

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039082**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.12.01**

(21) Номер заявки  
**201992760**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.11.06**

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 38/26* (2006.01)  
*C07K 14/605* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)

---

### (54) ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ БЕЛКОВОГО КОНЬЮГАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ОКСИНТОМОДУЛИН И ФРАГМЕНТ ИММУНОГЛОБУЛИНА

---

(31) **10-2012-0124725**

(32) **2012.11.06**

(33) **KR**

(43) **2020.03.31**

(62) **201791143; 2013.11.06**

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

(56) CN-A-102010473  
WO-A2-2012057525  
US-20100196405

(72) Изобретатель:  
**Ким Хьюн Ок, Лим Хьюнг Кю, Джан  
Мюн Хюн, Ким Сан Юн, Бэ Сан Мин,  
Квон Се Чан (KR)**

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

(57) Изобретение относится к жидкой композиции, не содержащей альбумин, содержащей конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия, в котором производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-23, 27 или 29-34, связано посредством непептидильного полимера с областью Fc иммуноглобулина, что может увеличивать продолжительность физиологической активности конъюгата этого производного оксинтомодулина длительного действия и сохранять его стабильность *in vivo* в течение длительного периода времени по сравнению с нативным оксинтомодулином, а также к способу получения этой жидкой композиции. Эта жидкая композиция содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество и не содержит сывороточный альбумин человека и факторы, являющиеся потенциально вредными для организма человека, и, следовательно, нечувствительна к вирусной инфекции. Кроме того, поскольку в конъюгате производного оксинтомодулина по изобретению это производное оксинтомодулина связано с областью Fc иммуноглобулина, оно обладает большой молекулярной массой, длительной физиологической активностью и превосходной стабильностью при хранении по сравнению с нативным оксинтомодулином.

**B1****039082****039082****B1**

### Техническая область изобретения

Настоящее изобретение относится к жидкой композиции, не содержащей альбумин, содержащей конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия, в котором оксинтомодулиновый пептид, включая производное оксинтомодулина, связан с областью Fc иммуноглобулина, которая может увеличивать продолжительность физиологической активности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия и сохранять его *in vivo* стабильность в течение длительного периода времени по сравнению с нативным оксинтомодулином. Настоящее изобретение также относится к способу получения данной жидкой композиции.

### Предшествующий уровень техники

Ожирение определяют как состояние аномального или избыточного накопления жира, которое может ухудшать состояние здоровья, и оно является результатом нарушения энергетического баланса, при котором потребление энергии превышает затраты энергии. В прошлом ожирение не представляло серьезную проблему для здоровья, но с экономическим ростом популяция людей с ожирением растет при растущем экономическом благополучии, и число различных заболеваний, связанных с ожирением, также растет. Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 1,5 млрд взрослых людей во всем мире имеет избыточную массу тела, более 500 млн из них страдает ожирением, и между 1980 и 2008 г. популяция людей с ожирением увеличилась приблизительно вдвое (World Health Organization, Fact sheet on obesity and overweight, 2011). В настоящее время процент людей, страдающих ожирением, растет не только в странах с высоким уровнем дохода, но также в странах с низким уровнем дохода. Избыточная масса тела и ожирение ответственны за повышение кровяного давления и уровней холестерина, а также являются причиной или вызывают ухудшение различных заболеваний. Кроме того, проблема ожирения является более серьезной у детей или подростков, повышает заболеваемость диабетом, сердечными заболеваниями, гипертензией или гиперлипидемией, и может также привести к смерти или инвалидности.

Как описано выше, ожирение является глобальным заболеванием и социальной проблемой, но в прошлом считали, что с ожирением можно бороться за счет индивидуальных усилий, и, следовательно, лечению ожирения не уделяли особого внимания. Однако ожирение непросто лечить, поскольку оно представляет собой комплексное заболевание, обусловленное механизмами контроля аппетита и энергетического метаболизма. Соответственно для лечения ожирения необходимы не только собственные усилия пациента, но также методика, способная лечить аномальные механизмы, связанные с контролем аппетита и энергетическим метаболизмом. Поэтому приложены усилия к разработке лекарственных средств для лечения ожирения.

В результате таких усилий были разработаны лекарственные средства, включающие римонабант (Sanofi-Aventis), сибутрамин (Abbott), Contrave (Takeda), орлистат (Roche) и тому подобное, но эти лекарственные средства имеют ограничения в том, что они оказывают побочные действия на плод или обладают недостаточными эффектами при лечении ожирения. Сообщали, что римонабант (Sanofi-Aventis) вызывал расстройства центральной нервной системы, сибутрамин (Abbott) и Contrave (Takeda) демонстрировали сердечно-сосудистые побочные эффекты, а орлистат (Roche) демонстрировал эффект снижения массы тела только приблизительно на 4 кг при введении в течение 1 года. Таким образом, в настоящее время не имеется или имеется немного терапевтических средств против ожирения, которые можно безопасно назначать пациентам с ожирением.

В последнее время значительное внимание привлекли производные глюкагона. Глюкагон продуцируется поджелудочной железой, когда уровни глюкозы в крови начинают падать за счет приема лекарственных средств, заболеваний, дефицита гормонов или ферментов или тому подобного. Функция глюкагона состоит в стимуляции расщепления клетками печени запасенного гликогена до глюкозы, которая затем высвобождается в кровь, чтобы повысить уровень глюкозы в крови до нормального уровня. Сообщали, что в дополнение к действию, заключающемуся в повышении уровня глюкозы в крови, глюкагон подавляет аппетит и активирует гормончувствительную липазу (HSL; от англ. "hormone-sensitive lipase") адипоцитов, что способствует липолизу, за счет чего он проявляет эффекты против ожирения. Среди производных глюкагона глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1; от англ. "glucagon-like peptide-1") находится в разработке в качестве терапевтического средства для снижения гипергликемии у пациентов с диабетом, и его функция состоит в стимуляции синтеза и секреции инсулина, ингибировании секреции глюкагона, подавлении опорожнения желудка, повышении утилизации глюкозы и ингибировании потребления пищи. Известно, что эксендин-4, выделенный из яда ящерицы, обладает приблизительно 50% аминокислотной гомологией с GLP-1 и активирует рецептор GLP-1, снижая гипергликемию у пациентов с диабетом. Тем не менее, сообщали, что терапевтические лекарственные средства против ожирения, включая GLP-1, вызывают побочные эффекты, такие как рвота и тошнота.

Следовательно, в качестве альтернативы GLP-1 внимание привлек оксинтомодулин, способный к связыванию с обоими рецепторами для двух пептидов (GLP-1 и глюкагона). Оксинтомодулин представляет собой пептид, полученный из предшественника глюкагона преглюкагона, и является эффективным средством против ожирения, поскольку он ингибирует потребление пищи подобно GLP-1, стимулирует насыщение и проявляет липолитическую активность подобно глюкагону.

На основании этой двойной функции пептида оксинтомодулина активно проводятся исследования по разработке лекарственных средств для лечения ожирения. Например, в патенте Кореи с регистрационным № 925017 раскрыта пероральная, парентеральная, мукозальная, ректальная, подкожная или трансдермальная фармацевтическая композиция для лечения ожирения у человека, содержащая оксинтомодулин в качестве активного ингредиента. Однако сообщали, что терапевтические средства против ожирения, содержащие оксинтомодулин, обладают коротким периодом полувыведения *in vivo* и демонстрируют низкую эффективность при лечении ожирения даже при их введении в высокой дозе три раза в сутки. Поэтому были сделаны усилия по увеличению периода полувыведения *in vivo* или эффективности лечения ожирения оксинтомодулином путем модификации оксинтомодулина.

Например, двойной агонист оксинтомодулин (Merck) был получен путем замены L-серина D-серином в аминокислоте 2 оксинтомодулина с повышением устойчивости к дипептидилпептидазе-IV (DPP-IV) и путем присоединения холестерина группировки к С-концу с увеличением периода полувыведения из крови. ZP2929 (Zealand) был получен путем замены L-серина D-серином в аминокислоте 2 оксинтомодулина с повышением устойчивости к DPP-IV, замены аргинина аланином в аминокислоте 17 с повышением устойчивости к протеазе, замены метионина лизином в аминокислоте 27 с повышением устойчивости к окислению и замены глутаминов в аминокислотах 20 и 24 и аспарагина в аминокислоте 28 аспарагиновой кислотой, аланином и серином соответственно с повышением устойчивости к деаминированию. Двойной агонист оксинтомодулин (Merck) обладает увеличенным периодом полувыведения *in vivo* 1,7 ч, который является более длительным, чем период полувыведения (8-12 мин) нативного оксинтомодулина, но все же обладает очень коротким периодом полувыведения *in vivo*, и его вводят в очень высокой дозе, составляющей несколько мг/кг. Таким образом, оксинтомодулин и его производные обладают двумя большими недостатками, то есть коротким периодом полувыведения и низкими лекарственными эффектами. Вследствие этих недостатков их необходимо вводить ежедневно в высоких дозах. Для преодоления данных недостатков был исследован способ увеличения периода полувыведения оксинтомодулина в крови при сохранении его активности *in vivo*, и в результате было разработано производное оксинтомодулина. Кроме того, используя данную технологию, путем конъюгации носителя с производным оксинтомодулина был получен непептидильный полимер, и было обнаружено, что этот белковый конъюгат может демонстрировать лучшую эффективность против ожирения в результате увеличения его периода полувыведения в крови при сохранении активности *in vivo* (заявка на патент Кореи № 10-2012-0064110).

Как правило, белки и пептиды обладают очень коротким периодом полувыведения и претерпевают денатурацию, такую как осаждение в результате агрегации мономеров, и адсорбцию на поверхностях сосудов под действием различных факторов, таких как неблагоприятные температуры, поверхность раздела между воздушной и водной фазой, высокое давление, физическая/механическая нагрузка, органические растворители и заражение микроорганизмами. Эта денатурация является необратимой, и, следовательно, денатурированные белки и пептиды утрачивают собственные физико-химические свойства и физиологически активные действия. Кроме того, белки и пептиды нестабильны и чувствительны к внешним факторам, таким как температура, влажность, кислород, ультрафиолетовые (УФ) лучи и тому подобное, претерпевая физические или химические изменения, включающие ассоциацию, полимеризацию и окисление, приводящие в результате к значительной потере активности (патент Кореи, регистрационный № 10-0389726).

Кроме того, адсорбированные белки и пептиды легко агрегируют за счет процесса денатурации, и денатурированные белки и пептиды при введении в организм человека действуют как причина образования антител в организме человека, и в связи с этим белки и пептиды следует вводить в достаточно стабильной форме. Соответственно исследованы различные способы предотвращения денатурации белков и пептидов в растворе (John Geigert, J. Parenteral Sci. Tech., 43, No5, 220-224, 1989; David Wong, Pharm. Tech. October, 34-48, 1997; Wei Wang, Int. J. Pharm., 185, 129-188, 1999; Willem Norde, Adv. Colloid Interface Sci., 25, 267-340, 1986; Michelle et al., Int. J. Pharm. 120, 179-188, 1995).

Чтобы достичь цели стабильности, к некоторым белковым и пептидным лекарственным средствам применяют лиофилизацию. Однако лиофилизированные композиции неудобны тем, что для применения они должны быть растворены в воде для инъекций. Кроме того, в случае лиофилизации требуются огромные инвестиции в сублимационные сушилки большой мощности или тому подобное, поскольку процесс лиофилизации включен в процессы изготовления. Кроме того, также применяют способ получения порошкообразных белков и пептидов с использованием распылительной сушилки, но в данном случае экономическая эффективность снижается вследствие низкого выхода, и воздействие высоких температур может неблагоприятно влиять на стабильность белков.

С целью преодоления таких ограничений проведены исследования, при которых к белкам и пептидам в растворе добавляли стабилизаторы, чтобы подавлять физико-химические изменения белков и пептидов, сохраняя при этом их эффективность *in vivo* даже при длительном хранении. Сывороточный альбумин человека представляет собой вид белка, широко применяемый в качестве стабилизатора для различных белковых лекарственных средств, и его эффективность доказана (Edward Tarelli et al., Biologicals (1998) 26, 331-346).

Способ очистки сывороточного альбумина человека включает инактивацию биологических загрязнителей, таких как микопlasма, прион, бактерии и вирус, и скрининг или изучение одного или более биологических загрязнителей или патогенов. Однако всегда существует риск, что пациенты подвергнутся воздействию биологических загрязнителей, которые удалены или инактивированы не полностью. Например, способ скрининга включает исследование, содержит ли донорская кровь человека определенный вирус, но данный способ не всегда надежен. В частности, определенный вирус, существующий у очень малого числа доноров, невозможно обнаружить.

