

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040489**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.09

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
201691795

(22) Дата подачи заявки
2015.03.31

**(54) СПОСОБ УЛУЧШЕНИЯ РАСТВОРИМОСТИ БЕЛКА И ПЕПТИДА ЗА СЧЕТ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ С ФРАГМЕНТОМ Fc ИММУНОГЛОБУЛИНА**

(31) 10-2014-0038032

(56) WO-A2-2011064758
KR-A-1020050047032
KR-A-1020140037961
US-A1-20140005361
KR-A-1020120043207

(32) 2014.03.31

(33) KR

(43) 2017.03.31

(86) PCT/KR2015/003195

(87) WO 2015/152618 2015.10.08

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

(72) Изобретатель:
**Лим Хьюнг Кю, Ли Чжонг Соо, Ким
Дэ Джин, Бэ Сан Мин, Джун Сун Йуб,
Квон Се Чан (KR)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к способу улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, где способ предназначен для улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида в водном растворе, имеющем pH от 5,0 до 7,0, где способ включает конъюгирование физиологически активного белка или пептида с N-концевой аминной группой фрагмента Fc иммуноглобулина через непептидильный полимер и где физиологически активный белок или пептид представляет собой эксендин-4, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), инсулин, оксинтомодулин или их производное.

B1**040489****040489****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, не конъюгированного с фрагментом Fc иммуноглобулина, где способ включает стадию конъюгирования физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина.

Предшествующий уровень техники

Лекарственные средства проявляют фармакологические действия только в растворенном состоянии, и поэтому растворимость лекарственных средств тесно связана с эффективностью. Водорастворимые лекарственные средства легко получают в виде инъекционных препаратов, а при приеме в виде таблеток они растворяются в желудочно-кишечном тракте. Тем не менее, слаборастворимые в воде лекарственные средства при их приеме без солюбилизации находятся в желудочно-кишечном тракте в виде агрегатов, таких как пеллеты, а также не растворяются до отдельных молекул и с трудом абсорбируются. Кроме того, при применении слаборастворимых в воде лекарственных средств в виде инъекционных препаратов без солюбилизации происходит закупоривание кровеносных сосудов, что вызывает свертывание крови. Таким образом, слаборастворимые в воде лекарственные средства не могут применяться в качестве инъекционных препаратов. Растворимость лекарственного средства представляет основную проблему при приготовлении лекарственного препарата.

Один из известных способов солюбилизации лекарственного средства состоит в применении поверхностно-активного вещества (ПАВ) в качестве солюбилизатора. Поверхностно-активные вещества имеют как гидрофобные, так и гидрофильные группы в каждой молекуле. В воде происходит изолирование гидрофобных углеводородных цепей внутри молекулы, при этом гидрофильные группы обращены наружу в сторону воды с образованием сферических мицелл. Лекарственные средства можно растворять посредством инкапсуляции в мицеллах. Тем не менее, при использовании в данном способе поверхностно-активного вещества высокой концентрации лекарственные средства могут не подходить для внутривенного введения. Кроме того, разбавление микроэмульсий ниже критической концентрации мицелл поверхностно-активных веществ может вызывать осаждение лекарственного средства в мицеллах (Journal of Advanced Pharmacy Education & Research 2(1)32-67 (2012) ISSN 2249-3379). Соответственно существует потребность в способе постоянного повышения растворимости лекарственных средств независимо от концентрации препарата без применения поверхностно-активных веществ.

Краткое изложение сущности изобретения

На основании указанного уровня техники авторы настоящего изобретения приложили значительные усилия по разработке способа, способного улучшить растворимость лекарственного средства, такого как физиологически активный белок или пептид. В результате они обнаружили, что при конъюгации фрагмента Fc иммуноглобулина с физиологически активным белком или пептидом растворимость физиологически активного белка или пептида эффективно возрастает, что позволяет легко приготовить композицию, содержащую физиологически активный белок или пептид в фармацевтически эффективной концентрации, и посредством этого было выполнено настоящее изобретение.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, не конъюгированного с фрагментом Fc иммуноглобулина, где способ предназначен для улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида в водном растворе, имеющем pH от 5,0 до 7,0, где способ включает конъюгирование физиологически активного белка или пептида с N-концевой аминной группой фрагмента Fc иммуноглобулина через непептидильный полимер и где физиологически активный белок или пептид представляет собой эксендин-4, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), инсулин, оксинтомодулин или их производное.

В предпочтительном воплощении способа по изобретению фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой фрагмент Fc, имеющий происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, и, возможно, где фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой гибрид доменов, в котором каждый домен имеет разное происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, где фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов одного и того же происхождения, или где фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой негликозилированный фрагмент Fc IgG4 человека.

В еще одном предпочтительном воплощении способа по изобретению непептидильный полимер выбран из группы, состоящей из полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и поли(молочная кислота-гликолевая кислота) (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В еще одном предпочтительном воплощении способа по изобретению водный раствор содержит буферный раствор лимонной кислоты или уксусной кислоты, полисорбат в качестве неионного поверхностно-активного вещества, маннит в качестве сахарного спирта и хлорид натрия или метионин в качестве изотонического агента.

В еще одном предпочтительном воплощении способа по изобретению производное эксендина-4 представляет собой имидазоацетил-эксендин-4.

Полезные эффекты изобретения

При конъюгации физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина в соответствии с настоящим изобретением можно эффективно улучшить растворимость физиологически активного белка или пептида и, следовательно, он эффективен при приготовлении различных лекарственных препаратов.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показаны стандартные калибровочные кривые инсулина и конъюгата инсулина длительного действия.

На фиг. 2 показан результат исследования растворимости инсулина и конъюгата инсулина длительного действия в соответствии с композицией, приведенной в табл. 1, в которой инсулин демонстрирует растворимость 0,628 мг/мл, а конъюгат инсулина длительного действия демонстрирует растворимость 15 мг/мл в расчете на инсулин.

На фиг. 3 показаны стандартные калибровочные кривые производного окситомодулина SEQ ID NO: 27 и конъюгата производного окситомодулина-ПЭГ-фрагмент Fc иммуноглобулина.

На фиг. 4 показан результат исследования растворимости производного окситомодулина с SEQ ID NO: 27 и конъюгата производного окситомодулина-ПЭГ-фрагмент Fc иммуноглобулина в соответствии с композицией, представленной в табл. 4, в которой производное окситомодулина демонстрирует растворимость 0,188 мг/мл, а конъюгат демонстрирует растворимость 11 мг/мл в расчете на окситомодулин.

Лучший способ осуществления изобретения

В аспекте настоящего изобретения предложен способ улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, не конъюгированного с фрагментом Fc иммуноглобулина, включающий конъюгацию физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина.

В конкретном воплощении изобретения фрагмент Fc иммуноглобулина, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, представляет собой фрагмент Fc, производный от IgG, IgA, IgD, IgE или IgM.

В другом конкретном воплощении изобретения фрагмент Fc иммуноглобулина, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, представляет собой гибрид доменов, в котором каждый домен имеет разное происхождение от иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения фрагмент Fc иммуноглобулина, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов одного и того же происхождения.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения фрагмент Fc иммуноглобулина, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, представляет собой фрагмент Fc агликозильированного IgG4 человека.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения стадия конъюгирования в соответствии с настоящим изобретением включает связывание физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина через непептидильный полимер.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения физиологически активный белок или пептид, конъюгированный с фрагментом Fc иммуноглобулина, полученный способом согласно настоящему изобретению, находится в форме слитого белка.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения непептидильный полимер, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, представляет собой полиэтиленгликоль.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения непептидильный полимер, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, выбран из группы, состоящей из полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и поли(молочная кислота-гликолевая кислота) (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения способ согласно настоящему изобретению предназначен для улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида в водном растворе.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения водный раствор, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, содержит буферный раствор лимонной кислоты или уксусной кислоты, полисорбат в качестве неионного поверхностно-активного вещества, маннита в качестве сахарного спирта и хлорида натрия или метионина в качестве изотонического агента.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения водный раствор, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, имеет pH от 5,0 до 7,0.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения физиологически активный белок или

пептид в способе согласно настоящему изобретению представляет собой эксендин-4, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), паратиреоидный гормон (PTH), кальцитонин, инсулин или окситоцимодулин.

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения водный раствор, применяемый в способе согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

Способ осуществления изобретения

В настоящем изобретении предложен способ улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, не конъюгированного с фрагментом Fc иммуноглобулина, где способ включает конъюгирование физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина. Способ по настоящему изобретению демонстрирует эффект улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида даже без добавления поверхностно-активного вещества к растворителю. В случае физиологически активного белка или пептида, в частности инсулина, окситоцимодулина и т.д., который является компонентом известных белковых лекарственных средств, он проявляет низкую растворимость в диапазоне pH от 5 до 7, который представляет собой обычный диапазон pH препаратов для введения в организм. Соответственно существует затруднение в том, чтобы приготовить препараты физиологически активного белка или пептида в требуемой концентрации. Проблема также заключается в том, что его инъекционные препараты могут вызывать осаждение в организме, создающее непредусмотренные побочные эффекты. В настоящем изобретении неожиданно было подтверждено, что при конъюгировании физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина он проявляет повышенную растворимость в указанном выше диапазоне pH. То есть способ по настоящему изобретению обладает эффектом улучшения растворимости пептида или белка, такого как инсулин или окситоцимодулин, который проявляет низкую растворимость в слабокислом диапазоне pH от 5 до 7.

