

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044650**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.20

(21) Номер заявки
202190744

(22) Дата подачи заявки
2019.09.25

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

(54) **СЛИТЫЙ БЕЛОК GLP1-FC И ЕГО КОНЬЮГАТ**

(31) **201811125762.9**

(32) **2018.09.26**

(33) **CN**

(43) **2021.08.24**

(86) **PCT/CN2019/107709**

(87) **WO 2020/063628 2020.04.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЦЗЯНСУ ДЖЕНСАЕНСИЗ ИНК.
(CN)

(72) Изобретатель:
**Ван Яли, Чэнь Сянь, Чжу Луянь, Лю
Бинь, Ван Сяошань, Жэнь Цзыцзя,
Чжоу Тинтин, Янь Хайся, Сюй Инин,
Гао Хуэйхуэй, Ван Цзинь, Сюй Ян, Лю
Яхуэй, Мо Вэйчуань, Чень Синь, Гао
Цзе, Су Хуншэн (CN)**

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

(56) **WO-A1-2018024162**
WO-A1-2018024162
CN-A-101712722
CN-A-101712722
CN-A-104130308

(57) В изобретении предложены новый слитый белок GLP-1 и его конъюгат, фармацевтическая композиция, содержащая их, и их применение в снижении уровня сахара в крови или массы тела, особенно для лечения диабета, в частности диабета II типа.

B1

044650

044650

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет китайской патентной заявки № 201811125762.9, поданной 26 сентября 2018 года и озаглавленной "СЛИТЫЙ БЕЛОК GLP1-FC И ЕГО КОНЪЮГАТ", раскрытие которой включено в данное описание изобретения посредством ссылки во всей полноте.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к биологически активным полипептидным слитым белкам и к их полимерным конъюгатам, имеющим пролонгированный период полувыведения *in vivo*, особенно к агонистам рецепторов GLP-1 (глюкагоноподобный пептид 1), имеющим пролонгированный период полувыведения *in vivo*, к фармацевтическим композициям, содержащим их, и к их применениям в снижении уровня глюкозы в крови (особенно в лечении диабета, в частности диабета II типа) и для контроля за массой тела.

Предшествующий уровень техники

С развитием экономики, увеличением средней продолжительности жизни населения и изменением образа жизни диабет стал серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Как в развитых, так и в развивающихся странах заболеваемость диабетом резко растет. В 2007 году в мире насчитывалось около 246 миллионов больных диабетом, и один больной диабетом умирал каждые 10 секунд. Подсчитано, что к 2025 году число больных сахарным диабетом в мире достигнет 333 миллионов. Китай стал "эпичесентром" диабета с 40 миллионами больных диабетом в настоящее время и примерно 5% уровнем заболеваемости диабетом, и он является второй крупнейшей страной в мире по диабету (первой является Индия). Существует два типа диабета: инсулинозависимый диабет (диабет I типа) и инсулинонезависимый диабет (диабет II типа), где на диабет II типа приходится более 90% пациентов с диабетом. Диабет II типа характеризуется как дисрегуляция секреции или эффекта инсулина, и дисфункция β -клеток, что приводит к нарушению обмена жиров, углеводов и белков, и в свою очередь к хронической гипергликемии и, в конечном итоге, вызывает различные микрососудистые, макрососудистые осложнения и осложнения в различных органах. В настоящее время имеются два типа лекарственных средств для борьбы с диабетом: 1) лекарственные средства, стимулирующие секрецию инсулина, такие как сульфонилмочевины, меглитиниды, ингибиторы дипептидилпептидазы и аналоги GLP-1; и 2) лекарственные средства, не стимулирующие секрецию инсулина, такие как инсулин, ингибиторы α -глюкозидазы, бигуаниды, тиазолидиндионы, аналоги инсулина и т.д. В настоящее время многие традиционные лекарственные средства для лечения диабета, используемые клинически, неэффективны для пациентов с диабетом II типа. Эти лекарственные средства не способны сдерживать прогрессирующее ухудшение состояния островковых β -клеток, снижать уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в крови или предотвращать осложнения диабета, такие как болезни сердца и почечная недостаточность, кроме того, эти лекарственные средства сопровождаются различными степенями побочных эффектов. Поэтому необходимо разработать новое лекарственное средство для лечения диабета II типа.

Гормон желудочно-кишечного тракта, глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), идентифицированный в 1985 году, экспрессируется геном проглюкагона после еды и в основном секретируется L-клетками слизистой оболочки кишечника. GLP-1 может стимулировать островковые β -клетки секретировать инсулин (J Med Chem, 47, 4128-4134, 2004) и играет важную роль в стабилизации уровней глюкозы в крови. Экзогенное введение GLP-1 может нормализовать уровень глюкозы в крови у пациентов с сахарным диабетом II типа (Diabetes Care, 15, 270-276, 1992; Lancet, 359, 824-830, 2002; Endocr. Rev, 16, 390-410, 1996; и Diabetologia, 28, 565-573, 1985). GLP-1 обладает следующими функциями: воздействие на островковые β -клетки глюкозозависимым образом, стимулирование транскрипции гена инсулина, повышение биосинтеза и секреции инсулина, стимулирование пролиферации и дифференцировки β -клеток, ингибирование апоптоза β -клеток и в результате этого увеличение количества островковых β -клеток, ингибирование секреции глюкагона, повышение чувствительности инсулиновых рецепторов периферических клеток, снижение HbA1c, подавление аппетита и кормления, и задержка опорожнения желудка (Diabetic Med, 18, 144-149, 2001; Diabetes, 51, 1443-1452, 2002; Diabetologia, 45, 1263-1273, 2002; Diabetes, 50, 525-529, 2001; Diabetes, 50, 725, 2001; Diabetes, 52, 365-371, 2003; Recent Prog. Hormone Res. 56, 377-399, 2001; Diabetologia, 39, 1546-1553, 1996; Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab, 281, E242-247, 2001; US patent 477967, 478017, 478425; Diabetes Care, 22, 403-408, 1999; J. Clin. Endocrinology and Metabolism, 88, 3082-3089, 2003; и Diabetes, 44, 1295, 1995). Однако, GLP-1 легко расщепляется дипептидилпептидазой (DPPIV) *in vivo* с периодом полувыведения менее 2 мин и поэтому вряд ли может стать эффективным антидиабетическим лекарственным средством.

Из-за короткого периода полувыведения и плохой физической и химической стабильности пептидные лекарственные средства легко разлагаются различными протеазами *in vivo*, так что обычно требуются их многократные инъекции в течение дня, что является для пациентов физической, умственной и финансовой нагрузкой и ограничивает соблюдение ими схемы приема лекарственного средства. Следовательно, в данной области существует острая потребность в лекарственных средствах с новыми структурами для удлинения их циркулирования в плазме и увеличения их системного лекарственного воздействия.

Краткое изложение сущности изобретения

После многолетних исследований и длительных экспериментов авторы настоящего изобретения обнаружили, что после слияния полипептида с партнером по слиянию (например с Fc-фрагментом, альбумином, XTEN или трансферрином), который способен увеличить период полувыведения полипептида, с получением слитого белка и дополнительного конъюгирования с гидрофильным полимером (таким как полиалкиленгликоль, в частности PEG (полиэтиленгликоль)), можно эффективно повысить *in vivo* стабильность биологически активных полипептидов и увеличить эффективность лекарственных средств. Настоящее изобретение было выполнено на основании вышеуказанных полученных данных.

В первом аспекте настоящего изобретения предложен слитый белок агониста рецептора GLP-1, содержащий агонист рецептора GLP-1 и партнер по слиянию (FP), способный увеличивать период полувыведения слитого белка *in vivo*, где агонист рецептора GLP-1 и партнер по слиянию связаны напрямую или через первый линкер L1.

Предпочтительно, первый линкер L1 представляет собой пептид, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Более предпочтительно, первый линкер L1 представляет собой гибкий пептид, содержащий A, T, G и/или S, такой как (GS)_n, где n представляет собой целое число от 1 до 50, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Наиболее предпочтительно, первый линкер L1 выбран из группы, состоящей из:

GSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9),

GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10),

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11),

GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12),

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13),

PRFQDSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 14),

SSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 15),

SSSSKAPPS (SEQ ID NO: 16),

SRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 17) и

GGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 18).

В одном воплощении, агонист рецептора GLP-1 является полноразмерным, усеченным или вариантом GLP-1 или аналогом GLP-1, например представляет собой эксендин-4, GLP-1(1-36), GLP-1(1-37), GLP-1(7-36), GLP-1(7-37), лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид, дулаглутид или семаглутид.

В другом воплощении партнер по слиянию (FP) является полноразмерным, усеченным или вариантом Fc-фрагмента иммуноглобулина, альбумином, XTEN или трансферрином; предпочтительно, Fc-фрагмент является производным от Fc-фрагмента иммуноглобулина человека; предпочтительно Fc-фрагмент состоит из одного-четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4; предпочтительно, Fc-фрагмент является производным от Fc-фрагмента IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, более предпочтительно Fc-фрагмента IgG; более предпочтительно, Fc-фрагмент является производным Fc-фрагмента IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и более предпочтительно, Fc-фрагмент IgG имеет сниженный эффект ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и/или CDC (комплементзависимая цитотоксичность) и/или повышенную аффинность связывания с FcRn.

В еще одном воплощении партнер по слиянию (FP) также связан прямо или через второй линкер L2 с последовательностью ST, содержащей сайт распознавания сортазы, и где сортаза представляет собой, например, сортазу A или сортазу B; предпочтительно ST содержит коровий сайт распознавания LPXTG сортазы A, где X представляет собой любую аминокислоту и ST представляет собой, например LPETG, LPETGG или LPETGGG; более предпочтительно, ST дополнительно содержит аффинную метку, связанную с сайтом распознавания сортазы, и ST представляет собой, например, LPETGGHHHHHH или LPETGGWSHPQFEK.

При этом второй линкер L2 представляет собой пептид, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Более предпочтительно, второй линкер L2 представляет собой гибкий пептид, содержащий A, T, G и/или S, такой как (GS)_n, где n является целым числом от 1 до 50, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и более предпочтительно, второй линкер L2 выбран из группы, состоящей из:

GSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9),

GGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 18),

GGGG (SEQ ID NO: 19),

GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 20) и

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21).

В другом воплощении слитый белок имеет структуру GLP-1-L1-FP-L2-ST, где GLP-1 представляет собой агонист рецептора GLP-1, и агонист рецептора GLP-1, L1, L2, FP и ST имеют такое же определение, как описано выше, и где один или оба из L1 и L2 могут отсутствовать.

В конкретном воплощении аминокислотная последовательность слитого белка представлена в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 22; или слитый белок кодируется нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 или 23.

Во втором аспекте настоящего изобретения представлен конъюгат, в котором один, два или более гидрофильных полимера прикреплены к концу слитого белка из первого аспекта, предпочтительно, гидрофильный полимер прикреплен к сайту распознавания сортазы посредством реакции транспептидации, в частности, слитый белок может находиться в форме мономера или димера.

В одном воплощении один, два или более гидрофильных полимера независимо выбирают из полисахарида и полиалкиленгликоля, такого как полипропиленгликоль и полиэтиленгликоль; полиалкиленгликоль может иметь концевую группу, например, иметь концевую алкоксигруппу, такую как метоксигруппа, и/или полиалкиленгликоль является линейным или разветвленным, и, например, полиалкиленовая группа является разветвленной, такой как разветвленный полиэтиленгликоль, особенно разветвленный полиэтиленгликоль с концевой метоксигруппой; молекулярная масса полиалкиленгликоля может составлять больше или равна 1, больше или равна 10, больше или равна 20, больше или равна 30, больше или равна 40, больше или равна 50, больше или равна 60, больше или равна 70, больше или равна 80, больше или равна 90, больше или равна 100, больше или равна 110, больше или равна 120, больше или равна 130, больше или равна 140, больше или равна 150 или больше или равна 160 кДа, например 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 кДа, или иметь значение между любыми этими двумя значениями; и предпочтительно молекулярная масса гидрофильного полимера составляет 20 кДа или 40 кДа.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата, описанного во втором аспекте, который включает приведение слитого белка, описанного в первом аспекте, в контакт с сортазой (такой как сортаза А или сортаза В) и гидрофильным полимером, где один конец гидрофильного полимера имеет аминогруппу, которая может быть амидирована сортазой.

В одном воплощении один конец гидрофильного полимера содержит poly-Gly, например GGGAA.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество слитого белка, описанного в первом аспекте, и/или конъюгата, описанного во втором аспекте, и возможно фармацевтически приемлемый носитель.

В одном воплощении фармацевтическая композиция предназначена для снижения уровня глюкозы в крови или массы тела, например, в лечении диабета, более конкретно в лечении диабета I типа и/или диабета II типа, особенно в лечении диабета II типа.

В другом воплощении фармацевтическая композиция находится в форме жидкого препарата или лиофилизированного препарата.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложено применение слитого белка, описанного в первом аспекте, или конъюгата, описанного во втором аспекте, для изготовления лекарственного средства для снижения уровня глюкозы в крови или массы тела, например лекарственного средства, предназначенного для использования в лечении диабета, включая диабет I типа и диабет II типа, особенно диабет II типа.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложен способ снижения уровня глюкозы в крови или массы тела, включающий введение слитого белка, описанного в первом аспекте, или конъюгата, описанного во втором аспекте, субъекту, нуждающемуся в этом, например, для лечения диабета, включая диабет I типа и диабет II типа, особенно диабет II типа.

Седьмой аспект настоящего изобретения заключается в предложении набора, содержащего слитый белок, описанный в первом аспекте, конъюгат, описанный во втором аспекте, и/или фармацевтическую композицию, описанную в четвертом аспекте, и возможно инструкции по применению.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что конъюгат GLP-1-Fc по настоящему изобретению может обеспечить неожиданно длительный гипогликемический эффект. Кроме того, по сравнению с существующими аналогичными лекарственными средствами, конъюгат GLP-1-Fc по настоящему изобретению может значительно снизить быструю потерю массы тела, вызванную приемом гипогликемических препаратов, так что клиническая безопасность препаратов значительно улучшается, и поэтому он имеет большое значение для клинического применения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1А показана структура эукариотического экспрессионного вектора слитого белка GLP-1 и на фиг. 1В показаны результаты теста в виде кривой роста и жизнеспособности клеток стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc2-L2-ST (номер клона: P1-3G3C2) во время ферментации.

На фиг. 2 показаны результаты микроскопического исследования стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc2-L2-ST (номер клона: P1-3G3C2) в разные моменты во время ферментации. На фиг. 2А представлено изображение клеток на 5-е сутки культивирования и на фиг. 2В показаны собранные клетки (13 сутки).

На фиг. 3 показан метаболизм глюкозы в супернатанте культуры стабильной клеточной линии

GLP1-L1-Fc2-L2-ST (номер клона: P1-3G3C2) во время ферментации.

На фиг. 4 показан метаболизм NH_4^+ и лактозы (Lac) в супернатанте культуры стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc2-L2-ST (номер клона: P1-3G3C2) во время ферментации.

На фиг. 5 показаны результаты электрофореза белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST в невосстанавливающем геле (слева: M/1/2/3) и в восстанавливающем геле (справа: 4/5/6/M). 1 и 6: супернатант бульона конечной ферментации; 3 и 4: образцы после очистки; 2 и 5: образцы ферментационного бульона на 10 суток.

На фиг. 6 показаны результаты теста SDS (додecilсульфат натрия) электрофореза (A) и анализа SEC (гель-проникающая хроматография) (B) очищенного белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST.

На фиг. 7 показаны результаты SDS электрофореза и RPC (обращенно-фазовая хроматография) уровня поперечного связывания двух белков. На фиг. 7A и фиг. 7C представлен SDS гель белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST поперечно сшитого с 20 и 40 кДа PEG соответственно; на фиг. 7B и фиг. 7D представлены результаты RPC белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST, поперечно сшитого с 20 и 40 кДа PEG соответственно; и на фиг. 7E представлен результат RPC белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST, поперечно сшитого с 40 кДа PEG.

На фиг. 8 показаны результаты анионообменной хроматографии (A) и теста RPC (B) GLP1-L1-Fc2-L2-ST после поперечного связывания.

