



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128812** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)

A61K 38/26 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/56 (2017.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/59 (2017.01)
A61K 47/61 (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 9/10 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C07K 19/00
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 07966	(72) Винахідник(и): Чун Сун Йоуп (KR), Кім Чін-Сун (KR), Чан Мюн Хюн (KR), Лі Сан Хюн (KR), Чхе Ін Юн (KR), Квон Се Чхан (KR)
(22) Дата подання заявки:	25.07.2013	(73) Володілець (володільці): ХАНМІ ФАРМ. КО., ЛТД., 214, Muha-ro, Paltan-myeon, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, Republic of Korea (KR)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	31.10.2024	(74) Представник: Кукшина Тетяна Архипівна, реєстр. №88
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	10-2012-0081475	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2011/075393, 23.06.2011 WO 2011/143208 A1, 17.11.2011 KR 2012/0043208 A, 04.05.2012 US 7928058 B2, 19.04.2011 WO 2010/107256 A2, 23.09.2010 EP 1891105 B1, 11.04.2012 WO 2011/071957 A1, 16.06.2011 WO 2009/033756 A2, 19.03.2009 WO 2012/173422 A1, 20.12.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	25.07.2012	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	KR	
(41) Публікація відомостей про заявку:	26.12.2018, Бюл.№ 24	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	30.10.2024, Бюл.№ 44	
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21):	а201501078, 25.07.2013	

UA 128812 C2

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГІПЕРЛІПІДЕМІЇ, ЯКА МІСТИТЬ ПОХІДНУ ОКСИНТОМОДУЛІНУ

(57) Реферат:

Винахід стосується композиції та її застосування для профілактики або лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, яка містить кон'югат похідного оксинто модуліну як активний інгредієнт, в якій кон'югат похідного оксинто модуліну містить похідне оксинто модуліну, Fc-діянку імуноглобуліну та непептидильний полімер.

Винахід належить до композиції для запобігання або лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, яка містить похідну оксинтомодуліну як активний інгредієнт та спосіб лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, який полягає у застосуванні цієї композиції.

5 В останні роки у Корей, у зв'язку з економічним зростанням та розповсюдженістю прийнятих на Заході особливостей харчування збільшилося споживання жирів з їжею та зросла кількість метаболічних захворювань, викликаних відсутністю фізичних навантажень, як-то гіперліпідемії, цукрового діабету, гіпертонії, артеріосклерозу та жирової інфільтрації печінки.

10 Гіперліпідемія є станом, пов'язаним з підвищеними рівнями ліпідів у крові, як-то вільного холестерину, холестеринових естерів, фосфоліпідів та тригліцеридів та може виникати у трьох формах: (1) гіперхолістеринемія, (2) гіпертригліцеридемія та (3) комбінована гіперліпідемія (гіперхолістеринемія та гіпертригліцеридемія). Звичайно розрізняють первинну та вторинну гіперліпідемію. Первинна гіперліпідемія головним чином є викликаною різними генетичними дефектами, тоді як вторинна гіперліпідемія виникає через різні хворобливі стани, споживання певних ліків та харчові звички. На додачу до цього, гіперліпідемія також може бути наслідком комбінації головних та другорядних причин. Критерієм для діагностики гіперліпідемії звичайно є рівень загального холестерину у 220 мг/дл або вище та рівень тригліцеридів у 150 мг/дл або вище.

20 У організмі ссавців природно існують різні форми холестерину. Відомо, що холестерин з низькою щільністю (ЛПНЩ) є шкідливим для здоров'я та його ріст підвищує ризик виникнення серцевих захворювань. (Assman et al., Am. J. Card, 1996). Холестерин з високою щільністю (ЛПВЩ), навпаки, вважається "добрим" холестерином, який є важливим для здоров'я через те, що він запобігає виникненню артеріосклерозу тощо.

25 Хоча гіперліпідемія не має певних особливих симптомів, під час цього стану надмірна кількість ліпідів у крові прилипають до стінок судин, тим самим зменшуючи їх розмір та викликаючи артеріосклероз через появу запальних реакцій. З цієї причини виникає ряд наступних хвороб, як-то ішемічна хвороба серця, цереброваскулярне захворювання, обструкція периферичних кровоносних судин тощо (E. Falk et al., Circulation, 1995). На додачу до цього, надмірна кількість ліпідів крові накопичується у тканинах печінки, що може викликати стеатоз печінки. Стеатозом печінки вважається такий стан, при якому співвідношення жирів до маси печінки є більшим, ніж 5 %. Цю недугу може викликати не тільки надмірне вживання жирів, але й зловживання алкоголем.

30 Поточні способи, які застосовують для зменшення рівню ліпідів у крові охоплюють дієтотерапію, лікувальну фізкультуру та лікарську терапію, хоча дієтотерапія або виконання вправ лікувальної фізкультури є важкими у виконанні та у забезпеченні жорсткого контролю та їх терапевтична дія також є обмеженою.

35 Розроблені до цього часу препарати для зниження рівнів ліпідів охоплюють секвестранти жовчних кислот, ліки, які знижують рівень холестерину, як-то пригнічувачі HMG-CoA редуктази, ферменту, який відіграє важливу роль у біосинтезі холестерину, ліки, які знижують рівень тригліцеридів, як-то похідних фіброевої кислоти та ніотинової кислоти тощо. Однак, було повідомлено, що ці ліки мають побічні дії, як-то токсичний вплив на печінку, шлунково-кишкові розлади та канцерогенез.

40 Отже, залишається невідкладна потреба у отриманні препаратів, які можуть бути застосовані для лікування гіперліпідемії та супутніх захворювань (наприклад, артеріосклерозу та жирової інфільтрації печінки) з меншою кількістю побічних дій.

45 Як можливий кандидат для основи таких ліків нещодавно привернув до себе увагу оксинтомодулін, який отримують з пре-глюкагону та який - пептид, що може зв'язуватися як з глюкагоноподібним пептидом-1 (GLP-1), так і з рецептором глюкагону, виконуючи подвійну функцію. Через ці характеристики оксинтомодулін досліджували для різного застосування, в тому числі для можливого застосування у лікуванні ожиріння, гіперліпідемії та стеатозу печінки. Однак оксинтомодулін має свій недолік, який полягає у тому, що цю сполуку треба вводити у великих дозах через короткий період її напівжиття у природних умовах та недостатність її активності для застосування у лікуванні ожиріння, гіперліпідемії та жирової інфільтрації печінки.

55 Виходячи з цього, автори винаходу отримали похідну оксинтомодуліну з підвищеною порівняно з природним оксинтомодуліном активністю та виявили, що ця похідна оксинтомодулін зменшує вміст та співвідношення ліпідів у крові при застосуванні моделі індукованої гіперліпідемії у хом'ячка, що вказує на можливе ефективне застосування цієї похідної у лікуванні гіперліпідемічних захворювань, тим самим завершуючи заявлений винахід.

Задачею винаходу є створення композиції для запобігання або лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, яка містить похідну оксинтомодуліну як активного інгредієнта.

Іншою задачею винаходу є створення способу лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, який полягає у введенні пацієнту похідної оксинтомодуліну.

Іншою задачею винаходу є застосування похідної оксинтомодуліну в отриманні лікарського препарату для запобігання або лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу.

Для досягнення зазначених вище цілей, у одному аспекті заявленим винаходом передбачено композицію для запобігання або лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, яка містить похідну оксинтомодуліну як активного інгредієнта.

Як тут застосовано, термін "оксинтомодулін" має відношення до пептиду, отриманого з пре-глюкагону, який є попередником глюкагону. У винаході під "оксинтомодуліном" мається на увазі нативний оксинтомодулін та його попередник, аналог (похідна), фрагмент та варіант. Переважним чином, оксинтомодулін має амінокислотну послідовність SEQ ID №: 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNTK RNRNNIA).

Як тут застосовано, термін "варіант оксинтомодуліну" має відношення до пептиду, який має один або більше амінокислотних залишків, відмінних від залишків амінокислої послідовності нативного оксинтомодуліну та здатен до активації рецептора GLP-1 та рецептора глюкагону. Варіант оксинтомодуліну можна отримати шляхом будь-якого заміщення, додавання, видалення чи змінення деяких амінокислот нативного оксинтомодуліну або шляхом їх комбінації.

Як тут застосовано, термін "похідна оксинтомодуліну" має відношення до пептиду, похідної або міметика пептиду, отриманого шляхом додавання, видалення або заміщення деяких амінокислот нативного оксинтомодуліну, здатного до активування рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора зі значно більшою ефективністю, ніж нативний оксинтомодулін.

Як тут застосовано, термін "фрагмент оксинтомодуліну" має відношення до фрагменту, до якого додано або з якого видалено одну або більше амінокислот на N-або C-кінці нативного оксинтомодуліну, у якому додана амінокислота також може бути амінокислотою, яка не зустрічається в природі (наприклад, амінокислотою D-типу). Такі амінокислоти мають функцію регулювання рівнів глюкози у крові *in vivo*.

Способи отримання варіанту, похідної та фрагменту оксинтомодулін можуть бути застосовані окремо або у комбінації. Наприклад, заявлений винахід стосується пептиду, який має одну чи більше амінокислот, які відрізняються від амінокислот нативного пептиду та дезамінування N-кінцевих амінокислотних залишків та виконує функцію активування як рецептора GLP-1, так і глюкагонового рецептора.

Вказані у цьому документі амінокислоти позначено наведеною нижче аббревіатурою згідно за правилами Комісії з біохімічної номенклатури IUPAC-IUB:

Аланін A;	Аргінін R;
Аспарагін N;	Аспарагінова кислота D;
Цистеїн C;	Глютамінова кислота E;
Глютамін Q;	Гліцин G;
Гістидин H;	Ізолейцин I;
Лейцин L;	Лізин K;
Метіонін M;	Фенілаланін F
Пролін P;	Серин S;
Треонін T;	Триптофан W;
Тирозин Y;	Валін V.

У винаході під похідною оксинтомодуліну мається на увазі будь-який пептид, отриманий шляхом заміщення, додавання, видалення або пост-трансляційного змінення (наприклад метилювання, ацилювання, убівітинування або внутрішньомолекулярного ковалентного зв'язування) амінокислот амінокислої послідовності SEQ ID №: 1, здатний до активування як рецептора GLP-1, так і глюкагонового рецептора. При заміщенні або додаванні амінокислот можуть бути застосовані не тільки ті 20 амінокислот, які звичайно є у складі білків людського організму, але також і нетипові амінокислоти або амінокислоти, які не зустрічаються у природі. Джерела придбання таких нетипових амінокислот охоплюють компанії Sigma-Aldrich, ChemPer Inc. та Genzyme Pharmaceuticals. Пептиди, які містять ці амінокислоти та атипові пептидні послідовності можуть бути синтезовані та отримані з комерційних джерел, як-то від компанії American Peptide Company або Bachem (США) або Anygen (Корея).

У окремому втіленні винаходу похідна оксинтомодуліну винаходу є новим пептидом, який містить амінокислотну послідовність за наступною Формулою 1:

Формула 1.

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2

в якій:

- 5 R1 - гістидин, дезаміно-гістидил, диметил-гістидил (N-диметил-гістидил), бета-гідроксиімідазопропіоніл, 4-імідазоацетил, бета-карбокси-імідазопропіоніл або тирозин;
 X1-Aib (аміноізомасляну кислоту), d-аланін, гліцин, 8ar(N-метилгліцин), серин, або d-серин;
 X2 - глютамінову кислоту або глютамін;
 X3 - лейцин або тирозин;
 X4 - серин або аланін;
 10 X5 - лізин або аргінін;
 X6 - глютамін або тирозин;
 X7 - лейцин або метіонін;
 X8 - аспарагінову або глютамінову кислоту;
 X9 - глютамінову кислоту, серин, альфа-метил-глютамінову кислоту або є видаленим;
 15 X10 - глютамін, глютамінову кислоту, лізин, аргінін або серин або є видаленим;
 X11 - аланін, аргінін або валін або є видаленим;
 X12 - аланін, аргінін, серин або валін або є видаленим;
 X13 - лізин, глютамін, аргінін або альфа-метил-глютамінову кислоту або є видаленим;
 X14 - аспарагінову кислоту, глютамінову кислоту або лейцин або є видаленим;
 20 X15 - фенілаланін або є видаленим;
 X16 - ізолейцин або валін або є видаленим;
 X17 - аланін, цистеїн, глютамінову кислоту, лізин, глютамін або альфа-метил-глютамінову кислоту або є видаленим;
 X18 - триптофан або є видаленим;
 25 X19 - аланін, ізолейцин, лейцин, серин або валін або є видаленим;
 X20 - аланін, лізин, метіонін, глютамін або аргінін або є видаленим;
 X21 - аспарагін або є видаленим;
 X22 - аланін, гліцин або треонін або є видаленим;
 X23 - цистеїн або лізин або є видаленим;
 30 X24 - пептид, який має 2-10 амінокислот, які являють собою комбінацію аланіну, гліцину та серину або є видаленим; та

- R2 - послідовність KRNRRNIA (SEQ ID №: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID №: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID №: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID №: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID №: 39), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID №: 40) або є видаленим (за виключенням випадку, якщо амінокислотна послідовність за Формулою 1 є ідентичною послідовності SEQ ID №: 1).

