



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 14/585 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/23 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006132294/04, 11.02.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.02.2005(30) Конвенционный приоритет:
11.02.2004 US 60/543,407

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2008

(45) Опубликовано: 10.01.2010 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 2004053370 A1, 18.03.2004. US 5604203
A1, 18.02.1997. RU 2207871 C2, 10.07.2003.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 11.09.2006(86) Заявка РСТ:
US 2005/004178 (11.02.2005)(87) Публикация РСТ:
WO 2005/077072 (25.08.2005)Адрес для переписки:
127006, Москва, ул.Долгоруковская, 7,
Садовая Плаза, 11 этаж, фирма "Бейкер и
Макензи", для Е.А.Ариевича

(72) Автор(ы):

ЛЕВИ Одайл Эстер (US),
ХЭНЛИ Майкл Р. (US),
ЙОДКА Каролия М. (US),
ЛЬЮИС Даяна Ю. (US),
СУАРЕС Кристофер Дж. (US),
ГОШ Сумитра С. (US),
Д'СУЗА Лоренс Дж. (US),
ПАРКЕС Дэвид Г. (US),
МЭК Кристин М. (US)

(73) Патентообладатель(и):

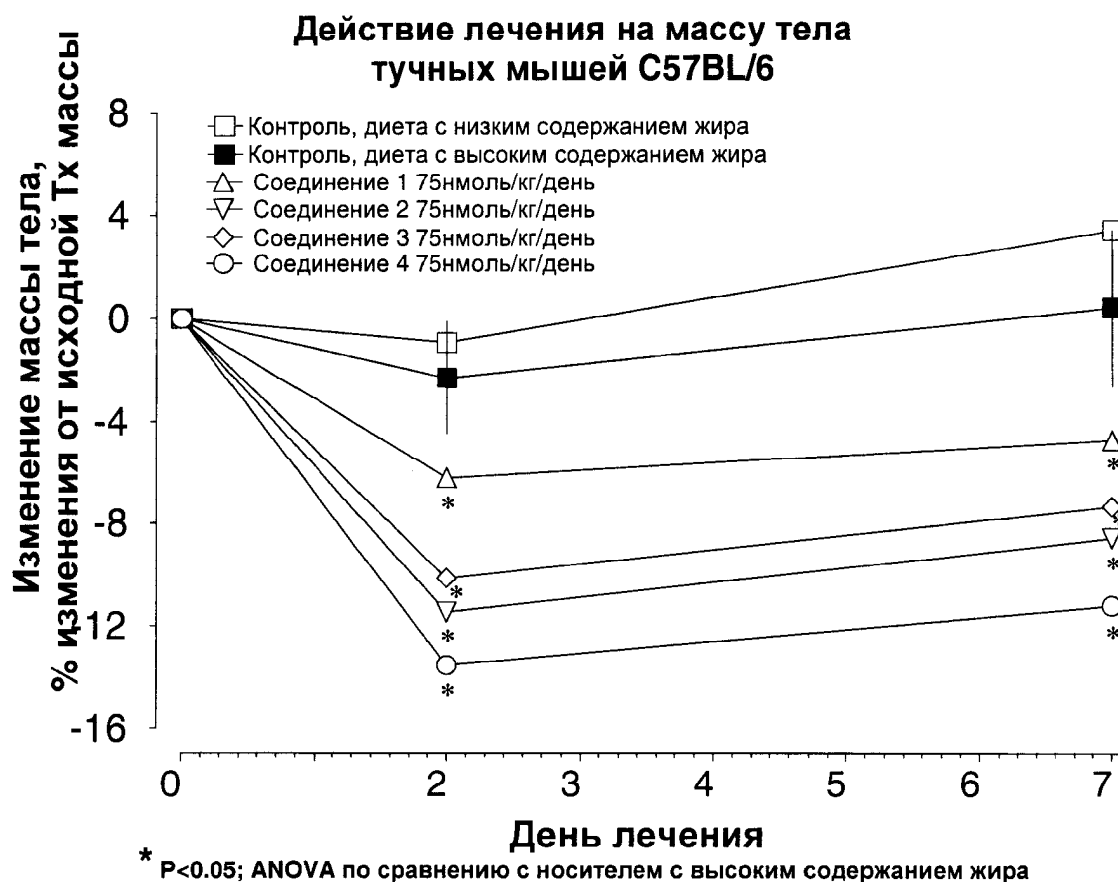
АМИЛИН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

(54) ГИБРИДНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ С СЕЛЕКТИРУЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к новым, селективируемым гибридным полипептидам, проявляющим по меньшей мере две гормональные активности, содержащим первый биологически активный модуль пептидного гормона ковалентно связанный по меньшей мере

с одним дополнительным биологически активным модулем пептидного гормона, которые могут быть использованы в качестве агентов для лечения и профилактики метаболических заболеваний и нарушений, связанных с избыточной массой тела. 18 з.п. ф-лы, 6 ил., 6 табл.



Фиг. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/585 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/23 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2006132294/04, 11.02.2005

(24) Effective date for property rights:
11.02.2005(30) Priority:
11.02.2004 US 60/543,407

(43) Application published: 20.03.2008

(45) Date of publication: 10.01.2010 Bull. 1

(85) Commencement of national phase: 11.09.2006

(86) PCT application:
US 2005/004178 (11.02.2005)(87) PCT publication:
WO 2005/077072 (25.08.2005)

Mail address:
127006, Moskva, ul.Dolgorukovskaja, 7, Sadovaja
Plaza, 11 ehtazh, firma "Bejker i Makenzi", dlja
E.A.Arievicha

(72) Inventor(s):

LEVI Odajl Ehster (US),
KhEhNLI Majkl R. (US),
JODKA Karolija M. (US),
L'JuIS Dajana Ju. (US),
SUARES Kristofer Dzh. (US),
GOSH Sumitra S. (US),
D'SUZA Lorens Dzh. (US),
PARKES Dehvid G. (US),
MEhK Kristin M. (US)

(73) Proprietor(s):

AMILIN FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US)

(54) HYBRID POLYPEPTIDES WITH SELECTABLE PROPERTIES

(57) Abstract:

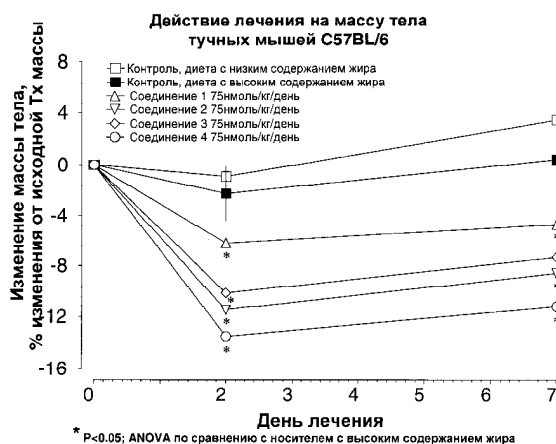
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention concerns new, selectable hybrid polypeptides expressing at least two hormonal activities containing a first biologically active module of a peptide hormone covalently bonded with at least one additional biologically active module of the peptide hormone.

EFFECT: polypeptides can be used as agents for treatment and prevention of metabolic diseases and disorders associated with overweight.

19 cl, 6 dwg, 6 tbl, 4 ex

Действие гибридов экзендин/РУУ у мышей DIO



Фиг. 1

Текст описания приведен в факсимильном виде.

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной
5 заявки США № 60/543407, поданной 11 февраля 2004, полный текст
которой включен здесь в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

10 Настоящее изобретение относится к пептидной химии, и, более
конкретно, к гибридным полипептидам с селективируемыми свойствами.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 В основе многих метаболических заболеваний и нарушений лежит
регуляция уровней инсулина и уровней глюкозы в крови. Секреция
инсулина регулируется частично гормонами, стимулирующими секрецию,
называемыми инкретинами, которые продуцируются энтероэндокринными
20 клетками. Инкретиновый гормон, глюкагон-подобный пептид-1 («GLP-1»)
представляет собой гормон, секретлируемый клетками кишечника,
который, как было показано в многочисленных исследованиях,
25 оказывает стимулирующее действие на секрецию инсулина. GLP-1
образуется из проглюкагона в пищеварительном канале и усиливает
высвобождение инсулина, индуцированное питательным веществом
(Krcsyman B., et al., *Lancet*, 2:1300-1303 (1987)). Известны
30 различные усеченные формы GLP-1, для стимуляции секреции инсулина
(инсулинотропное действие) и образования цАМФ [смотри, например,
Mojsov, S., *Int. J. Rep. Pro. Res.*, 40:333-343 (1992)]. Была
35 установлена взаимосвязь между различными лабораторными
экспериментами, проводимыми *in vitro*, и инсулинотропными реакциями
млекопитающих, особенно людей, на экзогенное введение GLP-1, GLP-
1(7-36) амида и GLP-1(7-37) кислоты (смотри, например, Nauck, M.
40 A., et al., *Diabetologia*, 36:741-744 (1993); Gutniak, M., et al.,
New Eng. J. of Med., 326(20):1316-1322 (1992); Nauck, M. A., et

al., *J. Clin. Invest.*, 91:301-307 (1993); и Thorens, B., *et al.*, *Diabetes*, 42:1219-1225 (1993)).

5 GLP-1(7-36) амид дает явно выраженный антидиабетогенный эффект у
больных инсулин-зависимым диабетом, путем стимуляции
чувствительности к инсулину и усиления индуцированного глюкозой
10 высвобождения инсулина в физиологических концентрациях (Gutniak M.,
et al., *New Eng. J. Med.*, 326:1316-1322 (1992)). При введении
пациентам, страдающим инсулин-независимым диабетом, GLP-1(7-36)
амид стимулирует высвобождение инсулина, снижает секрецию
15 глюкагона, препятствует опорожнению желудка и увеличивает расход
глюкозы (Nauck, 1993; Gutniak, 1992; Nauck, 1993). Однако,
применение молекул типа GLP-1 для длительного лечения диабета было
затруднено вследствие довольно короткого периода полужизни этих
20 пептидов в сыворотке крови.

Более конкретно, GLP-1 представляет собой полипептид из 30
аминокислот, образованный из проглюкагона, прогормона из 160
25 аминокислот. Действия различных прогормональных конвертаз в
поджелудочной железе и кишечнике в результате приводят к продукции
глюкагонов и других недостаточно определенных пептидов, тогда как
расщепление проглюкагона приводит в результате к продукции GLP-1 и
30 GLP-2, а также двух других пептидов. Аминокислотная
последовательность GLP-1 является на 100% гомологичной у всех до
сих пор изученных млекопитающих, заключающая в себе ключевую
физиологическую роль. GLP-1 (7-37) кислота усечена по С-концу и
35 амидирована с образованием GLP-1 (7-36) NH₂. Биологические эффекты
и метаболический цикл свободной кислоты GLP-1 (7-37) OH, и амида,
GLP-1 (7-36) NH₂, являются неотличимыми. По определению, нумерация
40 аминокислот основана на процессированном из проглюкагона GLP-1 (1-
37) OH. Биологически активный GLP-1 является результатом
дополнительного процессинга: GLP-1 (7-36) NH₂. Таким образом,

первой аминокислотой GLP-1 (7-37) OH или GLP-1 (7-36)NH₂ является ⁷His.

5 В желудочно-кишечном тракте, GLP-1 продуцируется L-клетками кишечника, слизистой толстой и прямой кишки, в ответ на стимуляцию глюкозой внутри просвета кишечника. Период полужизни в плазме крови активного GLP-1 составляет <5 минут, и его скорость метаболического
10 очищения составляет около 12-13 минут (Holst, 1994). Основной протеазой, вовлеченной в метаболизм GLP-1, является дипептидилпептидаза (DPP) IV (CD26), которая расщепляет N-концевой дипептид His-Ala, образуя, таким образом, метаболиты, GLP-1 (9-37)
15 OH или GLP-1 (9-36) NH₂ которые по-отдельности описаны как неактивные, слабые агонисты или антагонисты рецептора GLP-1. GLP-1 рецептор (GLP-1R) представляет собой G-белок сопряженный рецептор
20 из 463 аминокислот и расположен в бета клетках поджелудочной железы, в легких и менее распространен в головном мозге, жировой ткани и почках. Стимуляция GLP-1R под действием GLP-1 (7-37) OH или GLP-1 (7-36)NH₂ в результате приводит к активации аденилатциклазы,
25 синтезу цАМФ, деполяризации мембран, повышению внутриклеточного кальция и увеличению индуцированной глюкозой секреции инсулина (Holz et al., 1995).

30 GLP-1 является мощным стимулятором секреции инсулина, то есть секретируются из слизистой кишечника в ответ на прием пищи. Сильное инкретиновое действие GLP-1 подчеркивается тем фактом, что мыши с нуль-мутацией по гену рецептора GLP-1 интолерантны к глюкозе.
35 Инкретиновый эффект внутривенно введенного GLP-1 сохраняется у пациентов, страдающих диабетом, хотя инкретиновая реакция на перорально введенную глюкозу у таких пациентов нарушена.
40 Инфузионное введение GLP-1 или подкожные инъекции контролирует уровни глюкозы на тощак у пациентов, страдающих диабетом, и поддерживает пороговый уровень глюкозы для секреции инсулина (Gutniak et al., 1992; Nauck et al., 1986; Nauck et al., 1993).
45

50

Было показано, что GLP-1 является очень мощным терапевтическим агентом, способным увеличивать секрецию инсулина физиологическим путем, избегая гипогликемии, связанной с лекарственными средствами, содержащими сульфонилмочевину.

Другими важными эффектами GLP-1 в отношении гомеостаза глюкозы являются суппрессия секреции глюкагона и угнетение моторики желудка. Ингибирующие действия GLP-1 на секрецию глюкагона альфа клетками поджелудочной железы ведет к снижению продукции глюкозы в печени посредством уменьшения глюконеогенеза и гликогенолиза. Этот антиглюкагоновый эффект GLP-1 сохраняется у пациентов, страдающих диабетом.

Так называемый эффект ингибирования моторики проксимальных отделов кишечника подвздошной кишкой, оказываемый GLP-1, при котором угнетается двигательная функция желудка и желудочная секреция, осуществляется через эфферентные рецепторы блуждающего нерва, или непосредственным воздействием на гладкую мускулатуру кишечника. Снижение секреции желудочного сока под действием GLP-1 вносит вклад в латентную фазу при усвоении питательных веществ, таким образом, избавляя от необходимости в быстром ответе инсулина. В заключение, гастроинтестинальные эффекты GLP-1 вносят значительный вклад в задержку абсорбции глюкозы и жирных кислот и регуляцию секреции инсулина и гомеостаза глюкозы.

Также было показано, что GLP-1 вызывает индукцию специфических генов бета клеток, таких как, гены белка-транспортера GLUT-1, инсулина (через взаимодействие PDX-1 с промотором гена инсулина), и гексокиназы-1. Таким образом, GLP-1 теоретически мог бы приводить к обратному развитию интолерантности к глюкозе, обычно ассоциированной с возрастом, как показано в эксперименте на грызунах. Кроме того, GLP-1 может способствовать неогенезу бета клеток и увеличению массы бета клеток, помимо восстановления

функции бета клеток при состояниях недостаточности функции бета клеток.

5 Центральные эффекты GLP-1 включают в себя усиление чувства насыщения в сочетании с уменьшениями потребления пищи, осуществляемые через действие гипоталамических GLP-1R. 48 часовая непрерывная подкожная инфузия GLP-1 у пациентов, страдающих
10 диабетом II типа, уменьшала чувство голода и потребление пищи и усиливала чувство насыщения. Аноректические эффекты отсутствовали у мышей с нуль-мутацией гена рецептора GLP-1.

15 Экзендины представляют собой другое семейство пептидов, вовлеченных в секрецию инсулина. Экзендины обнаружены в слюне ядозуба, ящерицы, которая водится в Аризоне, и Мексиканского ядозуба. Экзендин-3 присутствует в слюне эскариона (*Heloderma horridum*), а экзендин-4
20 присутствует в слюне жилае (*Heloderma suspectum*) (Eng, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 265:20259-62, 1990; Eng., J., et al., *J. Biol. Chem.*, 267:7402-05 (1992)). Последовательности этих экзендинов имеют некоторое сходство с некоторыми членами семейства глюкагон-
25 подобных пептидов, с наибольшей гомологией, 53%, относящейся к GLP-1 (Goke, et al., *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55 (1993)).

Экзендин-4 связывается с GLP-1 рецепторами на инсулин-секретирующих
30 TC1 клетках, разбросанных ацинарных клетках поджелудочной железы морских свинок, и париетальных клетках желудка; этот пептид также стимулирует высвобождение соматостатина и ингибирует высвобождение гастрина в изолированных желудках (Goke, et al., *J. Biol. Chem.*,
35 268:19650-55 (1993); Schepp, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 69:183-91 (1994); Eissele, et al., *Life Sci.*, 55:629-34 (1994)). Было обнаружено, что экзендин-3 и экзендин-4 связываются с рецепторами
40 GLP-1 на ацинарных клетках поджелудочной железы для стимуляции в них продукции цАМФ и высвобождения из них амилазы (Malhotra, R., et al., *Regulatory Peptides*, 41:149-56 (1992); Raufman, et al., *J. Biol. Chem.*, 267:21432-37 (1992); Singh, et al., *Regul. Pept.*,
45

50

53:47-59 (1994)). Было предложено использовать инсулинотропные действия экзендина-3 и экзендина-4 для лечения сахарного диабета и профилактики гипергликемии (Eng, патент США № 5424286).

5 Сообщалось, что усеченные пептиды экзендинов, такие как экзендин [9-39], карбоксиамидированная молекула, и фрагменты с 3-39 по 9-39 являются мощными и селективными антагонистами GLP-1 (Goke, et al.,
10 J. Biol. Chem., 268:19650-55 (1993); Raufman, J. P., et al., J. Biol. Chem., 266:2897-902 (1991); Schepp, W., et al., Eur. J. Pharm., 269:183-91 (1994); Montrose-Rafizadeh, et al., Diabetes, 45(Suppl. 2):152A (1996)). Экзендин[9-39] блокирует эндогенный GLP-1 in vivo, приводя в результате к снижению секреции инсулина (Wang,
15 et al., J. Clin. Invest., 95:417-21 (1995); D'Alessio, et al., J. Clin. Invest., 97:133-38 (1996)). Рецептор, по-видимому, ответственный за инсулинотропное действие GLP-1 был клонирован из островковых клеток поджелудочной железы крыс (Thorens, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8641-8645 (1992)). Экзендины и экзендин[9-39] связываются с клонированным рецептором GLP-1 (GLP-1 рецептор
20 клеток поджелудочной железы крыс: Fehmann HC, et al., Peptides, 15 (3): 453-6 (1994); GLP-1 рецептор человека: Thorens B, et al., Diabetes, 42 (11): 1678-82 (1993)). В клетках, трансфектированных клонированным рецептором GLP-1, экзендин-4 является агонистом, т.е.
25 увеличивает цАМФ, тогда как экзендин[9-39] является антагонистом, т.е. блокирует стимулирующие действия экзендина-4 и GLP-1. Id.

30 Более конкретно, экзендин-4 представляет собой пептид, состоящий из 39 аминокислот, амидированный на С-конце, обнаруженный в слюне ядозуба (Heloderma horridum), с 53% гомологией аминокислотной последовательности с пептидной последовательностью GLP-1. Смотри,
35 например, Eng, J., et al. "Isolation and Characterization of Exendin-4, and Exendin-3 Analogue from Heloderma suspectum Venom," J. Bio. Chem., 267:11, p. 7402-7405 (1992), Young, A. A., et al., "Glucose-Lowering and Insulin-Sensitizing Actions of Exendin-4,"
40
45

Diabetes, Vol. 48, p. 1026-1034, May, 1999. В отношении активности, экзендин-4 является высоко специфическим агонистом в отношении рецептора GLP-1, и, подобно GLP-1, способен стимулировать секрецию инсулина. Следовательно, подобно GLP-1, экзендин-4 рассматривается как инсулинотропный пептид.

Однако, в отличие GLP-1, экзендин-4 имеет относительно длинный период полужизни в организме человека, вследствие его устойчивости к дипептидилпептидазе IV, которая быстро разрушает последовательность GLP-1 *in vivo*. Кроме того, было показано, что по сравнению с GLP-1, экзендин-4 обладает большей способностью стимулировать секрецию инсулина, и что меньшая концентрация экзендина-4 может быть использована для получения такой стимулирующей активности. Смотри, например, патент США № 5424286, включенный здесь в качестве ссылки. Следовательно, пептиды экзендина-4 или их производные (примеры таких производных смотри, например, в патенте США № 6528486, включенного здесь в качестве ссылки, и в соответствующей международной публикации WO 01/04156) имеют большую перспективу для использования при лечении состояний, включающих в себя нарушение регуляции уровней инсулина (например, таких состояний, как диабет), чем инсулин и GLP-1.

Другим семейством пептидных гормонов, вовлеченных в метаболические заболевания и нарушения, являются пептидные гормоны семейства амилинов, в том числе, амилин, кальцитонин, пептид, генетически родственный кальцитонину, аденомедуллин и интермедин (также известный как «AFP-6»). Амилин представляет собой пептидный гормон из 37 аминокислот. Он был выделен, очищен и химически охарактеризован как главный компонент амилоидных отложений в островках поджелудочной железы при диабете 2 типа у людей (Cooper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:8628-8632 (1987)). Молекула амилина подвергается двум пост-трансляционным модификациям: С-конец амидирован, а цистеины в положениях 2 и 7 поперечно связаны с

образованием N-концевой петли. Последовательность открытой рамки считывания гена амилина человека демонстрирует наличие Lys-Arg двухосновного аминокислотного сигнала к протеолитическому расщеплению, перед N-концевым кодоном для Lys, и Gly перед Lys-Arg протеолитическим сигналом в CLAIMS-концевом положении, типичная последовательность для амидирования под действием протеин-амидирующего фермента, PAM (Cooper et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1014:247-258 (1989)).

Сообщалось, что амилин регулирует опорожнение желудка и подавляет секрецию глюкагона и усвоение пищи, таким образом, регулируя скорость появления глюкозы в кровотоке. По-видимому, он дополняет действия инсулина, который регулирует скорость исчезновения глюкозы из кровотока и ее поглощения периферическими тканями. Эти действия подтверждаются экспериментальными данными у грызунов и людей, указывающими на то, что амилин дополняет эффекты инсулина в регуляции глюкозы после приема пищи, по меньшей мере, с помощью трех независимых механизмов, каждый из которых влияет на скорость появления глюкозы. Во-первых, амилин подавляет секрецию глюкагона после приема пищи. По сравнению со здоровыми взрослыми пациентами, у пациентов с диабетом 1 типа амилин не циркулирует, а у пациентов с диабетом 2 типа концентрации амилина после приема пищи снижены. Кроме того, инфузионное введение специфических моноклональных антител к амилину, которые связывают циркулирующий амилин, снова приводит к значительному повышению концентраций глюкагона по сравнению с контролем. Оба этих результата указывают на физиологическую роль эндогенного амилина в регуляции секреции глюкагона после приема пищи. Во-вторых, амилин замедляет моторику желудочно-кишечного тракта и опорожнение желудка. Наконец, было показано, что внутривентрикулярные инъекции амилина крыс снижают питание у крыс и изменяют метаболизм нейротрансмиттеров в гипоталамусе. В некоторых исследованиях, поглощение пищи

значительно снижалось вплоть до восьми часов после
внутригипоталамической инъекции амилина крыс и CGRP крыс. В
испытаниях на людях было показано, что аналог амилина, прамлинтид,
5 снижает массу тела или увеличение массы тела. Амилин может быть
эффективен при лечении метаболических состояний, таких как диабет
и ожирение. Амилин также может быть использован при лечении боли,
заболеваний костей, гастрита, для модуляции липидов, в частности
10 триглицеридов, или для воздействия на состав тканей тела,
например, предпочтительной потери жировой ткани и сохранения
нежировой ткани.

15 Гормон кальцитонин (СТ) был назван по его секреции в ответ на
индуцированную гиперкальциемию и его быстрому гипокальциемическому
эффекту. Он продуцируется и секретируется из нейроэндокринных
20 клеток щитовидной железы, которые в связи с этим были названы С
клетками. Хорошо изученным действием СТ(1-32) является его
воздействие на остеокласты. *In vitro* эффекты СТ включают в себя
быструю потерю поврежденных краев и сниженное высвобождение
25 лизосомальных ферментов. В конечном итоге, ингибирование функции
остеокластов под действием СТ в результате приводит к снижению
резорбции кости. Однако, ни постоянное снижение СТ в сыворотке в
случае тиреоидэктомии, ни повышенный уровень СТ в сыворотке,
30 обнаруженный при медуллярном раке щитовидной железы, по-видимому,
не связаны с изменениями содержания кальция в сыворотке крови или
костной массе. Таким образом, наиболее вероятно, что основной
35 функцией СТ(1-32) является борьба с острой гиперкальциемией в
экстремальных ситуациях и/или защита скелета в периоды
«кальциевого стресса», таких как рост, беременность и лактация.
(Обзор в Becker, JCEM, 89(4): 1512-1525 (2004) и Sexton, Current
40 Medicinal Chemistry 6: 1067-1093 (1999)). Согласно этому, в
недавних сведениях, полученных при изучении гена кальцитонина
мышей «knockout», который удаляет и кальцитонин, и CGRP-I пептиды,

сообщается, что у этих мышей были нормальные уровни значений, связанных с базальным кальцием, но повышенный кальциемический ответ (Kurihara H, et al, Hypertens Res. 2003 Feb; 26 Suppl:S 105-8).

СТ оказывает воздействие на уровни кальция в плазме и ингибирует функции остеокластов и широко используется при лечении остеопороза. Терапевтически, СТ лосося (sCT), по-видимому, увеличивает плотность кости и снижает частоту возникновения переломов с минимальными побочными эффектами. СТ также успешно использовался на протяжении 25 лет в качестве лекарственного средства при болезни костей Педжета, которая представляет собой хроническое заболевание скелета, результатом которого является увеличение и деформация костей в одном или нескольких участках скелета. Также широко используется анальгетический эффект СТ при болях в костях, испытываемых при остеопорозе, хотя механизм этого эффекта до конца не понят.

Пептид, генетически родственный кальцитонину (CGRP) представляет собой нейропептид, рецепторы которого распространены повсеместно в организме, в том числе в нервной системе и сердечно-сосудистой системе.

Этот пептид, по-видимому, модулирует чувствительную нейрональную передачу и является одним из наиболее сильных эндогенных вазодилатационных пептидов, открытых к настоящему времени. Описанные биологические эффекты CGRP включают в себя: модуляцию вещества Р при воспалении, модуляцию активности никотиновых рецепторов в нейромышечном синапсе, стимуляцию секреции ферментов поджелудочной железы, снижение секреции желудочного сока, периферическую вазодилатацию, учащение пульса, нейромодуляцию, регуляцию метаболизма кальция, остеогенную стимуляцию, секрецию инсулина, повышение температуры тела и снижение потребления пищи. (Wimalawansa, Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin and ADM: a peptide superfamily. Crit Rev Neurobiol. 1997; 11(2-3):

167-239). Важной ролью CGRP является регуляция притока крови к различным органам вследствие его сильного сосудорасширяющего действия, что доказывается снижением среднего артериального давления после внутривенного введения α CGRP. Сосудорасширяющие действия также подтверждаются недавним исследованием гомозиготных мышей, «knockout» по CGRP, в котором продемонстрирована повышенная резистентность периферических сосудов и высокое кровяное давление, вызванное повышенной активностью периферической симпатической нервной системы (Kurihara H, et al, Targeted disruption of ADM and α CGRP genes reveals their distinct biological roles. Hypertens Res. 2003 Feb; 26 Supplis 105-8). Таким образом, CGRP, по-видимому, вызывает сосудорасширяющие эффекты, гипотензивные эффекты и повышение частоты сердечных сокращений наряду с другими действиями.

Длительная инфузия CGRP пациентам с застойной сердечной недостаточностью показала длительный благоприятный эффект на гемодинамические функции без побочных эффектов, предполагая применение при сердечной недостаточности. Другие показания для применения CGRP включают в себя почечную недостаточность, острую и хроническую ишемию коронарных артерий, лечение сердечной аритмии, других заболеваний периферических сосудов, таких как феномен Рейно, субарахноидальная геморрагия, гипертензия и легочная гипертензия. Преэкламптическая токсемия беременных и преждевременные роды также теоретически поддаются лечению. (Wimalawansa, 1997). Последние терапевтические применения включают в себя применение антагонистов CGRP для лечения головных болей при мигрени.

Адреномедуллин (ADM) почти повсеместно экспрессируется гораздо большим числом тканей, содержащих пептид, чем не содержащих. В опубликованном обзоре по ADM, (Hinson, J.P. et al., *Endocrine Reviews* (2000) 21(2): 138-167) подробно описываются его действия на сердечно-сосудистую систему, клеточный рост, центральную нервную

систему и эндокринную систему, с рядом биологических функций, включающих расширение сосудов, клеточный рост, регуляцию секреции гормонов и выведение ионов натрия с мочой. Исследования, проведенные на крысах, кошках, овцах и людях, подтверждают, что внутривенное введение ADM приводит в результате к сильной и длительной гипотензии и сравнимой с таковой при введении CGRP. Однако, гипотензивный эффект ADM на среднее артериальное давление анестезированных крыс не ингибируется действием CGRP антагонистом CGRP₈₋₃₇, давая возможность предположить, что этот эффект не опосредуется рецепторами CGRP. Однократное или длительное введение ADM человека крысам, находящимся под наркозом, в сознании, или крысам с гипертензией, в результате приводит к значительному снижению общего периферического сопротивления, сопровождаемого падением кровяного давления, с сопутствующем увеличением частоты сердечных сокращений, сердечного выброса и ударного объема.

Также предполагалось, что ADM является важным фактором эмбриогенеза и дифференцировки, и фактором выживания при апоптозе для эндотелиальных клеток крыс. Это предположение поддерживается недавними исследованиями мышей, «knockout» по ADM, в которых у гомозиготных мышей, вследствие утраты гена, кодирующего ADM, было продемонстрировано нарушение образования сосудов во время эмбриогенеза, и, следовательно, гибель на средних сроках гестации. Сообщалось, что у гетерозиготных мышей ADM +/- было высокое кровяное давление наряду с предрасположенностью к повреждению тканей (Kurihara H, et al., *Hypertens Res.* 2003 Feb; 26 Suppl:S105-8).

ADM воздействует на такие эндокринные органы, как гипофиз, надпочечники, репродуктивные органы и поджелудочная железа. По-видимому, этот пептид принимает участие в ингибировании высвобождения адренокортикотропного гормона (АСТН) из гипофиза. В надпочечниках он, по-видимому, воздействует на секреторную

активность коры надпочечников как у крыс, так и у людей и увеличивает приток крови к надпочечникам, действуя как вазодилататор на сосудистую сеть надпочечников у интактных крыс.