Различные белки могут быть постепенно инактивированы с различными скоростями при различных условиях при хранении за счет их химических различий. То есть продление срока хранения за счет стабилизатора не идентично для различных белков. В связи с этим подходящая доля, концентрация и вид стабилизатора, применяемого для обеспечения стабильности при хранении, варьирует в зависимости от физико-химических свойств целевого белка. При применении стабилизаторов в комбинации они могут вызывать побочные эффекты, отличающиеся от желаемых эффектов, вследствие конкуренции и взаимодействия между ними. Кроме того, поскольку природа или концентрация белков может изменяться в процессе хранения, применяемые стабилизаторы могут проявлять эффекты, отличающиеся от их предназначенных эффектов. Таким образом, для стабилизации белков в растворе требуются огромные усилия и предосторожности.

В частности, конъюгат оксинтомодулина и Fc иммуноглобулина представляет собой конъюгат, в котором оксинтомодулин, представляющий собой физиологически активный пептид, связан с областью Fc иммуноглобулина. Следовательно, поскольку молекулярная масса и объем конъюгата безусловно отличаются от молекулярной массы и объема нативного оксинтомодулина, то для стабилизации белка требуется специальная композиция.

Кроме того, поскольку оксинтомодулин (то есть физиологически активный пептид) и область Fc иммуноглобулина представляют собой белки или пептиды, обладающие различными физико-химическими свойствами, их следует стабилизировать одновременно. Однако, как описано выше, различные белки или белки могут постепенно инактивироваться с различными скоростями в различных условиях в процессе хранения вследствие их химических различий и при применении стабилизаторов, подходящих для белков или пептидов, в комбинации они могут вызывать побочные эффекты, отличающиеся от желаемых эффектов, вследствие конкуренции и взаимодействия между ними. Таким образом, в случае конъюгата оксинтомодулина длительного действия существуют значительные затруднения при нахождении композиции для одновременной стабилизации оксинтомодулина, представляющего собой физиологически активный пептид, и области Fc иммуноглобулина.

В таких обстоятельствах авторы изобретения приложили значительные усилия для получения стабильной жидкой композиции, которую можно хранить в течение длительного периода времени, не беспокоясь о вирусном загрязнении, и в результате обнаружили, что стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество и может дополнительно содержать добавку, такую как изотонический агент или аминокислота, и консервант для многократного применения, может повысить стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, и экономически эффективная и стабильная жидкая композиция может быть получена с использованием стабилизатора, в результате чего выполнили настоящее изобретение.

### **Раскрытие изобретения**

Техническая задача.

Цель настоящего изобретения состоит в разработке жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащей фармакологически эффективное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, связано с областью Fc иммуноглобулина; и не содержащей альбумин-стабилизатор.

Другая цель настоящего изобретения состоит в разработке способа получения указанной выше жидкой композиции.

Еще одна цель настоящего изобретения состоит в разработке композиции для предупреждения или лечения ожирения или диабета, включающей жидкую композицию конъюгата производного оксинтомодулина, содержащую физиологически активный пептид производного оксинтомодулина, связанный с областью Fc иммуноглобулина.

Еще одна цель настоящего изобретения состоит в разработке способа предупреждения или лечения ожирения или диабета, включающего введение субъекту указанной выше жидкой композиции.

Техническое решение.

Для достижения указанных выше целей в одном аспекте в настоящем изобретении предложена жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащая фармакологически активное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где этот конъюгат производного оксинтомодулина содержит

производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-23, 27 или 29-34;



область Fc иммуноглобулина (IgG) и

непептидильный полимер, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля, поливиниловый спирт, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA), полимолочно-гликолевую кислоту (PLGA); липидный полимер; гиалуроновую кислоту или их комбинацию, и где этот непептидильный полимер ковалентно связывает производное оксинтомодулина и область Fc IgG;

и не содержащий альбумин стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

Предпочтительной является жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению, где стабилизатор дополнительно содержит один/одну или более изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов или аминокислот.

Предпочтительно в жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, как она определена выше, область Fc IgG представляет собой область Fc IgG4, более предпочтительно область Fc агликозилированного IgG4 человека.

Предпочтительно в жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

Целесообразно, когда в жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению сахарный спирт представляет собой один или более чем один из маннита, сорбита или глицерина, а концентрация сахарного спирта в жидкой композиции составляет 2-15% (мас./об.).

Предпочтительно в жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению буфер представляет собой один или более один из цитратного, ацетатного, гистидинового или фосфатного буфера, и буфер имеет pH в диапазоне от 4,5 до 7,0.

Предпочтительно в жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению изотонический агент представляет собой хлорид натрия.

Целесообразно, когда в жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер, а концентрация этого неионогенного поверхностно-активного вещества в жидкой композиции составляет 0,001-0,1% (мас./об.).

Предпочтительной является жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, как она определена выше, где аминокислота представляет собой метионин.

Еще более предпочтительной является жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, как она определена выше, где стабилизатор содержит буфер, имеющий pH в диапазоне от 4,8 до 6,0, один или более чем один из маннита или сорбита и полисорбат 20.

Еще один аспект жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, как она определена выше, составляет жидкая композиция, дополнительно содержащая один или более чем один консервант, представляющий собой метакрезол, фенол или бензиловый спирт, предпочтительно метакрезол, еще более предпочтительно в концентрации, составляющей 0,001-1% (мас./об.).

Еще один аспект указанной жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия составляет композиция для введения многократных доз.

Также предложен способ получения жидкой композиции по изобретению, как она определена выше, включающий следующие стадии:

а) получение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, как он определен выше; и

б) смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии (а), с не содержащим альбумин стабилизатором, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

Согласно настоящему изобретению также предложена жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащая

фармакологически эффективное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где этот конъюгат производного оксинтомодулина содержит

производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-23, 27 или 29-34;

область Fc IgG и

непептидильный полимер, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля, поливиниловый спирт, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA), полимолочно-гликолевую кислоту (PLGA); липидный полимер; гиалуроновую кислоту или их комбинацию, и где этот непептидильный полимер ковалентно связывает производное оксинтомодулина и область Fc IgG;

и 5-50 мМ гистидина; 2-15% (мас./об.) маннита; 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (мас./об.) полисорбата 20.

Предпочтительно в указанной композиции непептидильный полимер представляет собой полиэти-

ленгликоль.

Целесообразно, когда указанная жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия дополнительно содержит 0,001-1% (мас./об.) метакрезол.

Также предложен способ получения указанной жидкой композиции конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, включающий следующие стадии:

а) получение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, как он определен выше; и

б) смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии а), с 5-50 мМ гистидина; 2-15% (мас./об.) маннита; 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (мас./об.) полисорбата 20.

Один аспект заявленных способов получения композиций по изобретению составляет способ, дополнительно включающий смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии а), с одним/одной или более изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов, аминокислот, консервантов или их комбинацией.

Как используют в данном описании, термин "жидкая композиция" относится к лекарственной композиции, полученной в жидкой форме, и включает все жидкие композиции для внутреннего применения и композиции для наружного применения. В предшествующем уровне техники жидкая композиция по изобретению, пригодная для фармакологически эффективного количества конъюгата производного оксинтомодулина, содержащая производное оксинтомодулина, связанное с доменом Fc-иммуноглобулина, не была описана.

Как используют в данном описании, термин "стабилизатор" относится к веществу, стабильно сохраняющему ингредиенты, такие как активные ингредиенты, в течение определенного периода времени. Для цели настоящего изобретения этот термин относится к веществу, обеспечивающему стабильное хранение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. Стабильность при хранении белков, таких как конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия, важна не только для гарантии точной дозы, но также для ингибирования потенциального образования антигенного вещества для конъюгата производного оксинтомодулина.

Стабилизатор в настоящем изобретении предпочтительно содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество с целью придания стабильности конъюгату производного оксинтомодулина длительного действия. Кроме того, стабилизатор может предпочтительно дополнительно содержать один или более чем один ингредиент, выбранный из группы, состоящей из изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов и аминокислот.

Буфер функционирует так, чтобы поддерживать pH жидкой композиции таким образом, чтобы pH жидкой композиции не изменялся быстро, для того чтобы сделать конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия стабильным. Примеры буфера могут включать фармацевтически приемлемые буферы pH, включающие соль металла (фосфат натрия, фосфат калия или их однозамещенную или двухзамещенную соль), цитрат натрия, лимонную кислоту, ацетат натрия, уксусную кислоту и гистидин, либо можно также использовать смесь этих буферов. Буфер предпочтительно представляет собой цитратный или гистидиновый буфер и более предпочтительно гистидиновый буфер. Концентрация буфера предпочтительно составляет 5-100 мМ и более предпочтительно 5-50 мМ. Значение pH буфера предпочтительно составляет 4,0-8,0, более предпочтительно 4,5-7,0 и еще более предпочтительно 5,0-6,0.

В примере настоящего изобретения была измерена стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH буфера жидкой композиции. То есть после хранения конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия при 25°C в течение 0-4 недель при изменении pH буфера анализировали остаточное количество конъюгата, и в результате было показано, что конъюгат производного оксинтомодулина был более стабилен при pH 5,6, pH 5,8 и pH 6,0 (пример 3, табл. 2-5, пример 7, табл. 18-21, пример 8 и табл. 22-25). Таким образом, было обнаружено, что pH наиболее стабильного буфера в настоящем изобретении находится в диапазоне от 5,0 до 6,0. В примере настоящего изобретения измеряли стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида буфера жидкой композиции. В частности, после хранения конъюгата оксинтомодулина с 0,02% полисорбатом 20, 0,1 мг/мл метионина и 5% маннитом при 25°C в течение 0-4 недель анализировали остаточное количество конъюгата. Результаты анализа эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э-ВЭЖХ) показали, что остаточное количество конъюгата значительно не различается между буферами при одном и том же значении pH. Результаты анализа с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО-ВЭЖХ) или высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) показали, что гистидин был наиболее стабилен при одном и том же pH (пример 8 и табл. 22-25).

Функция сахарного спирта состоит в повышении стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В настоящем изобретении сахарный спирт может представлять собой один или более чем один сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из маннита, сорбита и глицерина. Предпочтительно сахарный спирт может представлять собой маннит. Концентрация сахарного

спирта в жидкой композиции предпочтительно составляет 1-20% (мас./об.) и более предпочтительно 2-15% (мас./об.).

В примере настоящего изобретения анализировали влияние вида сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, конъюгат производного оксинтомодулина хранили в цитратном буфере (pH 5,6) при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В результате конъюгат был более стабильным в присутствии маннита или сорбита, чем в присутствии глицерина при одной и той же концентрации. Результаты анализа ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат был несколько более стабильным в присутствии маннита по сравнению с присутствием сорбита (пример 4 и табл. 6-9). Иными словами, было показано, что добавление маннита или сорбита показало превосходную стабильность, но конъюгат был наиболее стабильным в присутствии маннита.

В примере настоящего изобретения анализировали влияние концентрации сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, конъюгат производного оксинтомодулина хранили при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В результате в присутствии 2% маннита или 15% маннита образовывался осадок белка, а в присутствии 5% маннита или 10% маннита конъюгат был стабилен (пример 5, табл. 10-13, пример 7 и табл. 18-21).

Функции неионогенного поверхностно-активного вещества состоят в уменьшении поверхностного натяжения раствора белка для предотвращения адсорбции белка на гидрофобной поверхности или его агрегации. Предпочтительные примеры неионогенного поверхностно-активного вещества, которое можно применять в настоящем изобретении, включают неионогенные поверхностно-активные вещества на основе полисорбата и неионогенные поверхностно-активные вещества на основе полоксамера, которые можно применять отдельно или в комбинации двух или более. Неправильно использовать неионогенное поверхностно-активное вещество в жидкой композиции в высоких концентрациях. Жидкая композиция по настоящему изобретению содержит неионогенное поверхностно-активное вещество в концентрации 0,2% (мас./об.) или менее и предпочтительно 0,001-0,1% (мас./об.).

Стабилизатор по настоящему изобретению может содержать аминокислоту, такую как метионин. Функция метионина состоит в дополнительной стабилизации белка за счет ингибирования образования примесей, которое может быть вызвано, например, окислительной реакцией белка.