- 3 метою підвищення активності природного оксинтомодуліну відносно рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора, похідна оксинтомодуліну винаходу може бути заміщеною 4-імідазоацетиллом, отриманим шляхом видалення альфа-карбонового атома гістидину у положенні 1 амінокислотної послідовності SEQ ID №:1, дезаміно-гістидилом, отриманим шляхом видалення N-кінцевої аміногрупи, диметил-гістидилом (N-диметил-гістидилом), отриманим шляхом модифікації N-кінцевої аміногрупи двома метильними групами, бета-гідроксиімідазопропіонілом, отриманим шляхом заміщення N-кінцевої аміногрупи на гідроксильну групу або бета-карбокси-імідазопропіонілом, отриманим шляхом заміщення N-кінцевої аміногрупи на карбоксильну групу. Крім того, ділянка зв'язування рецептора GLP-1 може бути заміщена амінокислотами, які підсилюють гідрофобні та іонні зв'язки або їх комбінацію. Частина послідовності оксинтомодуліну може бути заміщена амінокислотною послідовністю GLP-1 або ексендину-4 для підвищення активності рецептора GLP-1.

- Крім того, частина послідовності оксинтомодуліну може бути заміщена послідовністю, яка посилює альфа-спіраль. Переважним чином, амінокислоти у положеннях 10, 14, 16, 20, 24 та 28 амінокислотної послідовності за Формулою 1 можуть бути заміщені амінокислотами або їх похідними, які охоплюють Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO₂), Phe(4-NH₂), Phg, Pal, Nal, Ala (2-тієніл) та Ala (бензотієніл), які, як відомо, стабілізують альфа-спіраль та тип та кількість амінокислот або амінокислотних похідних, здатних стабілізувати альфа-спіраль не є обмеженими.

- Також амінокислоти у положеннях 10 та 14, 12 та 16, 16 та 20, 20 та 24 та 24 та 28 амінокислотної послідовності можуть бути переважним чином заміщені на глютамінову кислоту або лізин з утворенням кілець та кількість кілець, яких можна вставити не є обмеженою. Більш переважніше, похідна оксинтомодуліну може мати амінокислотну послідовність, вибрану з послідовностей за Формулами 1-6.

У особливому втіленні, похідна оксинтомодуліну винаходу є новим пептидом, який містить амінокислотну послідовність за наступною Формулою 2, отриману шляхом заміщення амінокислотної послідовності оксинтомодуліну на амінокислотну послідовність ексендину або GLP-1:

5 Формула 2.
R1-A-R3

У іншому особливому втіленні, похідна оксинтомодуліну винаходу є новим пептидом, який містить амінокислотну послідовність за наступною Формулою 3, отриману шляхом приєднання частини амінокислотної послідовності оксинтомодуліну до частини амінокислотної послідовності ексендину або GLP-1 через прийнятний амінокислотний лінкер:

10 Формула 3.
R1-B-C-R4

У іншому особливому втіленні, похідна оксинтомодуліну винаходу є новим пептидом, який містить амінокислотну послідовність за наступною Формулою 4, у якій частина амінокислотної послідовності оксинтомодуліну є заміщеною амінокислотою, здатною підсилювати зв'язувальну спорідненість до рецептора GLP-1, як-то, наприклад, Leu у положенні 26, який зв'язується з рецептором GLP-1 шляхом гідрофобної взаємодії заміщують гідрофобним залишком He або Val.

20 Формула 4.
R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3

У іншому особливому втіленні, похідна оксинтомодуліну винаходу є новим пептидом, який містить амінокислотну послідовність за наступною Формулою 5, у якій частина амінокислотної послідовності оксинтомодуліну є видаленою, доданою або заміщеною іншою амінокислотою з метою покращення властивостей нативного оксинтомодуліну, спрямованих до активування рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора:

25 Формула 5.
R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5
R1 у Формулах 2-5, є таким, як описано у Формулі 1;

30 А вибрано з групи, яка охоплює послідовність SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFV QWLMNT (SEQ ID №: 41), SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID №: 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID №: 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID №: 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID №: 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID №: 46) та SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID №: 47);

35 В вибрано з групи, яка охоплює послідовність SQGTFTSDYSKYLDSRRA QDFVQWLMNT (SEQ ID №: 41), SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID №: 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID №: 43), GQGTFTSDYSRYLEE EAVRLFIEWLKNG (SEQ ID №: 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID №: 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID №: 46), SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID №: 47), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW (SEQ ID №: 48) та SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID №: 49);

С є пептидом, який має 2-10 амінокислот, які являють собою комбінацію аланіну, гліцину та серину;

45 D1 - серин, глютамінову кислоту або аргінін;
D2 - аргінін, глютамінову кислоту або серин;
D3 - аргінін, аланін або валін;

D4 - аргінін, валін або серин;
D5 - глютамін, аргінін або лізин;

50 D6 - ізолейцин, валін або серин;
D7 - метіонін, аргінін або глютамін;
D8 - треонін, гліцин або аланін;

E1 - серин, Aib, Sar, d-аланін або d-серин;
E2 - серин або глютамінову кислоту;

E3 - аргінін або лізин;
E4 - глютамін або лізин;

55 E5 - аспарагінову кислоту або глютамінову кислоту;
E6 - глютамін, цистеїн або лізин;

E7 - цистеїн або лізин або є видаленим;

60 R3 - послідовність KRNRNNIA (SEQ ID №: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID №: 36) або GPSSGAPPPSK (SEQ ID №: 37);

R4 - послідовність HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID №: 38), HSQGTFT SDYSRYLDK (SEQ ID №: 39) або HGEFTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID №: 40); та

5 R5 - послідовність KRNRNNIA (SEQ ID №: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID №: 36) або GPSSGAPPPSK (SEQ ID №: 37) або є видаленим (за виключенням випадку, якщо амінокислотні послідовності за Формулами 2-5 є ідентичними послідовності SEQ ID №: 1).

Переважає чиним, похідна оксинтомодуліну винаходу може бути новим пептидом за наступною Формулою 6:

Формула 6.

10 R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X 13-X 14-X 15-X 16-X 17-X 18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2

У якій R1 - гістидин, дезаміно-гістидил, 4-імідазоацетил або тирозин;

X1-Aib (аміноізомасляну кислоту), гліцин, серин або d-серин;

X2 - глютамінову кислоту або глютамін;

X3 - лейцин або тирозин;

15 X4 - серин або аланін;

X5 - лізин або аргінін;

X6 - глютамін або тирозин;

X7 - лейцин або метіонін;

X8 - аспарагінову кислоту або глютамінову кислоту;

20 X9 - глютамінову кислоту або альфа-метил-глютамінову кислоту або є видаленим;

X10 - глютамін, глютамінову кислоту, лізин або аргінін або є видаленим;

X11 - аланін або аргінін або є видаленим;

X12 - аланін або валін або є видаленим;

X13 - лізин, глютамін, аргінін або альфа-метил-глютамінову кислоту або є видаленим;

25 X14 - аспарагінову кислоту, глютамінову кислоту або лейцин або є видаленим;

X15 - фенілаланін або є видаленим;

X16 - ізолейцин або валін або є видаленим;

X17 - аланін, цистеїн, глютамінову кислоту, глютамін або альфа-метил-глютамінову кислоту або є видаленим;

30 X18 - триптофан або є видаленим;

X19 - аланін, ізолейцин, лейцин або валін або є видаленим;

X20 - аланін, лізин, метіонін або аргінін або є видаленим;

X21 - аспарагін або є видаленим;

X22 - треонін або є видаленим;

35 X23 - цистеїн, лізин або є видаленим;

X24 є пептидом, який має 2-10 амінокислот, які є гліцином або є видаленим; та

R2 є послідовністю KRNRNNIA (SEQ ID №: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID №: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID №: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID №: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID №: 39) або HGEFTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID №: 40) або є видаленим (за виключенням випадку, якщо амінокислотна послідовність за Формулою 6 є ідентичною послідовності SEQ ID №: 1).

Більш переважним чиним, похідна оксинтомодуліну винаходу може бути вибраною з групи, що охоплює пептиди SEQ ID №: 2-34. Ще більш переважніше, похідна оксинтомодуліну винаходу може бути похідною оксинтомодуліну, описаною у Таблиці 1 Прикладу 2-1.

45 У прикладі винаходу були отримані похідні оксинтомодуліну, які, відповідно, мали амінокислотні послідовності SEQ ID № 2-34 та було знайдено, що ці похідні оксинтомодуліну демонструють відмінні активні властивості відносно рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора у порівнянні з нативним оксинтомодуліном (Приклад 2.). Інакше кажучи, з наведених вище результатів може бути помітно, що похідна оксинтомодуліну винаходу демонструє

50 відмінну терапевтичну дію, спрямовану проти гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, яка полягає у активуванні рецептора GLP-1 та рецептора глюкагону.

Похідні оксинтомодуліну винаходу є присутніми у вигляді кон'югатів, які містять різні полімери для підвищення терапевтичної дії та часу напівжиття похідних in vivo.

55 Кон'югати винаходу демонструють підвищену тривалість своєї дії у порівнянні з нативним оксинтомодуліном та кон'югати з тривалим строком дії містять оксинтомодулін, отриманий шляхом змінення, заміщення, додавання або видалення амінокислот нативного оксинтомодуліну, оксинтомодулін, кон'югований з біорозкладаним полімером, як-то поліетиленгліколь (ПЕГ), оксинтомодулін, кон'югований з полісахаридом, як-то альбумін, антитіла, еластин, фібронектин або хітин або з білком з тривалим строком дії, як-то фрагмент імуноглобуліну, оксинтомодулін, кон'югований з жирною кислотою, яка здатна зв'язуватися з

альбуміном *in vivo* або оксинтомодулін, інкапсульований у біорозкладані наночастинки. Тип застосованого у винаході кон'югату тривалої дії не є обмеженим.

Переважним чином, кон'югат є кон'югатом, у якому похідна оксинтомодуліну має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка охоплює SEQ ID №: 2-34, яка є приєднаною до Fc-ділянки імуноглобуліну через непептидильний полімер.

Fc-ділянка імуноглобуліну є біорозкладаним поліпептидом, здатним до метаболізування *in vivo*, отже є безпечною для застосування у якості носія для лікарського препарату. Ця ділянка має малу молекулярну масу у порівнянні з повною молекулою імуноглобуліну, отже це надає перевагу з точки зору отримання, очищення та виходу кон'югатів. На додачу до цього, через те, що амінокислотна послідовність відрізняється від антитіл, Fab - частина також демонструє високу неоднорідність, отже гомогенність матеріалу може бути сильно підвищена та може бути зменшена можливість викликання антигенності крові.

Як тут застосовано, термін "Fc-ділянка імуноглобуліну" має відношення до білка, який містить сталу ділянку 2 важкого ланцюга (CH2) та сталу ділянку 3 важкого ланцюга (CH3) імуноглобуліну, виключаючи змінні ділянки важкого та легкого ланцюгів, сталу ділянку 1 важкого ланцюга (CH1) та сталу ділянку 1 легкого ланцюга (CL1) імуноглобуліну. Додатково вона може містити шарнірну ділянку сталої ділянки важкого ланцюга. Також Fc-ділянка імуноглобуліну винаходу може являти собою подовжену Fc-ділянку, яка містить частину або всю сталу ділянку 1 важкого ланцюга та/або сталу ділянку 1 легкого ланцюга (CL1) за виключенням змінних ділянок важкого та легкого ланцюгів за умови, що вона має суттєво таку ж саме або кращу дію, ніж нативний білок. Також Fc-ділянка імуноглобуліну може бути ділянкою, що має видалену частину відносно довгої амінокислотної послідовності, відповідної ділянці CH2 та/або CH3. Певним чином, Fc-ділянка імуноглобуліну винаходу може містити 1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 та домен CH4, 2) домен CH1 та домен CH2, 3) домен CH1 та домен CH3, 4) домен CH2 та домен CH3, 5) комбінацію одного або декількох доменів та шарнірної ділянки (або частину шарнірної ділянки) імуноглобуліну, або 6) димер кожного домену важколанцюгових та легколанцюгових сталих ділянок.

Fc-ділянка імуноглобуліну винаходу охоплює нативну амінокислотну послідовність та послідовність її похідної (змінену шляхом мутації). Як тут застосовано, термін "похідна амінокислотної послідовності" має відношення до послідовності, яка відрізняється від нативної амінокислотної послідовності через видалення, вставку, наявність неконсервного або консервативного заміщення або комбінації цих змінень, які зачіпають один або декілька амінокислотних залишків нативної амінокислотної послідовності. Наприклад, відомо, що у випадку Fc-ділянки IgG у якості прийнятих ділянок для змінення можуть бути застосовані амінокислотні залишки у положеннях 214-238, 297-299, 318-322 або 327-331.