5 Было показано, что ADM присутствует во всех отделах женского репродуктивного тракта и уровни в плазме повышаются при нормальной беременности. Исследования преэклампсии на модели у крыс
10 показывают, что ADM может устранять гипертензию и уменьшать смертельные исходы у плода при введении крысам в период поздней гестации. Поскольку адреномедуллин не имел подобных эффектов у животных на ранней стадии гестации или у небеременных крыс в модели
15 преэклампсии, это дает основания предположить, что ADM может играть важную регуляторную роль в маточно-плацентарной сердечно-сосудистой системе. В поджелудочной железе ADM скорее всего выполняет
20 ингибирующую функцию, поскольку адреномедуллин ослаблял и задерживал инсулиновую реакцию на пероральное введение глюкозы, приводя в результате к повышенным уровням глюкозы. ADM также может
25 воздействовать на функцию почек. Периферически введенный болюс может значительно снижать среднее артериальное давление и повышать почечный кровоток, скорость клубочковой фильтрации и мочевого потока. В некоторых случаях также имеет место повышение экскреции
30 Na⁺.

ADM также оказывает периферическое действие на кости и легкие. В отношении костей исследования подтвердили значение за пределами
35 помимо сердечно-сосудистой системы и гомеостаза жидкостей, и продемонстрировали, что ADM действует на остеобласты эмбрионов и взрослых особей грызунов, увеличивая рост клеток по сравнению с известными факторами роста остеобластов, таких как трансформирующий
40 фактор роста- β . Это имеет важное клиническое значение, поскольку одной из основных задач в исследовании остеопороза является разработка способа лечения, который увеличит костную массу за счет стимуляции остеобластов. В легких ADM не только вызывает расширение
45

сосудов легких, а также ингибирует бронхоспазм, индуцированный гистамином или ацетилхолином. Недавние исследования с использованием ADM в форме аэрозоля для лечения легочной гипертензии в модели на крысах указывают на то, что ингаляционное лечение этого состояния является эффективным, что доказано тем фактом, что среднее легочное артериальное давление и общая легочная резистентность были заметно ниже у крыс, получавших ADM, чем у крыс, которым вводили солевой раствор. Этот результат достигался без изменения системного артериального давления или частоты сердечных сокращений (Nagaya N et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2125-31).

Было показано, что у здоровых добровольцев внутривенное введение ADM снижает артериальное давление и стимулирует частоту сердечных сокращений, сердечный выброс, плазменные уровни цАМФ, пролактина, норэпинефрина и ренина. У этих пациентов наблюдалась небольшое, или почти не наблюдалось, увеличение объема мочи, или экскреции натрия. У пациентов, страдающих сердечной недостаточностью или хронической почечной недостаточностью внутривенное введение ADM оказывало эффекты, подобные тем, которые наблюдались у здоровых пациентов, а также индуцировало диурез и натрийурез, в зависимости от введенной дозы (Nicholls, mg et al. *Peptides*. 2001; 22:1745-1752) Также было показано, что экспериментальное лечение с использованием ADM является эффективным при артериальной и легочной гипертензии, септическом шоке и ишемическом/реперфузионном повреждении (Beltowski J., *Pol J Pharmacol*. 2004;56:5-27). Другие показания для лечения аденомедуллином включают в себя: заболевание периферических сосудов, субарахноидальную геморрагию, гипертензию, преэклампсический токсикоз беременных и преждевременные роды, и остеопороз.

Экспрессия AFP-6 (т.е. интермедина) предже всего происходит в гипофизе и желудочно-кишечном тракте. О специфическом рецепторе к

AFP-6 не сообщалось, однако анализы связывания показали, что AFP-6 связывается со всеми известными рецепторами семейства амилинов. Было показано, что AFP-6 увеличивает продукцию цАМФ в клетках SK-N-MS и L6, экспрессирующих эндогенные рецепторы к CGRP, и конкурирует с меченным CGRP за связывание с его рецепторами на этих клетках. В опубликованных исследованиях *in vivo*, введение AFP-6 приводило к снижению кровяного давления, как у нормальных крыс, так и у крыс со спонтанной гипертензией, наиболее вероятно, через взаимодействие с CRLR/RAMP рецепторами. *In vivo* введение мышам приводило к торможению опорожнения желудка и уменьшению потребления пищи. (Roh et al. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):7264-74.)

Сообщалось, что биологические действия пептидных гормонов семейства амилинов главным образом опосредованы через связывание с двумя близкородственными типами II G белок-сопряженных рецепторов (GPCRs), рецептором кальцитонина (CTR) и рецептором, подобным рецептору кальцитонина (CRLR). Клонирование и функциональные исследования показали, что CGRP, ADM и амилин взаимодействуют с различными комбинациями CTR или CRLR, и белком, модифицирующим рецепторную активность (RAMP). Многие клетки экспрессируют многочисленные RAMP. Считается, что совместная экспрессия RAMP-белков и либо CTR, либо CRLR необходима для воспроизведения функционально активных рецепторов для кальцитонина, CGRP, ADM и амилина. Семейство RAMP включает в себя три члена (RAMP1, -2 и -3), идентичность последовательностей которых составляет менее 30%, но они имеют общую топологическую организацию. Совместная экспрессия CRLR и RAMP1 ведет к образованию рецептора к CGRP. Совместная экспрессия CRLR и RAMP2 ведет к образованию рецептора к ADM. Совместная экспрессия CRLR и RAMP3 ведет к образованию рецептора к ADM и CGRP. Совместная экспрессия hCTR2 и RAMP1 ведет к образованию рецептора к амилину и CGRP. Совместная экспрессия hCTR2 и RAMP3 ведет к образованию рецептора к амилину.

Другим семейством пептидных гормонов, вовлеченных в метаболические заболевания и нарушения, является семейство лептинов. Зрелая форма циркулирующего лептина представляет собой белок из 146 аминокислот, который обычно отделен от ЦНС гемэнцефалическим барьером (BBB) и гематоцереброспинальным барьером. Смотри, например, Weigle et al., 1995. *J Clin Invest* 96 : 2065-2070. Лептин является афферентным сигналом в цикле отрицательной обратной связи в регуляции потребления пищи и массы тела. Рецептор лептина является членом семейства цитокиновых рецепторов. Вызывающий анорексию эффект лептина, зависит от связывания с гомодимером Ob-Rb изоформы этого рецептора, который кодирует длинный интрацитоплазматический домен, который включает в себя несколько мотивов взаимодействия белок-белок. Ob-Rb высоко экспрессируется в гипоталамусе, что дает возможность предположить, что эта область головного мозга является важным участком действия лептина. Было показано, что мутация *ob* гена у мышей в результате приводит к синдрому, имеющему патофизиологические проявления, включающий в себя: ожирение, повышенное отложение жира в организме, гипергликемию, гиперинсулинемию, гипотермию и нарушение функции щитовидной железы и репродуктивных функций, как у самцов, так и у самок гомозиготных мышей *ob/ob* с ожирением (смотри, например, Ingalis, et al., 1990. *J Hered* 41 : 317-318). Терапевтические применения лептина или рецепторов лептина включают в себя (i) диабет (смотри, например, патентные заявки PCT W0 98/55139, W0 98/12224 и W0 97/02004); (ii) гематопоз (смотри, например, патентные заявки PCT W0 97/27286 и W0 98/18486); (iii) бесплодие (смотри, например, патентные заявки PCT W0 97/15322 и W0 98/36763); и (iv) опухолевую суппрессию (смотри, например, патентные заявки PCT W0 98/48831), полный текст каждого документа включен здесь в качестве ссылки.

Был клонирован и картирован в *db* локусе ген рецептора лептина (OB-R) (GenBank регистрационный № AF098792) (смотри, например,

Tartaglia, et al., 1995. *Cell* 83: 1263-1271). Также были идентифицированы некоторые транскрипты OB-R, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга. Дефекты OB-R вызывают синдром у мутантных диабетических ob/ob мышей, которые фенотипически идентичны ob/ob мышам (смотри, например, Ghilardi, et al., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6231-6235). В отличие от ob/ob мышей, однако, введение рекомбинантного лептина ob/ob мышам C57BLKS/J-м в результате не приводит к уменьшению потребления пищи и уменьшению массы тела (смотри, например, Roberts и Greengerg, 1996. *Nutrition Rev.* 54: 41-49).

Большинство исследований связанных с лептином, могут сообщить об активности, направленной на снижение массы тела после введения рекомбинантного лептина, фрагментов лептина и/или варианта рецептора лептина, введенных непосредственно в желудочки мозга. Смотри, например, Weigle, et al., 1995. *J Clin Invest* 96 : 2065-2070; Varash, et al., 1996. *Endocrinology* 137: 3144-3147.

В других исследованиях была показана значительная активность в отношении снижения массы тела вследствие интраперитонеального (i.p.) введения пептидов лептина испытуемым лицам. Смотри, Grasso et al., 1997. *Endocrinology* 138: 1413-1418. Кроме того, сообщалось, что фрагменты лептина и, в особенности, фрагмент длиной 18 аминокислот, содержащий остатки, полученные из полной длины лептина человека, действуют при потере массы тела, но только при непосредственном введении через имплантированную канюлю в боковые желудочки головного мозга крыс. Смотри, например, патентную заявку РСТ W0 97/46585, которая включена здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Другим пептидным гормоном, вовлеченным в метаболические заболевания и нарушения, является холецистокинин (ССК). По имеющимся сведениям, ССК был идентифицирован в 1928 г из препаратов кишечинальных экстрактов по его способности стимулировать сокращение желчного

пузыря. Другие биологические действия ССК, о которых сообщалось с тех пор, включают в себя стимуляцию панкреатической секреции, задержку опорожнения желудка, стимуляцию моторики кишечника и стимуляцию секреции инсулина. Смотри Lieverse *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 713: 268-272 (1994). По имеющимся сведениям, действия ССК, также включают в себя воздействия на сердечно-сосудистую деятельность, дыхательную функцию, нейротоксичность и пароксизмы, пролиферацию злокачественных клеток, анальгезию, сон, сексуальное и репродуктивное поведение, память, тревогу и поведения, опосредованные дофамином. Crawley и Corwin, *Peptides* 15: 731-755 (1994). Другие известные эффекты ССК включают в себя стимуляцию панкреатического роста, стимуляцию сокращения желчного пузыря, ингибирование секреции желудочного сока, высвобождения панкреатического полипептида и сократительного компонента перистальтики. Другие известные эффекты ССК включают в себя расширение сосудов. Walsh, "Gastrointestinal Hormones," In *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3d ed. 1994; Raven Press, New York).

Сообщалось, что инъекции комбинаций глюкагона, ССК и бомбезина усиливали ингибирование потребления сгущенного молока пробного завтрака недепрививированными крысами по сравнению с действием отдельных компонентов. Hinton *et al.*, *Brain Res. Bull.* 17:615-619 (1986). Также сообщалось, что глюкагон и ССК синергично ингибируют ложное кормление у крыс. LeSauter и Geary, *Am. J. Physiol.* 253:R217-225 (1987); Smith и Gibbs, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 713:236-241 (1994). Также предполагалось, что эстрадиол и ССК могут оказывать синергетическое действие на чувство насыщения. Dulawa *et al.*, *Peptides* 15:913-918 (1994); Smith и Gibbs, *supra*. Также предполагалось, что сигналы, возникающие в тонкой кишке в ответ на находящиеся в ней питательные вещества, могут синергично взаимодействовать с ССК для снижения потребления пищи. Cox, *Behav.*

Brain Res. 38:35-44 (1990). Кроме того, сообщалось, что ССК вызывает чувство насыщения у некоторых видов. Например, сообщалось, что угнетение кормления было вызвано интраперитонеальным введением крысам ССК, внутриартериальным введением свиньям, внутривенным введением кошкам и свиньям, введением в желудочки мозга обезьянам, крысам, собакам и овцам, и внутривенным введением людям, страдающим и не страдающим ожирением. Смотри Lieverse et al., supra. Исследования нескольких лабораторий на основании имеющихся сведений подтвердили поведенческую специфичность низких доз ССК в отношении ингибирования приема пищи, сравнивая реакцию на пищу с реакцией на непищевые стимулы, как у обезьян, так и у крыс, и показывая, что ССК запускает последовательность поведенческих реакций обычно наблюдаемых после приема пищи (т.е., последовательность возникновения чувства насыщения после приема пищи). Кроме того, по имеющимся сведениям, сравнение поведенческих реакций после ССК с поведенческими реакциями после поглощения пищи, отдельно или в комбинации с ССК выявило поведенческое сходство между ССК и поглощением пищи. Crawley and Corwin, supra. Также сообщалось о том, что ССК в физиологических концентрациях в плазме ингибирует потребление пищи и усиливает чувство насыщения, как у сухошапых людей, так и у людей, страдающих ожирением. Смотри Lieverse et al., supra.

ССК был охарактеризован в 1966 г как пептид, состоящий из 33 аминокислот. Crawley и Corwin, supra. Были идентифицированы видоспецифичные молекулярные варианты аминокислотной последовательности ССК. Пептид 33-аминокислотной последовательности и усеченный пептид, его 8-аминокислотная С-концевая последовательность (ССК-8) по имеющимся данным был идентифицирован у свиней, крыс, цыплят, шиншиллы, собак и у людей. 39-аминокислотная последовательность по имеющимся данным была обнаружена у свиней, собак и морских свинок. 58-аминокислотная последовательность по

имеющимся данным была обнаружена у кошек, собак и у людей. По имеющимся данным у лягушек и черепах показаны 47-аминокислотные последовательности гомологичные как ССК, так и гастрину. Сообщалось, что в свежем образце тканей кишечника человека содержатся небольшие количества еще более крупной молекулы, названной ССК-83. По имеющимся данным у крыс была установлена основная промежуточная форма, и названа ССК-22. Walsh, "Gastrointestinal Hormones," In Physiology of the Gastrointestinal Tract (3d ed. 1994; Raven Press, New York). Сообщалось о несульфатированном ССК-8 и тетрапептиде (названные ССК-4 (ССК(30-33)) в головном мозге крыс. С-концевой пентапептид (названный ССК-4 (ССК(29-33)) сохраняет структурную гомологию с ССК, а также гомологию с нейропептидом, гастрином. Сообщается, что С-концевая сульфатированная октапептидная последовательность, ССК-8, имеет сравнительную межвидовую стабильность. Клонирование и анализ последовательности кДНК, кодирующей препрохолецистокинин из карциномы щитовидной железы крыс, головного мозга свиньи и кишечника свиньи, по имеющимся данным обнаружили 345 нуклеотидов, кодирующих предшественник ССК, который представляет собой 115 аминокислот и содержит все ранее выделенные последовательности ССК, о которых имеются сведения. Crawley и Corwin, *supra*.

Говорят, что ССК распространен повсеместно в центральной нервной системе и в эндокринных клетках и кишечных нервах выше тонкой кишки. Агонисты ССК включают в себя сам ССК (называемый также ССК-33), ССК-8 (ССК(26-33)), несульфатированный ССК-8, пентагастрин (ССК-5 или ССК(29-33)), и тетрапептид, ССК-4 (ССК(30-33)). С панкреатическим ССК рецептором, ССК-8, по имеющимся данным, конкурентно связывался с 1000-5000 большей эффективностью, чем несульфатированный ССК-8 или ССК-4, и сообщалось, что ССК-8 был приблизительно в 1000 раз эффективнее, чем несульфатированный ССК-8 или ССК-4 в стимуляции секреции амилина поджелудочной железой.

Crawley и Corwin, *supra*. Говорилось, что в гомогенатах коры головного мозга ССК рецепторное связывание замещалось несulfатированным ССК-8 и ССК-4 в концентрациях, которые были эквимоллярны, в 10 раз или в 100 раз больше, чем сульфатированный ССК-8. *Id.*

По имеющимся данным, рецепторы к ССК были обнаружены в различных тканях, и были описаны два основных подтипа: рецепторы А-типа и рецепторы В-типа. Рецепторы А-типа были описаны в периферических тканях, в том числе поджелудочной железе, желчном пузыре, пилорическом сфинктере и афферентных волокнах блуждающего нерва, и в отдельных участках головного мозга. Сообщалось, что подтип рецепторов А-типа (ССК_A) является селективным в отношении сульфатированного октапептида. Подтип рецепторов В-типа (ССК_B) был идентифицирован повсюду в головном мозге и желудочно-кишечном тракте, и по имеющимся сведениям не требует сульфатирования или всех восьми аминокислот. Смотри Reidelberger, J. *Nutr.* 124 (8 Suppl.) 1327S-1333S (1994); Crawley и Corwin, *supra*.

Еще одним семейством пептидных гормонов, вовлеченных в метаболические заболевания и нарушения, является семейство панкреатических полипептидов ("PPF"). Панкреатический полипептид ("PP") был открыт как примесь инсулиновых экстрактов и был назван скорее по органу происхождения, чем по функциональному значению (Kimmel *et al.*, *Endocrinology* 83: 1323-30 (1968)). PP представляет собой пептид из 36 аминокислот, содержащий характерные структурные мотивы. В последствии в кишечных экстрактах был открыт родственный пептид, и назван Пептид YY ("PYY") из-за N- и C-концевых тирозинов (Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2514-8 (1982)). Третий родственный пептид позже был обнаружен в экстрактах головного мозга и назван Нейропептид Y ("NPY") (Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5485-9 (1982); Tatemoto *et al.*, *Nature* 296: 659-60 (1982)).

Сообщалось, что эти три родственных пептида оказывают различные биологические эффекты. Эффекты РР включают в себя ингибирование панкреатической секреции и расслабление желчного пузыря. Центральное введенный РР вызывает умеренное увеличение потребления пищи, которое может быть опосредовано рецепторами, локализованными в гипоталамусе и стволе головного мозга (обзор Gehlert, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218: 7-22 (1998)).

Высвобождение РУУ происходит после приема пищи. Альтернативной молекулярной формой РУУ является РУУ(3-36) (Eberlein et al., *Peptides* 10: 797-803 (1989); Grandt et al., *Regul. Pept.* 51: 151-9 (1994)). Данный фрагмент составляет примерно от 40% суммарной РУУ-подобной иммунореактивности в кишечных экстрактах человека и собаки и примерно 36% суммарной иммунореактивности РУУ в плазме в состоянии голода до немногим более 50% после приема пищи. По-видимому, он является продуктом расщепления РУУ дипептидилпептидазой-IV (DPP4). По имеющимся сообщениям РУУ(3-36) представляет собой селективный лиганд рецепторов Y2 и Y5, которые, по-видимому, являются фармакологически уникальными в предпочтении усеченных на N-конце (т.е. C-концевых фрагментов) аналогов НРУ. По имеющимся сообщениям, при периферическом введении РУУ снижает секрецию желудочного сока, моторику желудка, экзокринную секрецию поджелудочной железы (Yoshinaga et al., *Am. J. Physiol.* 263: G695-701 (1992); Guan et al., *Endocrinology* 128: 911-6 (1991); Pappas et al., *Gastroenterology* 91: 1386-9 (1986)), сокращение желчного пузыря и моторику кишечника (Savage et al., *Gut* 28: 166-70 (1987)). Влияние центрального введения РУУ на опорожнение желудка, моторику желудка и секрецию желудочного сока, которое наблюдается после прямой инъекции в задний мозг/ствол головного мозга или вокруг этих областей (Chen и Rogers, *Am. J. Physiol.* 269: R787-92 (1995); Chen et al., *Regul. Pept.* 61: 95-98 (1996); Yang и Tache, *Am. J. Physiol.* 268: G943-8 (1995); Chen et al., *Neurogastroenterol.*

Motil. 9: 109-16 (1997)), может отличаться от влияний, наблюдаемых при периферическом введении. Например, при центральном введении РУУ оказывает некоторые воздействия, противоположные воздействиям, приведенным в данном описании для периферического введения РУУ(3-36), при котором происходило стимулирование, а не ингибирование секреции желудочного сока. Моторика желудка подавлялась только вместе со стимуляцией TRH, но не подавлялась при отдельном введении, и в действительности стимулировалась при более высоких дозах, предположительно благодаря взаимодействию с рецепторами РР. Показано, что РУУ стимулирует потребление пищи и воды после центрального введения (Morley et al., *Brain Res.* 341: 200-3 (1985); Corp et al., *Am. J. Physiol.* 259: R317-23 (1990)).

Метаболические заболевания и нарушения принимают различные формы, включающие в себя ожирение, диабет, дислипидемию, резистентность к инсулину, клеточный апоптоз и т.д. Ожирение и связанные с ним расстройства широко распространены и представляют собой очень серьезные проблемы для здравоохранения в Соединенных Штатах и во всем мире. Высокая степень ожирения тела является самым мощным известным фактором риска развития сахарного диабета 2 типа и является высоким фактором риска развития сердечно-сосудистого заболевания. Ожирение является общепризнанным фактором риска в случае гипертензии, атеросклероза, застойной сердечной недостаточности, инсульта, заболевания желчного пузыря, остеоартрита, апноэ во сне, репродуктивных нарушений, таких как синдром поликистозного яичника, рак груди, предстательной железы и ободочной кишки и повышенная частота возникновения осложнений при общей анестезии (смотри, например, Kopelman, *Nature* 404: 635-43 (2000)). Ожирение снижает продолжительность жизни и влечет за собой серьезный риск сочетания вышеприведенных заболеваний, а также таких заболеваний, как инфекции, варикозное расширение вен, акантокератодермия, экзема, непереносимость физической нагрузки,

резистентность к инсулину, гипертензия, гиперхолестеринемия, желчно-каменная болезнь, повреждение опорно-двигательного аппарата и тромбоэмболическое заболевание (Rissanen et al., Br. Med. J. 301: 835-7 (1990)). Ожирение также является фактором риска для группы состояний, называемых синдромом инсулиновой резистентности или "синдромом Х". Недавние оценки расходов на лечение ожирения и связанных с ним нарушений составляют 150 миллиардов долларов во всем мире. Предполагается, что патогенез ожирения является многофакторным, но основная проблема состоит в том, что у лиц, страдающих ожирением не достигается баланса между доступностью питательных веществ и затратами энергии до тех пор, пока существует избыток жировой ткани. Ожирение в настоящее время является плохо поддающимся лечению, хроническим, по существу трудноизлечимым метаболическим нарушением. Терапевтическое лекарственное средство, применимое для снижения массы тела людей с ожирением, могло бы оказать мощное целебное действие на их здоровье.

Диабет представляет собой нарушение метаболизма углеводов, характеризующееся гипергликемией и глюкозурией вследствие недостаточной продукции или использования инсулина. Диабет существенно влияет на качество жизни огромной части населения в развитых странах. Недостаточная продукция инсулина охарактеризована как диабет 1 типа, а недостаточное использование инсулина как диабет 2 типа. Однако, в настоящее время широко известно, что существует множество характерных заболеваний, связанных с диабетом, которых проявляются задолго до того, как пациентам поставят диагноз манифестного сахарного диабета. Также последствия недостаточного контроля метаболизма глюкозы при диабете дают начало широкому спектру сопутствующих липидных и сердечно-сосудистых нарушений.

Дислипидемия, или аномальные уровни липопротеинов в плазме крови, часто встречается среди больных диабетом. Дислипидемия обычно характеризуется повышенными уровнями триглицеридов в плазме,

низкими уровнями HDL (липопротеины высокой плотности) холестерина, нормальными-повышенными уровнями LDL (липопротеины низкой плотности) холестерина и повышенными уровнями частиц малой плотности, LDL (липопротеины низкой плотности) в крови. Дислипидемия является одной из основных составляющих повышенной частоты возникновения сердечных приступов и смерти среди больных диабетом. Это подтверждается эпидемиологическими исследованиями, показывающими увеличение в несколько раз случаев смерти от сердечного приступа у больных диабетом по сравнению с лицами, не страдающими диабетом. Среди больных диабетом были описаны различные аномалии, связанные с липопротеинами.

Резистентность к инсулину представляет собой пониженную способность инсулина оказывать свое биологическое действие в широком интервале концентраций. При инсулиновой резистентности организм секретирует аномально высокие количества инсулина для компенсации этого дефекта и развивается состояние сниженной толерантности к глюкозе. Недостаточная компенсация нарушенной функции инсулина, неизбежное увеличение концентрации глюкозы в плазме, в результате приводят к клиническому проявлению диабета. Было установлено, что инсулиновая резистентность и соответствующая гиперинсулинемия вносят свой вклад в развитие ожирения, гипертензии, атеросклероза и диабета 2 типа. Ассоциация инсулиновой резистентности с ожирением, гипертензией и стенокардией была описана как синдром, Синдром X, при котором инсулиновая резистентность является общим патогенетическим звеном.

Апоптоз представляет собой активный процесс клеточного саморазрушения, который регулируется внешними и внутренними сигналами, имеющими место при нормальном развитии. Документально доказано, что апоптоз играет ключевую роль в регуляции эндокринных бета клеток поджелудочной железы. Имеется все больше указаний на то, что у взрослых млекопитающих масса бета-клеток подвергается динамическим изменениям для адаптации продукции инсулина к

поддержанию эугликемии в определенных состояниях, таких как беременность и ожирение. Контроль за массой бета-клеток зависит от едва уловимого баланса между клеточной пролиферацией, ростом и
5 программированной клеточной гибелью (апоптозом). Нарушение этого равновесия может вести к нарушению гомеостаза глюкозы. Например, стоит отметить, что интолерантность к глюкозе развивается с
10 возрастом, когда снижены скорости репликации бета-клеток и патологоанатомические исследования людей неоднократно показывали 40-60% уменьшение массы бета-клеток у пациентов, страдающих инсулин-независимым сахарным диабетом по сравнению с лицами, не
15 страдающими диабетом. Общепринято, что резистентность к инсулину является неизменным сопутствующим симптомом ожирения, но что нормогликемия поддерживается за счет компенсаторной гиперинсулинемии до тех пор, пока бета-клетки способны справляться
20 с повышенными потребностями в инсулине, с этого момента начинается диабет 2 типа.

Попытки лечения множественных аномалий, связанных с диабетом,
25 делали необходимым назначение нескольких противодиабетических лекарственных средств, направленных на эти аномалии у различных пациентов. Примерами противодиабетических лекарственных средств
30 являются белки, такие как инсулин и аналоги инсулина, и малые молекулы, такие как сенсibilизаторы к инсулину, стимуляторы секреции инсулина и соединения, регулирующие аппетит.

Остается необходимость в разработке полипептидов для использования
35 при вышеописанных метаболических заболеваниях, состояниях и нарушениях. Соответственно, настоящее изобретение относится к гибридным полипептидам и способам их получения и применения.

40 Все цитируемые здесь документы включены в настоящую заявку в качестве ссылки, как будто изложенные здесь полностью.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение главным образом относится к новым селективируемым гибридным полипептидам, используемым в качестве средств для лечения и профилактики метаболических заболеваний и нарушений, которые могут быть частично устранены за счет контроля уровней глюкозы в плазме, уровней инсулина и/или секреции инсулина, таких как диабет и состояния, связанные с диабетом. Такие состояния и нарушения включают в себя, но не только, гипертензию, дислипидемию, сердечно-сосудистое заболевание, расстройства пищевого поведения, резистентность к инсулину, ожирение и сахарный диабет любого типа, в том числе 1 типа, 2 типа и диабет беременных. В одном аспекте данное изобретение относится к гибридным полипептидам, проявляющим по меньшей мере одну гормональную активность. Гибридные полипептиды по изобретению включают в себя по меньшей мере два модуля биологически активного пептидного гормона, ковалентно связанных друг с другом, где по меньшей мере один из модулей биологически активного пептидного гормона проявляет по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного гормона. Биологически активные модули пептидного гормона независимо выбраны из: сложных пептидных гормонов, фрагментов сложных пептидных гормонов, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность сложных пептидных гормонов, аналогов и производных сложных пептидных гормонов, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность сложных пептидных гормонов, и пептидных энхансеров.

Сложные пептидные гормоны данного изобретения включают в себя: амилин, адrenomедуллин (ADM), кальцитонин (СТ), пептид, кодируемый геном кальцитонина (CGRP), интермедин, холецистокинин ("ССК"), лептин, пептид YY (PYY), глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1), глюкагон-подобный пептид-2 (GLP-2), оксинтомодулин (ОХМ) и экзендин-4;

Пептидные энхансеры данного изобретения включают в себя: структурные мотивы сложных пептидных гормонов, которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз или другие фармакокинетические характеристики гибриднему полипептиду, и структурные мотивы аналогов или производных сложных пептидных гормонов, которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз или другие фармакокинетические характеристики гибриднему полипептиду.

В другом аспекте данное изобретение относится к способам лечения или профилактики ожирения, где данный способ включает в себя введение терапевтически или профилактически эффективного количества гибридного полипептида по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом. В предпочтительном варианте осуществления, пациент страдает ожирением или имеет избыточную массу тела. Хотя «ожирение» главным образом определяется как индекс массы тела свыше 30, в настоящем описании любой пациент, в том числе пациент с индексом массы тела менее 30, который нуждается в снижении массы тела или желает снизить массу тела, включен в объем понятия «страдающий ожирением». Этот способ может быть полезен пациентам, имеющим резистентность к инсулину, интолерантность к глюкозе или любую форму сахарного диабета (например, 1, 2 типа или диабет беременных).

Еще в одном аспекте данное изобретение относится к способам уменьшения потребления пищи, снижения доступности питательных веществ, приводящим к потере массы тела, к способам лечения сахарного диабета или состояний, ассоциированных с диабетом, и способам улучшения липидного профиля (в том числе снижения уровней LDL холестерина и триглицеридов и/или изменения уровней HDL холестерина), где данные способы включают в себя введение пациенту

эффективного количества гибридного полипептида по данному изобретению. В предпочтительном варианте осуществления, способы по данному изобретению применяют для лечения или профилактики состояний или нарушений, которые могут быть частично устранены уменьшением доступности питательных веществ для пациента, нуждающегося в этом, указанные способы включают в себя введение пациенту терапевтически или профилактически эффективного количества гибридного полипептида по данному изобретению. В другом варианте осуществления способы по изобретению применяют для лечения или профилактики состояний или нарушений, которые можно облегчить путем контроля за уровнями глюкозы в плазме, уровнями инсулина и/или секреции инсулина. Еще в одном варианте осуществления, способы по данному изобретению применяют для лечения диабета и/или состояний, связанных с диабетом. Такие состояния и нарушения включают в себя, но не только, гипертензию, дислипидемию, сердечно-сосудистое заболевание, нарушения пищевого поведения, резистентность к инсулину, ожирение и сахарный диабет любого типа, в том числе I типа, II типа и диабет беременных, осложнения диабета (нейропатию (например, исходя из нейротрофических действий экзендина-4), нейропатическую боль (например, исходя из действия амилина), ретинопатию, состояния недостаточности массы бета-клеток поджелудочной железы (например, исходя из регенерирующих действий экзендина-4 и GLP-1 на островки).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически или профилактически эффективное количество по меньшей мере одного гибридного полипептида по данному изобретению, или их фармацевтически приемлемых солей вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, растворителями, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями, используемыми для доставки гибридных полипептидов.

Эти и другие аспекты данного изобретения будут понятнее на основании следующих предпочтительных вариантов осуществления и подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 представлено действие показательных соединений данного изобретения в исследовании на мышах DIO.

На Фигуре 2 представлено действие показательных соединений данного изобретения в исследовании на мышах DIO.

На Фигурах 3А-3В представлено действие показательных соединений данного изобретения в исследовании на мышах DIO.

На Фигурах 4А-4В представлено действие показательных соединений данного изобретения в исследовании потребления пищи по сравнению с исходными соединениями.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится главным образом к новым селектируемым гибридным полипептидам, используемым в качестве средств для лечения и профилактики метаболических заболеваний и нарушений, которые могут быть частично устранены с помощью контроля за уровнями глюкозы в плазме крови, уровнями инсулина и/или секрецией инсулина, таких как диабет и состояния, связанные с диабетом. Такие состояния и нарушения включают в себя, но не только, гипертензию, дислипидемию, сердечно-сосудистое заболевание, нарушения пищевого поведения, резистентность к инсулину, ожирение и сахарный диабет любого типа, в том числе 1 типа, 2 типа и диабет беременных.

