

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042163**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.01.20**

**(21)** Номер заявки  
**201990011**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.29**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/26* (2006.01)  
*A61K 47/50* (2017.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*C07K 14/605* (2006.01)  
*A61K 38/28* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)

---

**(54) ПРОИЗВОДНОЕ ГЛЮКАГОНА, КОНЬЮГАТ НА ЕГО ОСНОВЕ, СОДЕРЖАЩАЯ ИХ КОМПОЗИЦИЯ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 10-2016-0081995; 10-2016-0182982;  
10-2017-0069217

**(32)** 2016.06.29; 2016.12.29; 2017.06.02

**(33)** KR

**(43)** 2019.06.28

**(86)** PCT/KR2017/006922

**(87)** WO 2018/004283 2018.01.04

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

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

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

**(56)** WO-A2-2012169798  
KR-A-1020120010146  
KR-A-1020130018410  
US-B2-7994122  
US-B2-8454971

---

**(57)** Изобретение относится к применению пептида, представляющего собой производное глюкагона, и к применению конъюгата на его основе для лечения врожденного гиперинсулинизма.

---

**B1**

**042163**

**042163**

**B1**

### Область техники

Изобретение относится к производному глюкагона, конъюгату на его основе и содержащей их композиции, а также их применению, в частности, их терапевтическому применению в отношении метаболического синдрома, гипогликемии и врожденного гиперинсулинизма.

#### Предшествующий уровень техники

В связи с наблюдаемым в последнее время экономическим ростом и изменениями привычного рациона питания и т.д. число случаев заболеваний, связанных с метаболическим синдромом, в том числе таких разнообразных заболеваний, как ожирение, гиперлипидемия, гипертензия, артериосклероз, гиперинсулинемия, диабет и заболевания печени, быстро возрастает. Эти заболевания могут возникать независимо, но, как правило, в большинстве случаев они возникают в тесной взаимосвязи друг с другом и сопровождаются различными симптомами.

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

Однако лечить ожирение трудно, поскольку оно представляет собой сложное заболевание, связанное с механизмами контроля аппетита и энергетического метаболизма. Соответственно, лечение ожирения требует не только усилий пациентов с ожирением, но и способа, с использованием которого можно лечить аномальные механизмы, связанные с контролем аппетита и энергетическим метаболизмом. Поэтому были предприняты усилия по разработке лекарственных средств для лечения таких аномальных механизмов.

В результате этих усилий были разработаны такие лекарственные средства, как Rimonabant® (Sanofi-Aventis), Sibutramin® (Abbott), Contrave® (Takeda), Orlistat® (Roche) и т.д., но их недостатками являются серьезные неблагоприятные эффекты или очень слабые эффекты против ожирения. Например, согласно сообщению, Rimonabant® оказывает побочный эффект в виде нарушений центральной нервной системы, Sibutramine® и Contrave® оказывают сердечно-сосудистые побочные эффекты, и Orlistat® демонстрирует уменьшение массы тела лишь примерно на 4 кг при приеме в течение одного года.

Что касается глюкагона, то он продуцируется поджелудочной железой, когда уровни глюкозы в крови падают в результате приема других лекарственных средств, или вследствие заболеваний, или дефицита гормонов либо ферментов. Глюкагон посылает сигнал для расщепления гликогена в печени и последующего высвобождения глюкозы и участвует в повышении уровней глюкозы в крови до нормального диапазона. Кроме того, показано, что глюкагон эффективен при лечении гипогликемии. Гипогликемический терапевтический эффект глюкагона является результатом стимуляции деградации гликогена до глюкозы (расщепления гликогена) или усиления выработки глюкозы (биосинтеза глюкозы), происходящей из аминокислот-предшественников, что приводит к увеличению оттока глюкозы из печени.

Помимо эффекта повышения уровней глюкозы в крови глюкагон снижает аппетит и активирует чувствительную к гормонам липазу адипоцитов, способствуя липолизу, и за счет этого оказывает эффект против ожирения. Однако применение глюкагона в качестве терапевтического агента ограничено, поскольку он имеет низкую растворимость и осаждается при нейтральных pH.

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

Одно из производных глюкагона, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), находится в стадии разработки в качестве терапевтического агента для лечения гипергликемии у пациентов с диабетом. Функции GLP-1 заключаются в стимулировании синтеза и секреции инсулина, ингибировании секреции глюкагона, замедлении опорожнения желудка, усилении утилизации глюкозы и торможения всасывания питательных веществ.

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

Поэтому в качестве альтернативы GLP-1 много внимания было уделено оксинтомодулину, который может связываться с рецепторами двух пептидов, GLP-1 и глюкагона. Оксинтомодулин представляет собой пептид, полученный из предшественника глюкагона, пре-глюкагона, и имеет функции торможения всасывания питательных веществ и усиления насыщения подобно GLP-1 и обладает липолитической активностью подобно глюкагону, что повышает его эффективность в терапии, направленной против ожирения.

Однако оксинтомодулин или его производные имеют серьезный недостаток, заключающийся в необходимости ежедневного введения избыточного количества лекарственного средства, поскольку они

имеют низкую эффективность и короткий период полувыведения *in vivo*. Кроме того, когда в составе одного пептида имеются обе активности, GLP-1 и глюкагона, соотношение этих активностей получается неизменным, и поэтому применение агониста двойного действия с различными соотношениями становится затруднительным. Соответственно, комбинированная терапия, позволяющая использовать различные соотношения активностей путем регулирования содержания GLP-1 и глюкагона, может быть более эффективной. Однако для комбинированной терапии необходимо улучшить физические характеристики глюкагона, который образует агрегаты при нейтральных pH и со временем осаждается, демонстрируя таким образом слабую растворимость.

Что касается врожденного гиперинсулинизма, то он является одной из наиболее общих причин тяжелой и персистирующей гипогликемии у новорожденных и детей. Инсулин представляет собой гормон, который в организме человека регулирует уровень глюкозы в крови. Он участвует в понижении уровней глюкозы в крови, когда уровень глюкозы в крови повышается вследствие всасывания питательных веществ и так далее. Однако, при врожденном гиперинсулинизме инсулин не выполняет такого действия, и поджелудочная железа секретирует инсулин независимо от уровней глюкозы в крови. В результате у пациентов развивается гипогликемия.

Если возникает гипогликемия, то уровни глюкозы, кетонов, лактозы и т.д., которые утилизируются в основном клетками головного мозга, не могут поддерживаться, и поступление энергии из белков и жиров в организме блокируется, что приводит к поражению клеток головного мозга и тем самым вызывает судороги, расстройства способности к обучению, церебральный паралич, слепоту и даже, в тяжелых случаях, смерть.

Гипогликемия может возникать на какое-то время вследствие чрезмерной секреции инсулина. Кроме того, гипогликемия также возникает у младенцев, перенесших дистресс плода. Хотя в этом случае причина секреции инсулина не выяснена, показатели гипогликемии могут быть улучшены в промежутке времени от нескольких суток до нескольких месяцев. Младенцы, рожденные матерями с сахарным диабетом, могут иметь преходящую гипогликемию, если уровень сахара должным образом не регулируется, но она не рецидивирует, если кормление протекает должным образом, и тогда гипогликемия исчезает. Другой причиной является персистирующий гиперинсулинизм вследствие тяжелых генетических дефектов. Как сообщается, причины гиперинсулинизма вследствие генетических дефектов включают мутацию в гене SUR или гене Kir6.2 на хромосоме 11p15.1 или мутацию в гене глюкокиназы (GK) на хромосоме 7p15-p13, повышение активности GK, в результате чего повышается активность GK, и мутацию в гене глутаматдегидрогеназы (GDH), в результате чего повышается активность GDH и тем самым повышается содержание аденозинтрифосфата (АТФ) в островковых бета-клетках и так далее.

Соответственно, для предупреждения поражения головного мозга важно провести немедленное лечение гипогликемии. Гипогликемию можно лечить путем приема углеводсодержащего напитка, но в тяжелом случае необходима инъекция глюкозы или глюкагона в вену. Цель лечения заключается в организации у детей нормального цикла питания с использованием защитного приспособления. Например, в случае младенцев в возрасте одного года можно оставлять их без пищи в течение по меньшей мере от 14 до 15 ч при одновременном приеме лекарственных средств, поскольку они спят без приема пищи в течение от 10 до 12 ч в ночное время.

Примеры используемых лекарственных средств могут включать диазоксид, октреотид, глюкагон и так далее. Диазоксид вводят перорально два или три раза в сутки. Диазоксид ингибирует секрецию инсулина, воздействуя на АТФ-зависимый  $K^+$  (КАТР) канал, и поэтому он может быть эффективным для лечения GK-опосредуемого гиперинсулинизма или GDH-опосредуемого гиперинсулинизма, но в случае аутосомно-рецессивного гиперинсулинизма, вызванного дефектом КАТР-опосредованного пути, зачастую он оказывается бесполезным. Октреотид вводят путем подкожной инъекции. В случае введения октреотида сначала его эффект проявляется, но иногда этот эффект уменьшается через некоторое время. Глюкагон стимулирует высвобождение глюкозы из печени, и его вводят путем подкожной или внутривенной инъекции, которую, как известно, используют тогда, когда пероральное введение в неотложной ситуации не применимо.

Среди всего прочего, в настоящее время глюкагон применяют в виде лиофилизированной композиции вследствие его низкой растворимости и выпадения в осадок при нейтральных pH, что является неудобным, поскольку перед применением его необходимо растворить в каком-либо растворителе. Кроме того, если глюкагон используют в качестве терапевтического агента для лечения врожденного гиперинсулинизма, и при этом требуется долгосрочное лечение вследствие короткого полупериода его существования, то применение глюкагона ограничено из-за частого введения.

#### **Описание изобретения**

Техническая проблема.

Задача изобретения заключается в создании композиции, содержащей производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и, в частности, фармацевтической композиции для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, содержащей производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона.

Задача изобретения также заключается в создании производного глюкагона.

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

Задача изобретения также заключается в создании выделенного конъюгата, который содержит пептидную группировку и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой.

Задача изобретения также заключается в создании набора, включающего в себя производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и, в частности, набора для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, включающего в себя производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона.

Задача изобретения также заключается в создании способа предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, включающего введение нуждающемуся в этом субъекту производного глюкагона или выделенного конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции.

Задача изобретения также заключается в обеспечении применения производного глюкагона или выделенного конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма.

Задача изобретения также заключается в создании способа предупреждения или лечения гипогликемии, включающего введение нуждающемуся в этом субъекту производного глюкагона или выделенного конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции.

Задача изобретения также заключается в обеспечении применения производного глюкагона или выделенного конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции в изготовлении лекарственного средства для предупреждения или лечения гипогликемии.

Задача изобретения также заключается в создании способа предупреждения или лечения метаболического синдрома, включающего введение нуждающемуся в этом субъекту производного глюкагона или выделенного конъюгата либо содержащей их композиции.

Задача изобретения также заключается в обеспечении применения производного глюкагона или выделенного конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции в изготовлении лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

Решение технической задачи.

Согласно одному из аспектов изобретения предложена композиция, содержащая производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и, в частности, фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, содержащая производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона.

В конкретном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей пептид, являющийся производным глюкагона, включающий аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 1, и, в частности, фармацевтической композиции для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, содержащей пептид, являющийся производным глюкагона, содержащий аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 1:

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

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

где X1 представляет собой гистидин (H), дезаминогистидил, N-диметилгистидил, β-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, β-карбоксамидазопропионил, триптофан (W) или тирозин (Y) либо отсутствует;

X2 представляет собой α-метил-глутаминовую кислоту, аминоизомасляную кислоту (Aib), D-аланин, глицин (G), Sar (N-метилглицин), серин (S) или D-серин;

X7 представляет собой треонин (T), валин (V) или цистеин (C);

X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X12 представляет собой лизин (K) или цистеин (C);

X13 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X14 представляет собой лейцин (L) или цистеин (C);

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или цистеин (C);

X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E), аспарагиновую кислоту (D), серин (S), α-метил-глутаминовую кислоту или цистеин (C) либо отсутствует;

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутамин (Q), глутаминовую кислоту (E), лизин (K), аргинин (R), серин (S), цистеин (C) или валин (V) либо отсутствует;

X18 представляет собой аланин (A), аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), аргинин (R), валин (V) или цистеин (C) либо отсутствует;

X19 представляет собой аланин (A), аргинин (R), серин (S), валин (V) или цистеин (C) либо отсут-

ствует;

X20 представляет собой лизин (K), гистидин (H), глутамин (Q), аспарагиновую кислоту (D), аргинин (R), α-метил-глутаминовую кислоту или цистеин (C) либо отсутствует;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), лейцин (L), валин (V) или цистеин (C) либо отсутствует;

X23 представляет собой изолейцин (I), валин (V) или аргинин (R) либо отсутствует;

X24 представляет собой валин (V), аргинин (R), аланин (A), цистеин (C), глутаминовую кислоту (E), лизин (K), глутамин (Q), α-метил-глутаминовую кислоту или лейцин (L) либо отсутствует;

X27 представляет собой изолейцин (I), валин (V), аланин (A), лизин (K), метионин (M), глутамин (Q) или аргинин (R) либо отсутствует;

X28 представляет собой глутамин (Q), лизин (K), аспарагин (N) или аргинин (R) либо отсутствует;

X29 представляет собой лизин (K), аланин (A), глицин (G) или треонин (T) либо отсутствует; и

X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует;

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

Далее следуют другие конкретные воплощения настоящего изобретения.

В частности, в случае фармацевтической композиции, соответствующей предшествующему конкретному воплощению:

в общей формуле 1

X1 представляет собой гистидин (H), триптофан (W) или тирозин (Y) либо отсутствует;

X2 представляет собой серин (S) или аминокислотную кислоту (Aib);

X7 представляет собой треонин (T), валин (V) или цистеин (C);

X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X12 представляет собой лизин (K) или цистеин (C);

X13 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X14 представляет собой лейцин (L) или цистеин (C);

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);

X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E), серин (S) или цистеин (C);

X17 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), лизин (K), аргинин (R), серин (S), цистеин (C) или валин (V);

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), аргинин (R) или цистеин (C);

X19 представляет собой аланин (A) или цистеин (C);

X20 представляет собой глутамин (Q), аспарагиновую кислоту (D), лизин (K) или цистеин (C);

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), лейцин (L), валин (V) или цистеин (C);

X23 представляет собой изолейцин (I), валин (V) или аргинин (R);

X24 представляет собой валин (V), аргинин (R), аланин (A), глутаминовую кислоту (E), лизин (K), глутамин (Q) или лейцин (L);

X27 представляет собой изолейцин (I), валин (V), аланин (A), метионин (M), глутамин (Q) или аргинин (R);

X28 представляет собой глутамин (Q), лизин (K), аспарагин (N) или аргинин (R);

X29 представляет собой треонин (T); и

X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений: в общей формуле 1

X1 представляет собой гистидин (H), триптофан (W) или тирозин (Y);

X2 представляет собой серин (S) или аминокислотную кислоту (Aib);

X7 представляет собой цистеин (C), треонин (T) или валин (V);

X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X12 представляет собой лизин (K) или цистеин (C);

X13 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X14 представляет собой лейцин (L) или цистеин (C);

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);

X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E), серин (S) или цистеин (C);

X17 представляет собой глутаминовую кислоту (E), лизин (K), аргинин (R), цистеин (C) или валин (V);

X18 представляет собой аргинин (R) или цистеин (C);

X19 представляет собой аланин (A) или цистеин (C);

X20 представляет собой глутамин (Q) или лизин (K);

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), валин (V) или цис-

теин (C);

- X23 представляет собой валин (V);
- X24 представляет собой валин (V) или глутамин (Q);
- X27 представляет собой метионин (M);
- X28 представляет собой аспарагин (N) или аргинин (R);
- X29 представляет собой треонин (T); и
- X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений: в общей формуле 1

- X1 представляет собой тирозин (Y);
- X2 представляет собой аминокислоту (Aib);
- X7 представляет собой цистеин (C), треонин (T) или валин (V);
- X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);
- X12 представляет собой лизин (K);
- X13 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);
- X14 представляет собой лейцин (L) или цистеин (C);
- X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);
- X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E), серин (S) или цистеин (C);
- X17 представляет собой лизин (K), аргинин (R), цистеин (C) или валин (V);
- X18 представляет собой аргинин (R) или цистеин (C);
- X19 представляет собой аланин (A) или цистеин (C);
- X20 представляет собой глутамин (Q) или лизин (K);
- X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или цистеин (C);
- X23 представляет собой валин (V);
- X24 представляет собой глутамин (Q);
- X27 представляет собой метионин (M);
- X28 представляет собой аспарагин (N) или аргинин (R);
- X29 представляет собой треонин (T); и
- X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений: в общей формуле 1

- X1 представляет собой гистидин (H), триптофан (W) или тирозин (Y) либо отсутствует;
- X2 представляет собой серин (S) или аминокислоту (Aib);
- X7 представляет собой треонин (T), валин (V) или цистеин (C);
- X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);
- X12 представляет собой лизин (K) или цистеин (C);
- X13 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);
- X14 представляет собой лейцин (L) или цистеин (C);
- X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);
- X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E), серин (S) или цистеин (C);
- X17 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), лизин (K), аргинин (R), серин (S), цистеин (C) или валин (V);

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), аргинин (R) или цистеин (C);

