(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 041658 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.18

(21) Номер заявки
201890584

(22) Дата подачи заявки
2016.08.29

(51) Int. Cl. ***C07K 14/62*** (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

(54) НОВЫЕ АНАЛОГИ ИНСУЛИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **10-2015-0121819**
(32) **2015.08.28**
(33) **KR**
(43) **2018.08.31**
(86) **PCT/KR2016/009606**
(87) **WO 2017/039267 2017.03.09**

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

(72) Изобретатель:
Ким Джин Ён, О Ых Лим, Ли Джон Су, Лим Хён Гю, Чхой Ин Юнг, Квон Се Чан (KR)

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

(56) WO-A1-2014133324
KR-B1-101324828
NCBI, GenBank accession no. AAA72172.1 (27 April 1993) See whole document.
NCBI, GenBank accession no. AKI70564.1 (1 June 2015) See whole document.
NCBI, GenBank accession no. NM_001291897.1 (13 May 2015) See whole document.
KELLER et al., "Flexibility and bioactivity of insulin: an NMR investigation of the solution structure and folding of an unusually flexible human insulin mutant with increased biological activity", Biochemistry, Vol.40, pp.10732-10740 (2001) See whole document.
JORGENSEN et al., "Solution structure of the superactive monomeric Des- [Phe(B25)] human insulin mutant: elucidation of the structural basis for the monomerization of Des-[Phe(B25)] insulin and the dimerization of native insulin", Journal of Molecular Biology, Vol.257, pp.684-699 (1996) See whole document.

(57) Настоящее изобретение относится к новому аналогу инсулина и, более конкретно, к аналогу инсулина с улучшенным in vitro-эффектом по сравнению с нативным инсулином, нуклеиновой кислоте, кодирующей указанный аналог, вектору экспрессии, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, трансформанту, в который введен указанный вектор экспрессии, способу получения аналога инсулина из указанного трансформанта, фармацевтической композиции для лечения диабета, содержащей указанный аналог инсулина в качестве активного ингредиента, и способу лечения диабета с использованием указанного аналога инсулина или указанной фармацевтической композиции.

041658 B1

041658 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новому аналогу инсулина и, конкретнее, к аналогу инсулина с улучшенным in vitro-эффектом по сравнению с нативным инсулином, и к их применению.

Предшествующий уровень техники

Инсулин представляет собой гормон, контролирующий уровень глюкозы в крови, секретируемый поджелудочной железой и приводящий к перемещению избыточной глюкозы из крови в клетки, посредством чего он обеспечивает их источником энергии и поддерживает нормальный уровень глюкозы. Тем не менее, пациенты с диабетом не могут поддерживать нормальные инсулиновые функции из-за дефицита инсулина, инсулинорезистентности и утраты функции бета-клеток. В результате, пациенты с диабетом не могут использовать глюкозу крови в качестве источника энергии, но демонстрируют симптомы гипергликемии с высоким уровнем глюкозы и выводят глюкозу с мочой, что приводит к различным осложнениям. Соответственно, пациентам с диабетом и нарушениями секреции инсулина (тип I) или инсулинорезистентностью (тип II) в высшей степени необходимо введение инсулина, позволяющее им поддерживать нормальные уровни глюкозы в крови.

Человеческий инсулин состоит из двух полипептидных цепей, т.е. A-цепи и B-цепи, содержащими 21 и 30 аминокислот, соответственно, соединенных друг с другом двумя дисульфидными связями. Поскольку инсулин имеет очень короткий период полувыведения in vivo, как и другие белковые и пептидные гормоны, он не способен оказывать продолжительный терапевтический эффект, и поэтому существует проблема, состоящая в необходимости его постоянного и частого введения для того, чтобы он оказывал свой эффект. Частое введение инсулина доставляет пациентам сильную боль и дискомфорт, и поэтому существует потребность в улучшении введения с точки зрения приверженности пациентов к лечению, их безопасности и удобства.

Соответственно, исследования были сосредоточены на разработке различных белковых композиций, химических конъюгатов и так далее для улучшения терапевтических эффектов, а также качества жизни пациентов, благодаря снижению частоты введения за счет увеличения периода полувыведения этих белковых лекарственных средств, таких как инсулин, in vivo.

Известно, что инсулин удаляет глюкозу из крови, связываясь с рецепторами инсулина, и что эффект инсулина можно контролировать, изменяя последовательность нативного инсулина. In vivo-эффект инсулина можно контролировать заменой аминокислоты (аминокислот) инсулина другой аминокислотой (аминокислотами) или делецией определенной аминокислоты (аминокислот) инсулина. Поскольку производные инсулина с высокой активностью могут оказывать эффекты, эквивалентные эффектам нативного инсулина или превосходящие их, даже в небольшом количестве, они могут, таким образом, быть крайне желательны с терапевтической точки зрения. В частности, аминокислотные замены в A-цепи и/или B-цепи инсулина были широко изучены с точки зрения фармакокинетического эффекта действия инсулина после подкожной инъекции.

В этих условиях авторы настоящего изобретения провели всесторонние исследования для улучшения эффекта действия инсулина и, в результате, они обнаружили, что аналоги инсулина с модификацией (модификациями) определенного аминокислотного остатка (остатков) A-цепи и/или B-цепи инсулина демонстрируют существенно улучшенный in vitro-эффект, по сравнению с нативным инсулином, и что они могут поэтому быть эффективно использованы для лечения диабета, завершив посредством этого настоящее изобретение.

Описание изобретения

Техническая проблема.

Задачей настоящего изобретения является обеспечение нового аналога инсулина и, конкретно, аналога инсулина с улучшенным in vitro-эффектом по сравнению с нативным инсулином.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для лечения диабета, содержащей аналог инсулина в качестве активного ингредиента.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение способа лечения диабета, включающего введение аналога инсулина или фармацевтической композиции, содержащей аналог инсулина в качестве активного ингредиента, субъекту, нуждающемуся в этом.

Техническое решение.

Для решения указанных выше задач в одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен аналог инсулина, содержащий A-цепь SEQ ID NO: 3, представленную следующей общей формулой 1, и B-цепь SEQ ID NO: 4, представленную следующей общей формулой 2.

Общая формула 1

Xaa1-Ile-Val-Glu-**Xaa2**-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-**Xaa3**-Leu-**Xaa4**-Gln-**Xaa5**-Glu-Asn-

Xaa6-Cys-**Xaa7** (SEQ ID NO: 3)

В приведенной выше общей формуле 1:

Xaa1 представляет собой аланин, глицин, глутамин, гистидин, глутаминовую кислоту или аспарагин;

Xaa2 представляет собой аланин, глутаминовую кислоту, глутамин, гистидин или аспарагин;

Xaa3 представляет собой аланин, серин, глутамин, глутаминовую кислоту, гистидин или аспарагин;

Xaa4 представляет собой аланин, тирозин, глутаминовую кислоту, гистидин, лизин, аспарагиновую кислоту или аспарагин;

Xaa5 представляет собой аланин, лейцин, тирозин, гистидин, глутаминовую кислоту или аспарагин;

Xaa6 представляет собой аланин, тирозин, серин, глутаминовую кислоту, гистидин или аспарагин; и

Xaa7 представляет собой аспарагин, глицин, гистидин или аланин.

Общая формула 2

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-**Xaa8**-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-**Xaa9**-Tyr-**Xaa10**-**Xaa11**-Lys-Thr (SEQ ID NO: 4)

В приведенной выше общей формуле 2:

Xaa8 представляет собой тирозин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует;

Xaa9 представляет собой фенилаланин или отсутствует;

Xaa10 представляет собой треонин или отсутствует; и

Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует (при условии, что пептид, содержащий A-цепь SEQ ID NO: 1 и B-цепь SEQ ID NO: 2, исключен).

В более конкретном типичном воплощении аналог инсулина характеризуется тем, что он содержит A-цепь общей формулы 1 и B-цепь, где в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 отсутствует и Xaa10 представляет собой треонин.

Аналог инсулина характеризуется тем, что он содержит A-цепь общей формулы 1 и B-цепь, где в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 представляет собой фенилаланин и Xaa10 отсутствует.

В другом типичном воплощении аналог инсулина характеризуется тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 представляет собой фенилаланин, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин.

В еще одном типичном воплощении аналог инсулина характеризуется тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой аспарагин, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 представляет собой фенилаланин, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин.

В еще одном типичном воплощении аналог инсулина характеризуется тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин.