Как используют в настоящем описании, термин "растворимость" относится к степени, в которой физиологически активный белок или пептид растворяется в растворителе, пригодном для введения в организм человека. Более подробно, он относится к степени насыщения растворенного вещества в данном растворителе при определенной температуре. Растворимость можно измерить путем измерения концентрации растворенного вещества в точке насыщения. Например, концентрацию можно измерить с использованием УФ спектрофотометра или ВЭЖХ после добавления избыточного количества растворенного вещества к растворителю с последующим перемешиванием и фильтрованием раствора, но не ограничиваясь этим. Чтобы использовать физиологически активный белок или пептид для лечения, важно растворить его фармацевтически эффективное количество в растворителе, что является важным фактором, который следует учитывать при определении концентрации лиофилизированного препарата после разведения или концентрирования активного ингредиента жидкого препарата.

Было подтверждено, что при конъюгировании физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина его растворимость значительно возрастает по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, с которым не связан фрагмент. На основании этого настоящее изобретение отличается тем, что растворимость физиологически активного белка или пептида в водном растворе улучшается.

Согласно воплощению настоящего изобретения при использовании инсулина или окситоцимодулина в качестве репрезентативного физиологически активного пептида и его конъюгации с Fc растворимость инсулина и окситоцимодулина значительно возросла (фиг. 2 и 4).

При использовании в настоящем описании термин "водный раствор" относится к раствору, предназначенному для растворения физиологически активного белка или пептида. Водный раствор представляет собой раствор, подходящий для введения физиологически активного белка или пептида в организм человека. В конкретном воплощении настоящего изобретения водный раствор может иметь нейтральный или слабокислый pH, например pH от 5,0 до 7,0. Водный раствор, применяемый в способе по настоящему изобретению, не ограничен конкретным типом, но может включать буферный раствор лимонной кислоты или уксусной кислоты, содержащий полисорбат в качестве неионного поверхностно-активного вещества, маннит в качестве сахарного спирта и хлорид натрия или метионин в качестве изотонического агента.

В способе согласно настоящему изобретению фрагмент Fc иммуноглобулина может быть связан с физиологически активным белком или пептидом через непептидильный полимер. В частности, фрагмент Fc иммуноглобулина может быть связан с непептидильным полимером, который связан с физиологически активным белком или пептидом, или фрагмент Fc иммуноглобулина-непептидильный полимер может быть связан с физиологически активным белком или пептидом.

При использовании в настоящем документе термин "непептидильный полимер" относится к биосовместимому полимеру, включающему одно или более повторяющихся звеньев, связанных друг с другом ковалентной связью, за исключением пептидной связи.

Непептидильный полимер, который можно применять в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированных полиолов, поливинилового спирта, полисахаридов, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемых полимеров, таких как PLA (полимолочная кислота) и

PLGA (поли(молочная кислота-гликолевая кислота)), липидных полимеров, хитинов, гиалуроновой кислоты и их комбинаций, и предпочтительно полиэтиленгликоля, но не ограничиваясь этим. В объем настоящего изобретения также включены его производные, которые хорошо известны в данной области техники и могут быть легко получены специалистами в данной области техники.

Чтобы фрагмент Fc иммуноглобулина мог функционировать в качестве носителя, любой непептидильный полимер можно использовать без ограничения, если он представляет собой полимер, обладающий устойчивостью к протеолитическим ферментам *in vivo* и, следовательно, с трудом расщепляется протеолитическими ферментами. Непептидильный полимер имеет молекулярную массу в диапазоне от 1 до 100 кДа, и в частности от 1 до 20 кДа. Непептидильный полимер по настоящему изобретению, связанный с фрагментом Fc иммуноглобулина, также может представлять собой один полимер или комбинацию различных типов полимеров.

Непептидильный полимер может иметь активную группу, способную к связыванию с фрагментом Fc иммуноглобулина и с белковым или пептидным лекарственным средством, и, следовательно, функционирует в качестве линкера, связывая фрагмент Fc иммуноглобулина и белок или пептид.

Связывание физиологически активного белка или пептида с фрагментом Fc иммуноглобулина с использованием непептидильного полимера в качестве линкера можно осуществить путем проведения последовательно (1) взаимодействия непептидильного полимера с любым из физиологически активного белка или пептида и фрагмента Fc иммуноглобулина; и (2) взаимодействия продукта реакции стадии (1) с другим из физиологически активного белка или пептида и фрагмента Fc иммуноглобулина.

Тем не менее, если на стадии (1) фрагмент Fc иммуноглобулина связывают с непептидильным полимером, имеющим активную группу на обоих концах, часть продуктов стадии (1) может находиться в форме мостика, в котором два N-конца фрагмента Fc иммуноглобулина связаны с обоими концами непептидильного полимера при определенных условиях реакции. Продукты стадии (1) в форме мостика могут препятствовать вторичной реакции сочетания, связывающей с ними физиологически активный белок или пептид, или могут привести к значительному снижению выхода реакции сочетания. Следовательно, в одном воплощении изобретения для предотвращения образования мостика между фрагментом Fc иммуноглобулина и фрагментом Fc иммуноглобулина можно сначала подвергать взаимодействию непептидильный полимер и физиологически активный белок или пептид, а затем связанный с непептидильным полимером физиологически активный белок или пептид можно в последующем подвергать взаимодействию с фрагментом Fc иммуноглобулина. Тем не менее, нет необходимости осуществлять способ улучшения стабильности по настоящему изобретению в этом порядке.

На стадии (1) химическую реакцию для связывания непептидильного полимера с физиологически активным белком или пептидом или фрагментом Fc иммуноглобулина можно проводить известным способом. Например, непептидильный полимер, имеющий активную группу на обоих концах, можно подвергать взаимодействию с физиологически активным белком или пептидом либо с фрагментом Fc иммуноглобулина при температуре от 0 до 25°C в течение времени от 1 до 16 ч. В результате этой реакции физиологически активный белок или пептид либо фрагмент Fc иммуноглобулина может быть ковалентно связан с непептидильным полимером посредством одной активной группы.

Реакцию связывания физиологически активного белка или пептида с непептидильным полимером на стадии (1), можно проводить в реакционном растворе, содержащем органический растворитель. При этом органический растворитель может представлять собой любой органический растворитель, широко используемый в данной области техники, но не ограничиваясь этим, в частности первичный, вторичный или третичный спирт и спирт, имеющий от 1 до 10 атомов углерода. Более конкретно спирт может представлять собой изопропанол, этанол или метанол. Органический растворитель может быть свободно выбран из органических растворителей, подходящих к типу физиологически активного белка или пептида. Кроме того, органический растворитель можно использовать для образования связи между физиологически активным белком или пептидом и непептидильным полимером, но не ограничиваясь этим, в частности включают в количестве от 10 до 60%, более конкретно в количестве от 30 до 55% и еще более конкретно в количестве от 45 до 55% в расчете на общее количество реакционного раствора. Кроме того, pH реакционного раствора может составлять без ограничений, в частности, от 4,5 до 7,0 и более конкретно от 5,0 до 6,5.

Кроме того, в соответствии с типом активной группы, участвующей в реакции, восстанавливающий агент может быть дополнительно включен для проведения описанных выше стадий.

В частности, восстанавливающий агент согласно настоящему изобретению относится к любому восстанавливающему агенту, известному в данной области техники, функция которого состоит в восстановлении обратимой иминной двойной связи, образующейся в результате связывания между альдегидной группой непептидильного полимера и аминной группой полипептида (физиологически активного белка или пептида, фрагмента Fc иммуноглобулина) с образованием ковалентной связи. В зависимости от целей настоящего изобретения восстанавливающий агент может быть включен в реакционный раствор, чтобы дать возможность ковалентного связывания между непептидильным полимером и физиологически активным белком или пептидом или фрагментом Fc иммуноглобулина. Восстанавливающий агент по настоящему изобретению может представлять собой любой восстанавливающий агент, извест-

ный в данной области техники, но предпочтительно представляет собой без ограничений цианоборгидрид натрия, комплекс борана с пиридином, боргидрид натрия, комплекс борана с диметиламином, комплекс борана с триметиламином или триацетоксидборгидрид натрия. Адекватный восстанавливающий агент может быть выбран в зависимости от видов физиологически активного полипептида или константной области иммуноглобулина и реакционного растворителя.

Кроме того, для реакции связывания (реакции стадии (1)) между физиологически активным белком или пептидом и непептидильным полимером или фрагментом Fc иммуноглобулина и непептидильным полимером восстанавливающий агент может быть включен в конечной концентрации от 1 до 20 мМ, а для реакции сочетания (реакции стадии 2) в конечной концентрации от 1 до 100 мМ.