В примере настоящего изобретения тестировали влияние концентрации неионогенного поверхностно-активного вещества в качестве стабилизатора и присутствия или отсутствия аминокислоты на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, конъюгат производного оксинтомодулина хранили в цитратном буфере (pH 5,6) и 10% манните при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В результате конъюгат производного оксинтомодулина был наиболее стабильным в присутствии 0,02% полисорбата 20 и 0,1 мг/мл метионина (пример 6 и табл. 14-17).

Функция изотонического агента состоит в поддержании подходящего уровня осмотического давления при введении конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в раствор *in vivo*, и его дополнительная функция может состоять в дополнительной стабилизации конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в растворе. Характерные примеры изотонического агента включают водорастворимые неорганические соли, такие как хлорид натрия, сульфат натрия, цитрат натрия и тому подобное. Концентрация изотонического агента предпочтительно составляет 0-200 мМ, и его содержание можно надлежащим образом контролировать.

Стабилизатор по настоящему изобретению не содержит альбумин. Сывороточный альбумин человека, который можно использовать в качестве стабилизатора белка, получают из крови человека, и, следовательно, он может быть заражен патогенным вирусом человека, а желатин или бычий сывороточный альбумин может вызвать заболевания или вызвать аллергические реакции у некоторых пациентов. Не содержащий альбумин стабилизатор по настоящему изобретению не содержит инородный белок, такой как сывороточный альбумин человека или животного или очищенный желатин, и, следовательно, нечувствителен к вирусной инфекции.

Предпочтительные примеры сахаров среди сахаров и многоатомных спиртов, которые можно дополнительно использовать для повышения стабильности конъюгата оксинтомодулина длительного действия при хранении, включают моносахариды, такие как манноза, глюкоза, фукоза и ксилоза, и полисахариды, такие как лактоза, мальтоза, сахароза, раффиноза и декстран, и предпочтительные примеры многоатомных спиртов включают полипропилен, низкомолекулярный полиэтиленгликоль, глицерин, низкомолекулярный полипропиленгликоль и тому подобное. Эти сахара и многоатомные спирты можно использовать сами по себе или в комбинации двух или более.

В дополнение к вышеописанному буферу, изотоническому агенту, сахарному спирту, аминокислоте и неионогенному поверхностно-активному веществу жидкая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать другие компоненты или вещества, известные в данной области техники, в диапазоне, не уменьшающем эффективность настоящего изобретения.

Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по изобретению содержит фармакологически эффективное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащего физиологически активный пептид производного оксинтомодулина, связанный с областью Fc иммуноглобулина, и не содержащий альбумин стабилизатор, который может содержать буфер, имеющий pH в диапазоне от 4,8 до 7,0, один или более чем один сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из маннита и сорбита, и полисорбат 20. Более конкретно стабилизатор может содержать буфер, имеющий pH в диапазоне от 5,0 до 6,0, маннит и полисорбат 20. Кроме того, стабилизатор может дополнительно содержать один или более чем один компонент, выбранный из группы, состоящей из изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов и аминокислот.

Не содержащая альбумин жидкая композиция по изобретению, которая содержит высокую концентрацию конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, придает стабильность конъюгату производного оксинтомодулина длительного действия, нечувствительна к вирусной инфекции, является простой и обладает превосходной стабильностью при хранении и, следовательно, может быть экономично получена по сравнению с другими стабилизаторами или лиофилизированными композициями.

Кроме того, поскольку жидкая композиция по настоящему изобретению содержит конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия, обладающий физиологической активностью в течение продолжительного периода времени по сравнению с нативным оксинтомодулином, она может сохранять активность белка в организме человека в течение продолжительного периода времени по сравнению с традиционными препаратами оксинтомодулина и, следовательно, ее можно применять в качестве эффективного лекарственного препарата. Кроме того, жидкая композиция по настоящему изобретению обладает превосходной стабильностью даже при высокой концентрации конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия.

Как используют в данном описании, термин "оксинтомодулин" относится к пептиду, продуцируемому из преглукгона, являющегося предшественником глюкагона. В настоящем изобретении подразумевают, что оксинтомодулин включает нативный оксинтомодулин и его предшественник, производное, фрагмент и вариант. Предпочтительно оксинтомодулин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA).

Как используют в данном описании, термин "производное оксинтомодулина" включает пептид, производное пептида или пептидомиметик, который получен путем добавления, делеции или замены аминокислот в аминокислотной последовательности оксинтомодулина и может активировать рецепторы глюкагона и GLP-1 на более высоком уровне, чем при активации нативным оксинтомодулином. Как оно раскрыто в данном описании, производное оксинтомодулина может иметь любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2-34. Производное оксинтомодулина по настоящему изобретению имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-23, 27 или 29-34.

Как используют в данном описании, термин "фрагмент оксинтомодулина" относится к фрагменту, имеющему одну или более аминокислот на амино- или карбоксиконце нативного оксинтомодулина, в котором добавленные аминокислоты могут также представлять собой неприродные аминокислоты (например, аминокислоту D-типа). Этот фрагмент оксинтомодулина обладают функцией регулирования уровней глюкозы в крови *in vivo*.

Как используют в данном описании, термин "вариант оксинтомодулина" представляет собой пептид, имеющий один или более чем один аминокислотный остаток, отличающийся от остатков аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина, и обладает функцией активации рецепторов GLP-1 и глюкагона. Вариант оксинтомодулина может быть получен любым путем из следующих: замены, добавления, делеции, модификации или их комбинации некоторых аминокислот в аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина.

Способы получения варианта, производного и фрагмента оксинтомодулина можно применять по отдельности или в комбинации. Например, в данном описании раскрыт также пептид, имеющий одну или более аминокислот, отличающихся от аминокислот нативного оксинтомодулина, и дезаминированные N-концевые аминокислотные остатки, и обладающий функцией активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкагона.

Аминокислоты, упоминаемые в данном описании, сокращают согласно правилам номенклатуры IUPAC-IUB, как описано ниже:

Аланин - A; аргинин - R;  
аспарагин - N; аспарагиновая кислота - D;  
цистеин - C; глутаминовая кислота - E;  
глутамин - Q; глицин - G;  
гистидин - H; Изолейцин - I;  
лейцин - L; лизин - K;  
метионин - M; фенилаланин - F  
пролин - P; серин - S;  
треонин - T; триптофан - W;

тирозин Y; валин V.

Как оно раскрыто в данном описании, производное оксинтомодулина включает любой пептид, который получен путем замены, добавления, делеции или посттрансляционной модификации (например, метилирования, ацилирования, убиквитинирования или внутримолекулярного ковалентного связывания) аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и может активировать и рецептор глюкагона, и рецептор GLP-1. При замене или добавлении аминокислот можно использовать не только 20 аминокислот, обычно находящихся в белках человека, но также атипичные или неприродные аминокислоты. Коммерческие источники атипичных аминокислот включают фирмы Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, включающие эти аминокислоты, и атипичные пептидные последовательности могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например American Peptide Company или Bachem (USA) или Anygen (Korea).

Как оно раскрыто в данном описании, производное оксинтомодулина представляет собой новый пептид, содержащий аминокислотную последовательность следующей формулы 1:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (SEQ ID NO:50) (формула 1),

где

R1 представляет собой гистидин, дезаминагистидил, диметилгистидил (N-диметилгистидил), бета-гидроксиимидазопропионил, 4-имидазоацетил, бета-карбоксиимидазопропионил или тирозин;

X1 представляет собой Aib (аминоизомасляную кислоту), d-аланин, глицин, Sar (N-метилглицин), серии или d-серин;

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

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

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

X11 представляет собой аланин, аргинин или валин или отсутствует;

X12 представляет собой аланин, аргинин, серии или валин или отсутствует;

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

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

X15 представляет собой фенилаланин или отсутствует;

X16 представляет собой изолейцин или валин или отсутствует;

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

X18 представляет собой триптофан или отсутствует;

X19 представляет собой аланин, изолейцин, лейцин, серии или валин или отсутствует;

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

X21 представляет собой аспарагин или отсутствует;

X22 представляет собой аланин, глицин или треонин или отсутствует;

X23 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует;

X24 представляет собой пептид, имеющий от 2 до 10 аминокислот, состоящий из комбинации аланина, глицина и серина, или отсутствует; и

R2 представляет собой KRNRNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 40) или отсутствует (за исключением случая, где аминокислотная последовательность формулы 1 идентична SEQ ID NO: 1).

С целью повышения активности оксинтомодулина дикого типа по отношению к рецептору глюкагона и к рецептору GLP-1 производное оксинтомодулина, как оно раскрыто в данном описании, может быть замещено 4-имидазоацетиллом, полученным путем делеции альфа-углерода гистидина в положении 1 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, дезаминагистидилом, полученным путем делеции N-концевой аминокислотной группы, диметилгистидилом (N-диметилгистидилом), полученным путем модификации N-концевой аминокислотной группы двумя металльными группами, бета-гидроксиимидазопропиониллом, полученным путем замещения N-концевой аминокислотной группы гидроксильной группой, или бета-карбоксиимидазопропиониллом, полученным путем замещения N-концевой аминокислотной группы карбоксильной группой. Кроме того, рецепторсвязывающая область GLP-1 может быть замещена аминокислотами, уси-

ливающими гидрофобные и ионные связи или их комбинацию. Кроме того, часть последовательности окситомодулина может быть замещена аминокислотной последовательностью GLP-1 или эксендина-4, чтобы повысить активность рецептора GLP-1.

Кроме того, часть последовательности окситомодулина может быть замещена последовательностью, усиливающей альфа-спираль. Предпочтительно аминокислоты в положениях 10, 14, 16, 20, 24 и 28 аминокислотной последовательности формулы 1 могут быть замещены аминокислотами или производными аминокислот, состоящими из следующих: Tyr(4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO<sub>2</sub>), Phe(4-NH<sub>2</sub>), Phg, Pal, Nal, Ala(2-тиенил) и Ala(бензотиенил), о которых известно, что они стабилизируют альфа-спираль, и тип и число встраиваемых аминокислот или производных аминокислот, стабилизирующих альфа-спираль, не ограничено. Предпочтительно аминокислоты в положениях 10 и 14, 12 и 16, 16 и 20, 20 и 24 и 24 и 28 аминокислотной последовательности могут быть также замещены глутаминовой кислотой или лизином, чтобы образовать кольца, и число встраиваемых колец не ограничено. Наиболее предпочтительно производное окситомодулина может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из формул 2-6.

Как оно раскрыто в данном описании, производное окситомодулина представляет собой, в частности, новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 2, полученной путем замещения аминокислотной последовательности окситомодулина последовательностью эксендина или GLP-1

R1-A-R3 (SEQ ID NO:51) (формула 2),

Другое производное окситомодулина, как оно раскрыто в данном описании, представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 3, полученную путем связывания части аминокислотной последовательности окситомодулина и части аминокислотной последовательности эксендина или GLP-1 посредством соответствующего аминокислотного линкера

R1-B-C-R4 (SEQ ID NO:52) (формула 3),

Другое производное окситомодулина, как оно раскрыто в данном описании, представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 4, где часть аминокислотной последовательности окситомодулина замещена аминокислотой, усиливающей гидрофобное связывание с рецептором GLP-1. Например, он представляет собой пептид, где Leu в положении 26 замещен аминокислотой Ile или Val, усиливающей гидрофобность

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (SEQ ID NO:53) (формула 4).

Другое производное окситомодулина, как оно раскрыто в данном описании, представляет собой новый пептид, включающий аминокислотную последовательность приведенной ниже формулы 5, где часть аминокислотной последовательности нативного окситомодулина deletирована, добавлена или замещена другими аминокислотами с целью повышения способностей нативного окситомодулина к активации рецептора GLP-1 и рецептора глюкокагона

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5 (SEQ ID NO:54) (Формула 5),

В формулах 2-5 R1 является таким, как описано в формуле 1;

А выбран из группы, состоящей из SQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46) и SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47);

В выбран из группы, состоящей из SQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46), SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO: 48) и SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO: 49);

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

D1 представляет собой серин, глутаминовую кислоту или аргинин;

D2 представляет собой аргинин, глутаминовую кислоту или серин;

D3 представляет собой аргинин, аланин или валин;

D4 представляет собой аргинин, валин или серин;

D5 представляет собой глутамин, аргинин или лизин;

D6 представляет собой изолейцин, валин или серин;

D7 представляет собой метионин, аргинин или глутамин;

D8 представляет собой треонин, глицин или аланин;

E1 представляет собой серин, Aib, Sar, d-аланин или d-серин;

E2 представляет собой серин или глутаминовую кислоту;

E3 представляет собой аргинин или лизин;

E4 представляет собой глутамин или лизин;

E5 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

E6 представляет собой глутамин, цистеин или лизин;

E7 представляет собой цистеин или лизин или отсутствует;

R3 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) или GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37);

R4 представляет собой HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) или HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 40); и

R5 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) или GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37) или deletирован (за исключением случая, где аминокислотные последовательности формул 2-5 идентичны SEQ ID NO: 1).