В еще одном типичном воплощении аналог инсулина характеризуется тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой аланин, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин.

В еще одном типичном воплощении аналог инсулина по настоящему изобретению характеризуется тем, что:

в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa9 представляет собой фенилаланин; или

в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa4 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa9 представляет собой фенилаланин; или

в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa9 отсутствует; или

в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa4 представляет собой аланин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой глутаминовую кислоту и Xaa9 отсутствует;

без ограничения указанными вариантами.

В еще одном типичном воплощении аналог инсулина по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, 18, 20 или 22.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложена нуклеиновая кислота, кодирующая аналог инсулина.

В типичном воплощении нуклеиновая кислота по настоящему изобретению содержит нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 17, 19 и 21.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен трансформант, трансформированный рекомбинантным вектором экспрессии.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ получения аналога инсулина, включающий:

а) получение рекомбинантного вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид-аналог инсулина;

б) трансформацию клетки-хозяина рекомбинантным вектором экспрессии и получение трансформанта из указанной клетки-хозяина;

в) культивирование трансформанта и экспрессию пептида-аналога инсулина; и

г) выделение и очистку экспрессированного пептида-аналога инсулина.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция для лечения диабета, содержащая аналог инсулина в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый носитель.

Полезные эффекты.

Аналоги инсулина по настоящему изобретению демонстрируют значительно улучшенный in vitro-эффект по сравнению с нативным инсулином, и поэтому ожидают, что введение указанных аналогов инсулина даже в небольшом количестве будет достаточным для лечения и, таким образом, их можно будет эффективно использовать для лечения диабета.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показан результат анализа чистоты аналогов инсулина по настоящему изобретению посредством белкового электрофореза и, в качестве примера, результат для аналога инсулина 1 (дорожка 1 - маркер размера; и дорожка 2 - аналог инсулина 1).

На фиг. 2 показан результат анализа чистоты аналогов инсулина по настоящему изобретению посредством хроматографии с обращенной фазой и эксклюзионной хроматографии и, в качестве примера, результат для аналога инсулина 1.

На фиг. 3 показан результат пептидного картирования аналогов по настоящему изобретению и, в качестве примера, результат для аналога инсулина 1, где USP-инсулин соответствует нативному инсулину, использованному в качестве контроля.

Наилучший вариант осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

В то же время, каждое из объяснений и типичных воплощений, раскрытых здесь, применимо к другим объяснениям и типичным воплощениям. Т.е. объем настоящего изобретения включает все возможные комбинации различных элементов, раскрытых здесь. Кроме того, объем настоящего изобретения не следует ограничивать конкретными описаниями, приведенными ниже.

Настоящее изобретение относится к новому инсулину и, конкретно, к аналогу инсулина с улучшенным in vitro-эффектом по сравнению с нативным инсулином.

При использовании здесь термин "аналог инсулина" относится к модифицированному аналогу нативного инсулина, полученному модификациией части аминокислоты (аминокислот) нативного инсулина в форме вставки, делеции или замены, и, в частности, он включает различные аналоги нативного инсулина с улучшенным in vitro-эффектом по сравнению с нативным инсулином.

Нативный инсулин представляет собой гормон, секретируемый поджелудочной железой, и обычно функционирует, стимулируя абсорбцию глюкозы клетками и ингибируя распад жиров, контролируя, посредством этого, уровни глюкозы в крови in vivo. Инсулин образуется при процессинге его предшественника, проинсулина, не обладающего функцией контроля уровней глюкозы в крови. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей, т.е. А-цепи и В-цепи, содержащих 21 и 30 аминокислот, соответственно, соединенных друг с другом дисульфидными связями. Каждая из А-цепи и В-цепи может содержать аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, показанные ниже.

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)

Инсулин по настоящему изобретению относится к аналогам инсулина, полученным с применением технологии генетической рекомбинации, но инсулин не ограничен указанными аналогами и включает любой инсулин с улучшенным in vitro-эффектом по сравнению с нативным инсулином. Предпочтитель-

но, инсулин по настоящему изобретению включает инвертированный инсулин, варианты инсулина, фрагменты инсулина и так далее. Инсулин может быть получен не только рекомбинантным методом, но также твердофазным синтезом, и способ получения не ограничен указанными методами.

Эти аналоги инсулина, представляющие собой пептиды, обладающие способностью контролировать уровни глюкозы в крови in vivo, эквивалентной или соответствующей нативному инсулину, включают любые агонисты инсулина, производные инсулина, фрагменты инсулина, варианты инсулина и так далее.

При использовании здесь термин "агонист инсулина" относится к веществу, которое может связываться с рецептором инсулина in vivo независимо от структуры инсулина и, посредством этого, демонстрирует биологическую активность, эквивалентную биологической активности инсулина.

При использовании здесь термин "производное инсулина" может относиться к пептиду, гомологичному каждой из аминокислотных последовательностей A-цепи и B-цепи нативного инсулина, в форме, обладающей способностью контролировать уровни глюкозы в крови in vivo, где часть групп в аминокислотном остатке модифицирована химическим замещением (например, альфа-метилированием, альфа-гидроксилированием), удалением (например, дезаминированием) или модификацией (например, N-метилированием).

Кроме того, при использовании здесь термин "производное инсулина" может относиться к пептидному мимику и низко- или высокомолекулярному соединению, которое может контролировать уровни глюкозы в крови in vivo, связываясь с рецептором инсулина, несмотря на отсутствие гомологии аминокислотной последовательности нативного инсулина.

При использовании здесь термин "фрагмент инсулина" относится к форме инсулина, где по меньшей мере одна аминокислота добавлена или удалена, и добавленная аминокислота может представлять собой аминокислоту, не присутствующую в природе (например, аминокислоту D-типа), и фрагмент инсулина обладает способностью контролировать уровни глюкозы в крови in vivo.

При использовании здесь термин "вариант инсулина" относится к пептиду, отличающемуся от инсулина по меньшей мере одной аминокислотной последовательностью и также обладающему способностью контролировать уровни глюкозы в крови in vivo.

Способы, применяемые в получении агонистов, производных, фрагментов и вариантов инсулина могут быть применены по отдельности или в комбинации. Например, в объем настоящего изобретения могут быть включены пептиды, обладающие способностью контролировать уровни глюкозы в крови in vivo, отличающиеся по меньшей мере одной аминокислотной последовательностью, в которых аминокислотный остаток на N-конце дезаминирован.

Аналог инсулина по настоящему изобретению исключительным образом включает любой пептид, in vitro-эффект которого улучшен по сравнению с нативным инсулином посредством введения замены, вставки или делеции аминокислоты (аминокислот) или посттрансляционной модификации (например, метилирования, ацилирования, убиквитинирования и межмолекулярного ковалентного связывания) аминокислотных последовательностей (SEQ ID NO: 1 и 2) A-цепи и B-цепи нативного инсулина. Для замены или вставки аминокислоты (аминокислот) могут быть использованы не только 20 аминокислот, обычно наблюдаемые в человеческих белках, но также атипичные или искусственные аминокислоты. Атипичные аминокислоты могут быть приобретены у Sigma-Aldrich, ChemPep, Genzymepharmaceuticals и так далее. Пептиды, содержащие эти аминокислоты, и обычные пептидные последовательности могут быть синтезированы или приобретены у коммерческих компаний, синтезирующих пептиды, таких как American Peptide Company, Bachem (США) и Anygen (Корея).

Конкретно, аналоги инсулина по настоящему изобретению могут представлять собой аналоги инсулина, содержащие модификацию или удаление определенного аминокислотного остатка (остатков) A-цепи и B-цепи нативного инсулина, и, предпочтительно, могут представлять собой аналоги инсулина, где определенный аминокислотный остаток (остатки) A-цепи нативного инсулина модифицирован (модифицированы) и определенный аминокислотный остаток (остатки) B-цепи нативного инсулина модифицирован (модифицированы) и/или удален (удалены).

Предпочтительно, аналоги инсулина по настоящему изобретению могут представлять собой аналог, где 14-й аминокислотный остаток, тирозин, аминокислотной последовательности A-цепи, представленной SEQ ID NO: 1, заменен на глутаминовую кислоту, аспарагин или аланин, или аналог, где 16-й аминокислотный остаток, тирозин, заменен на глутаминовую кислоту и/или 25-й аминокислотный остаток, фенилаланин, аминокислотной последовательности B-цепи, представленной SEQ ID NO: 2, удален, или могут включать все эти аналоги.