В то же время непептидильный полимер может иметь активную группу на обоих концах, где каждая активная группа способна к связыванию фрагмента Fc иммуноглобулина и физиологически активного белка или пептида, в частности каждая активная группа способна к связыванию с аминной группой N-конца или лизина либо с тиольной группой физиологически активного белка или пептида; либо фрагмента Fc иммуноглобулина. Активная группа на обоих концах, в частности, выбрана из группы, состоящей из активной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и производного сукцинимидов. При этом производное сукцинимидов может представлять собой сукцинимидилкарбоксиметил, сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид или сукцинимидилкарбонат, но не ограничиваясь этим. Можно использовать без ограничений любую активную группу, если она связывается с аминной группой или тиольной группой аминокислотного остатка фрагмента Fc иммуноглобулина и физиологически активного белка или пептида.

В частности, когда непептидильный полимер имеет активную альдегидную группу на обоих концах, эта группа эффективно связывается с физиологически активным белком или пептидом и иммуноглобулином на обоих концах с минимальными неспецифическими реакциями. Конечный продукт, образовавшийся в результате восстановительного алкилирования альдегидной связью, значительно стабильнее, чем полученный в результате связывания посредством амидной связи. Альдегидная активная группа избирательно связывается с N-концом при низком pH и может связываться с остатком лизина (Lys) с образованием ковалентной связи при высоком pH например, при pH 9,0.

Активные группы на обоих концах линкера, такого как непептидильный полимер, могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Например, линкер может иметь малеимидную группу на одном конце и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце. Когда полиэтиленгликоль, имеющий активную гидроксильную группу на обоих его концах, используется в качестве непептидильного полимера, эту гидроксильную группу можно активировать до различных активных групп с помощью известных химических реакций, либо для получения белкового конъюгата длительного действия по настоящему изобретению можно использовать имеющийся в продаже полиэтиленгликоль, имеющий модифицированную активную группу.

Кроме того, активные группы непептидильного полимера могут без связываться с N-концевой аминной группой или аминной группой боковой цепи остатка лизина физиологически активного белка или пептида и фрагмента Fc иммуноглобулина соответственно, но конкретно не ограничиваясь этим. При этом остаток лизина на физиологически активном белке или пептиде и фрагменте Fc иммуноглобулина не ограничен конкретным положением, и неограничивающие примеры остатка лизина также включают неприродные аминокислоты и производные Lys, если они имеют аминную группу, способную к связыванию с непептидильным полимером, как и природный лизин.

В то же время, когда физиологически активный белок или пептид сначала подвергают взаимодействию с непептидильным полимером на стадии (1), физиологически активный белок или пептид и непептидильный полимер подвергают взаимодействию в молярном соотношении от 1:1 до 1:20, и на стадии (2) конъюгат физиологически активного белка или пептида и непептидильного полимера, представляющий собой продукт стадии (1), подвергают взаимодействию с фрагментом Fc иммуноглобулина в молярном соотношении, составляющем от 1:0,5 до 1:10, но не ограничиваясь этим.

Кроме того, способ по настоящему изобретению может включать процесс выделения и очистки конъюгата физиологически активного полипептида с непептидильным полимером или конъюгата фрагмента Fc иммуноглобулина с непептидильным полимером, представляющего собой продукт стадии (1), перед стадией (2) после стадии (1). Этот процесс можно выполнять с использованием различных методов разделения, известных в данной области техники, таких как хроматография.

На стадии (2), когда конъюгат физиологически активного полипептида с непептидильным полимером подвергают взаимодействию с фрагментом Fc иммуноглобулина, условия pH представляют собой без конкретных ограничений pH от 4,0 до 9,0.

В то же время, физиологически активный белок или пептид и фрагмент Fc иммуноглобулина можно конъюгировать друг с другом в форме слитого белка.

При использовании в настоящем документе термин "слитый белок" относится к белку, созданному посредством соединения двух или более генов, которые исходно кодируют отдельные белки. Слитый белок может быть получен искусственным путем с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Кроме

того, слитый белок может иметь форму, в которой физиологически активный белок или пептид и фрагмент Fc иммуноглобулина связаны друг с другом без линкера или через пептидильный линкер.

В данном случае пептидильный линкер относится к пептиду, связывающему белки двух видов, составляющих слитый белок. Пептидильный линкер можно включать с целью независимой укладки двух белков, составляющих слитый белок, или сохранения функции каждого из двух белков даже в форме слитого белка, но не ограничиваясь этим.

При использовании в настоящем документе термин "фрагмент Fc иммуноглобулина" относится к константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области 3 тяжелой цепи (CH3) иммуноглобулина за исключением переменных областей тяжелой и легкой цепей, к константной области 1 тяжелой цепи (CH1) и константной области 1 легкой цепи (CL1) иммуноглобулина, и может включать шарнирную область около константной области тяжелой цепи. Кроме того, фрагмент Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой удлиненный фрагмент Fc иммуноглобулина, включающий частично или полностью константную область 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константную область 1 легкой цепи (CL1) за исключением переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, если он обладает действием, по существу подобным или лучшим, чем нативный белок. Он также может представлять собой область, имеющую делецию в относительно длинном участке аминокислотной последовательности CH2 и/или CH3. Таким образом, фрагмент Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать (1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 и домен CH4, (2) домен CH1 и домен CH2, (3) домен CH1 и домен CH3, (4) домен CH2 и домен CH3, (5) комбинацию одного или более доменов константной области и шарнирной области иммуноглобулина (или участок шарнирной области) и (6) димер каждого домена константных областей тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

В отношении целей настоящего изобретения фрагмент Fc иммуноглобулина относится к веществу, обладающему действием повышения растворимости связанного с ним лекарственного средства, то есть физиологически активного белка или пептида, и может также относиться к носителю лекарственного средства.

При использовании в настоящем документе термин "носитель" относится к веществу, которое связывается вместе с лекарственным средством. Как правило, в результате связывания носителя с лекарственным средством физиологическая активность лекарственного средства возрастает или исчезает. Однако в отношении цели настоящего изобретения носитель по настоящему изобретению относится к веществу, которое сводит к минимуму снижение физиологической активности лекарственного средства и повышает стабильность лекарственного средства *in vivo* и продолжительность эффективности за счет задержки доставки лекарственного средства из области введения в кровь после подкожного введения, а также одновременно улучшает растворимость белка или пептида. В качестве носителей лекарственных средств исследованы различные вещества, такие как липиды, полимеры и т.д., но в настоящем изобретении в качестве носителя предложен фрагмент Fc иммуноглобулина для улучшения продолжительности действия *in vivo* лекарственного средства, с которым связан этот носитель, сведения к минимуму снижения активности *in vivo*, а также максимального увеличения растворимости. Кроме того, фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой биоразлагаемый полипептид, который может претерпевать метаболизм *in vivo* так, что его можно безопасно применять в качестве носителя лекарственного средства. Благодаря его характеристикам конъюгата, в котором фрагмент Fc иммуноглобулина связан с физиологически активным белком или пептидом, может быть разработан в качестве конъюгата длительного действия по настоящему изобретению.

Кроме того, фрагмент Fc иммуноглобулина, используемый для улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида в настоящем изобретении, может быть связан с физиологически активным белком или пептидом через линкер или непосредственно. В этом отношении сайт физиологически активного белка или пептида, с которым связывают фрагмент Fc иммуноглобулина, конкретно не ограничен, и возможно использование любого сайта внутри белка или пептида либо его N-конца или C-конца. Тем не менее, чтобы было возможно проявление физиологической активности конъюгата физиологически активного белка или пептида и фрагмента Fc иммуноглобулина, полученного способом по настоящему изобретению, при введении в организм человека предпочтительно выбирают без ограниченный сайт, не ингибирующий физиологическую активность, в зависимости от типа применяемого физиологически активного белка или пептида.

Кроме того, благодаря его относительно низкой молекулярной массе фрагмент Fc иммуноглобулина обладает большими преимуществами в отношении получения, очистки и выхода конъюгата по сравнению с полноразмерной молекулой иммуноглобулина. Кроме того, поскольку этот фрагмент не содержит Fab, проявляющий высокую неоднородность из-за различий в аминокислотной последовательности между различными антителами, ожидается значительное повышение однородности и уменьшение возможности индукции иммуногенности в крови.

Кроме того, фрагмент Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению включает не только нативную аминокислотную последовательность, но также производные его последовательности. Производное аминокислотной последовательности означает наличие одного или более аминокислотных остатков, отличающегося от аминокислотной последовательности дикого типа, и может встречаться в природе или

быть созданным искусственно. Фрагмент Fc иммуноглобулина включает производные в результате делеции, инсерции, консервативной или неконсервативной замены или их комбинации. Инсерцию, как правило, получают путем добавления аминокислотной последовательности из последовательных аминокислот в количестве примерно от 1 до 20 аминокислот или получают из более длинной последовательности. Делеция, как правило, находится в диапазоне примерно от 1 до 30 аминокислотных остатков. Методы получения производных последовательности фрагмента Fc иммуноглобулина описаны в Международных публикациях патентных заявок № WO 97/34631 и WO 96/32478, включенных в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные замены в белках и пептидах, которые по существу не изменяют активность молекул, известны в данной области техники (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются замены 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 фрагмент Fc иммуноглобулина может быть модифицирован путем фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и тому подобного.