- X19 представляет собой аланин (A) или цистеин (C);
- X20 представляет собой глутамин (Q), аспарагиновую кислоту (D) или лизин (K);
- X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);
- X23 представляет собой валин (V);
- X24 представляет собой валин (V) или глутамин (Q);
- X27 представляет собой изолейцин (I) или метионин (M);
- X28 представляет собой аспарагин (N) или аргинин (R);
- X29 представляет собой треонин (T); и
- X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений: в общей формуле 1

- X1 представляет собой тирозин (Y);
- X2 представляет собой аминокислоту (Aib);
- X7 представляет собой треонин (T);
- X10 представляет собой тирозин (Y);
- X12 представляет собой лизин (K);
- X13 представляет собой тирозин (Y);
- X14 представляет собой лейцин (L);

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);  
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E), серин (S) или цистеин (C);  
 X17 представляет собой лизин (K) или аргинин (R);  
 X18 представляет собой аргинин (R);  
 X19 представляет собой аланин (A);  
 X20 представляет собой глутамин (Q), цистеин (C) или лизин (K);  
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), цистеин (C), валин (V) или глутаминовую кислоту (E);  
 X23 представляет собой валин (V) или аргинин (R);  
 X24 представляет собой глутамин (Q) или лейцин (L);  
 X27 представляет собой метионин (M);  
 X28 представляет собой аспарагин (N) или аргинин (R);  
 X29 представляет собой треонин (T); и  
 X30 отсутствует.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид содержит аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 2:

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

X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46),

где X7 представляет собой треонин (T), валин (V) или цистеин (C);  
 X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);  
 X12 представляет собой лизин (K) или цистеин (C);  
 X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);  
 X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или серин (S);  
 X17 представляет собой лизин (K) или аргинин (R);  
 X20 представляет собой глутамин (Q) или лизин (K);  
 X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);  
 X24 представляет собой валин (V) или глутамин (Q); и  
 X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид имеет значение изоэлектрической точки (pI), отличающееся от значения pI для нативного глюкогона (6,8), например, pI 6,5 или ниже либо pI 7,0 или выше.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений, в конкретном воплощении настоящего изобретения каждая аминокислота по меньшей мере в одной паре аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28 в общей формуле 1 или 2 заменена на глутаминовую кислоту или лизин, которые способны образовывать кольцо, соответственно.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений, в конкретном воплощении настоящего изобретения каждая аминокислота в паре аминокислот X12 и X16, или каждая аминокислота в паре аминокислот X16 и X20, или каждая аминокислота в паре аминокислот X17 и X21 в общей формуле 1 или 2 соответственно заменена на глутаминовую кислоту или лизин, которые способны образовывать кольцо.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений, в конкретном воплощении настоящего изобретения, в соединении общей формулы 1 или 2, образовано кольцо (например, лактамное кольцо) между каждой из аминокислот по меньшей мере в одной паре аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений, в конкретном воплощении настоящего изобретения, в соединении общей формулы 1 или 2, X16 представляет собой глутаминовую кислоту, X20 представляет собой лизин, и боковые цепи X16 и X20 образуют лактамное кольцо.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений С-конец пептида амидирован или не модифицирован.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид представляет собой производное нативного глюкогона, способное активировать рецептор глюкогона.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-44.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений

пептид содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид находится в форме длительно действующего конъюгата, в котором группировка биосовместимого вещества соединена с пептидной группировкой и, в частности, с пептидной группировкой, содержащей аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений группировка биосовместимого вещества выбрана из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn (неонатальный Fc-рецептор)-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или его производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и эластина.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептидная группировка и группировка биосовместимого вещества связаны посредством линкера.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер выбран из группы, состоящей из пептида, жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер представляет собой полиэтиленгликоль.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина агликозилирована.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина выбрана из группы, состоящей из:

- (а) константного домена 1 тяжелой цепи (СН1-домена), СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена;
- (б) СН1-домена и СН2-домена;
- (в) СН1-домена и СН3-домена;
- (г) СН2-домена и СН3-домена;
- (д) комбинации между одним доменом или по меньшей мере двумя доменами, выбранным(ыми) из СН1-домена, СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена, и шарнирной областью или частью шарнирной области иммуноглобулина; и
- (е) димера, образованного между каждым из доменов константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, находится в форме димера.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина представляет собой производное нативной Fc-области, в котором удален участок, способный образовывать дисульфидную связь, производное нативной Fc-области, в котором удалена часть аминокислот(ы) на N-конце, производное нативной Fc-области, в котором к N-концу добавлен остаток метионина, производное нативной Fc-области, в котором удален комплемент-связывающий сайт, или производное нативной Fc-области, в котором удален сайт антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина имеет происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область IgG4.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина представляет собой агликозилированную Fc-область, имеющую происхождение из человеческого IgG4.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений

линкер связан с остатком цистеина в пептиде, включающем аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений, в конкретном воплощении настоящего изобретения линкер в составе конъюгата соответственно присоединен к пептидной группировке и группировке биосовместимого вещества посредством ковалентных связей, которые образуются соответственно, когда один конец линкера взаимодействует с аминокислотной или тиоловой группой группировки биосовместимого вещества, в то время как другой конец линкера взаимодействует с аминокислотной или тиоловой группой пептидной группировки, содержащей аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено производное глюкагона.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к выделенному пептиду, включающему аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленную как SEQ ID NO: 45.

В другом конкретном воплощении настоящее изобретение относится к выделенному пептиду, содержащему аминокислотную последовательность нижеисследующей общей формулы 2:

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

X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46),

где X7 представляет собой треонин (T), валин (V) или цистеин (C);

X10 представляет собой тирозин (Y) или цистеин (C);

X12 представляет собой лизин (K) или цистеин (C);

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или цистеин (C);

X16 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или серин (S);

X17 представляет собой лизин (K) или аргинин (R);

X20 представляет собой глутамин (Q) или лизин (K);

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X24 представляет собой валин (V) или глутамин (Q); и

X30 представляет собой цистеин (C) или отсутствует.

В случае выделенного пептида по предшествующему конкретному воплощению пептиды, соответствующие SEQ ID NO: 19, 33, 49 и 50, могут быть исключены из числа выделенных пептидов, содержащих аминокислотную последовательность общей формулы 2.

В выделенном пептиде по любому из предшествующих конкретных воплощений в общей формуле 2 X16 представляет собой глутаминовую кислоту, X20 представляет собой лизин, и боковые цепи X16 и X20 образуют лактамное кольцо.

В выделенном пептиде по любому из предшествующих конкретных воплощений C-конец пептида, содержащего аминокислотную последовательность общей формулы 2, амидирован или не модифицирован.

В случае выделенного пептида по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид представляет собой производное глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона.

В случае выделенного пептида по любому из предшествующих конкретных воплощений пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенный пептид (в частности, выделенный пептид, который содержит аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2), вектор, включающий в себя выделенный полинуклеотид, и выделенная клетка, включающая в себя полинуклеотид или вектор.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен выделенный конъюгат, содержащий пептидную группировку и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой, в котором пептидная группировка имеет или содержит одну и ту же аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к выделенному конъюгату, содержащему пептидную группировку и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой, в котором пептидная группировка имеет или содержит одну и ту же аминокислотную последовательность общей формулы 1.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к выделенному конъюгату, содержащему пептидную группировку и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой, в котором пептидная группировка имеет или содержит одну и ту же аминокислотную последовательность общей формулы 2.

В конъюгате по предшествующему конкретному воплощению группировка биосовместимого вещества выбрана из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или его производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и

эластина.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений пептидная область и группировка биосовместимого вещества связаны посредством линкера.

В случае конъюгата по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер выбран из группы, состоящей из пептида, жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер представляет собой полимер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений группировка биосовместимого вещества представляет собой FcRn-связывающее вещество, и группировка биосовместимого вещества связана с пептидной группировкой посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из пептида, жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер представляет собой полиэтиленгликоль.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина не гликозилирована.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина выбрана из группы, состоящей из: (а) СН1-домена, СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена; (б) СН1-домена и СН2-домена; (в) СН1-домена и СН3-домена; (г) СН2-домена и СН3-домена; (д) комбинации между одним доменом или по меньшей мере двумя доменами, выбранным(ыми) из СН1-домена, СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена, и шарнирной областью или частью шарнирной области иммуноглобулина; и (е) димера, образованного между каждым из доменов константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, находится в форме димера.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина представляет собой производное нативной Fc-области, в котором удален участок, способный образовывать дисульфидную связь, производное нативной Fc-области, в котором удалена часть аминокислот(ы) на N-конце, производное нативной Fc-области, в котором к N-концу добавлен остаток метионина, производное нативной Fc-области, в котором удален комплемент-связывающий сайт, или производное нативной Fc-области, в котором удален сайт антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина имеет происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область IgG4.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений Fc-область иммуноглобулина представляет собой агликозилированную Fc-область, имеющую происхождение из человеческого IgG4.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер связан с остатком цистеина в пептиде.

В конъюгате по любому из предшествующих конкретных воплощений, в конкретном воплощении настоящего изобретения линкер в составе конъюгата соответственно присоединен к пептидной группировке и группировке биосовместимого вещества посредством ковалентных связей, которые образуются соответственно, когда один конец линкера взаимодействует с аминокислотной группой или тиоловой группой группировки биосовместимого вещества, в то время как другой конец линкера взаимодействует с аминокислотной группой или тиоловой группой пептидной группировки, включающей аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2, соответственно.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения гипогликемии, содержащая производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для предупреждения или лечения гипогликемии, содержащей выделенный пептид или выделенный конъюгат, содержащий пептидную группировку, которая имеет такую же последовательность, как и у выделенного пептида, или включает последовательность, содержащую такую же последовательность, и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения метаболического синдрома, содержащая производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В конкретном воплощении настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для предупреждения или лечения метаболического синдрома, которая содержит выделенный пептид; или выделенный конъюгат, содержащий пептидную группировку, которая имеет такую же последовательность, как и у выделенного пептида, или включает последовательность, содержащую такую же последовательность, и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, выбрано из группы, состоящей из инсулинотропного пептида, агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агониста рецептора лептина, ингибитора дипептидилпептидазы-IV (DPP-IV), антагониста Y5-рецептора, антагониста рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агониста Y2/4-рецептора, агониста меланокортинового рецептора 3/4 (MC 3/4), ингибитора желудочной/панкреатической липазы, агониста рецептора 5-гидрокситриптамина, типа 2C (5HT<sub>2c</sub>, G-белок-связанного), агониста β3A-рецептора, агониста рецептора амилина, антагониста грелина, антагониста рецептора грелина, агониста рецептора-альфа, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR $\alpha$ ), агониста рецептора-дельта, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR $\delta$ ), агониста фарнезоидного X-рецептора (FXR), ингибитора ацетил-СоА-карбоксилазы, пептида YY, холецистокинина (CCK), ксенина, глицентина, обестатина, секретина, несфатина, инсулина и глюкозозависимого инсулинотропного пептида (GIP).

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений инсулинотропный пептид выбран из группы, состоящей из GLP-1, эксендина-3, эксендина-4, их агониста, их производного, их фрагмента, их варианта и их комбинации.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений инсулинотропный пептид представляет собой производное инсулинотропного пептида, в котором N-концевой остаток гистидина инсулинотропного пептида заменен на остаток, выбранный из группы, состоящей из дезаминогистидила, N-диметилгистидила, β-гидроксиимидазопропионила, 4-имидазоацетила и β-карбоксиимидазопропионила.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений инсулинотропный пептид выбран из группы, состоящей из нативного эксендина-4; производного эксендина-4, в котором удалена N-концевая аминокислотная группа эксендина-4; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 заменена на гидроксильную группу; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 модифицирована диметильной группой; производного эксендина-4, в котором удален α-углеродный атом 1-й аминокислоты эксендина-4, гистидина; производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена на серин, и производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена на аргинин.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений инсулинотропный пептид находится в форме длительно действующего конъюгата, который содержит пептидную группировку, включающую ту же аминокислотную последовательность, что и последовательность инсулинотропного пептида, и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений группировка биосовместимого вещества выбрана из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или его производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и эластина.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуро-

новой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептидная группировка, содержащая аминокислотную последовательность инсулинотропного пептида, связана с группировкой биосовместимого вещества посредством линкера.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер выбран из группы, состоящей из пептида, жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений линкер представляет собой полимер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений метаболический синдром выбран из группы, состоящей из нарушенной толерантности к глюкозе, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ожирения, диабета, гипертензии, неалкогольного стеатогепатита (NASH), атеросклероза, вызванного дислипидемией, атеросклероза, артериосклероза, коронарной болезни сердца, инсульта и так далее.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений инсулинотропный пептид связан с группировкой биосовместимого вещества посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений группировка биосовместимого вещества представляет собой FcRn-связывающее вещество, а пептидная группировка, содержащая аминокислотную последовательность инсулинотропного пептида, присоединена к группировке биосовместимого вещества через пептидный линкер; или непептидный линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитинов, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В случае фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений композиция может включать как (1) конъюгат, содержащий пептидную группировку, включающую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37, и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой; так и (2) конъюгат, который содержит группировку имидазо-ацетил-эксендина-4, где удален  $\alpha$ -углеродный атом 1-й аминокислоты эксендина-4 (т.е. гистидина), и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с группировкой имидазо-ацетил-эксендина-4.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений пептидная группировка, содержащая аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37, и группировка имидазо-ацетил-эксендина-4 связаны с соответствующими им группировками биосовместимого вещества посредством линкера.

В фармацевтической композиции по любому из предшествующих конкретных воплощений FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, включающий введение производного глюкагона или конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции нуждающемуся в этом субъекту.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение производного глюкагона или содержащего его конъюгата либо содержащей их композиции для приготовления лекарственного средства для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения гипогликемии, включающий введение производного глюкагона или конъюгата, содержащего производное глюкагона, либо содержащей их композиции нуждающемуся в этом субъекту.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение производного глюкагона или содержащего его конъюгата либо содержащей их композиции для приготовления лекарственного средства для предупреждения или лечения гипогликемии.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения метаболического синдрома, включающий введение производного глюкагона или конъюгата, со-

держашего производное глюкагона, либо содержащей их композиции нуждающемуся в этом субъекту.

В конкретном воплощении способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного соединения или вещества, обладающего терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома.

В способе по любому из предшествующих конкретных воплощений производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, вводят одновременно, отдельно или последовательно.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение производного глюкагона, или содержащего его конъюгата, либо содержащей их композиции для приготовления лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения метаболического синдрома.

Преимущественные эффекты изобретения.

Производные глюкагона по настоящему изобретению обладают улучшенными физическими свойствами по сравнению со свойствами нативного глюкагона и могут быть эффективно использованы для предупреждения и лечения метаболического синдрома, такого как ожирение, диабет и неалкогольный стеатогепатит (NASH), и врожденного гиперинсулинизма.

Краткое описание графических материалов.

На фиг. 1 представлен график, иллюстрирующий изменения массы тела животных моделей ожирения (крыс), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, во время отдельного или совместного введения длительно действующего конъюгата на основе инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата на основе производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным с SEQ ID NO: 12) с использованием установленной дозы крысам с интервалами 3 суток в течение 15 суток.

На фиг. 2 представлен результат, иллюстрирующий количество брыжеечного жира животных моделей ожирения (крыс), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, во время отдельного или совместного введения длительно действующего конъюгата на основе инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата на основе производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным с SEQ ID NO: 12) с использованием установленной дозы крысам с интервалами 3 суток в течение 15 суток (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  относительно разбавителя при анализе методом однофакторного ANOVA (дисперсионный анализ)).

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

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

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

На фиг. 6 представлен результат, иллюстрирующий изменения массы тела, уровней холестерина в крови, количества жира и нарушенной толерантности к глюкозе животных моделей ожирения (мышей), которые были получены в результате кормления кормом с высоким содержанием жиров, после однократного введения лираглутида (Novo Nordisk) и длительно действующего конъюгата на основе инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) или совместного введения длительно действующего конъюгата на основе инсулинотропного пептида (именуемого длительно действующим производным эксендина-4) и длительно действующего конъюгата на основе производного глюкагона (именуемого длительно действующим производным с SEQ ID NO: 37) с использованием установленной дозы мышам в течение 28 суток. Показаны эффекты по сравнению с разбавителем

(введенным с эксципиентом).

На фиг. 7 представлен результат, иллюстрирующий эффект уменьшения интенсивности симптомов гипогликемии после введения длительно действующего конъюгата на основе производного глюкагона с SEQ ID NO: 37 в животных моделях острой гипогликемии (крысах).

На фиг. 8 представлен результат, иллюстрирующий эффект уменьшения интенсивности симптомов гипогликемии после введения длительно действующего конъюгата на основе производного глюкагона с SEQ ID NO: 37 в животных моделях хронической гипогликемии (крысах).

Наилучший вариант осуществления изобретения.

Подробное описание предпочтительных воплощений.

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

Кроме того, специалисты средней квалификации в данной области техники могут быть способны выявить или подтвердить, используя только традиционные методы экспериментирования, многие эквиваленты к конкретным аспектам изобретения, описанным в этой заявке. Кроме того, также подразумевается, что эти эквиваленты должны быть включены в настоящее изобретение.

По всему тексту описания настоящего изобретения использованы не только общепринятые 1-буквенные коды и 3-буквенные коды для природных аминокислот, но и такие 3-буквенные коды, как Aib ( $\alpha$ -аминоизомасляная кислота), Sar (N-метилглицин), обычно используемые для других аминокислот. Помимо этого, аминокислоты, упомянутые в сокращенном виде в описании настоящего изобретения, приведены в соответствии с правилом номенклатуры по IUPAC-IUB (Международный союз по теоретической и прикладной химии/Международный биохимический союз).