Более предпочтительно, аналоги инсулина по настоящему изобретению могут представлять собой аналоги инсулина, содержащие A-цепь SEQ ID NO: 3, представленную следующей общей формулой 1, и B-цепь SEQ ID NO: 4, представленную следующей общей формулой 2.

Общая формула 1

Xaa1-Ile-Val-Glu-**Xaa2**-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-**Xaa3**-Leu-**Xaa4**-Gln-**Xaa5**-Glu-Asn-

Xaa6-Cys-**Xaa7** (SEQ ID NO: 3)

В приведенной выше общей формуле 1:

Xaa1 представляет собой аланин, глицин, глутамин, гистидин, глутаминовую кислоту или аспарагин;

Xaa2 представляет собой аланин, глутаминовую кислоту, глутамин, гистидин или аспарагин;

Xaa3 представляет собой аланин, серин, глутамин, глутаминовую кислоту, гистидин или аспарагин;

Xaa4 представляет собой аланин, тирозин, глутаминовую кислоту, гистидин, лизин, аспарагиновую кислоту или аспарагин;

Xaa5 представляет собой аланин, лейцин, тирозин, гистидин, глутаминовую кислоту или аспарагин;

Xaa6 представляет собой аланин, тирозин, серин, глутаминовую кислоту, гистидин или аспарагин; и

Xaa7 представляет собой аспарагин, глицин, гистидин или аланин.

Общая формула 2

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-**Xaa8**-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-**Xaa9**-Tyr-**Xaa10**-**Xaa11**-Lys-Thr (SEQ ID NO: 4)

В приведенной выше общей формуле 2:

Xaa8 представляет собой тирозин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует;

Xaa9 представляет собой фенилаланин или отсутствует;

Xaa10 представляет собой треонин или отсутствует; и

Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует (где пептиды, содержащие A-цепь SEQ ID NO: 1 и B-цепь SEQ ID NO: 2, могут быть исключены).

В более конкретном типичном воплощении аналог инсулина может представлять собой аналог инсулина, где:

в общей формуле 1:

Xaa1 представляет собой глицин,

Xaa2 представляет собой глутамин,

Xaa3 представляет собой серин,

Xaa4 представляет собой аланин, глутаминовую кислоту или аспарагин,

Xaa5 представляет собой лейцин,

Xaa6 представляет собой тирозин, и

Xaa7 представляет собой аспарагин; и

в общей формуле 2:

Xaa8 представляет собой тирозин или глутаминовую кислоту,

Xaa9 представляет собой фенилаланин или отсутствует,

Xaa10 представляет собой треонин, и

Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует;

без ограничения указанными вариантами.

В другом конкретном типичном воплощении аналог инсулина может представлять собой аналог инсулина, где:

в общей формуле 1:

Xaa1 представляет собой глицин,

Xaa2 представляет собой глутамин,

Xaa3 представляет собой серин,

Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту или аспарагин,

Xaa5 представляет собой лейцин,

Xaa6 представляет собой тирозин, и

Xaa7 представляет собой аспарагин; и

в общей формуле 2:

Xaa8 представляет собой тирозин,

Xaa9 представляет собой фенилаланин или отсутствует,

Xaa10 представляет собой треонин, и

Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует;

без ограничения указанными вариантами.

В еще одном конкретном типичном воплощении аналог инсулина может содержать A-цепь общей формулы 1 и B-цепь, где в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует, без ограничения указанными вариантами.

Аналог инсулина может содержать A-цепь общей формулы 1 и B-цепь, где в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 представляет собой фенилаланин, Xaa10 отсутствует и Xaa11

представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует, без ограничения указанными вариантами.

Аналог инсулина может характеризоваться тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 представляет собой фенилаланин, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует, без ограничения указанными вариантами.

Аналог инсулина может характеризоваться тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой аспарагин, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 представляет собой фенилаланин, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует, без ограничения указанными вариантами.

В еще одном конкретном типичном воплощении аналог инсулина может характеризоваться тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует, без ограничения указанными вариантами.

В еще одном конкретном типичном воплощении аналог инсулина может характеризоваться тем, что в A-цепи SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой аланин, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин, и в B-цепи SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту или отсутствует, без ограничения указанными вариантами.

В типичном воплощении аналоги инсулина по настоящему изобретению могут включать следующие аналоги:

1) аналог инсулина 1: пептид, где 14-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности A-цепи, представленной SEQ ID NO: 3, представляет собой глутаминовую кислоту и 25-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности B-цепи, представленной SEQ ID NO: 4, представляет собой фенилаланин, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15;

2) аналог инсулина 2: пептид, где 14-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности A-цепи, представленной SEQ ID NO: 3, представляет собой аспарагин и 25-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности B-цепи, представленной SEQ ID NO: 4, представляет собой фенилаланин, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 17;

3) аналог инсулина 3: пептид, где 14-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности A-цепи, представленной SEQ ID NO: 3, представляет собой глутаминовую кислоту и 25-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности B-цепи, представленной SEQ ID NO: 4, удален, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19;

4) аналог инсулина 4: пептид, где 14-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности A-цепи, представленной SEQ ID NO: 3, представляет собой аланин, 16-й аминокислотный остаток аминокислотной последовательности B-цепи, представленной SEQ ID NO: 4, представляет собой глутаминовую кислоту и 25-й аминокислотный остаток отсутствует, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 21.

При использовании здесь термин "in vitro-эффект" относится к поглощению глюкозы под действием аналога инсулина, и его показателем является результат измерения EC_{50} относительно поглощения глюкозы клетками мышиного происхождения 3T3-L1 с адипоцитарной дифференцировкой.

В типичном воплощении при измерении in vitro-эффекта аналогов инсулина 1-3 аналог инсулина 1 продемонстрировал повышение поглощения глюкозы на 238,4%, аналог инсулина 2 продемонстрировал повышение на 241,7% и аналог инсулина 3 продемонстрировал повышение на 705% по сравнению с нативным инсулином, соответственно, подтвердив посредством этого, что аналоги инсулина по настоящему изобретению демонстрируют выдающийся in vitro-эффект, в 2-7 раз превосходящий эффект нативного инсулина (табл. 1).

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные выше аналоги инсулина.

При использовании здесь термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотиду (ДНК) или рибонуклеотиду (РНК), включая геномную ДНК, кДНК и РНК, образующуюся при их транскрипции, и нуклеотид как основная структурная единица включает не только естественные нуклеотиды, но также аналоги с модификациями сахара или основания (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990). Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть выделена и получена с применением стандартных молекулярно-биологических технологий. Например, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть получена ПЦР-амплификацией с использованием подходящих праймерных последовательностей, основанных на последовательности гена нативного инсулина (NM_000207.2, NCBI), и может быть получена технологией стандартного синтеза с использованием автоматического ДНК-синтезатора.

Предпочтительно, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению включает нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO: 15, 17, 19 и 21. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению включает не только нуклеотидные последовательности, представленные SEQ ID NO: 15, 17, 19 и 21, но также все последовательности, по меньшей мере на 70% гомологичные указанным выше последовательностям, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98%, и пептид, кодируемый указанной выше нуклеиновой кислотой, может связываться с рецепторами инсулина in vivo, демонстрируя посредством этого по существу такую же биологическую активность, как инсулин.

При использовании здесь термин "гомология" относится к степени сходства с заданной аминокислотной последовательностью нативного белка дикого типа или кодирующей его полинуклеотидной последовательностью и включает последовательности, на описанный выше или больший процент идентичные аминокислотным последовательностям или полинуклеотидным последовательностям по настоящему изобретению. Гомология может быть определена сравнением двух заданных последовательностей невооруженным глазом или может быть определена с применением биоинформационного алгоритма, позволяющего анализировать гомологию выравниванием рассматриваемых последовательностей для сравнения. Гомология двух заданных аминокислотных последовательностей может быть указана как процент. Полезный автоматизированный алгоритм доступен для применения в модулях GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин, США). Алгоритм выравнивания, автоматизированный в указанных выше модулях, включает алгоритмы выравнивания последовательностей Нидлмана-Вунша (Needleman & Wunsch),

Пирсона-Липмана (Pearson & Lipman) и Смита-Уотермана (Smith & Waterman). Другие полезные алгоритмы выравнивания последовательностей и определения гомологии автоматизированы в программном обеспечении, включающем FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST и CLUSTAL W.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог инсулина. Рекомбинантный вектор по настоящему изобретению может быть сконструирован как вектор для обычного клонирования или экспрессии и может быть сконструирован как вектор для использования прокариотической клетки или эукариотической клетки в качестве клетки-хозяина.