Описанное выше производное иммуноглобулина Fc может представлять собой производное, которое обладает биологической активностью, эквивалентной активности фрагмента Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению, но обладает повышенной структурной стабильностью фрагмента Fc иммуноглобулина по отношению к нагреванию, pH и т.д.

Кроме того, фрагмент Fc иммуноглобулина может быть получен из нативного типа, изолированного у людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и т.д., или могут представлять собой их рекомбинанты или производные, полученные из трансформированных клеток животных или микроорганизмов. В данном случае они могут быть получены из нативного иммуноглобулина путем изолирования полноразмерных иммуноглобулинов из организма человека или животных и их обработки протеолитическим ферментом. Папаин расщепляет нативный иммуноглобулин на области Fab и Fc, а в результате обработки пепсином получают фрагменты pFc и F(ab)₂. Эти фрагменты можно подвергать, например, эксклюзионной хроматографии, чтобы выделить Fc или pFc. В частности, фрагмент Fc иммуноглобулина согласно настоящему изобретению может представлять собой рекомбинантный фрагмент Fc иммуноглобулина человеческого происхождения, полученный из микроорганизма.

Кроме того, область Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может иметь форму, обладающую нативными сахарными цепями, удлиненными сахарными цепями по сравнению с нативной формой или укороченными сахарными цепями по сравнению с нативной формой, либо может иметь негликозилированную форму. Повышенное или сокращенное гликозилирование или дегликозилирование иммуноглобулина Fc может быть достигнуто стандартными методами, например при использовании химического метода, ферментативного метода или генно-инженерного метода с использованием микроорганизмов. В данном случае при дегликозилировании связывание комплемента (C1q) с фрагментом Fc иммуноглобулина становится значительно сниженным, и антителозависимая цитотоксичность или комплементзависимая цитотоксичность уменьшается или устраняется, в результате чего не происходит индукции непредусмотренных иммунных ответов *in vivo*. В связи с этим дегликозилированные или негликозилированные фрагменты Fc иммуноглобулина в большей степени соответствуют цели использования в качестве носителей лекарственного средства.

При использовании в настоящем документе термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных группировок из фрагмента Fc иммуноглобулина, а термин "негликозилированный" означает, что фрагмент Fc иммуноглобулина продуцируется в негликозилированной форме прокарриотами, в частности *E.coli*.

В то же время фрагмент Fc иммуноглобулина может иметь происхождение от людей или других животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, и предпочтительно людей. Кроме того, фрагмент Fc иммуноглобулина может представлять собой фрагмент Fc, имеющий происхождение от IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, либо полученный посредством их комбинаций или комбинаций их гибридов. В частности, он имеет происхождение из IgG или IgM, которые находятся среди наиболее распространенных белков в крови человека, и наиболее конкретно из IgG, для которого известно увеличение периодов полувыведения лиганд-связывающих белков.

В то же время при использовании в настоящем документе термин "комбинация" означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные фрагменты Fc иммуноглобулина одного происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Таким образом, димер или мультимер может быть образован из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из фрагментов Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD и Fc IgE.

Термин "гибрид" при использовании в настоящем документе означает, что на одноцепочечном фрагменте Fc иммуноглобулина присутствуют последовательности, кодирующие два или более фрагментов Fc иммуноглобулина разного происхождения. В настоящем изобретении возможны разные типы гибридов. Так доменные гибриды могут состоять из доменов в количестве от одного до четырех, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE и Fc IgD, и могут включать шарнирную область.

В то же время IgG делится на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и настоящее изобретение включает их комбинации и гибриды. Предпочтительны подклассы IgG2 и IgG4, и наиболее предпочтителен фрагмент Fc IgG4, редко обладающим эффекторными функциями, такими как комплементзависимая цитотоксичность (CDC).

Фрагмент Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может иметь рекомбинантную форму, в которой шарнирная область связана с его N-концом. В данном случае фрагменты Fc иммуноглобулина, экспрессируемые в виде агрегатов, не вызывают потерю активности. Эти фрагменты также представляют собой фрагменты Fc в форме активного димера или мономера, не имеющих иницирующего остатка метионина, кодируемого кодоном инициации, и, следовательно, обладают преимуществами при солибилизации и рефолдинге.

Соответствующий фрагмент Fc иммуноглобулина в настоящем изобретении подробно описан в патентах Кореи № 755315, 775343 и 824505, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Таким образом, наиболее предпочтительный фрагмент Fc иммуноглобулина, используемый в качестве носителя лекарственного средства для слитого белка с инсулином и оксинтомодулином согласно настоящему изобретению, представляет собой негликозилированную область Fc, имеющую происхождение из IgG4 человека. Фрагмент Fc человека предпочтительнее, чем фрагмент Fc происхождения, отличающегося от человеческого, который может действовать в организме человека как антиген и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как выработка нового антитела против этого антигена.

При использовании в настоящем документе термин "физиологически активный белок или пептид" относится к белку или пептиду, регулирующему экспрессию гена или физиологические функции. В отношении целей настоящего изобретения может быть включен любой физиологически активный белок или пептид без ограничения при условии увеличения его растворимости.

В то же время аминокислоты, упоминаемые в настоящем документе, сокращаются согласно правилам номенклатуры ИЮПАК - Международного биохимического союза (IUB, International Union of Biochemistry) следующим образом:

Аланин: Ala или A	Аргинин: Arg или R
Аспарагин: Asn или N	Аспарагиновая кислота: Asp или D
Цистеин: Cys или C	Глутаминовая кислота: Glu или E
Глутамин: Gln или Q	Глицин: Gly или G
Гистидин: His или H	Изолейцин: Ile или I
Лейцин: Leu или L	Лизин: Lys или K
Метионин: Met или M	Фенилаланин: Phe или F
Пролин: Pro или P	Серин: Ser или S
Треонин: Thr или T	Триптофан: Trp или W
Тирозин: Tyr или Y	Валин: Val или V

Кроме того, на протяжении всего настоящего описания для аминокислот могут использоваться одно- и трехбуквенные коды.

Кроме того, в концепцию физиологически активного белка или пептида в дополнение к нативному физиологически активному белку или пептиду входят все его производные, варианты и фрагменты.

При использовании в настоящем документе термин "производное" относится к пептиду, имеющему химическую замену (например, альфа-метилование, альфа-гидроксилирование), делецию (например, деаминарование) или модификацию (например, N-метилование) некоторых групп аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности нативного физиологически активного белка или пептида. Производное может включать пептидомиметик, сохраняющий активность нативного физиологически активного пептида, но не имеющий гомологии последовательности с нативным физиологически активным пептидом.

При использовании в настоящем документе термин "пептидомиметик" относится к белковоподобной цепи, предназначенной для имитации пептида. В качестве примера пептидомиметика можно привести D-пептидомиметик, содержащий D-аминокислоту, но не ограничиваясь этим. Пептидомиметик можно легко получить, используя технологию получения пептидомиметиков, известную в данной области техники.

При использовании в настоящем документе термин "вариант" относится к белку или пептиду, имеющему одну или более аминокислотных последовательностей, отличающихся от последовательностей нативного белка или пептида, и относится к пептиду, сохраняющему активность нативного белка. Вариант может быть получен путем любого из замены, добавления, делеции и модификации или их комбинации в части аминокислотных последовательностей нативного белка или пептида. В данном случае добавленные аминокислоты могут представлять собой не природные аминокислоты (например, аминокис-

лоты D-типа).

При использовании в настоящем документе термин "фрагмент" относится к фрагменту, в котором делетирована одна или более аминокислот с N-конца или C-конца нативного белка или пептида, и предпочтительно к фрагменту, обладающему активностью нативного белка.

Физиологически активный белок или пептид может быть получен любым способом, иметь природное или рекомбинантное происхождение и может представлять собой, например, рекомбинантный белок, полученный с использованием прокариотической клетки, такой как *E.coli*, в качестве клетки хозяина, но не ограничиваясь этим.

В то же время физиологически активный белок или пептид может представлять собой без ограничений окситомодулин, эксендин-4, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), GLP-2, инсулинотропные пептиды, такие как глюкозозависимый инсулинотропный пептид (GIP), инсулин, глюкагон, паратиреоидный гормон (PTH) или кальцитонин. Как описано выше, в концепцию физиологически активного белка или пептида в дополнение к нативному физиологически активному белку или пептиду входят все его производные, варианты и фрагменты.

При использовании в настоящем документе термин "инсулин" относится к пептиду, секретируемому поджелудочной железой в ответ на повышенные уровни глюкозы в крови для захвата глюкозы в печени, мышечной ткани или жировой ткани и преобразования ее в гликоген и прекращения использования жира в качестве источника энергии и, таким образом, он контролирует уровень глюкозы в крови. Этот пептид включает нативный инсулин, базальный инсулин, агонисты инсулина, его предшественники, производные, фрагменты и варианты.

При использовании в настоящем документе термин "нативный инсулин" относится к гормону, секретируемому поджелудочной железой, который стимулирует поглощение глюкозы и ингибирует распад жира, и, таким образом, его функция состоит в контроле уровня глюкозы в крови. Инсулин образуется посредством процессинга из предшественника, не обладающего функцией регуляции уровня глюкозы в крови, известного как проинсулин. Ниже приведены аминокислотные последовательности инсулина.