На додачу до цього, можливо застосування інших різних похідних, в тому числі таких, які мають видалення ділянки, здатної утворювати дисульфідний зв'язок або видалення деяких амінокислотних залишків на N-кінці нативної Fc-ділянки або додавання метіонінового залишку на N-кінці нативної Fc-ділянки. Додатково, для усунення ефекторних функцій може бути здійснено видалення у комплемент-зв'язувальній ділянці, як-то у ділянці зв'язування C1q та у ділянці ADCC (залежної від антитіл клітинно-опосередкованої цитотоксичності). Способи отримання таких похідних послідовності Fc-ділянки імуноглобуліну наведені у патентах International Patent Publication №№. WO 97/34631 та WO 96/32478.

Амінокислотні заміщення у білках та пептидах, які загальним чином не змінюють активності цих білків або пептидів добре відомі (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Найбільш часто зустрічаються заміщення у обох напрямках типу 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 та Asp/Gly. На додачу до цього, Fc-ділянку можна, якщо це потрібно, змінити шляхом фосфорилювання, сульфатування, акрилування, глікозилювання, метилування, фарнезилювання, ацетилювання, амідування тощо.

Описані вище похідні Fc-ділянки виявляють біологічну активність, яка є ідентичною біологічній активності Fc-ділянки винаходу або мають підвищену структурну стійкість до нагрівання, зміни pH тощо.

На додачу до цього, така Fc-ділянка може бути отримана з нативних форм, виділених з організму людини та інших тварин, як-то корів, кіз, свиней, мишей, кролів, хом'яків, щурів та морських свинок або може бути рекомбінантною ділянкою або похідною ділянок, отриманих з трансформованих тваринних клітин або мікроорганізмів. При цьому Fc-ділянка може бути отриманою з нативного імуноглобуліну шляхом виділення цілого імуноглобуліну з живого людського або тваринного організму та обробки його протеїназою. При обробці папаїном цілого імуноглобуліну він розщеплюється на Fab- та Fc-ділянки, а при обробці цілого імуноглобуліну

пепсином він розщеплюється на фрагменти $rF'c$ та $F(ab)_2$. Фрагменти Fc або $rF'c$ можна виділити шляхом гель-фільтраційної хроматографії тощо. Переважним чином, Fc -ділянка людського походження є рекомбінантною Fc -ділянкою імуноглобуліну, отриманою з мікроорганізмів.

На додачу до цього, Fc -ділянка імуноглобуліну винаходу може також існувати у формі ділянки з нативними цукровими ланцюгами або зі збільшеними чи зменшеними у порівнянні з нативною формою цукровими ланцюгами або може існувати у деглікозилованій формі. Збільшення, зменшення або усунення цукрових ланцюгів імуноглобулінової Fc -ділянки може бути досягнуто шляхом загальноприйнятих способів, як-то хімічним, ферментативним способом та генно-інженерним шляхом з застосуванням мікроорганізмів. Fc -ділянка, отримана шляхом усунення з її складу цукрових ланцюгів демонструє значне зменшення зв'язувальної спорідненості до частини $C1q$ першого комплементного компоненту $C1$ та зменшення або втрату залежної від антитіл клітинної цитотоксичності або залежної від комплементу цитотоксичності, отже вона не викликає непотрібних імунних відповідей *in vivo*. У цьому зв'язку, Fc -ділянка імуноглобуліну у деглікозилованій або аглікозилованій формі може бути більш прийнятною для предмету винаходу у якості носія ліків.

Як тут застосовано, термін "деглікозилювання" має відношення до ферментативного усування від Fc -ділянки цукрових функціональних груп та термін "аглікозилювання" має відношення до неглікозилованої Fc -ділянки, отриманої у прокаріотах, переважним чином *E.coli*.

Слід зазначити, що Fc -ділянка імуноглобуліну може бути отримана з організму людини або інших тварин, як-то корів, кіз, свиней, мишей, кроликів, хом'яків, щурів та морських свинок та, переважним чином, з організму людини.

На додачу до цього, Fc -ділянку імуноглобуліну можна отримати з антитіл IgG , IgA , IgD , IgE , IgM , або їх комбінації або гібриду. Переважним чином, її отримують з антитіл IgG або IgM , які є одними з найбільш розповсюджених білків в крові людини та, ще переважніше, її отримують з антитіл IgG , які, як відомо, підвищують час напівжиття ліганд-зв'язуючих білків.

Як тут застосовано, термін "комбінація" означає, що поліпептиди, які кодуєть одноланцюгові імуноглобулінові Fc -ділянки однакового походження є приєднаними до одноланцюгового поліпептиду іншого походження з утворенням димеру або мультимеру. Певним чином, димер або мультимер може бути отримано з двох або більше фрагментів, вибраних з групи, яка охоплює Fc - фрагменти IgG , IgA , IgM , IgD та IgE .

Як тут застосовано, термін "гібрид" означає, що у одноланцюговій імуноглобуліновій Fc -ділянці присутні послідовності, які відповідають двом або більше імуноглобуліновим Fc -фрагментам різного походження. У винаході можливо застосування різних форм гібридів. Іншими словами, можливо застосування гібриду, який буде складатися з 1-4 доменів, вибраних з групи, яка охоплює ділянки $CH1$, $CH2$, $CH3$ та $CH4$ Fc - ділянок IgG , IgA , IgM , IgD та IgE , а також може містити шарнірну ділянку.

Слід також зазначити, що антитіла IgG можуть бути розділені на підкласи $IgG1$, $IgG2$, $IgG3$ та $IgG4$ та у винаході можливо застосування комбінацій або гібридів цих підкласів. Переважним чином, антитіла IgG належать до підкласу $IgG2$ та $IgG4$ та більш переважніше, це є Fc -ділянка $IgG4$, суттєво позбавлена ефекторних функцій, як-то комплемент-залежної цитотоксичності (CDC).

Іншими словами, найбільш бажаною Fc -ділянкою імуноглобуліну, яку застосовують у якості носія ліків у винаході є Fc -ділянка, отримана від антитіл людини $IgG4$. Fc -ділянка людського походження є більш бажаною, ніж Fc -ділянка, яка має інше походження, яка може діяти у організмі людини у якості антигену та викликати небажані імунні відповіді, як-то утворення нових антитіл проти антигену.

Як тут застосовано, термін "непептидильний полімер" має відношення до біосумісного полімеру, який містить дві або більше одиниць, що повторюються та зв'язані між собою шляхом будь-якого ковалентного зв'язку замість пептидного зв'язку. Непептидильний полімер у винаході, може бути взаємозамінно застосованим з непептидильним лінкером.

Непептидильний полімер, який може бути застосованим у винаході може бути вибраним з групи, що охоплює поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь, етиленгліколь/пропіленгліколю кополімер, поліоксиетилований поліол, полівініловий спирт, полісахариди, декстран, полівініловий етиловий етер, біорозкладані полімери, як-то ПМК (полімер молочної кислоти) та ПМГК (полімер молочної-гліколівої кислоти), ліпідні полімери, хітин, гіалуронова кислота та їх комбінації.

Переважним чином, непептидильний полімер є поліетиленгліколем. На додачу до цього, заявлений винахід також охоплює його відомі похідні та похідні, які можуть бути легко отримані за допомогою відомого у цій галузі способу.

Пептидний лінкер, застосований у злитому (гібридному) білку, отриманому шляхом традиційного способу злиття у одній рамці зчитування має недоліки через те, що він може легко розщеплюватися протеїназою *in vivo*, отже очікуване отримання належного ефекту підвищення сироваткового часу напівжиття активного лікарського препарату за допомогою носія не може бути досягнуто. Однак у винаході для підтримання сироваткового напівжиття пептиду подібно до дії носія може бути застосовано полімер, який є стійким до дії протеїнази. Таким чином, у винаході може бути застосовано будь-який непептидильний полімер без обмеження, за умови, що він є полімером, наділеним зазначеною вище функцією, тобто полімером, стійким до дії протеїнази *in vivo*. Непептидильний полімер має молекулярну масу у межах 1-100 кДа, переважним чином 1-20 кДа. Непептидильний полімер винаходу, прикріплений до імуноглобулінової Fc-ділянки може бути або одним видом полімеру або комбінацією різних полімерів.

Застосований у винаході непептидильний полімер може мати реакційну групу, здатну зв'язуватися з Fc-ділянкою імуноглобуліну та білковим лікарським препаратом. Реакційна група на обох кінцях непептидильного полімеру є переважним чином вибраною з групи, яка охоплює реакційну альдегідну групу, пропіональдегідну групу, бутиральдегідну групу, малеїмідну групу та сукцинімідну похідну.

Сукцинімідна похідна може бути сукцинімідилпропіонатом, гідрокси-сукцинімідилом, сукцинімідилкарбоксиметилом або сукцинімідилкарбонатом. Зокрема, коли пептидильний полімер має реактивну альдегідну групу на обох кінцях, неспецифічні реакції можуть бути зведені до мінімуму та фізіологічно активний поліпептид та імуноглобулін можуть бути ефективно зв'язані, відповідно, з одним та другим кінцями непептидильного полімеру. Кінцевий продукт, отриманий шляхом редуктивного алкілювання з альдегідним зв'язком є набагато стійкішим, ніж продукт, зв'язаний за допомогою амідного зв'язку. Альдегідна реакційна група вибірково зв'язується з N-кінцем при низькому значенні pH та може утворювати ковалентний зв'язок з лізиновим залишком при високих значеннях pH, як-то pH 9,0.

Реакційні групи на обох кінцях непептидильного полімеру можуть бути однаковими або різними. Наприклад, непептидильний полімер може мати малеїмідну групу на одному кінці та альдегідну групу, пропіональдегідну групу або бутиральдегідну групу на іншому кінці. Якщо поліетиленгліколь, який має реакційні гідроксигрупи на обох своїх кінцях застосовують як непептидильний полімер, то гідроксигрупа може бути активованою з різними реакційними групами шляхом відомих хімічних реакцій або може бути застосовано поліетиленгліколь, який має придбану з торгівельних джерел модифіковану реакційну групу з отриманням таким чином кон'югату винаходу тривалої дії.

Кон'югат винаходу може бути такою молекулою, у якій перший та другий кінець непептидильного полімеру є приєднаними до аміногрупи або до тіолової групи, відповідно, Fc-ділянки імуноглобуліну та похідної оксинтомодуліну.

Непептидильний полімер винаходу має функціональні групи на обох кінцях, які можуть бути приєднані або до Fc-ділянки імуноглобуліну або до білкового лікарського препарату. Функціональні групи можуть бути альдегідною, пропіональдегідною, бутиральдегідною, малеїмідною групою та сукцинімідною похідною (тобто сукцинімідилпропіонатом, гідроксисукцинімідилом, сукцинімідилкарбоксиметилом або сукцинімідилкарбонатом), але не обмежуються ними.

Реакційні групи на обох кінцях лінкера, який є непептидильним полімером також можуть бути однаковими або різними. Наприклад, непептидильний полімер може мати малеїмідну групу на одному кінці та альдегідну групу, пропіональдегідну групу або бутиральдегідну групу на іншому кінці. Наприклад, коли непептидильний полімер має реакційну альдегідну групу на одному кінці та реакційну малеїмідну групу на другому кінці, то виникнення неспецифічних реакцій може бути мінімізовано та фізіологічно активний поліпептид та імуноглобулін можуть бути ефективно приєднані до обох кінців непептидильного полімеру. Відповідно до втілення винаходу, кон'югат було синтезовано шляхом приєднання оксинтомодуліну або його похідної до Fc-ділянки імуноглобуліну за допомогою ковалентного зв'язку з застосуванням непептидильного полімеру ПЕГ, який містить окрему пропіональдегідну групу або таку групу разом з малеїмідною групою та альдегідною групою.

Фармацевтична композиція винаходу може бути застосована для попередження або лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу.

Як тут застосовано, термін "попередження" має відношення до всіх дій, які пригнічують або затримують розвиток зазначеної хвороби. Як тут застосовано, термін "попередження" має відношення до застосування похідної оксинтомодуліну винаходу для пригнічення або затримки розвитку гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, які демонструють підвищення

загального рівня холестерину у крові та рівнів холестерину низької щільності та зменшення рівнів холестерину високої щільності.

Як тут застосовано, термін "лікування" має відношення до всіх дій, які послаблюють, зменшують або усувають симптоми хвороби, яка розвивається. Як тут застосовано, термін "лікування" означає застосування похідної оксинтомодуліну винаходу для послаблення, зменшення або усунення гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, які демонструють підвищення загального рівня холестерину у крові та рівнів холестерину низької щільності та зменшення рівнів холестерину високої щільності.