Аланин	A	Аргинин	R
Аспарагин	N	Аспарагиновая кислота	D
Цистеин	C	Глутаминовая кислота	E
Глутамин	Q	Глицин	G
Гистидин	H	Изолейцин	I
Лейцин	L	Лизин	K
Метионин	M	Фенилаланин	F
Пролин	P	Серин	S
Треонин	T	Триптофан	W
Тирозин	Y	Валин	V

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложена композиция, содержащая производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и, в частности, предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, содержащая производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона.

Производное глюкагона по настоящему изобретению включает пептид, имеющий по меньшей мере одно отличие в аминокислотной последовательности по сравнению с нативным глюкагоном; пептид, в котором последовательность нативного глюкагона изменена посредством модификации нативного глюкагона, и миметик нативного глюкагона, который может активировать рецепторы глюкагона подобно нативному глюкагону.

Таким производным глюкагона может быть производное глюкагона, имеющее улучшенные физические свойства благодаря наличию у него измененного значения pI по сравнению с нативным глюкагоном. Кроме того, производное глюкагона может представлять собой производное глюкагона с улучшенной растворимостью, обладающее при этом эффективностью в отношении активации рецепторов глюкагона, но этим не ограничено.

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

В частности, нативный глюкагон может иметь следующую аминокислотную последовательность:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1).

Использованный в данном описании термин "изоэлектрическая точка" или "pI" относится к значению pH, при котором молекула, такая как полипептид или пептид, не имеет никакого суммарного заряда

(0). В случае полипептида с различными заряженными функциональными группами суммарный заряд полипептида в целом равен "0" в точке, где значение рН является таким же, как значение рI. Суммарный заряд полипептида при рН выше, чем рI, будет отрицательным, а суммарный заряд полипептида при рН ниже, чем рI, будет положительным.

Значения рI могут быть определены в геле с фиксированным градиентом рН, состоящем из полиакриламида, крахмала или агарозы, методом изоэлектрического фокусирования или могут быть определены, например, исходя из аминокислотной последовательности, с использованием программного обеспечения рI/MW ([http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html); Gasteiger et al., 2003) на сервере ExPASy.

Использованный в данном описании термин "измененная рI" относится к рI, которая отличается от рI для нативного глюкагона вследствие замены части аминокислотной последовательности нативного глюкагона на аминокислотный остаток, имеющий отрицательный заряд или положительный заряд, т.е. к более низкому или более высокому значению рI. Пептид с такой измененной рI может проявлять улучшенную растворимость и/или высокую стабильность при нейтральных рН в виде производного глюкагона, но конкретно этим не ограничивается.

Более конкретно, производное глюкагона может иметь измененное значение рI, а не значение рI (6,8) для нативного глюкагона, и еще более конкретно, может иметь значение рI меньше 6,8, конкретнее 6,7 или меньше, конкретнее 6,5 или меньше и в дополнение к этому значение рI, превышающее 6,8, 7 или больше, более конкретно 7,5 или больше, но этими значениями не ограничивается, и любое значение рI, отличающееся от значения рI для нативного глюкагона, будет входить в объем настоящего изобретения.

В частности, когда значение рI отличается от значения рI для нативного глюкагона, и поэтому проявляется улучшенная растворимость при нейтральных рН по сравнению с растворимостью нативного глюкагона, демонстрируя тем самым низкий уровень агрегации, тогда это производное тем более будет входить в объем настоящего изобретения.

Более конкретно, производное глюкагона может иметь значение рI в диапазоне от 4 до 6,5 и/или от 7 до 9,5, в частности, от 7,5 до 9,5 и конкретнее от 8,0 до 9,3, но значение рI этим не ограничивается. В этом случае благодаря более низкому или более высокому значению рI по сравнению со значением рI для нативного глюкагона, может быть продемонстрирована улучшенная растворимость и высокая стабильность при нейтральных рН по сравнению с таковыми для нативного глюкагона, но без конкретного ограничения этим.

В частности, производное нативного глюкагона может быть модифицировано любым методом замены, вставки, делеции и модификации или их комбинации в части аминокислот нативного глюкагона.

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

Кроме того, такая модификация с целью получения производных нативного глюкагона может включать все модификации с использованием аминокислот L-типа или D-типа и/или аминокислот не-природного типа; и/или модификацию нативной последовательности, например, модификацию функциональной группы, образование межмолекулярных ковалентных связей (например, образование кольца между боковыми цепями), метилирование, ацилирование, убиквитинилирование, фосфорилирование, аминоксанирование, биотинилирование и так далее. Кроме того, модификация также может включать замены в ненативных соединениях.

Кроме того, модификация также может включать все модификации, когда к амино- и/или карбокси-концу нативного глюкагона добавлены одна или более аминокислот.

В ходе замены или вставки аминокислот можно использовать не только 20 аминокислот, обычно присутствующих в белках человека, но и атипичные или не встречающиеся в природе аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот могут включать Sigma-Aldrich, ChemPer Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, содержащие эти аминокислоты, и атипичные пептидные последовательности, могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например, American Peptide Company, Bachem (США) или Anygen (Корея).

Можно использовать производные аминокислот, которые также могут быть получены аналогичным образом, например, 4-имидазоуксусную кислоту и так далее.

Поскольку глюкагон имеет рН примерно 7, он не растворяется в растворе, имеющем физиологическое значение рН (рН 4-8), и имеет тенденцию осаждаться при нейтральных рН. В водном растворе с рН 3 или ниже глюкагон растворяется на начальной стадии, но осаждается через один час с образованием геля. Поскольку гелеобразный глюкагон состоит в основном из образованных  $\beta$ -листами фибрилл, то при введении осажденного таким образом глюкагона через инъекционную иглу или посредством внутривенной инъекции будут закупориваться кровеносные сосуды, и, следовательно, он будет непригоден для применения в качестве инъекционного агента. Для того, чтобы замедлить процесс осаждения, обычно используют кислотные (рН 2-4) препараты, и в этом случае глюкагон может оставаться в относительно

неагрегированном состоянии в течение короткого периода времени. Однако глюкагон может образовывать фибриллы очень быстро при низких значениях pH, и поэтому такие кислотные препараты должны быть введены инъекцией сразу же после их приготовления.

В этой связи, авторы настоящего изобретения разработали производные глюкагона, характеризующиеся профилями длительного действия, путем изменения pI нативного глюкагона посредством замены аминокислотных остатков, имеющих отрицательные заряды и положительные заряды. Производные глюкагона по настоящему изобретению, благодаря наличию у него измененной pI по сравнению с pI нативного глюкагона, характеризуются улучшенной растворимостью и/или высокой стабильностью при нейтральных pH по сравнению с нативным глюкагоном.

В конкретном воплощении настоящего изобретения производное глюкагона может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность следующей ниже общей формулы 1:

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

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

В приведенной выше формуле

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

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

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин;

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

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

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

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

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

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

X23 представляет собой изолейцин, валин или аргинин либо отсутствует;

X24 представляет собой валин, аргинин, аланин, цистеин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин,

α-метил-глутаминовую кислоту или лейцин либо отсутствует;

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

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

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

X30 представляет собой цистеин или отсутствует;

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

Более конкретно, в общей формуле 1

X1 представляет собой гистидин, триптофан или тирозин либо отсутствует;

X2 представляет собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X13 представляет собой тирозин или цистеин;

X14 представляет собой лейцин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;

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

X18 представляет собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;

X19 представляет собой аланин или цистеин;

X20 представляет собой глутамин, аспарагиновую кислоту, лизин или цистеин;

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

X23 представляет собой изолейцин, валин или аргинин;

X24 представляет собой валин, аргинин, аланин, глутаминовую кислоту, лизин, глутамин или лейцин;

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

X28 представляет собой глутамин, лизин, аспарагин или аргинин;

X29 представляет собой треонин; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует

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

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

Кроме того, хотя в настоящем изобретении пептид описан как "пептид, состоящий из конкретной SEQ ID NO", такое выражение не исключает наличия мутации в пептиде, которая может иметь место в результате присоединения "несмысловой" последовательности "вверх по течению" или "вниз по течению" от аминокислотной последовательности с соответствующей SEQ ID NO, или наличия встречающейся в природе мутации, или наличия молчащей мутации, при условии, что пептид, имеющий такую мутацию, обладает активностью, такой же, как активность пептида, или соответствующей активности пептида, который состоит из аминокислотной последовательности с соответствующей SEQ ID NO. Даже когда имеет место присоединение последовательности или мутация, пептид очевидным образом входит в объем настоящего изобретения.

Все описанное выше также может быть применено к другим конкретным воплощениям или аспектам настоящего изобретения, но без ограничения этим.

В частности, в приведенной выше общей формуле 1

X1 может представлять собой гистидин, триптофан или тирозин;

X2 может представлять собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);

X7 может представлять собой цистеин, треонин или валин;

X10 может представлять собой тирозин или цистеин;

X12 может представлять собой лизин или цистеин;

X13 может представлять собой тирозин или цистеин;

X14 может представлять собой лейцин или цистеин;

X15 может представлять собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 может представлять собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;

X17 может представлять собой глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, цистеин или валин;

X18 может представлять собой аргинин или цистеин;

X19 может представлять собой аланин или цистеин;

X20 может представлять собой глутамин или лизин;

X21 может представлять собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, валин или цистеин;

X23 может представлять собой валин;

X24 может представлять собой валин или глутамин;

X27 может представлять собой метионин;

X28 может представлять собой аспарагин или аргинин;

X29 может представлять собой треонин; и

X30 может представлять собой цистеин или отсутствует.

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 11-17, 19-27, 29, 31, 33 и 35-44, и, в частности, пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 11-17, 19-27, 29, 31, 33 и 35-44, но этим не ограничивается.

В частности, в приведенной выше общей формуле 1

X1 может представлять собой тирозин;

X2 может представлять собой аминокислотную кислоту (Aib);

X7 может представлять собой цистеин, треонин или валин;

X10 может представлять собой тирозин или цистеин;

X12 может представлять собой лизин;

X13 может представлять собой тирозин или цистеин;

X14 может представлять собой лейцин или цистеин;

X15 может представлять собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 может представлять собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;

X17 может представлять собой лизин, аргинин, цистеин или валин;  
 X18 может представлять собой аргинин или цистеин;  
 X19 может представлять собой аланин или цистеин;  
 X20 может представлять собой глутамин или лизин;  
 X21 может представлять собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или цистеин;  
 X23 может представлять собой валин;  
 X24 может представлять собой глутамин;  
 X27 может представлять собой метионин;  
 X28 может представлять собой аспарагин или аргинин;  
 X29 может представлять собой треонин; и  
 X30 может представлять собой цистеин или отсутствует,

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

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 14, 17, 19-25, 27, 29, 33, 35-38, 40-42 и 44, и, в частности, пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 14, 17, 19-25, 27, 29, 33, 35-38, 40-42 и 44, но этим не ограничивается.

В частности, в общей формуле 1

X1 может представлять собой гистидин, триптофан или тирозин либо отсутствует;

X2 может представлять собой серин или аминокислотную кислоту (Aib);

X7 может представлять собой треонин, валин или цистеин;

X10 может представлять собой тирозин или цистеин;

X12 может представлять собой лизин или цистеин;

X13 может представлять собой тирозин или цистеин;

X14 может представлять собой лейцин или цистеин;

X15 может представлять собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 может представлять собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;

X17 может представлять собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, серин, цистеин или валин;

X18 может представлять собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аргинин или цистеин;

X19 может представлять собой аланин или цистеин;

X20 может представлять собой глутамин, аспарагиновую кислоту или лизин;

X21 может представлять собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X23 может представлять собой валин;

X24 может представлять собой валин или глутамин;

X27 может представлять собой изолейцин или метионин;

X28 может представлять собой аспарагин или аргинин;

X29 может представлять собой треонин; и

X30 может представлять собой цистеин или может отсутствовать,

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

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

В частности, в общей формуле 1

X1 может представлять собой тирозин;

X2 может представлять собой аминокислотную кислоту (Aib);

X7 может представлять собой треонин;

X10 может представлять собой тирозин;

X12 может представлять собой лизин;

X13 может представлять собой тирозин;

X14 может представлять собой лейцин;

X15 может представлять собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 может представлять собой глутаминовую кислоту, серин или цистеин;

X17 может представлять собой лизин или аргинин;

X18 может представлять собой аргинин;

X19 может представлять собой аланин;

X20 может представлять собой глутамин, цистеин или лизин;

X21 может представлять собой аспарагиновую кислоту, цистеин, валин или глутаминовую кислоту;

X23 может представлять собой валин или аргинин;  
 X24 может представлять собой глутамин или лейцин;  
 X27 может представлять собой метионин;  
 X28 может представлять собой аспарагин или аргинин;  
 X29 может представлять собой треонин; и  
 X30 может отсутствовать.

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

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

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

X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

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

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, и, в частности, пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 15 и 36-44, но этим не ограничивается. Более конкретно, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 37, или (по существу) состоит из соответствующей аминокислотной последовательности, но этим не ограничивается.

В частности, в общей формуле 2

X7 может представлять собой треонин, валин или цистеин;  
 X10 может представлять собой тирозин или цистеин;  
 X12 может представлять собой лизин;  
 X15 может представлять собой аспарагиновую кислоту;  
 X16 может представлять собой глутаминовую кислоту или серин;  
 X17 может представлять собой лизин или аргинин;  
 X20 может представлять собой глутамин или лизин;  
 X21 может представлять собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;  
 X24 может представлять собой глутамин; и  
 X30 может представлять собой цистеин или может отсутствовать, но конкретно этим не ограничивается.

Например, пептид может представлять собой пептид, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36-38, 40-42 и 44, и, в частности, пептид, который (по существу) состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 36-38, 40-42 и 44, но этим не ограничивается.

Однако среди выделенных пептидов, пептиды, соответствующие SEQ ID NO: 2-11, 14, 16-35, 49 и 50, и, в частности, пептиды, соответствующие SEQ ID NO: 19, 33, 49 и 50, могут быть исключены из заявленного объема, но без конкретного ограничения этим, и все пептиды, описанные в формуле изобретения, должны входить в объем настоящего изобретения, если не указано иное.

Производное глюкагона, описанное выше, может включать внутримолекулярный мостик (например, ковалентную перекрестную сшивку или нековалентную перекрестную сшивку), и, в частности, может быть в форме, включая кольцо. Например, производное глюкагона может быть в такой форме, когда кольцо образуется между 16-й и 20-й аминокислотами производного глюкагона, но конкретно этим не ограничивается.

Неограничивающие примеры кольца могут включать перекрестную сшивку с образованием лактама (или лактамного кольца).

Помимо этого, производное глюкагона включает все производные, которые модифицированы посредством включения аминокислоты, способной образовывать кольцо в желаемом месте для того, чтобы

включать кольцо.

Кольцо может быть образовано между боковыми цепями аминокислот в пределах производного глюкагона (например, в форме кольца, образованного между боковой цепью лизина и боковой цепью глутаминовой кислоты), но конкретно этим не ограничивается.

Например, пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2, может представлять собой пептид, в котором каждая аминокислота в каждой паре аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28 в общей формуле 1 или 2 может быть заменена на глутаминовую кислоту или лизин, соответственно, но этим не ограничивается. В  $X_n$  ( $n$  представляет собой целое число),  $p$  относится к положению аминокислоты, начиная от N-конца предложенной аминокислотной последовательности.

Кроме того, пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2, может представлять собой пептид, в котором каждая аминокислота в каждой паре аминокислот X12 и X16, или паре аминокислот X16 и X20, или паре аминокислот X17 и X21 соответственно заменена на глутаминовую кислоту или лизин, которые способны образовывать кольцо.

Кроме того, в общей формуле 1 или 2 пептид может представлять собой пептид, в котором образовано кольцо (например, лактамное кольцо) между каждой из аминокислот в каждой паре аминокислот из пар аминокислот X10 и X14, X12 и X16, X16 и X20, X17 и X21, X20 и X24, и X24 и X28, но этим не ограничивается.

Кроме того, в общей формуле 1 или 2, X16 может представлять собой глутаминовую кислоту, X20 может представлять собой лизин, и боковые цепи X16 и X20 могут образовывать лактамное кольцо, но этим они не ограничиваются.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть в такой форме, где N-конец и/или C-конец не будет модифицирован, однако, в объеме пептидов по настоящему изобретению также могут быть включены такие варианты, где amino-конец и/или карбокси-конец и т.д. пептида будет химически модифицирован, или защищен органическими группами, или к концу данного пептида для его защиты от протеаз *in vivo* будут добавлены аминокислоты, при повышении при этом его стабильности. В случае, когда C-конец не модифицирован, этот конец пептида по настоящему изобретению может иметь карбоксильную группу, но конкретно этим не ограничивается.

В частности, в случае полученного химическим синтезом пептида его N- и C-концы обладают электрическим зарядом, и, таким образом, N- и C-концы пептида могут быть ацетилированы и/или амидированы, но пептид конкретно этим не ограничивается.

