source S (GE healthcare, Inc.), уравновешенную 20 mM буферным раствором цитрата натрия (pH 2,0), содержащим 45% этанол. Затем белок аналога инсулина элюировали линейным градиентом (0-100%) 20 mM буферного раствора цитрата натрия (pH 2,0), содержащего 45% этанол и 0,5 M хлорид калия (10 объемов колонки).

Пример 7. Очистка с помощью анионообменной хроматографии.

Удаляли соль из образца посредством элюирования с обессоливающей колонки и заменяли буферным раствором (10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Для выделения очищенного аналога инсулина из образца, полученного в Примере 6, образец наносили на анионообменную колонку (Source Q: GE healthcare, Inc.), уравновешенную 10 mM трис-буферным раствором (pH 7,5). Затем белок аналога инсулина элюировали линейным градиентом (0-100%) 10 mM трис-буферного раствора, pH 7,5, содержащего 0,5 M хлорид натрия (10 объемов колонки).

Степень чистоты очищенного аналога инсулина анализировали с помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил-сульфата натрия (SDS-PAGE) и хроматографии высокого давления (HPLC), а аминокислотные замены подтверждали при помощи пептидного картирования и анализа молекулярной массы каждого пика.

В результате подтвердили, что аминокислотная последовательность была изменена в соответствии с целевым назначением соответствующего аналога инсулина.

Пример 8. Получение конъюгата инсулина длительного действия.

В данном примере получали конъюгат инсулина длительного действия для аналога последовательности (Glu в положении 14 А-цепи) нативного аналога инсулина, типичного аналога инсулина.

Для пегилирования с помощью PEG 3.4K ALD2 PEG (NOF, Japan) бета-цепи аналога инсулина по N-концу проводили реакцию между аналогом инсулина и PEG в молярном соотношении 1:4 и концентрации аналога инсулина 5 мг/мл при 4 ~8°C в течение приблизительно 2 ч. При этом реакцию осуществляли в 50 мМ цитрате натрия pH 6,0 с 40 ~ 60% изопропанола, и реакцию осуществляли посредством добавления восстанавливающего агента цианоборогидрида натрия в концентрации 3,0~20,0 мМ. Реакционный раствор очищали с помощью колонки SP-HP (GE Healthcare, США), содержащей этанол в цитрате натрия (pH 3,0).

Чтобы получить конъюгат аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина осуществляли реакцию между очищенным монопегилированным аналогом инсулина и Fc-фрагментом иммуноглобулина в молярном соотношении от 1:1 до 1:2 при общей концентрации белка 20 мг/мл при 25°C в течение приблизительно 12~16 часов. При этом буфер для реакции представлял собой 100 мМ HEPES, pH 8,2, к которому был добавлен 20 мМ цианоборогидрид натрия в качестве восстанавливающего реагента для получения конъюгата аналога инсулина, модифицированного PEG по N-концу Fc-фрагмента.

По окончании реакции реакционный раствор наносили на колонку Q HP (GE Healthcare, США) и вначале очищали конъюгат аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина с помощью буфера трис-HCl (pH 7,5) с градиентом концентрации NaCl.

Затем получали конъюгат аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина с помощью Source 15ISO (GE Healthcare, США) в качестве второй колонки. При этом конъюгат аналога инсулина и Fc-фрагмента иммуноглобулина элюировали с помощью градиента концентрации сульфата аммония в Tris-HCl (pH 7,5).

Пример 9. Синтез производных оксинтомодулина.

В данном примере синтезировали производные оксинтомодулина, имеющие следующие аминокислотные последовательности (табл.4).