Еще одно производное оксинтомодулина, как оно раскрыто в данном описании, может представлять собой новый пептид приведенной ниже формулы 6:

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (SEQ ID NO: 55) (формула 6),

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

X1 представляет собой Aib (аминоизомасляную кислоту), глицин, серин или d-серии;

X2 представляет собой глутаминовую кислоту или глутамин;

X3 представляет собой лейцин или тирозин;

X4 представляет собой серин или аланин;

X5 представляет собой лизин или аргинин;

X6 представляет собой глутамин или тирозин;

X7 представляет собой лейцин или метионин;

X8 представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту;

X9 представляет собой глутаминовую кислоту или альфа-метил-глутаминовую кислоту или отсутствует;

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

X11 представляет собой аланин или аргинин или отсутствует;

X12 представляет собой аланин или валин или отсутствует;

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

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

X15 представляет собой фенилаланин или отсутствует;

X16 представляет собой изолейцин или валин или отсутствует;

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

X18 представляет собой триптофан или отсутствует;

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

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

X21 представляет собой аспарагин или отсутствует;

X22 представляет собой треонин или отсутствует;

X23 представляет собой цистеин, лизин или отсутствует;

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

R2 представляет собой KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) или HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 40) или отсутствует (за исключением случая, где аминокислотная последовательность формулы 6 идентична последовательности SEQ ID NO: 1).

Производное оксинтомодулина, как оно раскрыто в данном описании, может быть выбрано из группы, состоящей из пептидов SEQ ID NO: 2-34. Также производное оксинтомодулина, как оно раскрыто в данном описании, может представлять собой производное оксинтомодулина, описанное в табл. 1 примера 1.

Оксинтомодулин обладает активностями двух пептидов, GLP-1 и глюкагона. GLP-1 обладает эффектом, снижающим уровни глюкозы в крови посредством секреции инсулина, а глюкагон обладает эффектом, повышающим уровни глюкозы в крови. Кроме того, GLP-1 ингибирует потребление пищи и подавляет опорожнение желудка, а глюкагон обладает эффектом, снижающим массу тела посредством стимуляции липолиза и повышения энергетического метаболизма. Таким образом, GLP-1 и глюкагон обладают различными биологическими эффектами. Следовательно, в случае, когда оба пептида присутствуют в виде конъюгата, если эффект любого из этих двух пептидов превышает эффект другого, может произойти побочное действие. Например, если эффект глюкагона выше, чем эффект GLP-1, уровни глюкозы в крови могут увеличиться, а если эффект GLP-1 выше, чем эффект глюкагона, могут встречаться

побочные эффекты, такие как тошнота и рвота. Кроме того, эффект этих двух пептидов может варьировать в зависимости от соотношения активностей этих двух пептидов. Следовательно, производные оксинтомодулина и их конъюгаты не ограничены только производными, обладающими повышенными активностями.

Как используют в данном описании, термин "конъюгат производного оксинтомодулина" относится к конъюгату, содержащему производное оксинтомодулина и другой элемент. Этот другой элемент может представлять собой любое вещество, обладающее полезными функциями, включающими увеличение периода полувыведения производного оксинтомодулина в крови или замедление высвобождения производного оксинтомодулина в почках. Конъюгат по настоящему изобретению может ковалентно связываться с производным оксинтомодулина или образовывать микросферы, что повышает сывороточную стабильность производного оксинтомодулина или замедляет высвобождение производного оксинтомодулина в почках, либо изменяет связывающую активность производного оксинтомодулина с его рецептором. Носитель, который может образовать конъюгат, содержащий производное оксинтомодулина, может быть выбран из группы, состоящей из альбумина, трансферрина, антител, фрагментов антител, эластина, гепарина, полисахарида, такого как хитин, фибронектин и тому подобное, который может связываться с производным оксинтомодулина, повышая сывороточную стабильность производного оксинтомодулина. Предпочтительно носитель представляет собой область Fc иммуноглобулина.

Fc иммуноглобулина, который можно применять в настоящем изобретении, может представлять собой область Fc иммуноглобулина человека, область Fc иммуноглобулина, имеющий последовательность его аналога, или область Fc иммуноглобулина, происходящую из животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок. Кроме того, область Fc иммуноглобулина может происходить из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации или их гибрида. Кроме того, каждый домен области Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой гибридный домен, происходящих из разных иммуноглобулинов, выбранных из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM. Альтернативно область Fc иммуноглобулина представляет собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов, состоящих из доменов одинакового происхождения. Предпочтительно область Fc иммуноглобулина представляет собой область, полученную из IgG или IgM, являющихся самыми распространенными белками в крови человека. Наиболее предпочтительно она представляет собой Fc иммуноглобулина, происходящую из IgG, о которой известно, что она увеличивает периоды полувыведения лигандсвязывающих белков. Fc иммуноглобулина может быть получена либо путем обработки нативного IgG специфичной протеазой, либо из трансформированных клеток с помощью рекомбинантного метода. Предпочтительно она представляет собой рекомбинантную Fc иммуноглобулина человека, полученную в *E. coli*.

В то же время IgG может быть также разделен на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и в настоящем изобретении также возможны комбинация или гибриды этих подклассов. Предпочтительно IgG относится к подклассам IgG2 и IgG4 и наиболее предпочтительно к IgG4, у области Fc которого, по существу, отсутствуют эффекторные функции, такие как комплементзависимая цитотоксичность (complement-dependent cytotoxicity; CDC). Иными словами, наиболее предпочтительной областью Fc иммуноглобулина, используемой в качестве носителя лекарственного средства в настоящем изобретении, является негликозилированная область Fc, происходящая из IgG4 человека. Область Fc человеческого происхождения более предпочтительна, чем область Fc происхождения, отличающегося от человеческого, которая может действовать в качестве антигена в организме человека и вызывать нежелательные иммунные ответы, такие как продуцирование нового антитела против антигена.

Конъюгат производного оксинтомодулина может быть получен путем использования непептидильного полимера или методом генной рекомбинации. В настоящем изобретении конъюгат получают путем связывания производного оксинтомодулина с областью Fc иммуноглобулина посредством непептидильного полимера.

Непептидильный полимер может быть связан с каждой из молекул: производным оксинтомодулина и областью Fc иммуноглобулина. Каждый конец непептидильного полимера может быть связан с областью Fc иммуноглобулина и аминной или тиольной группой производного оксинтомодулина соответственно.

Как используют в данном описании, термин "конъюгат производного оксинтомодулина" относится к конъюгату, обладающему пролонгированным длительным эффектом по сравнению с нативным оксинтомодулином. Примеры конъюгата длительного действия включают, но не ограничены ими, конъюгат, в котором производное оксинтомодулина, полученное в результате модификации, замены, добавления или делеции аминокислот в аминокислотной последовательности нативного оксинтомодулина, связано с биоразлагаемым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), конъюгат, в котором белок, обладающий превосходными свойствами длительного действия, такой как альбумин или иммуноглобулин, связан с производным оксинтомодулина, конъюгат, в котором жирная кислота, обладающая способностью к связыванию с альбумином *in vivo*, связана с производным оксинтомодулина, или конъюгат, в котором производное оксинтомодулина инкапсулировано в биоразлагаемых наночастицах.

Как используют в данном описании, термин "непептидильный полимер" относится к биосовместимому



мому полимеру, включающему два или более повторяющихся звена, связанных друг с другом любой ковалентной связью вместо пептидной связи. В настоящем изобретении непептидильный полимер можно использовать взаимозаменяемо с непептидильным линкером.

Пептидный линкер, используемый в слитом белке, полученном традиционным способом слияния в рамке считывания, имеет недостатки, состоящие в том, что он легко расщепляется протеиназой *in vivo*, и, следовательно, желаемый эффект увеличения периода полувыведения активного лекарственного средства в сыворотке за счет носителя не может быть получен. Тем не менее, в настоящем изобретении можно использовать полимер, обладающий устойчивостью к протеиназе, для поддержания периода полувыведения пептида в сыворотке аналогично носителю. Таким образом, в настоящем изобретении можно использовать любой непептидильный полимер без ограничения, если он представляет собой полимер, обладающий упомянутой выше функцией, то есть полимер, обладающий устойчивостью к протеиназе *in vivo*. Непептидильный полимер имеет молекулярную массу в диапазоне от 1 до 100 кДа и предпочтительно от 1 до 20 кДа. Непептидильный полимер по настоящему изобретению, связанный с областью Fc иммуноглобулина, может представлять собой один вид полимера или комбинацию разных полимеров.

Непептидильный полимер, используемый в настоящем изобретении, может иметь активную группу, способную к связыванию с областью Fc иммуноглобулина и белковым лекарственным средством. Активная группа на обоих концах непептидильного полимера предпочтительно выбрана из группы, состоящей из активной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и производного сукцинимиды.

Производное сукцинимиды может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, когда непептидильный полимер имеет активную альдегидную группу на его обоих концах, неспецифические взаимодействия можно свести к минимуму, и физиологически активный полипептид и иммуноглобулин могут быть эффективно связаны с обоими концами непептидильного полимера соответственно. Конечный продукт, образованный путем восстановительного алкилирования альдегидной связью, значительно более стабилен, чем связанный амидной связью. Альдегидная активная группа селективно связывается с N-концом при низком pH и может образовать ковалентную связь с остатком лизина при высоком pH, таком как pH 9,0.

Активные группы на обоих концах линкера, то есть непептидильного полимера, могут быть одинаковыми или разными. Например, непептидильный полимер может содержать на одном конце малеимидную группу, а на другом конце альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу. Для получения конъюгата длительного действия по настоящему изобретению при использовании в качестве непептидильного полимера полиэтиленгликоля, содержащего активную гидроксигруппу на его обоих концах, эта гидроксигруппа может быть активирована с образованием различных активных групп с помощью известных химических реакций, либо можно использовать полиэтиленгликоль, содержащий имеющуюся в продаже модифицированную активную группу.

Конъюгат по настоящему изобретению может представлять собой конъюгат, в котором каждый конец непептидильного полимера связан с областью Fc иммуноглобулина и с аминной или тиольной группой производного окситомодулина соответственно.

При этом в настоящем изобретении оба конца непептидильного полимера включают активные группы, с которыми может быть связана область Fc иммуноглобулина и белковое лекарственное средство. Примеры активных групп включают, но не ограничены ими, альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу, малеимидную группу, производное сукцинимиды (сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилпропионаткарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат) и тому подобное.

Активные группы на обоих концах линкера, то есть непептидильного полимера, могут быть одинаковыми или разными. Например, непептидильный полимер может содержать на одном конце малеимидную группу, а на другом конце альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу. Например, когда непептидильный полимер содержит активную альдегидную группу на одном конце и активную малеимидную группу на другом конце, неспецифические взаимодействия можно свести к минимуму, и физиологически активный полипептид и иммуноглобулин могут быть эффективно связаны с обоими концами непептидильного полимера. Непептидильный полимер, который можно использовать в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоля/пропиленгликоля, поливинилового спирта, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемых полимеров, таких как PLA (полимолочная кислота) и PLGA (полимолочно-гликолевая кислота), липидных полимеров, гиалуроновой кислоты и их комбинаций. Предпочтительно непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль. Кроме того, его производные, известные в данной области техники, и производные, которые могут быть легко получены способом, известным в данной области техники, также включены в объем настоящего изобретения.

В примере настоящего изобретения конъюгат синтезировали путем связывания окситомодулина или его производного с областью Fc иммуноглобулина посредством ковалентной связи, используя непептидильный полимер ПЭГ, включающий одну пропиональдегидную группу или обе группы, малеи-

мидную и альдегидную.

Конъюгат по настоящему изобретению обладает превосходными активностями по отношению к рецептору GLP-1 и к рецептору глюкагона по сравнению с нативным окситомодулином. Кроме того, он связан с областью Fc, что увеличивает период полувыведения из крови *in vivo* для поддержания его активности *in vivo* в течение длительного периода времени.