Если в настоящем изобретении не указано иное, то описание в разделе Подробное описание или в формуле изобретения в отношении "пептида" по настоящему изобретению или "конъюгата", в котором такой пептид ковалентно связан с биосовместимым веществом, может быть применимо к формам, которые включают не только соответствующий пептид или конъюгат, но также соли соответствующего пептида или конъюгата (например, их фармацевтически приемлемые соли) или их сольваты. Соответственно, даже в том случае, когда "пептид" или "конъюгат" описан в настоящем изобретении, такое описание также может быть в равной степени применимо к его конкретной соли, его конкретному сольвату и конкретному сольвату его конкретной соли. Эти соли, например, могут быть в форме, в которой используют любые фармацевтически приемлемые соли. Вид соли, в частности, не ограничивается. Однако солью предпочтительно является соль, которая безвредна и эффективна для субъекта, например млекопитающего, но конкретно этим не ограничивается.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу, которое может быть с эффективностью использовано для предполагаемого применения в рамках фармако-медицинского заключения без вызывания чрезмерной токсичности, раздражения, аллергических реакций и так далее.

Использованный в данном описании термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, происходящей из фармацевтически приемлемых неорганических кислот, органических кислот или оснований. Примеры подходящих солей могут включать соли соляной кислоты, бромноватой кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, перхлорной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, фосфорной кислоты, гликолевой кислоты, молочной кислоты, салициловой кислоты, янтарной кислоты, толуол-пара-сульфоновой кислоты, винной кислоты, уксусной кислоты, лимонной кислоты, метансульфоновой кислоты, муравьиной кислоты, бензойной кислоты, малоновой кислоты, нафталин-2-сульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты и так далее. Примеры солей, происходящих из подходящих оснований, могут включать соли щелочных металлов, таких как натрий, калий и т.д.; щелочноземельных металлов, таких как магний; аммония и так далее.

Кроме того, использованный в данном описании термин "сольват" относится к комплексу, образуемому между пептидом, конъюгатом или их солью по настоящему изобретению и молекулой растворителя.

Кроме того, пептид по настоящему изобретению может быть синтезирован методом, хорошо известным в данной области техники, сообразно его длине, например, с помощью автоматического пептидного синтезатора, и может быть получен с использованием генно-инженерной технологии.

В частности, пептид по настоящему изобретению может быть получен стандартным методом синте-

за, с использованием рекомбинантной экспрессионной системы или любым другим методом, известным в данной области техники. Соответственно, производное глюкагона по настоящему изобретению может быть синтезировано различными методами, включая, например, методы, описанные ниже:

(а) метод синтеза пептида с использованием постадийного твердофазного или жидкофазного метода либо с использованием сборки фрагментов с последующим выделением и очисткой конечного пептидного продукта; или

(б) метод экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, в клетке хозяина и извлечения продукта экспрессии из культуры клеток хозяина; или

(в) метод осуществления экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, в бесклеточной среде *in vitro* и извлечения из нее продукта экспрессии; или

метод получения пептидных фрагментов с использованием любой комбинации методов (а), (б) и (в), с получением пептида путем присоединения пептидных фрагментов друг к другу и затем выделения пептида.

В более конкретном примере желаемое производное глюкагона может быть получено с использованием генетического преобразования, которое включает приготовление слитого гена, кодирующего слитый белок, содержащий партнера слияния и производное глюкагона, перенос полученного гена в клетку хозяина, экспрессию в форме слитого белка и отщепление производного глюкагона из слитого белка с использованием протеазы или соединения, обладающего способностью к расщеплению белка после разделения. Для этой цели, например, последовательность ДНК, кодирующая аминокислотные остатки, которые могут расщепляться под действием протеазы, такой как фактор Ха или энтерокиназа, CNBγ или такого соединения, как гидроксилламин, может быть встроена между ДНК для партнера слияния и полинуклеотидом, кодирующим производное глюкагона.

В более конкретном воплощении производное глюкагона, например, пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2, может быть в форме длительно действующего конъюгата, в котором группировка биосовместимого вещества с возможностью увеличения *in vivo* периода полувыведения пептида присоединена к данному пептиду, но этим не ограничивается. Термин "группировка биосовместимого вещества" можно использовать взаимозаменяемо с термином "носитель".

В частности, конъюгат содержит пептидную группировку и группировку биосовместимого вещества, которая ковалентно связана с пептидной группировкой, и пептидная группировка может представлять собой такую же последовательность, как и аминокислотная последовательность общей формулы 1 или 2, или последовательность, ее включающую.

Использованный в данном описании термин "длительно действующий конъюгат", находящийся в форме, когда группировка биосовместимого вещества или носителя связана с физиологически активным веществом (например, производным глюкагона, инсулинотропным пептидом и т.д.), относится к конъюгату, который демонстрирует улучшенную эффективность в отношении продолжительности действия (например, увеличение периода полувыведения *in vivo*) по сравнению с таковым для физиологически активного вещества, к которому группировка биосовместимого вещества или носителя не присоединена. В длительно действующем конъюгате группировка биосовместимого вещества или носителя может представлять собой группировку, которая ковалентно связана с физиологически активным веществом, но конкретно этим не ограничивается.

В конкретном воплощении настоящего изобретения продолжительность эффективного действия вышеупомянутого конъюгата на основе производного глюкагона может увеличиваться по сравнению с нативным глюкагоном или его производным глюкагона, к которому носитель не присоединен.

Использованный в данном описании термин "группировка биосовместимого вещества" относится к веществу, которое может быть присоединено к физиологически активному веществу (например, производному глюкагона, инсулинотропному пептиду и т.д.) и тем самым может улучшить эффективность в отношении продолжительности действия по сравнению с физиологически активным веществом, к которому группировка биосовместимого вещества или носителя не присоединена. Группировка биосовместимого вещества может представлять собой группировку, которая ковалентно связана с физиологически активным веществом, но конкретно этим не ограничивается.

Примеры группировки биосовместимого вещества могут включать полимер, жирную кислоту, холестерин, альбумин и его фрагмент, альбуминсвязывающее вещество, полимер из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитело, фрагмент антитела, FcRn-связывающее вещество, соединительной ткани *in vivo* или его производное, нуклеотид, фибронектин, трансферрин, сахарид, гепарин и эластин, но этим не ограничиваются.

Примеры полимера могут представлять собой полимер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, био-разлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации, но конкретно этим не ограничивается.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) представляет собой общий термин, включающий все формы гомополимеров этиленгликоля, сополимеры ПЭГ и метил-замещенные полимеры ПЭГ (мПЭГ), но конкретно

этим не ограничивается.

Кроме того, группировка биосовместимого вещества может включать полиаминокислоты, такие как поли-лизин, поли-аспарагиновая кислота и поли-глутаминовая кислота, но этим не ограничивается.

Кроме того, жирная кислота может представлять собой кислоту, обладающую аффинностью связывания с альбумином *in vivo*, но конкретно этим не ограничивается.

В более конкретном воплощении FcRn-связывающее вещество может представлять собой Fc-область иммуноглобулина и, более конкретно, Fc-область IgG, но конкретно этим не ограничивается.

По меньшей мере одна боковая цепь аминокислоты в составе пептида по настоящему изобретению может быть связана с группировкой биосовместимого вещества для повышения его растворимости *in vivo*, и/или увеличения периода полувыведения, и/или повышения биодоступности. Эти модификации могут снижать выведение терапевтических белков и пептидов.

Группировка биосовместимого вещества может быть растворимой (амфипатической или гидрофильной), и/или нетоксичной, и/или фармацевтически приемлемой.

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

Группировка биосовместимого вещества может быть присоединена к производному глюкагона напрямую или связана с ним посредством линкера. Если группировка биосовместимого вещества связана с производным глюкагона напрямую или посредством линкера, такой связью может быть ковалентная связь.

В частности, линкер может представлять собой пептидный линкер или непептидный линкер.

Когда линкер представляет собой пептидный линкер, он может включать одну или более аминокислот, например, 1-1000 аминокислот, но конкретно этим не ограничивается. В настоящем изобретении можно использовать разные известные пептидные линкеры (например, включая линкер [GS]<sub>x</sub>, линкер [GGGS]<sub>x</sub> и линкер [GGGS]<sub>x</sub> и т.д., где x представляет собой натуральное число, равное по меньшей мере 1), но пептидные линкеры этим не ограничиваются.

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

Использованный в данном описании термин "непептидный линкер" может применяться взаимозаменяемым образом с термином "непептидный полимер".

В конкретном воплощении группировка биосовместимого вещества и пептид могут быть ковалентно связаны посредством непептидного линкера, содержащего реакционноспособную группу, которая может связываться с группировкой биосовместимого вещества (в частности, Fc-областью иммуноглобулина) и пептидом по обоим концам, соответственно.

В частности, непептидный линкер может представлять собой линкер, выбранный из группы, состоящей из жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.

Без конкретного ограничения, молекулярная масса непептидного полимера, предполагаемого для применения в настоящем изобретении, может находиться в диапазоне от более чем 0 до примерно 100 кДа или меньше, в частности, от примерно 1 до примерно 100 кДа, и более конкретно от примерно 1 до примерно 20 кДа, но этим не ограничивается.

Без конкретного ограничения, непептидный линкер может представлять собой линкер, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинация.

В более конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, но этим не ограничивается. Кроме того, производные, которые уже известны в данной области техники, и производные, которые легко могут быть получены по известным в данной области технологиям, входят в объем настоящего изобретения.

Непептидный линкер, предполагаемый для применения в настоящем изобретении, может представлять собой любой полимер, обладающий устойчивостью к протеазам *in vivo*, без ограничения. Молекулярная масса непептидного полимера может находиться в диапазоне от более чем 0 до примерно 100 кДа или меньше, в частности, от примерно 1 до примерно 100 кДа, и более конкретно от примерно 1 до примерно 20 кДа, но этим не ограничивается. Кроме того, непептидный линкер по настоящему изобретению, который связан с полипептидом, содержащим Fc-область иммуноглобулина, может включать полимер не только одного типа, но и комбинацию полимеров разных типов.

Использованный в данном описании термин "примерно" относится к диапазону, включающему все значения  $\pm 0,5$ ,  $\pm 0,4$ ,  $\pm 0,3$ ,  $\pm 0,2$ ,  $\pm 0,1$  и т.д., и он включает в себя все значения, эквивалентные тем, которые идут непосредственно после термина "примерно", или те значения, которые находятся в аналогичном диапазоне.

В частности, линкер может представлять собой линкер, соответственно присоединенный к пептидной группировке и группировке биосовместимого вещества посредством ковалентных связей, которые образуются соответственно, когда один конец линкера взаимодействует с аминогруппой или тиоловой группой группировки биосовместимого вещества, в то время как другой конец линкера взаимодействует с аминогруппой или тиоловой группой пептидной группировки (т.е. пептидной группировки, включающей аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2).

В конкретном воплощении один конец непептидного линкера может быть присоединен к аминокислотной или тиоловой группе Fc-области иммуноглобулина, в то время как другой конец непептидного линкера может быть присоединен к аминокислотной или тиоловой группе производного глюкогона. В частности, непептидный полимер может включать реакционноспособную группу на обоих своих концах, соответственно, которая может быть связана с группировкой биосовместимого вещества, в частности, с Fc-областью иммуноглобулина и производным глюкогона; например, реакционноспособная группа, которая может соответственно образовывать ковалентную связь для присоединения к биосовместимому веществу и производному глюкогона путем взаимодействия с аминогруппой N-конца, или остатком лизина производного глюкогона, или тиоловой группой остатка цистеина производного глюкогона, аминокислотной группой N-конца, или остатком лизина биосовместимого вещества, или тиоловой группой остатка цистеина биосовместимого вещества (например, Fc-области иммуноглобулина), но этим не ограничивается.

Кроме того, реакционноспособная концевая группа непептидного полимера, который может быть присоединен к группировке биосовместимого вещества, в частности, Fc-области иммуноглобулина, и производному глюкогона, может быть выбрана из группы, состоящей из альдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного, но этим не ограничивается.

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

В вышеизложенном в качестве сукцинимидного производного можно использовать сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат, но без ограничения этим.

Кроме того, конечный продукт, полученный в результате восстановительного аминирования посредством образования альдегидной связи, является более стабильным, чем продукт с присоединением через амидную связь. Альдегидная реакционноспособная группа избирательно взаимодействует с N-концом в условиях низких pH, в то время как при высоких pH, например, при pH 9,0, она может образовывать ковалентную связь с остатком лизина.

Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного линкера могут быть одинаковыми или могут отличаться друг от друга, например, на одном конце может находиться малеимидная реакционноспособная группа, а на другом конце может находиться альдегидная группа, пропиональдегидная группа или бутиральдегидная группа. Однако, если Fc-область иммуноглобулина и производное глюкогона могут быть конъюгированы с каждым из концов непептидного линкера, то это не является конкретным ограничением.

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

При использовании в качестве непептидного полимера полиэтиленгликоля, имеющего реакционноспособную гидроксигруппу на обоих своих концах, эту гидроксигруппу можно активировать путем превращения ее в различные реакционноспособные группы в результате известных химических реакций, или же для получения длительно действующего конъюгата белка по настоящему изобретению можно использовать коммерчески доступный полиэтиленгликоль, имеющий модифицированную реакционноспособную группу.

В конкретном воплощении непептидный полимер может представлять собой полимер, который может быть связан с остатком цистеина производного глюкогона и конкретнее с группой -SH цистеина, но этим не ограничивается. В частности, непептидный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, но конкретно этим не ограничивается, и в данное описание также могут быть включены другие типы непептидных полимеров, описанных ранее.

В конкретном воплощении конъюгат может представлять собой конъюгат, в котором пептид, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 37, связан с Fc-областью иммуноглобулина посредством непептидного полимера, и, в частности, непептидный полимер может представлять собой полимер, который связан с остатком цистеина, находящимся в 30-м положении аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 12, остатком цистеина, находящимся в 17-м положении аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 20, или остатком цистеина, находящимся в 30-м положении аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 37, но этим не ограни-

чивается. В частности, непептидный полимер может представлять собой полиэтиленгликоль, но конкретно этим не ограничивается, и в данное описание также могут быть включены другие типы непептидных полимеров, описанных ранее.

При использовании малеимид-ПЭГ-альдегида малеимидная группа может быть присоединена к группе -SH производного глюкогона посредством тиоэфирной связи, а альдегидная группа может быть присоединена к -NH<sub>2</sub> Fc-области иммуноглобулина посредством восстановительного аминирования, но этим не ограничивается, и вышеизложенное является только лишь воплощением.

Кроме того, в упомянутом выше конъюгате реакционноспособная группа непептидного полимера может представлять собой группу, которая присоединена к группе -NH<sub>2</sub>, локализованной на N-конце Fc-области иммуноглобулина, но это является только лишь воплощением.

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

Fc-область иммуноглобулина может содержать шарнирную область в константной области тяжелой цепи, но этим не ограничивается. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой расширенную Fc-область, содержащую часть константной области 1 тяжелой цепи (CH1) или ее целиком и/или константную область 1 легкой цепи (CL1), за исключением переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при условии, что Fc-область иммуноглобулина оказывает эффект по существу такой же или улучшенный по сравнению с нативным типом. Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой область, в которой удалена довольно протяженная часть аминокислотной последовательности, соответствующей CH2 и/или CH3.

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

Кроме того, в конкретном воплощении Fc-область иммуноглобулина может быть в димерной форме, и одна молекула производного глюкогона может быть ковалентно связана с Fc-областью в димерной форме, и, в частности, Fc-область иммуноглобулина и производное глюкогона могут быть связаны друг с другом посредством непептидного полимера. Кроме того, две молекулы производного глюкогона возможно могут быть конъюгированы симметричным образом с единственной Fc-областью в димерной форме. В частности, Fc-область иммуноглобулина и производное глюкогона или инсулинотропный пептид могут быть связаны друг с другом посредством непептидного линкера, но не ограничиваются этим описанным выше воплощением.

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

Например, аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, участвуют в связывании с Fc-областью иммуноглобулина, могут быть использованы в качестве сайтов, подходящих для модификации.

Кроме этого, возможны и другие различные производные, в том числе производное, в котором удален участок, способный образовывать дисульфидную связь, или удалены некоторые аминокислотные остатки на N-конце нативной Fc-области либо туда добавлен остаток метионина. Кроме того, для устранения эффекторных функций может быть осуществлена делеция в комплементсвязывающем сайте, таком как C1q-связывающий сайт, и сайте антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Методы получения таких производных для последовательности Fc-области иммуноглобулина раскрыты в публикациях международных патентных заявок №№ WO 97/34631, WO 96/32478 и так далее.

В данной области техники известны аминокислотные замены в белках и пептидах, которые обычно не изменяют активность белков или пептидов (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающимися заменами являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly в обоих направлениях. Кроме того, Fc-область при необходимости может быть модифицирована путем фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и так далее.

Описанные выше производные Fc-области демонстрируют биологическую активность, идентичную активности Fc-области по настоящему изобретению, и имеют улучшенную структурную стабильность в

отношении нагревания, pH и так далее.

Далее, такие Fc-области иммуноглобулина могут быть получены из нативных форм, выделенных *in vivo* из людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомячки, крысы, морские свинки и т.д., или могут представлять собой их рекомбинантные формы или производные, полученные из трансфицированных клеток животных или из микроорганизмов. В данной заявке Fc-область может быть получена из нативного иммуноглобулина путем выделения целой молекулы иммуноглобулина из живого организма человека или животного и обработки выделенного иммуноглобулина протеазой. При обработке целой молекулы иммуноглобулина папаином она расщепляется на Fab- и Fc-области, а при обработке целой молекулы иммуноглобулина пепсином она расщепляется на фрагменты pF'c и F(ab)<sub>2</sub>. Fc или pF'c могут быть выделены методом эксклюзионной хроматографии и так далее. В более конкретном воплощении Fc-область, имеющая происхождение из человека, представляет собой рекомбинантную Fc-область иммуноглобулина, полученную из микроорганизма.

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

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

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

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

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

Композиция по настоящему изобретению может быть использована для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома.