При использовании здесь термин "вектор" относится к рекомбинантному вектору, способному экспрессировать целевой белок в подходящей клетке-хозяине, представляющей собой генную конструкцию, содержащую необходимые функционально связанные регуляторные факторы, обеспечивающие экспрессию введенной нуклеиновой кислоты. Настоящее изобретение позволяет получить рекомбинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог инсулина, и аналог инсулина по настоящему изобретению может быть получен трансформацией или трансфекцией клетки-хозяина указанным рекомбинантным вектором.

В настоящем изобретении нуклеиновая кислота, кодирующая аналог инсулина, функционально связана с промотором. При использовании здесь термин "функционально связанный" относится к функциональной связи регуляторной последовательности, регулирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (например, промотора, сигнальной последовательности, сайта связывания рибосом, последовательности терминации транскрипции и так далее) с другой нуклеотидной последовательностью, посредством чего регуляторная последовательность может регулировать транскрипцию и/или трансляцию другой нуклеотидной последовательности.

При использовании здесь термин "промотор" относится к нетранслируемой последовательности нуклеиновой кислоты, расположенной выше кодирующей области, содержащей сайт связывания полимеразы и обладающей активностью инициации транскрипции гена, расположенного ниже промотора, с образованием мРНК, т.е. домену ДНК, с которым связывается полимераза, инициируя транскрипцию гена, и он расположен в 5'-домене инициации транскрипции с образованием мРНК.

Например, когда вектор по настоящему изобретению представляет собой рекомбинантный вектор и

в качестве клетки-хозяина используют прокариотическую клетку, обычно следует включать сильный промотор (например, промотор tac, промотор lac, промотор lacUV5, промотор lpp, промотор pLλ, промотор pRλ, промотор rac5, промотор amp, промотор recA, промотор SP6, промотор trp, промотор T7 и так далее), способный проводить транскрипцию, сайт связывания рибосом для инициации трансляции и последовательности терминации транскрипции/трансляции.

Кроме того, вектор для использования в настоящем изобретении, может быть получен манипуляцией с плазмидами (например, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, серия pGEX, серия pET, серия pPICZα, pUC19 и так далее), фагами (например, λgt4 λB, λ-Charon, λΔz1, M13 и так далее) или вирусами (например, SV40 и так далее), обычно используемыми в данной области.

В то же время, когда вектор по настоящему изобретению представляет собой рекомбинантный вектор и в качестве клетки-хозяина используют эукариотическую клетку, могут быть использованы промоторы, имеющие происхождение от геномов клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор), или промоторы, имеющие происхождение от вирусов млекопитающих (например, поздний аденовирусный промотор, 7.5K-промотор папилломавируса, промотор SV40, цитомегаловирусный промотор и tk-промотор HSV), и обычно вектор содержит полиаденилированную последовательность (например, терминатор бычьего гормона роста и полиаденилированную последовательность, имеющую происхождение от SV40) в качестве последовательности терминации транскрипции.

Кроме того, рекомбинантный вектор по настоящему изобретению содержит ген антибиотикорезистентности, обычно используемый в данной области в качестве селектируемого маркера, и может содержать, например, гены резистентности к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

Рекомбинантный вектор по настоящему изобретению может дополнительно содержать другую последовательность, облегчающую очистку получаемых целевых белков, т.е. одноцепочечного аналога инсулина, проинсулина или его аналогов. Включенная дополнительно последовательность может представлять собой маркерную последовательность для очистки белка, например, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, США), мальтозосвязывающий белок (NEB, США), FLAG (IBI, США), 6-гистидин и так далее, но типы последовательностей, необходимых для очистки целевых белков, не ограничены указанными вариантами.

Слитые белки, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора, содержащего указанную выше маркерную последовательность, могут быть очищены аффинной хроматографией. Например, при присоединении глутатион-S-трансферазы может быть использован глутатион, являющийся субстратом этого фермента, и при использовании 6-гистидиновой метки желаемый целевой белок может быть легко получен с использованием Ni-NTA-колонки.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен трансформант, трансформированный рекомбинантным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог инсулина.

При использовании здесь термин "трансформация" относится к процессу введения ДНК в клетку-хозяина и обеспечения возможности репликации указанной ДНК в клетке-хозяине в форме хромосомного фактора или в результате интеграции в хромосому, представляющему собой феномен искусственного генетического изменения посредством введения экзогенной ДНК в клетку.

Метод трансформации, применяемый в настоящем изобретении, может представлять собой любой метод трансформации, и она может быть легко проведена обычным методом, применяемым в данной области. Примеры обычно применяемых методов трансформации могут включать метод осаждения с $CaCl_2$, метод Ханахана (Hanahan) с улучшенной эффективностью и использованием диметилсульфоксида (DMSO) в качестве восстанавливающего агента в методе осаждения с $CaCl_2$, электропорацию, метод осаждения с $CaPO_4$, метод слияния протопластов, метод перемешивания с использованием волокон карбида кремния, трансформацию, опосредованную агробактериями, трансформацию с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ), трансформацию, опосредованную декстрансульфатом, липофектамином и сушкой/супрессией, и так далее.

Метод трансформации рекомбинантным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог инсулина по настоящему изобретению, может не быть ограничен этими методами, и может быть применен любой, без ограничения, метод трансформации или трансфекции, обычно применяемый в данной области.

Трансформант по настоящему изобретению может быть получен введением рекомбинантного вектора, содержащего целевую нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог инсулина, в клетку-хозяина. Относительно подходящего хозяина, используемого в настоящем изобретении, может не быть существенных ограничений, при условии, что он может экспрессировать нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Примеры подходящих хозяев могут включать бактерии, принадлежащие к роду Escherichia, такие как E. coli, бактерии, принадлежащие к роду Bacillus, такие как Bacillus subtilis, бактерии, принадлежащие к роду Pseudomonas, такие как Pseudomonas putida, дрожжи, такие как Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae и Schizosaccharomyces pombe, клетки насекомых, таких как Spodoptera frugiperda (SF9), и клетки животных, такие как CHO, COS и BSC. Предпочтительно, в качестве клетки-хозяина используют

E. coli.

В типичном воплощении соответствующую нуклеотидную последовательность, кодирующую аналоги инсулина 1-3 по настоящему изобретению, амплифицировали посредством ПЦР и амплифицированные генные фрагменты клонировали в вектор pET22b (Novagen). Для экспрессии аналогов инсулина в форме внутриклеточных включений вектор pET22b обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI, удаляя из него сигнальную последовательность, ПЦР-амплифицированные продукты аналогов инсулина обрабатывали теми же рестриктазами NdeI и BamHI и соответствующую выделенную ДНК вводили в вектор для клонирования pET22b с использованием ДНК-лигазы T4. Полученные таким образом векторы экспрессии были названы pET22b-аналог инсулина 1-4 соответственно.

Векторы экспрессии pET22b-аналог инсулина 1-4 кодируют аминокислотные последовательности представленные SEQ ID NO: 16, 18, 20 и 22, соответственно, под контролем промотора T7, и каждый из аналогов инсулина экспрессировали в форме включений в клетке-хозяине соответственно.

E. coli трансформировали рекомбинантными векторами pET22b-аналог инсулина 1-4, содержащими нуклеиновые кислоты, кодирующие каждый из аналогов инсулина SEQ ID NO: 16, 18, 20, и 22, соответственно, и посредством этого получали трансформантов, экспрессировавших их в форме включений.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ получения аналога инсулина с использованием указанных трансформантов.

Предпочтительно, согласно настоящему изобретению предложен способ получения аналога инсулина, включающий:

а) получение рекомбинантного вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог инсулина;

б) трансформацию клетки-хозяина рекомбинантным вектором экспрессии и получение трансформанта из указанной клетки-хозяина;

в) культивирование трансформанта и экспрессию аналога инсулина; и

г) выделение и очистку экспрессированного пептида-аналога инсулина.

Среда, используемая для культивирования трансформантов по настоящему изобретению, должна соответствовать требованиям надлежащего культивирования клетки-хозяина. Источники углерода для включения в среду для выращивания клетки-хозяина могут быть надлежащим образом выбраны по решению специалиста в данной области в соответствии с трансформантами, получаемыми из указанной клетки-хозяина, и могут быть выбраны подходящие условия культивирования для контроля продолжительности культивирования и количества культивированных клеток.