Як тут застосовано, термін "гіперліпідемія" має відношення до стану, пов'язаного з аномально підвищеними рівнями ліпідів, як-то вільного холестерину, холестеринових естерів, фосфоліпідів та тригліцеридів у крові. Хоча гіперліпідемія не має певних особливих симптомів, в ході цієї недуги надмірна кількість ліпідів у крові прилипає до стінок судин, тим самим зменшуючи їх розмір та викликаючи артеріосклероз через появу запальних реакцій. З цієї причини виникає ряд наступних хвороб, як-то ішемічна хвороба серця, цереброваскулярне захворювання, обструкція периферичних кровоносних судин тощо.

Отже, фармацевтична композиція винаходу може бути застосована не тільки для лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, але й для лікування ішемічної хвороби серця, цереброваскулярного захворювання та обструкції периферичних кровоносних судин.

Як тут застосовано, термін "стеатоз печінки" має відношення до стану, при якому співвідношення жиру до загальної маси печінки є більшим, ніж 5 %. У винаході, стеатоз печінки охоплює неалкогольний стеатоз печінки (NAFLD), алкогольний стеатоз печінки, стеатоз печінки, викликаний вживанням незбалансованого харчування, голодом, ожирінням, цукровим діабетом або стеатогепатит. Вважається, що неалкогольний стеатоз печінки охоплює первинний та вторинний тип захворювання, але переважним чином може траплятися неалкогольний стеатоз печінки, який є наслідком початкової гіперліпідемії, цукрового діабету або ожиріння.

На додачу до цього у винаході неалкогольний стеатоз печінки охоплює звичайний стеатоз, неалкогольний стеатопатит, фіброз та цироз печінки, які викликані розвитком цих хвороб.

Артеріосклероз є судинною хворобою, у якій в результаті накопичування холестерину в ендотелії кровоносних судин та проліферації ендотеліальних клітин утворюється атерома.

У прикладі винаходу, кон'югат похідної оксинтомодуліну тривалої дії було отримано шляхом зв'язування похідної оксинтомодуліну з Fc-ділянкою імуноглобуліну через ковалентний зв'язок з застосуванням поліетиленгліколю та отриманий кон'югат було застосовано до тваринних моделей хом'яків з гіперліпідемією, викликану шляхом споживання раціону з високим вмістом жирів. В результаті було виявлено, що група, якій було введено кон'югат похідної оксинтомодуліну тривалої дії винаходу показала значне зменшення рівнів тригліцеридів у крові (Фіг. 1), значне зменшення рівнів загального холестерину у крові (Фіг. 2) та значне зменшення рівнів холестерину низької щільності (ЛПНЩ) у крові порівняно з тваринними моделями з викликану гіперліпідемією. На додачу до цього було спостережено, що група, якій було введено кон'югат похідної оксинтомодуліну тривалої дії винаходу показала значне підвищення рівнів холестерину високої щільності (ЛПВЩ) у крові (Фіг. 4) та значне підвищення співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ - холестерину у крові (Фіг. 5) порівняно з тваринними моделями з викликану гіперліпідемією.

Крім того, може бути помітно, що кон'югат похідної оксинтомодуліну тривалої дії згідно за заявленим винаходом демонструє зменшення рівнів загального холестерину (Фіг.6) у крові, зменшення рівнів холестерину низької щільності (ЛПНЩ) у крові та зменшення рівнів тригліцеридів (Фіг.7) порівняно з наявним у торгівельній мережі аналогом GLP-1 тривалої дії VICTOZA®. На додачу до цього, може бути помітно, що застосування кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії винаходу веде до підвищення рівнів холестерину високої щільності (ЛПВЩ) та співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ - холестерину у крові порівняно до дії препарату VICTOZA® (Фіг. 8 та 9). Зокрема значне підвищення рівнів холестерину високої щільності (ЛПВЩ) та співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ - холестерину у крові порівняно до дії препарату VICTOZA® демонструє кон'югат тривалої дії пептиду SEQ ID №: 25 з Fc-ділянкою.

Іншими словами, похідна оксинтомодуліну згідно за заявленим винаходом зменшує рівень ліпідів у крові, отже може бути застосована у якості агента для лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу. На додачу до цього, у порівнянні з нативним оксинтомодуліном кон'югат винаходу має відмінну здатність до активування рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора та демонструє підвищений час напівжиття in vivo, отже його активність може бути підтримана in vivo протягом більш тривалого періоду часу.

Похідна оксинтомодуліну винаходу також може підвищувати активність фактора (протеїнкіназа C- ζ або PKC- ζ), який регулює активність ферментів, залучених до ліполізу жирів

та підвищувати рівень експресії фактора (Glut2), який є також залученим до ліполізу жирів, отже таким чином також відбувається лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, але обсяг винаходу не обмежується вищезазначеними механізмами дії.

Фармацевтична композиція винаходу також може містити фармацевтичний агент, який демонструє профілактичні або терапевтичні дії, спрямовані проти гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу. Зокрема композиція винаходу може додатково містити фармацевтичний агент, відомий у якості агента для лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу з метою застосування фармацевтичного агента у комбінації з похідною винаходу.

Отже, композиція винаходу може бути застосованою окремо або у комбінації з іншими ліками для запобігання або лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу.

Як тут застосовано, термін "введення" означає введення пацієнту зазначеного матеріалу за допомогою будь-якого відповідного способу. Похідна винаходу може бути введена будь-яким будь-яким шляхом за умови досягнення нею тканини-мішені. Зокрема похідна винаходу може бути введеною, але без обмеження, внутрішньочеревинним, внутрішньовенним, внутрішньом'язевим, підшкірним, внутрішньошкірним, пероральним, місцевим, інтраназальним, ректальним або внутрішньолегеневим шляхом. Тим не менш, через розщеплення пептиду при пероральному введенні, композицію для такого введення переважним чином отримують таким чином, щоб активний інгредієнт був покритим або захищеним від деградації у шлунку. Переважно композиція даного винаходу може бути застосована у прийнятній для ін'єкційного введення формі. Крім того, фармацевтична композиція винаходу може бути введеною за допомогою будь-якої системи, здатної доставляти активний інгредієнту клітини-мішені.

Фармацевтична композиція, яка містить похідну оксинтомодуліну винаходу може додатково містити фармацевтично прийнятний носій. Такі фармацевтично прийнятні носії для перорального введення охоплюють в'язівні речовини, мастила, розпушувачі, наповнювачі, солюбілізатори, диспергуючі агенти, стабілізатори, суспендуючі агенти, барвники та ароматизатори. Фармацевтично прийнятні носії для ін'єкційних препаратів охоплюють буфери, консерванти, знеболюючі засоби, солюбілізатори, ізотонічні агенти та стабілізатори. Фармацевтично прийнятні носії для місцевого застосування охоплюють основи, наповнювачі, мастила та консерванти.

Фармацевтична композиція винаходу може бути отримана з застосуванням зазначених вище фармацевтично прийнятних носіїв у вигляді різних лікарських форм. Наприклад, фармацевтична композиція для перорального введення може бути отримана у вигляді таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток тощо.

Для прийнятних для ін'єкційного введення препаратів може бути надана фармацевтична композиція у вигляді ампули зі стандартною лікарською формою або контейнера з багаторазовим дозуванням. Фармацевтична композиція також може бути отримана у вигляді розчинів, суспензій, таблеток, пігулок, капсул та препаратів з уповільненим вивільненням...

Слід зазначити, що приклади прийнятних для препарату носіїв, наповнювачів та розчинників охоплюють лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбіт, маніт, ксиліт, еритрит, мальтит, крохмаль, гуміарабік, альгінат, желатин, фосфат кальцію, силікат кальцію, целюлозу, метилцелюлозу, мікрокристалічну целюлозу, полівінілпіролідон, воду, метилгідроксибензоат, пропілгідроксибензоат, тальк, стеарат магнію та мінеральні оливи. Крім того, фармацевтична композиція винаходу може додатково містити наповнювачі, антикоагулянти, мастила, змочуючі агенти, ароматизатори, консерванти тощо.

Доза фармацевтичної композиції винаходу визначається залежно від виду активного інгредієнта разом з різними факторами, як-то тип хвороби, що підлягає лікуванню, шлях введення, вік, стать, вага пацієнта та тяжкість захворювання.

Фармацевтична композиція винаходу має відмінну ефективність та тривалий час напівжиття *in vivo*, отже кількість та частота введення такої фармацевтичної композиції може бути значно скороченою.

У іншому втіленні заявленим винаходом передбачено спосіб лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу, який полягає у введенні пацієнту похідної оксинтомодуліну винаходу.

Вищезазначені оксинтомодулін, гіперліпідемія, стеатоз печінки та артеріосклероз описані вище.

Як тут застосовано, термін "суб'єкт" стосується пацієнта, відносно якого є підозри, що він хворіє на гіперліпідемію, стеатоз печінки або артеріосклероз. Зокрема цей термін охоплює ссавців, включаючи людину, щурів та домашніх тварин, які хворіють або мають ризик розвитку

вищезазначених хвороб. На додачу до цього, суб'єкт може бути будь-яким суб'єктом, якого можна лікувати шляхом застосування похідної оксинтомодуліну винаходу.

Терапевтичний спосіб винаходу може полягати у введенні фармацевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить кон'югат. Загальна щоденна доза композиції може бути визначена за допомогою відповідної медичної оцінки лікарем та композицію можна вводити один або кілька разів. Тим не менш, з точки зору мети винаходу, конкретна терапевтично ефективна доза композиції для будь-якого конкретного пацієнта може варіювати в залежності від різних добре відомих у медичній галузі чинників, в тому числі від виду та ступеня відповіді, яка має бути досягнута, від певних композицій та в залежності від того, чи застосовані з ними ти чи інші агенти чи ні, від віку, маси тіла, стану здоров'я, статі та раціону пацієнта, часу та способу введення, швидкості секреції композиції, тривалості лікування та від інших лікарських засобів, які застосовують або у поєднанні або одночасно з композицією даного винаходу, а також від інших відомих у медицині факторів.

У іншому аспекті, заявленим винаходом передбачено спосіб отримання кон'югату похідної оксинтомодуліну, який може полягати у наступному: (1) ковалентне зв'язування непеptидильного полімеру, який має хімічно активну альдегідну, малеїмідну або сукцинімідну групу до аміно- або тіолової групи пептиду похідної оксинтомодуліну; (2) вилучення з реакційної суміші етапу 1) пептиду похідної оксинтомодуліну, який має непеptидильний полімер, ковалентно зв'язаний з ним у інших, ніж N-кінцеві, положеннях; та (3) ковалентне зв'язування Fc-ділянки імуноглобуліну з іншим кінцем приєднаного непеptидильного полімеру з отриманням пептидного кон'югату, який містить Fc-ділянку імуноглобуліну та пептиду похідної оксинтомодуліну, приєднані відповідно до одного та до іншого кінця непеptидильного полімеру.

Більш докладним чином, спосіб отримання може полягати у наступному: 1) ковалентне зв'язування непеptидильного полімеру, який має хімічно активну альдегідну групу та хімічно активну малеїмідну групу відповідно на одному та другому кінці до цистеїнового залишку похідної оксинтомодуліну; (2) вилучення з реакційної суміші етапу 1) пептиду похідної оксинтомодуліну, який має непеptидильний полімер, ковалентно зв'язаний з цистеїновим залишком; та (3) ковалентне зв'язування Fc-ділянки імуноглобуліну з іншим кінцем приєднаного непеptидильного полімеру з отриманням пептидного кон'югату, що містить Fc-ділянку імуноглобуліну та пептиду похідної оксинтомодуліну, приєднані відповідно до одного та до іншого кінця непеptидильного полімеру.

У іншому аспекті, заявленим винаходом передбачено спосіб застосування похідної оксинтомодуліну для отримання лікарського препарату для запобігання або лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу.

Похідна оксинтомодуліну винаходу має сильну здатність до активування рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора у порівнянні з нативним оксинтомодуліном та демонструє ефекти зменшення загальних рівнів холестерину у крові, зменшення рівнів ЛПНЩ та тригліцеридів, підвищення яких спричинено споживанням їжі з високим вмістом жиру та збільшення ЛПВЩ-рівнів та співвідношення співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ - холестерину. Отже, похідна оксинтомодуліну винаходу може бути ефективно застосована у лікуванні гіперліпідемії та пов'язаних з цим станом хвороб.

Опис креслень.

Фіг. 1 є графіком, на якому зображено змінення рівнів тригліцеридів у крові, викликане введенням похідної оксинтомодуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликаною вживанням їжі з високим вмістом жиру (#: вказує на значне підвищення у порівнянні з групою, яка вживала звичайну їжу з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$);*: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$)).

Фіг. 2 є графіком, на якому зображено змінення рівнів загального холестерину у крові, викликане введенням похідної оксинтомодуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликаною вживанням їжі з високим вмістом жиру (#: вказує на значне підвищення у порівнянні з групою, яка вживала звичайну їжу з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$);*: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$)).