На фиг. 9 показаны результаты теста активности GLP1-L1-Fc2-L2-ST, поперечно сшитого с 20 и 40 кДа PEG соответственно. По сравнению с дулаглутидом, относительная активность несшитого субстрата (GLP1-Fc) составляет 98,10%. Активность обоих PEG-сшитых продуктов снизилась, при этом относительная активность продукта, сшитого с 20 кДа PEG (PEG (20 кДа)-GLP1-Fc), составляет 40,38%, а относительная активность продукта, сшитого с 40 кДа PEG (PEG (40 кДа)-GLP1-Fc), составляет 32,85%.

На фиг. 10A показана кривая ответа глюкозотолерантного теста у мышей C57BL/6 через 24 ч после введения; на фиг. 10B показан эффект через 24 ч после введения на толерантность к глюкозе в мышинной модели C57BL/6 (AUC); на фиг. 10C показана кривая ответа глюкозотолерантного теста у мышей C57BL/6 через 144 ч после введения; на фиг. 10D показан эффект через 144 ч после введения на толерантность к глюкозе в мышинной модели C57BL/6 (AUC); на фиг. 10E показана кривая ответа глюкозотолерантного теста у мышей C57BL/6 через 168 ч после введения; на фиг. 10F показан эффект через 168 ч после введения на толерантность к глюкозе у мышей C57BL/6 (AUC); на фиг. 10G показана кривая ответа глюкозотолерантного теста у мышей C57BL/6 через 192 ч после введения; на фиг. 10H показан эффект через 192 ч после введения на толерантность к глюкозе в мышинной модели C57BL/6 (AUC); на фиг. 10I показана кривая ответа глюкозотолерантного теста у мышей C57BL/6 через 216 ч после введения; на фиг. 10J показан эффект через 216 ч после введения на толерантность к глюкозе у мышей C57BL/6 (AUC); на фиг. 10K показана кривая ответа глюкозотолерантного теста у мышей C57BL/6 через 240 ч после введения; на фиг. 10L показан эффект через 240 ч после введения на толерантность к глюкозе у мышей C57BL/6 (AUC); и на фиг. 10M показаны изменения массы тела у мышей C57BL/6 после введения.

На фиг. 11 показана кривая роста и жизнеспособность клеток стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 (номер клона: P1-P132C7) во время ферментации с подпиткой.

На фиг. 12 показаны микроскопические изображения стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 (номер клона: P1-P132C7) в разные моменты во время ферментации с подпиткой. На фиг. 12A показаны клетки на 5 сутки культивирования и на фиг. 12B показаны собранные клетки (13 сутки).

На фиг. 13 показан метаболизм глюкозы в супернатанте культуры стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 (номер клона: P1-P132C7) во время ферментации с подпиткой.

На фиг. 14 показана кривая изменения pH во времени для стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 (номер клона: P1-P132C7) в 15 л биореакторе во время ферментации с подпиткой.

На фиг. 15 показаны результаты SDS-PAGE электрофореза целевого белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 в супернатанте 15 л бульона от ферментации с подпиткой. Полоса 1 представляет собой очищенный образец, полоса 2 - белковый маркер, а полосы 3, 4 и 5 представляют собой супернатант ферментационного бульона на 12-е, 13-е и 14-е сутки.

На фиг. 16 показаны результаты SDS-PAGE электрофореза (A) и SEC анализа (B) очищенного белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3.

На фиг. 17 показаны результаты SDS-PAGE электрофореза и анализа RPC уровня поперечного сшивания двух белков. На фиг. 17A представлен SDS-тест белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, поперечно связанного с 40 кДа PEG, а на фиг. 17B представлен RPC-тест белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, поперечно связанного с 40 кДа PEG.

На фиг. 18 показаны результаты анионообменной хроматографии (A) и SEC-теста (B, C) of GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 после поперечного сшивания.

На фиг. 19 показаны результаты определения активности GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, поперечно связанного с 40 кДа PEG. Относительная активность несшитого субстрата (GLP1-Fc) по отношению к дулаглутиду составляет 112,24%. Активность PEG-сшитого продукта снижалась, при этом относительная активность GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, сшитого с 40 кДа PEG (PEG (40 кДа)-GLP1-Fc), составляет 21,51%.

На фиг. 20A показана толерантность к глюкозе мышей C57BL/6 (AUC) через 1-8 суток после введения и на фиг. 20B показаны изменения массы тела мышей C57BL/6 после введения.

На фиг. 21А показано влияние на уровень глюкозы в крови у мышей с STZ(стрептозотоцин)-индуцированным диабетом II типа через 1-12 суток после введения, и на фиг. 21В показаны изменения массы тела мышей с диабетом II типа после введения.

Подробное описание изобретения

Термин, используемый в этой заявке, имеет то же значение, что и в предшествующем уровне техники. Чтобы определить значение используемых терминов, конкретные значения некоторых терминов в этой заявке приведены ниже. Если определение в настоящем документе вступает в противоречие с общепринятым значением этого термина, то определение, содержащееся в настоящем документе, имеет преимущество.

При использовании здесь термин "аминокислота" относится к природным аминокислотам, неприродным аминокислотам, аналогам аминокислот и ко всем их D- и L-стереоизомерам. Неприродные аминокислоты включают, без ограничения ими, азетидин-2-карбоновую кислоту, 2-аминоадипат, 3-аминоадипат, β-аланин, аминопропионовую кислоту, 2-аминомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, 6-аминокапроновую кислоту, 2-аминогептановую кислоту, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминоизомасляную кислоту, 2-аминопимелиновую кислоту, трет-бутилглицин, 2,4-диаминоизомасляную кислоту, 2,2'-диаминопимелиновую кислоту, 2,3-диаминопропионовую кислоту N-этилглицин, N-этиласпарагин, гомопрولين, гидроксиллизин, алло-гидроксиллизин, 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин, изодесмозин, алло-изолейцин, N-метилаланин, N-метилглицин, N-метилизольцин, N-метилпентилглицин, N-метилвалин, нафталанин, норвалин, норлейцин, орнитин, пентилглицин, пипеколиновую кислоту и тиопролин. Аналоги аминокислот включают природные аминокислоты и неприродные аминокислоты, у которых C-концевая карбоксильная группа, N-концевая аминогруппа или группа боковой цепи химически обратимо или необратимо блокирована концевой группой, или химически модифицирована в другую функциональную группу, такую как метионинсульфоксид, метионинсульфон, S-(карбоксиметил)-цистеин, S-(карбоксиметил)-цистеинсульфоксид и S-(карбоксиметил)-цистеинсульфон.

Термин "полипептид" или "белок", используемые здесь взаимозаменяемо, относится к соединению из по меньшей мере двух аминокислотных остатков, соединенных друг с другом ковалентными связями (такими как пептидные связи), которые могут быть рекомбинантными полипептидами, природными полипептидами или синтетическими полипептидами. Кроме того, "полипептид" или "белок" по настоящему изобретению также относится к его вариантам или аналогам, то есть к полипептидам, отличающихся по аминокислотной последовательности одной или несколькими заменами, делециями, вставками, слияниями, усечениями или любой их комбинацией. Полипептидный вариант может быть полностью функциональным или может быть лишен одной или нескольких активностей. Полностью функциональные варианты могут содержать, например, только консервативные замены или изменения в некритичных остатках или в некритичных областях. Функциональные варианты могут также содержать замены похожих аминокислот, которые приводят к неизменным или незначительным изменениям функции. Аминокислоты, необходимые для функционирования, могут быть идентифицированы методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез или глицин-сканирующий мутагенез. (Cunningham, B. and Wells, J., Science, 244: 1081-1085, 1989). Ключевые сайты для полипептидной активности могут быть определены, например, с помощью структурного анализа, такого как кристаллизация, ядерный магнитный резонанс или фотоаффинная метка (Smith, L., et al., J. Mol. Biol., 224:899-904, 1992; и de Vos, A. et al., Science, 255: 306-312, 1992).

Термин "конъюгат" при использовании здесь, относится к продукту, образованному полипептидом или полипептидным вариантом, ковалентно или нековалентно связанным с описанной здесь модифицирующей группой.

Как правило, термин "полимер", используемый здесь, имеет значение, обычно подразумеваемое специалистами обычной квалификации в данной области, и относится как к самому полимеру, так и к его терминально-модифицированному производному, если явно не указано иное.

Кроме того, для полимеров, таких как полиэтиленгликоль, существует множество способов определения их молекулярной массы. Поскольку полимеры состоят из молекул с разными степенями полимеризации в определенном диапазоне распределения, молекулярные массы полимеров обычно представляют посредством их средней молекулярной массы, в частности среднечисловой молекулярной массы или средневесовой молекулярной массы. Хотя среднечисловая молекулярная масса и средневесовая молекулярная масса могут иметь некоторые отклонения, когда степень полимеризации полимеров значительно отличается, для полимеров с узким диапазоном распределения они, как правило, равны. Если не указано иное, для полимеров, таких как полиэтиленгликоль, упомянутый здесь, когда речь идет о его молекулярной массе, это может быть либо средневесовая молекулярная масса, либо среднечисловая молекулярная масса.

Агонист рецептора GLP-1.

Глюкагоноподобные пептиды включают глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и глюкагоноподобный пептид-2 (GLP-2), оба из которых являются производными проглюкагона, который состоит из 158 аминокислот и может расщепляться на разные пептидные цепи. Поскольку GLP-1 обладает фармаколо-

гическими эффектами стимулирования секреции инсулина, защиты островковых β -клеток, ингибирования секреции глюкагона и опорожнения желудка, а также снижения аппетита, он может быть клинически использован в лечении диабета II типа и ожирения. GLP-2 представляет собой пищевой фактор, который способствует росту тонкой кишки, ингибирует апоптоз клеток, способствует опорожнению желудка и повышает аппетит, поэтому он может быть клинически использован в лечении синдрома короткого кишечника. Биологически активным GLP-1 в организме человека является в основном GLP-1(7-36) амид и GLP-1(7-37). Природный GLP-1 (с период полувыведения менее 5 мин) легко гидролизует и инактивируется дипептидилпептидазой IV (DPP-IV), поэтому его трудно использовать в клинике.

Термин "агонист рецептора GLP-1" относится к молекуле, способной активировать рецептор GLP-1, такой как природный GLP-1, полученный из разных источников, таких как человек или животные, и функциональные варианты, фрагменты и аналоги, образованные посредством одной или более (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислотных замен, делеций и/или добавлений в последовательности дикого типа природных агонистов рецепторов GLP-1 (таких как GLP-1 и эксендин-4), например лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид, дулаглутид, семаглутид и т.д.

Слитый белок GLP-1.

Агонист рецептора GLP-1 (такой как GLP-1 и его функциональные варианты и фрагменты) связан с партнером по слиянию, способным увеличивать период полувыведения, например с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина, с образованием слитого белка. Слитые белки по настоящему изобретению упоминаются как "слитый белок с активностью агониста рецептора GLP-1" или "слитый белок GLP-1".

Человеческий иммуноглобулин IgG состоит из четырех полипептидов (две идентичные копии легкой цепи и тяжелой цепи), ковалентно связанных дисульфидными связями. При протеолизе молекул IgG папаином образуются два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Фрагмент Fc состоит из двух полипептидов, связанных между собой дисульфидными связями. Каждый полипептид, от N - до C-конца, состоит из шарнирной области, домена CH2 и домена CH3. Структура Fc-фрагмента практически одинакова у всех субтипов иммуноглобулина человека. IgG является одним из наиболее многочисленных белков в крови человека, составляющим от 70 до 75% общего иммуноглобулина в сыворотке крови человека.

Период полувыведения IgG из кровотока, который является самым длинным среди всех пяти типов иммуноглобулинов, может достигать 21 суток. Сообщалось о комбинировании Fc-области IgG с другими белками (такими как различные цитокины и растворимые рецепторы) с образованием слитых белков (Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989; Chamow et al., Trends Biotechnol., 14: 52-60, 1996; и патенты США 5116964 и 5541087). Типичный слитый белок представляет собой димерный белок, связанный остатками цистеина в шарнирной области IgG Fc с образованием молекулы, подобной IgG, но лишенной домена CH1 и легкой цепи. Благодаря структурной гомологии, *in vitro* фармакокинетические свойства слитого Fc-белка очень похожи на изотип IgG человека. Поэтому конструирование hGH слитых белков, связанных с Fc-областью человеческого IgG, поможет увеличить период полувыведения hGH при циркулировании в крови и/или увеличить его биологическую активность.

Область Fc иммуноглобулина безопасна для использования в качестве фармацевтического носителя, поскольку она представляет собой биоразлагаемый полипептид, который может метаболизироваться в организме. Кроме того, по сравнению со всей молекулой иммуноглобулина, Fc-область иммуноглобулина имеет относительно низкую молекулярную массу, что является благоприятным для приготовления, очистки и получения конъюгата. Поскольку Fc-область иммуноглобулина не содержит Fab-фрагмента (его аминокислотная последовательность меняется в зависимости от подкласса антител и поэтому является в высокой степени гетерогенной), ожидается, что Fc-область иммуноглобулина может значительно повысить однородность вещества и иметь низкую антигенность.

Термин "Fc-область иммуноглобулина" или "Fc-фрагмент", при использовании в настоящем изобретении, относится к белку, содержащему константную область тяжелой цепи 2 (CH2) и константную область тяжелой цепи 3 (CH3), но не переменную область тяжелой цепи и легкой цепи, константную область тяжелой цепи 1 (CH1) и константную область легкой цепи 1 (CL1). Он также может содержать шарнирную область в константной области тяжелой цепи. Кроме того, Fc-фрагмент, используемый в настоящем изобретении, может содержать часть или всю Fc-область, содержащую константную область тяжелой цепи 1 (CH1) и/или константную область легкой цепи 1 (CL1) без переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, если он имеет физиологическую функцию, которая в основном аналогична или лучше, чем у природного белка. Кроме того, это может быть Fc-фрагмент с относительно длинной делецией аминокислотных последовательностей CH2 и/или CH3. Следовательно, Fc-область иммуноглобулина, используемая в настоящем изобретении, может включать 1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 и домен CH4; 2) домен CH1 и домен CH2; 3) домен CH1 и домен CH3; 4) домен CH2 и домен CH3; 5) комбинацию одного или более доменов с шарнирной областью иммуноглобулина (с частью или со всей); или 6) димер любых доменов константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению содержит природную аминокислотную последовательность и ее производные (мутанты). Вследствие одной или более делеций,

вставок, неконсервативных или консервативных замен аминокислотных остатков или их комбинаций, производная аминокислотная последовательность может иметь последовательность, отличную от природной аминокислотной последовательности. Например, для Fc IgG, аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые, как известно, имеют решающее значение для связывания, можно использовать в качестве подходящих мишеней для модификации. Область Fc иммуноглобулина по настоящему изобретению может также содержать множество других производных, включая те, которые не имеют области, способной образовывать дисульфидные связи; те, которые имеют делецию нескольких аминокислотных остатков на N-конце природного Fc; или те, которые имеют дополнительные остатки метионина на N-конце природного Fc. Кроме того, чтобы удалить эффекторные функции, делеция может быть произведена на сайте связывания комплемента, таком как сайт связывания C1q и сайт ADCC (антителозависимой клеточной цитотоксичности). Методики получения таких производных Fc-области иммуноглобулина раскрыты в WO 97/34631 и WO 96/32478.

Для белков и пептидов известны аминокислотные замены, которые обычно не изменяют молекулярную активность (H.Neurath, RL Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее распространенными заменами являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly в обоих направлениях.

При необходимости, Fc-область может быть модифицирована, например посредством фосфорилирования, сульфирования, акрилата, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования и амидирования.

Производные Fc обладают такой же биологической активностью, что и Fc-область по настоящему изобретению, или имеют улучшенную структурную стабильность (такую как структурная устойчивость к нагреванию, pH и т.д.), чем их соответствующая Fc-область.