Как используют в данном описании, термин "консервант" относится к веществу, используемому для предотвращения аномальных взаимодействий или распада, вызванных микробным загрязнением. Жидкая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать консервант. Консервант, как правило, применяют в композициях многократного дозирования, которые с наибольшей вероятностью загрязняются микроорганизмами, но не только в них, и может также применяться в лиофилизированных композициях или композициях однократного дозирования для предотвращения загрязнения микроорганизмами. Жидкая композиция по настоящему изобретению может содержать один или более чем один консервант, выбранный из метакрезола, фенола и бензилового спирта. Концентрация консерванта в жидкой композиции может составлять 0,001-1% (мас./об.). В частности, консервант, включенный в жидкую композицию по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой метакрезол. Жидкая композиция по настоящему изобретению может представлять собой композицию для введения многократных доз.

В данном описании также раскрыта фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения ожирения или диабета, содержащая описанную выше жидкую композицию.

Как используют в данном описании, термин "предупреждение" относится ко всем действиям, ингибирующим или замедляющим развитие заболевания-мишени. Как используют в данном описании, термин "предупреждение" означает введение конъюгата по настоящему изобретению для ингибирования или замедления развития диабетических состояний, таких как аномальные уровни глюкозы в крови или аномальная секреция инсулина, или состояний ожирения, таких как увеличение массы тела или жировой ткани.

Как используют в данном описании, термин "лечение" относится ко всем действиям, облегчающим, улучшающим или ослабляющим симптомы развившегося заболевания. Как используют в данном описании, термин "лечение" означает введение конъюгата по настоящему изобретению для облегчения, улучшения или ослабления описанных выше диабетических состояний или состояний ожирения для нормализации уровней глюкозы в крови и секреции инсулина, а также уменьшения массы тела или жировой ткани.

Как используют в данном описании, термин "ожирение" относится к избыточному количеству жировой ткани. Индекс массы тела (=масса (кг), деленная на рост (м)), равный 25 или более, определяют как ожирение. Ожирение, как правило, является результатом нарушения энергетического баланса, при котором потребление энергии превышает затраты энергии. Ожирение представляет собой метаболическое заболевание, влияющее на весь организм и с высокой вероятностью приводящее к диабету и гиперлипидемии. Кроме того, ожирение связано с половой дисфункцией, артритом и повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также в некоторых случаях связано с развитием рака.

Как используют в данном описании, термин "диабет" представляет собой вид метаболического заболевания, при котором секреция инсулина недостаточна или нормальные функции не выполняются. Диабет характеризуется повышенными уровнями глюкозы в крови и вызывает различные проблемы со здоровьем. В случае диабета глюкоза выводится с мочой.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Как используют в данном описании, термин "фармацевтически приемлемый" означает количество, достаточное для проявления терапевтических эффектов и не вызывающее побочных эффектов. Доза активного ингредиента фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть легко определена специалистами в данной области техники в зависимости от типа заболевания, возраста пациента, массы, состояния здоровья, пола и чувствительности к лекарственному средству, пути введения, режима введения, частоты введения, продолжительности лечения, лекарственных средств, применяемых в комбинации или одновременно с композицией по данному изобретению, и от других факторов, известных в области медицины.

Также в данном описании раскрыт способ предупреждения или лечения ожирения или диабета, включающий введение субъекту жидкой композиции.

В данном случае жидкая композиция, ожирение и диабет являются такими, как описано выше.

Как используют в данном описании, термин "субъект" относится к субъекту с подозрением на ожирение или диабет. В частности, этот термин означает млекопитающих, включая людей, крыс и домашних животных, страдающих или обладающих риском развития описанного выше заболевания. Кроме того, субъект может представлять собой любого субъекта, которого можно лечить жидкой композицией производного по настоящему изобретению.

Терапевтический способ может включать введение фармацевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей жидкую композицию. Суммарная суточная доза композиции может быть определена на основании соответствующего медицинского заключения врача, и компо-

зицию можно вводить один раз или несколько раз. Однако в свете цели настоящего изобретения конкретная терапевтически эффективная доза композиции для какого-либо конкретного пациента может варьировать в зависимости от различных факторов, хорошо известных в области медицины, включающих вид и степень ответа, который должен быть достигнут, конкретные композиции в том отношении, применяют ли совместно с ними другие ингредиенты, возраст пациента, массу тела, состояние здоровья, пол и режим питания, время и путь введения, скорость секреции композиции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с композицией по настоящему изобретению, а также другие факторы, известные в области медицины.

#### **Полезные эффекты изобретения**

Жидкая композиция по изобретению, содержащая конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия, содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество и не содержит сывороточный альбумин человека и факторы, являющиеся потенциально вредными для организма человека, и, таким образом, нечувствительна к вирусной инфекции. Кроме того, конъюгат производного оксинтомодулина по настоящему изобретению содержит производное оксинтомодулина, связанное с областью Fc иммуноглобулина, и, таким образом, обладает большой молекулярной массой, длительной физиологической активностью и превосходной стабильностью при хранении по сравнению с нативным оксинтомодулином.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1a показан график, на котором представлены результаты, полученные при очистке моноэтилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) на колонке для очистки SOURCE S.

На фиг. 1b показан график, на котором представлены результаты, полученные при очистке конъюгата моноэтилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE 15Q.

На фиг. 1c показан график, на котором представлены результаты, полученные при очистке конъюгата моноэтилированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE ISO.

На фиг. 2a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH с помощью ИО-ВЭЖХ в примере 3 после 0-2 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 2a демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 2b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH с помощью Э-ВЭЖХ в примере 3 после 0-2 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 2b демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 2c показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH с помощью ОФ-ВЭЖХ в примере 3 после 0-2 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 2c демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 3a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и присутствия или отсутствия изотонического агента с помощью ИО-ВЭЖХ в примере 4 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 3a демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 3b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и присутствия или отсутствия изотонического агента с помощью Э-ВЭЖХ в примере 4 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 3b демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 3c показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и присутствия или отсутствия изотонического агента с помощью ОФ-ВЭЖХ в примере 4 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 3c демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 4a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от



На фиг. 8a показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от присутствия или отсутствия консерванта и концентрации производного оксинтомодулина длительного действия с помощью ИО-ВЭЖХ в примере 9 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 8a демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 8b показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от присутствия или отсутствия консерванта и концентрации производного оксинтомодулина длительного действия с помощью Э-ВЭЖХ в примере 9 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 8b демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

На фиг. 8c показана графическая диаграмма, на которой представлены результаты, полученные при оценке стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от присутствия или отсутствия консерванта и концентрации производного оксинтомодулина длительного действия с помощью ОФ-ВЭЖХ в примере 9 после 0-4 недель хранения при 25°C. Каждый график на фиг. 8c демонстрирует процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины.

### Осуществление изобретения

Далее настоящее изобретение описано более подробно со ссылкой на примеры. Тем не менее, понятно, что эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1. Синтез оксинтомодулина и производных оксинтомодулина.

С целью измерения стабильностей оксинтомодулина и производных оксинтомодулина в жидкой композиции были синтезированы производные оксинтомодулина, имеющие аминокислотные последовательности, показанные в табл. 1 ниже.

Таблица 1

#### Оксинтомодулин и производные оксинтомодулина

SEQ ID NO	Последовательность
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAVLKNTGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 6	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD
SEQ ID NO: 7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 8	CA-SQGTFTSDLSRQLEEEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID NO: 9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 11	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYLDK
SEQ ID NO: 12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGHGEGTFTSDLSKQMEEEAVK
SEQ ID NO: 13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIXWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 16	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGHSGQGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID NO: 17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 19	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 20	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTK
SEQ ID NO: 23	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID NO: 24	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 25	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 26	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 27	HAibQGTFTSDYSKYLDEQAARKFICWLMNT
SEQ ID NO: 28	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID NO: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 33	HAibQGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 34	YAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

В приведенной выше таблице аминокислотные остатки, указанные полужирным шрифтом, обозначают аминокислоты, образующие кольца, и аминокислотные остатки, указанные как X, означают альфа-метилглутаровую кислоту, не являющуюся нативной аминокислотой. Кроме того, CA означает 4-имидазоацетил, DA означает дезаминогистидил, а (d)S означает d-серин.

Пример 2. Получение конъюгата, содержащего производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина (производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25), связанное с областью Fc иммуноглобулина).

Во-первых, для пэгирования MAL-10K-ALD PEG по остатку цистеина в аминокислотном положении 30 производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) давали возможность взаимодействовать друг с другом производному оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и MAL-10K-ALD PEG в молярном отношении 1:3 и при концентрации белка 3 мкг/мл при комнатной температуре в течение 3 ч. В данном случае реакцию проводили в 50 мМ Трис-буфере (pH 8,0) в присутствии 1 М гуанидина. После завершения реакции реакционный раствор наносили на колонку SOURCE S для очистки производного оксинтомодулина, монопэгированного по остатку цистеина (колонка: SOURCE S, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0→100% 50 мин B (A: 20 мМ Na-цитрат, pH 3,0+45% этанол, B: A+1M KCl)) (фиг. 1a). Фиг. 1a представляет собой график, на котором представлены результаты, полученные при очистке монопэгированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) на колонке для очистки SOURCE S.

Затем очищенное монопэгированное производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина подвергали взаимодействию друг с другом при молярном отношении 1:5 и концентрации белка 20 мг/мл при 4°C в течение 16 ч. Реакцию проводили в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 6,0) в присутствии 20 мМ цианоборгидрида натрия (SCB) в качестве восстанавливающего агента. После завершения реакции реакционную смесь наносили на колонку для очистки SOURCE 15Q (колонка: SOURCE 15Q, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: A 0→4% 1 мин B→20% 80 мин B (A: 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, B: A+1 M NaCl)) (фиг. 1b) и на колонку для очистки SOURCE ISO (колонка: SOURCE ISO, скорость тока: 2,0 мл/мин, градиент: B 0→100% 100 мин A (A: 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, B: A+1,1 M сульфат аммония (CA)) (фиг. 1c) для очистки конъюгата, содержащего производное оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина. Фиг. 1b представляет собой график, на котором представлены результаты, полученные в результате очистки конъюгата монопэгированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE 15Q, и фиг. 1c представляет собой график, на котором представлены результаты, полученные в результате очистки конъюгата моно-пэгированного производного оксинтомодулина (SEQ ID NO: 25) и Fc иммуноглобулина на колонке для очистки SOURCE ISO.

Конъюгат производного оксинтомодулина, полученный, как описано выше, был разработан для увеличения периода полувыведения производного оксинтомодулина из крови. Он содержит область Fc иммуноглобулина, непептидильный полимер и производное оксинтомодулина, ковалентно связанные друг с другом сайт-специфическим путем, и обладает значительно увеличенным периодом полувыведения из крови.

Пример 3. Оценка стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH.

С целью оценки стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия (полученного в примере 2) в жидких композициях конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, показанных в табл. 2 при 25°C в течение 0-2 недель, а затем анализировали с помощью ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ИО-ВЭЖХ), эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э-ВЭЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ). Для хранения конъюгата производного оксинтомодулина использовали цитратный буфер в качестве буфера, маннит в качестве сахарного спирта и полисорбат 20 в качестве неионогенного поверхностно-активного вещества. В табл. 3-5 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что означает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 3 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 4 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 5 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 2

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	4,8	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,2	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#4	6,0	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#5	6,4	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл

Таблица 3

	ИО-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 недели	97,6	97,2	96,8	94,0	85,2

Таблица 4

	Э-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 недели	99,7	99,8	99,8	99,3	99,4

Таблица 5

	ОФ-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2 недели	83,0	84,4	86,7	65,5	74,0

Как видно из результатов ИО-ВЭЖХ (%) в табл. 3 выше, конъюгат производного оксинтомодулина был более стабильным при более низком pH. В результатах Э-ВЭЖХ в табл. 4 конъюгат производного оксинтомодулина был наиболее стабилен при pH 5,2, и по результатам ОФ-ВЭЖХ в табл. 5 конъюгат производного оксинтомодулина был наиболее стабилен при pH 5,6. Хотя стабильность при pH не различалась между способами анализа, различие в удержании между значениями pH была самой высокой при анализе с помощью ОФ-ВЭЖХ. Это позволяет предположить, что конъюгат производного оксинтомодулина был наиболее стабилен при pH 5,6.

Пример 4. Оценка стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от вида сахарного спирта и от присутствия или отсутствия изотонического средства.