Фіг. 3 є графіком, на якому зображено змінення рівнів ЛПНЩ-холестерину в крові, викликане введенням похідної оксинтомодуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликаною вживанням їжі з високим вмістом жиру (#: вказує на значне підвищення у порівнянні з групою, яка вживала звичайну їжу з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$);*: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$)).

Фіг. 4 є графіком, на якому зображено змінення рівнів ЛПВЩ-холестерину в крові, викликане введенням похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (*: вказує на значне підвищення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99 % ($p < 0,01$)).

5 Фіг. 5 є графіком, на якому зображено змінення рівнів ЛПВЩ/ЛПНЩ – холестерину в крові, викликане введенням похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (*: вказує на значне підвищення у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 95 % ($p < 0,05$)).

10 Фіг. 6 є графіком, на якому зображено змінення рівнів загального холестерину у крові, викликане шляхом введення препарату VICTOZA® або похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (**: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$)).

15 Фіг. 7 є графіком, на якому зображено змінення рівнів ЛПНЩ-холестерину в крові, викликане шляхом введення препарату VICTOZA® або похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (**: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$)).

20 Фіг. 8 є графіком, на якому зображено змінення рівнів ЛПВЩ-холестерину в крові, викликане шляхом введення препарату VICTOZA® або похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (*: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 95 % ($p < 0,05$)).

25 Фіг. 9 є графіком, на якому зображено змінення рівнів ЛПВЩ/ЛПНЩ - холестерину в крові, викликане шляхом введення препарату VICTOZA® або похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (**: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99 % ($p < 0,01$)).

30 Фіг. 10 є графіком, на якому зображено змінення рівнів тригліцеридів у крові, викликане шляхом введення препарату VICTOZA® або похідної оксинто модуліну тривалої дії хом'якам з гіперліпідемією, викликану вживанням їжі з високим вмістом жиру (**: вказує на значне зменшення цих рівнів у порівнянні з групою, яка вживала їжу з високим вмістом жиру з достовірністю у 99,9 % ($p < 0,001$)).

35 Далі заявлений винахід буде описано більш докладно з посиланням на приклади. Однак слід розуміти, що ці приклади наведені тільки з ілюстративною метою та не призначені для обмеження обсягу цього винаходу.

Приклад 1: Отримання клітинної лінії для активування *in vitro*.

Приклад 1-1: Отримання клітинної лінії, яка демонструє відповідь цАМФ на GLP-1.

40 У якості матриці для ПЛР була застосована частина, яка відповідала відкритій рамці зчитування (ORF) кДНК (OriGene Technologies, Inc. USA) гена людського рецептора GLP-1. ПЛР-реакцію з отриманням кінцевого продукту здійснювали з застосуванням зворотного та прямого праймерів, які містили, відповідно, сайти рестрикції *Hind*III та *Eco*RI.

Прямий праймер: 5'-CCCGGCCCGCGCGCGCTATTCGAAATAC-3' (SEQ ID №: 50)

Зворотній праймер: 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3' (SEQ ID №: 51)

45 Продукт ПЛР клонували у відомий вектор експресії для тваринних клітин *x0GC/dhfr* з отриманням таким чином рекомбінантного вектора *X0GC/GLP-1R*.

Рекомбінантний вектор *X0GC/GLP-1R* ввели у клітинну лінію CHO DG44, яку культивували у середовищі DMEM/F12 (10 % FBS) з ліпофектаміном (Invitrogene, USA), для отримання трансформанту. Отриманий трансформант інкубували у селективному середовищі, яке містило 1 мг/мл G418 та 10 нМ метотрексату з наступною селекцією моноклональних клітинних ліній, з яких потім була вибрана клітинна лінія, яка показала добру залежну від концентрації відповідь цАМФ на GLP-1,

Приклад 1-2: Отримання клітинної лінії, яка демонструє відповідь цАМФ на глюкагон.

55 У якості матриці для ПЛР була застосована частина, яка відповідала відкритій рамці зчитування (ORF) кДНК (OriGene Technologies, Inc. USA) гена людського рецептора глюкагону. ПЛР-реакцію з отриманням кінцевого продукту здійснювали з застосуванням зворотного та прямого праймерів, які містили, відповідно, сайти рестрикції *Eco*RI та *Xho*I.

Прямий праймер: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID №: 52)

Зворотній праймер: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (SEQ ID №: 53)

Продукт ПЛР клонували у відомий вектор експресії для тваринних клітин x0GC/dhfr з отриманням таким чином рекомбінантного вектора x0GC/GCGR.

- 5 Реконбінантний вектор x0GC/GCGR ввели у клітинну лінію CHO DG44, яку культивували у середовищі DMEM/F12 (10 % FBS) з ліпофектаміном (Invitrogene, USA), для отримання трансформанту. Отриманий трансформант інкубували у селективному середовищі, яке містило 1 мг/мл G418 та 10 нМ метотрексату з наступною селекцією моноклональних клітинних ліній, з яких потім була вибрана клітинна лінія, яка показала добру залежну від. концентрації відповідь цАМФ на глюкагон.

Приклад 2: Активність похідних оксинтомодуліну in vitro.

- 10 Приклад 2-1: Синтез похідних оксинтомодуліну.

Для вимірювання активності похідних оксинтомодуліну in vitro похідні оксинтомодуліну, які мали амінокислотні послідовності були розміщені у Таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Оксинтомодулін та похідні оксинтомодуліну.

SEQ ID №№	Послідовності
SEQ ID №: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNTGPSSGAPPPS
SEQ ID №: 4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS
SEQ ID №: 5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS
SEQ ID №: 6	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD
SEQ ID №: 7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID №: 8	CA-SQGTFTSDLSRQLEEEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID №: 9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID №: 11	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYLDK
SEQ ID №: 12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGHGEGTFTSDLSKQMEEEAVK
SEQ ID №: 13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID №: 14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIXWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 16	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGGHSQGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID №: 17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID №: 19	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 20	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID №: 21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTK
SEQ ID №: 23	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID №: 24	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID №: 25	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID №: 26	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID №: 27	HAibQGTFTSDYSKYLDEQAAKEFICWLMNT
SEQ ID №: 28	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID №: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID №: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID №: 33	HAibQGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID №: 34	YAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

- 15 У наведеній вище Таблиці 1, амінокислоти, позначені жирними літерами означають утворення кільця, а амінокислоти, позначені літерою X, означають альфа-метил-глутамінову кислоту, яка не є природною амінокислотою. CA означає 4-імідазоацетил, DA означає дезаміно-гістидил, Aib означає аміноізомасляну кислоту та (d)S означає d-серин.

Приклад 2-2: Вимірювання активності похідних оксинтомодуліну in vitro.

Для вимірювання дії пептидів, призначених для лікування ожиріння, було виміряно активність клітин *in vitro* з застосуванням трансформантів, отриманих у Прикладах 1-1 та 1-2.

Кожен з трансформантів трансформували таким чином, щоб досягти експресію генів рецептора GLP-1 людини та глюкагонового рецептора у клітинах CHO (клітини яєчника китайського хом'ячка) та щоб він був прийнятним для вимірювання активності GLP-1 та глюкагону. Отже, активність кожної похідної оксинтомодуліну вимірювали з застосуванням кожного з трансформантів.

Точніше кажучи, кожен з трансформантів пересівали двічі або тричі на тиждень та потім клітини нанесли у кожну лунку 96-лункового ПМКншету зі щільністю 1×10^5 клітин / лунку та наступним 24-годинним культивуванням.

Культивовані клітини промили буфером KRB, суспендували у 40 мл 1 mM буферу KRB, який містив ізобутилметилксантин та потім залишили при кімнатній температурі на 5 хв. Кожен оксинтомодулін та похідну оксинтомодуліну (SEQ ID №№: 2-6, 8, 10-13, 17, 18, 23-25, 27, 28 та 32-34) серійно розвели у 5 разів від 1000 nM до 0.02 nM та 40 мл кожного з розведень додали до клітин, які потім інкубували протягом години у термостаті з температурою 37 °C у атмосфері CO₂. Потім до клітин додали 20 мл лізуючого буферу та у кожному клітинному лізаті за допомогою набору cAMP assay kit (Molecular Device, USA) було виміряно концентрацію цАМФ. Після отримання результатів вимірювання за їх допомогою були обчислені значення EC₅₀, які були порівняні між собою (Таблиця 2).

Таблиця 2.

Порівняння активності *in vitro* рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора між похідними оксинтомодуліну.

SEQ ID №№	EC ₅₀ (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
SEQ ID №: 1	50-210	10-43
SEQ ID №: 2	51,8	12,8
SEQ ID №: 3	>1000	637,7
SEQ ID №: 4	5,5	>1000
SEQ ID №: 5	5,9	>1000
SEQ ID №: 6	500,1	>1000
SEQ ID №: 8	419,6	>1000
SEQ ID №: 10	>1000	>1000
SEQ ID №: 11	>1000	>1000
SEQ ID №: 12	>1000	>1000
SEQ ID №: 13	>1000	>1000
SEQ ID №: 17	97,9	>1000
SEQ ID №: 18	96,3	>1000
SEQ ID №: 23	2,46	5,8
SEQ ID №: 24	1,43	6,95
SEQ ID №: 25	1,9	1,3
SEQ ID №: 27	2,8-5,5	3,1-5,6
SEQ ID №: 28	3,1	0,3
SEQ ID №: 32	41,3	17,7
SEQ ID №: 33	2,2	80,2
SEQ ID №: 34	12,5	1,04

Як може бути видно у наведеній вище Таблиці 2, похідні оксинтомодуліну демонструють відмінні активні властивості *in vitro* GLP-1 та глюкагону порівняно до оксинтомодуліну (SEQ ID №:1).

Відомо, що оксинтомодулін лікує гіперліпідемію, стеатоз печінки або артеріосклероз, і ця лікувальна дія полягає у активуванні рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора. Похідні оксинтомодуліну за заявленим винаходом мають відмінне, порівняно до нативного оксинтомодуліну, активування рецептора GLP-1 та глюкагонового рецептора, отже вони можуть бути застосовані для лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки та пов'язаного з гіперліпідемією артеріосклерозу замість нативного оксинтомодуліну.

Приклад 3: Отримання кон'югату, який містить похідну оксинтомодуліну (SEQ ID №: 23) з Fc-ділянкою імуноглобуліну (імуноглобулін Fc-кон'югована похідна оксинтомодуліну 23).

Для ПЕГілування цистеїнового залишку у положенні 24 похідної оксинтомодуліну SEQ ID №: 23 з ПЕГ MAL-10K-ALD (NOF., Japan), була проведена реакція між похідною оксинтомодуліну (SEQ ID №: 23) та ПЕГ MAL-10K-ALD у молярному співвідношенні 1:3 з концентрацією білка у 3 мг/мл, яка тривала три години при кімнатній температурі. Реакція відбувалася у 50мМ буфері Tris (pH 8.0), який містив 1М гуанідин. Після завершення реакції реакційний розчин очистили на колонці SOURCE S (швидкість потоку: 2.0 мл/хв, градієнт: A 0 → 100 % 50 хв. B (A: 20 мМ Na-цитрат, pH 3.0+45 % етанол, B: A + 1М KCl)) з отриманням моноПЕГілованого у цистеїні оксинтомодуліну.

Далі було проведено реакцію між очищеною моноПЕГілованою похідною оксинтомодуліну (SEQ ID №: 23) та Fc-ділянкою імуноглобуліну у молярному співвідношенні 1:5 з концентрацією білка у 20 мг/мл яка тривала 16 годин при температурі 4 °C. Реакція відбувалася у 100 мМ калій-фосфатному буфері (pH 6.0), який містив 20 мМ SCB у якості відновника. Після завершення реакції реакційний розчин очистили на колонці SOURCE 15Q (швидкість потоку: 2.0 мл/хв, градієнт: A 0 → 4 % 1 хв. B → 20 % 80 хв. B (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1М NaCl)) та на колонці SOURCE I3O (швидкість потоку: 2,0 мл/хв, градієнт: B 0 → 100 % 100 хв. A, (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1.1М AS) з отриманням кон'югату, який містив похідну оксинтомодуліну (SEQ ID №: 23) та імуноглобуліну.

Приклад 4: Отримання кон'югату, який містить похідну оксинтомодуліну (SEQ ID №: 25) з Fc-ділянкою імуноглобуліну (Fc-імуноглобулін-кон'югована похідна оксинтомодуліну 25).