Кроме того, эти Fc-области могут быть получены из природных форм, выделенных из человека и других животных, включающих крупный рогатый скот, козу, свинью, мышь, кролика, хомяка, крысу и морскую свинку, или происходить из рекомбинантных или производных трансформированных животных клеток или микроорганизмов. При этом Fc-область может быть получена из природного иммуноглобулина путем выделения интактного иммуноглобулина из организмов человека или животных и обработки его протеолитическими ферментами. Папаин переваривает природный иммуноглобулин с образованием Fab- и Fc-областей, в то время как обработка пепсином приводит к образованию фрагментов rFc' и F(ab')₂. Фрагменты Fc или rFc' могут быть выделены, например посредством эксклюзионной хроматографии.

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой форму, имеющую природные сахарные цепи, или увеличенные или уменьшенные сахарные цепи по сравнению с естественной формой, или может представлять собой дегликозилированную форму. Увеличение, уменьшение или удаление сахарных цепей Fc иммуноглобулина может быть осуществлено способами, обычно используемыми в данной области техники, такими как химические методы, ферментативные методы и методы генной инженерии с использованием микроорганизмов. Удаление сахарных цепей из Fc-фрагмента приводит к значительному снижению аффинности связывания с комплементом (C1q) и к снижению или потере антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, и, тем самым, нежелательные *in vivo* иммунные реакции не будут индуцироваться. Ввиду этого, Fc-область иммуноглобулина в дегликозилированной или негликозилированной форме может быть более подходящей для целей настоящего изобретения при использовании в качестве лекарственного средства.

Термин "дегликозилирование", используемый в настоящем изобретении, означает ферментативное удаление сахарных фрагментов из области Fc, а термин "негликозилированный" означает, что Fc-область продуцируется в агликозилированной форме (например, в эукариотических клетках, таких как клетки млекопитающих, или в прокариотах, таких как *E.coli*).

Кроме того, Fc-область иммуноглобулина может быть Fc-областью, полученной из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, или полученной из их комбинации или гибрида. Предпочтительно, она происходит из IgG или IgM (двух наиболее многочисленных белков в крови человека), наиболее предпочтительно из IgG (который, как известно, увеличивает период полувыведения лиганд-связывающего белка).

Термин "комбинация", используемый в настоящем изобретении, означает димер или мультимер, образованный двумя или более одноцепочечными полипептидами, которые связаны вместе, где одноцепочечные полипептиды могут происходить из одной или разных областей Fc иммуноглобулина. То есть димер или мультимер может быть образован двумя или более фрагментами, выбранными из группы, состоящей из Fc-фрагмента IgG, Fc-фрагмента IgA, Fc-фрагмента IgM, Fc-фрагмента IgD и Fc-фрагмента IgE.

В другом воплощении слитый белок GLP-1 по настоящему изобретению является гомодимером.

В другом воплощении слитый белок GLP-1 дополнительно связан с фрагментом, содержащим сайт распознавания сортазы, то есть с фрагментом "ST", описанным в настоящем изобретении.

Термин "сортаза", включающий сортазу A и сортазу B, был впервые обнаружен, как имеющий функцию прикрепления бактериальных поверхностных белков на клеточной стенке. Было установлено,

что "сигнал распознавания" поверхностных белков состоит, в большинстве случаев, из трех основных частей: последовательности LPXTG, гидрофобной последовательности и хвоста из положительно заряженных остатков. Последовательность LPXTG является очень консервативной и может быть распознана сортазой, затем цистеин (Cys) транспептидазы действует как нуклеофильная группа, атакующая пептидную связь между треонином и глицином С-концевого мотива LPXTG субстрата (такого как поверхностный белок), вызывая расщепление пептидной связи (ацилирование), которое, в свою очередь, производит ацилазное промежуточное соединение, и, наконец, пептид ковалентно связан с клеточной стенкой или субъединицей фимбрий для функционирования (деацилирования).

В одном воплощении настоящего изобретения сортаза А используется для сайт-направленного присоединения PEG. В конкретном воплощении используют коровые сайты распознавания сортазы А LPETG, LPETGG и LPETGGG. В другом конкретном воплощении к сайту распознавания могут быть добавлены разные аффинные метки, такие как LPETGGHHHHHH, LPETGGWSHPQFEK и т.д.

В другом воплощении слитый белок GLP-1 по настоящему изобретению получают рекомбинантными методами, включающими, например, экспрессию белка в подходящей прокариотической или эукариотической клетке-хозяине и выделение слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению обычными методами. Например, нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид, может быть сначала синтезирована методом химического синтеза, а затем последовательность может быть клонирована в подходящий экспрессионный вектор для экспрессии под контролем подходящего промотора. Альтернативно, методы мутагенеза, такие как ПЦР-мутагенез, могут быть использованы для получения нуклеотидной последовательности, кодирующей GLP-1, из GLP-1 дикого типа, и тогда эта последовательность и последовательность других элементов для построения слитого белка может быть клонирована в подходящий экспрессионный вектор для экспрессии под контролем подходящего промотора. Эти методики полностью входят в сферу компетенции специалистов в данной области техники, и существует множество руководств в предшествующем уровне техники.

Подходящие эукариотические клетки-хозяева включают клетки млекопитающих, такие как CHO (яичника китайского хомячка), COS (африканской зеленой маргашки), HEK293, ВНК (клетки почки новорожденного хомячка), SK-Нер и НерG2. Клетки предпочтительно выращивают в условиях, пригодных для экспрессии слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению. Что касается реагентов и условий, используемых для получения или выделения слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению, то особых ограничений нет, и может быть применена любая система, известная в данной области техники или имеющаяся в продаже. В предпочтительном воплощении слитый белок GLP-1 получают способами, описанными в данной области.

Существует множество экспрессионных векторов, которые могут быть использованы для получения слитого белка GLP-1, который может быть выбран из эукариотических и прокариотических экспрессионных векторов. Прокариотические экспрессионные векторы могут включать, например, плазмиды, такие как pRSET, pET и pBAD, где промоторы, которые могут быть использованы, включают, например, lac, trc, trp, гесА или араBAD. Эукариотические экспрессионные векторы включают: (1) векторы, используемые для экспрессии в дрожжах, такие как pAO, pPIC, pYES и pMET, в которых могут быть использованы такие промоторы, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (2) векторы, используемые для экспрессии в клетках насекомых, такие как pMT, pAc[delta], pIB, pMIB, pBAC и т.д., в которых могут быть использованы такие промоторы, как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д.; и (3) векторы, используемые для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pсDNA3, pBPV и т.д., и векторы, происходящие из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, адено-ассоциированный вирус, вирус герпеса, ретровирус и тому подобное, в которых могут быть использованы такие промоторы, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -актин. В предпочтительном воплощении слитый белок GLP-1 экспрессируется в прокариотической или эукариотической клеточной системе и используются кодон-оптимизированные кодирующие последовательности. В предпочтительном воплощении последовательность для экспрессии слитого белка GLP-1 содержит лидерный пептид и/или сигнальный пептид для облегчения секреции слитого белка GLP-1 из клетки наружу для разделения и очистки. В другом предпочтительном воплощении последовательность, экспрессирующая слитый белок GLP-1, не содержит лидерный пептид и/или сигнальный пептид, и вместо того, чтобы секретироваться вне клетки, слитый белок GLP-1 получают посредством лизиса клетки для разделения и очистки.

В другом воплощении в слитом белке по настоящему изобретению белок GLP-1 и Fc-фрагмент связаны непосредственно. В другом воплощении белок GLP-1 и Fc-фрагмент связаны через первый линкер L1. В другом воплощении Fc-фрагмент и фрагмент, содержащий последовательность распознавания сортазы, связаны непосредственно. В другом воплощении Fc-фрагмент и фрагмент, содержащий последовательность распознавания сортазы, связаны через второй линкер L2.

В предпочтительном воплощении первый линкер L1 и/или второй линкер L2 представляет собой пептид, содержащий 1, 2, 3 или более аминокислот. Более предпочтительно, первый линкер L1 и/или второй линкер L2 представляет собой гибкий пептид, содержащий A, T, G и/или S, такой как (GS)_n, где n представляет собой целое число от 1 до 50, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Например, первый линкер L1 выбран из группы, состоящей из:

GSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9),
 GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10),
 GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11),
 GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12),
 GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13),
 PRFQDSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 14),
 SSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 15),
 SSSSKAPPS (SEQ ID NO: 16),
 SRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 17) и
 GGGSGGGSGGGSA (SEQ ID NO: 18).
 Например, второй линкер L2 выбран из группы, состоящей из:
 GSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9),
 GGGSGGGSGGGSA (SEQ ID NO: 18),
 GGGGS (SEQ ID NO: 19),
 GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20) and
 GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21).
 Конъюгаты слитого белка GLP-1.

Слитый белок GLP-1 по настоящему изобретению может быть конъюгирован с одной или более полимерными группами с получением конъюгата слитого белка GLP-1, где полимер конъюгирован с концом слитого белка, такими как N-конец или C-конец. Используемый здесь "полимер" предпочтительно является физиологически приемлемым, что включает растворимость в водном растворе или суспензии и отсутствие негативных эффектов, таких как побочные эффекты на млекопитающих после введения конъюгата слитого белка GLP-1 в фармацевтически эффективном количестве. Полимеры, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, конкретно не ограничены. Полимеры обычно предпочтительно имеют от 2 до примерно 3000 повторяющихся единиц. Полимерная группа может быть выбрана из природных или синтетических полимеров, примеры которых включают, без ограничения ими, например, полисахариды, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG), полиэтиленоксид (PEO), сополимер этиленгликоля и пропиленгликоля, поливиниловый спирт и любую их комбинацию. В предпочтительном воплощении конъюгат слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению конъюгирован с одной или более группами PEG для модификации.

В настоящем изобретении полимер не ограничен конкретной структурой, он может быть линейным (таким как алкокси-PEG или бифункциональный PEG), разветвленным или многолучевым (например раздвоенным PEG или PEG, связанным с полиольным ядром), дендритным, или может иметь легко разрушающиеся связи. Кроме того, внутренняя структура полимера может быть организована в любое количество разных структур, которые могут быть выбраны из гомополимеров, чередующихся сополимеров, случайных сополимеров, блок-сополимеров, чередующихся терполимеров, случайных терполимеров, блок-терполимеров и тому подобного. Полимеры также могут включать поли(алкиленоксид)ные полимеры, полималеиновую кислоту, поли(D,L-аланин) и тому подобное.

В некоторых воплощениях полимер представляет собой полиэтиленгликоль (PEG) или его производные, такие как метоксиполиэтиленгликоль (mPEG). В данном описании изобретения, если конкретно не указано, полиэтиленгликоли (PEG) включают те, которые имеют либо гидроксильные группы в качестве терминальной группы, либо другие группы в качестве терминальной группы. Другие группы включают, без ограничения ими, алкокси, циклоалкокси, циклоалкилокси, алкенил, арилокси или аралкилокси. Эти молекулярные типы PEG известны в уровне техники и обычно используются в модификации пептидов. Боковая цепь PEG может быть линейной, разветвленной, раздвоенной или состоять из нескольких ветвей. Разные полиэтиленгликоли могут иметь разную длину полимерных цепей и разные структуры полимеров.

В настоящем изобретении нет особых ограничений по молекулярной массе PEG, и его молекулярная масса может варьировать от 0,1 до 200 кДа, например от 1 до 150 кДа, от 2 до 100 кДа, от 3 до 80 кДа, от 4 до 50 кДа или от 5 до 40 кДа. Другие полезные PEG включают, например, те, которые раскрыты в WO 03/040211, US 6566506, US 6864350 и US 6455639. В частности, PEG имеет общую формулу $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, где диапазон n составляет от примерно 5 до 4000. Как упоминалось выше, PEG по настоящему изобретению включает PEG с другими терминальными группами, такой как метокси-PEG, разветвленный PEG, раздвоенный PEG и подобное. Подходящие разветвленные PEG могут быть получены, как описано в патенте US 5932462, полное раскрытие которого включено в данное описание посредством ссылки. Раздвоенный PEG относится к PEG, который имеет ветвь около одного конца полимерной цепи, и основная цепь раздвоенного PEG может быть линейной или разветвленной.

Специалистам в данной области известно, что в биологически активной молекуле конъюгированной с полимерной группой, по мере увеличения молекулярной массы полимерной группы биологическая активность конъюгата постепенно снижается. (Bailon et al. Rational design of potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chem* 2001; 12: 195-202; Bowen et al. Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein. *Experimental Hematology* 1999; 27: 425-32; and Bailon et al. PEG-modified biopharmaceuticals. *Expert Opin Deliv.* 2009; 6: 1-16). Специалистам также известно, что по мере увеличения молекулярной массы полимерной группы, соответственно увеличивается биологический период полувыведения и/или полупериод существования в плазме.

Чтобы обеспечить стабильный терапевтический эффект в течение длительного периода и снизить частоту введения для улучшения соблюдения пациентом режима лечения, желателно как можно больше увеличить биологический период полувыведения конъюгата слитого белка GLP-1 при сохранении значительной активности агониста рецептора GLP-1. Таким образом, в одном воплощении настоящего изобретения предлагаются конъюгаты слитого белка GLP-1 с увеличенным биологическим периодом полувыведения и значительной активностью агониста рецептора GLP-1.

В конкретном воплощении в конъюгате слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению молекулярная масса одной или более полимерных групп (например PEG) больше или равна 1, больше или равна 10, больше или равна 20, больше или равна 30, больше или равна 40, больше или равна 50, больше или равна 60, больше или равна 70, больше или равна 80, больше или равна 90, больше или равна 100, больше или равна 110, больше или равна 120, больше или равна 130, больше или равна 140, больше или равна 150, или больше или равна 160 кДа, например 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 кДа, или имеет значение между любыми двумя из вышеперечисленных значений. Следует отметить, что при описании молекулярной массы конъюгированной полимерной группы в конъюгате слитого белка GLP-1, при наличии нескольких конъюгированных полимерных групп в этом конъюгате, подсчитывают сумму молекулярных масс всех конъюгированных полимерных групп в конъюгате, если не указано иное.

Полимер, используемый в настоящем изобретении, известен в уровне техники, и его можно получить различными способами, включая, например, коммерческие способы, такие как CarboMer, Inc., JT Baker, The Dow Chemical Company и т.д., или его можно приготовить самостоятельно в соответствии со способами, известными в данной области техники, например, как описано в EP 1245608. Настоящее изобретение не ограничено полимерами, полученными каким-либо конкретным способом.

После реакции конъюгации, конъюгат может быть выделен подходящим методом, включающим, например, ультрафильтрацию, диализ или хроматографию и т.д., все из которых известны специалистам обычной квалификации в данной области.

Фармацевтическая композиция.

Слитый белок GLP-1 или конъюгат слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению могут иметь несколько применений, в том числе, например, применение в снижении уровня глюкозы в крови. Следовательно, в настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция для снижения глюкозы в крови, которая содержит терапевтически эффективное количество слитого белка или конъюгата по настоящему изобретению и возможно фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, эту фармацевтическую композицию можно использовать для лечения диабета, более предпочтительно для лечения диабета I типа и/или диабета II типа, и особенно предпочтительно для лечения диабета II типа.

Терапевтически эффективное количество слитого белка или конъюгата по настоящему изобретению зависит от пути введения, типа субъекта и физических характеристик конкретного рассматриваемого млекопитающего. Эти факторы и их связь с определением количества хорошо известны специалистам в области медицины. Количество и способ введения могут быть подобраны для достижения оптимальной эффективности доставки пептида субъекту, но в зависимости от факторов, хорошо известных специалистам в области медицины, таких как масса тела, диета, сопутствующие лекарственные средства и другие факторы.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в составе комбинированной терапии, то есть в комбинации с одним или более другими агентами, где фармацевтическую композицию и другие агенты вводят вместе или последовательно. В других воплощениях другие агенты можно вводить до, во время или после введения одного или более из слитого белка, конъюгата или их фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Другие агенты, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, например, агенты, способные снижать уровень глюкозы в крови, такие как инсулин, аналоги инсулина, агонисты декстрина и холецистокинин, и/или другие соединения или композиции для лечения заболеваний. Предпочтительно, такое комбинированное введение позволяет достичь комбинированного или даже синергического эффекта.