Таблица 4

SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO. 39	HSQGTFTSDYSKYLD SRRA QDFVQWLMNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 40	HAi b QGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 41	CA-SQGTFTSDYSKYLD EEAVRLFIEWLMNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 42	CA-SQGTFTSDYSKYLD ERRA QDFVAWLKNTGPSSGAPPPS
SEQ ID NO. 43	CA-GQGTFTSDYSRYL EEEEAVRLFIEWLKN GGPSSGAPPPS
SEQ ID NO. 44	CA-GQGTFTSDYSRQ MEEEAVRLFIEWLKN GGPSSGAPPPS
SEQ ID NO. 45	CA-GEGTFTSDLSRQ MEEEAVRLFIEWAAHS QGTFTSDYSKYLD
SEQ ID NO. 46	CA-SQGTFTSDYSRYL DEEAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID NO. 47	CA-SQGTFTSDLSRQ LEEEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID NO. 48	CA-GQGTFTSDYSRYL DEEAVXLFIEWLMNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 49	CA-SQGTFTSDYSRQ MEEEAVRLFIEWLMNG GPSSGAPPPSK
SEQ ID NO. 50	CA-GEGTFTSDLSRQ MEEEAVRLFIEWAAHS QGTFTSDYSRYL DK
SEQ ID NO. 51	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGGHGE G TFTSDLSKQ M EEEA V K
SEQ ID NO. 52	CA-SQGTFTSDYSRYLD XEAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID NO. 53	CA-GQGTFTSDYSRYL DEEAVXLFIXWLMNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 54	CA-GQGTFTSDYSRYL DEEAVRLFIXWLMNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 55	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGGHSQGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID NO. 56	CA-SQGTFTSDYSRYL DEEAVRLFIEWIRNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 57	CA-SQGTFTSDYSRYL DEEAVRLFIEWIRN GGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO. 58	CA-SQGTFTSDYSRYL DEEAVKLF IEWIRNTRNRN NIA
SEQ ID NO. 59	CA-SQGTFTSDYSRYL DEEAVKLF IEWIRNNGGPSSGAPPPSK

SEQ ID NO. 60	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTRKRRNNIA
SEQ ID NO. 61	DA-SQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTK
SEQ ID NO. 62	HAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNT
SEQ ID NO. 63	HAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 64	HAibQGTFTSDYS K YLD E KRA K EFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 65	HAibQGTFTSDYSKYLD E QA A K EFVQWLMNT
SEQ ID NO. 66	HAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNT
SEQ ID NO. 67	H(d)SQGTFTSDYSKYLD S RR A QDFVQWLMNTRRNNIA
SEQ ID NO. 68	CA-SQGTFTSDYSKYLD S RR A QDFVQWLMNTRRNNIA
SEQ ID NO. 69	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLD S RR A QDFVQWLMNTRRNNIA
SEQ ID NO. 70	CA-AibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 71	HAibQGTFTSDY A KYLD E KRA K EFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 72	YAibQGTFTSDYSKYLD E KRA K EFVQWLMNTC

в табл.4 аминокислоты, отмеченные жирным и подчеркнутые, обозначают образование кольца, а аминокислоты, обозначенные как X, означают ненативную аминокислоту, альфа-метил-глутаминовую кислоту. Кроме того, CA обозначает 4-имидазоацетил, а DA обозначает дезамино-гистидил.

Пример 10. Получение конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия.

В данном примере получали конъюгат длительного действия варианта нативного оксинтомодулина, типичного двойного агониста GLP-1/глюкагона.

Вначале, для пегилирования с помощью MAL-10K-ALD PEG аминокислотной последовательности двойного агониста GLP-1/глюкагона по остатку цистеина в положении 30 и (SEQ ID NO: 40: HAibQGTFTSDYSKYLD**E**KRA**K**EFVQWLMNTC, аминокислоты, показанные жирным шрифтом, означают формирование кольца, Aib означает 2-метилаланин), осуществляли реакцию между двойным агонистом GLP-1/глюкагона и MAL-10K-ALD (NOF, Япония) PEG в молярном соотношении от 1:1 до 1:3 при концентрации белка 3~5 мг/мл при комнатной температуре в течение приблизительно 3 часов. При этом реакцию осуществляли при условиях, когда к 50 мМ трис-буферу (pH 8,0) добавляли изопропанол. По окончании реакции реакционный раствор наносили на колонку SP HP (GE, США) и очищали монопегилированный по цистеину двойной агонист GLP-1/глюкагона. Способ очистки осуществляли с использованием буферного раствора цитрата натрия (pH 3,0), содержащего этанол и градиент концентрации хлорида калия.