Для ПЕГілування цистеїнового залишку у положенні 30 похідної оксинтомодуліну SEQ ID №: 25 з ПЕГ MAL-10K-ALD була проведена реакція між похідною оксинтомодуліну (SEQ ID №: 25) та ПЕГ MAL-10K-ALD у молярному співвідношенні 1:3 з концентрацією білка у 3 мг/мл яка тривала три години при кімнатній температурі. Реакція відбувалася у 50мМ буфері Tris (pH 8,0), який містив 1М гуанідин. Після завершення реакції реакційний розчин очистили на колонці SOURCE S (швидкість потоку: 2.0 мл/хв, градієнт: A 0 → 100 % 50 хв. B (A: 20 мМ Na-цитрат, pH 3,0+45 % етанол, B: A + 1МKCl))

Далі було проведено реакцію між очищеною моноПЕГілованою похідною оксинтомодуліну (SEQ ID №: 25) та Fc-імуноглобуліном у молярному співвідношенні 1:5 з концентрацією білка у 20 мг/мл яка тривала 16 годин при температурі 4 °C. Реакція відбувалася у 100 мМ калій-фосфатному буфері (pH 6.0), який містив 20 мМ SCB у якості відновника. Після завершення реакції реакційний розчин очистили на колонці SOURCE 15Q (швидкість потоку: 2.0 мл/хв, градієнт: A 0 → 4 % 1 хв. B → 20 % 80 хв. B (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A+1М NaCl)) та на колонці SOURCE I3O (швидкість потоку: 2.0 мл/хв, градієнт: B 0 → 100 % 100 хв. A, (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A + 1.1М AS) з отриманням кон'югату, який містив похідну оксинтомодуліну (SEQ ID №: 25).

Приклад 5: Дія оксинтомодуліну тривалої дії на зменшення ліпідів у тваринній моделі гіперліпідемії з застосуванням хом'яків.

Приклад 5-1: Розподілення піддослідних тварин на групи.

Піддослідними тваринами були хом'яки чоловічої статі у віці 8 тижнів (золоті сирійські хом'яки, 120-130 г., придбані у компанії Vital River China). Відомо, що хом'яки, на відміну від інших гризунів, демонструють подібні до людини профілі ліпідів у крові та є чутливими до раціону з високим вмістом жирів.

Тваринам надали доступ до стерилізованого раціону з високим вмістом жирів (Purina 5001, який містив 11,5 % кукурудзяної олії, 11,5 % кокосового масла, 0,5 % холестерину та 0,25 % деоксихолату; Dyets, Bethlehem, PA) або до стандартного раціону для гризунів (з низьким вмістом жирів (low fat, 2018; Harlan Teklad, Madison, WI)). Група, яка вживала стандартний раціон отримала доступ до відфільтрованої та УФ-стерилізованої водопровідної води, а група, яка вживала раціон з підвищеним рівнем жиру отримала доступ до води, що містила 10 % фруктозу. Тварин тримали у вольєрі, який відповідав стандартам GLP з 12-годинним світловим / 12-годинним затемненим циклом (з освітленням від 6 до 18 год.) та всі експериментальні процедури були проведені згідно зі стандартними рекомендаціями щодо експериментів з тваринами. Введення ліків розпочали через 3 тижні після викликання гіперліпідемії та тварин розподілили на чотири групи (n=6) як показано у таблиці 3 нижче.

Таблиця 3

Групи	Застосовані ліки	Спосіб введення
нормальна група	носій (DPBS)	підшкірно, раз на тиждень
група з індукованою гіперліпідемією	носій (DPBS)	
	кон'югат SEQ ID №: 25-Fc; 3,25 мМ/кг	
	кон'югат SEQ ID №: 23-Fc; 8,96 мМ/кг	

Зокрема, групу 1 (нормальна група) годували нормальною їжею та раз на тиждень або частіше тваринам цієї групи вводили підшкірно по 5 мл/кг фосфатно-сольового буферу Дульбекко (DPBS, Sigma).

Групу 2 (група тварин з викликанною гіперліпідемією) спочатку для викликання гіперліпідемії годували їжею з високим вмістом жиру та потім раз на тиждень або частіше тваринам цієї групи вводили підшкірно по 5 мл/кг фосфатно - сольового буферу Дульбекко (DPBS, Sigma).

Групу 3 (група тварин з викликанною гіперліпідемією + група тварин, яким було введено по 3,25 нМ/кг кон'югату SEQ ID №:25-Fc) спочатку годували їжею з високим вмістом жиру для викликання гіперліпідемії та потім тваринам цієї групи раз на тиждень шляхом ін'єкції вводили отриманий у Прикладі 4 кон'югат SEQ ID №:25-Fc (3,25 нМ/кг) з дозою у 5 мл/кг.

Групу 4 (група тварин з викликанною гіперліпідемією + група тварин, яким було введено по 8,96 нМ/кг кон'югату SEQ ID №:23-Fc) спочатку годували їжею з високим вмістом жиру для викликання гіперліпідемії та потім тваринам цієї групи раз на тиждень шляхом ін'єкції вводили отриманий у Прикладі 3 кон'югат SEQ ID №:23-Fc (8,96 нМ/кг) з дозою у 5 мл/кг.

Кожній групі (n=6) вводили сольовий розчин або лікарський препарат протягом двох тижнів, після чого досліджували дію цих сполук на зменшення ліпідних рівнів.

Приклад 5-2: Аналіз дії кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії на зменшення ліпідних рівнів.

Наступний експеримент було здійснено з метою дослідження дії кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії на зменшення ліпідних рівнів у хом'яків.

У тварин, яким вводили або не вводили похідну оксинтомодуліну тривалої дії (як описано у Прикладі 5-1) були відібрані зразки крові та здійснено аналіз цих зразків за допомогою хімічного аналізатора HITACHI 7020. Результати аналізу наведені у Фіг. 1-5.

У Фіг. 1-5 показано змінення рівнів тригліцеридів у крові (Фіг.1), змінення рівнів загального холестерину у крові (Фіг. 2), змінення рівнів ЛПНЩ-холестерину у крові (Фіг.3), змінення рівнів ЛПВЩ-холестерину у крові (Фіг. 4) та змінення співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ-холестерину у крові (Фіг. 5). Отримані результати піддали статистичній обробці з обчисленням середніх значень та стандартних відхилень цих середніх значень. Для перевірки статистичної значущості між групами (n=6), отримані дані піддали статистичній обробці з застосуванням тесту Данета для однофакторного дисперсійного аналізу та значення $p < 0,05$ було визнано статистично значущим.

Зокрема при дослідженні результатів вимірювання рівнів тригліцеридів у крові було помітно, що у тварин, які вживали їжу з високим вмістом жиру рівні тригліцеридів були значно підвищені, але у випадку, коли тваринам вводили похідну оксинтомодуліну тривалої дії (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc), ці рівні значно зменшилися (Фіг. 1).

При дослідженні результатів вимірювання рівнів загального холестерину у крові було помітно, що у тварин, які вживали їжу з високим вмістом жиру рівні загального холестерину у крові були значно підвищені, але у випадку, коли тваринам вводили похідну оксинтомодуліну тривалої дії (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc), ці рівні значно зменшилися (Фіг. 2).

При дослідженні результатів вимірювання рівнів ЛПНЩ-холестерину у крові було помітно, що у тварин, які вживали їжу з високим вмістом жиру рівні загального холестерину у крові були значно підвищені, але у випадку, коли тваринам вводили похідну оксинтомодуліну тривалої дії (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc), ці рівні значно зменшилися (Фіг. 3).

При дослідженні результатів вимірювання рівнів ЛПВЩ-холестерину у крові було помітно значне зростання цих рівнів в крові тварин, яким вводили похідну оксинтомодуліну тривалої дії (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc) на відміну від групи тварин, які вживали їжу з високим вмістом жиру (Фіг.4).

При дослідженні результатів вимірювання рівнів ЛПВЩ/ЛПНЩ-холестерину було помітно значне зростання цих рівнів в крові тварин, яким вводили похідну оксинтомодуліну тривалої дії

(кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc) на відміну від групи тварин, які вживали їжу з високим вмістом жиру (Фіг.5).

З наведених вище результатів можна побачити, що кон'югат похідної оксинтомодуліну винаходу, який містить Fc-ділянку імуноглобуліну, ковалентно приєднану до похідної оксинтомодуліну за допомогою ПЕГ запобігає накопичуванню тригліцеридів та ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ-холестерину), отже його можна буде ефективно застосувати у лікуванні гіперліпідемії або пов'язаного з нею стеатозу печінки або артеріосклерозу.

Приклад 6: Аналіз дії відомого аналога GLP-1 тривалої дії та кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії.

10 Препарат VICTOZA® є глюкагоноподібним пептидом-1 тривалої дії, GLP-1 аналогом, який в даний час є в наявності на ринку в якості агента для лікування діабету та, як відомо, який є ефективним у лікуванні ожиріння та у підвищенні рівнів ЛПВЩ-холестерину.

У наступних дослідженнях було порівняно дію кон'югату похідної оксинтомодуліну та відомого препарату VICTOZA® на зменшення рівнів ліпідів. Як описано у Прикладі 5, хом'яків розділили на "нормальну" групу тварин та групу тварин, яка вживала їжу з високим вмістом жиру. Тваринам "нормальної" групи раз на тиждень або частіше вводили підшкірно по 5 мл/кг DPBS. Групу тварин, яка вживала їжу з високим вмістом жиру розділили на групу тварин, якім раз на тиждень або частіше вводили підшкірно по 5 мл/кг DPBS, на групу тварин, якім раз на тиждень або частіше вводили підшкірно по 35,5 нМ/кг препарату VICTOZA®, на групу тварин, якім раз на тиждень або частіше вводили підшкірно по 3,25 нМ/кг кон'югату SEQ ID №: 25-Fc та на групу тварин, якім раз на тиждень або частіше вводили підшкірно по 8,96 нМ/кг кон'югату SEQ ID №: 23-Fc з наступним аналізом рівнів ліпідів у крові тварин у досліджуваних групах.

В результаті можна було помітити, що введення кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії за винаходом (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc) веде до зменшення рівнів загального холестерину у крові (Фіг. 6) та до зменшення рівнів ЛПНЩ-холестерину у крові (Фіг. 7) порівняно до введення наявного у продажу препарату VICTOZA®.

На додачу до цього, можна було помітити, що введення кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії за винаходом (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc) веде до підвищення рівнів ЛПВЩ-холестерину у крові та співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ-холестерину порівняно до дії наявного у продажу препарату VICTOZA® (Фіг. 8 та 9). Зокрема значне підвищення рівнів ЛПВЩ-холестерину у крові та співвідношення ЛПВЩ/ЛПНЩ-холестерину порівняно до введення препарату VICTOZA® демонструє кон'югат SEQ ID №: 25-Fc, який має тривалу дію.

На додачу до цього, введення кон'югату похідної оксинтомодуліну тривалої дії за винаходом (кон'югат SEQ ID №: 25-Fc або кон'югат SEQ ID №: 23-Fc) демонструє зменшення рівнів тригліцеридів у крові у порівнянні з введенням препарату VICTOZA®.

З наведених вище результатів можна побачити, що кон'югат похідної оксинтомодуліну тривалої дії винаходу демонструє дію, яка полягає у зменшенні рівня ліпідів та дорівнює або перевищує подібну дію відомого препарату VICTOZA®, отже цей кон'югат можна буде ефективно застосувати у якості агента для лікування гіперліпідемії, стеатозу печінки або артеріосклерозу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ХАНМІ ФАРМ КО., ЛТД

<120> Композиція для лікування гіперліпідемії, яка містить похідну оксинтомодуліну

<130> OPA13100

<150> KR10-2012-0081475

<151> 2012-07-25

<160> 53

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1,

<211> 37

<212> білок

<213> оксинтомодулін

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

5 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

10

<210> 2

<211> 37

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

15

<220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

20

<400> 2

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

25

Arg Asn Asn Ile Ala

35

30

<210> 3

<211> 39

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

35

<400> 3

40

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

5 35

<210> 4

<211> 39

<212> білок

10 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

<222> (1)

15 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 4

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu

1 5 10 15

20

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

25 <210> 5

<211> 39

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

30 <221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 5

35

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

5 <210> 6
<211> 42
<212> білок
<213> похідна оксинтомодуліну

10 <220>
<221> варіант
<222> (1)
<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

15 <400> 6
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr

20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp

20 35 40

<210> 7
<211> 30
<212> білок
25 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>
<221> варіант
<222> (1)
30 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

35 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys

20 25 30

<210> 8
<211> 29
40 <212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

5 <222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 8

10 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Lys

20

25

15 <210> 9

<211> 37

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

20 <220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

25 <220>

<221> варіант

<222> (20)

<223> Хаа - альфа-метил-глутамінова кислота

30 <400> 9

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1

5

10

15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20

25

30

35

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 10

<211> 40

40 <212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

45 <222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

5 35 40

<210> 11

<211> 43

<212> білок

10 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

<222> (1)

15 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 11

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

20

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr

20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys

35 40

25

<210> 12

<211> 38

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

30

<220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

35

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Gly

1 5 10 15

Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met

20 25 30

Glu Glu Glu Ala Val Lys

35

5 <210> 13
<211> 30
<212> білок
<213> похідна оксинтомодуліну

10 <220>
<221> варіант
<222> (1)
<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