Используемые здесь термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "физиологически приемлемый носитель" могут использоваться взаимозаменяемо, включая одну или более из любых физиологически совместимых солей, растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и про-

тивогрибковых средств, изотонических и задерживающих абсорбцию агентов и т.д. В некоторых воплощениях носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например посредством инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения терапевтическое средство может быть покрыто определенными материалами для защиты терапевтического средства от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать это терапевтическое средство.

При введении фармацевтического препарата по настоящему изобретению его вводят в фармацевтически приемлемом количестве в фармацевтически приемлемой композиции. Термин "фармацевтически приемлемый" означает нетоксичное вещество, которое не затрагивает биологически активную эффективность активных компонентов. Такие препараты обычно содержат соли, буферы, консерванты, совместимые носители и возможно другие терапевтические агенты, такие как дополнительные усилители иммунитета, включая адьюванты, хемокины и цитокины. При использовании в лекарственных средствах соль должна быть фармацевтически приемлемой. Однако фармацевтически неприемлемые соли могут быть успешно использованы для получения их фармацевтически приемлемых солей, поэтому они не исключены из объема настоящего изобретения.

Если необходимо, слитый белок GLP-1 или конъюгат слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению может быть объединен с фармацевтически приемлемыми носителями. При использовании здесь термин "фармацевтически приемлемые носители" относится к одному или более совместимым твердым или жидким наполнителям, разбавителям или инкапсулирующим веществам, которые подходят для введения млекопитающим, таким как человек. Термин "носитель" означает органические или неорганические, природные или синтетические компоненты, которые объединяю с активными компонентами для облегчения применения. Компоненты фармацевтической композиции также могут быть смешаны в такой форме, в которой отсутствуют взаимодействия, способные существенно нарушить терапевтический эффект нужного лекарственного средства.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать буферную систему, и предпочтительно буферная система представляет собой ацетатный буферный раствор с рН от примерно 3,0 до примерно 6,0, или фосфатный буферный раствор с рН от примерно 5,0 до примерно 9,0. В некоторых конкретных воплощениях, подходящие буферы включают ацетат, цитрат, борат и фосфат.

Возможно, фармацевтическая композиция может также содержать подходящие консерванты, такие как бензалкония хлорид, хлор-трет-бутанол, парабены и тимеросал.

Фармацевтическая композиция может быть удобно представлена в стандартной лекарственной форме и может быть получена любым способом, известным в области фармакологии. Такой способ включает стадию объединения активного агента с носителем, который содержит один или более вспомогательных ингредиентов. Как правило, композицию готовят путем непосредственного комбинирования активного соединения с одним или обоими из жидкого носителя и мелкодисперсного твердого носителя с последующим формированием продукта, если это необходимо.

Фармацевтическими композициями, подходящими для парентерального введения, могут быть стерильные водные или неводные композиции, содержащие один или более слитых белков или конъюгатов. В некоторых воплощениях композиция изотонична крови субъекта. Этот препарат может быть получен в соответствии с известными методами с использованием подходящих диспергирующих или увлажняющих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный инъекционный препарат может также представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например раствор в 1,3-бутандиоле. Приемлемые носители и растворители, которые могут быть использованы, включают воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используют в качестве растворителей или суспензионных сред. По этой причине можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или ди-глицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, могут быть использованы в качестве инъекционных композиций. Составы носителей, подходящие для перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и т.д. введения, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Слитый белок или конъюгат по настоящему изобретению может быть приготовлен с носителями, которые защищают его от быстрого высвобождения, например в виде композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфирные и полимолочная кислота. Многие способы получения таких композиций известны в уровне техники, см., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, и т.п.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить любым обычным путем, включая инъекцию или постепенную инфузию в течение времени. Например, введение может быть пероральным, внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, внутриполостным, внутриопухо-

левым или трансдермальным.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в эффективном количестве. "Эффективное количество" представляет собой количество любого слитого белка или конъюгата, представленного здесь, одного или с дополнительными дозами и/или другими терапевтическими агентами, вызывающими необходимый ответ (например снижение уровней глюкозы в крови у субъектов). Это может включать только временное замедление развития диабета или в некоторых воплощениях, долговременную остановку развития диабета.

Конечно, такое количество зависит от конкретного заболевания, подлежащего лечению, тяжести заболевания, индивидуальных параметров пациента (включая возраст, физическое состояние, рост и массу тела), продолжительности лечения, характера сопутствующего лечения (если таковое имеется), конкретного пути введения и подобных факторов в пределах знаний специалистов в области медицины и здравоохранения. Эти факторы хорошо известны специалистам в данной области и их можно узнать с использованием только рутинных экспериментов. Обычно предпочтительно использовать максимальную дозу каждого компонента или их комбинации, то есть самую высокую безопасную дозу, основанную на разумном медицинском суждении. Однако специалисты в данной области понимают, что пациентам могут потребоваться более низкие дозы или допустимые дозы по медицинским, психологическим или, в сущности, любым другим причинам.

Фармацевтическая композиция, используемая в предыдущем способе, предпочтительно является стерильной и содержит эффективное количество слитого белка или конъюгата, одного или в комбинации с другим препаратом в единице массы или единице объема, пригодной для введения пациентам для получения необходимого ответа, такого как снижение уровня глюкозы в крови.

Доза слитого белка или конъюгата, вводимая субъекту, может быть выбрана в соответствии с разными параметрами, особенно в соответствии со способом введения и состоянием субъекта. Другие факторы включают необходимый период лечения. Если реакция субъекта на начальную применяемую дозу недостаточна, может быть применена более высокая доза (или эффективная более высокая доза, достигаемая другим, более локальным путем доставки) в пределах толерантности пациента.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит 0,20 мг/мл ~ 5 мг/мл слитого белка GLP-1 и/или 4 мг/мл ~ 40 мг/мл конъюгата слитого белка GLP-1, предпочтительно 0,20 мг/мл ~ 5 мг/мл слитого белка GLP-1 и/или 4 мг/мл ~ 40 мг/мл конъюгата слитого белка GLP-1, более предпочтительно 0,5 мг/мл ~ 2 мг/мл слитого белка GLP-1 и/или 10 мг/мл ~ 20 мг/мл конъюгата слитого белка GLP-1. Как правило, доза слитого белка GLP-1 или конъюгата слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению может варьировать от примерно 10 мкг/кг массы тела пациента до примерно 100000 мкг/кг массы тела пациента. В некоторых воплощениях доза может варьировать от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг. В других воплощениях доза может варьировать от примерно 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, или от 0,1 мг/кг до 15 мг/кг. В других воплощениях доза может варьировать от примерно 1 мг/кг до 5 мг/кг, от 5 мг/кг до 10 мг/кг, от 10 мг/кг до 15 мг/кг или от 15 мг/кг до 20 мг/кг. В других воплощениях доза составляет примерно 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 7 мг/кг, 10 мг/кг, 12 мг/кг, 15 мг/кг, 17 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг или 30 мг/кг. В другом воплощении доза составляет примерно 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг или 6 мг/кг. Исходя из свойств композиции, доза может доставляться непрерывно (например, с помощью непрерывного насоса) или с периодическими интервалами. В некоторых воплощениях, при внутривенном введении, доза слитого белка GLP-1 или конъюгата слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению может быть от 0,1 до 20 мг/кг или иметь любое значение в этом интервале. Идеальный интервал времени для многократного введения конкретной композиции может быть определен специалистами в данной области без излишних экспериментов. Другие режимы дозирования предложенной композиции известны специалистам в данной области, где доза, режим введения, место введения, способ введения и т.д. могут отличаться от вышеуказанных. В одном воплощении дозу вводят внутривенно. В другом воплощении режим приёма лекарственного средства представляет собой однократное внутривенное введение.

Набор, содержащий слитый белок GLP-1 или конъюгат слитого белка GLP-1 (например, в фармацевтической композиции) и инструкции по применению также входят в объем настоящего изобретения. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один другой агент, например один или более других агентов, снижающих уровень глюкозы в крови. В другом воплощении набор может включать носитель, который разделен на отсеки для крепкого удержания одного или более контейнеров или ряда контейнеров (таких как пробирки, канюли, колбы, бутылки, шприцы и т.д.). Компоненты набора могут быть упакованы в водной среде или в лиофилизированной форме.

Композиция может быть представлена в лиофилизированной форме или в водной среде.

Предпочтительно, субъект является позвоночным, более предпочтительно млекопитающим, наиболее предпочтительно человеком, но субъект также может быть и другим животным, таким как домашние животные (например собаки, кошки и т.д.), домашний скот (например крупный рогатый скот, овцы и козы, свиньи, лошади и т.д.) или экспериментальные животные (например обезьяны, крысы, мыши, кролики, морские свинки и т.д.).

Слитый белок GLP-1 и/или конъюгат слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению можно вво-

доть самостоятельно, но предпочтительно его вводят в виде фармацевтической композиции, которая обычно содержит подходящие фармацевтические эксципиенты, растворители или носители, выбранные в соответствии с запланированным путем введения, и он может быть применен к пациенту/субъекту, нуждающемуся в лечении, любым подходящим способом. Точная дозировка будет зависеть от ряда факторов, включающих точную природу слитого белка GLP-1 и конъюгата слитого белка GLP-1.

Некоторые подходящие способы введения включают (без ограничения) пероральное, ректальное, назальное, местное (включая буккальное и сублингвальное), трансдермальное, вагинальное или парентеральное (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутрикожное, интраокулярное и эпидуральное) введение.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит изотонический модификатор и/или консервант, предпочтительно изотонический модификатор представляет собой один или более из сахарозы, маннита, хлорида натрия и глицерина, и консервант выбирают из м-крезола, бензилового спирта, метил-п-гидроксibenзоата, этил-п-гидроксibenзоата, пропилен-п-гидроксibenзоата и бутил-п-гидроксibenзоата. Специалисты в данной области способны приготовить растворы, подходящие для слитого белка GLP-1 или конъюгата слитого белка GLP-1 по настоящему изобретению, используя, например, изотонические эксципиенты, такие как физиологический раствор, раствор Рингера для инъекций и лактатный раствор Рингера для инъекций. В соответствии с требованиями также могут быть добавлены стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Фармацевтическая композиция для перорального применения может быть в виде таблеток, капсул, порошков или пероральных жидкостей. Таблетки могут содержать твердые носители, такие как желатин или адьюванты. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, вазелин, животное или растительное масло, минеральное масло или синтетическое масло, и они могут также включать физиологический раствор, глюкозу или другие растворы Сахаров или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция находится в виде жидкого препарата и/или лиофилизированного препарата. Предпочтительно, лиофилизированный препарат содержит лиопротектор, и более предпочтительно лиопротектор выбран из сахарозы, лактозы, маннита, трегалозы и других сахаров.

Слитый белок GLP-1 и/или конъюгат слитого белка GLP-1, описанные здесь, предпочтительно вводят субъекту в "терапевтически эффективном количестве" или "эффективном количестве". Композицию предпочтительно вводят субъекту в "терапевтически эффективном количестве", и терапевтически эффективное количество или эффективное количество достаточно, чтобы оказать пользу субъекту. Фактическое введенное количество, а также скорость и продолжительность курса введения будут зависеть от состояния и тяжести заболевания пациента, подлежащего лечению. Назначение лечения (такое как определение дозы) определяется медицинским персоналом, и, как правило, учитывают заболевание, подлежащее лечению, состояние отдельного пациента, место доставки, путь введения и другие факторы, известные врачам.

В некоторых воплощениях диапазон дозы слитого белка GLP-1 и/или конъюгата слитого белка GLP-1 может составлять от 30 мг/кг массы тела/сутки до 0,00001 мг/кг массы тела/сутки, от 3 мг/кг/сутки до 0,0001 мг/кг/сутки или от 0,3 мг/кг/сутки до 0,01 мг/кг/сутки.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения заболеваний, включающий введение терапевтически эффективного количества слитого белка GLP-1 и/или конъюгата слитого белка GLP-1 субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых воплощениях заболевание выбрано из группы, состоящей из: постпрандиального демпинг-синдрома, постпрандиальной гипергликемии, нарушения толерантности к глюкозе, ожирения, расстройств пищевого поведения, синдрома инсулинорезистентности, диабета и гипергликемии. В предпочтительном воплощении заболевание представляет собой диабет II типа.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как какие-либо дополнительные ограничения. Содержание всех ссылок, приведенных в настоящей заявке (включая ссылки на статьи, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и находящиеся на рассмотрении патентные заявки), прямо включено в настоящий документ посредством ссылки. В следующих примерах, если конкретно не указано, используемые реагенты и вещества являются имеющимися в продаже продуктами с по меньшей мере аналитической чистотой или эквивалентными уровнями чистоты.

Примеры

Пример 1. Получение слитого белка GLP-1.

1. Конструирование эукариотического экспрессионного вектора слитого белка GLP-1.

Слитый белок GLP-1, конструируемый в этом примере, имеет структуру GLP-1-L1-Fc-L2-ST, где GLP-1 представляет собой различные формы GLP-1 или его аналоги, предпочтительно последовательность GLP-1 является такой же, как дулаглутид (Trulicity™). L1 и L2 представляют собой первый и второй линкеры соответственно, где последовательность L1 представляет собой GGGGSGGGGSGGGGSA, и последовательность L2 представляет собой GGGGSGGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGGS или GSGGGSGGGGSGGGGGS, либо L2 отсутствует. Fc представляет Fc-область иммуноглобулина, которая происходит из человеческого IgG2 (также представлен как Fc2 в настоящем изобретении) или IgG4 (так-

же представлен как Fc4 в настоящем изобретении). Предпочтительно, Fc-область является такой же, как дулаглутид (Trulicity™), который является вариантом человеческого IgG4 (Fc4). ST представляет собой сайт распознавания сортазы A с ST последовательностью LPETG или LPETGGG.

Аминокислотные последовательности разных слитых белков GLP-1 были обратно транслированы в нуклеотидные последовательности в соответствии с предпочтением кодонов для клеток CHO. Полноразмерный фрагмент ДНК слитого белка GLP-1 был получен посредством синтеза целого гена и ПЦР-амплификации, и затем клонирован в эукариотический экспрессионный вектор pFRL-DHFR через сайты рестрикции HindIII-EcoRI на обоих концах. Вектор pFRL-DHFR содержал промотор цитомегаловируса человека (промотор hCMV-MIE), SV40 polyA, DHFR (дигидрофолатредуктаза) и другие элементы, которые могут способствовать эффективной и стабильной экспрессии чужеродных генов в эукариотических клетках (фиг. 1А).

Таблица 1. Список разных слитых белков GLP-1, сконструированных в Примере

Таблица 1. Характеристики аминокислотных последовательностей разных слитых белков GLP-1

Название белка	GLP-1	L1	Fc	L2	ST
GLP1-L1-Fc4-ST	Соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GSGGGG SA	Человеческий IgG4, соответствует дулаглутиду	Нет	LPETG
GLP1-L1-Fc4-L2-ST	Соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GSGGGG SA	Человеческий IgG4, соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GSGGGGS	LPETG
GLP1-L1-Fc2-L2-ST	Соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GSGGGG SA	Человеческий IgG2	GSGGGSGG GSGGGGS	LPETG
GLP1-L1-Fc2-ST	Соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GSGGGG SA	Человеческий IgG2	Нет	LPETG
GLP1-L1-Fc4-L2-ST G3	Соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GSGGGG SA	Человеческий IgG4, соответствует дулаглутиду	GGGGSGG GGS	LPETGGG

1. Аминокислотная последовательность GLP1-L1-Fc4-ST

HGEGTFTSDVSSYLEEQAQKEFIAWLVKGGGGGGSGGGSGGGGSAESKYGPPC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLPETG (SEQ ID NO: 1)

Нуклеотидная последовательность GLP1-L1-Fc4-ST:

CACGGCGAGGGCACTTTCACATCCGACGTGTCTAGCTACTTGAAGAGCAGGCC
GCTAAGGAGTTCATCGCTTGGCTCGTGAAGGGAGGTGGTGGTGGAGGTGGATCTGGC
GGAGGAGGATCTGGAGGTGGAGGAAGCGCCGAGTCCAAGTACGGACCTCCATGCCC
ACCTTGCCAGCACCAGAGGCCGCTGGCGGCCATCTGTGTTCTCTGTTCCACAAA
GCCAAAGGACACACTCATGATTAGCCGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGG
CGTGTCTCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCACAACGCTAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTCAACAGCACATACCGGGTG
GTGAGCGTGTCTGACTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTGTCTAACAAGGGCCTGCCTAGCTCTATTGAAAAGACTATTTCTAAGGCTAAG
GGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCACCTTCTCAGGAGGAGATGACA
AAGAACCAGGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCATCCGACATCGCT
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATACTACAAGACTACTCTCCAGT
GCTCGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGACTCCAGACTCACAGTGGACAAGTCCCG
TTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTCCACAACCA
CTACACTCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCCTGCCGAAACTGGG (SEQ ID NO:

2)

2. Аминокислотная последовательность GLP1-L1-Fc4-L2-ST.