Использованный в данном описании термин "предупреждение" относится ко всем видам действий, связанным с торможением или замедлением возникновения целевого заболевания (например, врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома) при введении производного глюкагона, конъюгата, содержащего производное глюкагона, или композиции, а термин "лечение" относится ко всем видам действий, связанным с улучшением состояния или благотворными изменениями симптомов целевого заболевания (например, врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома), при введении производного глюкагона, конъюгата, содержащего производное глюкагона, или композиции.

Использованный в данном описании термин "введение" относится к введению конкретного вещества пациенту подходящим способом. Композицию можно вводить обычным путем, который обеспечивает доставку композиции в ткань-мишень *in vivo*, например, путем внутривенного, внутримышечного, подкожного, интрадермального, перорального, местного, интраназального, легочного и интравентрикулярного введения, но конкретно этим не ограничивается.

Использованный в данном описании термин "гипогликемия" относится к состоянию здоровья, при котором уровни глюкозы в крови ниже, чем у нормальных людей, и, как правило, относится к состоянию, когда уровни глюкозы в крови составляют 50 мг/дл или меньше, но конкретно этим не ограничивается. Гипогликемия часто возникает, когда лицо, которое принимает пероральный гипогликемический агент или инсулин, ест меньше, чем обычно, или выполняет какие-либо виды работ или физические уп-

ражнения больше, чем обычно. Кроме того, гипогликемия может возникать из-за распития алкогольных напитков, приема лекарственных средств, понижающих уровень глюкозы, тяжелых физических заболеваний, дефицита гормонов, таких как гормоны коры надпочечников и глюкагон, из-за опухоли поджелудочной железы, продуцирующей инсулин, аутоиммунного инсулинового синдрома у пациентов, перенесших гастрэктомию, наследственного нарушения метаболизма углеводов и так далее.

В настоящем изобретении гипогликемия включает как острую, так и хроническую гипогликемию.

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

Более конкретно, причиной гипогликемии может быть персистирующий гиперинсулинизм вследствие тяжелого генетического дефекта. Примеры известных причин гиперинсулинизма вследствие генетического дефекта могут включать мутацию в гене SUR или гене Kir6.2, локализованном на хромосоме 11p15.1, или повышение активности глюкокиназы (GK) вследствие мутации в гене GK, локализованном на хромосоме 7p15-p13, повышение содержания АТФ в островковых клетках вследствие мутации в гене глутаматдегидрогеназы (GDH) и так далее.

Что касается врожденного гиперинсулинизма, то он является одной из главных причин тяжелой и персистирующей гипогликемии у новорожденных и детей. Он может быть вызван аномальным функционированием панкреатических клеток вследствие временного усиления секреции инсулина или генетической мутации у младенцев с низким весом при рождении или младенцев от матерей с диабетом и так далее. Известно, что глюкагон можно использовать для лечения врожденного гиперинсулинизма.

Кроме того, производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, можно использовать для предупреждения или лечения гипогликемии.

Кроме того, производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона по настоящему изобретению, можно использовать в качестве фармацевтического лекарственного средства не только для предупреждения увеличения массы тела, стимулирования уменьшения массы тела, снижения избыточного веса и лечения ожирения, в том числе морбидного ожирения (например, путем регулирования аппетита, процесса проглатывания пищи, потребления пищи, калорийности потребляемой пищи и/или расходования энергии), но также для лечения ассоциированного с ожирением воспаления, ассоциированного с ожирением заболевания желчного пузыря и индуцированного ожирением апноэ во сне, но этим не ограничивается, и можно использовать для лечения ассоциированных с ним заболеваний или состояний здоровья. Производное глюкагона по настоящему изобретению или конъюгат, содержащий производное глюкагона, также можно применять для лечения метаболического синдрома, иного, чем ожирение, т.е. связанных с ожирением заболеваний, таких как нарушенная толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемия, дислипидемия, ожирение, диабет, гипертензия, неалкогольный стеатогепатит (неалкогольный стеатогепатит, NASH), атеросклероз, вызванный дислипидемией, атеросклероз, артериосклероз, коронарная болезнь сердца, инсульт и так далее. Тем не менее, эффекты пептида по настоящему изобретению могут быть опосредованы полностью или частично эффектами, связанными с массой тела, описанными выше, или могут быть независимыми от них.

Использованный в данном описании термин "метаболический синдром" относится к симптому отдельного или комплексного возникновения различных заболеваний вследствие хронического метаболического расстройства. В частности, примеры заболеваний, относящихся к метаболическому синдрому, могут включать нарушенную толерантность к глюкозе, гиперхолестеринемия, дислипидемия, ожирение, диабет, гипертензию, неалкогольный стеатогепатит (NASH), атеросклероз, вызванный дислипидемией, атеросклероз, артериосклероз, коронарную болезнь сердца, инсульт и т.д., но этим не ограничивается ими.

Использованный в данном описании термин "ожирение" относится к медицинскому состоянию с избыточным жиром в организме, и лица, имеющие индекс массы тела (BMI; масса тела (кг), деленная на квадрат роста (м)) 25 или выше, диагностируются как имеющие ожирение. Чаще всего причиной ожирения является энергетический дисбаланс вследствие чрезмерного потребления пищи по сравнению с расходом энергии в течение длительного периода времени. Ожирение, являясь метаболическим заболеванием, которое поражает весь организм, повышает риск возникновения сексуальной дисфункции, артрита и сердечно-сосудистого заболевания, и в некоторых случаях оно связано с развитием рака.

Производное глюкагона по настоящему изобретению имеет измененную рI и таким образом, может демонстрировать улучшенную растворимость и более высокую стабильность в условиях нейтральных pH по сравнению с нативным глюкагоном. Кроме того, производное глюкагона по настоящему изобретению может демонстрировать активность в отношении рецептора глюкагона и поэтому может с эффективностью использоваться для предупреждения или лечения целевых заболеваний, включая гипогликемию, метаболический синдром и врожденный гиперинсулинизм.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Использованный в данном описании термин "фармацевтически приемлемый" относится к свойствам наличия достаточного количества, необходимого для

проявления терапевтического эффекта без вызывания неблагоприятных эффектов, и специалист в данной области техники легко сможет определить это, основываясь на факторах, общеизвестных в области медицины, таких как тип заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол, восприимчивость пациента к лекарственным средствам, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения, лекарственное средство, которое смешивают или вводят одновременно в комбинации и так далее.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, содержащая пептид или конъюгат, содержащий производное глюкагона, по настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может включать: для перорального введения связующее вещество, глидант, разрыхлитель, эксципиент, солубилизирующий агент, диспергирующий агент, стабилизирующий агент, суспендирующий агент, краситель, корригент и т.д.; для инъекций буферный агент, консервант, анальгезирующий агент, солубилизирующий агент, изотонический агент, стабилизирующий агент и т.д., которые могут быть использованы совместно; и для местного введения основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант и т.д., хотя этим не ограничивается.

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

При этом 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, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и так далее. Кроме того, композиция может дополнительно содержать наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, смачивающий агент, корригент, консервант и так далее.

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

Кроме того, композиция может быть приготовлена в форме однократной дозировки, подходящей для организма пациента, и, в частности, приготовлена в виде препарата, полезного для пептидных лекарственных средств, типичным способом, используемым в фармацевтической области, для введения пероральным или парентеральным путем, как например, через кожу, внутривенно, внутримышечно, интраартериально, интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, в легкие, трансдермально, подкожно, внутривагинально, интраназально, в желудок, местно, сублингвально, вагинально или ректально, но без ограничения этим.

Кроме того, пептид или конъюгат можно использовать путем смешивания с различными фармацевтически приемлемыми носителями, такими как физиологический раствор или органические растворители. Чтобы повысить стабильность или всасываемость, можно использовать углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион; хелатирующие агенты; низкомолекулярные белки; или другие стабилизаторы.

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

Хотя конкретного ограничения на это не имеется, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать упомянутый выше ингредиент (активный ингредиент) в количестве от 0,01% (мас./об.) до 99% (мас./об.).

Общую эффективную дозу композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в однократной дозе или можно вводить в течение длительного периода времени в виде многократных доз согласно протоколу дробного лечения. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного(ых) ингредиента(ов) может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. В частности, предпочтительная суммарная суточная доза пептида или конъюгата по настоящему изобретению может составлять приблизительно от 0,0001 мкг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Тем не менее, эффективную дозу пептида или конъюгата определяют с учетом различных факторов, включая возраст, массу тела, состояние здоровья, пол пациента, тяжесть заболевания, диету и скорость выведения, а также путь и частоту введения фармацевтической композиции. При этом специалисты в данной области техники легко смогут определить эффективную дозу, подходящую для конкретного применения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не ограничена конкретной лекарственной формой, конкретным путем и способом введения

при условии, что она оказывает эффекты настоящего изобретения.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может демонстрировать *in vivo* превосходящую продолжительность эффективного действия и титр, и поэтому число введений и частота введения могут быть значительно сокращены по сравнению с другими фармацевтическими препаратами, но без конкретного ограничения этим.

В частности, поскольку фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит в качестве активного ингредиента производное глюкагона, имеющее измененную *pI*, отличающуюся от *pI* для нативного глюкагона, она демонстрирует улучшенную растворимость и/или высокую стабильность в зависимости от *pH* данного раствора, и поэтому фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно с эффективностью использовать в получении стабильного препарата глюкагона для лечения целевого заболевания, включая врожденный гиперинсулинизм, гипогликемию или метаболический синдром.

С точки зрения фармацевтической композиции для предупреждения или лечения метаболического синдрома или способа терапии для предупреждения или лечения метаболического синдрома, фармацевтическая композиция может дополнительно содержать соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, а способ терапии может дополнительно включать применение упомянутого выше соединения или вещества.

Примеры соединения или вещества, обладающего терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома и предполагаемого для включения при комбинированном введении или в композицию по настоящему изобретению, могут включать инсулинотропный пептид, агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), агонист рецептора лептина, ингибитор дипептидилпептидазы-IV (DPP-IV), антагонист Y5-рецептора, антагонист рецептора меланинконцентрирующего гормона (MCH), агонист Y2/4-рецептора, агонист меланокортинового рецептора 3/4 (MC 3/4), ингибитор желудочной/панкреатической липазы, агонист рецептора 5-гидрокситриптамина, типа 2C (5HT2C), агонист  $\beta$ 3A-рецептора, агонист рецептора амилина, антагонист грелина, антагонист рецептора грелина, агонист рецептора-альфа, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR $\alpha$ ), агонист рецептора-дельта, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR $\delta$ ), агонист фарнезоидного X-рецептора (FXR), ингибитор ацетил-СоА-карбоксилазы, пептид YY, холецистокинин (CCK), ксенин, глицентин, обестатин, секретин, несфатин, инсулин и глюкозозависимый инсулинотропный пептид (GIP), но этим не ограничиваться. Кроме того, могут быть включены все лекарственные средства, эффективные с точки зрения лечения ожирения, и лекарственные средства, обладающие способностью подавлять воспаление и фиброз печени.

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

Более конкретно, инсулинотропный пептид может представлять собой производное инсулинотропного пептида, в котором N-концевой остаток гистидина инсулинотропного пептида заменен на что-либо одно, выбранное из группы, состоящей из дезамино-гистидила, N-диметил-гистидила,  $\beta$ -гидроксиимидазопропионила, 4-имидазоацетила и  $\beta$ -карбокси-имидазопропионила, но этим не ограничивается. В частности, инсулинотропный пептид может представлять собой GLP-1, эксендин-3 или эксендин-4.

Еще более конкретно, инсулинотропный пептид может быть выбран из группы, состоящей из нативного эксендина-4; производного эксендина-4, в котором удалена N-концевая аминокислотная группа эксендина-4; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 заменена на гидроксильную группу; производного эксендина-4, в котором N-концевая аминокислотная группа эксендина-4 модифицирована диметильной группой; производного эксендина-4, в котором удален  $\alpha$ -углеродный атом 1-й аминокислоты эксендина-4, гистидина; производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена на серин, и производного эксендина-4, в котором 12-я аминокислота эксендина-4, лизин, заменена на аргинин, но этим не ограничивается.

При этом в качестве примера инсулинотропного пептида или длительно действующего конъюгата на его основе в настоящее изобретение посредством ссылки включено полное описание публикации заявки на патент США № 2010-0105877, но без ограничения этим.

Кроме того, инсулинотропный пептид может быть в форме конъюгата, включающего в себя пептидную группировку, которая содержит аминокислотную последовательность вышеупомянутого инсулинотропного пептида, и группировку биосовместимого вещества, присоединенную к пептидной группировке, но этим не ограничивается. В частности, пептидная группировка, которая включает аминокислотную последовательность инсулинотропного пептида, характеризуется тем, что она находится в составе конъюгата, будучи ковалентно связанной с группировкой биосовместимого вещества посредством линкера, но конкретно этим не ограничивается. Конъюгат на основе инсулинотропного пептида может представлять собой длительно действующий конъюгат, и данное определение с точки зрения длительно действующего типа является таким же, как разъяснено выше.

Ко всем признакам с точки зрения конъюгата, в частности, к группировке биосовместимого вещества (Fc-области иммуноглобулина) и линкеру (например, непептидный полимер), будет применимо все то, что описано ранее. Например, линкер может представлять собой линкер, соответственно присое-

диненный к пептидной группировке и группировке биосовместимого вещества посредством ковалентных связей, которые образуются соответственно, когда один конец линкера взаимодействует с аминок группой или тиоловой группой группировки биосовместимого вещества, в то время как другой конец линкера взаимодействует с аминок группой или тиоловой группой пептидной группировки.

В конкретном воплощении один конец непептидного линкера может вступать во взаимодействие с аминок группой или тиоловой группой Fc-области иммуноглобулина, в то время как другой конец линкера вступает во взаимодействие с аминок группой или тиоловой группой инсулинотропного пептида, и в результате этого образуется ковалентная связь, соответственно.

В более конкретном воплощении композиция для предупреждения или лечения вышеупомянутого метаболического синдрома или способ терапии могут представлять собой композицию или способ терапии, в которых содержится или используется пептид, содержащий аминокислотную последовательность нижеследующей общей формулы 2, или входящая в состав конъюгата группировка биосовместимого вещества, ковалентно связанная с этим пептидом, но конкретно этим не ограничивается.

Y-A1b-QGTF-X7-SD-X10-S-X12-Y-L-X15-X16-X17-R-A-X20-X21-F-V-X24-W-L-M-N-T-

X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X20 представляет собой глутамин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X24 представляет собой валин или глутамин; и

X30 представляет собой цистеин либо отсутствует.

Пептид по предшествующему конкретному воплощению, когда аминокислотная последовательность общей формулы 2 идентична любой последовательности с SEQ ID NO: 19, 33, 49 и 50, все пептиды или часть пептидов могут быть исключены.

Более конкретно, композиция может включать в себя как (1) конъюгат, содержащий пептидную группировку, включающую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37, и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с пептидной группировкой; так и (2) конъюгат, который содержит группировку имидазо-ацетил-эксендина-4, где удален  $\alpha$ -углеродный атом 1-й аминокислоты эксендина-4 (т.е. гистидина), и группировку биосовместимого вещества, ковалентно связанную с группировкой имидазо-ацетил-эксендина-4. Еще более конкретно, пептидная группировка, содержащая аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37, и группировка имидазо-ацетил-эксендина-4 могут быть связаны с соответствующими им группировками биосовместимого вещества посредством линкера, но конкретно этим не ограничиваются.

Вводимые дозы соединения или вещества, обладающего терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, в частности, конъюгата, в котором инсулинотропный пептид присоединен к группировке биосовместимого вещества, могут находиться в диапазоне от примерно 0,0001 мкг до примерно 500 мг на 1 кг массы тела пациента, но конкретно этим не ограничивается.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать упомянутые выше вещества для совместного введения, то есть, соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, и производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, (или каждый ингредиент из упомянутых выше веществ для совместного введения) в количестве от 0,01% (мас./об.) до 99% (мас./об.).

При этом, согласно одному из аспектов, соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, и производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, в частности, конъюгат, в котором группировка биосовместимого вещества присоединена к инсулинотропному пептиду (например, конъюгату инсулинотропный пептид-ПЭГ-Fc-область Ig), и конъюгат, в котором группировка биосовместимого вещества присоединена к производному глюкагона, могут быть использованы в молярном соотношении от 1:0,01 до 1:50, но конкретно этим не ограничиваются.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен набор, включающий в себя производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, и, в частности, набор для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, включающий в себя производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона.

Производное глюкагона или конъюгат, содержащий производное глюкагона, врожденный гиперинсулинизм, гипогликемия, метаболический синдром, предупреждение или лечение являются такими же, как разъяснено выше. Виды ингредиентов, которые могут дополнительно содержаться в наборе по на-

стоящему изобретению, могут включать все ингредиенты, которые могут содержаться в композиции, разъясненной выше.

В частности, если набор представляет собой набор для предупреждения или лечения метаболического синдрома, то могут быть включены как (1) производное глюкагона, в частности, пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1 или 2, либо конъюгат, содержащий производное глюкагона, и (2) инсулилотропный пептид, в частности, GLP-1, эксендин-3, эксендин-4 или их производное, либо конъюгат, содержащий инсулилотропный пептид, но конкретно этим не ограничивается.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено производное глюкагона.

Производное глюкагона является таким же, как разъяснено выше.

Более конкретно, это производное отличается тем, что оно представляет собой выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленную последовательностью SEQ ID NO: 45, описанной выше. К разъяснению и комбинации в отношении выделенного пептида, включающего аминокислотную последовательность общей формулы 1, будет применимо все то, что описано выше.