Затем осуществляли реакцию между очищенным монопегилированным двойным агонистом GLP-1/глюкагона и Fc-фрагментом иммуноглобулина в молярном соотношении от 1:2 до 1:5 при концентрации белка приблизительно 20 мг/мл при 4~8°C в течение 12-16 ч. Реакцию осуществляли в условиях, когда в 100 мМ буферный раствор фосфата калия (pH 6,0) в качестве восстанавливающего реагента добавляли 20 мМ SCB (цианоборогидрид натрия). По окончании реакции, в качестве реакционного раствора, для первоначальной очистки конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона и Fc-фрагмента иммуноглобулина использовали SOURCE Q (GE, США). Очистку осуществляли с использованием 20 мМ бис-трис-буфера, pH 6,8 и градиента концентрации хлорида натрия. Затем проводили окончательную очистку конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона и Fc-фрагмента иммуноглобулина с помощью колонки Source ISO. Для очистки конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона и Fc-фрагмента иммуноглобулина использовали 20 мМ трис-буфер, pH 7,5, содержащий 1М сульфат аммония и градиент концентрации 20 мМ Трис-буфера, pH 7,5.

Пример 11. Оценка эффекта комбинированного введения конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина и конъюгата аналога инсулина с Fc иммуноглобулина.

Данный тест провели для определения динамики уровня глюкозы крови и изменения массы тела при комбинированном введении конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия и конъюгата аналога инсулина длительного действия, полученных в примерах 9 и 10. 42 крысам db/db (7-недельного возраста) дали акклиматизироваться в течение 2 недель при свободном доступе к корму и воде и затем животных поделили на 7 групп по 6 животных. В соответствии с вводимыми веществами, всего было 7 групп, включая группу, получавшую носитель, группу, получавшую только конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина (1,4 нмоль/кг), группу, получавшую только конъюгат аналога инсулина с Fc иммуноглобулина (8,8 и 17,6 нмоль/кг), группу, получавшую комбинацию конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия с Fc иммуноглобулина (2,2, 4,4 и 8,8 нмоль/кг). Все исследуемые вещества вводили подкожно дважды в сутки. Уровень глюкозы крови определяли с помощью глюкометра после 4-часового голодания случайным образом дважды в неделю, за исключением суток, когда осуществляли введение. Уровень глюкозы крови в каждой группе сравнивали с помощью графика AUC (площадь под кривой), показывающего изменение глюкозы натощак в течение 4 недель (фиг. 1) по сравнению с группой, получавшей носитель. В каждой группе сравни-

вали изменение массы после введения лекарственного средства на протяжении 4 недель относительно массы до введения (фиг. 2).

Как показано на фиг. 1, по сравнению с группами, получавшими введение конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина (1,4 нмоль/кг) или конъюгата аналога инсулина с Fc иммуноглобулина (8,8 нмоль/кг) в отдельности, в группе, получавшей комбинированное введение двух веществ в том же количестве (конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина (1,4 нмоль/кг) или конъюгата аналога инсулина с Fc иммуноглобулина (8,8 нмоль/кг)), наблюдали синергетический эффект. Кроме того, в группе, получавшей комбинированное введение, наблюдали эффект снижения уровня глюкозы крови, сходный с введением конъюгата аналога инсулина с Fc иммуноглобулина в более высокой дозе (17,6 нмоль/кг).

Применительно к изменению массы тела (фиг. 2), конъюгат аналога инсулина с Fc иммуноглобулина вызывал увеличение массы тела при повторяющемся введении на протяжении 4 недель, тогда как в группе, получавшей комбинированное введение, и в группе, которой вводили только конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина длительного действия, происходило снижение массы тела.

Кроме того, как показало сравнение группы, получавшей конъюгат аналога инсулина с Fc иммуноглобулина в отдельности, с группой, которая получала такое же количество аналога инсулина с Fc иммуноглобулина в комбинации с конъюгатом двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина, набор веса вследствие введения инсулина мог быть предотвращен посредством совместного введения с конъюгатом двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина. Кроме того, даже при сравнении группы, получавшей только конъюгат аналога инсулина с Fc иммуноглобулина (17,6 нмоль/кг), с группой, получавшей комбинированное лечение (конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона с Fc иммуноглобулина (1,4 нмоль/кг), конъюгат аналога инсулина с Fc иммуноглобулина (8,8 нмоль/кг)), можно отметить эффект снижения массы тела.