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGGSSGGGSAESKYGPPC
 PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSSGL
 PETG (SEQ ID NO: 3)

Нуклеотидная последовательность GLP1-L1-Fc4-L2-ST:

CACGGCGAGGGCACTTTCACATCCGACGTGTCTAGCTACTTGAAGAGCAGGCC
 GCTAAGGAGTTCATCGCTTGGCTCGTGAAGGGAGGTGGTGGTGGAGGTGGATCTGGC
 GGAGGAGGATCTGGAGGTGGAGGAAGCGCCGAGTCCAAGTACGGACCTCCATGCCC
 ACCTTGCCAGCACCAGAGGCCGCTGGCGGCCATCTGTGTTCTGTTCCCAAAA
 GCCAAAGGACACACTCATGATTAGCCGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGA
 CGTGTCTCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
 TGCACAACGCTAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTCAACAGCACATAACGGGTG
 GTGAGCGTGTGCTGCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTG
 CAAGGTGTCTAACAAGGGCCTGCCTAGCTCTATTGAAAAGACTATTTCTAAGGCTAAG
 GGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCACCTTCTCAGGAGGAGATGACA
 AAGAACCAGGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCATCCGACATCGCT
 GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAACAAGACTACTCCTCCAGT
 GCTCGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAGACTCACAGTGGACAAGTCCCG
 TTGGCAGGAGGGCAACGTGTTCTTGTCTCCGTGATGCACGAGGCCCTCCACAACCA
 CTACACTCAGAAGTCCCTGTCTGTCTGCTCCCTGGGCGGAGGTGGCGGCTCTGGAGGCGG
 AGGTAGTGGTGGCGGGGTTCACTGCCGAAACTGGG (SEQ ID NO: 4)

3. Аминокислотная последовательность GLP1-L1-Fc2-L2-ST.

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGGSSGGGSAVECPPCPA
 PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGSSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGSSGLPETG
 (SEQ ID NO: 5)

Нуклеотидная последовательность GLP1-L1-Fc2-L2-ST:

CACGGCGAGGGAAACATTCACCAGCGACGTGTCCAGCTACCTGGAGGAGCAGGC
 CGCCAAGGAGTTTATCGCCTGGCTCGTGAAGGAGGCGGCGGCGGAGGAGGTTCTG
 GCGGCGGCGGCTCCGGCGGAGGCGGATCCGCTGTTGAATGTCTCCATGTCCAGCTC
 CACCAGTTGCTGGGCCTTCCGTCTTCTTATCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT
 GATATCTCGTACCCCTGAGGTGACCTGTGTCTAGTGGATGTGAGTCATGAAGATCCA
 GAAGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGATGGTGTGCAAGTGCATAATGCTAAGACCAAG
 CCACGAGAGGAGCAGTTTAACTCAACCTTTAGGGTTGTGAGTGTGTTGACTGTCTGTC
 CATCAAGATTGGTTAAACGGTAAAGAATACAAGTGTAAGTCTCCAACAAGGGATTG
 CCTGCCCTATTGAGAAGACCATTCCAAGACGAAAGCCAACCACGTGAGCCTCAA
 GTGTATACTCTACCCCAAGTCGAGAGGAGATGACTAAGAATCAAGTCTCACTTACGT
 GTCTTGTCAAAGGTTTCTACCCATCAGACATTGCCGTGGAGTGGGAGTCAAATGGTC
 AACCCGAGAATAATTATAAGACCACTCCCCCATGTTAGACTCAGACGGTCTTTCTT
 CTTGTACTCTAACTTACTGTGACAAATCCCGATGGCAACAAGGCAATGTGTTCTCC
 TGTTCCGTCATGCACGAGGCCTTACACAATCACTATAACCAGAAATCCTGTCTTTGTC
 TCCAGGGGGTCTGGCGGTGGCTCCGGTGGAGGCGGAAGCGGCGGTGGAGGATCAC
 TGCCCGAAACTGGG (SEQ ID NO: 6)

4. Аминокислотная последовательность GLP1-L1-Fc2-ST.

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGSSGGGSSAVECPPCPAP
 PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLF
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETG (SEQ ID NO: 7)

Нуклеотидная последовательность GLP1-L1-Fc2-ST:

CACGGCGAGGGAACATTCACCAGCGACGTGTCCAGCTACCTGGAGGAGCAGGC
 CGCCAAGGAGTTTATCGCCTGGCTCGTGAAAGGAGGCGGCGGCGGAGGAGGTTCTG
 GCGGCGGCGGCTCCGGCGGAGGCGGATCCGCTGTTGAATGTCTCCATGTCCAGCTC
 CACCAGTTGCTGGGCCTTCCGCTTCCCTATTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGAT
 GATATCTCGTACCCCTGAGGTGACCTGTGTCGTAAGTGGATGTGAGTCATGAAGATCCA
 GAAGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGATGGTGTGCAAGTGCATAATGCTAAGACCAAG
 CCACGAGAGGAGCAGTTAACTCAACCTTTAGGGTTGTGAGTGTGTTGACTGTCTGTC
 CATCAAGATTGGTTAAACGGTAAAGAATACAAGTGTAAAGTCTCAACAAGGGATTG
 CCTGCCCTATTGAGAAGACCATTCCAAGACGAAAGGCCAACACGTGAGCCTCAA
 GTGTATACTCTACCCCAAGTCGAGAGGAGATGACTAAGAATCAAGTCTCACTTACGT
 GTCTTGTCAAAGGTTTCTACCCATCAGACATTGCCGTGGAGTGGGAGTCAAATGGTC
 AACCCGAGAATAATTATAAGACCACTCCCCCATGTTAGACTCAGACGGTCTTTCTT
 CTGTACTCTAACTTACTGTGACAAATCCCGATGGCAACAAGGCAATGTGTTCTCC
 TGTTCCGTCATGCACGAGGCCTTACACAATCACTATAACCAGAAATCCTTGCTTTGTCT
 TCCAGGAAACTGCCCGAAACTGGG (SEQ ID NO: 8)

5. Аминокислотная последовательность GLP1-L1-Fc4-L2-STG3.

HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGGGGGSGGGSSGGGSSAESKYPPC
 PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF
 FLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGGGGSLPETGG
 G (SEQ ID NO: 22)

Нуклеотидная последовательность GLP1-L1-Fc4-L2-STG3:

CACGGCGAGGGCACTTTCACATCCGACGTGTCTAGCTACTTGGAAGAGCAGGCCCGCT
 AAGGAGTTCATCGCTTGGCTCGTGAAAGGAGGTGGTGGTGGAGGTGGATCTGGCGG
 AGGAGGATCTGGAGGTGGAGGAAGCGCCGAGTCCAAGTACGGACCTCCATGCCAC
 CTTGCCCAGCACAGAGGCCGCTGGCGGCCCATCTGTGTTCTGTTCCACCAAAGC
 CAAAGGACACACTCATGATTAGCCGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACG
 TGTCTCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 CACAACGCTAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTCAACAGCACATAACGGGTGGT
 GAGCGTGCTGACTGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA
 AGGTGTCTAACAAGGGCCTGCCTAGCTCTATTGAAAAGACTATTTCTAAGGCTAAGGG
 CCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCACCTTCTCAGGAGGAGATGACAAA
 GAACCAGGTGTCCCTGACTTGCTCGTGAAGGGCTTCTACCCATCCGACATCGCTGTG
 GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACTACTCCTCCAGTGCT
 CGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGACTCCAGACTCACAGTGGACAAGTCCCGTTG
 GCAGGAGGGCAACGTGTTCTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTCCACAACCACTA
 CACTCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGCGGAGGAGGTGGATCTGGTGGAGGCGG
 ATCTCTGCCCGAAACTGGGGGTGGA (SEQ ID NO: 23)

2. Скрининг и ферментация стабильных клеточных линий.

2.1. Скрининг стабильных клеточных линий.

Каждую сконструированную выше плазмиду трансфицировали в клетку-хозяина CHO DG44 посредством электротрансфекции с плотностью клеток 6×10^6 клетки/мл, в объеме 0,8 мл и с количеством плазмиды 40 мкг. Плазмиду и клетки осторожно перемешивали, а затем добавляли в электропорационные кюветы (Bio-Rad, 4 мм). Электропоратор, используемый здесь, был от Bio-Rad (GENE PULSER XCELL), и параметры электропорации были следующими: напряжение 290 В и длительность импульса 20 мс.

После электропорации клетки переносили в чашки Петри, содержащие 15 мл восстановительной среды, на 48 ч культивирования и затем инокулировали в 96-луночные планшеты со средой для скрининга, содержащей 50 нМ МТХ (метотрексат). Когда конфлюентность клеток достигала более 50%, в клеточных линиях проводили скрининг на высокую экспрессию посредством метода дот-блоттинг с использованием козлиных античеловеческих IgG Fc. Отобранные клоны с относительно высокими уровнями экспрессии последовательно переносили на 24-луночные планшеты, 6-луночные планшеты, колбы для культивирования клеток T25 и колбы для встряхивания клеточных культур для размножения.

Чтобы увеличить выход слитого белка, клетки культивировали под давлением с увеличением концентрации метотрексата. С помощью ингибирования гена DHFR метотрексатом была реализована ко-амплификация гена DHFR и гена слитого белка.

2.2. Ферментация.

Клетки инокулировали в объем 8 л и с плотностью $0,8-1,6 \times 10^6$ клеток/мл в 15 л биореактор (Applikon, Biobundle 15L). Параметры культивирования были установлены следующим образом: pH $6,95 \pm 0,15$, DO 45%, подача кислорода: большая пузырьковая вентиляция, и скорость вращения: 80-140 об-мин. При плотности клеток примерно $10-12 \times 10^6$ клеток/мл на 5-е сутки культивирования, температуру культивирования снижали до 33°C. Питание начинали с четвертых суток культивирования, и остаточное содержание глюкозы измеряли каждые сутки. Сахар добавляли до достижения концентрации 3 г/л каждые сутки до понижения температуры и 4 г/л после понижения температуры. Во время культивирования количество клеток и жизнеспособность измеряли каждые сутки. На 13-е сутки клетки собирали, когда жизнеспособность составляла примерно 90%.

На фиг. 1В-4 показана кривая роста, жизнеспособность клеток, результаты микроскопического исследования и различные параметры процесса для стабильной клеточной линии GLP1-L1-Fc2-L2-ST (номер клона: P1-3G3C2) во время ферментации. Как видно из фиг. 1В, на девятые сутки ферментации плотность клеток была самой высокой и составляла $20,5 \times 10^6$ /мл, и на 13-е сутки, когда клетки собирали, плотность клеток составляла $15,5 \times 10^6$ /мл и жизнеспособность клеток составляла 86,6%. Микроскопические исследования показали, что морфология клеток была хорошей без явных мертвых клеток (фиг. 2А и фиг. 2В). На фиг. 3 и фиг. 4 показан метаболизм глюкозы, NH_4^+ и молочной кислоты (Lac) во время ферментации.

На фиг. 11-14 показана кривая роста, жизнеспособность клеток, результаты микроскопических исследований и различные параметры процесса для GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 во время ферментации с подпиткой. Из фиг. 11В видно, что на 8 сутки ферментации клеточная плотность была самой большой и составляла $19,9 \times 10^6$ клеток/мл, и на 14-е сутки, когда клетки собирали, плотность клеток составляла $16,0 \times 10^6$ клеток/мл и жизнеспособность клеток составляла 92%. Микроскопические исследования показали, что морфология клеток была хорошей без явных мертвых клеток (фиг. 12А и фиг. 12В). На фиг. 13 и фиг. 14 показан метаболизм глюкозы и изменения pH во время ферментации.

Содержание белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST в ферментационном супернатанте составляло 1,8 г/л и содержание GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 составляло 1,19 г/л согласно определению инструментом с молекулярным взаимодействием (Pall Life Science, Qke). SDS-PAGE электрофорез использовали для определения целостности белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST. GLP1-L1-Fc2-L2-ST представляет собой слитый белок Fc с двойной цепью с молекулярной массой 61,6 кДа (без сахарных цепочек). Как показано на фиг. 5, молекулярная масса GLP1-L1-Fc2-L2-ST была в основном такой же, как теоретическая молекулярная масса в невосстановленном и восстановленном состоянии. В то же время SDS-PAGE электрофорез использовали для определения изменений белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 (фиг. 15). Видно, что выход целевого белка значительно увеличился с 12 по 14-ые сутки культивирования и в супернатанте целевой белок составлял большинство, и оставалось только небольшое количество примеси. Экспрессированный белок был идентифицирован методом ELISA (иммуносорбентный анализ), и результат был положительным.

2.3. Очистка и определение.

GLP1-L1-Fc2-L2-ST и GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 в супернатанте ферментационного бульона очищали в две стадии: с помощью аффинной хроматографии (Uni mab, NanoMicro) и анионообменной хроматографии (QHP, ВХК). Очищенный белок определяли с помощью SDS-PAGE и SEC. Согласно результатам SDS-PAGE (фиг. 6А и фиг. 16А), размер целевого белка был в основном таким же, как теоретическая молекулярная масса. SEC выполняли на Agilent Advancebio SEC 300A, 2,7 мкм, 7,8×300 мм колонка, градиентное элюирование проводили с использованием 50 мМ Tris + 150 мМ NaCl + 10% ацетонитрил, pH 7,0 (температура колонки: 30°C, скорость потока: 0,5 мл/мин, температура инжектора образца: 4,0°C, объем инжектора образца: 50 мкг, и время анализа образца: 35 мин). На фиг. 6В видно, что время удерж-

живания белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST составляло 14,6 мин, и чистота после двухступенчатой очистки составляла 97,2%. На фиг. 16B видно, что время удерживания белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 составляло 14,49 мин, и чистота после двухступенчатой очистки составляла 98,412%.

Пример 2. Связывание 20 и 40 кДа PEG со слитым белком GLP1-Fc.

С-концы всех сконструированных слитых белков GLP1-Fc содержали коровую последовательность распознавания LPETG сортазы А, которая может быть специфически распознана сортазой А. Под действием сортазы А, амидная связь между Т и Г была разорвана и Т реагировал с сульфгидрильной группой С в положении сортазы 184 с образованием промежуточной тиоэфирной связи, которую затем атаковали GGGAA-PEG с poly-Gly на N-конце. Наконец, PEG с разной молекулярной массой связывали с С-концом белка.

Системы реакции пегилирования белков GLP1-L1-Fc2-L2-ST и GLP1-L1-Fc2-ST были следующими: 20 или 40 кДа GGGAA-PEG (GGGAA был приобретен у Shanghai GL Biochem Co., Ltd., а 20 или 40 кДа GGGAA-PEG был синтезирован Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) растворяли в буферном растворе и доводили pH до 8,0, и затем белок добавляли к буферной системе 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0 при соотношении питания 1:15 и 1:10 соответственно. Затем добавляли сортазу А и 10 mM CaCl₂. Отбор проб проводили в разные моменты времени реакции, и через 90 мин добавляли ЭДТА, чтобы остановить реакцию.