Производное отличается тем, что оно представляет собой выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2:

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

X30 (общая формула 2, SEQ ID NO: 46).

В общей формуле 2

X7 представляет собой треонин, валин или цистеин;

X10 представляет собой тирозин или цистеин;

X12 представляет собой лизин или цистеин;

X15 представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеин;

X16 представляет собой глутаминовую кислоту или серин;

X17 представляет собой лизин или аргинин;

X20 представляет собой глутамин или лизин;

X21 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X24 представляет собой валин или глутамин; и

X30 представляет собой цистеин или отсутствует.

Когда аминокислотная последовательность общей формулы 2 идентична любой из SEQ ID NO: 19, 33, 49 и 50, тогда она может быть исключена.

Более конкретно, в пептиде, включающем аминокислотную последовательность общей формулы 2, X16 может представлять собой глутаминовую кислоту, X20 может представлять лизин, и боковые цепи X16 и X20 могут образовывать лактамное кольцо, но без ограничения этим.

Кроме того, C-конец пептида, включающего аминокислотную последовательность общей формулы 2, может быть амидирован или не модифицирован, но этим не ограничивается.

Кроме того, пептид может представлять производное глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона, но этим не ограничивается.

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

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложены выделенный полинуклеотид, кодирующий производное глюкагона, вектор, включающий в себя полинуклеотид, и выделенная клетка, включающая в себя полинуклеотид или вектор.

Производное глюкагона является таким же, как разъяснено выше.

В частности, таким производным может быть выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленную последовательностью SEQ ID NO: 45, описанной выше. К разъяснению и комбинации в отношении выделенного пептида, включающего аминокислотную последовательность общей формулы 1, будет применимо все то, что описано выше. Кроме того, в частности, таким производным может быть выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2, представленную последовательностью SEQ ID NO: 46, описанной выше. К разъяснению и комбинации в отношении выделенного пептида, включающего аминокислотную последовательность общей формулы 2, будет применимо все то, что описано выше.

Использованный в данном описании термин "гомология" означает сходство последовательностей по сравнению с аминокислотной последовательностью для дикого типа или нуклеотидной последовательностью для дикого типа, и сравнение гомологии может быть выполнено невооруженным глазом или с использованием коммерчески доступной программы для сравнения. Используя коммерчески доступную компьютерную программу, можно выразить гомологию между двумя или несколькими последовательностями в процентах (%), и можно вычислить % гомологии между сопоставляемыми последовательностями.

Использованный в данном описании термин "рекомбинантный вектор" относится к конструкции

ДНК, содержащей последовательность полинуклеотида, кодирующего целевой пептид, например, производное глюкогона, которая функционально связана с соответствующей регуляторной последовательностью для обеспечения экспрессии целевого пептида, например, производного глюкогона, в клетке хозяина.

Регуляторная последовательность содержит промотор, способный инициировать транскрипцию, какую-либо последовательность оператора для регуляции транскрипции, последовательность, кодирующую подходящий рибосомасвязывающий домен мРНК, и последовательность, регулирующую терминацию транскрипции и трансляции. Рекомбинантный вектор после его перенесения в подходящую клетку хозяина может реплицироваться, или может функционировать независимо от генома клетки хозяина, или может интегрироваться в сам геном клетки хозяина.

Рекомбинантный вектор, используемый в настоящем изобретении, не может быть конкретно ограничен при условии, что этот вектор способен реплицироваться в клетке хозяина, и он может быть сконструирован с использованием любого вектора, известного в данной области техники. Примеры традиционно используемого вектора могут включать природные или рекомбинантные плазмиды, космиды, вирусы и бактериофаги. Векторы, предполагаемые для использования в настоящем изобретении, могут представлять собой любой экспрессирующий вектор, известный в данной области техники.

Рекомбинантный вектор используют для трансфекции клетки хозяина с целью продуцирования производных глюкогона по настоящему изобретению. Кроме того, такие трансфицированные клетки, как часть настоящего изобретения, могут быть использованы для амплификации нуклеиновокислотных фрагментов и векторов или могут представлять собой культивированные клетки или клеточные линии, используемые для получения рекомбинантными методами производных глюкогона по настоящему изобретению.

Использованный в данном описании термин "трансфекция" относится к процессу введения рекомбинантного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий целевой белок, в клетку хозяина, тем самым обеспечивая экспрессию белка, кодируемого полинуклеотидом, в клетке хозяина. Что касается используемого для трансфекции полинуклеотида, то не имеет значения, встроен ли он в хромосому клетки хозяина и локализован там или локализован вне хромосомы, в то же время он может быть экспрессирован в клетке хозяина, и включены оба эти случая.

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

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

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

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен выделенный конъюгат, в котором производное глюкогона связано с группировкой биосовместимого вещества, которое способно увеличивать период полувыведения *in vivo* производного глюкогона. Таким конъюгатом может быть длительно действующий конъюгат.

В частности, согласно настоящему изобретению предложен выделенный конъюгат, который содержит пептидную группировку и группировку биосовместимого вещества, и пептидная группировка представляет собой такую же последовательность, как и последовательность общей формулы 1 или 2, или последовательность, ее включающую.

Что касается производного глюкогона, аминокислотной последовательности общей формулы 1 или 2, биосовместимого вещества и строения конъюгата, то все то, что описано выше, применимо к ним.

В частности, таким производным может быть выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленную последовательностью SEQ ID NO: 45, описанной выше. К признаку и комбинации в отношении выделенного пептида, включающего аминокислотную по-

следовательность общей формулы 1, применимо все то, что описано выше.

Кроме того, в частности, таким производным может быть выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2, представленную последовательностью SEQ ID NO: 46, описанной выше. К признаку и комбинации в отношении выделенного пептида, включающего аминокислотную последовательность общей формулы 2, применимо все то, что описано выше.

В частности, группировка биосовместимого вещества может быть выбрана из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или его производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и эластина, но этим не ограничивается.

В частности, полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации, но конкретно этим не ограничивается.

Более конкретно, FcRn-связывающее вещество может представлять собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, но конкретно этим не ограничивается. Такое же разъяснение относительно Fc-области иммуноглобулина также применимо к этому аспекту.

Выделенный конъюгат может представлять собой конъюгат, в котором группировка производного глюкогона, в частности, пептидная группировка, содержащая аминокислотную последовательность пептида, являющегося производным глюкогона, и группировка биосовместимого вещества связаны друг с другом посредством линкера. Такое же разъяснение относительно линкера также применимо к этому аспекту.

Кроме того, группировка производного глюкогона, в частности, пептидная группировка, содержащая аминокислотную последовательность пептида, являющегося производным глюкогона, может быть связана с группировкой биосовместимого вещества посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, жирной кислоты, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации, но этим не ограничивается.

Кроме того, группировка биосовместимого вещества может представлять собой FcRn-связывающее вещество, и выделенный пептид может быть связан с группировкой биосовместимого вещества посредством пептидного линкера или непептидного линкера, выбранного из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинил-этилового эфира, биоразлагаемого полимера, такого как полимолочная кислота (PLA) и полимолочная-гликолевая кислота (PLGA), липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации, но этим не ограничивается.

В частности, FcRn-связывающее вещество может представлять полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, а линкером может быть, в частности, полиэтиленгликоль, но этим не ограничивается.

Кроме того, линкером может быть линкер, который присоединен к остатку цистеина производного глюкогона, но конкретно этим не ограничивается.

Кроме того, линкер может представлять собой линкер, соответственно присоединенный к производному глюкогона и группировке биосовместимого вещества посредством ковалентных связей, которые образуются соответственно, когда один конец линкера взаимодействует с аминогруппой или тиоловой группой группировки биосовместимого вещества, в то время как другой конец линкера взаимодействует с аминогруппой или тиоловой группой пептидной группировки, но конкретно этим не ограничивается.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома, включающий введение субъекту производное глюкогона, конъюгата, содержащего производное глюкогона, или содержащей их композиции.

Производное глюкогона, конъюгат, содержащий производное глюкогона, содержащая их композиция, врожденный гиперинсулинизм, гипогликемия, метаболический синдром, предупреждение и лечение являются такими же, как разъяснено выше.

В настоящем изобретении термин "субъект" относится к субъекту, предположительно имеющему врожденный гиперинсулинизм, гипогликемию или метаболический синдром, и этот термин означает млекопитающих, включающих людей, мышей и домашний скот, имеющих врожденный гиперинсулинизм, гипогликемию или метаболический синдром либо имеющих риск врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома. Однако любой субъект, подлежащий лечению производным глюкогона по настоящему изобретению или композицией, содержащей производное глюкогона,

входит в объем изобретения без ограничения. Кроме того, субъект, предположительно имеющий врожденный гиперинсулинизм, гипогликемию или ожирение, можно эффективно лечить путем введения фармацевтической композиции, содержащей производное глюкагона по настоящему изобретению. Врожденный гиперинсулинизм, гипогликемия и ожирение являются такими, как разъяснено выше.

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

При этом способ предупреждения или лечения метаболического синдрома может представлять собой терапию, в которой применяют совместное введение, при этом дополнительно используют по меньшей мере одно соединение или вещество, обладающее терапевтической активностью в отношении метаболического синдрома, хотя данный способ конкретно этим не ограничен.

Следует понимать, что использованный в данном описании термин "совместное введение" относится к одновременному, разделному или последовательному введению. Если введение представляет собой последовательное или раздельное введение, то интервалом для введения вторичного ингредиента должен быть интервал, благодаря которому не утрачивается полезный эффект от совместного введения.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено применение производного глюкагона, или выделенного конъюгата, или композиции для изготовления лекарственного средства (или фармацевтической композиции) для предупреждения или лечения врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии или метаболического синдрома.

Производное глюкагона, выделенный конъюгат, композиция, врожденный гиперинсулинизм, гипогликемия и метаболический синдром являются такими же, как разъяснено выше.

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

Пример 1. Получение клеточной линии, демонстрирующей цАМФ (циклический аденозинмонофосфат)-ответ на GLP-1.

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

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

Прямой праймер (SEQ ID NO: 47):

5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'.

Обратный праймер (SEQ ID NO: 48):

5'-СТААССГАСТСТСГГГГААГАСТГАГСТСГСС-3'.

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

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

Пример 2. Синтез производного глюкагона.

Для получения производных глюкагона с улучшенными физическими свойствами в аминокислотной последовательности нативного глюкагона с SEQ ID NO: 1 производили замены на аминокислотные остатки, имеющие положительный и отрицательный заряды, и таким образом синтезировали производные глюкагона, которые представлены в приведенной ниже табл. 1. Относительную активность *in vitro*,

указанную ниже, измеряли методом, описанным в примере 4.

Таблица 1

Аминокислотные последовательности нативного глюкагона и производных глюкагона

SEQ ID NO	Пептидная последовательность	Образование кольца	pI	Активность <i>in vitro</i> (активность относительно SEQ ID NO: 1, %)
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDF VQWLMNT	-	6,8	100
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDF VQWLMNT	-	4,56	0,6
SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDF VQWLMNT	-	4,66	6,1

SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDF VQWLMNT	-	4,13	< 0,1
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCEAQDF VQWLMNT	-	4,22	0,3
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCEADDF VQWLMNT	-	4,03	< 0,1
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCEADDF VQWLMNT	-	3,71	< 0,1
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDF VQWLINT	-	3,77	< 0,1
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDF VVWLINT	-	3,77	< 0,1
SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCDADDF VVWLINT	-	3,66	< 0,1
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEF VQWLMNT	-	4,78	4,6
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKEF VQWLMNTC	образовано кольцо	6,20	56,3
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSCYLDSTRRAQDF VQWLMNT	-	4,43	5,2
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEF VQWLMNT	-	8,12	18,1
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDF VVWLMNT	-	6,11	1,1
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQVF VQWLMRT	-	9,11	4,2
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDF VQWLMRT	-	6,03	23,2
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDF RLWLMNT	-	8,15	< 0,1
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEF VQWLMNT	образовано кольцо	8,12	12,1

SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>ECRA</u> <u>KEF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	4,78	299,7
SEQ ID NO: 21	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>EKCA</u> <u>KEF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	4,78	57,8
SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>EKRC</u> <u>KEF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	6,20	147,8
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>EKRA</u> <u>KEF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	6,20	76,8
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>EKRA</u> <u>KEF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	6,21	58,0
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>EKRA</u> <u>KCF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	8,12	46,9
SEQ ID NO: 26	WXQGTFTSDYSKYLDE <u>ECRA</u> <u>KD</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	4,68	1,0
SEQ ID NO: 27	YXQGTFTSDYSKYLDE <u>ECRA</u> <u>KD</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	4,68	93,6
SEQ ID NO: 28	WXQGTFTSDYSKYLDE <u>ECRA</u> <u>KD</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	4,68	< 0,1
SEQ ID NO: 29	YXQGTFTSDYSKCLDE <u>ERRA</u> <u>KDF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	6,15	61,3
SEQ ID NO: 30	WXQGTFTSDYSKCLDE <u>ERRA</u> <u>KD</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	4,44	0,3
SEQ ID NO: 31	YXQGTFTSDYSKYLD <u>CKRA</u> <u>KEF</u> VQWLMNT	образовано кольцо	8,12	6,3
SEQ ID NO: 32	- SQGTFTSDYSKYLDE <u>ECRA</u> <u>KEFV</u> QWLMNT	образовано кольцо	4,78	0,7
SEQ ID NO: 33	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDF VQWLMNT	-	6,04	108,2
SEQ ID NO: 34	WXQGTFTSDYSKYLDE <u>ERRA</u> <u>KE</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	6,21	0,2

SEQ ID NO: 35	YXQGTFTSDYSKYCD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> F VQWLMNT	образовано кольцо	6,2	17,7
SEQ ID NO: 36	YXQGTFTSDCSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> F VQWLMNT	образовано кольцо	6,21	9,9
SEQ ID NO: 37	YXQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> F VQWLMNTC	образовано кольцо	6,21	225,5
SEQ ID NO: 38	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>E</u> F VQWLMNT	образовано кольцо	6,15	167,3
SEQ ID NO: 39	YXQGT FVSDCSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>D</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	6,15	3,7
SEQ ID NO: 40	YXQGT FVSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>D</u> FVQWLMNTC	образовано кольцо	6,15	40,8
SEQ ID NO: 41	YXQGTFCSDYSKYLD <u>E</u> RR <u>A</u> K <u>D</u> FVQWLMNT	образовано кольцо	6,03	45,2
SEQ ID NO: 42	YXQGTFCSDYSKYLDSRRAQDF VQWLMNT	-	6,03	37,9
SEQ ID NO: 43	YXQGTFTSDCSKYLDSRRAQDF VQWLMNT	-	6,03	1,6
SEQ ID NO: 44	YXQGTFTSDYSKYLDSRRAQDF VQWLMNTC	-	6,21	75,4

В аминокислотных последовательностях, указанных в табл. 1, аминокислота, обозначенная "X", представляет собой неприродную аминокислоту, аминокислотную кислоту (Aib), подчеркнутые аминокислотные остатки означают образование кольца, и "-" в аминокислотной последовательности указывает на то, что в соответствующем положении никакого аминокислотного остатка нет. Кроме того, в строках, касающихся образования кольца, "-" указывает на то, что образования кольца в соответствующих последовательностях не происходит.

Пример 3. Измерение pI производных глюкогона.

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

Как показано в приведенной выше табл. 1, в то время как нативный глюкогон с SEQ ID NO: 1 имел pI 6,8, некоторые производные глюкогона по настоящему изобретению демонстрировали значения pI в диапазоне от примерно 4 до примерно 6. Поскольку производные глюкогона по настоящему изобретению имеют значения pI ниже или выше, чем значение pI нативного глюкогона, они могут проявлять улучшенную растворимость и более высокую стабильность в условиях нейтральных pH по сравнению с нативным глюкогоном.

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

Пример 4. Измерение цАМФ активности производных глюкогона.

Активность производных глюкогона, синтезированных в примере 2, измеряли в клеточных линиях, имеющих рецепторы глюкогона человека, полученных в примере 1. Конкретно, трансфицированную клеточную линию переседали 3-4 раза в неделю, аликвотами вносили в 384-луночный планшет в количестве  $6 \times 10^3$  клеток на одну лунку и культивировали в течение 24 ч. Нативный глюкогон и производные глюкогона суспендировали в сбалансированном солевом буферном растворе Хенкса (HBSS), содержащем 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантин (IBMX), 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 5 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES) с клеточными культурами, в концентрациях 200 нМ и 1600 нМ, соответственно, непрерывно подвергали 4-кратному разведению 10 раз, ис-

пользовали набор для анализа цАМФ (набор LANCE cAMP 384, PerkinElmer), добавляли к культивированным клеткам и измеряли значение их флуоресценции. После измерения наивысшее значение флуоресценции принимали за 100% и затем, исходя из этого, рассчитывали значения  $EC_{50}$  (50%-ная эффективная концентрация) для производных глюкогона и сравнивали их с  $EC_{50}$  для нативного глюкогона. Результаты представлены в приведенной выше табл. 1.

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

Чтобы осуществить пэггилирование остатка цистеина производного глюкогона (SEQ ID NO: 12 или 20) с использованием ПЭГ 10 кДа, имеющего малеимидную группу и альдегидную группу, соответственно, на обоих концах (названного как "малеимид-ПЭГ-альдегид", 10 кДа, NOF, Japan), производные глюкогона и малеимид-ПЭГ-альдегид приводили во взаимодействие в молярном соотношении от 1:1 до 1:5 при концентрации белка от 3 до 10 мг/мл при низкой температуре в течение 1-3 ч. В частности, реакцию проводили в среде, в которую добавляли 20-60% изопропанола. По завершении реакции реакционную смесь наносили на SP Sepharose HP (GE Healthcare, USA) для очистки производных глюкогона, монопэггилированных по остатку цистеина.