В одном аспекте данное изобретение включает в себя модульную конструкцию физиологически, метаболически и/или фармакокинетически активных пептидных модулей, которые можно выбирать исходя из «биологических активностей», например, терапевтической

эффективности, объема выполняемых функций, продолжительности действия, физиологических свойств и/или других фармакокинетических свойств.

5 Не ограничиваясь теорией, настоящее изобретение относится, по меньшей мере частично, к методике "набор инструментальных средств", где биоактивные модули пептидных гормонов связаны в двоичные, 10 третичные комбинации или комбинации более высокого порядка для создания новых эффективных терапевтических средств с селективируемыми свойствами. «Биоактивные модули пептидных гормонов» могут представлять собой пептидные гормоны, пептидные фрагменты, 15 обладающие гормональной активностью, или структурные мотивы пептидных гормонов, которые придают химическую, метаболическую и/или другую фармакокинетическую стабильность. Пептидные гормоны 20 могут включать в себя природные пептидные гормоны, а также аналоги и производные пептидных гормонов, известные в области техники и описанные здесь.

25 В одном аспекте данного изобретения было обнаружено, что объединение определенных физикохимических характеристик двух и более пептидных гормонов в единое средство может облегчить воздействие на несколько точек в неправильно функционирующем 30 метаболическом цикле. Таким образом, в одном аспекте данное изобретение относится к рационально составленным гибридным полипептидам, которые объединяют избираемые биологические активности в единый полипептидный агент. В одном варианте 35 осуществления селективируемые гибридные полипептиды данного изобретения могут включать в себя применение химически стабильных линкеров для ковалентного присоединения биологически активных 40 модулей. В другом варианте осуществления селективируемые гибридные полипептиды данного изобретения могут включать в себя применение расщепляемых линкеров, которые могут быть самостоятельными или образовывать часть биологически активного модуля. 45

Еще раз, не ограничиваясь теорией, создание гибридных полипептидов по настоящему изобретению главным образом может включать в себя: (1) идентификацию, селекцию и соединение биологически активных модулей пептидных гормонов желаемой эффективности и терапевтического использования, и (2) ковалентное связывание биологически активных модулей (например, природных пептидных гормонов, аналогов или производных пептидных гормонов, обладающих гормональной активностью, фрагментов пептидных гормонов, обладающих гормональной активностью, стабилизирующих мотивов и т.д.) либо непосредственно, либо через линкер без потери биологической активности составных модулей. В некоторых вариантах осуществления, критерии отбора модулей могут включать в себя, но не только: (а) желаемую эффективность *in vivo* для заданного терапевтического или профилактического показания; (b) необязательный синергизм или двойное действие связанных модулей для различных терапевтических или профилактических показаний; и/или (с) желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики.

Заголовки разделов использованы здесь только для организации структуры описания, а не для ограничения каким-либо образом описанного объекта изобретения.

Гибридные полипептиды данного изобретения

Как упоминалось выше, настоящее изобретение частично относится к гибридным полипептидам, содержащим, по меньшей мере два биологически активных модуля пептидных гормонов, выбираемых из описанных здесь сложных пептидных гормонов. Гибридные полипептиды по настоящему изобретению главным образом будут использоваться в лечении и профилактике метаболических состояний и нарушений. Гибридные полипептиды по данному изобретению будут проявлять по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного

гормона, и, предпочтительно, могут обладать по меньшей мере одной дополнительной биологической активностью второго сложного пептидного гормона.

5

В одном варианте осуществления, гибридные полипептиды данного изобретения могут содержать по меньшей мере два биологически активных модуля пептидных гормонов, где каждый из указанных по меньшей мере двух биологически активных пептидных модулей проявляет по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного гормона. В другом варианте осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению могут содержать по меньшей мере два биологически активных пептидных модуля, где по меньшей мере один из указанных биологически активных модулей пептидных гормонов обладает по меньшей мере одной гормональной активностью сложного пептидного гормона и по меньшей мере один из указанных биологически активных модулей пептидных гормонов придает желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики гибридному полипептиду.

15

20

25

30

35

40

45

В предпочтительном варианте осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению могут обладать сравнимой или более высокой эффективностью при лечении и/или профилактике метаболических состояний и нарушений, по сравнению со сложными пептидными гормонами. В другом варианте осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению могут обладать сравнимой или более высокой эффективностью при лечении и/или профилактике диабета и/или состояний, связанных с диабетом, по сравнению со сложными пептидными гормонами. Альтернативно, предпочтительные гибридные полипептиды по данному изобретению могут иметь улучшенную технологичность, стабильность и/или простую технологию получения, по сравнению со сложными пептидными гормонами.

50

Более конкретно, гибридные полипептиды по настоящему изобретению в основном будут содержать первый биологически активный модуль пептидного гормона ковалентно связанный по меньшей мере с одним
5 дополнительным биологически активным модулем пептидного гормона. Биологически активные модули пептидных гормонов могут быть ковалентно связаны вместе любым способом, известным в области
10 техники, в том числе, но не только, непосредственными амидными связями или химическими линкерными группами, описанными ниже более подробно. В одном варианте осуществления химические линкерные группы могут включать в себя пептидные миметики, которые индуцируют
15 или стабилизируют структуру полипептида.

Первый биологически активный модуль пептидного гормона может быть выбран из первого сложного пептидного гормона и может представлять
20 собой пептидный гормон (включая природные пептидные гормоны, а также их аналоги и производные), пептидный фрагмент, обладающий гормональной активностью (включая фрагменты природных пептидных гормонов, а также их аналоги и производные), или структурный мотив
25 пептидного гормона (включая природные пептидные гормоны, а также их аналоги и производные), которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую
30 стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики гибриднему полипептиду. Подобным образом, дополнительный биологически активный пептидный модуль (модули) может быть выбран из сложных пептидных
35 гормонов, и может представлять собой пептидный гормон (включая природные пептидные гормоны, а также их аналоги и производные), пептидный фрагмент, обладающий гормональной активностью (включая
40 фрагменты природных пептидных гормонов, а также их аналоги и производные), или структурный мотив пептидного гормона (включая природные пептидные гормоны, а также их аналоги и производные), которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную

стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики гибридному полипептиду. Первый пептидный гормон и дополнительный пептидный гормон могут представлять собой один и тот же пептидный гормон, могут быть из одного семейства пептидных гормонов, или могут быть различными пептидными гормонами, в зависимости от желаемых характеристик биологически активных модулей пептидных гормонов.

Используемый здесь термин «биологически активный» относится к (1) биологической активности по меньшей мере по одному *in vivo* гормональному пути, или (2) модуляции терапевтической эффективности, объема функций, продолжительности действия, физико-химических свойств и/или других фармакокинетических свойств такой биологической активности. Биологическую активность можно оценить с помощью анализов рецепторного связывания с целевым гормоном, или путем метаболических исследований, которые контролируют физиологический признак, известных в области техники и описанных здесь. Терапевтическую эффективность, объем функций, продолжительность действия, физиологические свойства и/или другие фармакокинетические свойства такой биологической активности можно видоизменять, например, путем изменения химической стабильности, конформационной стабильности, метаболической стабильности, рецепторного взаимодействия, ингибирования протеаз и/или других фармакокинетических характеристик.

В одном варианте осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению сохраняют по меньшей мере около 25%, предпочтительно около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% биологической активности сложного пептидного гормона. Предпочтительными гибридными полипептидами являются полипептиды, активность которых в одном из анализов, относящихся к метаболизму, известных в данной области или описанных здесь (например,

рецепторного связывания, потребления пищи, опорожнения желудка, панкреатической секреции, секреции инсулина, снижения содержания глюкозы в крови, уменьшения массы тела и т.д.) является равной или
5 превышает активность сложного пептидного гормона в том же анализе. Альтернативно, предпочтительные гибридные полипептиды по данному изобретению могут демонстрировать улучшенную технологичность,
10 стабильность и/или простую технологию пролучения, по сравнению со сложными пептидными гормонами.

В другом варианте осуществления, гибридные полипептиды по данному изобретению сохраняют по меньшей мере около 25%, предпочтительно
15 около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% биологической активности природного сложного пептидного гормона, в отношении снижения доступности питательных веществ, снижения потребления пищи, эффекта прибавки массы тела и/или лечения и
20 профилактики метаболических состояний и нарушений. В другом варианте осуществления, гибридные полипептиды по данному изобретению проявляют по меньшей мере около 110%, 125%, 130%, 140%,
25 150%, 200% или более биологической активности природного пептидного гормона касающейся снижения доступности питательных веществ, снижения потребления пищи, эффекта прибавки массы тела и/или лечения и профилактики метаболических состояний и нарушений. В
30 другом варианте осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению демонстрируют улучшенную агонистическую активность в отношении рецептора сложного пептидного гормона.

35 Сложные пептидные гормоны, аналоги и производные

Сложные пептидные гормоны главным образом включают в себя пептидные гормоны, используемые при лечении или профилактике метаболических
40 заболеваний и нарушений, в том числе: (a) семейство амилинов, включая амилин, адреномедуллин ("ADM"), кальцитонин ("СТ"), пептид, кодируемый геном кальцитонина ("CGRP"), интермедин (также известный как "AFP-6") и родственные пептиды; (b) холецистокинин ("ССК"); (c)

семейство лептина, в том числе лептин и пептиды, подобные лептину;
(d) семейство панкреатических полипептидов, в том числе
панкреатический полипептид ("PP") и пептид YY ("PYY"); и (e)
5 инкретины и миметики инкретинов, в том числе: пептидные гормоны,
кодируемые геном проглукана, такие как: глюкагон, глюкагон-
подобный пептид-1 ("GLP-1"), глюкагон-подобный пептид-2 ("GLP-2") и
10 оксинтомодулин ("ОХМ"); и экзендины, такие как: экзендин-3 и
экзендин-4. Как было сказано выше, сложные пептидные гормоны
данного изобретения также включают в себя аналоги и производные,
которые сохраняют гормональную активность этих природных пептидных
15 гормонов. В одном варианте осуществления, такие аналоги и
производные являются агонистами рецептора целевого гормона.

Под «амилином» подразумевается пептидный гормон человека,
20 называемый амилином и секретируемый бета-клетками поджелудочной
железы, и его разновидности, описанные в патенте США № 5234906,
выданном 10 августа 1993, на «Hyperglycemic Compositions»,
содержание которого включено здесь в качестве ссылки. Более
25 конкретно, амилин представляет собой полипептидный гормон из 37
аминокислот, обычно секретируемый совместно с инсулином
панкреатическими бета-клетками в ответ на поступление питательных
веществ (смотри, например, Koda et al., *Lancet* 339:1179-1180,
30 1992). В этом смысле, «амилин», «амилин дикого типа» и «природный
амилин», т.е. немодифицированный амилин, используются
взаимозаменяемо.

35 Под «адреномедуллином» или "ADM" подразумевается пептидный гормон
человека и его разновидности. Более конкретно, ADM получается из
препрогормона длиной 185 аминокислот посредством ступенчатого
40 ферментативного расщепления и амидирования. Этот процесс
завершается высвобождением биологически активного пептида из 52
аминокислот.

Под «кальцитонином» или «СТ» подразумевается пептидный гормон человека и его разновидности, в том числе кальцитонин лосося («sCT»). Более конкретно, СТ представляет собой 32 аминокислотный полипептид, расщепляемый из более крупного прогормона. Он содержит одну дисульфидную связь, которая обуславливает принятие аминоконцом циклической формы. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК кальцитонина может давать мРНК, кодирующую полипептид, генетически родственной кальцитонину; по-видимому, этот пептид функционирует в нервной и сосудистой системах. Был клонирован рецептор к кальцитонину и было показано, что он является членом семейства семи трансмембранных рецепторов, сопряженных с G белком.

Под «пептидом, кодируемым геном кальцитонина» или «CGRP» подразумевается пептидный гормон человека и его разновидности в любой физиологической форме.

Под «интермедином» или «AFR-6» подразумевается пептидный гормон человека или его разновидности в любой физиологической форме.

Под «холецистокинином» или «ССК» подразумевается пептидный гормон человека или его разновидности. Более конкретно, ССК представляет собой 33-аминокислотную последовательность, впервые идентифицированную у людей, и включает в себя 8-аминокислотный *in vivo* С-концевой фрагмент («ССК-8») который, как сообщается, был показан у свиней, крыс, цыплят, шиншиллы, собак и людей. Следовательно, термин ССК-33 главным образом будет относиться к ССК(1-33) человека, тогда как ССК-8 (ССК(26-33)) будет относиться к С-концевому октапептиду в общем как сульфатированному, так и несulfатированному, если не указано иное. Далее, пентагастрин или ССК-5 будет относиться к С-концевому пептиду ССК(29-33), а ССК-4 будет относиться к С-концевому тетрапептиду ССК(30-33). Однако, используемый здесь ССК главным образом будет относиться ко всем природным вариантам гормона, в том числе ССК-33, ССК-8, ССК-5 и

ССК-4, в сульфатированной и несulfатированной форме, если не указано иное.

5 Под «лептином» подразумевается природная форма лептина любых видов, а также биологически активные D-изоформы или фрагменты природного лептина и его варианты, и комбинации вышесказанного. Лептин представляет собой полипептидный продукт об гена, описанный в 10 международной патентной публикации № WO 96/05309, полный текст которой включен здесь в качестве ссылки. Предполагаемые аналоги и фрагменты лептина изложены в патенте США 5521283, патенте США 5532336, РСТ/US96/22308 и РСТ/US96/01471, каждый из которых включен 15 здесь в качестве ссылки в полном объеме.

Под «РР» подразумевается полипептид панкреатического пептида человека или его разновидности, в любой физиологической форме. 20 Следовательно, термин «РР» включает в себя как 36 аминокислотный полипептид человека полной длины, представленный в SEQ ID NO: 1, так и разновидности РР, в том числе, например, РР мышей, хомяков, цыплят, быков, крыс и собак РР. В этом смысле, «РР», «РР дикого 25 типа» и «природный РР», т.е. немодифицированный РР используются взаимозаменяемо.

Под «РУУ» подразумевается полипептид УУ пептида человека или его 30 разновидности, в любой физиологической форме. Следовательно, термин «РУУ» включает в себя как 36 аминокислотный пептид человека полной длины, так и разновидности РУУ, в том числе, например, РУУ мыши, хомяка, цыпленка, быка, крысы и собаки. В этом смысле «РУУ» и «РУУ 35 дикого типа» и «природный РУУ», т.е. немодифицированный РУУ, используются взаимозаменяемо. В контексте настоящего изобретения все модификации, рассматриваемые в отношении полипептидов по 40 настоящему изобретению, аналогичных РУУ, основаны на 36 аминокислотной последовательности природного РУУ человека.

Под «GLP-1» подразумевается глюкагон-подобный пептид-1 человека или его разновидности, в любой физиологической форме. Термин «GLP-1» включает в себя GLP-1(1-37) человека, GLP-1(7-37) и GLP-1(7-36)амид, относительно полной длины GLP-1(1-37) человека, и разновидности GLP-1, в том числе, например, GLP-1 мыши, хомяка, цыпленка, быка, крысы и собаки. В этом смысле, «GLP-1», «GLP-1 дикого типа», и «природный GLP-1», т.е. немодифицированный GLP-1, используются взаимозаменяемо.

Под «GLP-2» подразумевается глюкагон-подобный пептид-2 человека или его разновидности, в любой физиологической форме. Более конкретно, GLP-2 представляет собой 33-аминокислотный пептид, секретируемый совместно наряду с GLP-1 из эндокринных клеток кишечника в тонкой и толстой кишке.

Под «ОХМ» подразумевается оксинтомодулин человека или его разновидности в любой физиологической форме. Более конкретно, ОХМ представляет собой 37 аминокислотный пептид, который содержит 29 аминокислотную последовательность глюкагона, за которой следует 8 аминокислотный карбоксиконцевой удлиняющий сегмент.

Под «экзендином» подразумевается пептидный гормон, обнаруженный в слюне ядозуба, ящерицы, которая водится в Аризоне, и мексиканского ядозуба, а также разновидности этого гормона. Более конкретно, Экзендин-3 находится в слюне *Heloderma horridum*, а экзендин-4 находится в слюне *Heloderma suspectum* (Eng, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 265:20259-62, 1990; Eng., J., et al., *J. Biol. Chem.*, 267:7402-05 (1992)). Экзендины имеют некоторое сходство последовательностей с некоторыми членами семейства глюкагон-подобных пептидов с наибольшей идентичностью, 53%, с GLP-1 (Goke, et al., *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55 (1993)). В этом смысле, «экзендин», «экзендин дикого типа» и «природный экзендин», т.е. немодифицированный экзендин, используются взаимозаменяемо.

Используемый здесь «аналог» относится к пептиду, последовательность которого происходит из последовательности основного эталонного пептида (например, РР, РУУ, амилина, GLP-1, экзендина, и т.д.),
5 включая вставки, замены, удлинения и/или делеции эталонной аминскислотной последовательности, предпочтительно имеющей по меньшей мере 50 или 55% идентичность аминокислотных
10 последовательностей с основным пептидом, более предпочтительно, имеющей по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% идентичность аминокислотных последовательностей с основным пептидом. В одном варианте осуществления, такие аналоги могут содержать
15 консервативные или неконсервативные аминокислотные замены (включая неперодные аминокислоты и L и D формы).

«Производное» определяется как молекула, имеющая аминокислотную последовательность природного эталонного пептида или аналога, но
20 дополнительно имеющая химическую модификацию одной или нескольких его боковых аминогрупп, α -углеродных атомов, концевой аминогруппы или концевой карбоксильной группы. Химическая модификация включает
25 в себя, но не только, добавление химических частей, создание новых связей и удаление химических частей. Модификации аминокислот боковых групп включают в себя, но не только, ацилирование лизина ϵ -
30 аминогрупп, N-алкилирование аргинина, гистидина или лизина, алкилирование карбоксильных групп глутаминовой или аспарагиновой кислоты, и дезаминирование глутамина или аспарагина. Модификации аминоконца включают в себя, без ограничения, дезамино, N-низший
35 алкил, N-ди-низший алкил, изогнутые алкилы (например, разветвленные, циклические, конденсированные, адамантил) и N-ацильные модификации. Модификации концевой карбоксильной группы
40 включают в себя без ограничения, амидные, низший алкил-амидные, с изогнутыми алкилами (например, разветвленные, циклические, конденсированные, адамантил) алкильные, диалкиламидные и модификации со сложными эфирами низших алкилов. Низший алкил
45

представляет собой C1-C4 алкил. Кроме того, одна или несколько боковых групп, или концевых групп, могут быть защищены защитными группами, известными специалисту в области химии пептидов. α -углерод аминокислоты может быть моно- или диметилированным.

Под «агонистом» подразумевается соединение, которое вызывает биологическую активность природного эталонного пептида человека, предпочтительно активность которого лучше активности эталонного пептида, или в пределах пяти порядков величины (плюс или минус) активности по сравнению с эталонным пептидом, более предпочтительно, 4, 3, 2 или 1 порядок величины, при оценке известными в области техники способами измерения, такими как исследования рецепторного связывания/конкурентности. В одном варианте осуществления, эти термины относятся к соединению, которое вызывает биологический эффект, подобный биологическому эффекту природного эталонного полипептида человека, например, соединение (1) обладающее активностью в исследованиях в отношении потребления пищи, опорожнения желудка, панкреатической секреции или потери массы тела сходной с природным эталонным пептидом человека, или (2) которое связывается специфически в стандартном рецепторном анализе или в анализе конкурентного связывания с меченным эталонным пептидом. Предпочтительно, агонисты будут связываться в таких анализах с аффинностью более 1 мкМ, и более предпочтительно, с аффинностью более 1-5 нМ. В другом варианте осуществления, эти термины относятся к соединению, которое дает биологический эффект при лечении диабета или состояния или нарушения, связанного с диабетом. Такие агонисты могут включать в себя полипептид, содержащий активный фрагмент эталонного пептида или малую химическую молекулу.

Под «аминокислотой» и «аминокислотным остатком» подразумеваются природные аминокислоты, неприродные аминокислоты и модифицированные аминокислоты. Если не указано обратное, любая ссылка на

аминокислоту вообще или на конкретное название аминокислоты, включает в себя ссылку как на D, так и на L стереоизомеры, если их структура допускает такие стереоизомерные формы. Природные аминокислоты включают в себя аланин (Ala), аргинин (Arg), аспарагин (Asn), аспарагиновую кислоту (Asp), цистеин (Cys), глутамин (Gln), глутаминовую кислоту (Glu), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys), метионин (Met), фенилаланин (Phe), пролин (Pro), серин (Ser), треонин (Thr), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и валин (Val). Неприродные аминокислоты включают в себя, но не только, гомолизин, гомоаргинин, азетидинкарбоновую кислоту, 2-аминоадапиновую кислоту, 3-аминоадипиновую кислоту, бета-аланин, аминопропионовую кислоту, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, третичный-бутилглицин, 2,4-диаминоизомасляную кислоту, десмозин, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту, N-этилглицин, N-этиласпарагин, гомопролин, гидроксизин, алло-гидроксизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилаланин, N-метилглицин, N-метилизолойцин, N-метилпентилглицин, N-метилвалин, нафталанин, норвалин, норлейцин, орнитин, пентилглицин, пипеколиновую кислоту и тиопролин. Дополнительные неприродные аминокислоты включают в себя модифицированные аминокислотные остатки, которые химически блокированы, обратимо или необратимо, или химически модифицированы по их N-концевой аминогруппе или группам боковой цепи, как, например, N-метилированные D и L аминокислоты или остатки, где функциональные группы боковых цепей химически модифицированы в другую функциональную группу. Например, модифицированные аминокислоты включают в себя метионинсульфоксид, метионинсульфон; (сложный бета-метилэфир)-аспарагиновой кислоты, модифицированную аминокислоту аспарагиновую кислоту; N-этилглицин, модифицированную

аминокислоту глицин; или аланинкарбоксамид, модифицированную аминокислоту аланин. Дополнительные остатки, которые могут быть включены, описаны у Sandberg et al., J. Med. Chem. 41: 2481-91, 1998.

Используемый здесь: "5 Ара" означает 5 аминопентаноил, "12 Адо" означает 12-аминододеканоил, "PEG(8)" означает 3,6,-диоксоктаноил, а "PEG(13)" означает 1-амино-4,7,10-тиокса-13-тридеканаминамисукцинимойл.

Как рассматривалось выше, природные сложные пептидные гормоны известны в уровне техники, а также их аналоги и производные. Для ссылки последовательности некоторых природных сложных пептидных гормонов представлены ниже в Таблице 1.

Таблица 1: Примеры сложных пептидных гормонов

Посл. ID	Описание	Последовательность
44	Амелин крыс	KCNTATCATQRLANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY
45	h-Амелин:	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY
46	h-ADM:	YRQSMNMFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPGY
47	s-CT:	CSNLSTCVLGKLSEELHKLQTYPRNTGSGTR
48	h-CT:	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP
49	h-CGRP α:	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF
50	h-CGRP β:	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF
51	h-AFP-6 (1-47)	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
52	h-AFP-6 (8-47):	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
53	Мышиный AFP-6 (1-47):	PHAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLVRPAGRRDSAPVDPSSPHSY
54	Мышиный AFP-6 (8-47):	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQLVRPAGRRDSAPVDPSSPHSY

55	ССК-8 – сульфатированный:	DY (SO ₃) MGWMDF
56	h-Лептин:	MHWGTLGFLWLWPYLFYVQAVPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIP GLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFAFSKCHLPWASGLETL DSLGGVLEASGYSTEVVALSRLQGSLLQDMLWQLDLSPGC
57	hPYY:	YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
58	hPYY (3-36)	IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY
59	hGLP-1 (1-37):	HDEFERHAEGTFTSDVSSSTLEGQAALFIWLVKGRG
60	GLP-1 лягушки:	HAEGTYTNDVTEYLEEKAKEFIEWLIKGPKKIRYS-OH; HAEGTFTSDVTQQLDEKAKEFIDWLINGGPSKEIIS-OH
61	h-GLP-1 (7-36):	HAEGTFTSDVSSYLEGQAALFIWLVKGR
62	h-GLP-2	HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIETKITD
63	GLP-2 лягушки:	HAEGTFTNDMTNYLEEKAKEFVGVWLIKGRP-OH
64	ОХМ:	HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRNRNIA
65	Экзендин-3:	HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS
66	Экзендин-4	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

При физиологической экспрессии эти пептиды главным образом амидированы по С-концу, но для целей настоящего изобретения это не обязательно. Другими словами, С-концы этих пептидов, а также гибридных полипептидов настоящего изобретения могут иметь свободную -ОН или -NH₂ группу. Эти пептиды также могут иметь другие пост-трансляционные модификации. Специалисту в данной области будет понятно, что гибридные полипептиды настоящего изобретения также могут быть созданы с остатком метионина на N-конце.

Аналоги вышеуказанных сложных пептидных гормонов известны в данной области, но главным образом включают в себя модификации, такие как замены, делеции и вставки в аминокислотную последовательность этих сложных пептидных гормонов, и любые их комбинации. Замены, вставки и делеции могут быть на N- или С-конце, или могут быть во внутренних

участках сложного пептидного гормона. В предпочтительном аспекте, аналоги сложных пептидных гормонов данного изобретения включают в себя одну или несколько модификаций "заменимого" аминокислотного остатка. В контексте этого изобретения «заменимым» аминокислотным остатком является остаток, который может быть изменен, т.е. удален или замещен, в природной аминокислотной последовательности фрагмента, например, фрагмента сложного пептидного гормона человека, без прекращения или существенного снижения активности полученного в результате аналога агониста рецептора сложного пептидного гормона.

Предпочтительные замены включают в себя консервативные аминокислотные замены. «Консервативной аминокислотной заменой» является замена, при которой остаток аминокислоты заменяется остатком аминокислоты, имеющим похожую боковую цепь или физикохимические характеристики (например, электростатические, образование водородных связей, изостерические, гидрофобные свойства). Семейства аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи известны в области техники. Эти семейства включают в себя амнокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, метионин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Настоящее изобретение также относится к производным сложных пептидных гормонов. Такие производные включают в себя сложные пептидные гормоны и их аналоги, конъюгированные с одной или несколькими молекулами водорастворимого полимера, такого как

полиэтиленгликоль («PEG») или цепями жирных кислот различной длины (например, стеарил, пальмитоил, октаноил и т.д.), или полученные добавлением полиаминокислот, таких как поли-his, поли-arg, поли-lys и поли-ala. Модификации сложных пептидных гормонов или их аналогов также могут включать в себя заместители, представляющие собой малые молекулы, такие как короткие алкилы и изогнутые алкилы (например, разветвленные, циклические, конденсированные, адамантил), и ароматические группы. Молекулярная масса молекул водорастворимого полимера предпочтительно будет находиться в интервале примерно от 500 примерно до 20000 Дальтон.

Такие модификации, представляющие собой конъюгацию с полимером или модификации с использованием заместителя, представляющего собой малую молекулу, могут иметь место особенно на N- или C-концах или боковых цепях аминокислотных остатков в пределах последовательности гибридных полипептидов. Альтернативно, могут существовать многочисленные участки образования производных по всей длине гибридного полипептида. Замены одной или нескольких аминокислот лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой или цистеином могут обеспечить дополнительные участки для образования производных. Смотри, например, патенты США №№ 5824784 и 5824778. Предпочтительно, гибридные полипептиды могут быть конъюгированы с одной, двумя или тремя молекулами полимера.

Молекулы водорастворимых полимеров предпочтительно выстраиваются к амина, карбоксильной или тиольной группе, и могут быть связаны N или C концами, или с боковыми цепями лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина. Альтернативно, молекулы водорастворимых полимеров могут быть связаны с группами диамина или дикарбоксильными группами. В предпочтительном варианте осуществления, гибридные полипептиды данного изобретения конъюгированы с одной, двумя или тремя молекулами PEG через эфирную аминогруппу лизина.

Производные по данному изобретению также включают в себя сложные пептидные гормоны или аналоги с химическими изменениями одного или нескольких аминокислотных остатков. Такие химические изменения включают в себя амидирование, гликозилирование, ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование и циклизацию. Химические изменения могут иметь место особенно на N- или C-концах или боковых цепях аминокислотных остатков в пределах последовательности RPF гибридных полипептидов. В одном варианте осуществления, C-концы этих пептидов могут иметь свободную -ОН или -NH₂ группу. В другом варианте осуществления N-конец может быть кэпирован изобутилоксикарбонильной группой, н-бутилоксикарбонильной группой, этоксикарбонильной группой, изокапроильной группой (изокап), октанильной группой, октилглициновой группой (G(Oct)) или группой 8-аминооктановой кислоты. В предпочтительном варианте осуществления, циклизацию можно осуществить через образование дисульфидных мостиков. Альтернативно, могут существовать многочисленные участки химических модификаций по всей длине гибридного полипептида.

Семейство амилина

Рассмотренные выше, сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, включают в себя пептидные гормоны семейства амилина, в том числе, амилин, адреномедуллин ("ADM"), кальцитонин ("СТ"), пептид, кодируемый геном кальцитонина ("CGRP"), интермедин (известный также как "AFP-6") и родственные им пептиды. Природные пептидные гормоны семейства амилина известны в данной области, как и их функциональные пептидные аналоги и производные. Некоторые предпочтительные природные пептиды, аналоги пептидов и производные описаны здесь, однако следует признать, что любые пептиды семейства амилинов, которые проявляют гормональную активность, известные в области техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.

Любой аналог амилина или производное, известные в области техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, аналоги амилина и производные

5 обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного амилина. В некоторых вариантах осуществления аналоги амилина являются агонистами рецептора, с которым может специфически

10 связываться природный амилин. Предпочтительные аналоги амилина и производные включают в себя аналоги и производные, описанные в заявке US 2003/0026812 A1, включенной здесь в качестве ссылки..