Система реакции пегилирования белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 была следующей: 40 кДа GGGAA-PEG (GGGAA приобретали у Shanghai GL Biochem Co., Ltd., и 40 кДа GGGAA-PEG синтезировали в Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) растворяли в буферном растворе и доводили pH до 7,0 и затем добавляли белок и PEG к буферной системе 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,0 при соотношении питания 1:15 (молярное соотношение). Затем добавляли сортазу А и CaCl₂ (10 mM), 50 ME фермента на мг целевого белка, и конечная концентрация целевого белка составляла 6 мг/мл. Через 30 мин добавляли ЭДТА, чтобы остановить реакцию.

Вышеупомянутые продукты после связывания анализировали с помощью SDS-PAGE и обращённо-фазовой хроматографии (RPC) для определения уровня связывания (уровень сшивания). Одиночное сшивание означает, что только один мономер димера слитого белка связан с PEG, а двойное сшивание означает, что оба мономера димера слитого белка связаны с PEG. Тест посредством обращенной фазовой хроматографии проводили на Waters Xbridge®protein BEH C4, 3,5 мкм, 4,6×250 мм хроматографической колонке с градиентным элюированием 0,1% TFA вода и 0,1% TFA ацетонитрил, в условиях: температура колонки 50°C, длина волны обнаружения 280 нм, скорость потока 0,5 мл/мин, температура инжектора образца 4,0°C, объем инжектора образца 20 мкг и время анализа образца 50 мин. Результаты тестирования белков GLP1-L1-Fc2-L2-ST и GLP1-L1-Fc2-ST показаны на фиг. 7. По мере увеличения времени реакции продукты пегилирования с 20 или 40 кДа PEG постепенно увеличивались. Через 90 мин продукты пегилирования достигали максимума, и реакцию прекращали, и в это время общий уровень сшивки белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST с 20 кДа PEG составлял 75,62%, из которых однократная сшивка составляла 55,57%, а двойная 20,05%. Общий уровень сшивки белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST с 40 кДа PEG составлял 40,15%, из которых одинарная сшивка составляла 36,36%, а двойная 3,79%. Общий уровень сшивки белка GLP1-L1-Fc2-ST с 40% PEG составлял 60,83%, из которых одинарная скорость сшивки составила 48,46%, а двойная 12,37%. Из результатов сшивки с 40 кДа PEG видно, что при тех же условиях реакции эффективность сшивки GLP1-L1-Fc2-ST была значительно выше, чем у GLP1-L1-Fc2-L2-ST.

Результаты теста белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 показаны на фиг. 17. По мере увеличения времени реакции 40 кДа-пегилирование продукта постепенно увеличивалось. Через 30 мин продукт пегилирования достигал максимума и реакция была прекращена, и в это время общий уровень сшивки белка GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 с 40 кДа PEG составлял 80,86%, из них одинарная сшивка составляла 44,087% с временем пика 10,543 мин, а двойная сшивка 36,782% с пиковым временем 9,698 мин.

Очистка и обнаружение после сшивания.

После сшивания с 40 кДа PEG, GLP1-L1-Fc2-L2-ST подвергали Butyl HP гидрофобной хроматографии для удаления непрореагировавшего GGGAA-PEG и сортазы А, и анионообменной хроматографии для удаления несшитого субстратного белка, для контроля остаточного количества субстрата в пределах 1%. Как показано на фиг. 8A, GLP1-L1-Fc2-L2-ST, сшитый с 40 кДа PEG, можно разделить на два пика P1 и P2 с помощью анионообменной хроматографии. Результаты теста RPC показывают (фиг. 8B), что пик P1 соответствует, в основном, двойным сшитым продуктам (двойной сшитый продукт 90,84%, одиночный сшитый продукт 8,4%, субстрат 0,15%), а P2 пик соответствует, в основном, одиночным сшитым продуктам (двойной сшитый продукт 8,56%, одиночный сшитый продукт 90,12%, субстрат 0,73%). Время удерживания несшитого GLP1-L1-Fc2-L2-ST составляло 17,3 мин, а время удерживания одиночных и двойных сшитых продуктов составляло 22,5 и 23,2 мин, соответственно.

После сшивания с 40 кДа PEG, GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 можно разделить на одиночные сшитые, двойные сшитые и субстраты посредством анионообменной хроматографии (SuperQ 5PW, TOSOH). Хроматограмма показана на фиг. 18A. Согласно результатам теста посредством SEC (гель-проникающая хроматография) (фиг. 18B и C), пик P1 был, в основном, двойным сшитым продуктом (двойной сшитый продукт составлял 97,172%, одиночный сшитый продукт 2,766%, субстрат 0%), а P2 пик был, главным

образом, одиночным сшитым продуктом (двойной сшитый продукт составлял 19,722%, одиночный сшитый продукт 79,754%, субстрат 0,158%). Время удерживания одиночных и двойных сшитых продуктов составляло 10,63 и 9,8 мин соответственно.

Пример 3. Определение активности сшитого белка GLP1-L1-Fc2-L2-ST.

GLP-1 может активировать аденилатциклазу (AC) посредством связывания с рецептором GLP-1 (GLP-1R) с получением цАМФ, а цАМФ дополнительно активирует цАМФ-зависимый транскрипционный фактор, то есть элемент ответа цАМФ активирующего белка (CREB), который активирует транскрипцию ниже расположенных генов после связывания с элементом ответа цАМФ (CRE).

Определение в этом примере включает следующие стадии: клетки HEK293/CRE-Luc/GLP1R (приобретали у GenScript, #M00562) культивировали до логарифмической фазы роста, переваривали трипсином и ресуспендировали в полной среде с доведением плотности клеток до 1×10^6 клеток/мл, а затем клетки добавляли в белые 96-луночные планшеты, 50 мкл/луночка. Дулаглутид и тестируемое вещество разбавляли полной средой до 400 нг/мл и затем разбавляли в 4-кратном соотношении с получением в общей сложности 9 градиентов и затем добавляли к клеткам, 50 мкл/луночка. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 ч. Позднее добавляли люциферазу Bright-Glo Luciferase (promega) по 100 мкл в луночку и защищали от света в течение 10 мин. Для измерения величины флуоресценции использовался полнополосный считыватель флуоресцентных микропланшетов (TECAN, 200PRO).

Данные обрабатывали в соответствии с четырехпараметрическим уравнением с помощью программного обеспечения Softmax analysis, при этом значения флуоресценции стандартных и тестируемых веществ были ординатами, а логарифмическое значение концентраций было абсциссами. Относительную активность исследуемого вещества рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\text{Относительная активность тестируемого вещества} = \frac{\text{EC}_{50} \text{ стандартного вещества}}{\text{EC}_{50} \text{ тестируемого вещества}}$$

На фиг. 9 показаны результаты теста активности GLP1-L1-Fc2-L2-ST, сшитого с 20 и 40 кДа PEG соответственно. По сравнению с дулаглутидом относительная активность несшитого субстрата (GLP1-Fc) составляла 98,10%. Активность обоих PEG-сшитых продуктов уменьшалась, когда относительная активность продукта, сшитого с 20 кДа PEG (указанного как PEG (20 кДа)-GLP1-Fc на фигуре) составляла 40,38% и относительная активность 40 кДа сшитого продукта (указанного как PEG (40 кДа)-GLP1-Fc на фигуре) составляла 32,85%.

На фиг. 19 показаны результаты теста активности GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, сшитого с 40 кДа PEG. Аналогично PEG-конъюгированному GLP1-L1-Fc2-L2-ST, по сравнению с дулаглутидом, активность 40 кДа PEG-конъюгированного GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 (указанного как PEG (40 кДа)-GLP1-Fc) на фигуре) была снижена, с относительной активностью 21,51%.

Пример 4. In vivo гипогликемическая активность слитого белка GLP-1 или его PEG конъюгата.

C57BL/6 мыши (приобретенные у Beijing Vital River Co., Ltd.) выращивали по 5 мышей в клетке, кормили нормальным мышиным кормом и питьевой водой в свободном доступе. Светлое время составляло 12 ч (08:00am-20:00pm), а темное время составляло 12 ч (20:00pm-08:00am).

(1) Экспериментальные результаты для GLP1-L1-Fc2-L2-ST.

40 здоровых самцов мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель были разделены на 5 групп по 8 мышей в каждой. Эти группы включали: (1) группу GLP1-Fc (GLP-1-L1-Fc2-L2-ST субстрата до сшивания); (2) группу дулаглутида; (3) группу 40 кДа PEG GLP1-Fc (GLP-1-L1-Fc2-L2-ST, сшитую с 40 кДа PEG); (4) группу 20 кДа PEG GLP1-Fc (GLP-1-L1-Fc2-L2-ST, сшитую с 20 кДа PEG); и (5) контрольную группу. Группам (1)-(4) вводили по 3 мг/кг, а контрольной группе давали нормальный физиологический раствор. Эксперимент IPGTT выполняли через 24, 144, 168, 192, 216 и 240 ч после введения. Экспериментальная процедура была следующей. Мыши голодали в течение 6 часов, у них измеряли уровень глюкозы в крови и массу тела. В период голодания мыши имели свободный доступ к воде. Через 6 ч мышам вводили 2,0 г/кг раствора глюкозы объемом 10 мл/кг внутривенно и измеряли значения глюкозы крови через 10, 30, 60, 90, 120 мин после глюкозной нагрузки. По этим значениям строили кривую толерантности к глюкозе и вычисляли площадь под кривой (AUC) глюкозы крови. Данные были представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка (Mean \pm SEM) и проанализированы с помощью статистического программного обеспечения Graphpad prism7.0. Различия были проанализированы с помощью статистики Манна-Уитни.

Как показано на фиг. 10A, 10B, 10C, 10D, 10E и 10F, как уровень глюкозы в крови, так и площадь под кривой (AUC) в глюкозотолерантном тесте каждой экспериментальной группы значительно снились по сравнению со значениями в контрольной группе в течение 6 суток после однократного введения. Через 7 суток не было достоверной разницы между группами дулаглутида, GLP1-Fc и контрольной группой, что указывает на то, что эффективность GLP1-Fc и дулаглутида может поддерживаться в течение 6 суток. Как показано на фиг. 10G, 10H, 10I, 10J, 10K и 10L, PEG (20 кДа)-GLP1-Fc все еще оказывал значительный эффект в отношении толерантности к глюкозе на 8-е сутки после однократного введения. Через 9 суток площадь под кривой (AUC) глюкозотолерантного теста не отличалась от контрольной группы, указывая, что эффект лекарственного средства может сохраняться в течение 8 суток. PEG (40 кДа)-GLP1-Fc все еще оказывал значительный эффект в отношении толерантности к глюкозе вплоть до 9-х

суток после однократного введения. Через 10 дней площадь под кривой (AUC) глюкозотолерантного теста не отличалась от контрольной группы, указывая на то, что эффект лекарственного средства может сохраняться в течение 9 суток.

На фиг. 10М показаны суточные изменения массы тела мышей C57BL/6J после введения. По сравнению с контрольной группой масса тела мышей в каждой группе снижалась в течение 24 ч, особенно в группе дулаглутид и группе GLP1-Fc, не сшитого с PEG. Стоит отметить, что как PEG (20 кДа)-GLP1-Fc, так и PEG (40 кДа)-GLP1-Fc могут значительно снизить быструю потерю массы тела, вызванную лекарственными средствами, указывая, что пегилирование может значительно облегчить побочные эффекты таких лекарственных средств при клинических применениях и, таким образом, они обладают лучшими свойствами безопасности.

(2) Экспериментальные результаты для GLP1-L1-Fc4-L2-STG3.

18 здоровых самцов мышей C57BL/6 в возрасте 8-10 недель были разделены на 3 группы по 6 мышей в каждой. Группы включали: (1) контрольную группу; (2) группу дулаглутид; и (3) группу PEG (40 кДа)-GLP1-Fc (GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, сшитый с 40 кДа PEG). Группам (2) и (3) вводили одинаковую активность (то есть выполняли пересчет массы на основании *in vitro* активности, определенной на фиг. 19), где доза дулаглутид составляла 0,76 мг/кг, доза PEG (40 кДа)-GLP1-Fc составляла 3,5 мг/кг, а контрольной группе давали физиологический раствор. Эксперимент IPGTT проводили через 1, 5, 6, 7 и 8 суток после введения, и экспериментальная процедура заключалась в следующем. Мыши голодали в течение 6 часов, и у них измеряли уровень глюкозы в крови и массу тела. В период голодания мыши имели свободный доступ к воде. Через 6 мышам вводили внутривенно 2,0 г/кг раствора глюкозы объемом 10 мл/кг и измеряли значения глюкозы крови через 10, 30, 60, 90, 120 мин после глюкозной нагрузки. По полученным значениям рассчитывали площадь под кривой (AUC) глюкозы крови. Данные были представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка (Mean \pm SEM) и проанализированы с помощью статистического программного обеспечения Graphpad prism7.0. Различия были проанализированы с помощью статистики Манна-Уитни.

Как показано на фиг. 20А, и глюкоза в крови, и площадь под кривой (AUC) глюкозотолерантного теста для мышей в каждой экспериментальной группе значительно снижались по сравнению со значениями в контрольной группе в течение 5 суток после однократного введения. Через 5 суток не было значимой разницы между дулаглутидной и контрольной группой, что указывало на то, что эффективность дулаглутид может сохраняться в течение 5 суток. PEG (40 кДа)-GLP1-Fc все еще оказывал значительный эффект в отношении толерантности к глюкозе до 7-х суток после однократного введения. Через 8 суток площадь под кривой (AUC) глюкозотолерантного теста не имела отличий по сравнению с контрольной группой, что указывает на то, что эффективность PEG (40 кДа) -GLP1-Fc может поддерживаться в течение 7 суток.

На фиг. 20В показаны изменения массы тела мышей C57BL/6 после введения. По сравнению с контрольной группой масса тела мышей в обеих группах снижалась в течение 24 часов, особенно в группе дулаглутид. Стоит отметить, что PEG (40 кДа)-GLP1-Fc также может значительно уменьшать быструю потерю массы тела, вызванную лекарственными средствами, что дополнительно показывает то, что пегилирование может значительно облегчить побочные эффекты таких лекарственных средств - агонистов рецепторов GLP-1 при клинических применениях.

Пример 5. Определение гипогликемической активности сшитого GLP1-L1-Fc4-L2-STG3 у мышей с STZ-индуцированным диабетом II типа.

Создание мышинной модели диабета II типа.

Мышей C57BL/6 (приобретенных у Beijing Vital River Co., Ltd.) выращивали по 5 мышей в клетке, кормили нормальным кормом для роста мышей и питьевой водой в свободном доступе. Светлое время составляло 12 ч (08:00am-20:00pm) и темное время составляло 12 ч (20:00pm-08:00am). 30 здоровых самцов мышей C57BL/6 в возрасте 8-10 недель обрабатывали 60 мг/кг STZ, который вводили непрерывно в течение 4 суток, а через 2 недели измеряли значения глюкозы в крови. Мыши со значениями глюкозы крови не натошак больше или равными 16,7 ммоль/л считались мышами с успешно установленным диабетом II типа.

Протокол.

24 мыши с диабетом II типа были разделены на 4 группы по 6 мышей в каждой. Эти группы включали: (1) контрольную группу; (2) группу дулаглутид-1 мг/кг; (3) группу PEG (40 кДа)-GLP1-Fc (GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, сшитый с 40 кДа PEG)-1 мг/кг; и (4) группу PEG (40 кДа)-GLP1-Fc (GLP1-L1-Fc4-L2-STG3, сшитый с 40 кДа PEG)-3 мг/кг. Доза дулаглутид составляла 1 мг/кг, доза PEG (40 кДа)-GLP1-Fc составляла 1 мг/кг или 3 мг/кг, а контрольной группе давали нормальный физиологический раствор. Уровень глюкозы в крови и массу тела в сутки 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 измеряли не натошак и с питьем в свободном доступе. Данные были представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка (Mean \pm SEM) и проанализированы с помощью статистического программного обеспечения Graphpad prism7.0. Различия были проанализированы с помощью статистики Манна-Уитни.

Результаты.

Как показано на фиг. 21А, уровень глюкозы в крови мышей в каждой экспериментальной группе значительно снижался по сравнению со значениями в контрольной группе после однократного введения. Разница в уровне глюкозы в крови между группой дулаглутид-1 мг/кг и контрольной группой все еще была значимой ($P=0,0022$) на 6-е сутки, но к 7-м суткам значимой разницы не было ($P=0,9654$), что указывает на то, что гипогликемический эффект дулаглутида может сохраняться вплоть до 6 суток.