Примеры используемых источников сахара могут включать сахара и углеводы, такие как глюкоза, сахароза, лактоза, фруктоза, мальтоза, крахмал и целлюлоза; масла и жиры, такие как соевое масло, подсолнечное масло, касторовое масло и кокосовое масло; жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота, стеариновая кислота и линолевая кислота; спирты, такие как глицерин и этанол; и органические кислоты, такие как уксусная кислота. Эти вещества могут быть использованы по отдельности или в комбинации.

Примеры используемых источников азота могут включать пептон, дрожжевой экстракт, мясной бульон, солодовый экстракт, жидкий кукурузный экстракт, соевую муку, мочевину или неорганические соединения, такие как сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат аммония, карбонат аммония и нитрат аммония. Источники азота могут быть использованы по отдельности или в комбинации.

Примеры используемых источников фосфора могут включать дигидрофосфат калия, гидрофосфат калия или соответствующую натрийсодержащую соль. В дополнение, культуральная среда может содержать соль металла, такую как сульфат магния или сульфат железа, необходимую для роста трансформанта. Кроме того, могут быть использованы вещества, необходимые для роста, такие как аминокислоты и витамины. Более того, в культуральных средах могут быть использованы подходящие предшественники. Указанные выше источники могут быть подходящим образом добавлены в культуру во время культивирования методом периодической культуры или непрерывной культуры. pH культуры можно подходящим образом корректировать с использованием основного соединения, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия и аммиак, или кислого соединения, такого как фосфорная кислота и/или серная кислота. В дополнение, может быть добавлен пеногаситель, такой как полигликолевый эфир жирной кислоты, для предотвращения пенообразования. Кроме того, для поддержания аэробного состояния культуры в нее может быть добавлен кислород или кислородсодержащий газ (например, воздух). Трансформанта по настоящему изобретению можно культивировать при 20-45°C и предпочтительно при 25-40°C. Кроме того, культивирование продолжают до получения максимального количества желаемых аналогов инсулина, и, в связи с этим, продолжительность культивирования может обычно составлять от 10 до 160 ч.

Как описано выше, трансформант по настоящему изобретению может продуцировать аналоги инсулина при обеспечении условий культивирования, подходящих для клеток-хозяев, и пептид-N-гликозидаза, образуемая ими в соответствии с составом вектора и характеристиками клеток-хозяев, может поступать в цитоплазму или периплазматическое пространство клеток-хозяев или во внеклеточную среду.

Экспрессированные белки, расположенные внутри или вне клетки-хозяина, могут быть очищены

обычным методом.

Примеры методов очистки могут включать высаливание (например, осаждение сульфатом аммония, осаждение фосфатом аммония и так далее), осаждение растворителем (например, осаждение белковой фракции с использованием ацетона или этанола и так далее), диализ, гель-фильтрацию, ионный обмен или хроматографию, такую как колоночная хроматография с обращенной фазой, ультрафильтрация и так далее, и эти методы могут быть применены по отдельности или в комбинации.

Трансформант по настоящему изобретению характеризуется экспрессией аналогов инсулина 1-3 с рекомбинантного вектора pET22b-аналог инсулина 1-3 в форме включений под контролем промотора T7. Соответственно, предпочтительно преобразование аналогов инсулина 1-3, экспрессированных в форме включений, в растворимую форму с их последующим выделением и очисткой.

В типичном воплощении настоящее изобретение может дополнительно включать следующие стадии выделения и очистки аналогов инсулина, экспрессированных в форме включений, из трансформанта:

d-1) получение клеток трансформанта из культуры и их измельчение;

d-2) выделение экспрессированного пептида-аналога инсулина из лизата измельченных клеток с его последующим рефолдингом;

d-3) очистку пептида-аналога инсулина, прошедшего рефолдинг, посредством катионообменной хроматографии;

d-4) обработку очищенного пептида-аналога инсулина трипсином и карбоксипептидазой B; и

d-5) последовательную очистку обработанного пептида-аналога инсулина катионообменной хроматографией и анионообменной хроматографией.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложена фармацевтическая композиция для лечения диабета, содержащая указанные выше аналоги инсулина.

Фармацевтическая композиция, содержащая аналоги инсулина по настоящему изобретению, может содержать фармацевтически приемлемый носитель. Примеры фармацевтически приемлемого носителя для перорального введения могут включать связывающий агент, скользящий агент, разрыхлитель, эксципиент, солюбилизирующий агент, диспергирующий агент, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, корригент и так далее; для инъекционных композиций могут быть смешаны для применения буферный агент, консервант, анальгетик, изотонический агент, стабилизирующий агент и так далее; и в композициях для местного применения могут быть использованы основа, эксципиент, смазывающий агент, консервант и так далее. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена сочетанием с различными фармацевтически приемлемыми носителями, описанными выше. Например, для перорального введения фармацевтическая композиция может быть изготовлена в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и так далее. Для инъекций фармацевтическая композиция может быть изготовлена в форме однодозовых ампул или многодозовых контейнеров. Кроме того, фармацевтическая композиция может также быть изготовлена в форме растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул и композиций с длительным высвобождением.

В то же время, примеры подходящих носителей, эксципиентов и разбавителей могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, вода, метилгидроксибензоат, пропилгидроксибензоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и так далее. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающий агент, увлажнитель, корригент, эмульгатор, консервант и так далее.

В еще одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения диабета, включающий введение фармацевтической композиции, содержащей аналоги инсулина по настоящему изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом.

Аналоги инсулина по настоящему изобретению демонстрируют значительно улучшенный in vitro-эффект по сравнению с нативным инсулином, и поэтому ожидают, что введение фармацевтической композиции, содержащей указанные выше аналоги инсулина, может быть эффективным для лечения диабета.

При использовании здесь термин "введение" относится к введению определенного вещества пациенту подходящим способом, и конъюгат по настоящему изобретению может быть введен любым известным способом введения, при условии, что лекарственное средство сможет проникнуть в целевую ткань. Например, может быть проведено внутрибрюшинное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, внутрикожное, пероральное, местное, интраназальное, внутрилегочное и ректальное введение, но путь введения не ограничен указанными вариантами. Тем не менее, из-за расщепления пептидов при пероральном введении активные ингредиенты композиции для перорального введения должны быть заключены в оболочку или включены в композицию для защиты от расщепления в желудке. Предпочтительно, настоящая композиция может быть введена в форме для инъекций. Кроме того, фармацевтическая композиция может быть введена с использованием определенного устройства, обеспечивающего транспорт активных ингредиентов в целевую клетку.

Кроме того, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению могут определять тип ле-

карственного средства, используемого в качестве активного компонента, а также ряд соответствующих факторов, включая типы заболеваний, подлежащих лечению, пути введения, возраст, пол и массу тела пациента и тяжесть заболевания. Поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению имеет отличные продолжительность сохранения и титр in vivo, это позволяет существенно снизить частоту введения и дозу фармацевтических лекарственных средств по настоящему изобретению.

Вариант осуществления изобретения

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

Пример 1. Конструирование и экспрессия вектора для аналогов инсулина.

Для конструирования аналогов инсулина с модификацией аминокислоты (аминокислот) А-цепи и/или В-цепи нативного инсулина синтезировали пары праймеров, состоящие из прямого праймера и обратного праймера, для амплификации аналогов инсулина с введением соответствующей модификации и затем проводили ПЦР с использованием кДНК проинсулина в качестве матрицы. В частности, использовали матрицу, где кДНК проинсулина (SC128255, OriGene) (см. последовательности BC005255.1 и AAH05255) была клонирована в вектор pET22b (Novagen) и для оптимальной рекомбинантной экспрессии инсулина нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 23 (ATG GCA ACA ACA TCA ACA GCA ACT ACG CGT), кодирующая аминокислотную последовательность Met Ala Thr Thr Ser Thr Ala Thr Thr Arg (SEQ ID NO: 24), была введена в клонированную кДНК проинсулина в качестве N-концевого партнера по слиянию.

Конкретно, в настоящем изобретении были синтезированы следующие аналоги инсулина, содержащие аминокислотные модификации, показанные в табл. 1.