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: 1)

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: 2)

При использовании в настоящем документе термин "базальный инсулин" относится к пептиду, который управляет нормальным суточным уровнем глюкозы, например к инсулину левемир, лантус, деглудек и т.д.

При использовании в настоящем документе термин "агонист инсулина" относится к соединению, которое связывается с рецептором инсулина, в результате чего проявляет биологическую активность, равную активности инсулина, которая не связана со структурой инсулина.

Термин "вариант инсулина" относится к пептиду, имеющему одну или более аминокислотных последовательностей, отличающихся от последовательностей нативного инсулина, и сохраняющему функцию, контролирующую уровень глюкозы в крови в организме.

Термин "производное инсулина" относится к пептиду, имеющему гомологию аминокислотной последовательности с нативным инсулином по меньшей мере 80%, который может иметь на аминокислотном остатке несколько групп, химически замещенных, делетированных или модифицированных, или обладающему функцией регуляции уровня глюкозы в крови в организме. Термин "фрагмент инсулина" относится к фрагменту, в котором одна или более аминокислот делетирована с N-конца или C-конца инсулина и который обладает функцией регуляции уровня глюкозы в крови в организме.

Каждый из способов получения агонистов, производных, фрагментов и вариантов инсулина можно использовать по отдельности или в комбинации. Например, настоящее изобретение включает пептид, в котором одна или более аминокислот отличается от аминокислот нативного пептида, а N-концевой аминокислотный остаток деаминирован, и который обладает функцией регуляции уровня глюкозы в крови в организме. Инсулин, применяемый в настоящем изобретении, можно получить с помощью рекомбинантной технологии, а также синтезировать с использованием метода твердофазного синтеза.

Кроме того, инсулин, используемый в настоящем изобретении, может быть связан с непептидным полимером. Этот непептидный полимер можно использовать в качестве линкера в настоящем изобретении. Непептидный полимер используют в качестве линкера для связывания фрагмента Fc иммуноглобулина, в результате чего сохраняется активность инсулина и улучшается растворимость, а также улучшается стабильность. Применение пептидного линкера возможно с использованием технологии генетической рекомбинации.

Кроме того, настоящее изобретение отличается тем, что физиологически активный белок или пептид конъюгирован с фрагментом Fc иммуноглобулина, в результате чего улучшается стабильность белка или пептида. Конкретное ограничение в отношении сайта связывания отсутствует. Однако модификация

цепи А инсулина может привести к снижению активности и стабильности и, следовательно, фрагмент Fc иммуноглобулина можно связывать с цепью В через линкер или без линкера. В частности, фрагмент Fc иммуноглобулина может быть связан с N-концом цепи В инсулина без конкретных ограничений через непептидильный линкер или без непептидильного линкера.

При использовании в настоящем документе термин "оксинтомодулин" относится к пептиду, имеющему происхождение от предшественника глюкагона преглюкагона, и включает нативный оксинтомодулин, его предшественники, производные, фрагменты и варианты.

В частности, оксинтомодулин имеет аминокислотную последовательность

HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNIA (SEQ ID NO: 3).

Производное оксинтомодулина включает пептиды, производные пептидов или пептидомиметики, полученные путем добавления, делеции и замены части аминокислот последовательности оксинтомодулина, в результате чего происходит активация обоих рецепторов, рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона в большей степени по сравнению с нативным оксинтомодулином. В настоящем изобретении производное оксинтомодулина может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4-36.

Кроме того, фрагмент оксинтомодулина сохраняет функцию, контролирующую уровень глюкозы в крови в организме.

Кроме того, вариант оксинтомодулина представляет собой пептид, имеющий один или более аминокислотных остатков, отличающихся от остатков аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина, и обладающий функцией активации рецепторов GLP-1 и глюкагона. Способы получения варианта, производного и фрагмента можно использовать по отдельности или в комбинации. Например, настоящее изобретение включает пептид, в котором одна или более аминокислот отличается от аминокислот нативного пептида, а N-концевые аминокислотные остатки деаминированы, и который обладает функцией активации обоих рецепторов, рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона.

В настоящем изобретении производное оксинтомодулина включает любой пептид, который получен путем замен, добавлений, делеций или посттрансляционных модификаций (например, метилирования, ацилирования, убиквитинирования, внутримолекулярного ковалентного связывания) в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, в результате чего рецепторы глюкагона и GLP-1 активируются одновременно. При замене или добавлении аминокислот можно использовать любые из 20 аминокислот, чаще всего обнаруживаемых в белках человека, а также атипичных или не встречающихся в природе аминокислот. Коммерческие источники атипичных аминокислот включают компании Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, включающие эти аминокислоты, и атипичные пептидные последовательности могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например, у компаний American Peptide Company (США), Bachem (США) или Anygen (Корея).

В конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность следующей формулы 1:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-

X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (Формула 1),

где R1 представляет собой гистидин, дезамино-гистидил, диметил-гистидил (N-диметил-гистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидзаоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин;

X1 представляет собой AIB (аминоизомасляную кислоту), D-аланин, глицин, Sar (N-метилглицин), серин или D-серин;

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту, серин, альфа-метил-глутаминовую кислоту или делетирован;

X10 представляет собой глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин или делетирован;

X11 представляет собой аланин, аргинин, валин или делетирован;

X12 представляет собой аланин, аргинин, серин, валин или делетирован;

X13 представляет собой лизин, глутамин, аргинин, альфа-метил-глутаминовую кислоту или делетирован;

X14 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лейцин или делетирован;

X15 представляет собой фенилаланин или делетирован;

X16 представляет собой изолейцин, валин или делетирован;

X17 представляет собой аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин, альфа-метил-глутаминовую кислоту или делетирован;

X18 представляет собой триптофан или делетирован;

X19 представляет собой аланин, изолейцин, лейцин, серин, валин или делетирован;

X20 представляет собой аланин, лизин, метионин, глутамин, аргинин или делетирован;

X21 представляет собой аспарагин или делетирован;

X22 представляет собой аланин, глицин, треонин или делетирован;

X23 представляет собой цистеин, лизин или делетирован;

X24 представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящих из комбинаций аланина, глицина и серина, или делетирован; и

R2 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 38), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 39), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 40), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 41), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 42) или делетирован (за исключением случая, если аминокислотная последовательность формулы 1 идентична последовательности SEQ ID NO: 3).

С целью усиления активности оксинтомодулина дикого типа для рецептора глюкагона и рецептора GLP-1 производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может быть замещено 4-имидазоацетиллом, где альфа-атом углерода гистидина в положении 1 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3, делетирован, дезамино-гистидилом, где N-концевая аминокислотная группа делетирована, диметил-гистидилом (N-диметил-гистидилом), где N-концевая аминокислотная группа модифицирована двумя метальными группами, бета-гидроксиимидазопропионилом, где N-концевая аминокислотная группа замещена гидроксильной группой или бета-карбоксиимидазопропионилом, где N-концевая аминокислотная группа замещена карбоксильной группой. Кроме того, область, связывающая рецептор GLP-1, может быть замещена аминокислотами, которые усиливают гидрофобные и ионные связи, или их комбинациями. Часть последовательности оксинтомодулина может быть заменена аминокислотной последовательностью GLP-1 или эксендина-4, за счет чего усиливает его активность по отношению к рецептору GLP-1.

Кроме того, часть последовательности оксинтомодулина может быть заменена последовательностью, стабилизирующей альфа-спираль. Например, аминокислоты в положениях 10, 14, 16, 20, 24 и 28 аминокислотной последовательности формулы 1 могут быть заменены аминокислотами, состоящими из Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO₂), Phe(4-NH₂), Phg, Pal, Nal, Ala(2-тиенил) и Ala(бензотиенил), которые известны как стабилизирующие альфа-спираль, или производными аминокислот.

В данном случае Tyr(4-Me) представляет собой производное тирозина, в котором атом водорода или гидроксильная группа тирозина замещены метильной группой; Phe(4-Me) представляет собой производное фенилаланина, в котором пара-положение фенилаланина замещено метильной группой; Phe(4-Cl) представляет собой производное фенилаланина, в котором пара-положение фенильной группы замещено хлоридом; Phe(4-CN) представляет собой производное фенилаланина, в котором пара-положение фенильной группы замещено цианидной группой; Phe(4-NO₂) представляет собой производное фенилаланина, в котором пара-положение фенильной группы замещено нитрогруппой; и Phe(4-NH₂) представляет собой производное фенилаланина, в котором пара-положение фенильной группы замещено аминной группой.

Кроме того, Phg представляет собой фенилглицин; Pal представляет собой производное аланина, в котором бета-метильная группа аланина замещена пиридинильной группой; Nal представляет собой производное аланина, в котором бета-метильная группа аланина замещена нафтильной группой; Ala(2-тиенил) представляет собой производное аланина, в котором бета-метильная группа аланина замещена 2-тиенильной группой, и Ala(бензотиенил) представляет собой производное аланина, в котором бета-метильная группа аланина замещена бензотиенильной группой.