Примеры аналогов амилина включают в себя:

15	SEQ ID:	
	67	^{25,28,29} Pro-h-амилин (прамлинтид)
	68	дез- ¹ Lys-h-амилин
	69	²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h-амилин
	70	¹⁸ Arg, ^{25,28} Pro-h-амилин
20	71	дез- ¹ Lys, ¹⁸ Arg, ^{25,28} Pro-h-амилин
	72	¹⁸ Arg, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	73	дез- ¹ Lys, ¹⁸ Arg, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	74	дез- ¹ Lys, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	75	²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h-амилин
25	76	²⁸ Pro-h-амилин, 2,7-Cyclo-[² Asp, ⁷ Lys]-h-амилин
	77	²⁻³⁷ h-амилин
	78	¹ Ala-h-амилин
	79	² Ala-h-амилин
	80	^{2,7} Ala-h-амилин
30	81	¹ Ser-h-амилин
	82	²⁹ Pro-h-амилин
	83	^{25,28} Pro-h-амилин
	84	дез- ¹ Lys, ^{25,28} Pro-h-амилин
	85	²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h-амилин
35	86	²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ²⁸ Pro-h-амилин
	87	дез- ¹ Lys, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ²⁸ Pro-h-амилин
	88	¹⁸ Arg, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ²⁸ Pro-h-амилин
	89	¹⁸ Arg, ²³ Leu, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	90	¹⁸ Arg, ²³ Leu, ^{25,28} Pro-h-амилин
40	91	¹⁷ Ile, ²³ Leu, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	92	¹⁷ Ile, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	93	дез- ¹ Lys, ¹⁷ Ile, ²³ Leu, ^{25,28,29} Pro-h-амилин
	94	¹⁷ Ile, ¹⁸ Arg, ²³ Leu-h-амилин
	95	¹⁷ Ile, ¹⁸ Arg, ²³ Leu, ²⁶ Val, ²⁹ Pro-h-амилин
45	96	¹⁷ Ile, ¹⁸ Arg, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h-амилин,

97	¹³ Thr, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁸ Leu, ²⁹ Pro, ³¹ Asp-h-амилин
98	¹³ Thr, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁹ Pro, ³¹ Asp-h-амилин
99	дез- ¹ Lys, ¹³ Thr, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁸ Pro, ³¹ Asp-h-амилин
100	¹³ Thr, ¹⁸ Arg, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁶ Ala, ²⁹ Pro, ³¹ Asp-h-амилин
101	¹³ Thr, ¹⁸ Arg, ²¹ His, ²³ Leu, ^{28,29} Pro, ³¹ Asp-h-амилин
102	¹³ Thr, ¹⁸ Arg, ²¹ His, ²³ Leu, ²⁵ Pro, ²⁶ Ala, ^{28,29} Pro, ³¹ Asp-h-амилин

Как известно в области техники, такие аналоги амилина предпочтительно являются амидированными, но в контексте настоящего изобретения, необязательно могут быть в кислотной форме, если не указано иное.

Любой аналог ADM или производное, известное в данной области, может быть использован применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, аналоги ADM и производные обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного ADM. В некоторых вариантах осуществления, аналоги ADM являются агонистами рецептора, с которым может специфически связываться природный ADM.

Любой аналог СТ или производное, известное в области техники, может быть использован применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, аналоги СТ и производные обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного СТ. В некоторых вариантах осуществления аналоги СТ являются агонистами рецептора, с которым может специфически связываться природный СТ. Предпочтительные аналоги СТ и производные включают в себя аналоги и производные, описанные в патентнах США №№ 4652627; 4606856; 4604238; 4597900; 4537716; 4497731; 4495097; 4444981; 4414149; 4401593 и 4397780, которые включены здесь в качестве ссылки.

Примеры аналогов СТ включают в себя:

SEQ ID:	
103	⁸ Gly-CT
104	²² Leu-CT
105	² Gly, ³ Ser, ⁸ Gly, ²² дез-Tyr-CT

106	¹⁴ Gln-sCT,
107	¹⁸ Arg-sCT,
108	^{11,18} Arg-sCT,
109	¹⁴ Gln, ¹⁸ Arg-sCT,
110	¹⁴ Gln, ^{11,18} Arg-sCT

Как известно в области техники, такие аналоги СТ предпочтительно являются амидированными, но в контексте настоящего изобретения, необязательно могут быть в кислотной форме, если не указано иное.

Любой аналог CGRP или производное, известные в области техники могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления аналоги и производные CGRP обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного CGRP. В некоторых вариантах осуществления аналоги CGRP являются агонистами рецептора, с которым может специфически связываться природный CGRP. Предпочтительные аналоги и производные CGRP включают в себя аналоги и производные, описанные в патентах США №№ 4697002 и 4687839, которые включены здесь в качестве ссылки.

Примеры аналогов CGRP включают в себя:

SEQ ID:	
111	³⁶ D-Ser-CGRP
112	³⁶ D-Thr-CGRP
113	³⁶ D-Asp-CGRP
114	³⁶ D-Asn-CGRP
115	³⁶ Ser-CGRP
116	³⁶ Hse-CGRP
117	³⁶ Asp-CGRP
118	³⁶ Thr-CGRP
119	³⁶ Asn-CGRP

Любой аналог или производное AFP-6, известные в области техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления аналоги и производные AFP-6 обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного AFP-6. В некоторых вариантах осуществления аналоги AFP-6 являются агонистами рецептора, с которым природный AFP-6 способен специфически

связываться. Предпочтительные аналоги и производные AFP-6 включают в себя аналоги и производные, описанные в публикации WO 2003/022304, которая включена здесь в качестве ссылки.

Примеры аналогов AFP-6 включают в себя:

SEQ ID:	
120	TQAQLLRVGCNLTSCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
121	TQAQLLRVGCDTATCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
122	TQAQLLRVGMVLGTMQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
123	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVEPSSPHSY
124	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQESAPVEPSSPHSY
125	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQL---RQDSAPVDPSSPHSY
126	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQL---DSAPVDPSSPHSY
127	RVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
128	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVEPSSPHSY
129	VGCVLGTCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
130	GCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
131	GCNTATCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVDPSSPHSY
132	GCNTATCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
133	GCSNLSTCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
134	GCGNLSTCQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY
135	GCVLGTCQVQNLSHRLWQL----RQESAPVEPSSPHSY
136	CVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
137	QVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
138	VQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
139	VQNLSHRL----QLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY
140	GTMQVQNLSHRLWQL----RQDSAPVEPSSPHSY

Как известно в области техники, такие аналоги AFP-6 предпочтительно являются амидированными, но в контексте настоящего изобретения необязательно могут быть в кислотной форме, если не указано иное.

Семейство ССК

ССК, в том числе hССК и их разновидности, и различные аналоги известны в области техники. В основном, ССК имеет 33-аминокислотную последовательность, впервые идентифицированную у людей, и включает в себя 8-аминокислотный *in vivo* С-концевой фрагмент ("ССК-8") который по сообщениям, показан у свиней, крыс, цыплят, шиншиллы, собак и у людей. Другие разновидности включают в себя 39-аминокислотную последовательность, обнаруженную у свиней, собак и морских свинок, и 58-аминокислотную последовательность, обнаруженную у кошек, собак и людей, и 47-аминокислотные последовательности, гомологичные как ССК, так и гастрину. С-концевая сульфатированная октапептидная последовательность (ССК-8) относительно консервативна среди видов, и может быть минимальной последовательностью для биологической активности на периферии у грызунов. Следовательно, термин ССК-33 в основном будет относиться к ССК(1-33) человека, тогда как ССК-8 (ССК(26-33)) будет относиться к С-концевому октапептиду, в общем как сульфатированному, так и несulfатированному, если не указано иное. Далее, пентагастрин или ССК-5 будет относиться к С-концевому пептиду ССК(29-33), а ССК-4 будет относиться к С-концевому тетрапептиду ССК(30-33).

Сообщалось, что подтип рецепторов А-типа (ССК_А) является селективным в отношении сульфатированного октапептида. Подтип рецепторов В-типа (ССК_В) был идентифицирован повсюду в головном мозге и желудочно-кишечном тракте, и по имеющимся сведениям не требует сульфатирования или всех восьми аминокислот.

Различные *in vivo* и *in vitro* скрининговые методы для аналогов ССК известны в уровне техники. Примеры включают в себя *in vivo* исследования, включающие в себя изучение сокращения желчного пузыря собак или морских свинок после быстрого внутривенного введения соединения, тестируемого на ССК-подобную активность, и *in vitro* исследования, в которых проводят измерение с использованием стрипов

желчного пузыря кролика. Смотри Walsh, "Gastrointestinal Hormones", In Physiology of the Gastrointestinal Tract (3d ed. 1994; Raven Press, New York).

Некоторые предпочтительные ССК и аналоги ССК, обладающие активностью ССК, включают в себя:

SEQ ID:	
141	DY(SO ₃ H)MGWMDF
142	DYMGWMDF
143	MGWMDF
144	GWMDF
145	WMDF
146	KDY(SO ₃ H)MGWMDF
147	KDYMGMDF
148	KMGWMDF
149	KGWMDF
150	KWMDF

Как известно в уровне техники, такие ССК пептиды предпочтительно являются амидированными, но в контексте настоящего изобретения необязательно могут быть в кислотной форме, если не указано иное.

Семейство лептина

Сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, также включают в себя пептидные гормоны семейства лептина. Природные пептидные гормоны семейства лептина известны в уровне техники, как и их функциональные пептидные аналоги и производные. Некоторые предпочтительные природные пептиды, аналоги и производные пептидов описаны здесь, однако, следует признать, что любые известные пептиды семейства лептина, которые проявляют гормональную активность, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.

Любой аналог или производное лептина, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, аналоги и производные лептина обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного лептина. В некоторых вариантах осуществления, аналоги лептина

являются агонистами рецептора, с которым способен специфически связываться природный лептин. Предпочтительные аналоги лептина включают в себя аналоги, описанные, например, в публикациях WO 2004/039832, WO 98/55139, WO 98/12224 и WO 97/02004, все включены здесь в качестве ссылки.

Примеры аналогов лептина включают в себя аналоги, в которых аминокислота в положении 43 заменена на Asp или Glu; в положении 48 заменена на Ala; в положении 49 заменена на Glu, или отсутствует; в положении 75 заменена на Ala; в положении 89 заменена на Leu; в положении 93 заменена на Asp или Glu; в положении 98 заменена на Ala; в положении 117 заменена на Ser, в положении 139 заменена на Leu, в положении 167 заменена на Ser, и любые их комбинации.

Некоторые предпочтительные PPF и аналоги PPF, обладающие PPF активностью, включают в себя:

SEQ ID:	
151	⁴³ Asp-лептин
152	⁴³ Glu-лептин
153	⁴⁸ Ala-лептин
154	⁴⁹ Glu-лептин
155	⁴⁹ Des-AA-лептин
156	⁷⁵ Ala-лептин
157	⁸⁹ Leu-лептин
158	⁹³ Asp-лептин
159	⁹³ Glu-лептин
160	⁹⁸ Ala-лептин
161	¹¹⁷ Ser-лептин
162	¹³⁹ Leu-лептин
163	¹⁶⁷ Ser-лептин
164	⁴³ Asp, ⁴⁹ Glu-лептин
165	⁴³ Asp, ⁷⁵ Ala-лептин
166	⁸⁹ Leu, ¹¹⁷ Ser-лептин
167	⁹³ Glu, ¹⁶⁷ Ser-лептин

Семейство PPF

Сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, также включают в себя PPF пептидные гормоны, в том числе PP и PYY. Природные PPF пептидные гормоны известны в уровне техники, как и их

функциональные пептидные аналоги и производные. Некоторые предпочтительные природные пептиды, аналоги и производные пептидов описаны здесь, однако, следует признать, что любые известные пептиды семейства PPF, которые проявляют гормональную активность, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.

Любой аналог или производное PPF, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, аналоги и производные PPF обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного PPF полипептида. В некоторых вариантах осуществления аналоги PPF являются агонистами рецептора, с которым способен специфически связываться природный PPF полипептид. Предпочтительные аналоги и производные PPF включают в себя аналоги и производные, описанные в публикации WO 03/026591 и WO 03/057235, которые включены здесь в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления, предпочтительные аналоги и производные PPF, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность PPF, в основном включают в себя по меньшей мере два мотива PYY, в том числе полипролиновый мотив и мотив C-концевого хвоста. Такие аналоги в основном описаны в предварительной заявке США № 60/543406, поданной 11 февраля 2004, которая включена здесь в качестве ссылки. Другие предпочтительные аналоги PPF раскрыты в PCT/US05/004351, озаглавленной "Pancreatic Polypeptide Family Motifs and Polypeptides Comprising the Same", номер в реестре патентных поверенных 18528.832, поданной одновременно с настоящей заявкой, содержание которой включено здесь в качестве ссылки. В качестве предпосылки, поиск дал возможность предположить, что различия в аффинностях связывания с Y рецептором коррелировали со различиями вторичной и третичной структуры. Смотри, например, Keire et al., *Biochemistry* 2000, 39, 9935-9942.

Природный РУУ свиньи был охарактеризован как пептид, содержащий два С-концевых спиральных сегмента остатков с 17 по 22 и с 25 по 33, разделенных перегибом около остатков 23, 24 и 25, с центральным витком вокруг остатков 12-14, и с N-концевой складкой рядом с остатками 30 и 31. Кроме того, полная длина РУУ свиньи была охарактеризована, как содержащая РР складку, стабилизированную гидрофобными взаимодействиями среди остатков на N- и С- концах. См. *id.*

«РУУ мотив» в основном представляет собой структурный компонент, первичный, вторичный или третичный, природного полипептида семейства РР, который является ключевым для биологической активности, т.е. биологическая активность значительно снижена в отсутствие этого мотива или при его повреждении. Предпочтительные РУУ мотивы включают в себя N-концевой полипролиновый мотив II типа природного полипептида семейства РР, β -спиральный мотив II типа природного полипептида семейства РР, α -спиральный мотив С-конца природного полипептида семейства РР, и С-концевой хвостовой мотив природного полипептида семейства РР. Более конкретно, в N-концевом полипролиновом участке, аминокислоты, соответствующие остаткам 5 и 8 природного полипептида семейства РР в основном сохраняются как пролин. β -спиральный мотив II типа в основном будет содержать аминокислоты, соответствующие остаткам 12-14 природного полипептида семейства РР. α -спиральный мотив может в основном исходить из аминокислот, соответствующих приблизительно остатку 14 природного полипептида семейства РР до любой точки вплоть до С-конца, и включая его, при условии, что α -спиральный мотив включает в себя достаточное количество аминокислотных остатков, так, что α -спиральный виток образуется в растворе. α -спиральный мотив также может содержать аминокислотные замены, вставки и делеции последовательности природного пептида семейства РР, при условии, что α -спиральный виток по-прежнему образуется в растворе. С-

концевой хвостовой мотив главным образом содержит аминокислоты, соответствующие приблизительно последним 10 остаткам природного полипептида семейства РР, более предпочтительно, последние 7, 6 или 5 остатков природного полипептида семейства РР, и, более предпочтительно, аминокислотные остатки 32-35.

Предпочтительные аналоги РУУ включают в себя аналоги с внутренними делециями, вставками и заменами в областях молекулы РУУ, не соответствующих полипролиновому мотиву и/или С-концевому хвостовому мотиву. Например, предусматриваются внутренние делеции в положениях 4, 6, 7, 9 или 10.

Инкретины и миметики инкретинов

Сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, также включают себя пептидные гормоны GLP-1. Природные GLP-1 пептидные гормоны, включающие в себя GLP-1(1-37), GLP-1(7-37) и GLP-1(7-36)амид, известны в уровне техники, как и их функциональные пептидные аналоги и производные. Используемый здесь, GLP-1 относится ко всем природным формам пептидных гормонов GLP-1. Некоторые предпочтительные природные пептиды, пептидные аналоги и производные описаны здесь, однако, следует признать, что любые известные GLP-1 пептиды, которые проявляют гормональную активность, известную в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.

Любой пептидный аналог или производное GLP-1, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, пептидные аналоги GLP-1 и производные обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного GLP-1 пептида. В некоторых вариантах осуществления пептидные аналоги GLP-1 являются агонистами рецептора, с которым способен специфически связываться природный GLP-1 пептид. Предпочтительные пептидные аналоги и производные GLP-

1 включают в себя аналоги и производные, описанные, например, в публикации WO 91/11457, которая включена здесь в качестве ссылки.

Аналоги GLP-1, известные в уровне техники, включают в себя:

SEQ ID:	
168	⁹ Gln-GLP-1(7-37)
169	D- ⁹ Gln-GLP-1(7-37)
170	¹⁶ Thr- ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)
171	¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)
172	⁸ Gly-GLP-1(7-36)
173	⁹ Gln-GLP-1(7-37)
174	D- ⁹ Gln-GLP-1(7-37)
175	ацетил- ⁹ Lys-GLP-1(7-37)
176	⁹ Thr-GLP-1(7-37)
177	D- ⁹ Thr-GLP-1(7-37)
178	⁹ Asn-GLP-1(7-37)
179	D- ⁹ Asn-GLP-1(7-37)
180	²² Ser ²³ Arg ²⁴ Arg ²⁶ Gln-GLP-1(7-37)
181	¹⁶ Thr ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)
182	¹⁸ Lys-GLP-1(7-37)
183	²³ Arg-GLP-1(7-37)
184	²⁴ Arg-GLP-1(7-37)

Как известно из уровня техники, такие аналоги GLP-1 предпочтительно могут быть амидированы, но в контексте настоящего изобретения, необязательно могут находиться в кислотной форме, если не указано иное.

Другие аналоги и производные GLP-1 описаны в патенте США № 5545618, который включен здесь в качестве ссылки. Предпочтительная группа аналогов и производных GLP-1 включает в себя аналоги и производные, описанные в патенте США № 6747006, который включен здесь в качестве ссылки в полном объеме. Также предусматривается использование в настоящем изобретении молекул, описанных в патенте США № 5188666, который специально включен в качестве ссылки. Другая группа молекул для использования в настоящем изобретении включает в себя соединения, описанные в патенте США № 5512549, который специально включен здесь в качестве ссылки. Другая предпочтительная группа

GLP-1 соединений для использования в настоящем изобретении описана в публикации WO 91/11457, которая включена здесь в качестве ссылки.

5 Сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, также включают в себя пептидные гормоны GLP-2. Природные GLP-2 пептидные гормоны, например, GLP-2 крыс и его гомологи, в том числе GLP-2 быка, GLP-2 свиньи, GLP-2 дегу, GLP-2 жвачных животных, GLP-2
10 морской свинки, GLP-2 хомяка, GLP-2 человека, GLP-2 радужной форели и GLP-2 цыпленка, известны в уровне техники, как и их функциональные пептидные аналоги и производные. Некоторые предпочтительные природные пептиды, пептидные аналоги и производные
15 описаны здесь, однако, следует признать, что любые GLP-2 пептиды, которые проявляют гормональную активность, известную в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.
20

Любой аналог или производное GLP-2, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, пептидные аналоги и производные GLP-2
25 обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного GLP-2 пептида. В некоторых вариантах осуществления пептидные аналоги GLP-2 являются агонистами рецептора, с которым способен специфически связываться природный GLP-2 пептид. Предпочтительные пептидные аналоги и производные GLP-2 включают в себя аналоги и производные, описанные например в заявке США № 08/669791 и международной заявке PCT PCT/CA97/00252, каждая из которых включена
30 здесь в качестве ссылки. Специфические аналоги GLP-2, известные в уровне техники, включают в себя: GLP-2 крысы или человека, модифицированный в положении 2 для придания резистентности к DPP-IV путем замены Gly на Ala.
35
40

Сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, также включают в себя пептидные гормоны оксинтомодулина (ОХМ). Природные ОХМ пептидные гормоны известны в уровне техники, как и их
45

50

функциональные пептидные аналоги и производные. Некоторые предпочтительные природные пептиды, пептидные аналоги и производные описаны здесь, однако, следует признать, что любые известные ОХМ пептиды, которые проявляют гормональную активность, известную в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.

Любой пептидный аналог или производное ОХМ, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, пептидные аналоги и производные ОХМ обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного ОХМ пептида. В некоторых вариантах осуществления, пептидные аналоги ОХМ являются агонистами рецептора, с которым способен специфически связываться ОХМ пептид.

Сложные пептидные гормоны, используемые в настоящем изобретении, также включают в себя экзендины. Природные экзендины известны в уровне техники, как и их функциональные пептидные аналоги и производные. Некоторые предпочтительные природные пептиды, пептидные аналоги и производные описаны здесь, однако следует признать, что любые известные экзендины, которые проявляют гормональную активность, известную в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению.

Любой пептидный аналог или производное экзендина, известные в уровне техники, могут быть использованы применительно к настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, пептидные аналоги и производные экзендина обладают по меньшей мере одной гормональной активностью природного экзендина. В некоторых вариантах осуществления, пептидные аналоги экзендина являются агонистами рецептора, с которым природный экзендин способен специфически связываться.

Предпочтительные аналоги экзендина включают в себя:

SEQ ID:	
185	¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-экзендин-4
186	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-экзендин-4
187	¹⁴ Leu, ²² Ala, ²⁵ Phe-экзендин-4

5 Как известно в уровне техники, такие аналоги экзендина предпочтительно являются амидированными, но в контексте настоящего изобретения необязательно могут находиться в кислотной форме, если
10 не указано иное.

Дополнительные примеры аналогов и производных экзендина описаны в заявке PCT PCT/US98/16387, поданной 6 августа 1998, под названием
15 «Novel Exendin Agonist Compounds», по которой испрашивается преимущество приоритета по патентной заявке США № 60/055404, поданной 8 августа 1997, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки. Другие аналоги и производные экзендина описаны в
20 заявке PCT/US98/24210, поданной 13 ноября 1998, под названием «Novel Exendin Agonist Compounds», по которой испрашивается преимущество приоритета по предварительной заявке США № 60/065,442 поданной 14 ноября 1997, каждая из которых включена здесь в
25 качестве ссылки. Другие аналоги и производные экзендина описаны в заявке PCT/US98/24273, поданной 13 ноября 1998, под названием «Novel Exendin Agonist Compounds», по которой испрашивается преимущество приоритета по предварительной заявке США № 60/066,029 поданной 14 ноября 1997, каждая из которых включена здесь в
30 качестве ссылки. Другие аналоги и производные экзендина описаны в заявке PCT/US97/14199, поданной 8 августа 1997, под названием «Methods for Regulating Gastrointestinal Activity», которая является частичным продолжением патентной заявки США № 08/694,954 поданной 8 августа 1996, каждая из которых включена в качестве
35 ссылки. Другие аналоги и производные экзендина описаны в заявке PCT/US98/00449, поданной 7 января 1998, под названием «Use of Exendins and Agonists Thereof for the Reduction of Food Intake», по которой испрашивается приоритет по предварительной заявке США №
40
45

60/034,905 поданной 7 января 1997, каждая из которых включена здесь в качестве ссылки. Другие аналоги и производные экзендина описаны в US 2004/0209803 A1, поданной 19 декабря 2003, под названием
5 «Compositions for the Treatment and Prevention of Neuropathy», которая включена здесь в качестве ссылки.

Биологически активные модули пептидных гормонов

10 Как рассматривалось выше, гибридные полипептиды по настоящему изобретению в основном содержат по меньшей мере два биологически активных модуля пептидных гормонов, ковалентно связанных друг с
15 другом. Эти биологически активные модули пептидных гормонов могут представлять собой: (a) природные сложные пептидные гормоны, (b) аналоги или производные природных сложных пептидных гормонов, которые сохраняют гормональную активность, (c) фрагменты природных
20 сложных пептидных гормонов, которые сохраняют гормональную активность, (d) фрагменты аналогов или производных природных сложных пептидных гормонов, которые сохраняют гормональную активность, (e) структурные мотивы природных сложных пептидных
25 гормонов, которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики гибридному полипептиду; или (f)
30 структурные мотивы аналогов или производных природных сложных пептидных гормонов, которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную стабильность, метаболическую
35 стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики гибридному полипептиду. Структурные мотивы (e) и (f) собирательно будут называться здесь «пептидными энхансерами».
40

Предпочтительные биологически активные модули пептидных гормонов включают в себя природные пептидные гормоны, выбранные из: амилина, ADM, CT, CGRP, интермедины, CCK(1-33), CCK-8, лептина, PYY(1-36),
45

РУУ(3-36), GLP-1(1-37), GLP-1(7-37), GLP-1(7-36), GLP-2, ОХМ, экзендина-3 и экзендина-4.

Другие предпочтительные биологически активные модули пептидных гормонов включают в себя аналоги и производные сложных пептидных гормонов, выбранных из: амилина, ADM, СТ, CGRP, интермедина, ССК, лептина, РУУ(1-36), РУУ(3-36), GLP-1(1-37), GLP-1(7-37), GLP-1(7-36), GLP-2, ОХМ, экзендина-3 и экзендина-4, где данный аналог или производное проявляет по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного гормона. Данный аналог может содержать одну или несколько вставок, делеций или замен в аминокислотной последовательности сложного пептидного гормона, а производное может содержать одну или несколько химических модификаций аминокислотного остатка аналога или сложного пептидного гормона, как описано здесь более полно и известно в уровне техники.

Более конкретно, аналоги и производные могут быть выбраны из любых описанных выше и/или известных из уровня техники. Особенно предпочтительными аналогами и производными, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность, используемые в качестве биологически активных модулей пептидных гормонов данного изобретения, включают в себя следующие:

Амилин:	² Ala-h-амилин, ^{2,7} Ala-h-амилин, ²⁸ Pro-h-амилин, ^{25,28} Pro-h-амилин, ^{25,28,29} Pro-h-амилин, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h-амилин, ¹⁸ Arg, ^{25,28} Pro-h-амилин, ¹⁸ Arg, ^{25,28,29} Pro-h-амилин, ²⁵ Pro, ²⁶ Val, ^{28,29} Pro-h-амилин, ¹⁸ Arg, ²³ Leu, ^{25,28,29} Pro-h-амилин, ¹⁸ Arg, ²³ Leu, ^{25,28} Pro-h-амилин и 2,7-Цикло-[² Asp, ⁷ Lys]-h-амилин
СТ:	¹⁴ Gln-sCT, ¹⁸ Arg-sCT, ^{11,18} Arg-sCT, ¹⁴ Gln, ¹⁸ Arg-sCT, ¹⁴ Gln, ^{11,18} Arg-sCT
CGRP:	³⁶ D-Ser-CGRP, ³⁶ D-Thr-CGRP, ³⁶ D-Asp-CGRP, ³⁶ D-Asn-CGRP, ³⁶ Ser-CGRP, ³⁶ Hse-CGRP, ³⁶ Asp-CGRP, ³⁶ Thr-CGRP, ³⁶ Asn-CGRP
AFP-6:	TQAQLLRVGCNLSCTCQVQNLSHRLWQLMGFAGRQDSAPVDPSSPHSY,

		TQAQLLRVGCDTATCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY, TQAQLLRVGMVLGTMQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY, TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVEPSSPHSY, TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQESAPVEPSSPHSY,
5	CCK:	DY(OSO ₃ H)MGWMDF, DYMGWMDF, MGWMDF, GWWMDF, WMDF, KDY(OSO ₃ H)MGWMDF, KDYMGWMDF, KMGWMDF, KGWMDF, KWMDF
10	Лептин:	⁴³ Asp-лептин, ⁴³ Glu-лептин, ⁴⁸ Ala-лептин, ⁴⁹ Glu- лептин, ⁴⁹ Des-AA-лептин, ⁷⁵ Ala-лептин, ⁸⁹ Leu- лептин, ⁹³ Asp-лептин, ⁹³ Glu-лептин, ⁹⁸ Ala-лептин, ¹³⁹ Leu-лептин,
15	PYY:	³ Leu-PYY, ³ Val-PYY, ⁴ Arg-PYY, ⁴ Gln-PYY, ⁴ Asn-PYY, ²⁵ Lys-PYY, ³⁴ Pro-PYY, ³⁴ His-PYY, ^{1,36} Tyr-PYY, ¹³ Pro ¹⁴ Ala-PYY, ³¹ Leu ³⁴ Pro-PYY, des-AA-4-PYY
20	GLP-1	⁹ Gln-GLP-1(7-37), D- ⁹ Gln -GLP-1(7-37), ¹⁶ Thr- ¹⁸ Lys -GLP-1(7-37), ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37), ⁸ Gly-GLP-1 (7- 36), ⁹ Gln-GLP-1 (7-37), D- ⁹ Gln-GLP-1 (7-37), acetyl- ⁹ Lys-GLP-1(7-37), ⁹ Thr-GLP-1(7-37), D- ⁹ Thr- GLP-1 (7-37), ⁹ Asn-GLP-1 (7-37), D- ⁹ Asn-GLP-1 (7- 37), ²² Ser ²³ Arg ²⁴ Arg ²⁶ Gln-GLP-1(7-37), ¹⁶ Thr ¹⁸ Lys- GLP-1(7-37), ¹⁸ Lys-GLP-1(7-37), ²³ Arg-GLP-1(7-37), ²⁴ Arg-GLP-1(7-37)
25	Экзенди н	¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-экзендин-4, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-экзендин-4, ⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-экзендин-4 и ¹⁴ Leu, ²² Ala, ²⁵ Phe- экзендин-4.

30 Как известно в уровне техники, такие пептидные соединения
предпочтительно могут быть амидированы, но в контексте настоящего
изобретения необязательно могут находиться в кислотной форме, если
не указано иное.

35 Другие предпочтительные биологически активные модули пептидных
гормонов включают в себя фрагменты сложных пептидных гормонов,
выбранных из: амилина, ADM, СТ, CGRP, интермедина, ССК, лептина,
PYY(1-36), PYY(3-36), GLP-1(1-37), GLP-1(7-37), GLP-1(7-36), GLP-2,
40 ОХМ, экзендина-3 и экзендина -4, где эти фрагменты проявляют по
меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного
гормона.

45

50

Другие предпочтительные биологически активные модули пептидных гормонов включают в себя фрагменты аналогов или производных сложного пептидного гормона выбранного из: амилина, ADM, СТ, CGRP, интермедина, ССК, лептина, PYY(1-36), PYY(3-36), GLP-1(1-37), GLP-1(7-37), GLP-1(7-36), GLP-2, OXM, экзендина-3 и экзендина-4, где этот фрагмент проявляет по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного гормона. Еще раз, аналог может содержать одну или несколько вставок, делеций или замен в аминокислотной последовательности сложного пептидного гормона, а производное может содержать одну или несколько химических модификаций аминокислотного остатка аналога или сложного пептидного гормона, как описано здесь более полно и известно в уровне техники.

Некоторые предпочтительные фрагменты, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность, включают в себя следующие. Однако, должно быть понятно, что предусматриваются комбинации вышеописанных аналогов и производных, взятых с фрагментами, известными в уровне техники, в том числе предпочтительные фрагменты, описанные ниже.

Амилин:	амилин(1-36), амилин(1-35), амилин(1-20), амилин(1-18), амилин(1-17), амилин(1-16), амилин(1-15), амилин(1-7)
СТ:	СТ(8-32), СТ(8-27), СТ(8-26), СТ(8-10), СТ(18-26), СТ(18-27)
AFP-6:	AFP-6(18-27)
ССК:	ССК-8, ССК-5, ССК-4
Лептин:	лептин(22-167), лептин(56-73)
PYY:	PYY(1-35), PYY(1-30), PYY(1-25), PYY(1-15), PYY(1-10), PYY(2-36), PYY(3-36), PYY(4-36), PYY(5-36)
GLP-1	GLP-1(7-37), GLP-1(7-36), GLP-1(7-35)

Экзендин	экзендин-4(1-27), экзендин-4(1-28), экзендин-4(1-29), экзендин-4(1-30) или более длинные
----------	--

5 Еще раз, как известно в уровне техники, такие пептидные соединения могут быть амидированы, но в контексте настоящего изобретения
10 необязательно могут находиться в кислотной форме, если не указано иное. Далее, вышеуказанные предпочтительные фрагменты могут быть объединены с любым из аналогов или производных, рассмотренных здесь или известных в данной области. Например, предпочтительные
15 фрагменты аналогов могут включать в себя ⁵Ala, ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-28), ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-27), ⁵Ala, ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-28), ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-27) или любые другие комбинации описанных фрагментов, аналогов и производных.