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние вида сахарного спирта в качестве стабилизатора и присутствия или отсутствия хлорида натрия в качестве изотонического агента на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя цитратный буфер (pH 5,6), выбранный в примере 3, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в табл. 6 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В табл. 7-9 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ показана площадь %/исходная площадь %, что означает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 7 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 8 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 9 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 6

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 mM Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#2	5,6	20 mM Na-Цитрат	-	10% Сорбит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#3	5,6	20 mM Na-цитрат	-	10% Глицерин	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#4	5,6	20 mM Na-цитрат	150 mM NaCl	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл

Таблица 7

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	98,8	98,8	88,3	98,3
2 недели	97,2	96,9	79,0	95,0
3 недели	94,4	94,5	63,0	93,8
4 недели	91,6	91,8	55,8	91,6

Таблица 8

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,9	100,0	92,0	100,0
2 недели	99,7	99,8	84,7	99,9
3 недели	99,2	99,4	79,2	99,5
4 недели	98,4	98,6	76,0	98,8

Таблица 9

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	98,9	98,7	90,0	98,4
2 недели	96,0	95,6	80,6	95,0
3 недели	94,0	93,6	75,2	92,9
4 недели	92,6	91,1	70,0	90,1

Как видно из таблиц 6-9 выше, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был более стабильным в манните или сорбите, чем в глицерине, при одной и той же концентрации. Результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был немного стабильнее в манните, чем в сорбите. Кроме того, стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия значимо не различалась в зависимости от присутствия и отсутствия хлорида натрия в качестве изотонического средства.

Пример 5. Оценка стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации сахарного спирта.

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние концентрации сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя цитратный буфер (pH 5,6) и маннит, выбранные в приведенных выше примерах, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в табл. 10 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В табл. 11-13 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 11 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 12 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 13 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.



Таблица 10

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	2% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#2	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	5% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#4	5,6	20 мМ Na-Цитрат	-	15% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл

Таблица 11

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 неделя	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	79,7	98,7	98,8	79,0
2 недели	57,6	97,6	97,9	61,0
3 недели	39,8	97,1	97,2	49,2
4 недели	34,9	95,5	95,5	43,4

Таблица 12

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 неделя	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,3	99,4	100,0	99,5
2 недели	89,0	99,4	99,8	95,4
3 недели	79,4	99,3	99,4	90,5
4 недели	74,7	98,4	99,1	83,5

Таблица 13

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 неделя	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	89,8	93,2	98,2	95,2
2 недели	80,3	85,3	94,7	90,9
3 недели	71,9	78,5	91,1	84,1
4 недели	66,0	71,0	89,1	76,5

Как видно из табл. 10-13, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был стабилен в присутствии 5% маннита или 10% маннита. Однако в присутствии 2% маннита или 15% маннита образовывался осадок белка. Результаты ИО-ВЭЖХ или Э-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия был сходным между 10% маннитом и 5% маннитом. Результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия была выше в 10% манните, чем в 5% манните.

Пример 6. Оценка стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от концентрации поверхностно-активного вещества и присутствия или отсутствия аминокислоты.

Авторы настоящего изобретения протестировали влияние концентрации поверхностно-активного вещества в качестве стабилизатора и присутствия или отсутствия аминокислоты на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. Используя цитратный буфер (pH 5,6) и цитратный буфер и 10% маннит, выбранные в приведенных выше примерах, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в табл. 14 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В табл. 15-17 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 15 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 16 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 17 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 14

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 мМ Na-цитрат	-	10% Маннит	0,005% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#2	5,6	20 мМ Na-цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#3	5,6	20 мМ Na-цитрат	-	10% Маннит	0,05% Полисорбат 20	-	10 мг/мл
#4	5,6	20 мМ	-	10%	0,02%	0,1 мг/мл	10 мг/мл
		Na-цитрат		Маннит	Полисорбат 20	метионин	

Таблица 15

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	96,0	96,5	96,4	96,2
2 недели	95,1	94,7	95,1	95,3
3 недели	92,7	92,0	92,2	92,7
4 недели	89,7	89,1	89,2	89,7

Таблица 16

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,4	99,7	99,7	99,6
2 недели	99,3	99,5	99,2	99,3
3 недели	98,3	98,1	98,3	99,1
4 недели	97,3	97,1	97,3	97,9

Таблица 17

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,3	97,8	98,1	97,4
2 недели	79,2	79,2	77,5	79,7
3 недели	71,5	71,6	69,5	73,3
4 недели	65,1	65,0	65,0	67,8

Как видно из результатов в табл. 14-17, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был наиболее стабильным в композиции, содержащей 0,02% полисорбат 20 и 0,1 мг/мл метионина.

Пример 7. Оценка стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH и концентрации сахарного спирта.

Авторы настоящего изобретения исследовали влияние pH и концентрации сахарного спирта в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя 0,02% полисорбат 20 и 0,1 мг/мл метионина, выбранных в описанных выше примерах, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в табл. 18 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В табл. 19-21 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 19 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 20 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 21 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 18

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,2	20 мМ Na-цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,2	20 мМ Na-цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#3	5,2	20 мМ Na-цитрат	-	15% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#4	5,6	20 мМ Na-цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#5	5,6	20 мМ Na-цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#6	5,6	20 мМ Na-цитрат	-	15% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
		Na-цитрат		Маннит	Полисорбат 20	Метионин	
#7	6,0	20 мМ Na-цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#8	6,0	20 мМ Na-цитрат	-	10% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#9	6,0	20 мМ Na-цитрат	-	15% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл

Таблица 19

	ИО-ВЭЖХ (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,4	99,6	97,1	97,2	97,6	98,0	90,6	92,9	93,4
2 недели	97,5	97,8	90,5	93,8	94,1	93,2	81,5	83,6	85,6
3 недели	93,0	93,6	82,6	86,0	86,9	87,1	71,2	74,6	77,0
4 недели	90,0	90,5	71,1	85,0	85,6	85,7	62,7	66,3	68,9

Таблица 20

	Э-ВЭЖХ (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	98,8	99,5	98,8	99,5	99,3	98,5	99,6	100,0	100,7
2 недели	98,8	99,1	91,1	98,4	97,1	96,9	97,3	98,3	97,9
3 недели	97,7	98,3	96,4	98,1	98,4	98,2	98,1	99,1	100,8
4 недели	98,0	98,5	94,9	97,9	98,3	98,3	97,6	98,2	99,0

Таблица 21

	ОФ-ВЭЖХ (%)								
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	78,2	78,2	42,1	88,2	90,7	89,4	99,9	99,1	100,7
2 недели	60,7	58,6	-	80,4	80,2	80,6	96,8	93,4	92,0
3 недели	47,5	41,9	-	79,4	77,3	69,8	97,6	92,8	93,6
4 недели	34,8	28,0	-	72,8	65,0	62,6	96,9	91,1	88,9

Как видно из результатов в приведенных выше таблицах, результаты ИО-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия была выше при значениях pH порядка pH 5,2, pH 5,6 и pH 6,0. Результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия была выше при значениях pH порядка pH 6,0, pH 5,6 и pH 5,2. Результаты Э-ВЭЖХ показали, что стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия значимо не различаются при pH 5,2, pH 5,6 и pH 6,0. Иными словами, результаты ИО-ВЭЖХ, ОФ-ВЭЖХ и Э-ВЭЖХ показали, что конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был стабилен при pH 5,6.

В то же время результаты ИО-ВЭЖХ и Э-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия значимо не различаются между концентрациями маннита при pH 5,6. Однако результаты ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат производного оксинтомодулина дли-

тельного действия был более стабильным в 5% манните, чем в 10 или 15% манните при pH 5,6.

Пример 8. Оценка стабильности конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия в зависимости от pH и вида буфера.

Авторы настоящего изобретения исследовали влияния pH и вида буфера в качестве стабилизатора на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя 0,02% полисорбат 20, 0,1 мг/мл метионина и 5% маннит, выбранные в приведенных выше примерах, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в табл. 22 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ.

В табл. 23-25 ниже ИО-ВЭЖХ (%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 23 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 24 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 25 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 22

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	20 mM Na-цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,8	20 mM Na-цитрат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#3	5,8	20 mM Na-ацетат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#4	5,8	10 mM гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#5	5,8	10 mM Na-фосфат	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл

Таблица 23

	ИО-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,6	96,8	96,5	97,2	96,1
2 недели	93,9	91,4	90,6	92,6	89,6
3 недели	90,4	88,1	86,9	89,2	84,4
4 недели	90,1	87,0	84,8	87,4	81,7

Таблица 24

	Э-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,4	99,8	99,8	99,7	99,7
2 недели	100,5	100,2	100,0	100,0	99,3
3 недели	100,4	100,2	99,1	99,6	98,2
4 недели	100,1	99,2	99,0	98,8	97,7

Таблица 25

	ОФ-ВЭЖХ (%)				
	#1	#2	#3	#4	#5
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,1	97,2	99,4	99,5	99,0
2 недели	97,6	97,7	99,4	99,8	99,3
3 недели	96,1	98,7	97,2	98,9	97,4
4 недели	98,0	96,6	97,6	98,3	98,1

Как видно из результатов в табл. 23-25, результаты Э-ВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия значимо не различается между pH 5,6 и pH 5,8. Результаты ИО-ВЭЖХ показали, что конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был более стабильным при pH 5,6, чем при pH 5,8. Результаты Э-ВЭЖХ показали, что стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия значимо не различается ме-

жду буферами при одном и том же pH. Кроме того, результаты ИО-ВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ показали, что конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия был наиболее стабильным в гистидине при одном и том же pH.

Пример 9. Оценка влияния присутствия или отсутствия консерванта и концентрации конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия.

Авторы настоящего изобретения исследовали влияния присутствия или отсутствия консерванта в качестве стабилизатора и конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия на стабильность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия. В частности, используя гистидиновый буфер (pH 5,6), 0,02% полисорбат 20, 0,1 мг/мл метионина и 5% маннит, выбранные в приведенных выше примерах, конъюгат производного оксинтомодулина длительного действия хранили в композициях, представленных в табл. 26 ниже, при 25°C в течение 0-4 недель, а затем анализировали с помощью ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ. В табл. 27, 28 и 29 ниже ИО-ВЭЖХ(%), Э-ВЭЖХ (%) и ОФ-ВЭЖХ (%) показана площадь %/исходная площадь %, что показывает процент удерживания конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия относительно исходной величины. В табл. 27 показана площадь (%) ИО-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, в табл. 28 показана площадь (%) Э-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения, и в табл. 29 показана площадь (%) ОФ-ВЭЖХ конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия после хранения.

Таблица 26

	pH	Буфер	Изотонический агент	Сахарный спирт	Поверхностно-активное вещество	Другое	Оксинтомодулин длительного действия
#1	5,6	10 mM Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	10 мг/мл
#2	5,6	10 mM Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин 0,27% мета-крезол	10 мг/мл
#3	5,6	10 mM Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин	40 мг/мл
#4	5,6	10 mM Гистидин	-	5% Маннит	0,02% Полисорбат 20	0,1 мг/мл Метионин 0,27% мета-крезол	40 мг/мл

Таблица 27

	ИО-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	97,9	98,2	97,7	97,1
2 недели	95,3	95,7	95,1	94,3
3 недели	93,6	92,9	93,4	91,8
4 недели	91,3	90,4	90,2	88,4

Таблица 28

	Э-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	99,7	99,6	99,5	99,4
2 недели	99,3	99,1	99,0	97,9
3 недели	99,1	98,9	98,7	97,0
4 недели	98,8	98,0	98,0	95,4

Таблица 29

	ОФ-ВЭЖХ (%)			
	#1	#2	#3	#4
0 недель	100,0	100,0	100,0	100,0
1 неделя	100,1	100,0	99,8	99,7
2 недели	99,4	99,5	99,2	99,1
3 недели	98,3	98,3	98,8	98,5
4 недели	98,8	97,9	97,7	97,4

Как видно в табл. 26-29, результаты ИО-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ или ОФ-ВЭЖХ показали, что стабиль-

ность конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия не изменилась даже в присутствии консерванта и не различалась в зависимости от его концентрации.

Хотя в иллюстративных целях раскрыты предпочтительные воплощения настоящего изобретения, специалистам в данной области техники понятно, что возможны различные модификации, дополнения и замены без отклонения от объема и сущности изобретения, раскрытого в прилагаемой формуле изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содержащая

фармакологически активное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где этот конъюгат производного оксинтомодулина содержит

производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-23, 27 или 29-34;

область Fc иммуноглобулина (Ig) и

непептидильный полимер, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля, поливиниловый спирт, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA), полимолочно-гликолевую кислоту (PLGA); липидный полимер; гиалуроновую кислоту или их комбинацию, и где этот непептидильный полимер ковалентно связывает производное оксинтомодулина и область Fc Ig;

и не содержащий альбумин стабилизатор, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

2. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.1, где стабилизатор дополнительно содержит один/одну или более изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов или аминокислот.

3. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.1 или 2, где область Fc Ig представляет собой область Fc IgG4, предпочтительно область Fc агликозифицированного IgG4 человека.

4. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.1-3, где непептидильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

5. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.1-4, где сахарный спирт представляет собой один или более чем один из маннита, сорбита или глицерина.

6. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.5, где концентрация сахарного спирта в жидкой композиции составляет 2-15% (мас./об.).

7. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 1-6, где буфер представляет собой один или более чем один из цитратного, ацетатного, гистидинового или фосфатного буфера.

8. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.1-7, где буфер имеет pH в диапазоне от 4,5 до 7,0.

9. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.2-8, где изотонический агент представляет собой хлорид натрия.

10. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.1-9, где неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полксамер.

11. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.10, где концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества в жидкой композиции составляет 0,001-0,1% (мас./об.).

12. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.2-11, где аминокислота представляет собой метионин.

13. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.1-12, где стабилизатор содержит буфер, имеющий pH в диапазоне от 4,8 до 6,0, один или более чем один из маннита или сорбита и полисорбат 20.

14. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп.1-13, дополнительно содержащая один или более чем один консервант, где этот консервант представляет собой метакрезол, фенол или бензиловый спирт, предпочтительно метакрезол.

15. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.14, где концентрация консерванта в жидкой композиции составляет 0,001-1% (мас./об.).

16. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.14, представляющая собой композицию для введения многократных доз.

17. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, содер-

жащая

фармакологически эффективное количество конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, где этот конъюгат производного оксинтомодулина содержит

производное оксинтомодулина, представляющее собой физиологически активный пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2-23, 27 или 29-34;

область Fc Ig и

непептидный полимер, где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля/пропиленгликоля, поливиниловый спирт, поливинилэтиловый эфир, полимолочную кислоту (PLA), полимолочно-гликолевую кислоту (PLGA); липидный полимер; гиалуроновую кислоту или их комбинацию, и где этот непептидный полимер ковалентно связывает производное оксинтомодулина и область Fc Ig;

и 5-50 мМ гистидина, 2-15% (мас./об.) маннита, 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (мас./об.) полисорбата 20.

18. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по п.17, где непептидный полимер представляет собой полиэтиленгликоль.

19. Жидкая композиция конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия по любому из пп. 17 или 18, дополнительно содержащая 0,001-1% (мас./об.) метакрезола.

20. Способ получения жидкой композиции по любому из пп.1-13, включающий следующие стадии:

а) получение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия; и

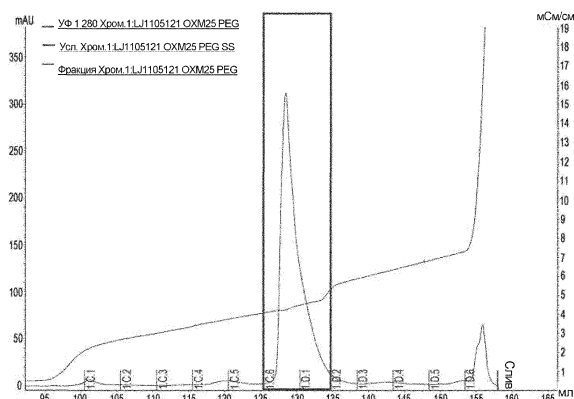
б) смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии (а), с не содержащим альбумин стабилизатором, который содержит буфер, сахарный спирт и неионогенное поверхностно-активное вещество.

21. Способ получения жидкой композиции по п.17 или 18, включающий следующие стадии:

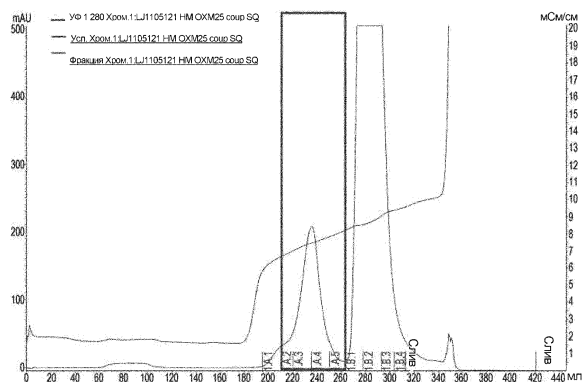
а) получение конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия; и

б) смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии (а), с 5-50 мМ гистидина, 2-15% (мас./об.) маннита, 0,01-1 мг/мл метионина и 0,001-0,1% (мас./об.) полисорбата 20.

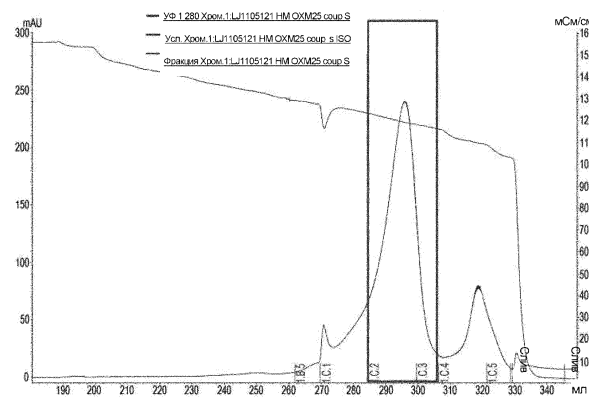
22. Способ по п.20 или 21, дополнительно включающий смешивание конъюгата производного оксинтомодулина длительного действия, полученного на стадии (а), с одним/одной или более изотонических агентов, сахаров, многоатомных спиртов, аминокислот, консервантов или их комбинацией.