Ограничений типа и числа встраиваемых аминокислот или производных аминокислот, стабилизирующих альфа-спираль, нет. В конкретном воплощении между аминокислотными остатками могут образоваться внутримолекулярные кольца. Например, внутримолекулярные кольца могут образоваться в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 и 24 и 28, и в данном случае соответствующие положения могут быть замещены парой, состоящей из глутаминовой кислоты и лизина. Конкретного ограничения на число внутримолекулярных колец, образующихся в производном оксинтомодулина, растворимость которого может быть улучшена способом по настоящему изобретению, нет.

В одном воплощении изобретения оксинтомодулин, растворимость которого улучшают способом по настоящему изобретению, или его производное может представлять собой производное оксинтомодулина, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из следующих формул 2-6. В конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой пептид, имеющий аминокислотную последовательность следующей формулы 2, в котором аминокислотная последовательность оксинтомодулина замещена последовательностью эксендина или GLP-1:

R1-A'-R3 (формула 2)

В другом конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой пептид, имеющий аминокислотную последовательность следующей фор-

мулы 3, в котором часть аминокислотной последовательности оксинтомодулина связана с последовательностью эксендина или GLP-1 с использованием соответствующего аминокислотного линкера:

R1-B'-C'-R4 (формула 3)

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой пептид, в котором часть аминокислотной последовательности оксинтомодулина замещена аминокислотами, способными к усилению связывающего сродства к рецептору GLP-1. Например, Leu в положении 26, который связывается с рецептором GLP-1 посредством гидрофобного взаимодействия, замещен гидрофобным остатком Ile или Val, в результате чего усиливается связывающее сродство к рецептору GLP-1. Более конкретно следующая формула 4 представляет собой пептид, включающий пептиды оксинтомодулина, обладающие улучшенным связывающим сродством к рецептору (D6 замещенный):

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (формула 4)

Еще в одном другом конкретном воплощении изобретения производное оксинтомодулина по настоящему изобретению представляет собой пептид, включающий следующую формулу 5, в котором часть аминокислотной последовательности делетирована, добавлена или замещена другой аминокислотой с целью усиления активностей нативного оксинтомодулина по отношению к рецептору GLP-1 и рецептору глюкагона:

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-Fv-E6-WLMNT-E7-R5 (формула 5)

В формулах 2-5 R1 является таким же, как в описании формулы 1.

A' выбран из группы, состоящей из

SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 43),
SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 44),
SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 45),
GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 46),
GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 47),
GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 48) и
SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 49);

B' выбран из группы, состоящей из

SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 43),
SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 44),
SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 45),
GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 46),
GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 47),
GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 48),
SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 49),
GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO: 50) и SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO: 51);

C представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящий из комбинаций аланина, глицина и серина;

D1 представляет собой серин, глутаминовую кислоту или аргинин;

D2 представляет собой аргинин, глутаминовую кислоту или серин;

D3 представляет собой аргинин, аланин или валин;

D4 представляет собой аргинин, валин или серин;

D5 представляет собой глутамин, аргинин или лизин;

D6 представляет собой изолейцин, валин или серин;

D7 представляет собой метионин, аргинин или глутамин;

D8 представляет собой треонин, глицин или аланин;

E1 представляет собой серин, AIB, Sar, D-аланин или D-серин;

E2 представляет собой серин или глутаминовую кислоту;

E3 представляет собой аргинин или лизин;

E4 представляет собой глутамин или лизин;

E5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

E6 представляет собой глутамин, цистеин или лизин;

E7 представляет собой цистеин, лизин, или делетирован;

R3 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 38) или GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 39);

R4 представляет собой HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 40), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 41) или HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 42); и

R5 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 38), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 39) или делетирован (за исключением случаев, когда аминокислотные последовательности формул 2-5 идентичны SEQ ID NO: 3).

В частности, производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может представлять собой

пептид следующей формулы 6:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-

X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (формула 6),

где R1 представляет собой гистидин, дезамино-гистидил, 4-имидазоацетил или тирозин;

X1 представляет собой AIB (аминоизомасляную кислоту), глицин, серин или D-серин;

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту, альфа-метил-глутаминовую кислоту или делетирован;

X10 представляет собой глутамин, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, или делетирован;

X11 представляет собой аланин, аргинин или делетирован;

X12 представляет собой аланин, валин или делетирован;

X13 представляет собой лизин, глутамин, аргинин, альфа-метил-глутаминовую кислоту или делетирован;

X14 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лейцин или делетирован;

X15 представляет собой фенилаланин или делетирован;

X16 представляет собой изолейцин, валин или делетирован;

X17 представляет собой аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин, альфа-метил-глутаминовую кислоту или делетирован;

X18 представляет собой триптофан или делетирован;

X19 представляет собой аланин, изолейцин, лейцин, валин или делетирован;

X20 представляет собой аланин, лизин, метионин, аргинин или делетирован;

X21 представляет собой аспарагин или делетирован;

X22 представляет собой треонин или делетирован;

X23 представляет собой цистеин, лизин или делетирован;

X24 представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящих из глицина, или делетирован; и

R2 представляет собой KRNRRNIA (SEQ ID NO: 37), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 38), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 39), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 40), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 41), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 42) или делетирован (за исключением случая, если аминокислотная последовательность формулы 6 идентична последовательности SEQ ID NO: 3).

Более конкретно производное оксинтомодулина по настоящему изобретению может быть выбрано из группы, состоящей из пептидов с SEQ ID NO: 4-36.

Оксинтомодулин обладает активностями двух пептидов, GLP-1 и глюкагона. GLP-1 снижает уровень глюкозы в крови, уменьшает потребление пищи и подавляет опорожнение желудка, тогда как глюкагон увеличивает уровень глюкозы в крови, облегчает липолиз и снижает массу тела за счет повышения энергетического метаболизма. Если эти два пептида, обладающие разными биологическими эффектами, присутствуют в одном пептиде, и один из этих пептидов проявляет более доминирующий эффект по сравнению с другим, то могут возникнуть нежелательные эффекты. Если глюкагон демонстрирует более доминирующий эффект по сравнению с GLP-1, уровень глюкозы в крови может повышаться. Если GLP-1 демонстрирует более доминирующий эффект по сравнению с глюкагоном, это может вызвать побочные эффекты, такие как тошнота и рвота. Общая эффективность может различаться в зависимости от отношения активности двух пептидов.

При использовании в настоящем документе термин "инсулинотропный пептид" относится к пептиду, обладающему инсулинотропной функцией, и инсулинотропный пептид стимулирует синтез и экспрессию инсулина в бета-клетке поджелудочной железы. Пример инсулинотропного пептида может представлять собой глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), эксендин-3, эксендин-4, имидазоацетил (CA) эксендин-4 или глюкозозависимый инсулинотропный пептид (GIP), но не ограничиваясь этим, при условии обладания им инсулинотропной функцией. Инсулинотропный пептид, используемый в настоящем изобретении, включает в дополнение к нативному инсулинотропному пептиду все его производные, варианты и фрагменты. Их общие описания являются такими же, как описано выше.

Описания GLP-1, эксендина-3 или эксендина-4 и их производных включены без ограничений в публикацию патентной заявки Кореи № 10-2012-0137271 (или WO 2012-169798), относящейся к производному оксинтомодулина, и в публикацию патентной заявки Кореи № 10-2009-0008151 (или WO 2009-011544), относящуюся к производному инсулинотропного пептида, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

При использовании в настоящем документе термин "глюкагон" относится к пептидному гормону, повышающему уровни глюкозы в крови. Функции глюкагона состоят в расщеплении гликогена до глюкозы в печени с повышением уровней глюкозы.

При этом нативный глюкагон может иметь следующую 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: 52)

Кроме того, глюкагон, используемый в настоящем изобретении, включает в дополнение к нативному глюкагону все его производные, варианты и фрагменты. Их общие описания являются такими же, как описано выше.

При использовании в настоящем документе термин "паратиреоидный гормон (PTH)" относится к гормону, вырабатываемому паращитовидными железами, действие которого состоит в повышении концентрации кальция в крови. Сведения об аминокислотной последовательности паратиреоидного гормона могут быть доступны из известной базы данных, такой как GenBank Национального института здоровья США (The US National Institute of Health). Паратиреоидный гормон включает в дополнение к нативному паратиреоидному гормону все его производные, варианты и фрагменты.

При использовании в настоящем документе термин "кальцитонин" означает тиреоидный гормон, регулирующий концентрацию кальция в крови, и его функция состоит в снижении концентрации кальция в крови. Сведения об аминокислотной последовательности кальцитонина могут быть доступны из известной базы данных, такой как GenBank Национального института здоровья США. Кальцитонин включает в дополнение к нативному кальцитонину все его производные, варианты и фрагменты.

Способ по настоящему изобретению используют для эффективного повышения растворимости физиологически активного белка или пептида без применения поверхностно-активных веществ. Однако для дополнительного повышения растворимости можно применять поверхностно-активные вещества.

Таким образом, поверхностно-активные вещества добавляют в водный раствор, и конъюгаты длительного действия физиологически активного белка или пептида и фрагмента Fc иммуноглобулина инкапсулируются в мицеллы, что дополнительно повышает растворимость конъюгата.