20 Другие предпочтительные биологически активные пептидные модули включают в себя «пептидный энхансер», т.е. структурные мотивы сложных пептидных гормонов (в том числе их аналогов и производных), которые придают желаемую химическую стабильность, конформационную
25 стабильность, метаболическую стабильность, рецепторное взаимодействие, ингибирование протеаз и/или другие фармакокинетические характеристики гибридному полипептиду. Примеры пептидных энхансеров включают в себя следующие. Еще раз, должно
30 быть понятно, что предусматриваются комбинации вышеописанных аналогов и производных, взятых вместе со следующими биологически активными пептидными модулями. Например, последние шесть
35 аминокислотных остатков аналогов и производных пептидных гормонов семейства амилина, известных в данной области и/или описанных выше, также рассматриваются как предпочтительные биологически активные пептидные модули.

--	--

5	Семейство амилина	амилин(32-37), амилин(33-37), амилин(34-37), амилин(35-37), амилин(36-37), амилин(37), ADM(47-52), ADM(48-52), ADM(49-52), ADM(50-52), ADM(51-52), ADM(52), СТ(27-32), СТ(27-32), СТ(28-32), СТ(29-32), СТ(30-32), СТ(31-32), СТ(32), CGRP(32-37), CGRP(33-37), CGRP(34-37), CGRP(35-37), CGRP(36-37), CGRP(37), интермедин (42-47), интермедин (43-47), интермедин (44-47), интермедин (45-47), интермедин (46-47), интермедин (47)
10	РYY	РYY(25-36), РYY(26-36), РYY(27-36), РYY(28-36), РYY(29-36), РYY(30-36), РYY(31-36), РYY(32-36), РYY(25-35), РYY(26-35), РYY(27-35), РYY(28-35), РYY(29-35), РYY(30-35), РYY(31-35), РYY(32-35)
15	GLP-1 и 2	GLP-1(29-37) лягушки; GLP-1(30-37) лягушки; GLP-2(24-31) лягушки, GLP-2(25-31) лягушки
20	Экзендин-4	экзендин-4(31-39), экзендин-4(32-39), экзендин-4(33-39), экзендин-4(34-39), экзендин-4(35-39), экзендин-4(36-39), экзендин-4(37-39), экзендин-4(38-39), экзендин-4(39)

Принципы выбора пептидного модуля, спейсеры и линкерные группы

25 Гибридные полипептиды по настоящему изобретению в основном содержат по меньшей мере два биологически активных модуля пептидных гормонов данного изобретения, где по меньшей мере один из биологически
30 активных модулей пептидных гормонов проявляет по меньшей мере одну гормональную активность. Биологически активный модуль пептидного гормона, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, может быть расположен на N-конце гибридного
35 полипептида, С-конце гибридного полипептида или в случае, если гибридный полипептид содержит более двух биологически активных модулей пептидных гормонов, может быть расположен во внутренней части гибридного полипептида.

40 В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным расположение биологически активного модуля пептидного гормона, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, таким
45

50

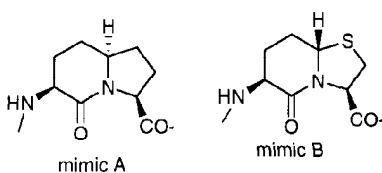
образом, чтобы С-конец биологически активного модуля пептидного гормона был амидирован. Амидирование С-конца биологически активного модуля пептидного гормона можно выполнить, расположив этот модуль на С-конце гибридного полипептида, или введением этого модуля в структуру в направлении от С-конца к N-концу на N-конце гибридного полипептида. В обеих конфигурациях С-конец биологически активного модуля пептидного гормона доступен для амидирования. Отдельные сложные пептидные гормоны, где амидирование С-конца может быть предпочтительным, включают в себя пептидные гормоны семейства амилина, ССК, РУУ, hGLP-1(7-36) и hGLP-2. Отдельные сложные пептидные гормоны, где амидирование С-конца не является обязательно предпочтительным (иначе говоря, где элонгация С-конца модуля является вполне допустимой) включают в себя экзендин-4, экзендин-4(1-28), GLP-1(7-37), GLP-1(7-36) лягушки и GLP-2 лягушки. Однако, если эти сложные пептидные гормоны расположены на С-конце гибридного полипептида, они могут быть необязательно амидированы, и фактически предпочтительно могут быть необязательно амидированы.

Биологически активные модули пептидных гормонов могут быть ковалентно связаны любым способом, известным в уровне техники. Могут быть использованы стабильные связи или легко распадающиеся. В одном варианте осуществления карбоксильная группа первого модуля может быть непосредственно связана с аминогруппой второго модуля. В другом варианте осуществления, для присоединения модулей могут быть использованы линкерные группы. Кроме того, если требуется, могут быть использованы спейсеры или вещества, индуцирующие образование витков спирали, известные в уровне техники, для стабилизации связи. В качестве примера, в тех случаях, когда амидирование С-конца биологически активного модуля пептидного гормона, расположенного на N-конце, не требуется, этот модуль может быть присоединен ко второму модулю напрямую, или с использованием любых подходящих линкерных групп, известных в уровне техники, таких алкил; PEG;

аминокислота, например, Lys, Glu, β -Ala; полиаминокислоты, например, поли-his, поли-arg, поли-lys, поли-ala, Gly-Lys-Arg (GKR) и т.д.; бифункциональный линкер (смотри, например, Pierce catalog, Rockford, Il); аминокaproил ("Aca"), β -аланил, 8-амино-3,6-диоксооктаноил или другие расщепляемые и нерасщепляемые линкеры, известные в уровне техники.

В тех случаях, когда желательно амидирование С-конца биологически активного модуля пептидного гормона, расположенного на N-конце, этот модуль может быть снова присоединен ко второму модулю с использованием любой подходящей линкерной группы, известной в области техники. Более конкретно, при условии, что биологически активному модулю пептидного гормона, проявляющему по меньшей мере одну гормональную активность, была придана конфигурация в направлении от С-конца к N-концу, приводящей в результате к связи аминок-амино, предпочтительные линкерные группы включают в себя дикарбоновые кислоты, алкилы, PEG и аминокислоты, такие как Lys, Cys и Glu.

Как указывалось выше, гибридные полипептиды также предпочтительно могут включать в себя спейсер для дополнительной стабилизации связывания биологически активных модулей пептидных гормонов. Может быть использован любой спейсер или вещество, индуцирующее образование витков, известные в уровне техники. В качестве примера, предпочтительные β -спиральные миметики включают в себя миметик А и миметик В показанные ниже, также дипептиды Ala-Aib и Ala-Pro.



Примеры комбинаций и конкретные варианты осуществления

Примеры комбинаций биологически активных модулей пептидных гормонов для получения гибридных полипептидов по данному изобретению, включают в себя комбинации двух или нескольких биологически
5 активных модулей пептидных гормонов, выбранных из: природных пептидных гормонов, аналогов и производных пептидных гормонов, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность, фрагментов природных пептидных гормонов, которые проявляют по
10 меньшей мере одну гормональную активность, фрагментов аналогов и производных пептидных гормонов, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность, и пептидных энхансеров, при условии, что по меньшей мере один модуль проявляет по меньшей мере одну
15 гормональную активность.

Гибридные полипептиды по данному изобретению будут включать в себя по меньшей мере два биологически активных модуля пептидных
20 гормонов, где каждый модуль состоит из сложных пептидных гормонов. В контексте настоящего изобретения, сложные пептидные гормоны гибридного полипептида могут быть одинаковыми или различными, при
25 условии, что по меньшей мере два сложных пептидных гормона являются различными. В предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере два сложных пептидных гормона происходят из различных семейств пептидных гормонов, например, семейства амилина, ССК, семейства
30 лептина, PPF, семейства проглюкагона и семейства экзендина.

В некоторых вариантах осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению могут содержать два или несколько модулей,
35 которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность. Например, гибридный полипептид может содержать фрагмент первого пептидного гормона или аналога, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, ковалентно связанный с фрагментом по
40 меньшей мере одного дополнительного аналога пептидного гормона. Дополнительный фрагмент(ы) может необязательно проявлять по меньшей мере одну гормональную активность. Первый пептидный гормон может
45

50

быть таким же или отличаться от дополнительного пептидного гормона (гормонов), при условии, что по меньшей мере один из дополнительных пептидных гормонов отличается от первого пептидного гормона, и первая гормональная активность может быть такой же или отличаться от необязательной дополнительной гормональной активности.

В других вариантах осуществления гибридные полипептиды по данному изобретению могут содержать один или несколько модулей, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность в комбинации с одним или несколькими модулями пептидного энхансера. Например, фрагмент первого пептидного гормона, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, может быть ковалентно связан с пептидным энхансером, или фрагмент первого пептидного гормона, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, может быть ковалентно связан со вторым пептидным гормоном, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, который в свою очередь связан с пептидным энхансером. Альтернативно, пептидный энхансер может быть расположен между двумя модулями пептидных гормонов как стабилизирующий спейсер. Еще раз, первый пептидный гормон может быть тем же самым или отличаться от второго пептидного гормона, и первая гормональная активность может быть такой же или отличаться от второй гормональной активности.

В другом варианте осуществления гибридные полипептиды данного изобретения могут содержать два, три, четыре или более биологически активных модулей пептидных гормонов. Примеры комбинаций включают в себя модуль, обладающий гормональной активностью в комбинации с одним, двумя или тремя пептидными энхансерами; два модуля, обладающие гормональной активностью в комбинации с одним или двумя пептидными энхансерами; три модуля, обладающие гормональной активностью в комбинации с одним пептидным энхансером, и т.д.

Сложные пептидные гормоны предпочтительно выбраны из амилина, адrenomедуллина, кальцитонина, пептида, кодируемого геном

кальцитонина, интермедина, холецистокинина, лептина, пептида YY, глюкагон-подобного пептида-1, глюкагон-подобного пептида 2, оксинтомодулина или экзендина-4.

5 Более конкретно, предпочтительные комбинации модулей включают в себя модули, включающие в себя комбинации экзендина, амилина и PYY в качестве сложных пептидных гормонов. Конкретные комбинации
10 включают в себя экзендин-4/PYY и PYY/экзендин-4 комбинации со спейсерами или линкерными группами, или без них. Другие комбинации включают в себя комбинации экзендин/амилин и амилин/экзендин, со спейсерами или линкерными группами, или без них. Другие комбинации
15 включают в себя комбинации амилин/PYY и PYY/амилин, со спейсерами или линкерными группами, или без них.

В одном аспекте, предпочтительные комбинации модулей включают
20 комбинации, которые включают в себя первый модуль, содержащий экзендин-4, фрагмент экзендина-4, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, аналог экзендина-4 или производное, которое проявляет по меньшей мере одну гормональную активность в
25 комбинации по меньшей мере с одним дополнительным биологически активным модулем пептидного гормона. В одном варианте осуществления, первый модуль связан с одним, двумя или тремя
30 дополнительными биологически активными модулями пептидных гормонов.

В предпочтительных вариантах осуществления первый модуль, содержащий пептид экзендина-4, связан со вторым биологически
35 активным модулем пептидного гормона, содержащим пептид амилина, проявляющим по меньшей мере одну гормональную активность. В другом варианте осуществления второй модуль дополнительно связан с третьим биологически активным модулем пептидного гормона, содержащим пептид
40 кальцитонина, проявляющим по меньшей мере одну гормональную активность. Еще в одном варианте осуществления третий модуль может быть дополнительно связан с четвертым биологически активным модулем пептидного гормона, содержащим пептидный энхансер, выбранный из
45

50

пептидов амилина. В одном варианте осуществления, первый модуль может быть расположен на С-конце гибридного полипептида. Альтернативно, первый модуль может быть расположен на N-конце гибридного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, для связывания модулей при необходимости могут быть вставлены спейсеры или линкеры, такие как β Ala.

Предпочтительные пептиды экзендина-4 включают в себя: экзендин-4, экзендин-4(1-27), экзендин-4(1-28), ^{14}Leu , ^{25}Phe -экзендин-4(1-28) и ^5Ala , ^{14}Leu , ^{25}Phe -экзендин-4(1-28). Предпочтительные пептиды амилина, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность, включают в себя амилин, фрагменты амилина, такие как амилин(1-17), амилин (1-16), амилин(1-15) и амилин(1-7) и аналоги амилина, такие как прамлинтид, ^2Ala -h-амилин, $^{2,7}\text{Ala}$ -h-амилин и их фрагменты.

Предпочтительные пептиды кальцитонина, которые проявляют по меньшей мере одну гормональную активность, включают в себя sCT, фрагменты sCT, sCT(8-10), sCT(8-27) и аналоги кальцитонина, такие как ^{18}Arg -sCT, ^{14}Gln , ^{18}Arg -sCT, ^{14}Gln , $^{11,18}\text{Arg}$ -sCT и их фрагменты.

Предпочтительные амилиновые пептидных энхансеры включают в себя амилин(32-37), амилин(33-37) и амилин(34-37), и их аналоги. Комбинации амилин/sCT, используемые применительно к настоящему изобретению, включают в себя комбинации, описанные в заявке PCT/US05/004631, Amylin Family Agonist, номер в реестре патентных поверенных 18528.835, поданной одновременно с настоящей заявкой, которая включена здесь в качестве ссылки.

В одном аспекте, предпочтительные комбинации модулей включают в себя комбинации, включающие первый модуль, содержащий экзендин-4, фрагмент экзендина-4, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное экзендина-4, который проявляет по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога экзендина-4, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность в комбинации с пептидным энхансером. Предпочтительные

соединения экзендина-4 включают в себя: экзендин-4, экзендин-4(1-27), экзендин-4(1-28), ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-28) и ⁵Ala, ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-28). Предпочтительные пептидные энхансеры включают в себя: PYY(25-36), PYY(30-36) и PYY(31-36). В одном варианте осуществления, первый модуль расположен на С-конце гибридного полипептида, а пептидный энхансер расположен на N-конце гибридного полипептида. Альтернативно, первый модуль может быть расположен на N-конце гибридного полипептида, а пептидный энхансер может быть расположен на С-конце гибридного полипептида. В некоторых вариантах осуществления для присоединения модулей при необходимости могут быть вставлены спейсеры или линкеры, такие как βAla.

В другом аспекте, предпочтительные комбинации модулей включают в себя комбинации, включающие первый модуль, содержащий экзендин-4, фрагмент экзендина-4, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное экзендина-4, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога экзендина-4, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность в комбинации со вторым модулем, содержащим ССК, фрагмент ССК, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное ССК, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога ССК, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность. Еще раз, предпочтительные соединения экзендина-4 включают в себя: экзендин-4, экзендин-4(1-27), экзендин-4(1-28), ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-28), ⁵Ala, ¹⁴Leu, ²⁵Phe-экзендин-4(1-28) и ¹⁴Leu-экзендин-4(1-28). Предпочтительные соединения ССК включают в себя: ССК-8 и ССК-8(Phe(CH₂SO₃)). В одном варианте осуществления первый модуль расположен на С-конце гибридного полипептида, а второй модуль расположен на N-конце гибридного полипептида. Альтернативно, первый модуль может быть расположен на N-конце гибридного полипептида, а

пептидный энхансер может быть расположен на С-конце гибридного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, для присоединения модулей при необходимости могут быть вставлены спейсеры или линкеры, такие как β Ala.

В другом аспекте, предпочтительные комбинации модулей включают в себя комбинации, включающие первый модуль, содержащий амилин, фрагмент амилина, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное амилина, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога амилина, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность в комбинации со вторым модулем, содержащим пептидный энхансер, такой как PYY(25-36) или PYY(30-36). В одном варианте осуществления, первый модуль расположен на С-конце гибридного полипептида, а пептидный энхансер расположен на N-конце гибридного полипептида. Альтернативно, первый модуль может быть расположен на N-конце гибридного полипептида, а пептидный энхансер может быть расположен на С-конце гибридного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, для присоединения модулей при необходимости могут быть вставлены спейсеры или линкеры, такие как β Ala.

Другие предпочтительные комбинации модулей включают в себя комбинации, содержащие комбинации экзендина и ССК или амилина, кальцитонина и ССК в виде третичной комбинации. Конкретные комбинации включают в себя экзендин/ССК и ССК/экзендин, со спейсерами или линкерами и линкерными группами, или без них. Другие комбинации включают в себя ССК/амилин/кальцитонин и ССК/амилин/кальцитонин/амилин, со спейсерами или линкерными группами, или без них. Каждый модуль может независимо представлять собой пептидных энхансер или может проявлять гормональную активность, в зависимости от желаемых свойств гибридного полипептида.

Другие предпочтительные комбинации модулей включают в себя те, которые содержат комбинации экзендина, амилина и кальцитонина в виде третичных и тетра-гибридных молекул. Примеры комбинаций включают в себя комбинации экзендин/амилин/кальцитонин; экзендин/амилин/кальцитонин/амилин; амилин/кальцитонин/экзендин; и амилин/кальцитонин/амилин/экзендин, со спейсерами или линкерными группами, или без них. Каждый модуль может независимо представлять собой пептидный энхансер, или может проявлять гормональную активность, в зависимости от желаемых свойств гибридного полипептида.

В одном варианте осуществления, когда один из биологически активных модулей пептидных гормонов, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, представляет собой амилин или его аналог или фрагмент, а второй биологически активный модуль пептидного гормона содержит ССК, тогда этот гибридный полипептид предпочтительно должен содержать третий биологически активный модуль пептидного гормона, выбранный из другого сложного пептидного гормона. Примеры третьего биологически активного модуля пептидных гормонов включают в себя кальцитонины, более предпочтительно, кальцитонин лосося, его аналоги или фрагменты.

В другом варианте осуществления, когда один из биологически активных модулей пептидных гормонов, проявляющий по меньшей мере одну биологическую активность, представляет собой амилин или его аналог или фрагмент, а второй биологически активный модуль пептидных гормонов содержит СТ, то этот гибридный полипептид предпочтительно должен содержать третий биологически активный модуль пептидного гормона, выбранный из другого сложного пептидного гормона. Примеры третьего биологически активного модуля пептидных гормонов включают в себя экзендин-4, его аналоги и фрагменты.

Еще в одном варианте осуществления, когда один из биологически активных модулей пептидных гормонов, проявляющих по меньшей мере

одну биологическую активность, представляет собой GLP-1 или его аналог или фрагмент, а второй биологически активный модуль пептидного гормона представляет собой пептидный энхансер, содержащий фрагмент экзендина, тогда этот гибридный полипептид предпочтительно должен содержать третий биологически активный модуль пептидного гормона. Примеры третьего биологически активного модуля пептидных гормонов включают в себя PYY (в том числе его аналоги, производные и фрагменты) и CCK (в том числе его аналоги, производные и фрагменты).

В каждой из описанных выше предпочтительных комбинаций понятно, что ссылка на сложный пептидный гормон включает в себя ссылку на аналоги, производные, фрагменты, а также относящиеся к ним пептидные энхансеры.

В предпочтительном аспекте, гибридные полипептиды включают в себя:

SEQ ID:	
1	Экзендин-4-PYY(22-36)
2	Экзендин-4-PYY(25-36)
3	Экзендин-4-PYY(18-36)
4	Экзендин-4- β Ala- β Ala-PYY(22-36)
5	Экзендин-4- β Ala- β Ala-PYY(25-36)
6	Экзендин-4- β Ala- β Ala-PYY(31-36)
7	Экзендин-4(1-28)-PYY(22-36)
8	Экзендин-4(1-28)-PYY(25-36)
9	Экзендин-4(1-28)-PYY(18-36)
10	Экзендин-4(1-28)- β Ala- β Ala-PYY(22-36)
11	Экзендин-4(1-28)- β Ala- β Ala-PYY(25-36)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

12	Экзендин-4 (1-28) -βAla-βAla-PYY (31-36)
13	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-28) -PYY (18-36)
14	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-28) -PYY (22-36)
15	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-28) -PYY (25-36)
16	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-17) -PYY (18-36)
17	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-28) -βAla-βAla - PYY (22-36)
18	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-28) -βAla-βAla - PYY (25-36)
19	⁵ Ala, ¹⁴ Leu, ²⁵ Phe-Экзендин-4 (1-28) -βAla-βAla - PYY (31-36)
20	Экзендин-4-ССК-8
21	Экзендин-4 (1-28) -ССК-8
22	Экзендин-4 (1-28) -ССК-8 (Phe (CH ₂ SO ₃))
23	Экзендин-4 (1-28) - (8-амино-3,6-диоксооктаноил) - ССК-8
24	Экзендин-4 (1-28) - (8-амино-3,6-диоксооктаноил) - ССК-8 (Phe (CH ₂ SO ₃))
25	Экзендин-4 (1-27) -hАмилин (1-7) - ¹⁴ Gln, ^{11,18} Arg-sCT (8-27) -Амилин (33-37)
26	Экзендин-4 (1-27) - ^{2,7} Ala-hАмилин (1-7) -sCT (8-10)
27	²⁹ 12 Ado-Экзендин (1-28) -hАмилин (1-7) - ^{11,18} Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
28	²⁹ 12 Ado-Экзендин (1-28) - ¹ дез-Lys-hАмилин (1-7) - ^{11,18} Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
29	²⁹ 3,6-диоксооктаноил-Экзендин (1-28) -hАмилин (1-7) - ^{11,18} Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
30	²⁹ 3,6-диоксооктаноил-Экзендин (1-28) - ¹ дез-Lys-hАмилин (1-7), ^{11,18} Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)

31	$^{29}5$ Ара -Экзендин (1-28) -hАмилин (1-7) - 11,18 Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
32	$^{29}5$ Ара -Экзендин (1-28) - 1 дез-Lys-hАмилин (1-7) - 11,18 Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
33	$^{29}\beta$ Ala- β Ala-Экзендин (1-28) ,hАмилин (1-7) - 11,18 Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
34	$^{29}\beta$ Ala- β Ala-Экзендин (1-28) - 1 дез-Lys-hАмилин (1-7) - 11,18 Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
35	$^{29}4,7,10$ -триокса-13-тридеканаминамисукцинимидил-Экзендин (1-28) -hАмилин (1-7) - 11,18 Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
36	$^{29}4,7,10$ -триокса-13-тридеканаминамисукцинимидил-Экзендин (1-28) - 1 дез-Lys-hАмилин (1-7) - 11,18 Arg-sCt (8-32) -hАмилин (33-37)
37	ССК-8-GKR- 15 Glu-hАмилин (1-17) - 18 Arg-sCt (18-26) -Амилин (32-37)
38	Амилин (1-18) -РYY (19-36)
39	изокапроил-STAVL- (Aib) -К (формил) -LSQEL- (Aib) -К (формил) -LQT-РYY (18-36)
40	изокапроил-STAVL- (Aib) -К (формил) -LSQEL- (Aib) -К (формил) -L-РYY (16-36)
41	ССК-8- [Сукциноил-Cys] -РYY (3-36)
42	ССК-8- [Бис-Cys (N-Ацетил)] -РYY (3-36)
43	ССК-8- [Gly-Аминоксиметилкарбонил] -РYY (3-36)

Гибридные полипептиды по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные модификации, включающие в себя, но не только, замены, делеции и вставки в аминокислотной последовательности таких гибридных полипептидов и любые их комбинации. В предпочтительном аспекте, гибридные полипептиды по данному изобретению включают в себя одну или несколько модификаций «заменяемых» аминокислотных остатков. В контексте данного

изобретения «заменяемым» аминокислотным остатком является остаток, который можно изменить, т.е. удалить или заменить, в природном фрагменте аминокислотной последовательности человека, например, фрагменте сложного пептидного гормона, без прекращения или существенного снижения агонистической активности гибридного полипептида в отношении рецептора сложного пептидного гормона.

Предпочтительные замены включают в себя консервативные аминокислотные замены. «Консервативной аминокислотной заменой» является замена, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим похожую боковую цепь или физикохимические характеристики (например, электростатические, образование водородных связей, изостерические, гидрофобные свойства). Семейства аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи известны в области техники. Эти семейства включают в себя амнокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, метионин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Настоящее изобретение также относится к производным гибридных полипептидов. Такие производные включают в себя гибридные полипептиды, конъюгированные с одной или несколькими молекулами водорастворимого полимера, такого как полиэтиленгликоль («PEG») или цепями жирных кислот различной длины (например, стеарил, пальмитоил, октаноил и т.д.), или полученные добавлением полиаминокислот, таких как поли-his, поли-arg, поли-lys и поли-ala. Модификации гибридных полипептидов также могут включать в себя

заместители, представляющие собой малые молекулы, такие как короткие алкилы и изогнутые алкилы (например, разветвленные, циклические, конденсированные, адамантил), и ароматические группы.
5 Молекулярная масса молекул водорастворимого полимера предпочтительно будет находиться в интервале примерно от 500 примерно до 20000 Дальтон.

10 Такие модификации, представляющие собой конъюгацию с полимером или модификации с использованием заместителя, представляющего собой малую молекулу, могут иметь место особенно на N- или C-концах или боковых цепях аминокислотных остатков в пределах последовательности
15 гибридных полипептидов. Альтернативно, могут существовать многочисленные участки образования производных по всей длине гибридного полипептида. Замены одной или нескольких аминокислот лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой или
20 цистеином могут обеспечить дополнительные участки для образования производных. Смотри, например, патенты США №№ 5824784 и 5824778. Предпочтительно, гибридные полипептиды могут быть конъюгированы с
25 одной, двумя или тремя молекулами полимера.

Молекулы водорастворимых полимеров предпочтительно выстраиваются к
30 amino, карбоксильной или тиольной группе, и могут быть связаны N или C концами, или с боковыми цепями лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина. Альтернативно, молекулы водорастворимых полимеров могут быть связаны с группами диамина и дикарбоксильными группами. В предпочтительном варианте
35 осуществления, гибридные полипептиды данного изобретения конъюгированы с одной, двумя или тремя молекулами PEG через эпислон аминокгруппу лизина.

40 Производные гибридных полипептидов по данному изобретению также включают в себя гибридные полипептиды с химическими изменениями одного или нескольких аминокислотных остатков. Такие химические изменения включают в себя амидирование, гликозилирование,
45

50

ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование и циклизацию. Химические изменения могут иметь место особенно на N- или C-концах или боковых цепях аминокислотных остатков в пределах последовательности RRF гибридных полипептидов. В одном варианте осуществления, C-концы этих пептидов могут иметь свободную -ОН или -NH₂ группу. В другом варианте осуществления N-конец может быть кэпирован изобутилоксикарбонильной группой, н-бутилоксикарбонильной группой, этоксикарбонильной группой, изокапроильной группой (изокап), октанильной группой, октилглициновой группой (G(Oct)) или группой 8-аминооктановой кислоты. В предпочтительном варианте осуществления, циклизацию можно осуществить через образование дисульфидных мостиков. Альтернативно, могут существовать многочисленные участки химических модификаций по всей длине гибридного полипептида.

Примеры гибридных полипептидов по настоящему изобретению представлены в перечне последовательностей и дополнительно рассмотрены в разделе Примеры, приведенном ниже.

Применение гибридных полипептидов в лечении или профилактике метаболических состояний или нарушений

В другом аспекте данное изобретение относится к способам лечения или профилактики ожирения, где способ включает в себя введение терапевтически или профилактически эффективного количества гибридного полипептида пациенту, нуждающемуся в этом. В предпочтительном варианте осуществления пациент страдает ожирением или имеет избыточную массу тела. Хотя «ожирение» главным образом определяется как индекс массы тела свыше 30, в настоящем описании любой пациент, в том числе пациент с индексом массы тела менее 30, который нуждается в снижении массы тела или желает снизить массу тела, включен в объем понятия «страдающий ожирением». Этот способ может быть полезен пациентам, имеющим резистентность к инсулину,

инtolерантность к глюкозе или любую форму сахарного диабета (например, 1, 2 типа или диабет беременных).

5 В других аспектах данное изобретение относится к способам снижения
потребления пищи, доступности питательных веществ, приводящим к
потере массы тела, влияющим на состав тканей тела и изменяющим
энергетический запас организма или повышающим расход энергии, к
10 способам лечения сахарного диабета и улучшения липидного профиля (в
тсм числе снижения уровней LDL холестерина и триглицеридов и/или
изменения уровней HDL холестерина), где данные способы включают в
себя введение пациенту эффективного количества гибридного
15 полипептида по данному изобретению. В предпочтительном варианте
осуществления, способы по данному изобретению применяют для лечения
или профилактики состояний или нарушений, которые могут быть
частично устранены уменьшением доступности питательных веществ для
20 пациента, нуждающегося в этом, указанные способы включают в себя
введение пациенту терапевтически или профилактически эффективного
количества гибридного полипептида по данному изобретению. Такие
состояния и нарушения включают в себя, но не только, гипертензию,
дислипидемию, сердечно-сосудистое заболевание, нарушение пищевого
25 поведения, резистентность к инсулину, ожирение и сахарный диабет
любого типа.

30 Не ограничиваясь теорией, считается, что эффекты гибридных
полипептидов по данному изобретению, введенных периферически,
оказываемые на снижение потребление пищи, задержку опорожнения
35 желудка, снижение доступности питательных веществ и приводящие к
потере массы тела, определены взаимодействиями с одним или более
специфическими рецепторными классами в семействе PP, или сходных с
ними. Более конкретно, по-видимому, вовлекается рецептор или
40 рецепторы, сходные с PYY-предпочитающими (или Y7) рецепторами.

Дополнительные исследования, которые можно применить в данном
изобретении, включают в себя исследования, которые могут определить
45

50

действие PPF соединений на состав тканей тела. Примером исследования может быть исследование, включающее в себя использование мышинной модели алиментарного ожирения (DIO), для

5 метаболического заболевания. До периода лечения самцов мышей C57BL/6J держали на диете с высоким содержанием жира (#D12331, 58% калорий из жиров; Research Diets, Inc.,) в течение 6 недель, начиная с 4-х недельного возраста. В течение исследования мышей

10 продолжали держать на диете с высоким содержанием жира. На протяжении всего периода исследования вода может быть предоставлена без ограничений. Одну группу мышей того же возраста можно держать на диете с низким содержанием жира (#D12329, 11% калорий из жиров)

15 для сравнения метаболических параметров с группами DIO.

DIO мышам можно имплантировать подкожно (SC) в межлопаточное пространство осмотические насосы для доставки либо носителя (50% диметилсульфоксид (DMSO) в воде), либо соединения по изобретению. Насосы в последней группе могут быть установлены для доставки

20 любого количества, например, 1000 мкг/кг/день соединения по изобретению, в течение 7-28 дней.

Массу тела и потребление пищи можно измерять через равные промежутки времени на протяжении периодов исследования. Дыхательный коэффициент (RQ, определяемый как отношение выделенного CO₂ к

30 объему поглощенного O₂) и интенсивность обмена веществ определяли с использованием метода непрямой калориметрии на интактных животных (Oxymax, Columbus Instruments, Columbus, OH). Мышей можно подвергнуть эвтаназии передозировкой изофурана, и измерить индекс ожирения (масса билатерального эпидидимального жира). Кроме того, до определения эпидидимальной массы, можно проанализировать состав

35 тканей массы тела (безжировая масса, жировая масса) каждой мыши используя прибор для двухэнергетической рентгеновской абсорциометрии (DEXA), следуя инструкциям производителя (Lunar Piximus, GE Imaging System). В способах по изобретению

40

предпочтительными PPF полипептидами данного изобретения являются полипептиды, активность которых в одном из описанных здесь исследований (предпочтительно исследованиях потребления пищи, опорожнения желудка, панкреатической секреции, снижения массы тела или исследовании состава тканей тела) превышает активность сложного пептидного гормона в том же самом исследовании.

Помимо улучшения состояния при гипертензии у пациентов, нуждающихся в этом, как результат сниженного потребления пищи, потери массы тела или лечения ожирения, соединения по данному изобретению могут быть использованы для лечения гипотензии.