Затем очищенные монопэггилированные производные глюкогона и Fc-область иммуноглобулина приводили во взаимодействие в молярном соотношении от 1:2 до 1:10 при концентрации белка от 10 до 50 мг/мл при температуре от 4 до 8°C в течение от 12 до 18 ч. Эту реакцию проводили в среде, в которой цианоборгидрид натрия ( $NaCNBH_3$ ) и от 10 до 20% изопропанола было добавлено в 100 мМ кальций-фосфатный буфер (pH 6,0). По завершении реакции реакционную смесь наносили на колонку Butyl Sepharose FF (GE Healthcare, USA) и колонку Source ISO (GE Healthcare, USA) для очистки конъюгата, содержащего производные глюкогона и Fc-область иммуноглобулина.

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

В частности, конъюгат, в котором производное глюкогона с SEQ ID NO: 12 и Fc-область иммуноглобулина связаны посредством ПЭГ, был назван "конъюгатом, содержащим производное глюкогона с SEQ ID NO: 12 и Fc-область иммуноглобулина", "длительно действующим конъюгатом с SEQ ID NO: 12" или "длительно действующим производным с SEQ ID NO: 12", и в настоящем изобретении эти термины можно использовать взаимозаменяемым образом.

В частности, конъюгат, в котором производное глюкогона с SEQ ID NO: 20 и Fc-область иммуноглобулина связаны посредством ПЭГ, был назван "конъюгатом, содержащим производное глюкогона с SEQ ID NO: 20 и Fc-область иммуноглобулина", "длительно действующим конъюгатом с SEQ ID NO: 20" или "длительно действующим производным с SEQ ID NO: 20", и в настоящем изобретении эти термины можно использовать взаимозаменяемым образом.

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

ПЭГ 3,4 кДа, имеющий пропиональдегидную группу на обоих концах, т.е. 3.4k PropionALD (2) PEG, приводили во взаимодействие с Lys CA эксендина-4, используя имидазо-ацетил-эксендин-4, где удален альфа-углеродный атом N-концевого остатка гистидина (CA эксендин-4, AP, USA), и выделяли пик изомера на самой последней части (Lys27) между двумя пиками Lys, который является довольно реакционноспособным и четко отличается от N-концевого изомера. Затем проводили реакцию сочетания, используя пэггилированный изомер пептида.

Реакцию сочетания осуществляли, приводя во взаимодействие вышеупомянутый пэггилированный пептид, имидазо-ацетил-эксендин-4, и Fc-область иммуноглобулина в молярном соотношении 1:8 при концентрации общего белка 60 мг/мл при 4°C в течение 20 ч. Взаимодействие проводили в 100 мМ К-Р (калий-фосфатный буфер) (pH 6,0), в который и добавляли восстанавливающий агент 20 мМ SCB (цианоборгидрид натрия). После сочетания реакционную смесь очищали путем пропускания через две колонки для очистки. Сначала удаляли большое количество Fc-области иммуноглобулина, не участвующее в реакции сочетания, используя SOURCE Q (XK 16 мл, Amersham Biosciences). После применения градиента концентрации соли с использованием 1 М раствора NaCl в 20 мМ трис-буфере (pH 7,5) сразу происходит элюирование Fc-области иммуноглобулина, которая имеет относительно слабую аффинность связывания, затем незамедлительно происходит элюирование конъюгата эксендин-4-(Fc-область иммуноглобулина). В результате этой первичной очистки Fc-область иммуноглобулина удаляется до определенной степени, однако полное разделение на ионообменной колонке не достигается из-за небольшой разницы в аффинности связывания между Fc-областью иммуноглобулина и конъюгатом эксендин-4-(Fc-область иммуноглобулина). Соответственно, проводили вторичную очистку, используя гидрофобность этих двух разных веществ. Образец, прошедший первичную очистку, адсорбировали на SOURCE ISO (HR 16 мл, Amersham Biosciences), используя 20 мМ трис-буфер (pH 7,5) и 1,5 М сульфат аммония, и затем элюировали при постепенном понижении концентрации сульфата аммония. В результате, Fc-область иммуноглобулина, которая обладает слабой аффинностью связывания с колонкой для HIC (хроматография гидрофобного взаимодействия), элюировалась первой, затем элюировался образец, эксендин-4-(Fc-

область иммуноглобулина), который обладает высокой аффинностью связывания к хвостовой части. Это разделение осуществлялось гораздо легче по сравнению с разделением на ионообменной колонке благодаря большому различию в гидрофобности.

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

Скорость потока: 2,0 мл/мин.

Градиент: А0→25% 70 мин В (А: 20 мМ трис-буфер, рН 7,5; В: А+ 1 М NaCl).

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

Скорость потока: 7,0 мл/мин.

Градиент: В 100→0% 60 мин В [А: 20 мМ трис-буфер (рН 7,5), В: А + 1,5 М сульфат аммония ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)].

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

Пример 7. Получение конъюгата, содержащего производное глюкагона и Fc-область иммуноглобулина (конъюгат SEQ ID NO: 37-Fc-область иммуноглобулина).

Чтобы осуществить пэгирование остатка цистеина производного глюкагона (SEQ ID NO: 12 или 20) с использованием ПЭГ 10 кДа, имеющего малеимидную группу и альдегидную группу, соответственно, на обоих концах (названного как "малеимид-ПЭГ-альдегид", 10 кДа, NOF, Japan), производные глюкагона и малеимид-ПЭГ-альдегид приводили во взаимодействие в молярном соотношении от 1:1 до 1:5 при концентрации белка от 3 до 10 мг/мл при низкой температуре в течение 1-3 ч. В частности, реакцию проводили в среде, в которую добавляли 20-60% изопропанола. По завершении реакции реакционную смесь наносили на SP Sepharose HP (GE Healthcare, USA) для очистки производных глюкагона, монопэгированных по остатку цистеина.

Затем очищенные монопэгированные производные глюкагона и Fc-область иммуноглобулина приводили во взаимодействие в молярном соотношении от 1:2 до 1:10 при концентрации белка от 10 до 50 мг/мл при температуре от 4 до 8°C в течение от 12 до 18 ч. Эту реакцию проводили в среде, в которой 10-50 мМ цианоборгидрид натрия (NaCNBH<sub>3</sub>), являющийся восстанавливающим агентом, и от 10 до 20% изопропанола было добавлено в 100 мМ кальций-фосфатный буфер (рН 6,0). По завершении реакции реакционную смесь наносили на колонку Butyl Sepharose FF (GE Healthcare, USA) и колонку Source ISO (GE Healthcare, USA) для очистки конъюгата, содержащего производные глюкагона и Fc-область иммуноглобулина.

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

В частности, конъюгат, в котором производное глюкагона с SEQ ID NO: 37 и Fc-область иммуноглобулина связаны посредством ПЭГ, был назван "конъюгатом, содержащим производное глюкагона с SEQ ID NO: 37 и Fc-область иммуноглобулина", "длительно действующим конъюгатом с SEQ ID NO: 37" или "длительно действующим производным с SEQ ID NO: 37", и в настоящем изобретении эти термины можно использовать взаимозаменяемым образом.

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

В этом эксперименте использовали крыс с ожирением, вызванным кормлением кормом с высоким содержанием жиров, которые широко используются в качестве животных моделей ожирения. В частности, грызуны с ожирением, вызванным кормом с высоким содержанием жиров, являются наиболее часто используемыми животными моделями для доклинической оценки влияния агентов, применяемых для лечения ожирения, на снижение массы тела, и данные модели создавали так, как приведено ниже. Когда здоровых крыс или мышей кормили кормом с содержанием жиров 60% в течение 4 недель (для крыс) или 6 месяцев (для мышей), масса тела у крыс увеличивалась примерно на 600 г, а масса тела у мышей увеличивалась примерно на 55 г по сравнению с их массой тела до кормления, и уровни липидов в крови также возрастали, что свидетельствует о состоянии ожирения, как у людей. Масса тела крыс, использованных в этом экспериментальном примере, перед введением составляла примерно 600 г. Во время эксперимента крыс содержали по отдельности, и они имели неограниченный доступ к воде. Освещение не предоставлялось с 6 ч вечера до 6 ч утра.

Тестируемые группы, получавшие корм с высоким содержанием жиров, включают: группу 1, получавшую эксципиент, не содержащий длительно действующего глюкагона (введение: 2 мл/кг; инъекция один раз каждые 3 суток), - разбавитель; группу 2, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группу 3, получавшую длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 в дозе 1,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группу 4, получавшую длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 в дозе 3,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группу 5, получавшую длительно действующее производное с SEQ

ID NO: 12 в дозе 6,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток); группу 6, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 в дозе 1,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток, соответственно); группу 7, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 в дозе 3,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток, соответственно); группу 8, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 3,3 нмоль/кг + длительно действующий производное с SEQ ID NO: 12 в дозе 6,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 3 суток, соответственно); группу 9, получавшую спаренное кормление с группой 4; и группу 10, получавшую спаренное кормление с группой 7.

Эксперимент останавливали на 15-е сутки, а в ходе эксперимента измеряли изменения массы тела крыс в каждой группе с интервалами 3 суток. После остановки эксперимента и аутопсии измеряли количество брыжеечного жира и массу печени. Для сравнения группы, получавшей разбавитель, и тестируемых групп выполняли статистический анализ методом однофакторного ANOVA.

В результате измерения изменений массы тела, что может быть подтверждено на фиг. 1, группы, которым вводили либо только длительно действующее производное эксендина, либо только длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12, показали уменьшение массы тела на величину от -8 и -7 до -22% по сравнению с массой тела до введения, в то время как в группах с совместным введением длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного с SEQ ID NO: 12 эффект снижения массы тела дополнительно увеличился с -22 до -35%.

Кроме того, при сравнении эффекта уменьшения массы тела в группе, которой вводили только длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12, и в группе, которой вводили комбинацию длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного с SEQ ID NO: 12, с уменьшением массы тела в группе спаренного кормления, соответственно, была показана разница, составляющая примерно -11% и примерно -17%, соответственно, что служит подтверждением того, что эффект снижения массы тела проявляется при введении одного только производного глюкоагона или при совместном введении в результате действий, иных чем потребление корма.

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

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

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

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

Тестируемые группы, получавшие корм с высоким содержанием жиров, включают: группу 1, получавшую эксципиент, не содержащий длительно действующего глюкоагона (введение: 5 мл/кг; инъекция один раз каждые 2 суток), - разбавитель; группу 2, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группу 3, получавшую длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 в дозе 4,4 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группу 4, получавшую длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 в дозе 8,8 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группу 5, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 в дозе 4,4 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); группу 6, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 2,1 нмоль/кг + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 в дозе 6,6 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); и группу 7, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 0,8 нмоль/кг + длительно действующий производное с SEQ ID NO: 20 в дозе 8,0 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток).

Эксперимент останавливали на 22-е сутки, а в ходе эксперимента измеряли изменения массы тела мышей в каждой группе с интервалами 2 суток. После остановки эксперимента и аутопсии измеряли массу печени мышей.

В результате измерения изменений массы тела, что может быть подтверждено на фиг. 4, каждая из групп, которым вводили только длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг,

инъекция один раз каждые 2 суток), показала уменьшение массы тела на -25 и -29%, соответственно, по сравнению с массой тела до введения. Кроме того, было показано, что эффект снижения массы тела еще больше возрастал при введении в комбинации с длительно действующим производным эксендина. Также было подтверждено, что совместное введение длительно действующего производного эксендина и длительно действующего производного с SEQ ID NO: 20 в соотношении 1:1, 1:3 и 1:10 еще больше усиливало эффект снижения массы тела до -50% или больше. Помимо этого, эффект снижения массы тела в зависимости от соотношения между длительно действующим производным эксендина и длительно действующим производным с SEQ ID NO: 20 не был существенным, однако, эффект анорексии повышался наряду с увеличением процентной доли длительно действующего производного эксендина, тем самым подтверждая, что длительно действующее производное глюкагона по настоящему изобретению может играть дополнительную роль в снижении массы тела помимо эффекта анорексии.

Кроме того, в результате измерения уровней общего холестерина в крови, что может быть подтверждено на фиг. 5, каждая из групп, которым вводили длительно действующее производное эксендина (4,4 нмоль/кг, инъекция один раз каждые 2 суток) и длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг, инъекция один раз каждые 2 суток), показала уменьшение уровней холестерина на -35 и -71%, соответственно. На основании приведенного выше было подтверждено, что длительно действующее производное глюкагона по настоящему изобретению может играть дополнительную роль в снижении уровня холестерина в крови помимо эффекта анорексии. Для сравнения группы, получавшей эксципиент (разбавитель), и тестируемых групп выполняли статистический анализ методом однофакторного ANOVA.

Экспериментальный пример 3. Эффект совместного введения длительно действующего производного эксендина и длительно действующего конъюгата с SEQ ID NO: 37 мышам с ожирением, вызванным кормом с высоким содержанием жиров.

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

Тестируемые группы, получавшие корм с высоким содержанием жиров, включают: группу 1, получавшую эксципиент, не содержащий длительно действующего глюкагона (введение: 5 мл/кг; инъекция один раз каждые 2 суток), - разбавитель; группу 2, получавшую лираглутид (Novo Nordisk) в дозе 50 нмоль/кг (инъекция два раза в сутки (BID)); группу 3, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток); и группу 4, получавшую длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 37 в дозе 2,2 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток).

Эксперимент останавливали на 28-е сутки и проводили интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе (IPGTT). После остановки эксперимента и аутопсии измеряли уровни холестерина в крови и массу печени мышей.

В результате измерения изменений массы тела, что может быть подтверждено на фиг. 6, каждая из групп, которым вводили только лираглутид (Novo Nordisk) в дозе 50 нмоль/кг (инъекция два раза в сутки) или только длительно действующее производное эксендина из примера 6 в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток), показала уменьшение массы тела на -22 и -32% по сравнению с массой тела в группе с введением разбавителя, соответственно, а группа с совместным введением длительно действующего производного эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) + длительно действующего производного с SEQ ID NO: 37 в дозе 2,2 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) показала дополнительное уменьшение массы тела на величину от -32 до -62% по сравнению с массой тела в группе с введением разбавителя.

Эффект снижения количества жира также дополнительно усиливался в группе с совместным введением длительно действующего производного эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) + длительно действующего производного с SEQ ID NO: 37 в дозе 2,2 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) на величину от -62 до -88% по сравнению с группой, которой вводили только длительно действующее производное эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток).

Кроме того, в результате измерения уровней общего холестерина в крови, что может быть подтверждено на фиг. 6, каждая из групп, которым вводили только лираглутид (Novo Nordisk) в дозе 50 нмоль/кг (инъекция два раза в сутки) или только длительно действующее производное эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток), показала уменьшение уровней холестерина на -40 и -49% по сравнению с уровнями холестерина в группе с введением разбавителя, соответственно, а группа с совместным введением длительно действующего производного эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) + длительно действующего производного с SEQ ID NO: 37 в дозе 2,2 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) показала дополнительное уменьшение уровней холестерина на величину от -49 до -70% по сравнению с уровнями холестерина в группе с введением разбавителя.

В результате проведения интраперитонеального теста толерантности к глюкозе (IPGTT), как пока-

зано на фиг. 6, группа с введением только длительно действующего производного эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) и группа с совместным введением длительно действующего производного эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) + длительно действующего производного с SEQ ID NO: 37 в дозе 2,2 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) показала аналогичные эффекты с величиной -61 и -67%, соответственно.

На основании приведенных выше результатов было подтверждено, что совместное введение длительно действующего производного эксендина в дозе 4,3 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) + длительно действующего производного с SEQ ID NO: 37 в дозе 2,2 нмоль/кг (инъекция один раз каждые 2 суток) показала аналогичный эффект в отношении регулирования уровней глюкозы в крови, демонстрируя при этом более превосходный эффект, применительно к эффектам снижения массы тела и уровней холестерина в крови, по сравнению с таковыми эффектами в случае соответствующего их введения.

Экспериментальный пример 4. Эффект улучшения острой гипогликемии под действием длительно действующего конъюгата с SEQ ID NO: 37.

Крысам Sprague Dawley (SD) не давали корма в течение 4 ч и вводили подкожной инъекцией инсулин (0,65 единиц/кг), чтобы вызвать гипогликемию. Через сорок пять минут после инъекции было подтверждено наличие у крыс гипогликемии, у крыс подкожной инъекцией вводили эксципиент (2 мл/кг; разовая инъекция, разбавитель), внутривенной инъекцией вводили длительно действующий конъюгат с SEQ ID NO: 37 (в концентрациях 5,16 нмоль/кг; 10,31 нмоль/кг и 20,63 нмоль/кг, соответственно) и подкожной инъекцией вводили нативный глюкагон (60 нмоль/кг) и измеряли изменения уровней глюкозы в крови.

В результате было подтверждено, что длительно действующий конъюгат с SEQ ID NO: 37 во всех введенных дозах улучшал вызванную инсулином гипогликемию у крыс SD, как показано на фиг. 7. На основании этих результатов было подтверждено, что длительно действующий конъюгат с SEQ ID NO: 37 обладает терапевтическим эффектом в отношении связанных с гипогликемией заболеваний.

Экспериментальный пример 5. Эффект улучшения хронической гипогликемии под действием длительно действующего конъюгата с SEQ ID NO: 37.