Таблица 1

	Аминокислотные модификации
Аналог инсулина 1	A^{14} Tyr → Glu
Аналог инсулина 2	A^{14} Tyr → Asn
Аналог инсулина 3	A^{14} Tyr → Glu + делеция B^{25}
Аналог инсулина 4	A^{14} Tyr → Ala + B^{16} Tyr → Glu, делеция B^{25}

В табл. 1 выше аналог инсулина 1 представляет собой аналог с заменой 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности А-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 1, т.е. тирозина, на глутаминовую кислоту;

аналог инсулина 2 представляет собой аналог с заменой 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности А-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 1, т.е. тирозина, на аспарагин;

аналог инсулина 3 представляет собой аналог с заменой 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности А-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 1, т.е. тирозина, на глутаминовую кислоту и делецией 25-й аминокислоты аминокислотной последовательности В-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 2, т.е. фенилаланина; и

аналог инсулина 4 представляет собой аналог с заменой 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности А-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 1, т.е. тирозина, на аланин, заменой 16-й аминокислоты аминокислотной последовательности В-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 2, т.е. тирозина, на глутаминовую кислоту и делецией 25-й аминокислоты аминокислотной последовательности В-цепи нативного инсулина, представленной SEQ ID NO: 2, т.е. фенилаланина.

Соответствующие пары прямых праймеров и обратных праймеров, разработанные для амплификации аналогов инсулина 1-3, показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2

	Последовательность	SEQ ID NO:
Аналог инсулина 1	5'-ccagcatctgctccctcgaacagctggagaactactg-3'	5
	5'-cagtagttctccagctgttcgagggagcagatgctgg-3'	6
Аналог инсулина 2	5'-cagcatctgctccctcaaccagctggagaactac-3'	7
	5'-gtagttctccagctggttgagggagcagatgctg-3'	8
Аналог инсулина 3	5'-ccagcatctgctccctcgaacagctggagaactactg-3'	5
	5'-cagtagttctccagctgttcgagggagcagatgctgg-3'	6
	5'-gcggggaacgaggcttctacacacccaagacccg-3'	9
	5'-cgggtcttgggtgtgtagaagcctcgttccccgc-3'	10
Аналог инсулина 4	5'-cagcatctgctccctcgcccagctggagaactac-3'	11
	5'-gtagttctccagctgggcgagggagcagatgctg-3'	12
	5'-ctggtggaagctctcgagctagtgtgcggggaac-3'	13
	5'-gttccccgcacactagctcgagagcttccaccag-3'	14
	5'-gcggggaacgaggcttctacacacccaagacccg-3'	9
	5'-cgggtcttgggtgtgtagaagcctcgttccccgc-3'	10

В табл. 2 выше пара праймеров, состоящая из SEQ ID NO: 5 и 6, была разработана для замены 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности A-цепи нативного инсулина, т.е. тирозина, на глутаминовую кислоту; пара праймеров, состоящая из SEQ ID NO: 7 и 8, была разработана для замены 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности A-цепи нативного инсулина, т.е. тирозина, на аспарагин; пара праймеров, состоящая из SEQ ID NO: 9 и 10, была разработана для делеции 25-й аминокислоты аминокислотной последовательности B-цепи нативного инсулина, т.е. фенилаланина; пара праймеров, состоящая из SEQ ID NO: 11 и 12, была разработана для замены 14-й аминокислоты аминокислотной последовательности A-цепи нативного инсулина, т.е. тирозина, на аланин; и пара праймеров, состоящая из SEQ ID NO: 13 и 14, была разработана для замены 16-й аминокислоты аминокислотной последовательности B-цепи нативного инсулина, т.е. тирозина, на глутаминовую кислоту.

Для проведения ПЦР для амплификации аналогов инсулина с соответствующими модификациями готовили реакционный раствор, смешивая 150 нг ДНК-матрицы, 1 мл каждого 100 пМ праймера, 5 мл 2,5 мМ dNTP, 10 единиц pfx-полимеразы (Invitrogen, США) и 10X буферный раствор. Реакционный раствор подвергали начальной денатурации при 95°C в течение 30 с с последующим повторением 18 циклов отжига при 95°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 68°C в течение 6 мин и, в завершение, оставляли при 68°C на 5 м. Полученные таким образом ПЦР-амплифицированные продукты выделяли с использованием набора для выделения из геля (Qiagen, Германия) и обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI, получая фрагменты для введения. Вектор pET22b (Novagen, США) затем расщепляли теми же рестриктазами и полученные фрагменты выделяли с использованием того же набора для выделения из геля. Указанные выше фрагменты для введения лигировали с подготовленным таким образом вектором, используя лигазу T4, с получением векторов экспрессии pET22b-аналог инсулина 1-4. Указанные векторы экспрессии содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности аналогов инсулина 1-4, под контролем промотора T7, и эти векторы позволяют экспрессировать белки-аналоги инсулина в форме включений в клетке-хозяине.

Полученный таким образом вектор экспрессии pET22b-аналог инсулина 1 по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15, кодирующую аналог инсулина, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16; полученный таким образом вектор экспрессии pET22b-аналог инсулина 2 по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 17, кодирующую аналог инсулина, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18; полученный таким образом вектор экспрессии pET22b-аналог инсулина 3 по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19, кодирующую аналог инсулина, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20; и полученный таким образом вектор экспрессии pET22b-аналог инсулина 4 по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 21, кодирующую аналог инсулина, имеющий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22.

Последовательности ДНК и последовательности белков каждого из аналогов инсулина 1-4 показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3

	Последовательность		SEQ ID NO:
Аналог инсулина 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 GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	15
	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	16
Аналог инсулина 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 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	17
	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	18

		Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Asn Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	
Аналог инсулина 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 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	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 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	20
Аналог инсулина 4	ДНК	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAG CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC 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 GCC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	21
	Белок	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly 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	22
		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 Ala Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	

Пример 2. Экспрессия рекомбинантных аналогов инсулина.

Рекомбинантную экспрессию аналогов инсулина по настоящему изобретению под контролем промотра T7 проводили следующим образом. E. coli BL21-DE3 (E. coli B F-dcm ompT hsdS(rB^-mB^-) gal λDE3) (Novagen, США) трансформировали каждым из векторов экспрессии аналогов инсулина, полученных в Примере 1. Трансформацию проводили с применением метода, рекомендованного Novagen, изготовителем E. coli BL21-DE3. Каждую отдельную колонию, трансформированную векторами экспрессии аналогов инсулина, собирали, засевали в 2X жидкую среду Лурия (Luria Broth, LB), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и культивировали при 37°C в течение 15 ч. Культуру рекомбинантных E. coli и 2X среду LB, содержащую 30% глицерина, смешивали в соотношении 1:1 (об./об.), аликвоты смеси по 1 мл помещали в каждую криопробирку, соответственно, и хранили при -140°C. Полученные клетки использовали как исходные для получения рекомбинантных аналогов инсулина.

Для экспрессии рекомбинантных аналогов инсулина по одной пробирке каждых исходных клеток разводили в 500 мл 2X LB и инкубировали на водяной бане с шейкером при 37°C в течение 14-16 ч. Инкубацию прекращали при достижении значения OD 5,0 или выше, и полученную культуру использовали в качестве посевной культуры. Посевную культуру засевали в 17 л ферментационной среды с использованием ферментера объемом 50 л (MSJ-U2, B.E. MARUBISHI, Япония) и начинали первую периодическую ферментацию. Культивирование проводили при 37°C и скорости перемешивания 500 об/мин с подачей воздуха 20 л/мин (1 об./об./мин) и поддержанием pH 6,70 30%-ной аммиачной водой. По мере ферментации при уменьшении количества питательных веществ в культуральной среде ферментацию

проводили в подпитываемой культуре, добавляя подпитывающий раствор. Мониторинг роста бактерий проводили по значениям OD, и при достижении значения OD 100 или более вносили IPTG в конечной концентрации 500 мкМ. После внесения культивирование продолжали еще приблизительно 23-25 ч. По завершении культивирования рекомбинантные бактерии выделяли центрифугированием и хранили при -80°C до использования.

Пример 3. Выделение и очистка рекомбинантных аналогов инсулина.

Для выделения и очистки рекомбинантных аналогов инсулина, экспрессированных в примере 2, из трансформантов клетки лизировали, как показано ниже, с последующим рефолдингом для преобразования аналогов инсулина, экспрессированных в форме нерастворимых в воде включений, в водорастворимую форму.

3-1. Выделение и рефолдинг рекомбинантных аналогов инсулина.