Соединения по данному изобретению также могут быть использованы для потенцирования, индукции, стимуляции или восстановления восприимчивости к глюкозе в панкреатических островках или клетках.

Эти функции могут быть использованы для лечения или профилактики состояний, связанных с метаболическими нарушениями, такими, которые описаны выше и в патентной заявке США № US20040228846. Исследования на определение такой активности известны в уровне техники. Например, в опубликованной патентной заявке США № US20040228846 (включенной в качестве ссылки в полном объеме), исследования описаны для выделения островков и культивирования, а также определения зрелости островков плода. В примерах патентной заявки US20040228846, пептиды кишечных гормонов, в том числе панкреатический полипептид (PP), нейропептид Y (NPY), нейропептид К (NPK), PYY, секретин, глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) и бомбезин приобретали на фирме Sigma. Коллагеназу XI типа получали на фирме Sigma. Культуральную среду RPMI 1640 и эмбриональную сыворотку теленка получали на фирме Gibco. Набор для радиоиммуноанализа, содержащий антитела к инсулину ($[^{125}\text{I}]$ -RIA kit) приобретали у фирмы Linco, St Louis.

Забор ткани островков поджелудочной железы крыс в послеродовом периоде проводился у крыс в возрасте P-02. Ткань островков поджелудочной железы взрослых крыс получали от 6-8 недельных крыс.

Ткань островков зародышей крыс получали следующим образом. Беременных самок крыс скарифицировали на е21 день беременности. Зародышей удаляли из матки. Из каждого выводка препарировали 10-14
5 поджелудочных желез и дважды промывали в буфере Хенкса. Поджелудочные железы объединяли, суспендировали в 6 мл 1 мг/мл раствора коллагеназы (Тип XI, Sigma) и инкубировали при 37° С в течение 8-10 минут при постоянном встряхивании. Ферментативное
10 расщепление останавливали добавлением 10 объемов ледяного буфера Хенкса с последующим трехкратным промыванием буфером Хенкса. Затем островки очищали на градиенте фиколла и культивировали в 10% эмбриональной сыворотке теленка (FBS)/среда RPMI с добавлением или
15 без добавления 1 мкМ IBMX. По истечению пяти дней, 20 островков отбирали вручную в каждую пробирку и анализировали на статическое высвобождение инсулина. В основном, ткань островков сначала можно
20 промыть KRP буфером, а затем инкубировать с 1 мл KRP буфера, содержащего 3 мМ глюкозы (низкая) в течение 30 минут при 37° С при постоянном встряхивании. После сбора супернатанта ткань островков
25 инкубировали с 17 мМ глюкозы (высокая) в течение одного часа при 37° С. Высвобождение инсулина при низкой и высокой стимуляции глюкозой анализировали методом радиоиммуноанализа (RIA) используя набор «¹²⁵I]-RIA kit». Эмбриональную ткань островков E21
30 культивировали в течение 5 дней в присутствии 200 нг/мл PYY, ZP, CCK, NPK, NPY, секретина, GLP-1 или бомбезина.

Также представлены примеры *in vivo* исследований с использованием
35 самцов крыс с сахарным диабетом и ожирением (Zucker Diabetic Fatty (ZDF)), инбредной (>F30 поколений) модели крыс, у которых спонтанно проявляется диабет у всех fa/fa самцов, содержащихся на стандартной диете грызунов Purina 5008. У ZDF самцов fa-fa, гипергликемия
40 начинает развиваться примерно в возрасте семи недель и уровни глюкозы (кормление) обычно достигают 500 мг/дл к возрасту 10 - 11 недель. Во время развития диабета уровни инсулина (кормление)

являются высокими. Однако, к возрасту 19 недель инсулин падает примерно до уровня инсулина у контрольных худых крыс одного помета. Уровни триглицеридов и холестерина у крыс, страдающих ожирением
5 обычно выше, чем у худых. В этом исследовании три группы ZDF крыс в возрасте 7 недель, по 6 крыс в каждой группе, получали инфузионное лечение с помощью насоса ALZA в течение 14 дней: 1) контрольный
10 носитель, 2) и 3), PYY в двух различных дозах, 100 пмоль/кг/ч и 500 пмоль/кг/ч, соответственно. До инфузии и после инфузии на 7 и 14 день было сделано четыре измерения: 1) уровень глюкозы в плазме, 2) уровень инсулина в плазме и 3) уровень триглицеридов в плазме (TG),
15 а также пероральный тест толерантности к глюкозе (OGTT). Соответственно, эти исследования могут быть использованы с соединениями по данному изобретению для тестирования на желаемую активность.

20 Другие применения, предусмотренные для гибридных полипептидов, включают в себя способы снижения концентраций алюминия (Al) в центральной нервной системе (смотри патент США 6734166, включенный
25 в качестве ссылки в полном объеме) для лечения, профилактики или задержки появления клинических симптомов болезни Альцгеймера. Исследования для определения действия на Al известны в уровне техники и могут быть найдены в патенте США 6734166, в котором
30 используют диплоидных и Ts мышей. Этих мышей содержали по отдельности в обменных или полипропиленовых клетках Nalgene® и давали три дня до эксперимента для адаптации к этим клеткам. Во время эксперимента мыши имели свободный доступ к пище (LabDiet® NIH
35 Rat and Moust/Auto 6F5K52, St. Louis, Mo.) и воде, за исключением 16 часов до эвтаназии, в этот период пища не предоставлялась. Мышам делали ежедневные подкожные инъекции либо активного соединения,
40 либо солевого раствора. По истечению 13 дней мышей скарифицировали для одного эксперимента и 3 дней для другого, и образцы собирали. Образцы головного мозга мышей взвешивали в чистых тефлоновых

плашках и готовили для анализа методом расщепления микроволнами в высокочистой азотной кислоте. Затем анализировали на содержание Al, используя масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (Nuttall et al., *Annals of Clinical and Laboratory Science* 25, 3, 264-271 (1995)). Все ткани, проходившие обработку во время исследования, находились в чистом окружающем пространстве помещения при использовании систем фильтрации воздуха HEPA для минимизации фонового загрязнения.

Соединения по данному изобретению проявляют широкий спектр биологических активностей, которые относятся к их антисекреторным и антисократительным свойствам. Эти соединения могут подавлять гастроинтестинальную секрецию непосредственным взаимодействием с эпителиальными клетками или, возможно, ингибируя секрецию гормонов или нейротрансмиттеров, которые стимулируют интестинальную секрецию. Антисекреторные свойства включают в себя ингибирование желудочной и/или панкреатической секреции и могут быть использованы при лечении или профилактике заболеваний и нарушений, включающих в себя гастрит, панкреатит, пищевод Баретта и гастроэзофагальный рефлюкс.

Соединения данного изобретения применяются при лечении любого количества нарушений желудочно-кишечного тракта (смотри, например, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Inco, New York, 12th Ed.) которые связаны с чрезмерной секрецией электролитов и воды, а также сниженной абсорбцией, например, инфекционная диарея, воспалительная диарея, синдром укороченной тонкой кишки или диарея, которая обычно встречается после хирургических процедур, например, илеостомии. Примеры инфекционной диареи включают в себя без ограничения, острую вирусную диарею, острую бактериальную диарею (например, сальмонеллезную, кампилобактерную и клостридиальную или диарею вследствие протозойных инфекций), или диарею путешественников (например, вирус Норволк или ротавирусы).

Примеры воспалительной диареи включают в себя без ограничения, синдром мальабсорбции, тропическую спру, хронический панкреатит, болезнь Крона, диарею и синдром воспаленного кишечника. Было
5 обнаружено, что пептиды по данному изобретению могут быть использованы для лечения неотложных или опасных для жизни ситуаций, включающих гастроинтестинальное нарушение, например, после
10 хирургического вмешательства или вследствие холеры.

Соединения по данному изобретению также могут быть использованы для лечения или профилактики повреждения кишечника в отличие от простого лечения симптомов, связанных с повреждением кишечника
15 (например, при диареи). Такое повреждение кишечника может представлять собой язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, атрофию кишечника, истончение слизистой кишечника и/или утрату функций слизистой оболочки кишечника, или быть результатом
20 этих процессов (смотри публикацию WO 03/105763, включенную здесь в качестве ссылки в полном объеме). Исследования такой активности, как описано в WO 03/105763, включают самцов крыс HSD в возрасте 11
25 недель, массой 250-300 грамм, содержащихся при 12:12 часовом светотемновом цикле, имеющих свободный доступ к стандартному рациону питания грызунов (Teklad LM 485, Madison, WI) и воде. Животные голодали в течение 24 часов до эксперимента. Простая и
30 воспроизводимая крысиная модель хронического воспаления толстого кишечника ранее была описана Morris GP, et al., "Napten- induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon." Gastroenterology. 1989; 96:795-803. Она демонстрирует сравнительно
35 длительный период воспаления и изъязвления, дающий возможность изучить патофизиологию воспалительного заболевания толстого кишечника специально контролируемым образом, и оценить новые
40 способы лечения, потенциально применимые при лечении воспалительного заболевания кишечника у людей.

Крыс анестезировали 3% изофлуораном и размещали на подстилке с регулируемым нагреванием при 37°C. Иглу зонда вставляли ректально на 7 см. Гаптен тринитробензолсульфоновую кислоту (TNBS), растворенную в 50% этаноле (об/об) доставляли в просвет толстой кишки через иглу зонда в дозе 30 мг/кг, в общем объеме 0,4-0,6 мл, как описано у Mazelin, et al., *Juton Nerv Syst.* 1998;73:38 45. Контрольные группы получали физиологический раствор (NaCl 0,9%) внутрикшечно.

Через четыре дня после индукции колита, у анестезированных крыс проводили резекцию толстой кишки, которых затем подвергали эвтаназии путем декапитации. Измеряли массу удаленной кишки и селезенки, и кишку фотографировали для определения объема морфологического повреждения в баллах. Воспаление определяли как области гиперемии и утолщение стенки кишки.

Гибридные полипептиды данного изобретения также могут быть использованы для лечения или профилактики опухолей поджелудочной железы (например, ингибирования пролиферации опухолей поджелудочной железы). Способы по данному изобретению включают в себя снижение пролиферации опухолевых клеток. Типы доброкачественных опухолей поджелудочной железы, которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя серозные цистаденомы, микрокистозные опухоли и кистозно-солидные опухоли. Этот способ также эффективен при уменьшении пролиферации клеток злокачественных опухолей поджелудочной железы, таких как карциномы, возникающие из протоков, ацинусов или островков поджелудочной железы. В патенте США 5574010 (включен в качестве ссылки в полном объеме) представлены примеры исследований для тестирования на антипролиферативные свойства. Например, в патенте '010 указано, что PANC-1 и MiaPaCa-2 представляют собой две линии злокачественных клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека, которые коммерчески доступны от таких поставщиков, как Американская

коллекция типовых культур, ATCC (Rockville, Md.). Две линии
опухолевых клеток выращивали в культуральной среде RPMI-1640,
дополненной 10% эмбриональной сывороткой теленка, 29,2 мг/л
5 глутамина, 25 мкг гентамицина, 5 мл пенициллина, стрептомицином и
раствором фунгизона (JRH Biosciences, Lenexa, Kans.) при 37
градусах Цельсия в 5 % CO₂ инкубаторе с водяной рубашкой NAPCO. Все
10 клеточные линии разъединяли с использованием 0,25 % трипсина
(Clonetics, San Diego, Calif.) от одного до двух раз в неделю,
когда достигается слившийся монослой опухолевых клеток. Клетки
осаждали в течение 7 минут при 500 g в охлаждаемой центрифуге при 4
15 градусах Цельсия, и ресуспендировали в обогащенной культуральной
среде RPMI 1640, свободной от трипсина. Жизнеспособные клетки
подсчитывали в микроскопических препаратах с трипановым синим в
гемоцитометре.

20 Десять тысяч, 20000, 40000 и 80000 клеток каждого типа добавляли в
96 луночные планшеты для микрокультур (Costar, Cambridge, Mass.) в
общем объеме культуральной среды 200 мкл на лунку. До добавления
25 РУУ или тестируемого пептида клетки оставляли для адгезии на 24
часа. До добавления пептидов культуральную среду заменяли свежей.
In vitro инкубирование опухолевых клеток поджелудочной железы либо
с РУУ, либо с тестируемым соединением продолжали в течение 6 часов
30 и 36 часов. К клеткам добавляли РУУ в дозах 250 пмоль, 25 пмоль и
2,5 пмоль на лунку (N =14). Тестируемое соединение добавляли к
клеточным культурам в дозах 400 пмоль, 40 пмоль и 4 пмоль на лунку.
35 Контрольные лунки получали 2 мкл 0,9% солевой раствор для имитации
объема и физического повреждения после адгезии опухолевых клеток.
Каждый 96 луночный планшет содержал 18 контрольных лунок для
возможности провести сравнение в каждом планшете во время
40 проведения эксперимента. Девяносто шести (96) луночные планшеты
дублировали 6 раз с различными концентрациями РУУ и тестируемого
соединения как с PANC-1, так и с MiaPaCa-2 клетками.

По истечении периода инкубации, 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-
дифенилтетразолия бромид, MTr тетразолия бромид (Sigma, St. Louis,
Mo.) добавляли к свежей культуральной среде в количестве 0,5 мг/мл.
5 Культуральную среду заменяли, и опухолевые клетки инкубировали в
течение 4 часов с МТТ тетразолия бромидом при 37°C. По истечению
инкубации, культуральную среду аспирировали. Кристаллический осадок
10 формазона растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (Sigma, St.
Louis, Mo.). Количественную оценку растворенного формазона
проводили путем получения показаний поглощения при длине волны 500
нм на ELISA ридере (Molecular Devices, Menlo Park, Calif.). МТТ
15 анализ определяет митохондриальную НАДН-зависимую дегидрогеназную
активность, этот анализ находился среди наиболее чувствительных и
надежных способов количественного определения *in vitro* ответа
опухолевых клеток на химиотерапию. (Alley, M. C., et al., *Cancer*
20 *Res.*, 48:589-601, 1988; Carmichael, J., et al., *Cancer Res.*,
47:936-942, 1987; McNale, A. P., et al., *Cancer Lett.*, 41:315-321,
1988; и Saxton, R. E., et al., *J. Clin. Laser Med. and Surg.*,
25 10(5):331-336, 1992.) Анализ показаний поглощения при 550 нм
проводили группированием лунок одних и тех же тестируемых
соединений и установлением различий между контрольными обработками
и обработками различными концентрациями пептидов, используя
30 однофакторный анализ ANOVA.

Также представлены примеры исследования *in vivo*. Изучали
ингибирование роста аденокарциномы протока поджелудочной железы
35 человека Mia PaCa-2 *in vivo* под действием пептида YY и тестируемого
соединения. От семидесяти тысяч до 100,000 Mia PaCa-2 клеток
человека ортотопически трансплантировали 48 самцам бестимусных
40 мышей. Через одну неделю, животных подвергали воздействию либо РYY,
либо тестируемого соединения в количестве 200 пмоль/кг/ч через
миниосмотические насосы в течение четырех недель. Парные культуры
получали физиологический раствор. При умерщвлении подопытных
45

животных измеряли массу и размер опухоли. У контрольных мышей в поджелудочной железе наблюдали значительный рост злокачественной опухоли человека, доказанный гистологическими срезами. Через 9
5 недель у девяноста процентов (90%) контрольных мышей наблюдали значительное метастазирование. Масса опухоли была снижена на 60,5 % у мышей под воздействием тестируемого соединения и на 27% у мышей под воздействием PYY.

Для всех показаний в предпочтительных вариантах осуществления, гибридный полипептид по данному изобретению вводят периферически в дозе примерно от 0,5 мкг примерно до 5 мг в сутки в однократной или
15 дробных дозах или в виде контролируемого непрерывного высвобождения, или примерно от 0,01 мг/кг примерно до 500 мкг/кг на дозу, более предпочтительно примерно от 0,05 мкг/кг примерно до 250 мкг/кг, наиболее предпочтительно примерно менее 50 мкг/кг. Дозы в
20 этих интервалах будут варьировать в зависимости от активности каждого аналога или производного, разумеется, и могут быть определены специалистом в данной области.

В способах по настоящему изобретению гибридные полипептиды данного изобретения можно вводить отдельно или вместе с одним или несколькими другими соединениями, которые демонстрируют длительное
30 или кратковременное действие по снижению доступности питательных веществ, включая, но не ограничиваясь другими соединениями и композициями, содержащими амилин или агонист аналога амилин, кальцитонин лосося, холецистокинин (ССК) или агонист ССК, лептин
35 (ОВ белок) или агонист лептина, экзендин или агонист аналога экзендина, или GLP-1 или агонист аналога GLP-1. Подходящие агонисты амилина включают в себя, например, [^{25,28,29}Pro-]амилин человека (также известный как «прамлинтид» и описанный в патентах США №№
40 5686511 и 5998367). Используемый ССК предпочтительно представляет собой ССК октапептид (ССК-8). Лептин рассматривается например в (Pelleymounter et al., Science 269: 540-3 (1995); Halaas et al.,
45

Science 269: 543-6 (1995); Campfield et al., Science 269: 546-9 (1995)). Подходящие экзендины включают в себя экзендин-3 и экзендин-4, а соединения агонистов экзендина включают в себя
5 например те, которые описаны в публикациях РСТ WO 99/07404, WO 99/25727 и WO 99/25728.

Получение и очистка полипептидов

10 Описанные здесь гибридные полипептиды могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методик или методик химического пептидного синтеза, известных в уровне техники, например, с использованием автоматизированного или
15 полуавтоматизированного пептидного синтезатора, или и того, и другого.

Гибридные полипептиды по данному изобретению могут быть синтезированы в растворе или на твердой подложке в соответствии с общепринятыми методиками. Различные автоматические синтезаторы коммерчески доступны и могут быть использованы в соответствии с
20 известными протоколами. Смотри, например, Stewart и Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.* 105: 6442 (1983); Merrifield, *Science* 232: 341-7 (1986); и Barany и Merrifield, *The Peptides*, Gross и Meienhofer, eds., Academic Press, New York, 1-284 (1979).
30 Твердофазный пептидный синтез можно проводить с помощью автоматического синтезатора пептидов (например, Model 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, California) с использованием системы NMP/HOBt (Option 1) и tBoc или Fmoc химии (смотри, Applied Biosystems User's Manual for the ABI 430A Peptide Synthesizer, Version 1.3B July 1, 1988, section 6, pp. 49-70, Applied
35 Biosystems, Inc., Foster City, California) с кэппированием. Пептиды могут быть собраны с помощью синтезатора Advanced Chem Tech Synthesizer (Model MPS 350, Louisville, Kentucky Пептиды могут быть очищены с помощью RP-HPLC (препаративной и аналитической)
40
45

используя, например, систему Waters Delta Prep 3000 и препаративную колонку C4, C8 или C18 (10 μ , 2,2x25 см; Vydac, Hesperia, California). Активный пептид может быть легко синтезирован, а затем
5 подвергнут скринингу в скрининговых анализах, предназначенных для идентификации реакционноспособных пептидов.

Гибридные полипептиды по настоящему изобретению альтернативно могут
10 быть получены с помощью рекомбинантных технологий, хорошо известных в данной области. См. например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor (1989). Эти гибридные полипептиды, полученные с помощью рекомбинантных
15 технологий могут быть экспрессированы из полинуклеотида. Специалисту в данной области будет понятно, что полинуклеотиды, в том числе ДНК и РНК, которые кодируют такие различные фрагменты гибридных полипептидов могут быть получены из кДНК дикого типа,
20 принимая во внимание вырожденность генетического кода, или могут быть сконструированы по желанию. Эти полинуклеотидные последовательности могут включать в себя кодоны, облегчающие транскрипцию и трансляцию мРНК в микробных хозяевах. Такие
25 производящие последовательности могут быть легко сконструированы в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. См. например, WO 83/04053. Указанные выше полинуклеотиды также могут необязательно кодировать N-концевой остаток метионина. Непептидные соединения, используемые в настоящем изобретении, могут
30 быть получены способами, известными в уровне техники. Например, фосфат-содержащие аминокислоты и пептиды, содержащие такие аминокислоты, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области. См. например, Bartlett и Landen, *Bioorg. Chem.* 14: 356-77 (1986).
40

Разнообразные экспрессионные системы вектор/хозяин могут быть использованы для включения и экспрессии кодирующей
45 последовательности гибридного полипептида. Эти системы включают в

себя, но не только, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным бактериофагом, плазмидой или космидой, ДНК экспрессирующими векторами; дрожжевые клетки, трансформированные дрожжевыми векторами экспрессии; системы клеток насекомых, инфицированных вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирус); системы клеток растений, трансфектированных вирусными векторами экспрессии (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированных бактериальными векторами экспрессии (например, Ti или pBR322 плазида); или системы клеток животных. Клетки млекопитающих, которые используют в получении рекомбинантных белковых продуктов, включают в себя, но не только клетки VERO, клетки HeLa, клеточные линии овоцитов китайского хомячка (CHO), клетки COS (такие как COS-7), клетки WI 38, ВНК, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 и 293. Примеры протоколов для рекомбинантной экспрессии белка описаны здесь ниже.

Таким образом, полинуклеотидные последовательности, предлагаемые данным изобретением используют при получении новых и пригодных плазмидных ДНК векторов, новых и пригодных трансформированных и трансфектированных прокариотических и эукариотических клеток-хозяев (в том числе бактериальных клеток, клеток дрожжей и млекопитающих, выращенных в культуре), и новых и эффективных способов для выращивания в культуре таких клеток-хозяев, способных экспрессировать гибридные полипептиды по настоящему изобретению. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие гибридные полипептиды, здесь также могут быть использованы для генной терапии в тех случаях, когда недостаточная продукция сложного пептидного гормона (гормонов) химерного организма была бы частично устранена, или была бы необходимость в их повышенных уровнях.

Настоящее изобретение также относится к способам для рекомбинантной ДНК продукции гибридных полипептидов по настоящему изобретению.

Предложен способ получения гибридных полипептидов из клетки-хозяина, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гибридные полипептиды, включающий в себя: (а) культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие такие гибридные полипептиды в условиях, облегчающих экспрессию такой молекулы ДНК; и (b) получение таких гибридных полипептидов.

Клетки-хозяева могут быть прокариотическими или эукариотическими и включать в себя клетки бактерий, млекопитающих (такие как овоциты китайского хомячка (CHO), клетки обезьян, клетки почек детенышей хомяка, злокачественные клетки или другие клетки), клетки дрожжей и клетки насекомых.

Системы клеток-хозяев млекопитающих для экспрессии рекомбинантного белка также хорошо известны специалистам в данной области. Штаммы клеток-хозяев могут быть выбраны по специфической способности процессировать экспрессированный белок или производить определенные пост-трансляционные модификации, которые будут использоваться для обеспечения активности белка. Такие модификации полипептида включают в себя, но не только, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацетилирование. Пост-трансляционный процессинг, который расщепляет «препро» форму белка, также может иметь большое значение для правильной вставки, укладки и/или функции. Различные клетки-хозяева, такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, и подобные, имеют специфический клеточный аппарат и характерные механизмы для таких пост-трансляционных функций, и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга введенного чужеродного белка.

Альтернативно, дрожжевая система может быть использована для получения гибридных полипептидов данного изобретения. Кодирующая область ДНК, кодирующей гибридный полипептид, амплифицируют с помощью ПЦР. ДНК, кодирующая пре-про-альфа-лидерную последовательность дрожжей амплифицируют из геномной ДНК дрожжей в

рекации ПЦР с использованием одного праймера, содержащего нуклеотиды 1-20 «альфа-фактора спаривания» гена и другого праймера, комплементарного нуклеотидам 255-235 этого гена (Kurjan и Herskowitz, *Cell*, 30: 933-43 (1982)). Пре-про-альфа-лидерная кодирующая последовательность и фрагменты кодирующей последовательности гибридного полипептида лигируют в плазмиду, содержащую алкогольдегидрогеназный (ADH2) промотор дрожжей, так, что данный промотор направляет экспрессию слитого белка, состоящего из пре-про-альфа фактора, слитого со зрелым гибридным полипептидом. По данным Rose и Broach, *Meth. Enz.* 185: 234-79, Goeddel ed., Academic Press, Inc., San Diego, California (1990), данный вектор дополнительно включает в себя ADH2 терминатор транскрипции ниже клонирующего сайта, «2-микронную» область начала репликации у дрожжей, leu-2d ген дрожжей, гены REP1 и REP2 дрожжей, ген β -лактамазы *E. coli*, и репликатор *E. coli*. β -лактамазный и leu-2d гены обеспечивают селекцию в бактериях и дрожжах, соответственно. Ген leu-2d также обеспечивает повышенное число копий плазмиды в дрожжах для индукции более высоких уровней экспрессии. Гены REP1 и REP2 кодируют белки, участвующие в регуляции числа копий плазмиды.

ДНК конструкцию, описанную в предыдущем абзаце, трансформируют в дрожжевые клетки, используя известный способ, например, обработку ацетатом лития (Steams et al., *Meth. Enz.* 185: 280-97 (1990)). ADH2 промотор индуцируется при истощении глюкозы в ростовой среде (Price et al., *Gene* 55: 287 (1987)). Пре-про-альфа последовательность влияет на секрецию слитого белка из клеток. Параллельно, дрожжевой белок KEX2 отщепляет пре-про последовательность от зрелых полипептидов, аналогичных PYY (Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5330-4 (1984)).

Гибридные полипептиды по данному изобретению также могут быть рекомбинантно экспрессированы в дрожжах с использованием коммерчески доступной экспрессионной системы, например, *Pichia*

Expression System (Invitrogen, San Diego, California), в соответствии с инструкциями производителя. Эта система также основывается на пре-про-альфа последовательности для направления секрети, но транскрипцию вставки направляет алкоголь оксидазный (AOX1) промотор при индукции метанолом. Секретированный гибридный полипептид очищают от ростовой среды дрожжей, например, способами, используемыми для очистки гибридного полипептида от супернатантов бактериальных клеток или клеток млекопитающих.

Альтернативно, кДНК, кодирующая гибридные полипептиды, может быть клонирована в бакуловирусный вектор экспрессии pVL1393 (PharMingen, San Diego, California). Этот вектор, содержащий гибридный полипептид затем используют в соответствии с указаниями производителя (PharMingen) для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda* в среде, не содержащей белок SF9, и для получения рекомбинантного белка. Этот белок очищают и концентрируют из среды с использованием колонки гепарин-Сефароза (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) и колонок для последовательного распределения молекул по размеру (Amicon, Beverly, Massachusetts), и ресуспендируют в PBS. SDS-PAGE анализ показывает одну полосу и подтверждает размер белка, и секвенирование методом Эдмана на пептидном секвенаторе Proton 2090 Peptide Sequencer подтверждает его N-концевую последовательность.

Например, ДНК последовательность, кодирующая гибридный полипептид, может быть клонирована в плазмиду, содержащую желаемый промотор и, необязательно, лидерную последовательность (смотри, например, Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)). Последовательность этой конструкции может быть установлена с помощью автоматизированного секвенирования. Эту плазмиду затем трансформируют в *E. coli*, штамм MC1061, используя стандартные методики с применением CaCl_2 инкубации и обработки бактерий методом теплового шока (Sambrook et al., *supra*). Трансформированные бактерии выращивают в среде LB,

дополненной карбенициллином, и продукцию экспрессируемого белка индуцируют выращиванием в подходящей среде. При наличии лидерной последовательности она будет влиять на секрецию гибридного полипептида, и расщепляться во время секреции. Секретированный рекомбинантный белок очищают от бактериальной культуральной среды способом, описанным ниже.

Альтернативно, гибридные полипептиды по настоящему изобретению могут быть экспрессированы в инсекционной системе. Инсекционные системы для экспрессии белка хорошо известны специалистам в данной области. В одной такой системе, вирус ядерного полиэдрома совки калифорнийской люцерновой (*Autographa californica*) (AcNPV) используют в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов в клетках *Spodoptera frugiperda* или в *Trichoplusia larvae*. Кодирующую последовательность гибридного полипептида клонируют в неосновную область вируса, такую как ген полигедрина, и помещают под контроль полигедринового промотора. Успешная вставка гибридного полипептида переведет ген полигедрина в неактивное состояние и будет продуцироваться рекомбинантный вирус лишенный белковой оболочки. Рекомбинантные вирусы затем используют для заражения клеток *S. frugiperda* или *Trichoplusia larvae* в которых экспрессируется гибридный полипептид (Smith et al., J. Virol. 46: 584 (1983); Engelhard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-7 (1994)).

В другом примере последовательность ДНК, кодирующая гибридный полипептид, может быть амплифицирована с помощью ПЦР и клонирована в соответствующий вектор, например, pGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Вектор pGEX предназначен для получения слитого белка, содержащего глутатион-S-трансферазу (GST), кодируемого этим вектором, и белка, кодируемого фрагментом ДНК, вставленным в клонирующий сайт вектора. Праймеры для ПЦР могут быть получены для включения, например, соответствующего сайта расщепления. Рекомбинантный слитый белок затем может быть отщеплен от GST части

слитого белка. Полипептидную конструкцию pGEX-3X/аналог РУУ трансформируют в *E. coli* XL-1 Blue cells (Stratagene, La Jolla, California), и выделяют отдельные трансформированные клетки и
5 выращивают при 37°C в среде LB (дополненной карбенициллином) до оптической плотности 0,4 при длине волны 600 нм, с последующей дополнительной инкубацией в течение 4 часов в присутствии 0,5 мМ
10 изопропил β -D-тиогалактопиранозид (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Плазмидную ДНК из отдельных трансформированных клеток очищали и частично секвенировали с использованием автоматизированного секвенатора для подтверждения наличия вставки
15 желаемого гена, кодирующего РРФ гибридный полипептид, в соответствующей ориентации.

Ожидается, что слитый белок, продуцируемый в виде нерастворимого
20 внутриклеточного тельца в бактерии, может быть очищен следующим образом. Клетки собирают центрифугированием; промывают в 0,15 М NaCl, 10 мМ Tris, pH 8, 1 мМ EDTA; и обрабатывают лизоцимом 0,1 мг/мл (Sigma Chemical Co.) в течение 15 мин при комнатной
25 температуре. Лизат освобождают от взвешенных частиц с помощью ультразвука, и клеточный дебрис осаждают центрифугированием в течение 10 мин при 12000 x g. Осадок, содержащий слитый белок
30 ресуспендируют в 50 мМ Tris, pH 8, и 10 мМ EDTA, наложенной на 50% глицерин, и центрифугируют в течение 30 мин при 6000 x g. Осадок ресуспендируют в стандартном фосфатном буферном растворе (PBS), свободном от ионов Mg^{++} и Ca^{++} . Слитый белок дополнительно очищают
35 фракционированием ресуспендированного осадка в денатурирующем SDS полиакриламидном геле (Sambrook et al., supra). Этот гель пропитывают погружением в 0,4 М KCl для визуализации белка, который вырезают и электроэлюируют в гель-разделяющем буфере без SDS. В том
40 случае, если слитый белок GST/полипептид аналога РУУ получают в бактериях в виде растворимого белка, его можно очистить с использованием GST Purification Module (Pharmacia Biotech).