Оценку эффекта длительно действующего конъюгата с SEQ ID NO: 37 в качестве терапевтического агента в случае врожденного гиперинсулинизма проводили на грызунах с введенной инсулиновой помпой. Модель заболевания врожденного гиперинсулинизма создавали посредством введения инсулиновой помпы грызунам (крысам или мышам) хирургическим путем. Поскольку инсулин непрерывно секретируется из введенной грызунам помпы, индуцируется персистирующая гипогликемия, и поэтому такая модель приводит к состоянию, аналогичному врожденному гиперинсулинизму у людей.

Конкретно, крыс SD подвергали хирургической операции подкожного введения осмотической помпы, заполненной инсулином. В течение недели у крыс SD измеряли уровни глюкозы в крови, тех крыс, которые демонстрировали персистирующую гипогликемию, отбирали и им вводили подкожной инъекцией эксципиент (разбавитель) и длительно действующий конъюгат с SEQ ID NO: 37 (в дозе 3 нмоль/кг или 6 нмоль/кг) с интервалами 3 суток (Q3D), затем в течение 2 недель измеряли изменения уровней глюкозы в крови (BG) и рассчитывали площадь под кривой для уровня глюкозы в крови (AUC<sub>BG</sub>).

Площадь под кривой (AUC) имеет отношение к общему способу количественного определения изменения уровней глюкозы в крови при длительном приеме лекарственного средства. В результате было подтверждено, что крысы SD, которым вводили длительно действующий конъюгат с SEQ ID NO: 37, во всех введенных дозах постоянно демонстрировали значительное повышение уровней глюкозы в крови по сравнению с крысами, представляющими собой крыс с хронической гипогликемией, которым вводили эксципиент, не содержащий длительно действующего глюкагона (2 мл/кг; один раз каждые 3 суток, разбавитель), как показано на фиг. 8 (\*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 по сравнению с крысами с хронической гипогликемией, эксципиент, метод однофакторного ANOVA). На основании этих результатов было подтверждено, что длительно действующий конъюгат с SEQ ID NO: 37 обладает терапевтическим эффектом в отношении хронической гипогликемии, которая встречается у пациентов с врожденным гиперинсулинизмом.

Специалистам средней квалификации в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его замысла или существенных признаков. Описанные воплощения должны рассматриваться во всех аспектах только как иллюстративные и не ограничительные. Таким образом, объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не вышеизложенным описанием изобретения. Все изменения, которые возникают в пределах смыслового значения и диапазона эквивалентности формулы изобретения, следует включать в объем настоящего изобретения.

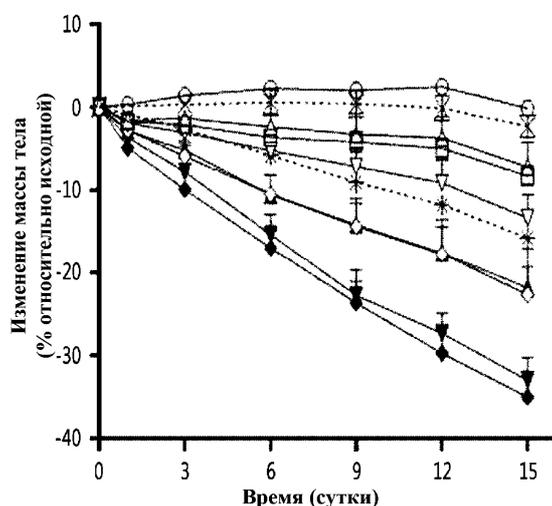
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пептида, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 11, 13-17, 19-27 и 29-44, для лечения врожденного гиперинсулинизма.
2. Применение по п.1, где пептид имеет значение изоэлектрической точки (pI), отличающееся от значения изоэлектрической точки нативного глюкагона (6,8).
3. Применение по п.1, где кольцо образовано между аминокислотной парой из 16-й и 20-й аминокислот.
4. Применение по п.1, где С-конец пептида амидирован.
5. Применение по п.1, где С-конец пептида не модифицирован.
6. Применение по п.1, где пептид представляет собой производное нативного глюкагона, способное активировать рецептор глюкагона.
7. Применение по п.1, где пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 15 и 36-44.
8. Применение по п.1, где пептид содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 37.
9. Применение по любому из пп.1-8, где пептид находится в форме длительно действующего конъюгата, в котором группировка биосовместимого вещества связана с пептидной группировкой, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 5, 11, 13-17, 19-27 и 29-44.
10. Применение по п.9, где группировка биосовместимого вещества выбрана из группы, состоящей из полимера, жирной кислоты, холестерина, альбумина и его фрагмента, альбуминсвязывающего вещества, полимера из повторяющихся звеньев конкретной аминокислотной последовательности, антитела, фрагмента антитела, FcRn (неонатальный Fc-рецептор)-связывающего вещества, соединительной ткани *in vivo* или ее производного, нуклеотида, фибронектина, трансферрина, сахара, гепарина и эластина.
11. Применение по п.10, где полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.
12. Применение по п.10, где FcRn-связывающее вещество представляет собой полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина.
13. Применение по п.9, где пептидная группировка и группировка биосовместимого вещества связаны друг с другом посредством линкера.
14. Применение по п.13, где линкер выбран из группы, состоящей из пептида, жирной кислоты, сахара, полимера, низкомолекулярного соединения, нуклеотида и их комбинации.
15. Применение по п.14, где полимер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля и пропиленгликоля, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты, олигонуклеотида и их комбинации.
16. Применение по п.13, где линкер представляет собой полиэтиленгликоль.
17. Применение по п.12, где Fc-область иммуноглобулина агликозилирована.
18. Применение по п.12, где Fc-область иммуноглобулина выбрана из группы, состоящей из:
  - (а) константного домена 1 тяжелой цепи (СН1-домена), СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена;
  - (б) СН1-домена и СН2-домена;
  - (в) СН1-домена и СН3-домена;
  - (г) СН2-домена и СН3-домена;
  - (д) комбинации между одним доменом или по меньшей мере двумя доменами, выбранным(и) из СН1-домена, СН2-домена, СН3-домена и СН4-домена, и шарнирной областью или частью шарнирной области иммуноглобулина; и
  - (е) димера, образованного между каждым из доменов константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.
19. Применение по п.12, где полипептид, содержащий Fc-область иммуноглобулина, находится в форме димера.
20. Применение по п.12, где Fc-область иммуноглобулина представляет собой производное нативной Fc-области, в котором удален участок, способный образовывать дисульфидную связь, производное нативной Fc-области, в котором удалена часть аминокислот(ы) на N-конце, производное нативной Fc-области, в котором на N-конце добавлен остаток метионина, производное нативной Fc-области, в котором удален комплементсвязывающий сайт, или производное нативной Fc-области, в котором удален сайт антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).
21. Применение по п.12, где Fc-область иммуноглобулина имеет происхождение из иммуноглобулина, выбранного из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.
22. Применение по п.21, где Fc-область иммуноглобулина представляет собой Fc-область IgG4.
23. Применение по п.12, где Fc-область иммуноглобулина представляет собой агликозилированную

Fc-область, имеющую происхождение из человеческого IgG4.

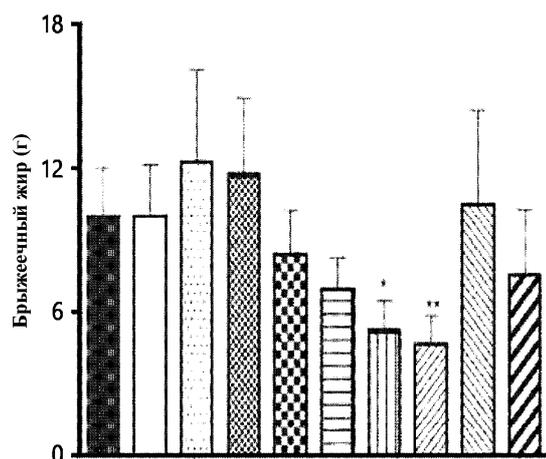
24. Применение по п.13, где линкер связан с остатком цистеина пептидной группировки.

25. Применение по п.13, где линкер соответственно связан с пептидной группировкой и группировкой биосовместимого вещества посредством ковалентных связей, которые образуются соответственно путем взаимодействия одного конца линкера с аминокислотной или тиоловой группой группировки биосовместимого вещества и путем взаимодействия другого конца линкера с аминокислотной или тиоловой группой пептидной группировки.



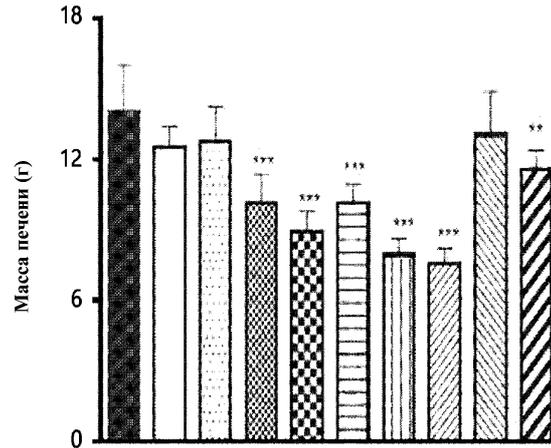
- Экципиент
- Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг)
- △ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▽ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ◇ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▲ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▼ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ◆ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- × Спаренное кормление (с группой, которой вводили длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))
- \*
- Спаренное кормление (с группой, которой вводили длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) и длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))

Фиг. 1



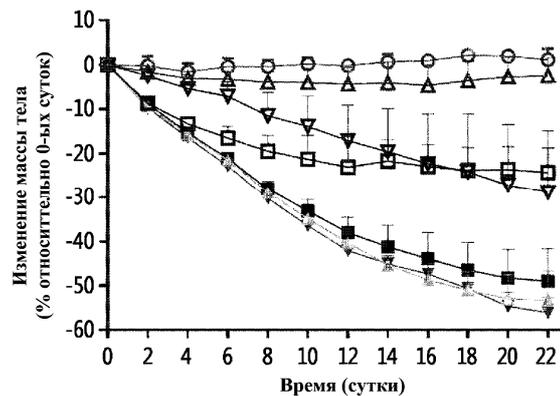
- Экспциент
- Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг)
- ▤ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▥ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ▧ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▨ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▩ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- Спаренное кормление (с группой, которой вводили длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))
- ▬ Спаренное кормление (с группой, которой вводили длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) и длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))

Фиг. 2



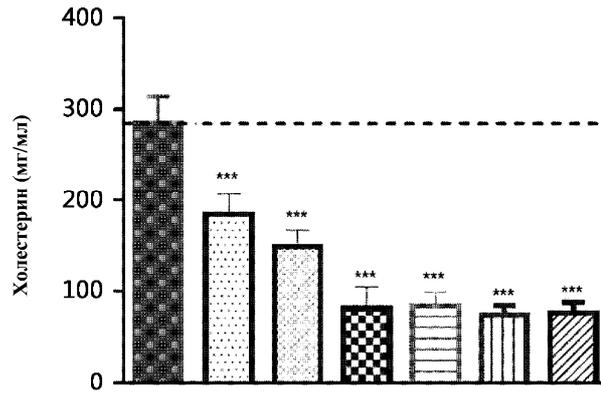
- Экципиент
- Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг)
- ▨ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▩ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ▧ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▦ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (1,6 нмоль/кг)
- ▥ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг)
- ▤ Длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (6,6 нмоль/кг)
- ▣ Спаренное кормление (с группой, которой вводили длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))
- ▢ Спаренное кормление (с группой, которой вводили длительно действующее производное эксендина-4 (3,3 нмоль/кг) и длительно действующее производное с SEQ ID NO: 12 (3,3 нмоль/кг))

Фиг. 3



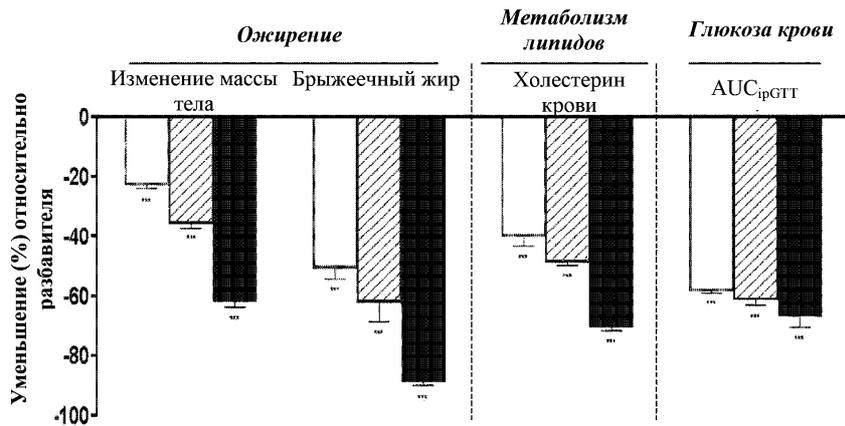
- Экципиент
- Длительно действующее производное эксендина-4 (4,3 нмоль/кг)
- △ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (4,4 нмоль/кг)
- ▽ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг)
- ▲ Длительно действующее производное эксендина-4 (4,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (4,4 нмоль/кг)
- ▾ Длительно действующее производное эксендина-4 (2,1 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (6,6 нмоль/кг)
- Длительно действующее производное эксендина-4 (0,8 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (8,0 нмоль/кг)

Фиг. 4



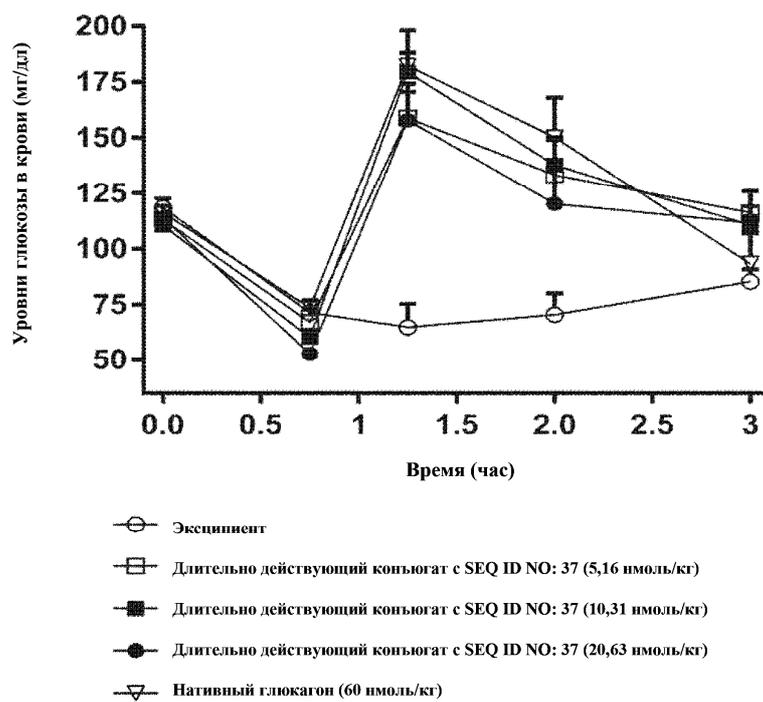
- Экципиент
- ▨ Длительно действующее производное эксендина-4 (4,3 нмоль/кг)
- ▩ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (4,4 нмоль/кг)
- ▧ Длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (8,8 нмоль/кг)
- ▦ Длительно действующее производное эксендина-4 (4,3 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (4,4 нмоль/кг)
- ▥ Длительно действующее производное эксендина-4 (2,1 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (6,6 нмоль/кг)
- ▤ Длительно действующее производное эксендина-4 (0,8 нмоль/кг) + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 20 (8,0 нмоль/кг)

Фиг. 5

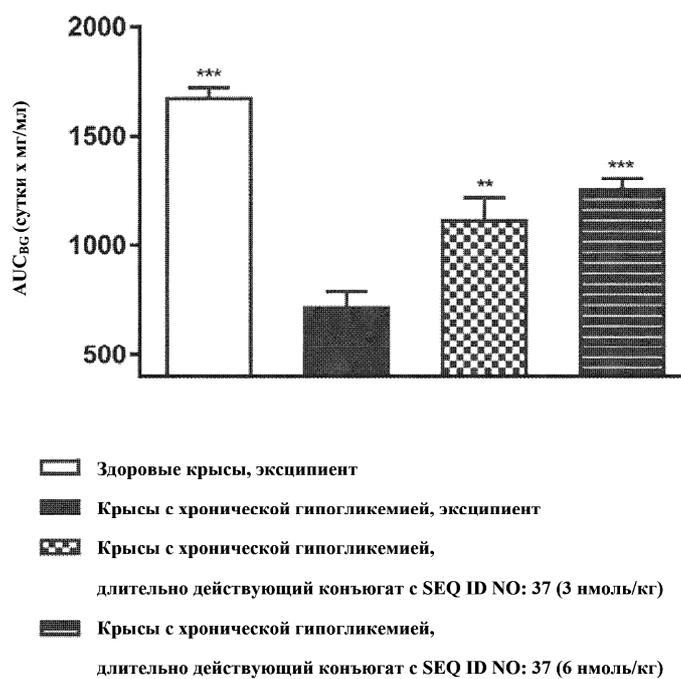


- Лираглутид 50 нмоль/кг BID (3 мг/сутки для людей)
- ▨ Длительно действующее производное эксендина 4,3 нмоль/кг Q2D (6 мг/неделя для людей)
- Длительно действующее производное эксендина + длительно действующее производное с SEQ ID NO: 37 4,3 нмоль/кг Q2D (6 мг/неделя для людей) + 2,2 нмоль/кг Q2D (3 мг/неделя для людей)

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