С другой стороны, после однократного введения PEG (40 кДа)-GLP1-Fc-1 мг/кг все еще оказывал значительный гипогликемический эффект до 10-ых суток ($P=0,0381$), результат которого не был близок к контрольной группе до 11-ых суток ($P=0,1143$); и PEG (40 кДа)-GLP1-Fc-3 мг/кг все еще оказывал значительный гипогликемический эффект на 11-е сутки после однократного введения ($P=0,0381$), и разница между которым и контрольной группой не была существенной до 12-ых суток ($P=0,0762$). Приведенные выше результаты показали, что PEG (40 кДа)-GLP1-Fc оказывал значительно более долгосрочный гипогликемический эффект и может быть использован в лечении диабета II типа.

Кроме того, также наблюдали изменения массы тела у диабетических мышей после введения. Как показано на рис. 21В, масса тела мышей во всех экспериментальных группах снижалась по сравнению с массами в контрольной группе, особенно в группе дулаглутида, где масса тела мышей снижалась не более чем на 2,5 г по сравнению с контрольной группой. Две дозовые группы PEG (40 кДа)-GLP1-Fc оказывали гораздо меньшее влияние на массу тела, где масса тела мышей в группе PEG (40 кДа)-GLP1-Fc-1 мг/кг снижалась не более чем на 0,3 г по сравнению с контрольной группой и масса тела мышей в группе PEG (40 кДа)-GLP1-3 мг/кг снижалась не более чем на 1,1 г по сравнению с контрольной группой. Эти результаты показывают, что PEG (40 кДа)-GLP1-Fc в различных дозах может значительно улучшать быструю потерю массы тела, вызванную лекарственными средствами при использовании в лечении диабета, указывая, что модификации пегилированием могут значительно улучшить облегчить побочные эффекты таких лекарственных средств в клинических применениях и в то же время эффективно улучшить соблюдение пациентом режима лечения.

Таким образом, пегилированный GLP1-Fc может стимулировать секрецию инсулина островковыми β -клетками, ингибировать временное повышение уровня глюкозы в крови, вызванное экзогенным потреблением глюкозы, и способствовать утилизации глюкозы. После PEG-модификации, белок GLP1-Fc демонстрирует более длительный гипогликемический эффект и меньшее количество побочных эффектов, что предотвращает быструю потерю массы тела, часто вызываемую GLP-1-подобными, снижающими массу тела лекарственными средствами, и имеет хорошую перспективу клинического применения.

Настоящее изобретение было проиллюстрировано различными конкретными воплощениями. Однако специалистам в данной области понятно, что настоящее изобретение не ограничено конкретными воплощениями и специалисты могут делать различные модификации и вариации в рамках объема настоящего изобретения, не отходя от сущности и объема настоящего изобретения. Все эти модификации и вариации входят в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, где один или два гидрофильных полимера прикреплены к С-концу слитого белка агониста рецептора GLP-1 (глюкагоноподобный пептид 1),

где слитый белок агониста рецептора GLP-1 содержит агонист рецептора GLP-1 и партнер по слиянию (FP),

агонист рецептора GLP-1 выбран из группы, состоящей из эксендина-4, GLP-1(1-36), GLP-1(1-37), GLP-1(7-36), GLP-1(7-37), лираглутида, ликсисенатида, альбиглутида, дулаглутида и семаглутида,

партнер по слиянию представляет собой Fc-фрагмент, соединенный с С-концом агониста рецептора GLP-1 непосредственно или через первый линкер L1, первый линкер L1 представляет собой гибкий пептид, содержащий A, T, G и/или S, и

гидрофильный полимер представляет собой полиэтиленгликоль (PEG), имеющий молекулярную массу 20-40 кДа, и полиэтиленгликоль соединен с Fc-фрагментом.

2. Конъюгат по п.1, где первый линкер L1 содержит (GS)_n, где n является целым числом от 1 до 50;

предпочтительно первый линкер L1 выбран из группы, состоящей из:

GSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9),

GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 10),

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11),

GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12),

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13),

PRFQDSSSSKAPPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 14),

SSSSKAPPPSLPSPRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 15),

SSSSKAPPPS (SEQ ID NO: 16),

SRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 17) и

GGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 18).

3. Конъюгат по п.1, где Fc-фрагмент происходит из Fc-фрагмента иммуноглобулина человека;

Fc-фрагмент состоит из одного-четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4; или

Fc-фрагмент происходит из Fc-фрагмента IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, более предпочтительно Fc-фрагмента IgG;

предпочтительно Fc-фрагмент происходит из Fc-фрагмента IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и

более предпочтительно Fc-фрагмент IgG имеет пониженный ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) эффект, и/или CDC (комплементзависимая цитотоксичность) эффект, и/или повышенную аффинность связывания с FcRn.

4. Конъюгат по п.1, где партнер по слиянию (FP) также связан непосредственно или через второй линкер L2 с аминокислотной последовательностью ST, содержащей сайт распознавания сортазы;

предпочтительно сортаза представляет собой сортазу A или сортазу B;

предпочтительно ST содержит коровый сайт распознавания LPXTG сортазы A, где X представляет собой любую аминокислоту, и ST представляет собой, например, LPETG, LPETGG или LPETGGG;

более предпочтительно ST дополнительно содержит аффинную метку, связанную с сайтом распознавания сортазы, и ST представляет собой, например, LPETGGHHHHHH или LPETGGWSHPQFEK; и

где второй линкер L2 представляет собой пептид, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот;

более предпочтительно второй линкер L2 представляет собой гибкий пептид, содержащий A, T, G и/или S, например (GS)_n, где n является целым числом от 1 до 50, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

предпочтительно, второй линкер L2 выбран из группы, состоящей из:

GSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 9),

GGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 18),

GGGGS (SEQ ID NO: 19),

GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20) и

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 21).

5. Конъюгат по п.1, где полиэтиленгликоль является линейным или разветвленным.

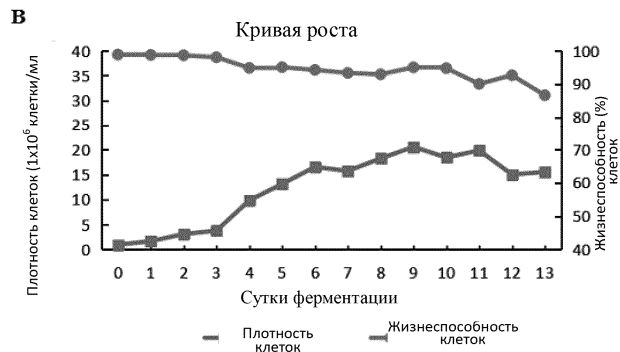
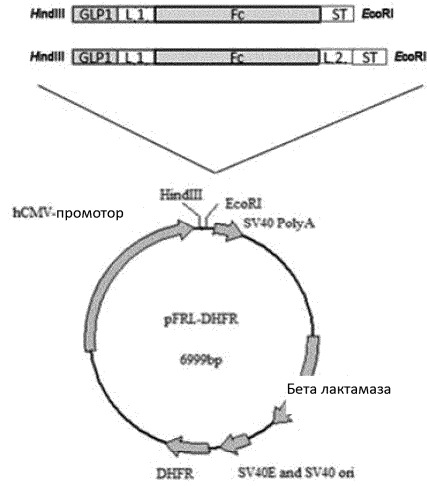
6. Способ получения конъюгата по любому из пп.1-5, включающий приведение слитого белка в контакт с сортазой и гидрофильным полимером, где один конец гидрофильного полимера имеет аминокислотную группу, которая может быть амидирована сортазой, и где один конец гидрофильного полимера содержит поли-Gly.

7. Способ по п.6, где сортаза представляет собой сортазу A или сортазу B, и/или поли-Gly пред-

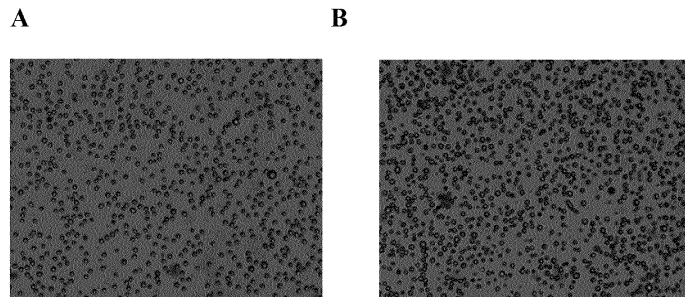
ставляет собой GGGAА.

8. Применение конъюгата по любому из пп.1-5 для изготовления лекарственного средства для снижения уровня глюкозы в крови или массы тела.

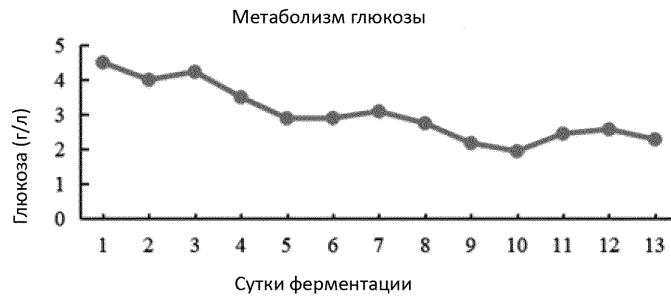
9. Применение по п.8, где лекарственное средство предназначено для лечения диабета, включая диабет I типа и диабет II типа, предпочтительно диабет II типа.



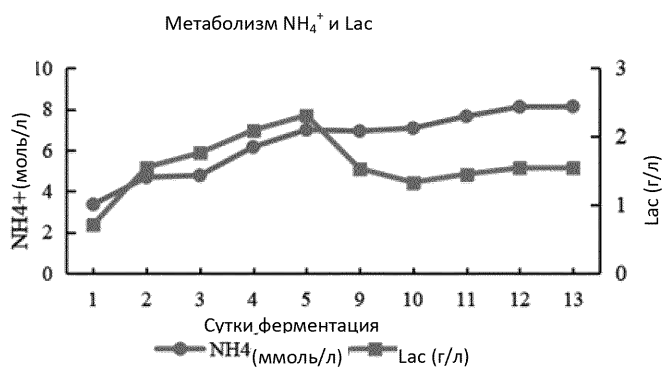
Фиг. 1



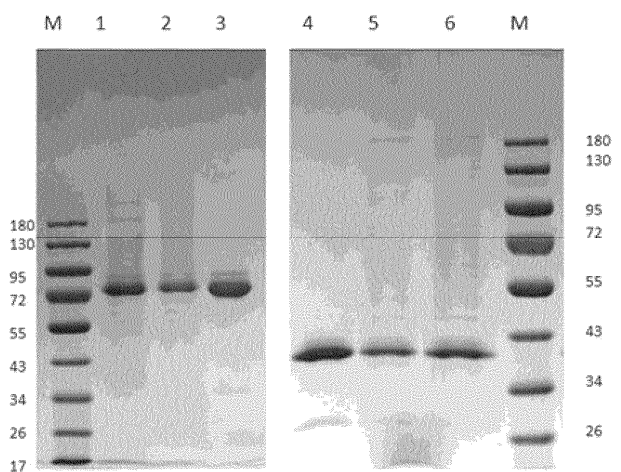
Фиг. 2



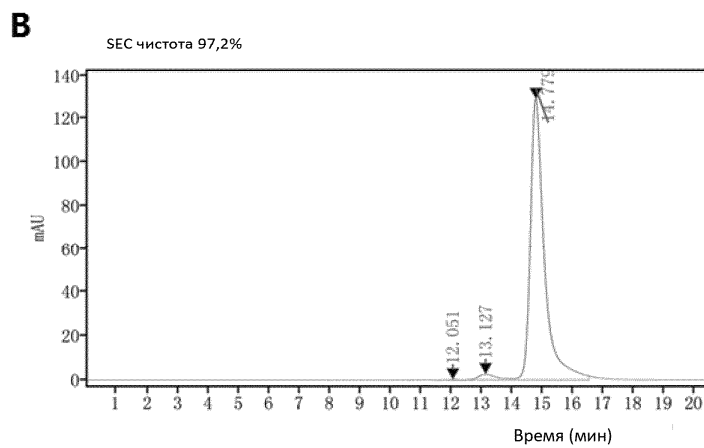
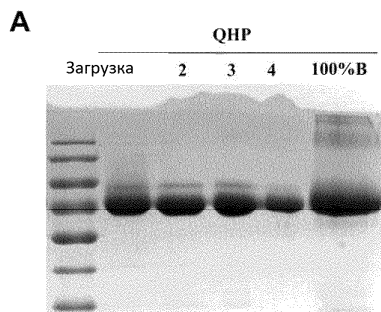
Фиг. 3