Конкретно, каждый клеточный осадок ресуспендировали в 1 л солюбилизирующего буферного раствора (50 мМ трис-HCl (pH 9,0), 1 мМ EDTA (pH 8,0), 0,2 М NaCl и 0,5% Triton X-100) и клетки лизировали с использованием микрофлюидайзера M-110EH (AC Technology Corp. Model M1475C) при давлении 15000 psi (103,4 МПа). Клеточные лизаты центрифугировали при 7000 об/мин и 4°C в течение 20 мин и супернатант удаляли. Полученный осадок ресуспендировали в 3 л промывочного буфера (0,5% Triton X-100, 50 мМ трис (pH 8,0), 0,2 М NaCl и 1 мМ EDTA). Проводили центрифугирование при 7000 об/мин и 4°C в течение 20 мин и полученный осадок ресуспендировали в дистиллированной воде с последующим центрифугированием таким же образом. Каждый из полученных осадков ресуспендировали в 400 мл буферного раствора (1 М глицина, 3,78 г цистеина-HCl, pH 10,6) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Для выделения ресуспендированных рекомбинантных аналогов инсулина к ним добавляли 400 мл 8 М мочевины и перемешивали при 40°C в течение 1 ч. Для рефолдинга солюбилизированных рекомбинантных аналогов инсулина полученную смесь центрифугировали при 7000 об/мин и 4°C в течение 20 мин и отбирали супернатант. Супернатант перемешивали при 4°C в течение 16 ч с добавлением 7,2 л дистиллированной воды с использованием перистальтического насоса при скорости потока 1000 мл/ч.

3-2. Очистка катионообменной хроматографией.

Образцы, в которых был проведен рефолдинг в примере 3-1, соответствующим образом наносили на катионообменную колонку (Source S, GE Healthcare), уравновешенную буферным раствором с 20 мМ цитрата натрия (pH 2,0), содержащим 45%-ной этанол для конъюгации. Белки-аналоги инсулина затем элюировали из колонки с линейным градиентом концентрации от 0 до 100% в 10 объемах колонки с использованием буферного раствора с 20 мМ цитрата натрия (pH 2,0), содержащего 0,5 М хлорида калия и 45%-ной этанол.

3-3. Обработка трипсином и карбоксипептидазой B.

Из образцов, элюированных в примере 3-2, с использованием обессоливающей колонки удаляли соли с последующей их заменой буферным раствором (10 мМ трис-HCl, pH 8,0). Образцы обрабатывали трипсином в соответствии с молярным отношением 1000 по количеству белка в образце и карбоксипептидазой B в соответствии с молярным отношением 2000 по количеству белка в образце и перемешивали при 16°C в течение 16 ч. Реакцию останавливали, снижая pH до 3,5 с использованием 1 М цитрата натрия (pH 2,0).

3-4. Очистка катионообменной хроматографией.

Образцы, в которых была завершена реакция в примере 3-3, соответствующим образом повторно наносили на катионообменную колонку (Source S, GE Healthcare), уравновешенную буферным раствором с 20 мМ цитрата натрия (pH 2,0), содержащим 45%-й этанол для конъюгации. Белки-аналоги инсулина затем элюировали из колонки с линейным градиентом концентрации от 0 до 100% в 10 объемах колонки с использованием буферного раствора с 20 мМ цитрата натрия (pH 2,0), содержащего 0,5 М хлорида калия и 45%-ной этанол

3-5. Очистка анионообменной хроматографией.

Из образцов, элюированных в примере 3-4, удаляли соли с использованием обессоливающей колонки с последующей их заменой буферным раствором (10 мМ трис-HCl, pH 7,5). Для выделения чистых аналогов инсулина из полученных таким образом образцов полученные образцы соответствующим образом наносили на анионообменную колонку (Source Q, GE Healthcare), уравновешенную буферным раствором с 10 мМ трис (pH 7,5) для конъюгации. Белки-аналоги инсулина затем элюировали из колонки с линейным градиентом концентрации от 0 до 100% в 10 объемах колонки с использованием буферного раствора с 10 мМ трис (pH 7,5), содержащего 0,5 М хлорида натрия.

Чистоту очищенных аналогов инсулина анализировали белковым электрофорезом (SDS-PAGE) и хроматографией с обращенной фазой и эксклюзионной хроматографией, и результаты показаны на фиг. 1 и 2, соответственно. Кроме того, модификации аминокислот подтверждали пептидным картированием и анализом молекулярной массы каждого пика, и результаты показаны на фиг. 3.

В результате, желаемые целевые модификации аминокислотной последовательности каждого из аналогов инсулина были подтверждены.

Пример 4. Сравнение in vitro-эффекта нативного инсулина и аналогов инсулина.

Для оценки in vitro-эффекта аналогов инсулина, выделенных и очищенных в примере 3, проводили эксперимент способности к абсорбции глюкозы (способности к поглощению глюкозы или синтезу липидов) с использованием клеточной линии мышиного происхождения 3T3-L1 с адипоцитарной дифференцировкой. Клеточную линию 3T3-L1 (ATCC, CL-173) субкультивировали с использованием модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco, номер по каталогу 12430), содержащей 10% сыворотки новорожденных телят (bovine newborn calf serum, NBCS) два-три раза в неделю. Клеточную линию 3T3-L1 суспендировали в дифференцировочной среде (DMEM, содержащая 10% FBS), высевали в 48-луночный планшет в концентрации 5×10 клеток на лунку и культивировали при 37°C в течение 48 ч. Для дифференцировки клеточной линии 3T3-L1 с образованием адипоцитов в дифференцировочную среду добавляли 1 мкг/мл человеческого инсулина (Sigma, номер по каталогу 19278), 0,5 мМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин, Sigma, номер по каталогу 15879) и 1 мкМ дексаметазон (Sigma, номер по каталогу D4902), старую среду удаляли и в каждую лунку вносили по аликвоте полученной смеси в количестве 250 мкл на лунку. Через сорок восемь часов среду заменяли дифференцировочной средой с добавлением только 1 мкг/мл человеческого инсулина. Индукцию дифференцировки клеточной линии 3T3-L1 с образованием адипоцитов затем подтверждали на протяжении периода продолжительностью от 7 до 9 суток, заменяя среду дифференцировочной средой, содержащей 1 мкг/мл человеческого инсулина, с 48-часовыми интервалами.

Для эксперимента способности к абсорбции глюкозы клетки, завершившие свою дифференцировку с образованием адипоцитов, промывали один раз свободной от сыворотки средой DMEM и затем обрабатывали с использованием 250 мкл свободной от сыворотки среды DMEM в течение 4 ч для удаления из них сыворотки.

Человеческий инсулин и аналоги инсулина, соответственно, подвергали 10-кратному серийному разведению от 5 мкМ до 0,005 нМ свободной от сыворотки средой DMEM для дальнейшего использования в качестве образцов. Полученные таким образом образцы инсулина вносили в соответствующие лунки в количестве 250 мкл и проводили культивирование при 37°C в течение 24 ч в инкубаторе с 5% CO_2. Для оценки количества глюкозы, оставшейся в среде по завершении культивирования, из каждой культуры получали образец объемом 200 мкл, разводили его в 5 раз с использованием D-PBS и подвергали GOPOD-анализу (GOPOD Assay Kit, Megazyme, номер по каталогу K-GLUC). Концентрацию оставшейся глюкозы рассчитывали, исходя из оптической плотности стандартного раствора глюкозы, вычисляли соответствующие значения EC_{50} относительно способности к поглощению глюкозы под действием аналогов инсулина, и результаты показаны в табл. 4 ниже.

Таблица 4

	Способность к поглощению глюкозы
	(по сравнению с нативным инсулином) (%)
Нативный человеческий инсулин	100
Аналог инсулина 1	238,4
Аналог инсулина 2	241,7
Аналог инсулина 3	705

Как показано в табл. 4, аналог инсулина 1 продемонстрировал повышение способности к поглощению глюкозы на 238,4%, аналог инсулина 2 продемонстрировал повышение на 241,7% и аналог инсулина 3 продемонстрировал повышение на 705% по сравнению с нативным инсулином соответственно.

На основании представленных выше результатов было подтверждено, что аналоги инсулина по настоящему изобретению демонстрируют выдающийся in vitro-эффект, в 2-7 раз превосходящий эффект нативного инсулина, и эти результаты демонстрируют, что указанные аналоги инсулина могут иметь существенно увеличенный период полувыведения из сыворотки in vivo и могут, таким образом, быть представлены в форме стабильных инсулиновых композиций и эффективно использованы в качестве терапевтических агентов для лечения диабета.