Слитый белок можно подвергнуть ферментации для отщепления GST от PPF гибридного полипептида. Реакционную смесь для ферментации (20-40 мкг слитого белка, 20-30 единиц тромбина человека (4000 Ед/мг (Sigma) в 0,5 мл PBS) инкубируют 16-48 часов при комнатной температуре и загружают на денатурирующий SDS-PAGE гель для фракционирования продуктов реакции. Гель пропитывают погружением в 0,4 М KCl для визуализации белковых полос. Идентичность белковой полосы соответствующей ожидаемой молекулярной массе гибридного полипептида может быть подтверждена анализом части аминокислотной последовательности с использованием автоматизированного секвенсера (Applied Biosystems Model 473A, Foster City, California).

В особенно предпочтительном способе рекомбинантной экспрессии гибридных полипептидов настоящего изобретения, клетки 293 могут быть ко-трансфектированы плазмидами, содержащими кДНК гибридного полипептида, в вектор pCMV (5' CMV промотор, 3' NGN поли A последовательность) и pSV2neo (содержащий ген резистентности neo) с помощью кальций фосфатного метода. Предпочтительно, векторы должны быть линейаризованы ScaI до трансфекции. Подобным образом, может быть использована альтернативная конструкция, использующая похожий вектор pCMV с включенным в него геном neo. Стабильные клеточные линии выбирают из единичных клеточных клонов методом предельных разведений в ростовой среде, содержащей 0,5 мг/мл G418 (антибиотик, подобный неомицину) в течение 10-14 дней. Клеточные линии подвергают скринингу на экспрессию гибридного полипептида с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или Вестерн блота, и высоко экспрессирующие клеточные линии наращивают для выращивания в большом масштабе.

Предпочтительно, чтобы трансформированные клетки использовались в течение длительного времени, желателен высокий выход получаемого белка и по существу стабильная экспрессия. После трансформации таких клеток векторами, содержащими селективируемые маркеры наряду с

подходящей экспрессионной кассетой, клетки могут расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде до их переноса на селективную среду. Селектируемый маркер предназначен для придания резистентности при селекции, и его присутствие позволяет выращивать и восстанавливать клетки, которые успешно экспрессируют вставленные последовательности. Резистентные кластеры стабильно трансформированных клеток могут быть размножены с использованием технологий тканевых культур, соответствующих данной клетке.

Ряд селекционных систем может быть использовано для восстановления клеток, трансформированных для получения рекомбинантного белка. Такие селекционные системы включают в себя, но не только, гены HSV тимидинкиназы, гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы и аденин фосфорибозилтрансферазы, в tk-, hgppt- или appt- клетках, соответственно. Также, анти-метаболическая резистентность может быть использована как основа для отбора dhfr, придающего резистентность к метотрексату; gpt, придающего резистентность к микофеноловой кислоте; neo, который придает резистентность к аминогликозиду, G418; также, который придает резистентность к хлорсульфону; и hygro, который придает резистентность к гидромицину. Дополнительные селектируемые гены, которые могут быть использованы, включают в себя trpB, который дает возможность клеткам использовать индол вместо триптофана, или hisD, который дает возможность клеткам использовать гистинол вместо гистидина. Маркеры, которые дают визуальную индикацию для идентификации трансформированных клеток, включают в себя антоцианины, β -глюкуронидазу и ее субстрат, GUS, и люциферазу и ее субстрат, люциферин.

Многие гибридные полипептиды настоящего изобретения могут быть получены с использованием комбинации и автоматического пептидного синтеза, и рекомбинантных технологий. Например, гибридный полипептид настоящего изобретения может содержать комбинацию модификаций, включающих в себя делецию, замену и вставку с помощью

ПЭГилирования. Такой гибридный полипептид может быть получен
постадийно. На первой стадии, промежуточный полипептид, содержащий
модификации делеции, замены, вставки и любой их комбинации, может
5 быть получен с помощью описанных рекомбинантных технологий. Затем,
после необязательной стадии очистки, описанной ниже, промежуточный
полипептид ПЭГилируют посредством химической модификации
10 соответствующим ПЭГилирующим реактивом (например, от Nectar
Transforming Therapeutics, San Carlos, California) с получением на
выходе желаемого гибридного полипептида. Специалисту в данной
области будет понятно, что вышеописанная процедура может быть
15 обобщена применительно к гибриднему полипептиду, содержащему
комбинацию модификаций, выбранных из делеции, замены, вставки,
получения производных и других способов модификации, хорошо
известных в уровне техники и рассматриваемых настоящим
20 изобретением.

Может быть целесообразным очистить гибридные полипептиды,
полученные в соответствии с настоящим изобретением. Методики
25 очистки белка хорошо известны специалистам в данной области. Эти
методики включают в себя, на одном уровне, предварительное
фракционирование клеточной среды на полипептидные и неполипептидные
30 фракции. Отделив полипептид от других белков, полипептид,
представляющий интерес, может быть дополнительно очищен с
использованием хроматографических и электрофоретических методов для
достижения частичной или полной очистки (или очистки до
35 гомогенности). Аналитическими методами, особенно подходящими для
получения чистого пептида, являются ион-обменная хроматография,
гель-проникающая хроматография, электрофорез в полиакриламидном
геле и изоэлектрофокусирование. Особенно эффективным методом
40 очистки белков является ВЭЖХ с обращенной фазой, с последующим
определением свойств очищенного продукта с помощью жидкостной
хроматографии/масс спектрометрии (LC/MS) и лазерной десорбции-

ионизации в присутствии матрицы (MALDI) масс спектрометрии. Дополнительное подтверждение чистоты получают с помощью анализа определения аминокислот.

5 Некоторые аспекты настоящего изобретения касаются очистки и, в конкретных вариантах осуществления, существенной очистки, кодируемого белка или пептида. Используемое здесь выражение
10 "очищенный пептид" относится к композиции, которую можно отделить от других компонентов, где пептид очищен до любой степени, сравнимой с его природным состоянием. Очищенный пептид, следовательно, также относится к пептиду, свободному от окружающей
15 среды, в которой он встречается в природе.

В основном, «очищенный» будет относиться к пептидной композиции, которая была подвергнута фракционированию для удаления различных
20 других компонентов, и которая по существу сохраняет свою выраженную биологическую активность. В тех случаях, когда используется термин «по существу очищенный», это определение будет относиться к композиции, в которой пептидные формы являются основным компонентом
25 композиции, как, например, содержащей около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95% или более пептидов в композиции.

30 Различные методики, подходящие для использования при очистке белка будут хорошо известны специалистам в данной области. Эти методики включают в себя, например, преципитацию сульфатом аммония, ПЭГ, антителами и подобным; тепловую денатурацию с последующим
35 центрифугированием; хроматографические стадии, такие как ионный обмен, гель фильтрация, обращенная фаза, гидроксипатитная и аффинная хроматография; изоэлектрофокусирование; гель-электрофорез;
40 и комбинацию этих и других методов. Как общеизвестно в уровне техники, считается, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен, или что некоторые стадии могут быть опущены, и,

тем не менее, в результате может быть получен подходящий способ получения по существу очищенного белка или пептида.

5 Не существует общего требования, чтобы пептиды всегда находились в наиболее очищенной форме. Действительно, предусматривается, что
10 значительно менее очищенные продукты будут иметь ценность в некоторых вариантах осуществления. Частичная очистка может быть выполнена использованием меньшего количества стадий очистки в комбинации, или использованием различных форм одной и той же общей
15 схемы очистки. Например, принимается во внимание, что катион-обменная колоночная хроматография выполненная с использованием аппарата ВЭЖХ в основном приведет в результате к большей «-кратности» очистки, чем та же самая методика, использующая хроматографическую систему низкого давления. Способы,
20 демонстрирующие низкую степень относительной очистки могут иметь преимущества в суммарном извлечении белкового продукта, или в сохранении активности экспрессированного белка.

25 Специалист может необязательно очистить и выделить такие гибридные полипептиды из других компонентов, полученных в этом процессе. Способы очистки полипептида можно найти в патенте США № 5849883. Эти документы описывают приведенные в качестве примера
30 специфические способы для выделения и очистки G-CSF композиций, которые могут использоваться при выделении и очистке гибридных полипептидов по данному изобретению. Давая описания этих патентов, является очевидным то, что специалист в данной области хорошо
35 осведомлен о многочисленных методах очистки, которые могут быть использованы для очистки гибридных полипептидов из данного источника.

40 Также предполагается, что комбинация анион-обменной и иммунно-аффинной хроматографии может быть использована для получения очищенных композиций гибридных полипептидов настоящего изобретения.
45

50

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим терапевтически или профилактически эффективное количество по меньшей мере одного гибридного полипептида по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемой соли вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, солюбилизаторами, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями, используемыми при доставке гибридных полипептидов. Такие композиции могут включать разбавители с различным буфером (например, Трис-HCl, ацетатный, фосфатный), pH и ионной силой; добавки, такие как поверхностно-активные вещества и солюбилизаторы (например, Tween 80, Polysorbate 80), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метабисульфит натрия), консерванты (например, тимерсол, бензиловый спирт) и наполнители (например, лактоза, маннитол); материалы включения в конкретные препараты полимерных соединений, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и т.д., или в ассоциацию с липосомами. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* гибридных полипептидов настоящего изобретения. Смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences 1435-712, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1990).

В основном гибридные полипептиды настоящего изобретения будут использоваться так же, как и индивидуальные полипептиды, принимая во внимание их фармакологические свойства. Одним предпочтительным применением является периферическое введение таких гибридных полипептидов для лечения или профилактики метаболических состояний и нарушений. В частности, соединения по настоящему изобретению обладают активностью как агенты для снижения усвоения питательных веществ, уменьшения потребления пищи и потери массы тела. В другом осуществлении изобретения предпочтительным применением является

назначение таких гибридных полипептидов для лечения диабета или связанных с диабетом состояний и нарушений. Гибридные полипептиды настоящего изобретения могут быть изготовлены для периферического введения, включая составы для инъекций, перорального введения, назального введения, пульмонального введения, местного введения или других видов введения, известных специалистам в данной области. Более конкретно, введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению может осуществляться любым обычным путем, пока целевая ткань доступна через этот путь. В предпочтительном варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции можно вводить пациенту любым общепринятым периферическим способом, например, внутривенным, внутрикожным, внутримышечным, внутрь молочной железы, интраперитонеальным, интратекальным, ретробульбарным, внутрилегочным; пероральным, сублингвальным, назальным, анальным, вагинальным или чрескожным путем введения, или посредством хирургической имплантации в конкретное место. Лечение может состоять из единичной дозы или множественных доз на протяжении периода времени. Также рассматривается контролируемое непрерывное высвобождение композиций по настоящему изобретению.

Фармацевтические составы могут быть жидкими или могут быть твердыми, например, лиофилизированными для восстановления. Водные композиции по настоящему изобретению содержат эффективное количество гибридных полипептидов, растворенных или диспергированных в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде. Фраза «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относится к молекулярным образованиям и композициям, которые не дают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Используемый здесь «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя любой и все растворители, дисперсионную среду, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию

агенты и тому подобное. Применение такой среды и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. Исключение составляет любая обычная несовместимая с активным ингредиентом среда или агент, использование которого предполагается в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в данные композиции. В некоторых случаях, будет уместно приготовить гибридный полипептид по данному изобретению и другой агент, уменьшающий потребление пищи, снижающий уровень глюкозы в плазме или изменяющий уровень липидов в плазме, такой как амилин, аналог агониста амилина, ССК или агонист ССК, или лептин или агонист лептина, или экзендин или аналог агониста экзендина, или РУУ или аналог РУУ, в одной композиции или растворе для совместного введения. В других случаях, более предпочтительным может быть введение дополнительного агента отдельно от гибридного полипептида. Гибридный полипептид по данному изобретению может быть приготовлен для введения в виде растворов свободного основания или фармакологически приемлемых солей в воде, соответствующим образом смешанные с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя кислотные аддитивные соли (образованные свободными аминокгруппами белка), которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и тому подобное. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, могут быть также получены из неорганических оснований, таких как например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триэтиламин, гистидин, прокаин и тому подобное. Такие продукты легко получить обычными, хорошо известными специалисту в данной области методами. Могут быть также приготовлены дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях и в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти

препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

В одном варианте осуществления, фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают таким образом, чтобы они подходили для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии. Предпочтительно гибридный полипептид суспендируют в водном носителе, например, в изотоническом буферном растворе при pH примерно от 3,0 примерно до 8,0, предпочтительно при pH примерно от 3,5 примерно до 7,4, от 3,5 до 6,0 или от 3,5 примерно до 5,0. Подходящие буферы включают натрий цитрат-лимоннокислый и натрий фосфат-фосфорнокислый и натрий ацетат-уксуснокислый буферы. Резервуарная форма или «депо» препарата с медленным высвобождением может быть использована так, что фармацевтически эффективные количества препарата доставляются в кровоток на протяжении многих часов или дней после чрескожной инъекции или доставки.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях данная форма должна быть стерильной и текучей для легкого набора в шприц. Также желательно для гибридного полипептида по данному изобретению, чтобы она была стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, сорбит, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и подобные), их подходящие смеси растительные масла. Нужную текучесть можно установить, например, используя покрытия, такие как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Защиту от действия микроорганизмов

можно осуществить, используя различные антибактериальные и противогрибковые агенты, например, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту, тимерозал и тому подобное. Во многих случаях может быть предпочтительным включать изотонические агенты (например, сахара или хлорид натрия). Длительную абсорбцию инъецируемых композиций можно осуществить использованием в данных композициях агентов, задерживающих абсорбцию (например, моностеарат алюминия и желатина).

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены включением активных соединений в нужном количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при необходимости, с последующей фильтрационной стерилизацией. В основном, дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами получения являются методы вакуумной сушки и сушки вымораживанием, с получением порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

В основном, терапевтически или профилактически эффективное количество гибридных полипептидов по настоящему изобретению будет определяться возрастом, массой тела и состоянием или тяжестью заболеваний, состояний и нарушений у пациента. Смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences 697-773. See also Wang and Hanson, Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers, Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42:2S (1988). Обычно, может быть использована доза примерно от 0,001 мкг/кг массы тела в сутки примерно до 1000 мкг/кг массы тела в сутки, но может быть

использована большая или меньшая доза на усмотрение лечащего врача. Дозирование может быть один или несколько раз в день или реже, и может быть в сочетании с другими композициями, как здесь описано.
5 Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается указанными здесь дозами.

Соответствующие дозировки можно определить путем использования
10 установленных методов анализа для определения уровня метаболических состояний или нарушений совместно с соответствующими данными доза-ответ. Конечный режим дозирования будет определяться лечащим врачом с учетом факторов, которые модифицируют действие лекарственных
15 средств, например, специфической активности лекарственного средства, тяжести поражения и чувствительности пациента, возраста, состояния, массы тела, пола и режима питания пациента, тяжести
20 какой-либо инфекции, времени введения и других клинических факторов. Дополнительная информация относительно соответствующих уровней доз и продолжительности лечения для отдельных заболеваний и состояний будет выяснена после проведения исследований.

Эффективная доза обычно находится в диапазоне примерно от 1 до 30
25 мкг примерно до 5 мг/день, предпочтительно примерно от 10 до 30 мкг примерно до 2 мг/день и более предпочтительно примерно от 5 до 100
30 мкг примерно до 1 мг/день, наиболее предпочтительно примерно от 5 мкг примерно до 500 мкг/день, введенная в единичной дозе или дробных дозах. Предпочтительно дозировки могут составлять примерно от 0,01 примерно до 500 мкг/дозу. Точную вводимую дозу может
35 определить специалист в данной области, и она зависит от активности конкретного соединения, а также от возраста, массы тела и состояния конкретного человека. Ведение следует начинать всякий раз,
40 например, когда нужно ослабить усвоение питательных веществ, уменьшить потребление пищи, снизить массу тела, уровень глюкозы в крови или липидов в плазме, например, при первых признаках симптомов или вскоре после диагностирования ожирения, сахарного

диабета или синдрома резистентности к инсулину. Введение можно осуществлять любым путем, например, инъекционно, предпочтительно, подкожно или внутримышечно, перорально, назально, чрескожно и т.д.

5 Дозировки для конкретных путей введения, например, перорального введения, могут быть увеличены с учетом желаемой биодоступности, например, примерно в 5-100 раз.

10 В одном варианте осуществления изобретения, где фармацевтические композиции вводят парентерально, композицию составляют таким образом, чтобы доставляемая доза гибридного полипептида находилась в интервале от 1 мкг/кг до 100 мг/кг массы тела в день,

15 предпочтительно, в интервале доз от 0,1 мкг/кг примерно до 50 мг/кг массы тела в день. Парентеральное введение можно проводить сначала болюсно с последующей инфузией для поддержания терапевтических циркулирующих уровней лекарственного продукта. Специалисты в данной

20 области могут легко установить оптимальные эффективные дозировки и режимы введения, определяемые хорошей медицинской практикой и клиническим состоянием конкретного пациента.

25 Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров действующих веществ и путей введения. Оптимальный фармацевтический состав будет определяться специалистом в данной области в зависимости от пути введения и необходимой дозировки.

30 Смотри, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*, страницы 1435-1712. Такие составы могут оказывать влияние на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* введенных действующих веществ. В зависимости от пути введения, подходящие дозы могут быть рассчитаны в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размера

40 органа. Дальнейшая обработка расчетов, необходимая для определения соответствующей лечебной дозы, обычно проводится специалистом в данной области без проведения дополнительных экспериментов, особенно в свете описанной информации по дозам и методам анализа, а

также фармакокинетических данных, наблюдаемых в испытаниях на животных и в клинических испытаниях на людях.

5 Ясно, что фармацевтические композиции и способы лечения по данному изобретению могут использоваться в области медицины и ветеринарии. Таким образом, пациентом, которому проводят лечение, может быть млекопитающее, предпочтительно, человек или другое животное. В
10 ветеринарии пациенты включают в себя, например, сельскохозяйственных животных, в том числе, коров, овец, свиней, лошадей и коз, домашних животных, таких как собаки и кошки, экзотических животных и/или животных зоопарка, лабораторных
15 животных, в том числе, мышей, крыс, кроликов, морских свинок и хомячков; и домашнюю птицу, например, цыплят, индеек, уток и гусей.

Кроме того, настоящее изобретение рассматривает набор, включающий
20 гибридный полипептид настоящего изобретения, компоненты, пригодные для приготовления гибридного полипептида по настоящему изобретению для фармацевтического применения, и инструкцию для использования указанного гибридного полипептида и компонентов для
25 фармацевтического применения.

Для облегчения понимания настоящего изобретения приведены следующие примеры. Очевидно, что связанные с изобретением эксперименты не
30 следует рассматривать, как ограничивающие настоящее изобретение, и такие варианты изобретения, как известные сейчас или разработанные позже, которые будут в сфере компетенции специалиста в данной области, считаются подпадающими под объем данного изобретения, как
35 описано здесь и заявлено далее.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение более подробно раскрыто на следующих
40 неограничивающих примерах, которые приведены для более полной иллюстрации изобретения, но которые не следует понимать как ограничивающие его объем. Примеры иллюстрируют получение гибридных полипептидов по настоящему изобретению и тестирование этих
45

50

гибридных полипептидов по изобретению *in vitro* и/или *in vivo*.
Специалистам в данной области техники понятно, что методики,
описанные в этих примерах, представляют собой методики, описанные
5 авторами изобретения как высокоэффективные для осуществления
изобретения и как таковые представляющие собой предпочтительные
варианты его выполнения. Однако, следует понимать, что специалисты
10 в данной области должны учитывать относительно настоящего описания,
что в конкретных описанных методах может быть сделано множество
изменений и при этом получен подобный или сходный результат без
уклонения от сущности и объема изобретения.

15 Пример 1. Получение гибридных полипептидов

Пептиды по изобретению могут быть синтезированы с помощью
пептидного синтезатора Symphony (Protein Technologies, Inc.) с
использованием амидной смолы Ринка (Novabiochem) с нагрузкой 0,43-
20 0,49 ммоль/г при 0,050-0,100 ммоль или предварительно нагруженной
смолы Ванга (Fmoc-Tyr(tBu)-смола Ванга) 0,63 ммоль/г (Novabiochem).
Остатки Fmoc-аминокислот (5,0 экв., 0,250-0,500 ммоль) растворяли в
25 концентрации 0,10 М в 1-метил-2-пирролидиноне. Все остальные
реагенты (HBTU, гидрат 1-гидроксibenзотриазола и N,N-
диизопропилэтиламин) приготавливали в виде 0,55 М
диметилформаидных растворов. Fmoc-защищенные аминокислоты затем
30 связывали со сшитой со смолой аминокислотой, применяя HBTU (2,0
экв., 0,100-0,200 ммоль), гидрат 1-гидроксibenзотриазола (1,8 экв.,
0,090-0,18 ммоль), N,N-диизопропилэтиламин (2,4 экв., 0,120-0,240
ммоль) в течение 2 часов. После присоединения последней
35 аминокислоты с пептида удаляли защитную группу с помощью 20% (об.)
пиперидина в диметилформамиде в течение 1 часа. После завершения
синтеза пептидной последовательности пептидный синтезатор Symphony
40 программировали на отщепление смолы. Отщепление пептида со смолы с
помощью трифторуксусной кислоты (TFA) проводили с использованием
93% TFA, 3% фенола, 3% воды и 1% триизопропилсилана в течение 1
45 часа. Отщепленный пептид преципитировали с помощью трет-

бутилметилового эфира, осаждали путем центрифугирования и
лиофилизировали. Осадок повторно растворяли в воде (10-15 мл),
фильтровали и очищали по методу обращенно-фазовой ВЭЖХ с
5 использованием колонки C18 и градиента ацетонитрила/воды,
содержащей 0.1% TFA.

Общая методика N-эпирования пептидов по изобретению жирными
10 кислотами (например, октановой или стеариновой кислотой) такова:
Пептид на амидной смоле Ринка (0,1 ммоль) суспендировали в NMP (5
мл). В отдельной пробирке HBTU (0,3 ммоль), HOBT (0,3 ммоль)
растворяли в DMF (5 мл) с последующим добавлением DIEA (0,6 ммоль).
15 Этот раствор добавляли к смоле и эту суспензию встряхивали в
течение 2 ч. Растворитель фильтровали и тщательно промывали NMP (5
мл × 4) и CH₂Cl₂ (20 мл), сушили и подвергали отщеплению TFA в
течение 1 ч. Выход желаемого пептида составлял приблизительно 40 мг
20 после отщепления и очистки.

ПЭГ-модифицирование может быть проведено в растворе по свободной
эпсилон-аминогруппе лизина или концевой аминогруппе очищенного
25 пептида с помощью коммерчески доступных активированных сложных
эфиров ПЭГ. Полученные конъюгированные с ПЭГ производные очищают до
однородности по методу обращенно-фазовой ВЭЖХ, а чистоту
подтверждали по методу LC/MS и MALDI-MS.

Некоторые показательные гибридные полипептиды по изобретению
30 приведены ниже в таблице 1-1. Были предсказаны различные
модификации синтезированных соединений, такие как химические
модификации, такие как гликозилирование, ПЭГ-модификации и т.д.;
35 аминокислотные модификации, такие как замены, инсерции и делеции и
т.д.. Кроме того, даже несмотря на то, что они изображены
амидированными по С-концу, следует понимать, что гибридные
40 полипептиды по изобретению могут альтернативно находиться в виде
свободной кислоты.

Таблица 1-1: Некоторые показательные гибридные соединения по изобретению

SEQ ID:	
1	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
2	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
3	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
4	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-βAla-βAla-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
5	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-βAla-βAla-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
6	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-βAla-βAla-VTRQRY-NH ₂
7	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKN-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
8	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKN-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
9	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKN-NRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
10	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
11	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
12	HGEGTFTSDLSKQMEEEAAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-VTRQRY-NH ₂

13	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNNRYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
14	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
15	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNRHYLNLVTRQRY-NH ₂
16	HGEGFTSDLSKQLEEEENRYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
17	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-βAla-βAla-ASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
18	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-βAla-βAla-RHYLNLVTRQRY-NH ₂
19	HGEGFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN-βAla-βAla-VTRQRY-NH ₂
20	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGPSSGAPPS-DY(SO ₃)MGWMDF-NH ₂
21	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-DY(SO ₃)MGWMDF-NH ₂
22	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-DY(SO ₃)MGWMDF-NH ₂
23	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-[8-амино-3,6-диоксаоктаноил]-DY(SO ₃)MGWMDF-NH ₂
24	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-[8-амино-3,6-диоксаоктаноил]-DF(CH ₂ SO ₃)MGWMDF-NH ₂
25	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNCNTATCVLGRLSQELHRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂
26	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNCNTATAVLG-NH ₂
27	HGEGFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-12-Ado-KCNTATCVLGRHLRLQTYPRNTGSNTY-NH ₂

28	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-12-Ado-CNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
29	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-3,6-диоксаоктаноил-KCNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
30	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-3,6-диоксаоктаноил-CNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
31	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-5-Apa-KCNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
32	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-5-Apa-CNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
33	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-KCNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
34	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-βAla-βAla-CNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
35	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-4,7,10-триокса-13-тридеканаминосукцинимидил-KCNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
36	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN-4,7,10-триокса-13-тридеканаминосукцинимидил-CNTATCVLGRHLRLQTYPRTNTGSNTY-NH ₂
37	DF(CH ₂ SO ₃)MGWMDf-GKR-KCNTATCATQRLANELVRLQTYPRTNVGSNTY-NH ₂
38	KCNTATCATQRLANFLVR-RYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
39	изокапроил-STAVL-(Aib)-K(формил)-LSQEL-(Aib)-K(формил)-LQT-NRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂
40	изокапроил-STAVL-(Aib)-K(формил)-LSQEL-(Aib)-K(формил)-L-ELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY-NH ₂

41	
42	
43	

Пример 2. Анализы связывания

Гибридные полипептиды по изобретению могут быть исследованы в ходе множества анализов рецепторного связывания в соответствии с методиками анализов связывания, широко известных специалистам в данной области техники. Такие анализы включают в себя анализы, описанные ниже.

Анализ связывания амилина: Оценка связывания некоторых показательных соединений по изобретению с рецепторами амилина может быть проведена на мембранах из nucleus accumbens головного мозга крыс следующим образом. Самцов крыс Sprague-Dawley® (200-250 грамм) забивали путем декапитации. Головной мозг выделяли и помещали в холодный фосфатно-буферный раствор (PBS). На вентральной поверхности выполняли надрезы роstralнее гипоталамуса в латеральных пределах, образованных зрительными путями и продолжающихся под углом 45° кнутри от этих путей. Эти ткани базальной части переднего мозга, содержащие nucleus accumbens и прилегающие области, взвешивали и гомогенизировали на льду в 20 мМ буфере HEPES (20 мМ кислота HEPES, значение pH приведено к 7,4 NaOH при 23°C). Мембраны трижды промывали свежим буфером путем центрифугирования в течение 15 минут при 48000 x g. Полученный мембранный осадок ресуспендировали в 20 мМ буфере HEPES, содержащем 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF).

Для измерения связывания ¹²⁵I-амилина (см., Beaumont K et al. Can J Physiol Pharmacol. 1995 Jul; 73(7):1025-9) мембраны из 4 мг исходного сырого вещества ткани инкубировали с ¹²⁵I-амилином в концентрации 12-16 пМ в 20 мМ буфере HEPES, содержащем 0,5 мг/мл бацитрацина, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0,2 мМ PMSF. Растворы инкубировали в течение 60 минут при 2°C. Инкубацию прекращали путем фильтрования через стекловолоконные фильтры GF/B (Whatman Inc., Clifton, N.J.), предварительно замоченные на 4 часа

в 0,3% полиэтиленимине для ослабления неспецифического связывания радиоактивно меченых пептидов. Фильтры непосредственно перед фильтрованием промывали 5 мл холодного PBS, а немедленно после
5 фильтрования 15 мл холодного PBS. Фильтры удаляли, а радиоактивность измеряли с помощью гамма-счетчика с эффективностью регистрации 77%. Конкурентные кривые строили на основе измерения
10 связывания в присутствии 10^{-12} - 10^{-6} М немеченого исследуемого соединения и анализировали методом нелинейной регрессии, используя 4-параметрическое логистическое уравнение (программа Inplot; GraphPAD Software, San Diego).

Анализ связывания с рецепторами CGRP: Оценку связывания соединений по изобретению с рецепторами CGRP проводили по существу так же, как описано для связывания амилина за исключением использования
20 мембран, полученных из клеток SK-N-MC, подтвержденно экспрессирующих рецепторы CGRP (Muff, R. et.al., Ann NY Acad. Sci. 1992: 657, 106-16). Анализы связывания проводили, как описано для
25 связывания амилина за исключением использования 13500 имп./мин ^{125}I -hCGRP на лунку или 21,7 пМ на лунку (Amersham).

Анализ связывания аденомедуллина: Исследование связывания с рецептором аденомедуллина может быть проведено на HUVEC,
30 содержащих рецептор аденомедуллина (Kato J et.al., Eur J Pharmacol. 1995, 289:383-5), в соответствии с анализом на циклический АМФ AlphaScreen™ производства Perkin Elmer с
35 использованием оптимума 25-30000 клеток на лунку. Повышение содержания цАМФ в HUVEC по сравнению с таковым в клетках CHO не велико. Клетки CHO как таковые могут быть по желанию выбраны в качестве отрицательного контроля, поскольку они не экспрессируют
40 рецептор аденомедуллина.

Анализ связывания с рецептором кальцитонина: Исследование связывания с рецептором кальцитонина может быть проведено на
45

клетках CHO или на клетках T47D, которые также экспрессируют рецептор кальцитонина (Muff R. *et.al*, *Ann N Y Acad Sci*. 1992, 657:106-16 и Kuestner R.E. *et. al*. *Mol Pharmacol*. 1994, 46:246-55),
5 что известно в данной области техники.

Анализ связывания лептина: Для оценки связывания и активации рецептора лептина традиционно используются два *in vitro*
10 биологических анализа (см., например, White, *et al.*, 1997. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 10657-10662). Для измерения ингибирования связывания лептина в отсутствие и в присутствии рекомбинантного мышинного лептина (положительный контроль) или пептида клетками COS-7, трансфицированными длинноцепочечной (передающей сигнал) формой мышинного рецептора OB ("OB-RL"), может
15 быть использован гибридный белок щелочная фосфатаза ("AP") – лептин ("OB"). Анализы передачи сигнала могут быть выполнены на клетках GT1-7, совместно трансфицированных репортерной конструкцией AP и конструкцией OB-RL. Активность секретированной щелочной фосфатазы ("SEAP") в ответ на стимулирование мышинным лептином или пептидом
20 может быть измерен по хемилюминесценции.

Анализ связывания с рецептором Y1: Мембраны получают из сплошных культур клеток SK-N-MC, эндогенно экспрессирующих рецепторы
30 нейропептида Y1. Мембраны инкубировали с 60 пМ человеческого [¹²⁵I]-пептида YY (2200 Ки/ммоль, Perkin Elmer Life Sciences) и с немеченым полипептидом PPF в течение 60 минут при температуре окружающей среды на 96-луночном полистирольном планшете. Затем
35 содержимое лунок собирали на 96-луночный стекловолоконный планшет с помощью планшетного харвестера Perkin Elmer. Высушенные стекловолоконные планшеты объединяли со сцинтиллятором и регистрировали на сцинтилляционном счетчике Perkin Elmer.
40

Анализ связывания с рецептором Y2: Мембраны получают из сплошных культур клеток SK-N-BE, эндогенно экспрессирующих рецепторы
45

нейропептида Y2. Мембраны инкубировали с 30 пМ человеческого [125 I]-пептида YY (2200 Ки/ммоль, Perkin Elmer Life Sciences) и с немеченым полипептидом PPF в течение 60 минут при температуре окружающей среды на 96-луночном полистирольном планшете. Затем содержимое лунок собирали на 96-луночный стекловолоконный планшет с помощью планшетного харвестера Perkin Elmer. Высушенные стекловолоконные планшеты объединяли со сцинтиллятором и регистрировали на сцинтилляционном счетчике Perkin Elmer.