Данные результаты показывают, что комбинация, включающая как конъюгат инсулина длительного действия, так и конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия, обладает превосходной способностью контролировать уровень глюкозы крови и не имеет побочных эффектов в виде набора лишнего веса вследствие введения инсулина и обеспечивает лучший терапевтический эффект при сравнении с группами, получавшими стандартный инсулин и двойной агонист GLP-1/глюкагона, соответственно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая комбинация для лечения или предупреждения сахарного диабета, содержащая конъюгат инсулина длительного действия и конъюгат двойного агониста GLP-1(глюкагон-подобный пептид-1)/глюкагона длительного действия,

где конъюгат инсулина длительного действия представляет собой конъюгат, в котором инсулин связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидильного полимера;

где конъюгат двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия представляет собой конъюгат, в котором двойной агонист GLP-1/глюкагона связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидильного полимера,

где инсулин представляет собой аналог инсулина, в котором аминокислота в положении 14 A-цепи (SEQ ID NO: 37) инсулина заменена глутаминовой кислотой; и

где двойной агонист GLP-1/глюкагона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 40, 63 и 64, и одновременно активирует рецептор GLP-1 и рецептор глюкагона.

2. Комбинация по п.1, где комбинация дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

3. Комбинация по п.1, где двойной агонист рецепторов глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1)/глюкагона длительного действия имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, а аминокислоты в положениях 16 и 20 образуют кольцо.

4. Комбинация по п.1, в которой непептидильный полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биодеградируемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

5. Комбинация по п.1, в которой Fc-область иммуноглобулина является агликозилированной.

6. Комбинация по п.5, в которой Fc-область иммуноглобулина содержит от одного до четырех участков, выбранных из группы, состоящей из доменов CH1, CH2, CH3 и CH4; и где Fc-область иммуноглобулина дополнительно содержит шарнирный участок.

7. Комбинация по п.6, в которой Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область, имеющую происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM; и возможно где каждый из доменов Fc-области иммуноглобулина представляет собой гибрид доменов, имеющих разное происхождение, выбранное из

группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

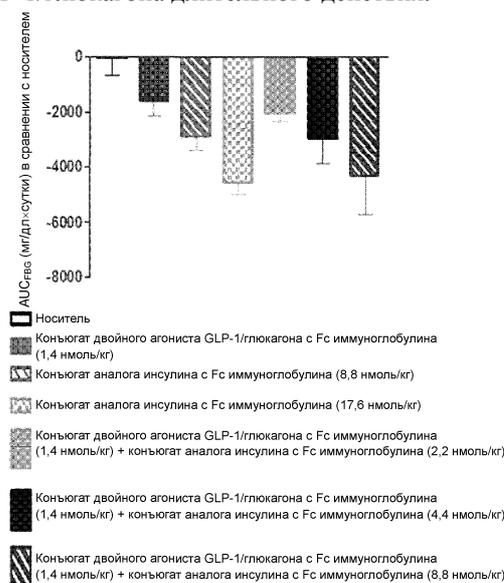
8. Комбинация по п.7, в которой Fc-область иммуноглобулина представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных полипептидов, состоящих из доменов, имеющих одинаковое происхождение.

9. Комбинация по п.3, где непептидный полимерный линкер представляет собой PEG (полиэтиленгликоль).

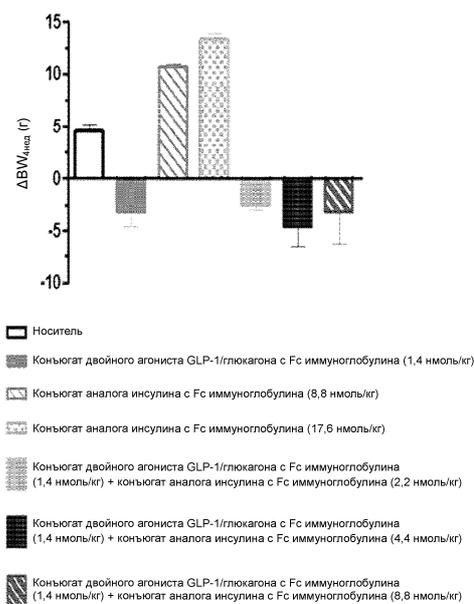
10. Способ предупреждения или лечения диабета, включающий введение комбинации по любому из пп.1-9 субъекту, подверженному высокому риску сахарного диабета или страдающему сахарным диабетом.

11. Способ по п.10, в котором стадию введения осуществляют путем комбинированного введения конъюгата инсулина длительного действия и конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия.

12. Способ по п.11, где комбинированное введение осуществляют путем одновременного последовательного введения или введения в обратном порядке конъюгата инсулина длительного действия и конъюгата двойного агониста GLP-1/глюкагона длительного действия.



Фиг. 1



Фиг. 2