В воплощении настоящего изобретения было исследовано, повышается ли растворимость инсулина или окситоцидина при слабокислом pH в результате конъюгации репрезентативного физиологически активного пептида инсулина или окситоцидина с Fc иммуноглобулина. В результате конъюгированная форма с фрагментом Fc иммуноглобулина значительно повышала растворимость инсулина или окситоцидина по сравнению с неконъюгированной формой (табл. 2 и 3, фиг. 2; и табл. 5 и 6; фиг. 4). Этот результат свидетельствует о том, что способ по настоящему изобретению можно применять для улучшения растворимости пептида или белка, и в частности для значительного улучшения растворимости пептида или белка, обладающего очень низкой растворимостью в нейтральных или слабокислых условиях, за счет чего его включение в фармацевтически эффективной концентрации в композицию затруднительно.

Далее настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на следующие примеры. Однако эти примеры предназначены только для иллюстративных целей, и не подразумевается, что настоящее изобретение ограничивается этими примерами.

Пример 1. Оценка растворимости инсулина и конъюгата инсулина длительного действия.

(1) Получение конъюгата инсулина длительного действия.

Порошок инсулина растворяли в 10 mM HCl, а затем подвергали взаимодействию с 3,4 К пропион-ALD₂ PEG (PEG, имеющий две пропиональдегидные группы, NOF, Япония) при 4°C в течение около 2 ч при молярном соотношении инсулин: PEG 1:2 и концентрации инсулина 5 мг/мл для ПЭГилирования N-конца цепи В инсулина. Эту реакцию проводили в 50 mM цитрате натрия (pH 5,0) и 45% изопропанол и добавляли в реакционную смесь от 2 до 20 mM цианоборгидрида натрия в качестве восстанавливающего агента. Реакционный раствор очищали на колонке SP HP (GE Healthcare), используя буфер, содержащий цитрат натрия (pH 3,0) и градиент концентрации KCl. С целью получения конъюгата инсулин-PEG-фрагмент Fc иммуноглобулина моно-ПЭГилированный инсулин и фрагмент Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:1,2 при суммарной концентрации белка 20 мг/мл при комнатной температуре в течение приблизительно 13 ч. Для этой цели реакционный раствор представлял собой 100 mM N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновую кислоту (HEPES) и 22 mM фосфат калия при pH 8,2, и к этой смеси добавляли 20 mM цианоборгидрид натрия в качестве восстанавливающего агента.

После завершения реакции реакционный раствор сначала пропускали через колонку с Q сефарозой HP (GE Healthcare), используя буфер трис-HCl (pH 7,5) и градиент концентрации NaCl, а затем пропускали через колонку Source 15 ISO (GE Healthcare), используя буфер трис-HCl (pH 7,5) и градиент концентрации сульфата аммония, в результате чего получили окончательно очищенный конъюгат инсулин-PEG-фрагмент Fc иммуноглобулина.

(2) Тест на растворимость инсулина и конъюгата инсулина длительного действия.

Чтобы исследовать растворимость инсулина и конъюгата инсулина длительного действия, исполь-

зовали стандартное и исследуемое вещество инсулина, и конъюгат инсулина длительного действия получали в соответствии с композицией, приведенной в следующей табл. 1 соответственно.

В композицию исследуемых веществ инсулина и конъюгата инсулина длительного действия входил буферный раствор уксусной кислоты с pH 6,0, полисорбат в качестве неионного поверхностно-активного вещества, маннит в качестве сахарного спирта и хлорид натрия в качестве изотонического агента. В соответствии с количественными значениями, приведенными в табл. 2 и 3, исследуемые вещества растворяли при комнатной температуре, не полностью растворившееся исследуемое вещество инсулин центрифугировали и только супернатант собирали и использовали в тесте на растворимость.

С этой целью максимальное количественное значение среди теоретически ожидаемых количественных значений исследуемого вещества инсулина было определено как составляющее около 10 мг/мл, и оно представляет собой количественное значение, полученное путем преобразования 100 мг/мл конъюгата инсулина длительного действия в инсулин. Исследуемое вещество инсулин, растворенное при максимальном количественном значении, разводили серийно, и точку (0,008 мг/мл), в которой инсулин полностью растворялся без примесей или осадка, определили как минимальное количественное значение.

Соответствующую калибровочную стандартную кривую инсулина и конъюгата инсулина длительного действия сначала подтверждали высокоэффективной жидкостной хроматографией с обращенной фазой (RP-HPLC), как на фиг. 1. Количественные значения инсулина и конъюгата инсулина длительного действия вычисляли путем помещения площадей пика исследуемых веществ инсулина и конъюгата инсулина длительного действия, подтвержденных хроматографией с обращенной фазой, на калибровочную стандартную кривую соответственно. Результаты приведены в табл. 2 и 3 и на фиг. 2.

Таблица 1

Вещество	Условия растворения
Стандарт инсулина	Растворенный в HCl, а затем доведенный до pH 5,0
Исследуемое вещество инсулин	pH 6,0
Стандарт и исследуемое вещество конъюгат инсулина длительного действия	pH 6,0

Таблица 2

Инсулин	
Теоретически ожидаемое количественное значение (мг/мл)	Значение измерения (количественное значение, вычисленное с помощью стандартной калибровочной кривой) (мг/мл)
0,008	0,000
0,04	0,000
0,2	0,005
1	0,047
5	0,253
10	0,628

Таблица 3

Конъюгат инсулина длительного действия (в расчете на инсулин)	
Теоретически ожидаемое количественное значение (мг/мл)	Значение измерения (количественное значение, вычисленное с помощью стандартной калибровочной кривой) (мг/мл)
61,1	61,2
89	86,7
110	103,4
146	133,5

Как показано в табл. 2 и 3, количественное значение исследуемого вещества конъюгата инсулина длительного действия, растворенного в буфере для композиции конъюгата инсулина длительного действия, демонстрировало незначительное различие между теоретически ожидаемым значением и измеренным значением, при этом количественное значение исследуемого вещества инсулина, растворенного в буфере для препарата конъюгата инсулина длительного действия, демонстрировало значимое различие (вплоть до примерно 16-кратного) между теоретически ожидаемым значением и измеренным значением. Кроме того, при растворении исследуемого вещества инсулина в буфере для препарата конъюгата инсулина длительного действия осадки наблюдали после центрифугирования во всех случаях, за исключением концентрации 0,008 мг/мл.

Как показано в результате, растворимость улучшалась за счет фрагмента Fc иммуноглобулина, используемого в качестве носителя конъюгата инсулина длительного действия.

Пример 2. Оценка растворимости оксинтомодулина и конъюгата оксинтомодулина длительного действия.

(1) Получение конъюгата оксинтомодулина длительного действия.

Производное оксинтомодулина подвергали взаимодействию с MAL-10.

K-ALD PEG (NOF, Япония) при 4°C в течение около 1 ч при молярном соотношении 1:1 и концен-

трации производного оксинтомодулина 3 мг/мл для ПЭГилирования MAL-10K-ALD PEG по остатку цистеина в положении 30 SEQ ID NO: 27, представляющей собой аминокислотную последовательность производного оксинтомодулина. Эту реакцию проводили в 50 мМ Трис (pH 7,5) и 60% изопропанол. После завершения реакции реакционный раствор наносили на колонку SP HP (GE Healthcare, Швеция), используя буферный раствор цитрата натрия (pH 3,0) и градиент концентрации KCl, для очистки производного оксинтомодулина, моно-ПЭГилированного в цистеине.

Затем очищенное таким образом моно-ПЭГилированное производное оксинтомодулина и фрагмент Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию в молярном соотношении 1:4 при суммарной концентрации белка 20 мг/мл при 4°C в течение около 16 ч. Для этой цели реакционный раствор представлял собой 100 мМ фосфат калия при pH 6,0, и к этой смеси добавляли 20 мМ цианоборгидрид (SCB) натрия в качестве восстанавливающего агента. После завершения реакции реакционный раствор сначала пропускали через колонку с бутилсефарозой FF (GE Healthcare, Швеция), используя буфер бис-трис и градиент концентрации NaCl, а затем пропускали через колонку Source ISO (GE Healthcare, Швеция), используя натрийцитратный буфер и градиент концентрации сульфата аммония, в результате чего получили окончательно очищенный конъюгат производное оксинтомодулина-PEG-фрагмент Fc иммуноглобулина.

(2) Тест на растворимость оксинтомодулина и конъюгата оксинтомодулина длительного действия.

Чтобы исследовать растворимость производного оксинтомодулина с SEQ ID NO: 27 и конъюгата оксинтомодулина длительного действия стандартное и исследуемое вещество производное оксинтомодулина и производное конъюгата оксинтомодулина длительного действия получали в соответствии с композицией, приведенной в следующей табл. 4 соответственно.

В композицию исследуемых веществ оксинтомодулина и конъюгата оксинтомодулина длительного действия входил цитратный буферный раствор с pH 5,6, полисорбат в качестве неионного поверхностно-активного вещества, маннит в качестве сахарного спирта и метионин. В соответствии с количественными значениями, приведенными в табл. 5 и 6, исследуемые вещества растворяли при комнатной температуре, не полностью растворившееся исследуемое вещество производное оксинтомодулина центрифугировали и только супернатант собирали и использовали в тесте на растворимость.