Анализ связывания с рецептором Y4: Клетки CHO-K1 подвергали временной трансфекции кДНК, содержащей ген нейропептида Y4, и затем через сорок восемь часов из сплошных клеточных культур получали мембраны. Мембраны инкубировали с 18 пМ человеческого [125 I]-панкреатического полипептида (2200 Ки/ммоль, Perkin Elmer Life Sciences) и с немеченым полипептидом PPF в течение 60 минут при температуре окружающей среды на 96-луночном полистирольном планшете. Затем содержимое лунок собирали на 96-луночный стекловолоконный планшет с помощью планшетного харвестера Perkin Elmer. Высушенные стекловолоконные планшеты объединяли со сцинтиллятором и регистрировали на сцинтилляционном счетчике Perkin Elmer.

Анализ связывания с рецептором Y5: Клетки CHO-K1 подвергали временной трансфекции кДНК, содержащей ген нейропептида Y5, и затем через сорок восемь часов из сплошных клеточных культур получали мембраны. Мембраны инкубировали с 44 пМ человеческого [125 I]-пептида YY (2200 Ки/ммоль, Perkin Elmer Life Sciences) и с немеченым полипептидом PPF в течение 60 минут при температуре окружающей среды на 96-луночном полистирольном планшете. Затем содержимое лунок собирали на 96-луночный стекловолоконный планшет с помощью планшетного харвестера Perkin Elmer. Высушенные стекловолоконные планшеты объединяли со сцинтиллятором и регистрировали на сцинтилляционном счетчике Perkin Elmer.

Анализ связывания с рецептором GLP-1: Активность и аффинность связывания с рецептором GLP-1 могут быть измерены с помощью анализа замещающего связывания, в котором источником рецептора являются мембраны клеток RINm5F, а лиганд представляет собой [¹²⁵I]GLP-1. Гомогенизированные мембраны клеток RINm5F инкубировали в 20 мМ буфере HEPES с 40000 имп./мин маркера [¹²⁵I]GLP-1 и различными концентрациями исследуемого соединения в течение 2 часов при 23°C при постоянном перемешивании. Реакционные смеси фильтровали через стеклянные фильтры, предварительно замоченные в 0,3% растворе PEI и промывали ледяным фосфатно-буферным раствором. Связанную радиоактивность измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика. Значения аффинности связывания рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Пример 3: Анализ потребления мышами пищи

Гибридные полипептиды по изобретению могут быть протестированы на предмет подавления аппетита в ходе анализа потребления мышами пищи и на предмет их воздействия на прирост массы тела у мышей с вызванным диетой ожирением (DIO). Экспериментальные методики скринингов описаны ниже.

Самок мышей NIH/Swiss (в возрасте 8-24 недель) содержали группами при цикле свет:темнота 12:12 часов с включением света в 06.00. Воду и стандартный гранулированный корм для мышей предоставляли ad libitum, если иное не оговорено особо. Животных лишали пищи приблизительно за 15.00 часов, 1 день до эксперимента. Утром в день проведения эксперимента животных разделяют на экспериментальные группы. В типичном исследовании n = 4 клетки с 3 мышами в каждой клетке.

Во временной точке = 0 мин всем животным проводили внутрибрюшинную инъекцию носителя или соединения в количестве, варьирующем

приблизительно от 10 нмоль/кг до 75 нмоль/кг и немедленно давали предварительно отвешенное количество (10-15 г) стандартного корма. Пищу убирали и взвешивали через 30, 60 и 120 мин для определения количества потребленной пищи (Morley, Flood et al., *Am. J. Physiol.* 267: R178-R184, 1994). Потребление пищи рассчитывали путем вычитания массы оставшейся пищи, например, во временной точке 30, 60, 120, 180 и/или 240 минут, из массы исходно предоставленной пищи во временной точке = 0. Существенные эффекты лечения определяли с помощью ANOVA ($p < 0,05$). При обнаружении существенного различия средние значения исследуемых веществ сравнивали со средним значением контроля с помощью теста Даннета (Prism v. 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, California).

Пример 4: Прирост массы тела у ожиревших мышей C57Bl/6 (с вызванным диетой ожирением, или DIO)

Самцы мышей C57BL/6 (в возрасте 4 недель на начало исследования) получали корм с высоким содержанием жира (HF, 58% калорийности диеты за счет жира) или с низким содержанием жира (LF, 11% калорийности диеты за счет жира). Через 4 недели питания кормом каждой мыши имплантировали осмотический насос (Alzet # 2002), который подкожно непрерывно доставлял предварительно определенную дозу гибридного полипептида в течение двух недель. Массу тела и потребление пищи измеряли еженедельно (Surwit et al., *Metabolism—Clinical and Experimental*, 44: 645-51, 1995). Эффекты исследуемого соединения выражали как среднее \pm ср.-кв. откл. % изменения массы тела (т.е. % отличия от исходной массы), по меньшей мере, 14 мышей в группе, получавшей лечение ($p < 0,05$ ANOVA, тест Даннета, Prism v. 2.01, GraphPad Software Inc., San Diego, California).

Гибриды экзендин/PYY:

Показательные гибридные полипептиды по изобретению синтезировали с использованием укороченных по С-концу экзендинов (например, экзендина-4(1-28) или $^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4(1-28)) и

укороченных по N-концу PYY, содержащих области от 18-36 до 31-36. Как таковые показательные гибридные полипептиды, как правило, содержат два домена, причем первый домен представляет собой фрагмент аналога экзендина-4, а второй домен представляет собой пептидный энхансер, выбранный из укороченных вариантов PYY. Для сравнения в несколько вариантов между пептидными составными блоками также встраивали β -аланиновые дипептидные спейсеры (см. таблицу 4-1).

Таблица 4-1: Гибриды экзендин/PYY и их эффекты в анализе поглощения пищи

Description	Поглощение мышами пищи % от исходного			
	30 мин	60 мин	120 мин	Доза
$^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4 (1-17) - PYY (18-36)	-4	-11	-10	10 нмоль / кг
$^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4 (1-28) - PYY (22-36)	21	9	-4	10 нмоль / кг
$^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4 (1-28) - βAla - βAla -PYY (22-36)	-3	-5	-22	10 нмоль / кг
$^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4 (1-28) - PYY (25-36)	8	-13	-30	10 нмоль / кг
$^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4 (1-28) - βAla - βAla -PYY (25-36)	-9	-25	-42	10 нмоль / кг
$^5\text{Ala}, ^{14}\text{Leu}, ^{25}\text{Phe}$ -экзендин-4 (1-28) - βAla - βAla -PYY (31-36)	-14	-36	-52	10 нмоль / кг
экзендин-4 (1-28) - PYY (25-36)	-30	-37	-45	10 нмоль / кг
экзендин-4 (1-28) - βAla - βAla -PYY (25-36)	-24	-40	-52	10 нмоль / кг
экзендин-4 (1-28) - βAla - βAla -PYY (31-36)	-49	-56	-61	10 нмоль / кг

Как показано в таблице 4-1, некоторые показательные соединения по изобретению проявляли эффективность в анализе поглощения пищи. Некоторые пептиды также тестировали при 75 нмоль/кг в анализе DIO и подтверждали их более высокую эффективность по сравнению с PYY (фигура 1).

Гибриды экзендин/амилин:

Другие показательные гибридные полипептиды по изобретению получали из укороченного по С-концу экзендина (1-27), укороченных по С-концу амилиновых пептидов (например, амилина (1-7), ^{2,7}Ala-амилина (1-7) и амилина (33-27)) и необязательно фрагментов sCT (например, sCT(8-10) и ¹⁴Gln,^{11,18}Arg-sCT(8-27)). Несмотря на то, что оба гибридных полипептида были весьма активны в подавлении аппетита (см. таблицу 4-2), начало действия отличалось от такового в профилях активности исходных молекул (данные не приведены).

Таблица 4-2: Гибриды экзендин/амилин и их эффекты в анализе ПП

Описание	Поглощение мышами пищи % от исходного			
	30 мин	60 мин	120 мин	Доза
Экзендин-4 (1-27) -амилин (1-7) - ¹⁴ Gln, ^{11,18} Arg-sCT(8-27) -амилин (33-37)	-24	-40	-48	25 нмоль / кг
Экзендин-4 (1-27) - ^{2,7} Ala-амилин (1-7) -sCT(8-10)	-40	-59	-66	25 нмоль / кг

Оба соединения также проявляли превосходную эффективность в скрининге в анализе DIO (фигура 2).

Гибриды экзендин/ССК-8:

Другие показательные гибридные полипептиды по изобретению получали из полноразмерного или укороченного по С-концу экзендина-4, присоединенного к N-концу ССК-8 либо непосредственно, либо посредством линкера, сохраняющего N-концевой амид ССК-8 (таблица 4-3). Кроме того, получали некоторые гибриды, содержащие природный Tyr(SO₃), тогда как получали и другой гибрид, содержащий более стабильную группу Phe(CH₂SO₃). Все полученные гибридные полипептиды активно подавляли поглощение пищи (таблица 4-3).

Таблица 4-3: Гибриды экзендин/ССК-8 и их эффект в анализе поглощения пищи

Описание	Поглощение мышами пищи % от исходного			
	30 мин	60 мин	120 мин	Доза
Экзендин-4-ССК-8	-12	-28	-28	10 нмоль/кг
Экзендин-4 (1-28)-ССК-8	-20	-36	-45	10 нмоль/кг
Экзендин-4 (1-28)-ССК-8 [Phe(CH ₂ SO ₃)]	-24	-47	-66	10 нмоль/кг
Экзендин-4 (1-28)-[8-амино-3,6-диоксаоктаноил]-ССК-8	-12	-28	-40	10 нмоль/кг

Гибридные полипептиды экзендин/ССК-8 тестировали в анализе DIO при 25 нмоль/кг (фигуры 3А и 3В). Данные свидетельствовали о первоначальном снижении массы с последующим обратным эффектом для всех соединений. Что интересно, обратный эффект оказался уменьшенным у гибридов, содержащих более устойчивый к гидролизу остаток Phe(CH₂SO₃), равно как и у гибридов, содержащих линкер 8-амино-3,6-диоксаоктаноил между остатками экзендина и ССК.

Гибрид амилин/РУУ:

Синтезировали гибридный полипептид амилин/РУУ, содержащий укороченные сегменты каждого пептида. Активность *in vivo* в анализе поглощения пищи показана в таблице 4-4.

Таблица 4-4: Гибрид амилин/РУУ

Описание	Поглощение мышами пищи % от исходного			
	30 мин	60 мин	120 мин	Доза
Амилин(1-18)-РУУ(19-36)	-13	-14	-13	25 нмоль/кг

Для определения, являются ли показательные гибридные полипептиды по изобретению более эффективными, чем исходные составляющие пептидные гормоны, показательные соединения тестировали в анализе поглощения пищи при минимальной эффективной дозе более активной исходной молекулы. Результаты приведены ниже на фигурах 4А и 4В, на которых также проведено сравнение эффектов общих исходных пептидов (соединения 1, 11 и 12 представляют собой составляющие пептидные гормоны, их аналоги или фрагменты). Данные свидетельствуют о том, что некоторые пептиды являются, по меньшей мере, равноэффективными по сравнению с общими исходными пептидами. Параллельно с исследованиями *in vivo* проводились *in vitro* анализы рецепторного связывания и функциональные анализы (циклазной активности) для всех соединений (данные не приведены).

Хотя настоящее изобретение описано с помощью предпочтительных примеров и вариантов выполнения, следует понимать, что их варианты и модификации очевидны специалистам в данной области техники. Таким образом, подразумевается, что приложенная формула изобретения охватывает все подобные эквивалентные варианты, которые подпадают под объем заявленного изобретения.

Формула изобретения

1. Гибридный полипептид, проявляющий по меньшей мере две гормональные активности, содержащий первый биологически активный модуль пептидного гормона, ковалентно связанный по меньшей мере с одним дополнительным биологически активным модулем пептидного гормона,

где биологически активные модули пептидного гормона независимо выбраны из группы, состоящей из: сложных пептидных гормонов, фрагментов сложных пептидных гормонов, проявляющих по меньшей мере одну гормональную активность сложных пептидных гормонов, аналогов и производных сложных пептидных гормонов, проявляющих по меньшей мере одну гормональную активность сложных пептидных гормонов, и фрагментов аналогов и производных сложных пептидных гормонов, проявляющих по меньшей мере одну гормональную активность сложных пептидных гормонов;

сложные пептидные гормоны независимо выбраны по меньшей мере из двух групп, состоящих из: амилина, аденомедулина (ADM), кальцитонина (CT), пептида, кодируемого геном кальцитонина (CGRP), интермедины, холецистокинина ("ССК"), лептина, пептида YY (PYY), глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1), глюкагон-подобного пептида 2 (GLP-2), оксинтомодулина (OXM) и экзендин-4; и

оба биологически активных модуля пептидных гормонов проявляют по меньшей мере одну гормональную активность своего сложного пептидного гормона; и где дополнительно:

в том случае, когда по меньшей мере один биологически активный модуль пептидного гормона, проявляющий по меньшей мере одну гормональную

активность сложного пептидного гормона, представляет собой амилин, фрагмент амилина, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное амилина, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога или производного амилина, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, и по меньшей мере один другой биологически активный модуль пептидного гормона представляет собой ССК, фрагмент ССК, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное ССК, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, фрагмент аналога или производного ССК, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, СТ, фрагмент СТ, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, аналог или производное СТ, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога или производного СТ, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, то в этом случае гибридный полипептид дополнительно содержит по меньшей мере три биологически активных модуля пептидных гормонов, выбранных по меньшей мере из трех различных сложных пептидных гормонов.

2. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из первого биологически активного модуля пептидного гормона или по меньшей мере один дополнительный биологически активный модуль пептидного гормона представляет собой сложный пептидный гормон или фрагмент сложного пептидного гормона, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного гормона.

3. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один из первого биологически активного модуля пептидного гормона или по меньшей мере один дополнительный биологически активный модуль пептидного гормона представляет собой аналог или производное сложного пептидного гормона, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмент аналога или производного сложного пептидного гормона, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность сложного пептидного гормона.

4. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что сложные пептидные гормоны независимо выбраны из группы, состоящей из: амилина, кальцитонина, ССК, РУУ и экзендина-4.

5. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один биологически активный модуль пептидного гормона, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, расположенный на N-концевой части гибридного полипептида, вставлен в структуру в ориентации от С-конца к N-концу.

6. Гибридный полипептид по п.5, отличающийся тем, что N-конец гибридного полипептида амидирован.

7. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один биологически активный модуль пептидного гормона, проявляющий по меньшей мере одну гормональную активность, расположен на С-концевой части гибридного полипептида.

8. Гибридный полипептид по п.7, отличающийся тем, что С-конец гибридного полипептида амидирован.

9. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что С-конец одного биологически активного модуля пептидного гормона непосредственно присоединен к N-концу по меньшей мере одного дополнительного биологически активного модуля пептидного гормона с образованием ковалентного связывания.

10. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что биологически активные модули пептидных гормонов ковалентно присоединены с использованием одной или нескольких линкерных групп, независимо выбранных из группы, состоящей из: алкилов; дикарбоновых кислот PEG; аминокислот; полиаминокислот; бифункциональных линкеров; аминакапроила (Aca), β -аланила, 8-амино-3,6-диоксооктаноила и Gly-Lys-Arg (GKR).

11. Гибридный полипептид по п.1, отличающийся тем, что первый биологически активный модуль пептидного гормона выбран из группы, состоящей из: экзендина-4, фрагмента экзендина-4, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, аналога или производного экзендина-4, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, и фрагмента аналога экзендина-4, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность; и

по меньшей мере один дополнительный биологически активный модуль пептидного гормона независимо выбран из группы, состоящей из: амилина, фрагмента амилина, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, аналога или производного амилина, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, или фрагмента аналога амилина, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, ССК, фрагмента ССК, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, аналога или производного ССК, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, фрагмента аналога ССК, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, СТ, фрагмента СТ проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, аналога или производного СТ, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, фрагмента аналога СТ, проявляющего по меньшей мере одну гормональную активность, и пептидного энхансера.

12. Гибридный полипептид по п.11, отличающийся тем, что первый биологически активный модуль пептидного гормона выбран из группы, состоящей из: экзендина-4, экзендина-4(1-27), экзендина-4(1-28), ^{14}Leu , ^{25}Phe -экзендина-4(1-28); ^5Ala , ^{14}Leu , ^{25}Phe -экзендина-4(1-28) и ^{14}Leu -экзендина-4(1-28); и по меньшей мере один дополнительный биологически активный модуль пептидного гормона независимо выбран из группы, состоящей из: $^{25,28,29}\text{Pro}$ -h-амилина, h-амилина-(1-7)- ^{14}Gln , $^{11,18}\text{Arg}$ -sCT(8-27)-амилина-(33-37), h-амилина-(1-7)- $^{11,18}\text{Arg}$ -sCT(8-32)-h-амилина(33-37), $^1\text{дез-Lys}$ -h-амилина-(1-7), $^{11,18}\text{Arg}$ -sCT(8-32)-h-амилина(33-37), ССК-8, $\text{Phe}^2\text{ССК-8}$.

13. Гибридный полипептид по п.11, отличающийся тем, что гибридный полипептид содержит по меньшей мере три биологически активных модуля пептидных гормонов.

14. Гибридный полипептид по п.11, отличающийся тем, что гибридный полипептид содержит по меньшей мере четыре биологически активных модуля пептидных гормонов.

15. Гибридный полипептид по п.11, отличающийся тем, что первый биологически активный модуль пептидного гормона расположен на С-конце гибридного полипептида, и по меньшей мере один дополнительный биологически активный модуль пептидного гормона расположен на N-конце гибридного полипептида.

16. Гибридный полипептид по п.11, отличающийся тем, что первый биологически активный модуль пептидного гормона расположен на N-конце гибридного полипептида, и по меньшей мере один дополнительный биологически активный модуль пептидного гормона расположен на С-конце гибридного полипептида.

17. Гибридный полипептид по п.4, отличающийся тем, что сложные пептидные гормоны независимо выбраны по меньшей мере из двух из группы, состоящей из: амилина и экзендина-4.

5 18. Гибридный полипептид по п.17, отличающийся тем, что модуль пептидного гормона амилина расположен на С-конце гибридного полипептида.

19. Гибридный полипептид по п.17, отличающийся тем, что модуль пептидного гормона экзедина расположен на N-конце гибридного полипептида.

10

15

20

25

30

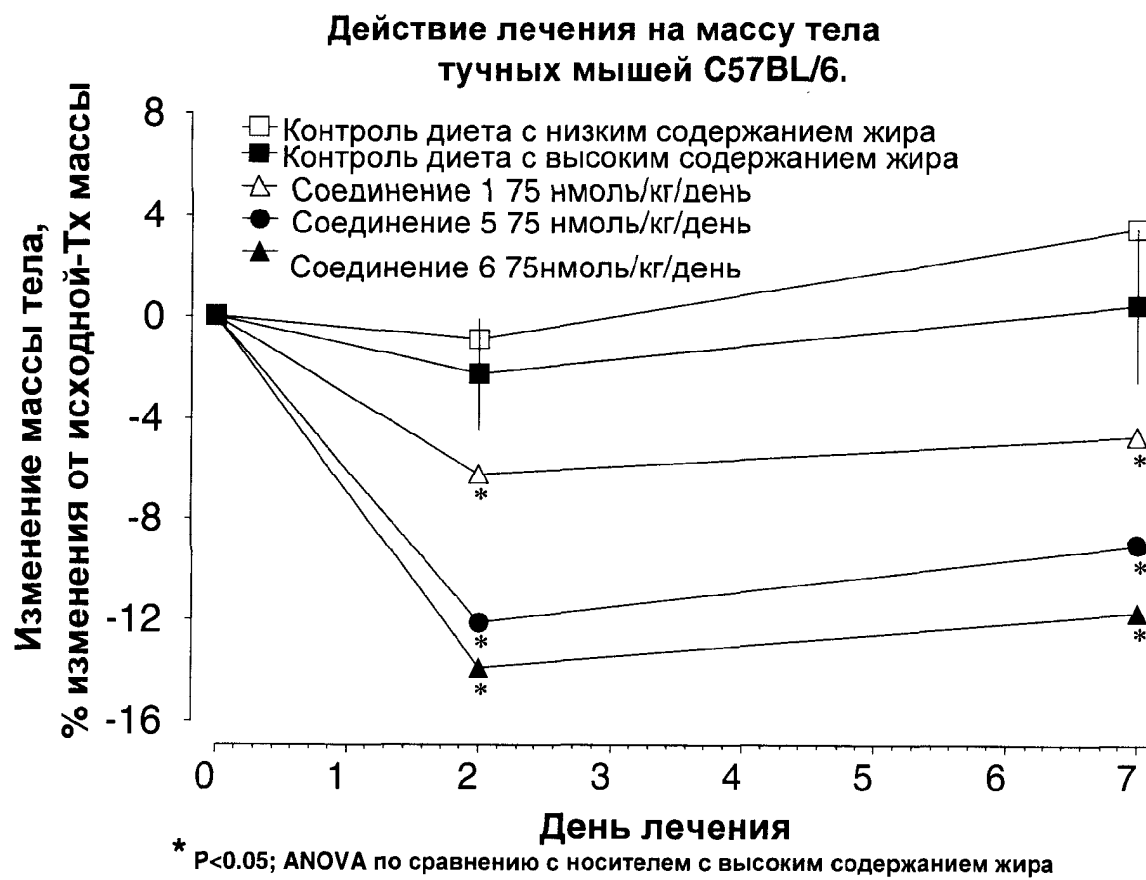
35

40

45

50

Действие гибридов Экзендин/Амилин у мышей DIO



Фиг.2

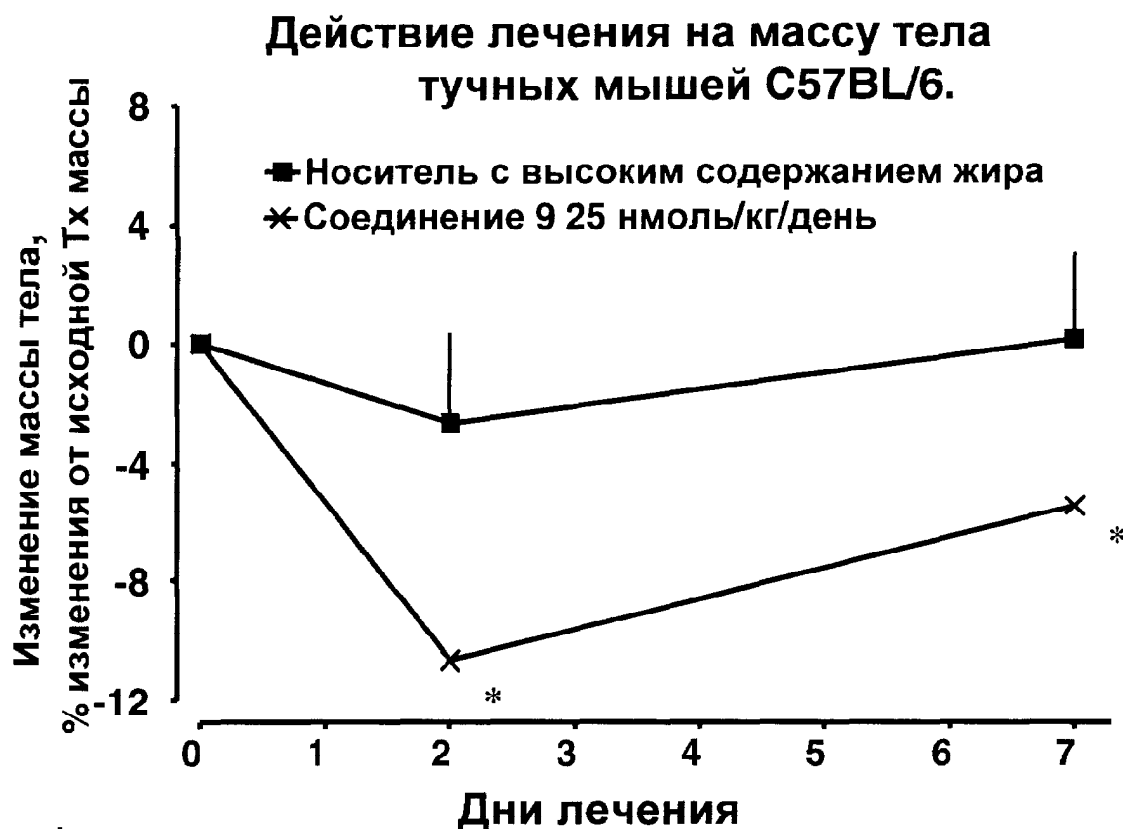
Действие гибридов Экзендин/ССк-8 у мышей DIO

Действие лечения на массу тела тучных мышей C57BL/6.



Фиг.3А

Действие гибридов Экзендин/ССк-8 у мышей DIO

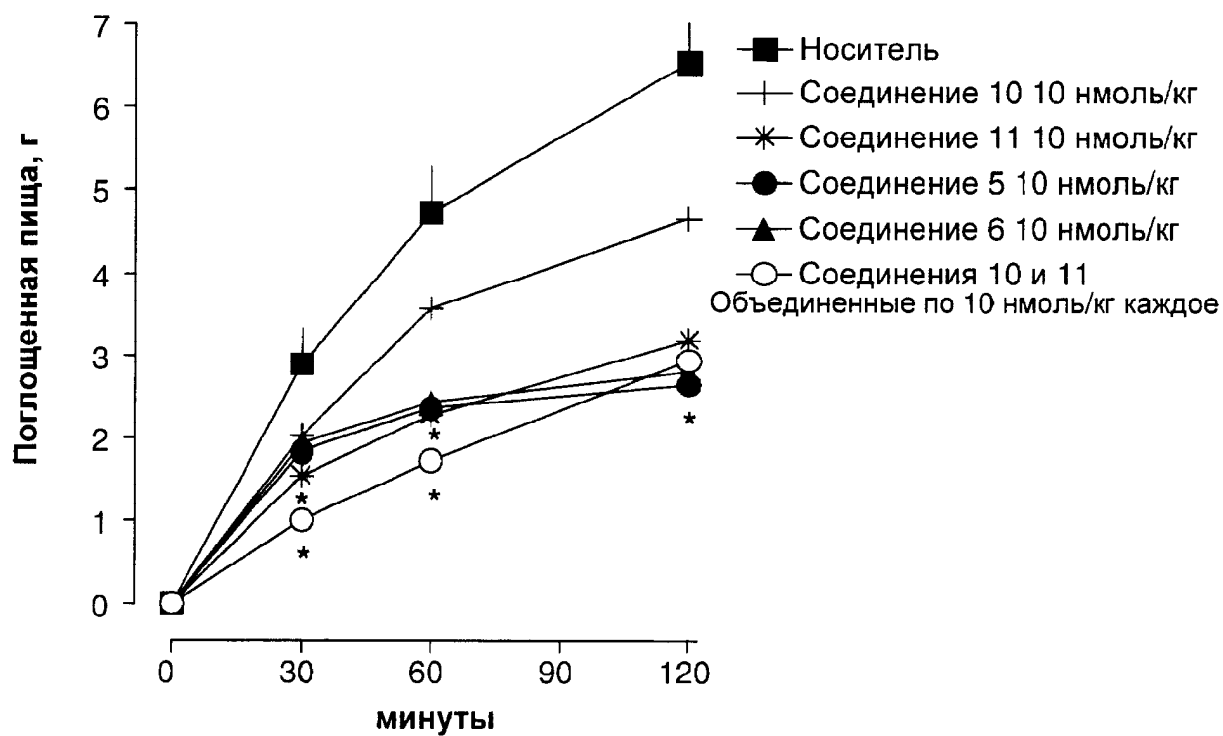


* P<0.05; ANOVA по сравнению с носителем с высоким содержанием жира

Фиг.3В

**Действие соединений по изобретению в
исследовании потребления пищи (в сравнении с исходными
соединениями)**

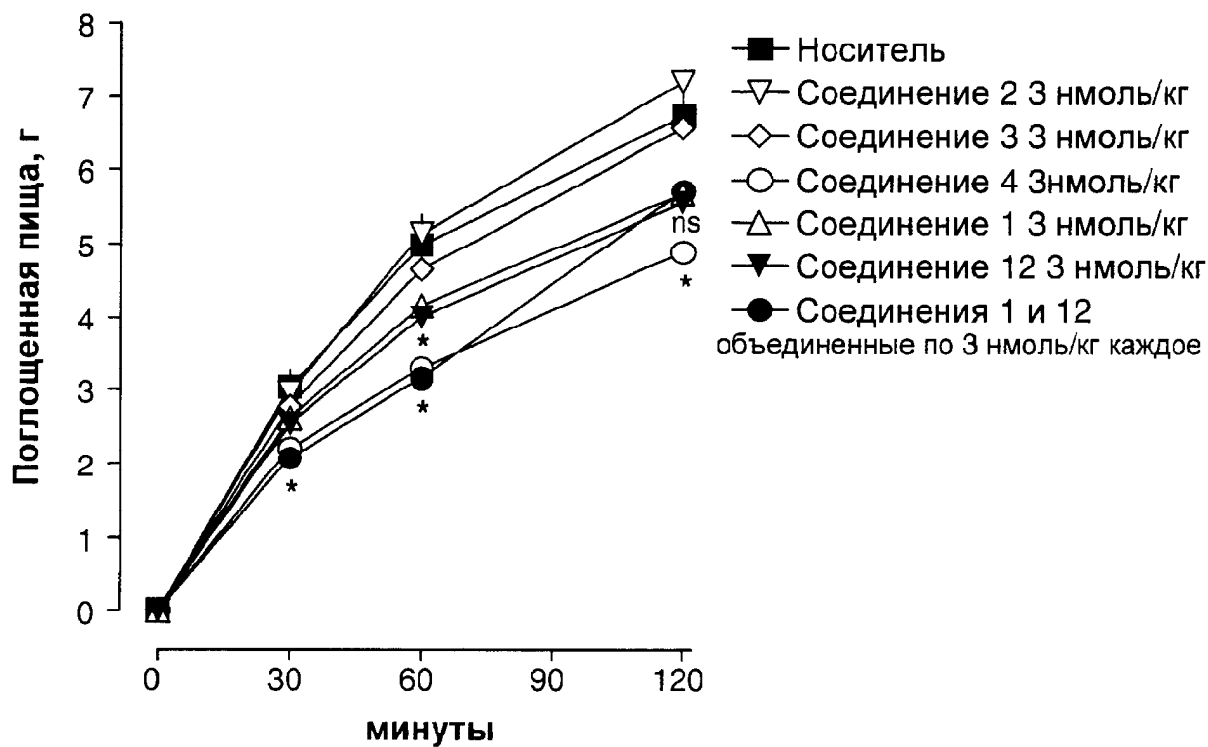
Исследование потребления пищи:



Фиг.4А

**Действие соединений по изобретению в
исследовании потребления пищи (в сравнении с исходными
соединениями)**

**Исследование потребления пищи:
Суммарное потребление пищи**



Фиг.4В