15 <220>
<221> варіант
<222> (16)
<223> Хаа - альфа-метил-глутамінова кислота

20 <220>
<221> варіант
<222> (20)

<223> Хаа - альфа-метил-глутамінова кислота
25 <400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Xaa

1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys

30 20 25 30

<210> 14
<211> 37
<212> білок
<213> похідна оксинтомодуліну

35 <220>
<221> варіант
<222> (1)
<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

40 <220>
<221> варіант
<222> (20)
<223> Хаа - альфа-метил-глутамінова кислота

45 <220>
<221> варіант
<222> (24)
<223> Хаа - альфа-метил-глутамінова кислота

<400> 14

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

5

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

10

<210> 15

<211> 37

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

15

<220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

20

<220>

<221> варіант

<222> (24)

<223> Хаа - альфа-метил-глутамінова кислота

25

<400> 15

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

<210> 16

<211> 34

35

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

40

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu

20 25 30

5

Glu Lys

<210> 17

<211> 37

10 <212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

15 <222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

20

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

25

<210> 18

<211> 40

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

30

<220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

35

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35 40

- 5 <210> 19
 <211> 37
 <212> білок
 <213> похідна оксинтомодуліну

- 10 <220>
 <221> варіант
 <222> (1)
 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

- 15 <400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn

20 25 30

20

Arg Asn Asn Ile Ala

35

- <210> 20
 <211> 40
 25 <212> білок
 <213> похідна оксинтомодуліну

- <220>
 <221> варіант
 30 <222> (1)
 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

- <400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

35

Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35

40

<210> 21

<211> 37

5 <212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант

10 <222> (1)

<223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<400> 21

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu

15

1

5

10

15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn

20

25

30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

20

<210> 22

<211> 30

<212> білок

<213> похідна оксинтомодуліну

25

<220>

<221> варіант

<222> (1)

<223> "H" означає дезаміногістидил, похідну гістидину.

30

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1

5

10

15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys

35

20

25

30

<210> 23

<211> 29

<212> білок

40 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>

<221> варіант
 <222> (2)
 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

5 <400> 23

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr

10 20 25

<210> 24
 <211> 30
 <212> білок
 15 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>
 <221> варіант
 <222> (2)
 20 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

<400> 24

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

25 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 25
 <211> 30
 30 <212> білок
 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>
 <221> варіант
 35 <222> (2)
 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

<400> 25

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

40 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 26
 45 <211> 30

<212> білок
 <213> похідна оксинтомодуліну

 <220>
 5 <221> варіант
 <222> (2)
 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

 <400> 26
 10 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

 1 5 10 15

 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

 20 25 30

 15 <210> 27
 <211> 29
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

 20 <220>
 <223> похідна оксинтомодуліну

 <220>
 <221> варіант
 25 <222> (2)
 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

 <400> 27

 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

 1 5 10 15
 30

 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr

 20 25

 <210> 28
 35 <211> 29
 <212> білок
 <213> похідна оксинтомодуліну

 <220>
 40 <221> варіант
 <222> (2)
 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

 <400> 28
 45

 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

 1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

5 <210> 29
<211> 37
<212> білок
<213> похідна оксинтомодуліну

10 <220>
<221> варіант
<222> (2)
<223> "S" означає d-серин, варіант серину.

15 <400> 29
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1

5

10

15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20

25

30

Arg Asn Asn Ile Ala

20 35

<210> 30
<211> 37
<212> білок
25 <213> похідна оксинтомодуліну

<220>
<221> варіант
<222> (1)
30 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1

5

10

15

35 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20

25

30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

40 <210> 31

<211> 37
 <212> білок
 <213> похідна оксинтомодуліну

5 <220>
 <221> варіант
 <222> (1)
 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину

10 <220>
 <221> варіант
 <222> (2)
 <223> "S" означає d-серин, варіант серину.

15 <400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn

20 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala

35

25 <210> 32
 <211> 30
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

30 <220>
 <223> похідна оксинтомодуліну

<220>
 <221> варіант
 <222> (1)
 35 <223> "H" означає 4-імідазоацетил, похідну гістидину.

<220>
 <221> варіант
 <222> (2)
 40 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

<400> 32

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

45 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 33

<211> 30
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

5 <220>
 <223> похідна оксинтомодуліну

<220>
 <221> варіант
 10 <222> (2)
 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

<400> 33

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu

15 1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 20 25 30

<210> 34
 <211> 30
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

25 <220>
 <223> похідна оксинтомодуліну

<220>
 <221> варіант
 <222> (2)
 30 <223> Хаа - аміноізомасляна кислота

<400> 34

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

1 5 10 15

35 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys

20 25 30

<210> 35
 <211> 8
 40 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> група R2

45 <400> 35

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

1 5

<210> 36

5 <211> 10
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
10 <223> група R2

<400> 36

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10

15 <210> 37
<211> 11
<212> білок
<213> штучна послідовність

20 <220>
<223> група R2

<400> 37

25 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
1 5 10

<210> 38
<211> 15
30 <212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> група R2

35 <400> 38

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp

1 5 10 15

40 <210> 39
<211> 16
<212> білок
<213> штучна послідовність

45 <220>
<223> група R2

<400> 39

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

1 5 10 15

<210> 40

<211> 20

5 <212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> група R2

10

<400> 40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Lys

15

20

<210> 41

<211> 28

<212> білок

20 <213> штучна послідовність

<220>

<223> група A або B

25

<400> 41

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg

1 5 10 15

Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

20

25

30

<210> 42

<211> 28

<212> білок

<213> штучна послідовність

35

<220>

<223> група A або B

<400> 42

40

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Glu

1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr

20

25

<210> 43

<211> 28

5 <212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> група А або В

10

<400> 43

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg

1

5

10

15

Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr

15

20

25

<210> 44

<211> 28

<212> білок

20 <213> штучна послідовність

<220>

<223> група А або В

25

<400> 44

Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu Glu

1

5

10

15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly

20

25

<210> 45

30 <211> 28

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

35 <223> група А або В

<400> 45

Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1

5

10

15

40

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly

20

25

<210> 46

<211> 26

5 <212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> група A або B

10

<400> 46

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1

5

10

15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala

15

20

25

<210> 47

<211> 28

<212> білок

20 <213> штучна послідовність

<220>

<223> група A або B

25

<400> 47

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1

5

10

15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly

20

25

30

<210> 48

<211> 24

<212> білок

<213> штучна послідовність

35

<220>

<223> група B

<400> 48

40

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu

1

5

10

15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp

20

<210> 49

<211> 14

5 <212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> група B

10

<400> 49

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp

1

5

10

15

<210> 50

<211> 30

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

20

<220>

<223> праймер

<400> 50

25

cccgcccccc gcggccgcta ttgaaaatac

30

<210> 51

<211> 33

<212> ДНК

30

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

35

<400> 51

gaacgggtccg gaggacgtcg actcttaaga tag

33

<210> 52

<211> 34

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

40

<220>

<223> праймер

45

<400> 52

cagcgacacc gaacgtcccc ccgtacttaa ggcc

34

50

<210> 53

<211> 32

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> праймер

5 <400> 53

ctaaccgact ctgggggaag actgagctcg cc

32

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

10

1. Композиція для профілактики або лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, яка містить кон'югат похідної оксинтомодуліну як активний інгредієнт, в якій кон'югат похідної оксинтомодуліну містить:

15 похідну оксинтомодуліну, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NOs: 28, 32, 33 та 34;

Fc-ділянку імуноглобуліну; та

непептидильний полімер, де непептидильний полімер ковалентно з'єднує похідну оксинтомодуліну та Fc-ділянку імуноглобуліну.

20 2. Композиція за п. 1, в якій похідна оксинтомодуліну є у формі кон'югата, приєднаного до сполуки, вибраної з групи, яка складається з фрагмента імуноглобуліну, антитіла, еластину, альбуміну та фібрoneктину.

3. Композиція за п. 1, в якій непептидильний полімер вибрано з групи, що складається з поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, кополімеру етиленгліколю/пропіленгліколю, поліоксietилованого поліолу, полівінілового спирту, полівінілового етилового етеру, ПМК (полімеру молочної кислоти), ПМГК (полімеру молочно-гліколевої кислоти), ліпідних полімерів, гіалуронової кислоти та їх комбінацій.

4. Композиція за п. 3, в якій непептидильний полімер є поліетиленгліколем.

5. Композиція за п. 3, в якій полісахаридом є декстран, хітин або їх комбінація.

30 6. Композиція за п. 1, в якій один кінець та другий кінець непептидильного полімеру є, відповідно, приєднаними до аміногрупи або до тілової групи Fc-ділянки імуноглобуліну та похідної оксинтомодуліну.

7. Композиція за п. 1, яка додатково містить фармацевтичний агент, який має профілактичні або терапевтичні ефекти, спрямовані проти гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу.

35 8. Композиція за п. 1, в якій жирова інфільтрація печінки є неалкогольною жирковою інфільтрацією печінки, алкогольною жирковою інфільтрацією печінки, жирковою інфільтрацією печінки, викликану вживанням незбалансованого харчування, голодом, ожирінням, цукровим діабетом або стеатогепатитом.

9. Композиція за п. 8, в якій неалкогольна жирова інфільтрація печінки є наслідком гіперліпідемії, цукрового діабету або ожиріння.

40 10. Композиція за п. 8, в якій неалкогольну жирову інфільтрацію печінки вибрано з групи, що складається з простого стеатозу, неалкогольного стеатогепатиту, фіброзу печінки та цирозу печінки.

11. Композиція за будь-яким одним з пп. 1-10, в якій амінокислоти у позиціях 16 та 20 похідного оксинтомодуліну утворюють кільце.

12. Спосіб профілактики або лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, який полягає у введенні пацієнту кон'югата похідної оксинтомодуліну, де кон'югат похідної оксинтомодуліну містить:

50 похідну оксинтомодуліну, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з послідовностей SEQ ID NOs: 28, 32, 33 та 34 ;

Fc-ділянку імуноглобуліну; та

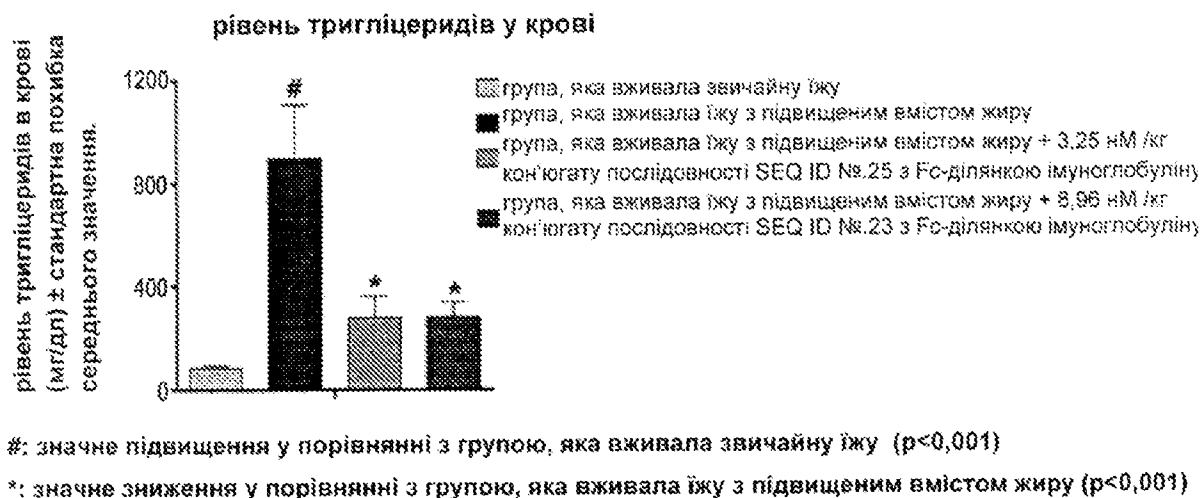
непептидильний полімер, де непептидильний полімер ковалентно з'єднує похідну оксинтомодуліну та Fc-ділянку імуноглобуліну.