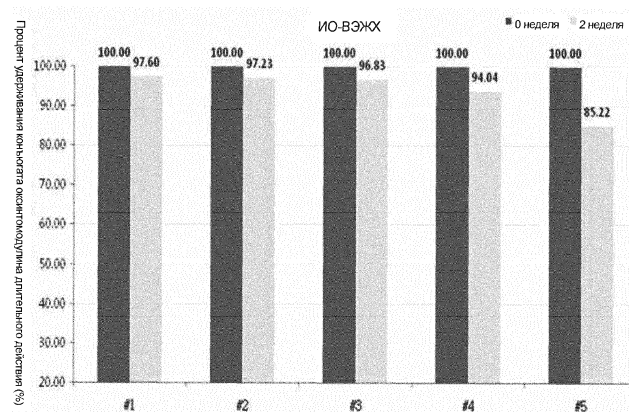
Фиг. 1а



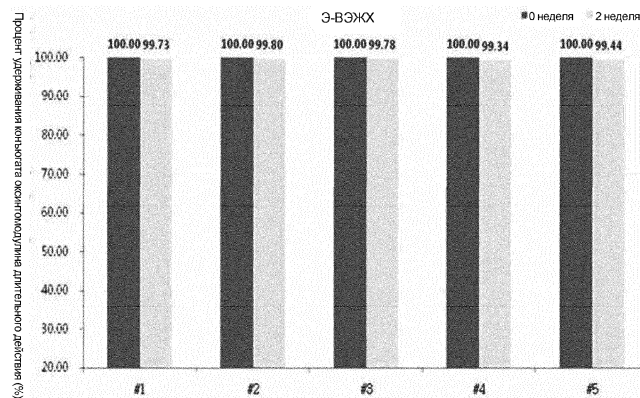
Фиг. 1б



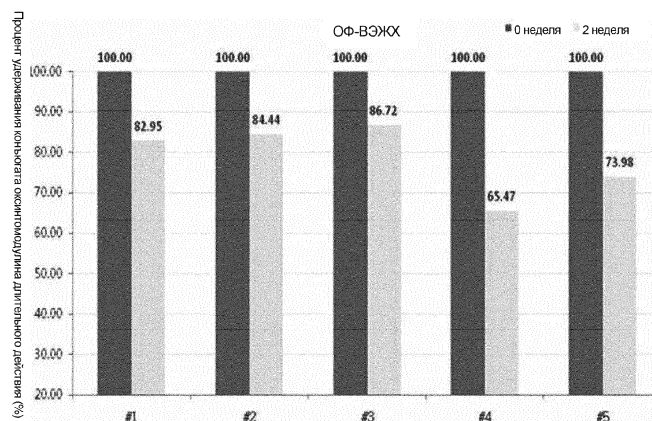
Фиг. 1с



Фиг. 2а

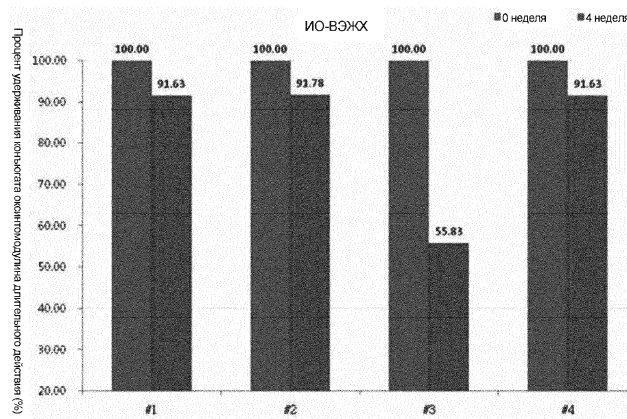


Фиг. 2b

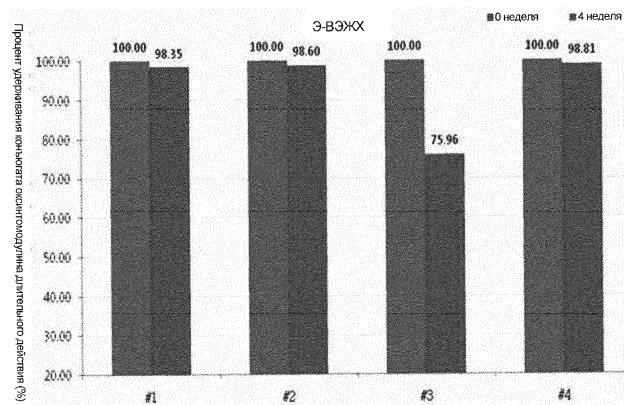


Фиг. 2с

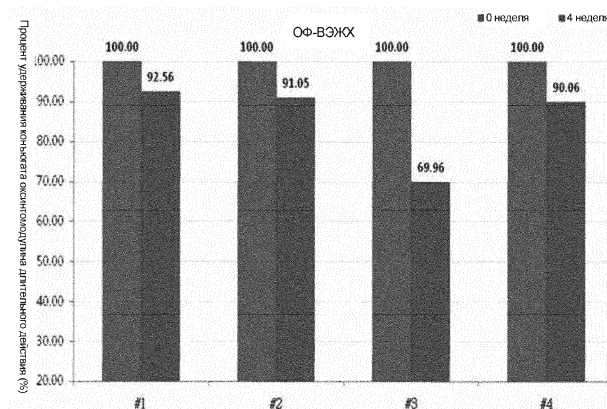




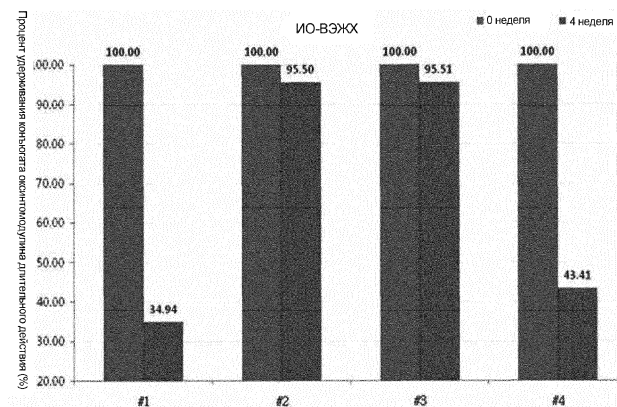
Фиг. 3а



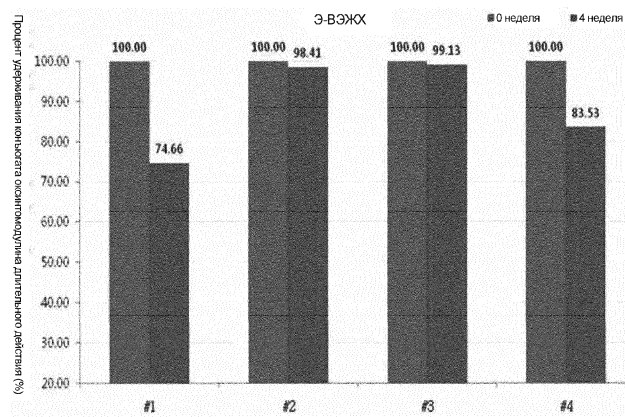
Фиг. 3б



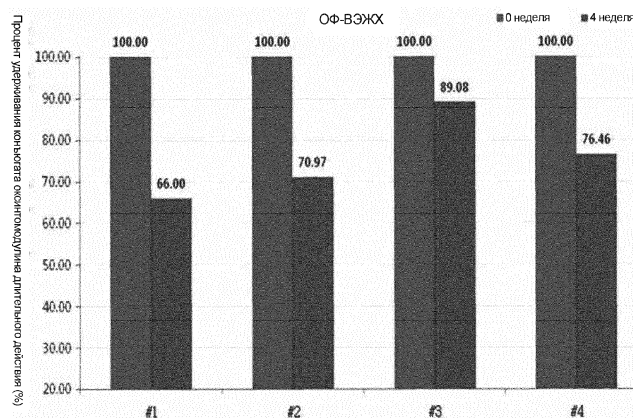
Фиг. 3с



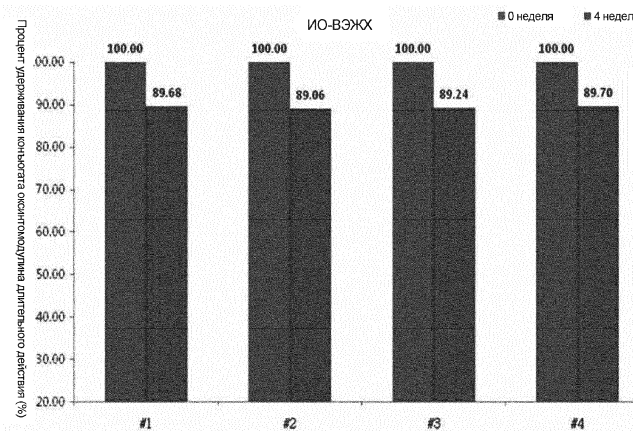
Фиг. 4а



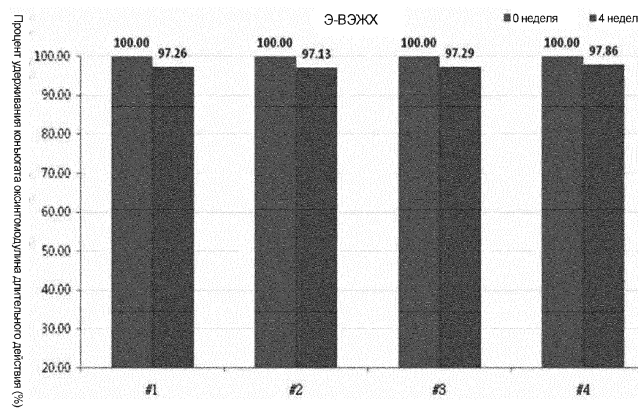
Фиг. 4b



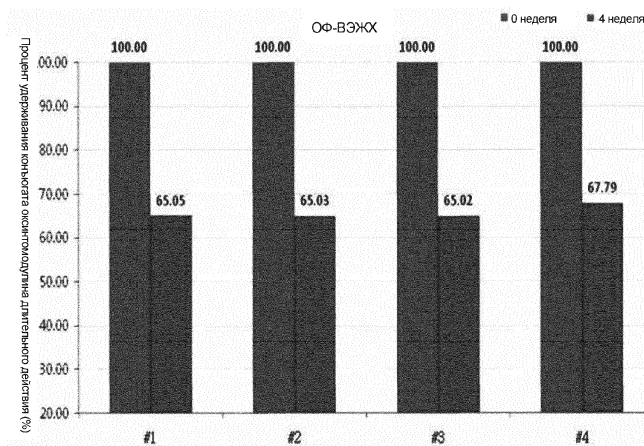
Фиг. 4с



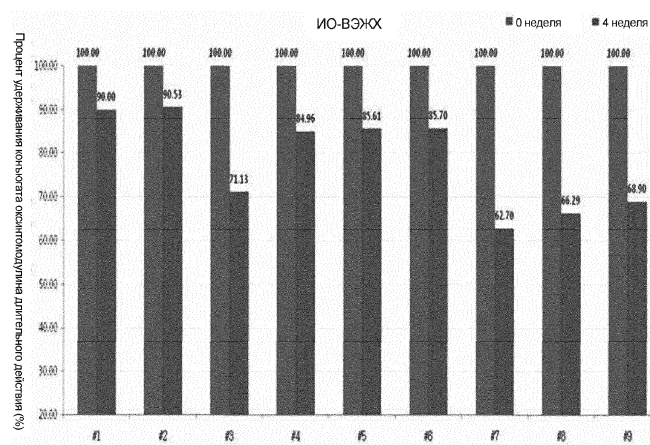
Фиг. 5a



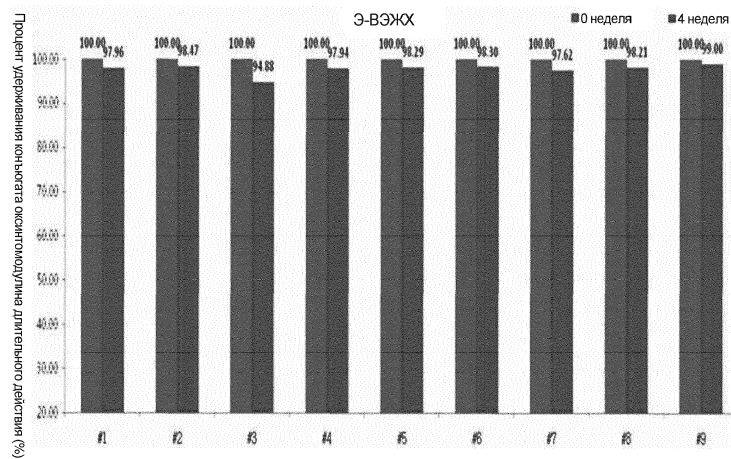
Фиг. 5b



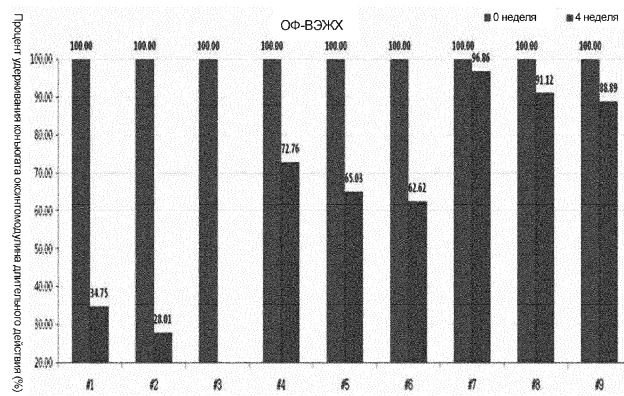
Фиг. 5с



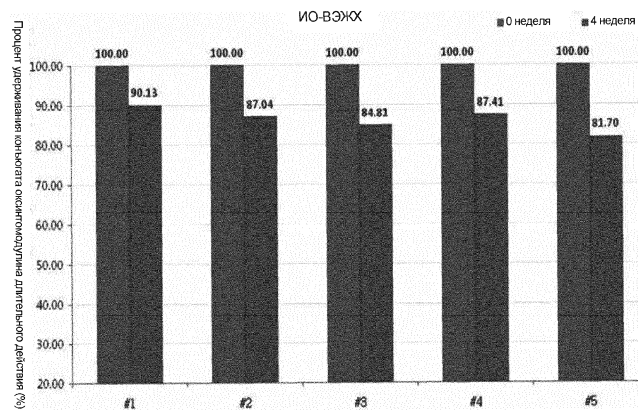
Фиг. 6а



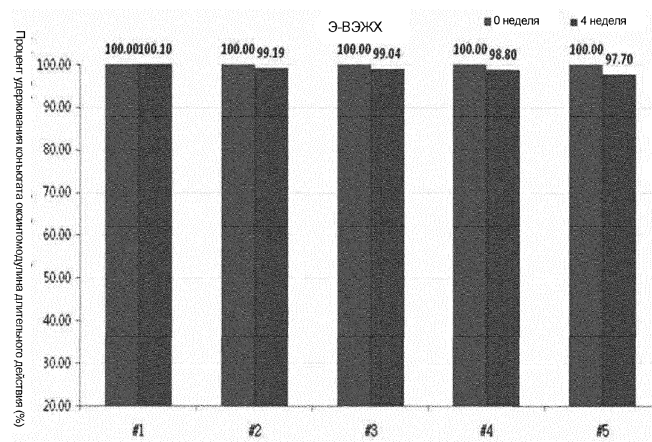
Фиг. 6б



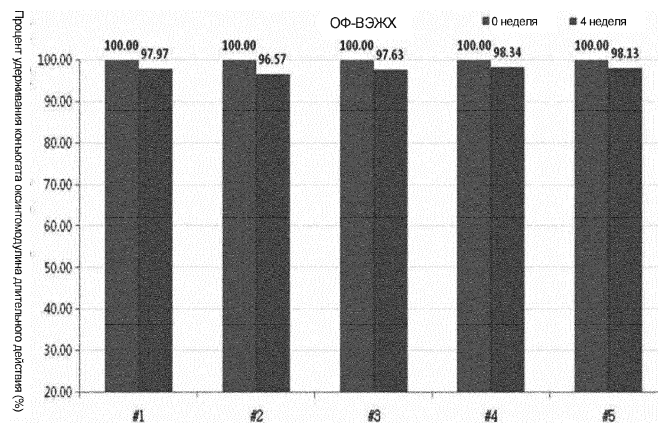
Фиг. 6с



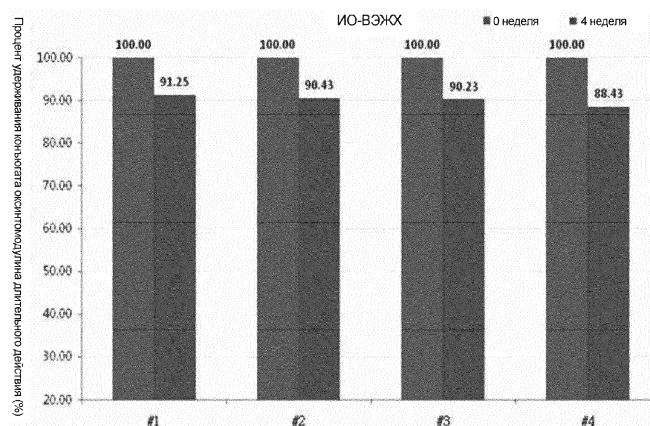
Фиг. 7а



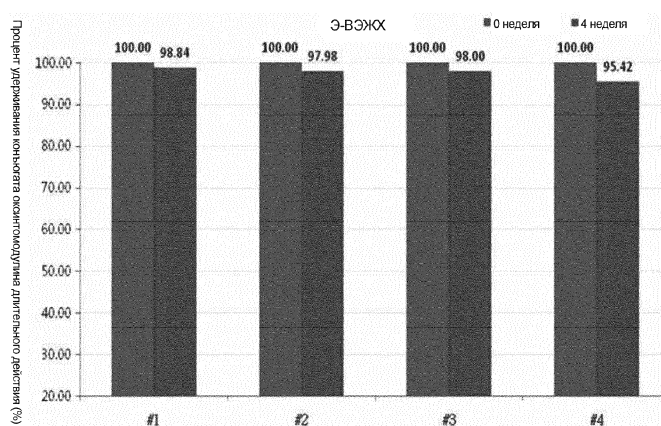
Фиг. 7б



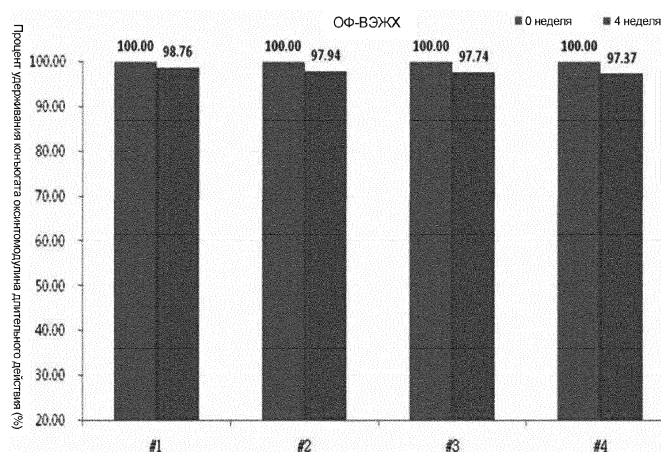
Фиг. 7с



Фиг. 8а



Фиг. 8b



Фиг. 8с



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2