С этой целью максимальное количественное значение среди теоретически ожидаемых количественных значений исследуемого вещества производного оксинтомодулина было определено как составляющее около 5 мг/мл, и оно представляет собой количественное значение, полученное путем преобразования 80 мг/мл конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в производное оксинтомодулина. Исследуемое вещество производное оксинтомодулина, растворенное при максимальном количественном значении, разводили серийно, и точку (0,008 мг/мл), в которой производное оксинтомодулина полностью растворялось без примесей или осадка, определили как минимальное количественное значение.

Соответствующую калибровочную стандартную кривую производного оксинтомодулина и конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия сначала подтверждали хроматографией с обращенной фазой, как на фиг. 3. Количественные значения производного оксинтомодулина и конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия вычисляли путем помещения площадей пика исследуемых веществ производного оксинтомодулина и конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, подтвержденных хроматографией с обращенной фазой, на калибровочную стандартную кривую соответственно.

Таблица 4

Вещество	Условия растворения
Стандарт производного оксинтомодулина	pH 7,5, 60% изопропанол
Исследуемое вещество производное оксинтомодулина	pH 5,6
Стандарт и исследуемое вещество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия	pH 5,6

Таблица 5

Производное оксинтомодулина	
Теоретически ожидаемое количественное значение (мг/мл)	Значение измерения (количественное значение, вычисленное с помощью стандартной калибровочной кривой) (мг/мл)
0,008	0,000
0,04	0,000
0,2	0,002
1	0,014
5	0,188

Таблица 6

Конъюгат производного окситомодулина длительного действия	
Теоретически ожидаемое количественное значение (мг/мл)	Значение измерения (количественное значение, вычисленное с помощью стандартной калибровочной кривой) (мг/мл)
10	9,6
40	40,5
90	88,0
160	145,8

Как показано в табл. 5 и 6 и на фиг. 4, количественное значение исследуемого вещества конъюгата производного окситомодулина длительного действия, растворенного в буфере для композиции конъюгата производного окситомодулина длительного действия, демонстрировало незначительное различие между теоретически ожидаемым значением и измеренным значением, при этом количественное значение исследуемого вещества производного окситомодулина, растворенного в буфере для препарата конъюгата производного окситомодулина длительного действия, демонстрировало значимое различие (вплоть до примерно 27-кратного) между теоретически ожидаемым значением и измеренным значением. Кроме того, при растворении исследуемого вещества производного окситомодулина в буфере для препарата конъюгата производного окситомодулина длительного действия осадки наблюдали после центрифугирования во всех случаях, за исключением концентрации 0,008 мг/мл. Как показано в результате, растворимость улучшалась за счет фрагмента Fc иммуноглобулина, используемого в качестве носителя конъюгата производного окситомодулина длительного действия.

Эти результаты показывают, что фрагмент Fc иммуноглобулина, используемый в качестве носителя физиологически активного белка и пептида по настоящему изобретению, способен эффективно улучшать растворимость белка и пептида.

На основании приведенного выше описания специалистам в данной области техники понятно, что настоящее изобретение можно осуществлять на практике в различных конкретных формах без изменения его технической сущности или существенных характеристик. Поэтому следует понимать, что описанное выше воплощение изобретения является не ограничивающим, а иллюстративным во всех аспектах. Объем изобретения в большей степени определяется прилагаемой формулой изобретения, чем предшествующей ей описанию, и, следовательно, подразумевается, что все изменения и модификации, которые попадают в рамки границ и пределов формулы изобретения или эквивалентов таких границ и пределов, таким образом, охвачены формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида по сравнению с растворимостью физиологически активного белка или пептида, не конъюгированного с фрагментом Fc иммуноглобулина, где способ предназначен для улучшения растворимости физиологически активного белка или пептида в водном растворе, имеющем pH от 5,0 до 7,0,

где способ включает конъюгирование физиологически активного белка или пептида с N-концевой аминной группой фрагмента Fc иммуноглобулина через непептидильный полимер и

где физиологически активный белок или пептид представляет собой эксендин-4, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), инсулин, окситомодулин или их производное.

2. Способ по п.1, где

фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой фрагмент Fc, имеющий происхождение из IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, и, возможно,

где фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой гибрид доменов, в котором каждый домен имеет разное происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM,

где фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов одного и того же происхождения, или

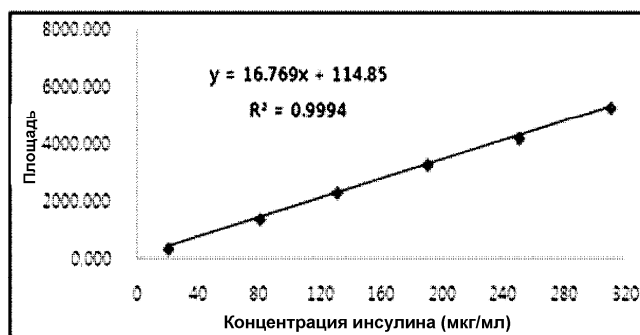
где фрагмент Fc иммуноглобулина представляет собой негликозилированный фрагмент Fc IgG4 человека.

3. Способ по п.1, где непептидильный полимер выбран из группы, состоящей из полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и поли(молочная кислота-гликолевая кислота) (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинация.

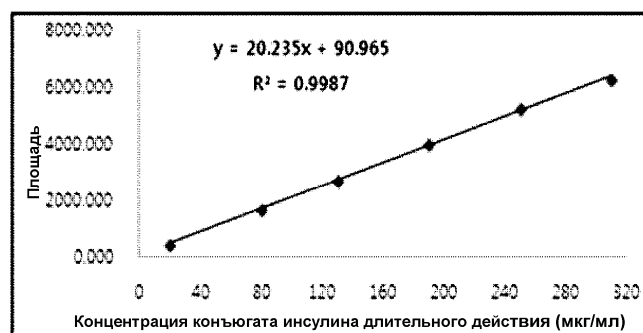
4. Способ по п.1, где водный раствор содержит буферный раствор лимонной кислоты или уксусной кислоты, полисорбат в качестве неионного поверхностно-активного вещества, маннит в качестве сахарного спирта и хлорид натрия или метионин в качестве изотонического агента.

5. Способ по п.1, где производное эксендина-4 представляет собой имидазоацетил-эксендин-4.

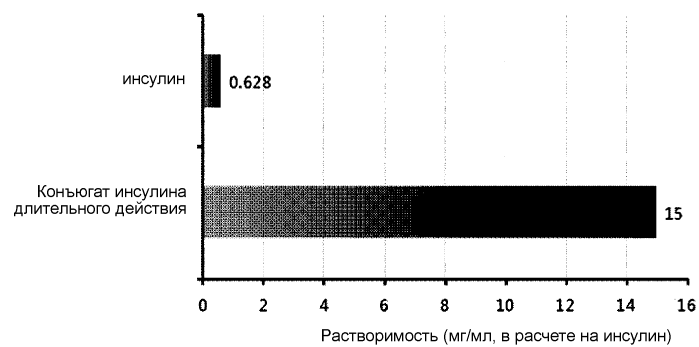
Стандартная калибровочная кривая инсулина



Стандартная калибровочная кривая конъюгата инсулина длительного действия



Фиг. 1

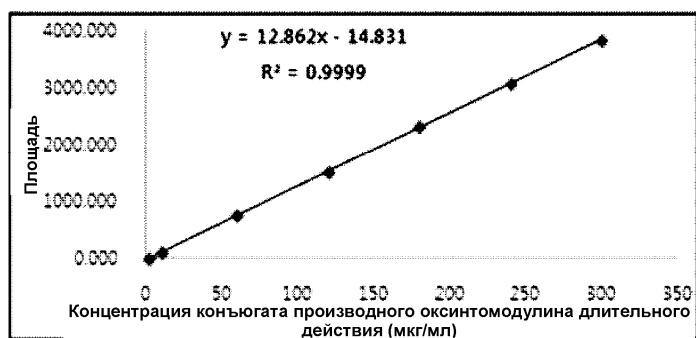


Фиг. 2

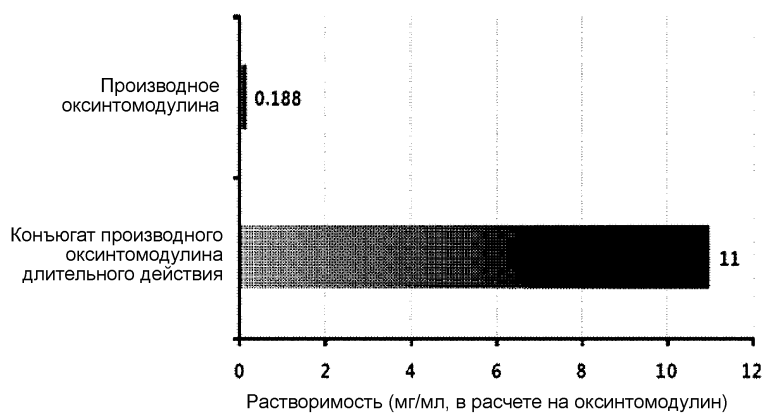
Стандартная калибровочная кривая производного оксинтомодулина



Стандартная калибровочная кривая конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2