Специалистам в данной области будет ясно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без выхода за рамки его сущности или основных признаков. Описанные воплощения следует рассматривать во всех отношениях только как наглядные и не ограничивающие. Таким образом, объем настоящего изобретения определен приложенной формулой изобретения, но не предшествующим описанием. Все изменения в рамках значения и диапазона эквивалентности формулы изобретения следует рассматривать как включенные в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид проинсулин, содержащий А-цепь с SEQ ID NO: 3, указанную в следующей общей формуле 1, и В-цепь с SEQ ID NO: 4, указанную в следующей общей формуле 2, где аналог инсулина, содержащий А-цепь и В-цепь, может образовываться при процессинге указанного пептида проинсулина:

(общая формула 1)

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa2-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa3-Leu-Xaa4-Gln-Xaa5-Glu-Asn-Xaa6-Cys-Xaa7 (SEQ ID NO: 3),

(общая формула 2)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa8-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Xaa9-Tyr-Xaa10-Xaa11-Lys-Thr (SEQ ID NO: 4), где:

(a) в A-цепи с SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин; и

в B-цепи с SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин.

2. Пептид проинсулин по п.1, где пептид (a) содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20.

3. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид проинсулин по п.1 или 2.

4. Нуклеиновая кислота по п.3, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

5. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.3.

6. Клетка-хозяин, содержащая рекомбинантный вектор экспрессии по п.5.

7. Клетка-хозяин по п.6, представляющая собой E. coli.

8. Способ получения аналога инсулина, включающий:

a) получение рекомбинантного вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид проинсулин по п.1;

б) трансформирование клетки-хозяина рекомбинантным вектором экспрессии и получение ее трансформанта;

в) культивирование трансформанта и экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид проинсулин; и

г) выделение и очистку экспрессированного пептида проинсулина, и затем его процессинг с получением аналога инсулина.

9. Способ по п.8, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

10. Способ по п.8, где трансформант представляет собой E. coli.

11. Способ по п.8, где стадия (г) включает:

d-1) получение клеток трансформанта из культуры и их измельчение;

d-2) выделение экспрессированного пептида проинсулина из лизата измельченных клеток с его последующим рефолдингом;

d-3) очистку пептида проинсулина, прошедшего рефолдинг, посредством катионообменной хроматографии;

d-4) обработку очищенного пептида проинсулина трипсином и карбоксипептидазой B; и

d-5) последовательную очистку аналога инсулина катионообменной хроматографией и анионообменной хроматографией.

12. Аналог инсулина, содержащий A-цепь с SEQ ID NO: 3, указанную в следующей общей формуле 1, и B-цепь с SEQ ID NO: 4, указанную в следующей общей формуле 2:

(общая формула 1)

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa2-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa3-Leu-Xaa4-Gln-Xaa5-Glu-Asn-Xaa6-Cys-Xaa7 (SEQ ID NO: 3),

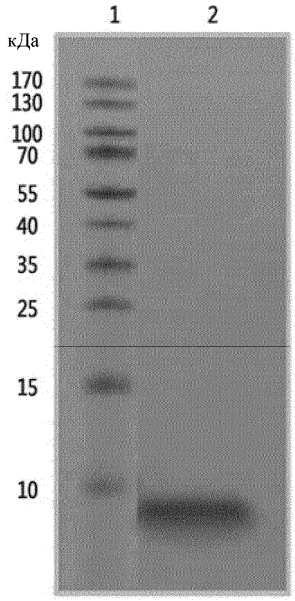
(общая формула 2)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa8-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Xaa9-Tyr-Xaa10-Xaa11-Lys-Thr (SEQ ID NO: 4), где:

(a) в A-цепи с SEQ ID NO: 3 Xaa1 представляет собой глицин, Xaa2 представляет собой глутамин, Xaa3 представляет собой серин, Xaa4 представляет собой глутаминовую кислоту, Xaa5 представляет собой лейцин, Xaa6 представляет собой тирозин и Xaa7 представляет собой аспарагин; и

в B-цепи с SEQ ID NO: 4 Xaa8 представляет собой тирозин, Xaa9 отсутствует, Xaa10 представляет собой треонин и Xaa11 представляет собой пролин.

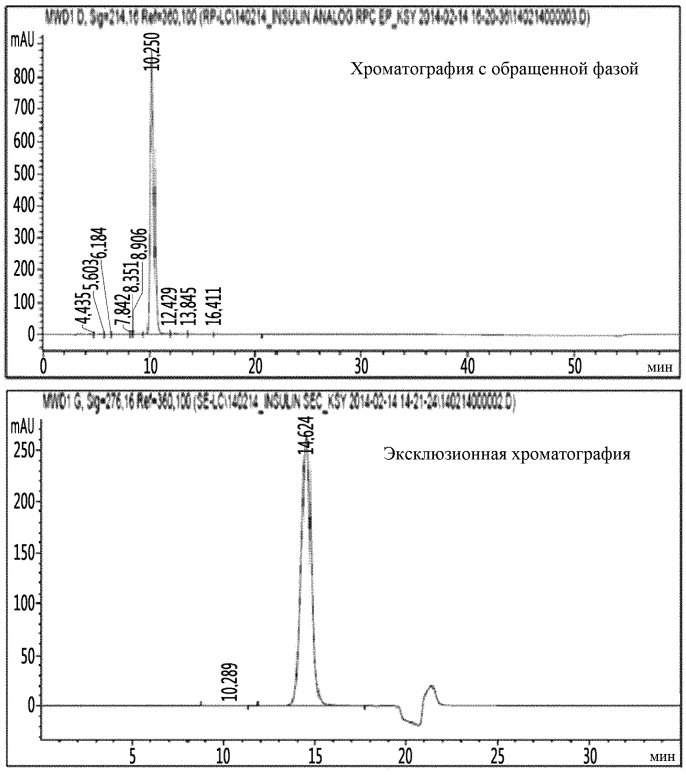
13. Фармацевтическая композиция для лечения диабета, содержащая аналог инсулина по п.12 и фармацевтически приемлемый носитель.



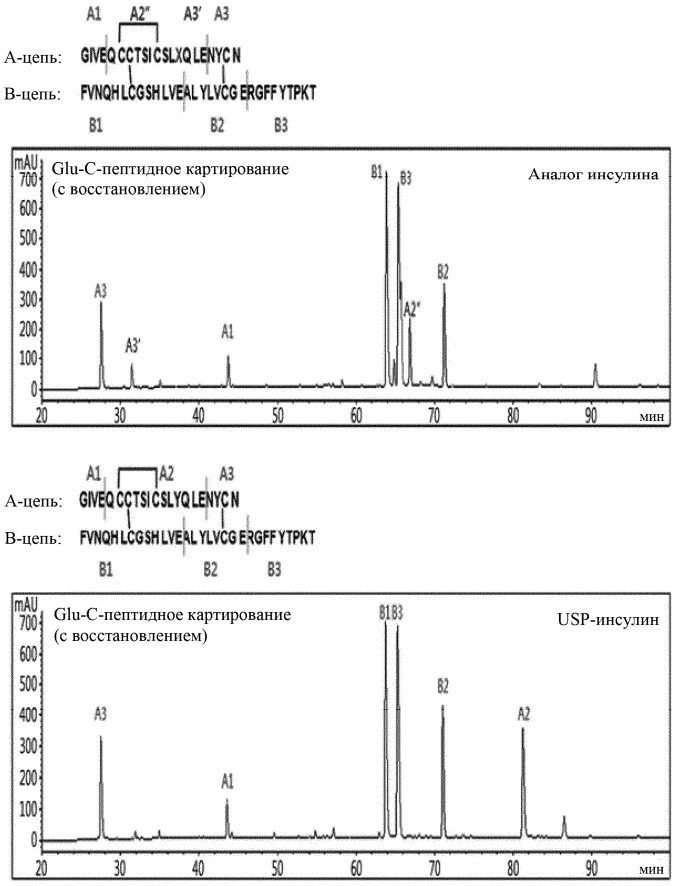
1. Маркер размера

2. Аналог инсулина

Фиг. 1



Фиг. 2


A1 A2'' A3' A3
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
B-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
B1 B2 B3
Glu-C-пептидное картирование
(с восстановлением)
Аналог инсулина
mAU
A3
A3'
A1
B1
B3
A2''
B2
мин
A1 A2 A3
A-цепь: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
B-цепь: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
B1 B2 B3
Glu-C-пептидное картирование
(с восстановлением)
USP-инсулин
B1B3
A3
A1
B2
A2
мин

Фиг. 3