55 13. Застосування кон'югата похідної оксинтомодуліну в отриманні лікарського препарату для профілактики або лікування гіперліпідемії, жирової інфільтрації печінки або артеріосклерозу, де кон'югат похідної оксинтомодуліну містить:

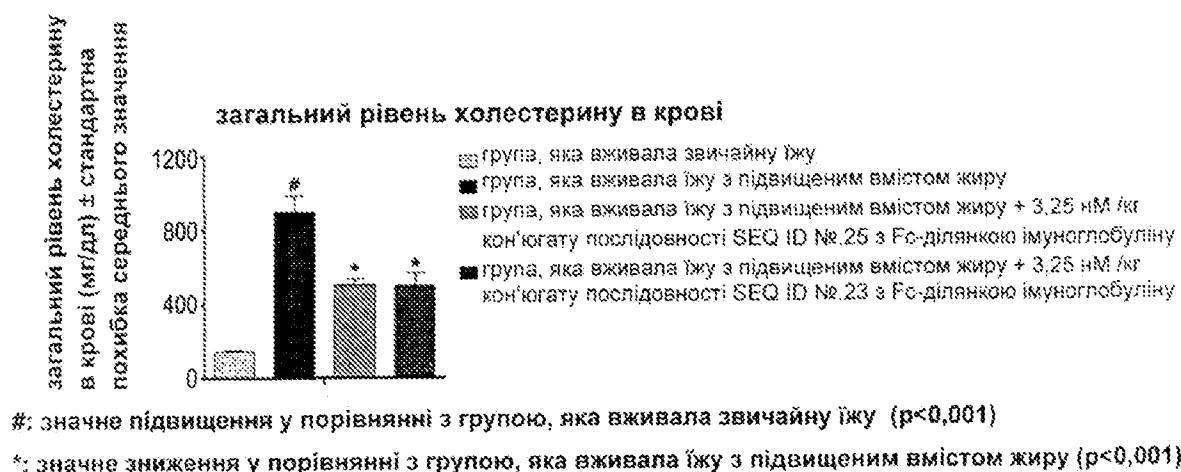
похідну оксинтомодуліну, яка має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з послідовностей SEQ ID NOs: 28, 32, 33 та 34;

Fc-ділянку імуноглобуліну; та

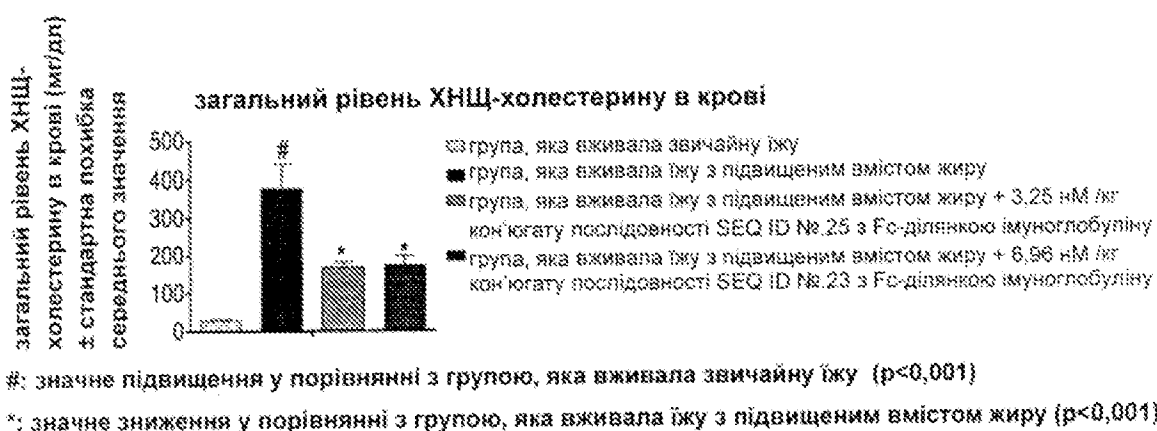
непептидильний полімер, де непептидильний полімер ковалентно з'єднує похідну оксинто модуліну та Fc-ділянку імуноглобуліну.



Фіг. 1

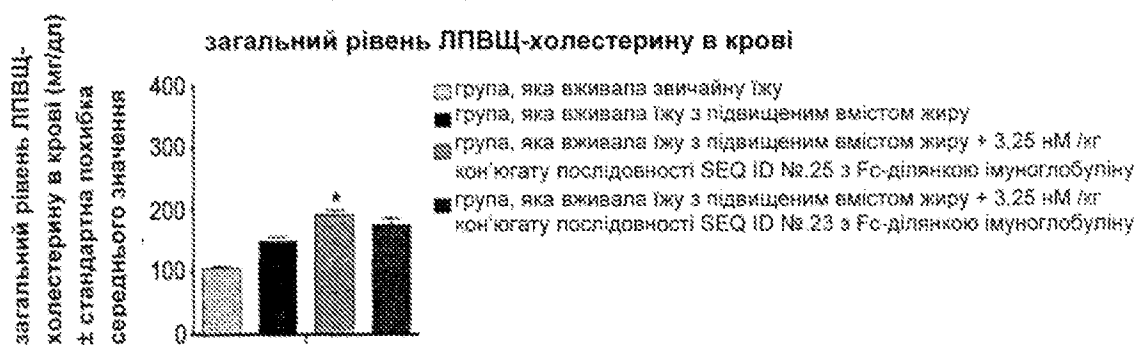


Фіг. 2



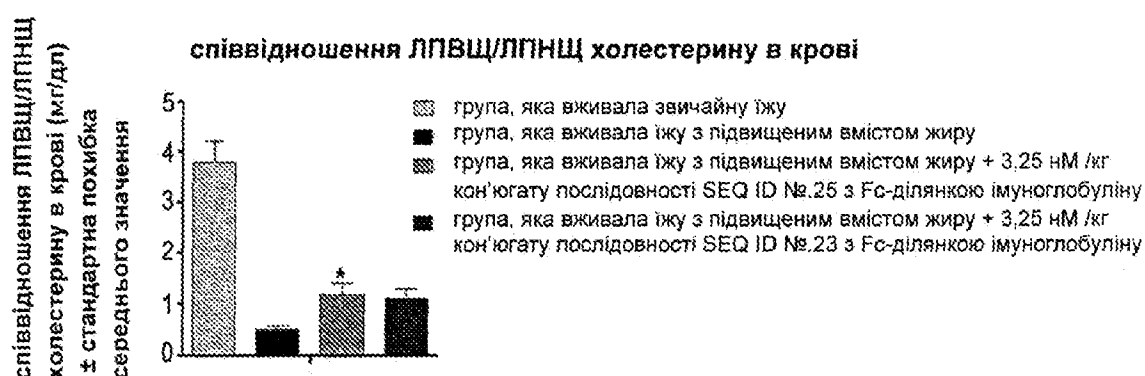
Фіг. 3

Композиція для лікування гіперліпідемії, яка містить похідну оксинтомодуліну.



*: значне підвищення у порівнянні з групою, яка вживала їжу з підвищеним вмістом жиру ($p < 0,01$)

Фіг. 4



*: значне підвищення у порівнянні з групою, яка вживала їжу з підвищеним вмістом жиру ($p < 0,01$)

Фіг. 5



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у порівнянні з хом'яками, які вживали їжу з підвищеним вмістом жиру

Фіг. 6

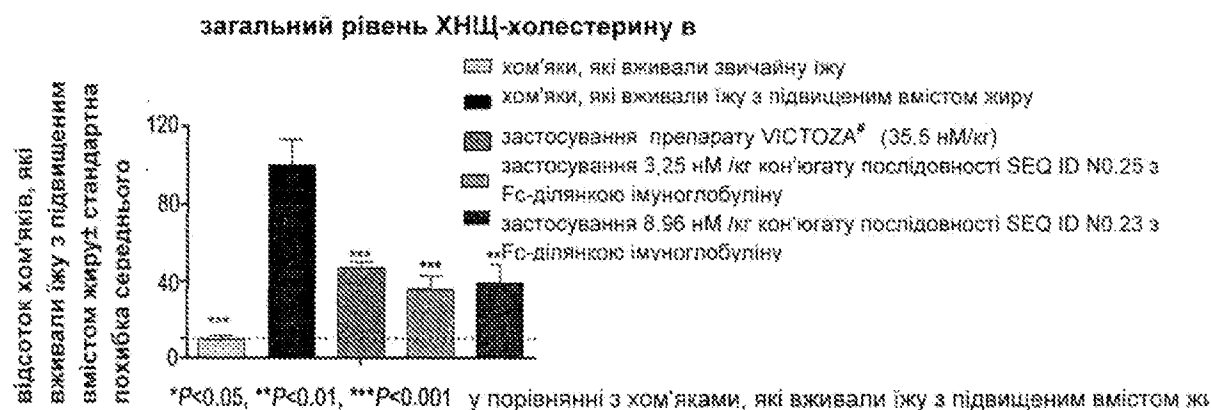


Fig. 7

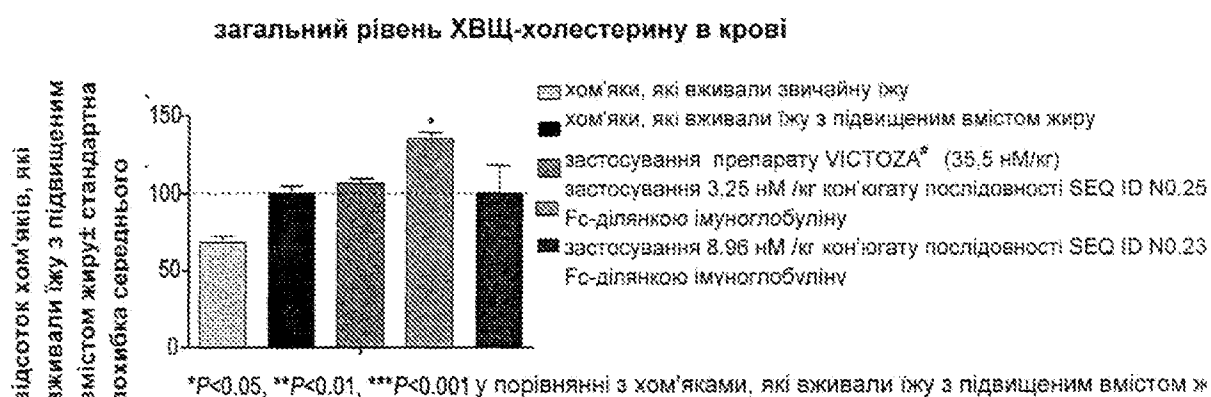


Fig. 8

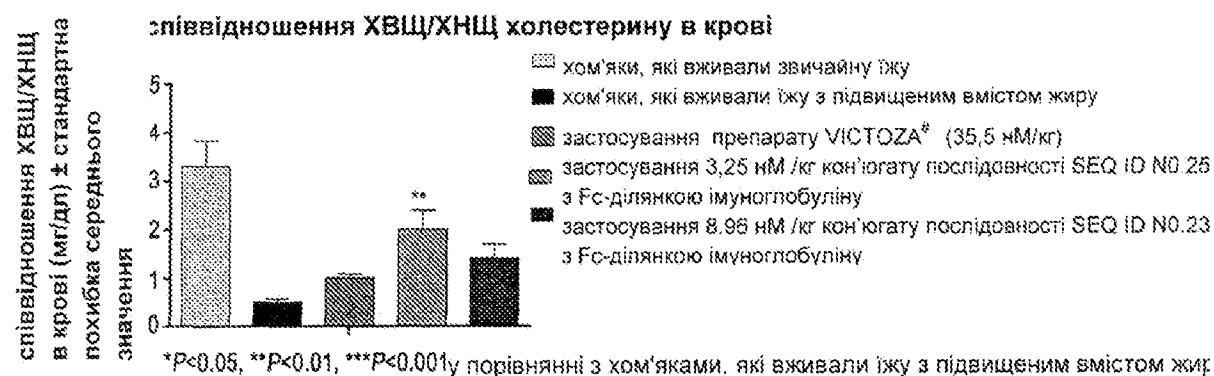
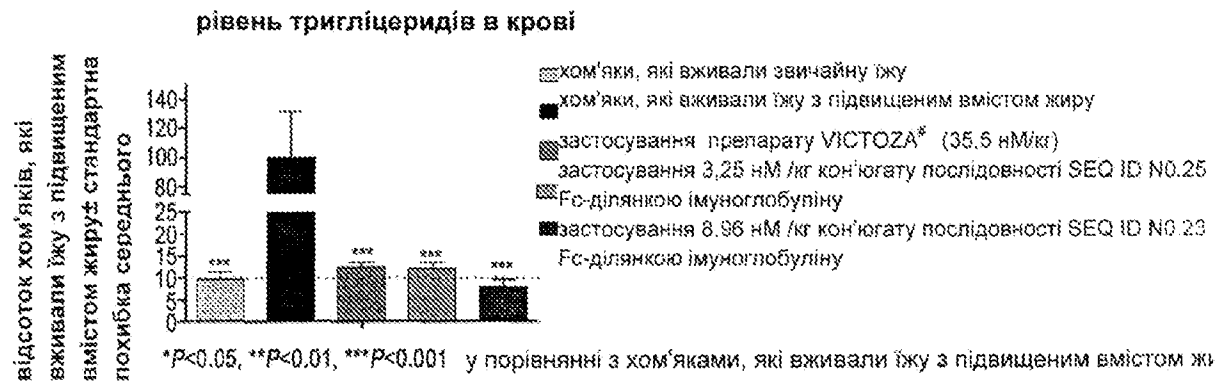


Fig. 9



Фіг. 10