Фиг. 4

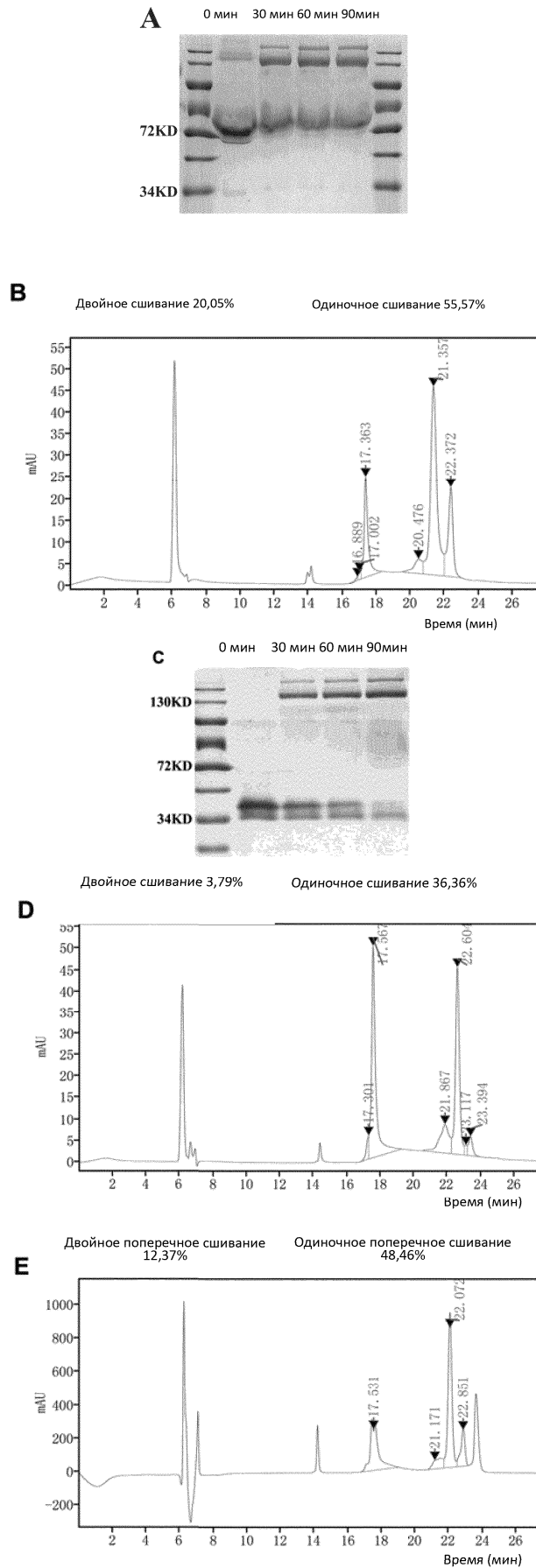


Фиг. 5

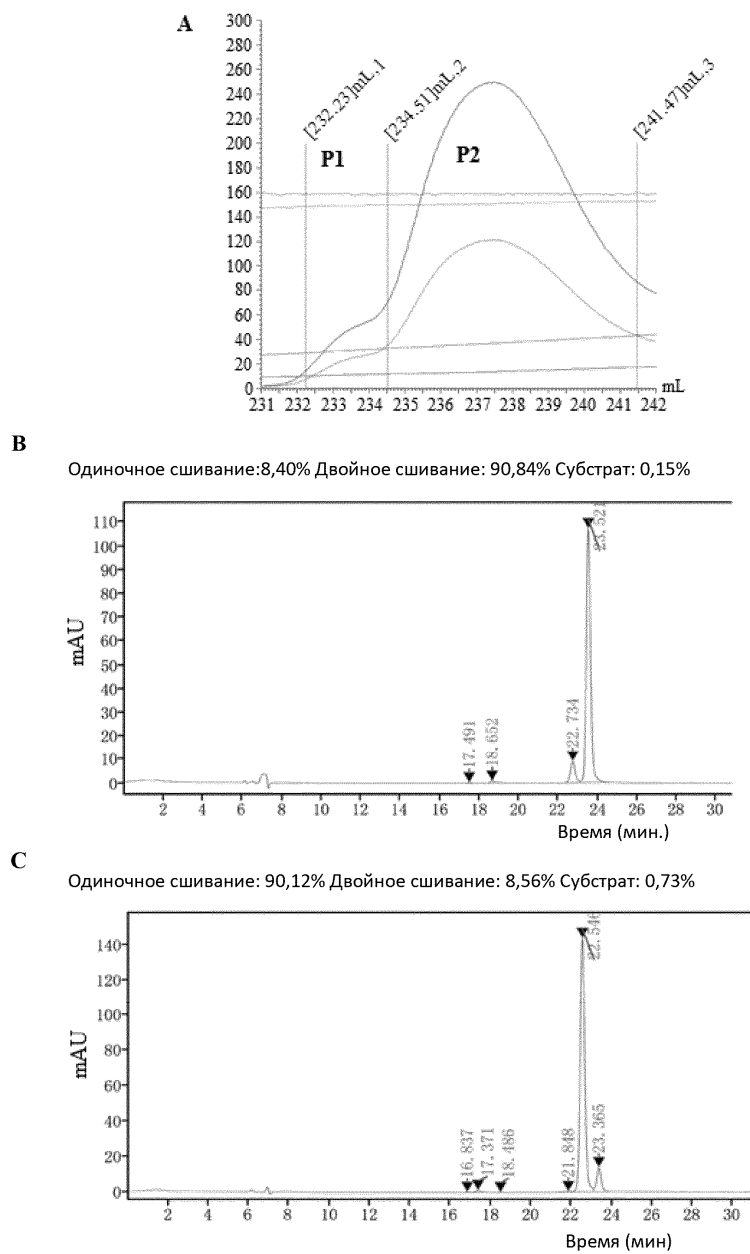


Фиг. 6

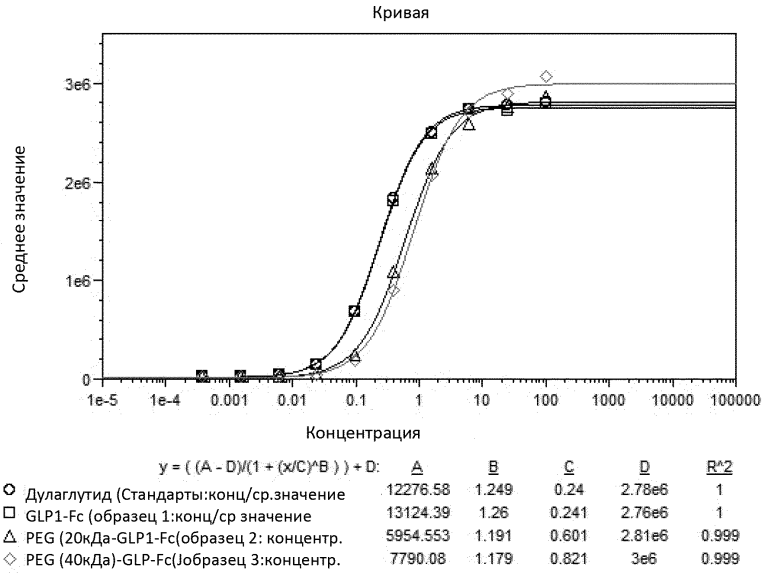
044650



Фиг. 7

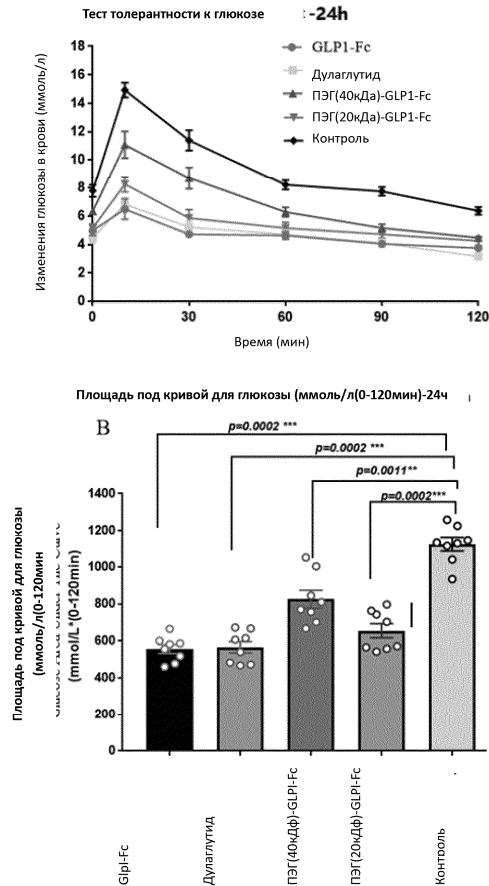


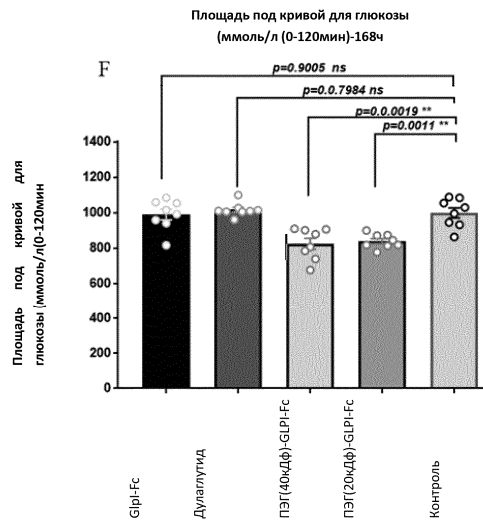
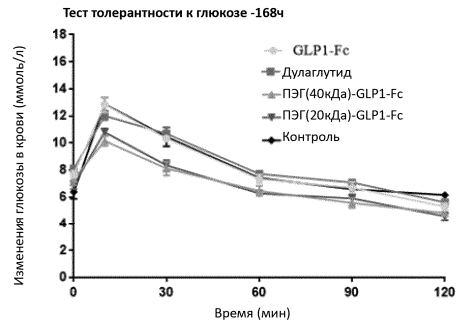
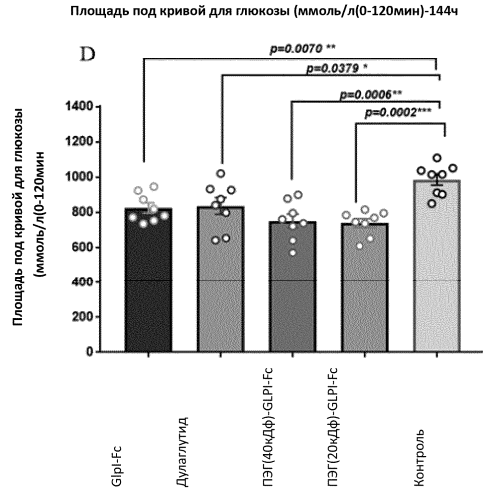
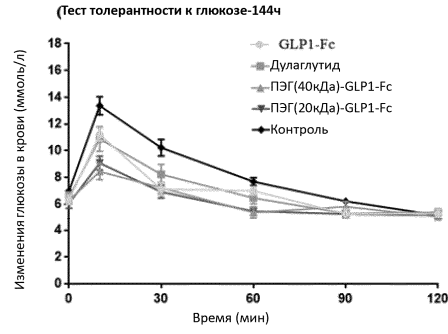
Фиг. 8

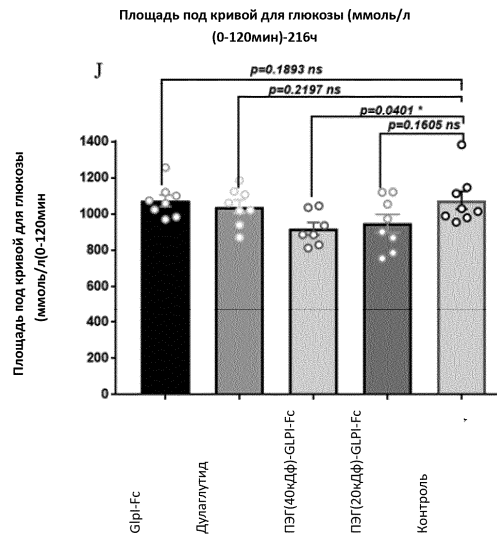
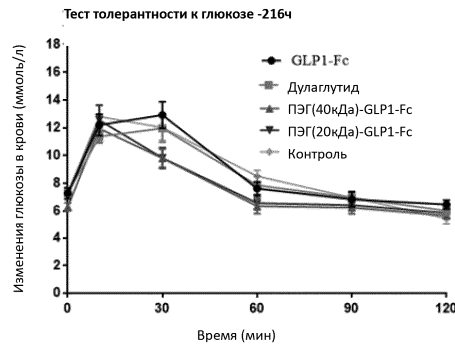
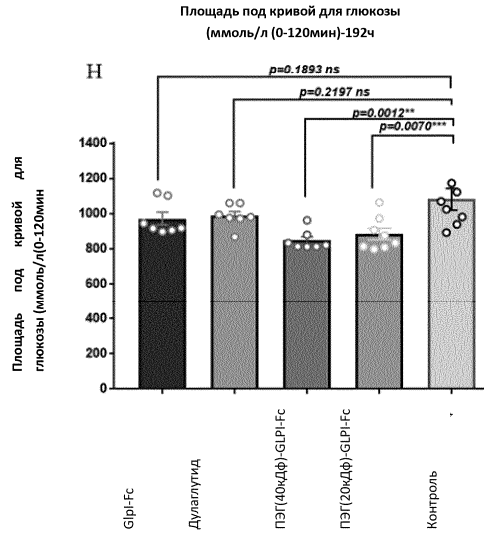
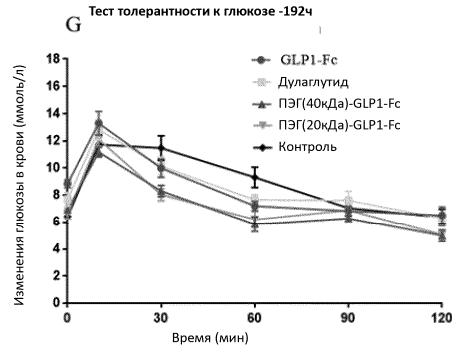


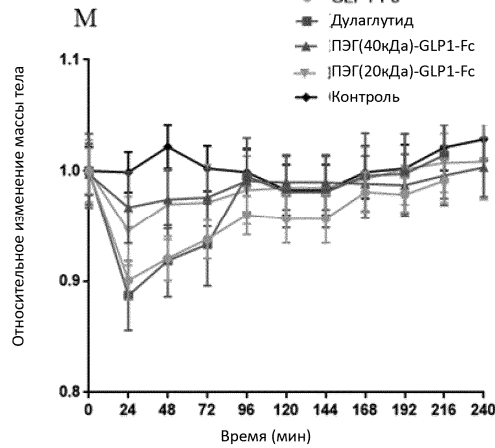
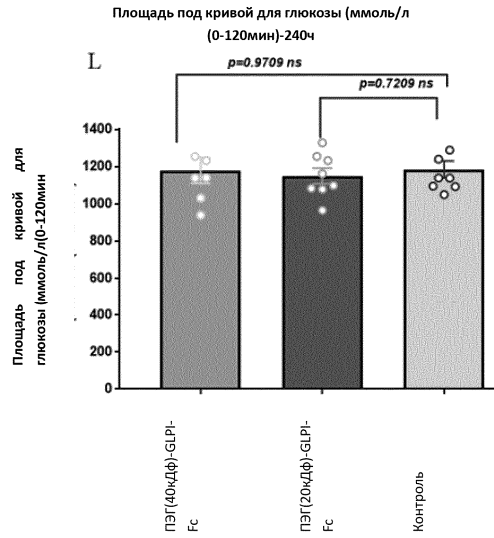
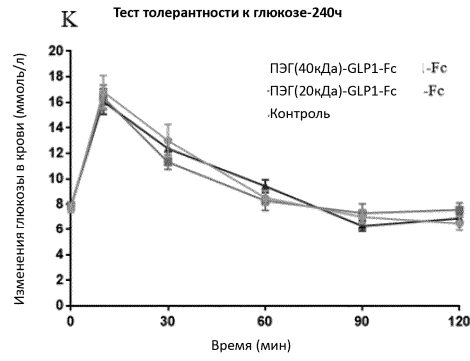
	EC50	Относит. активность	Наклон	Кoeffиц. наклона
дулаглутид	0,980	/	1,242	/
GLP1-Fc	0,999	98,10%	1,254	1,01
ПЭГ (20kDa) -GLP1-Fc	2,427	40,38%	1,183	0,95
ПЭГ (40kDa) -GLP1-Fc	2,983	32,85%	1,173	0,94

Фиг. 9

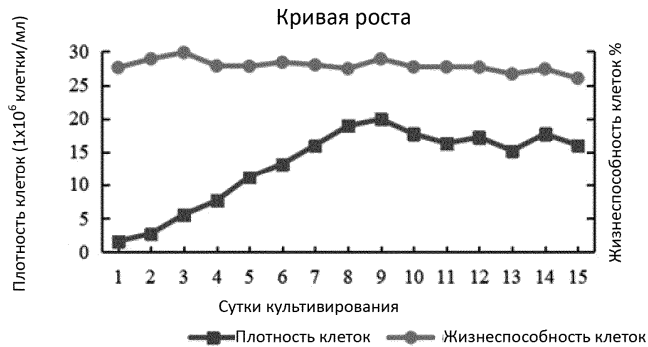




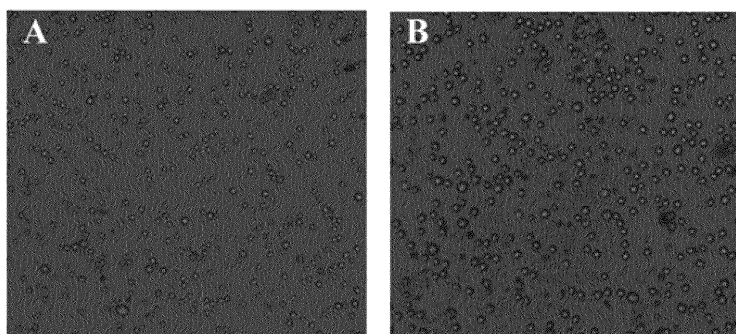




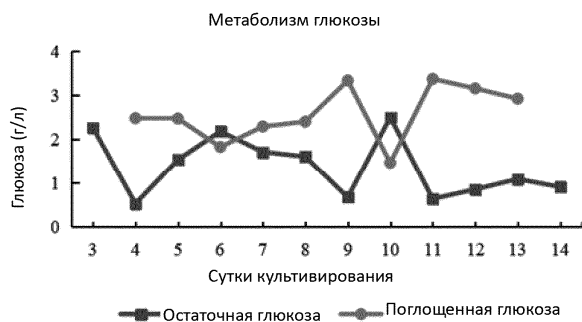
Фиг. 10



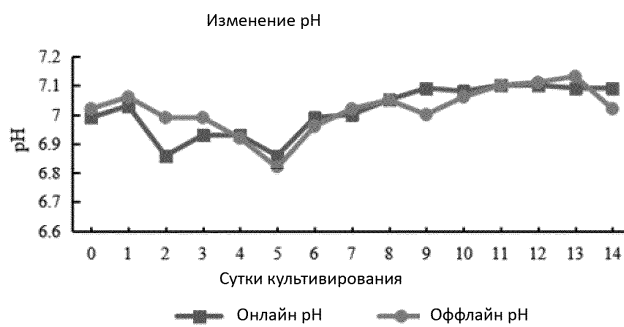
Фиг. 11



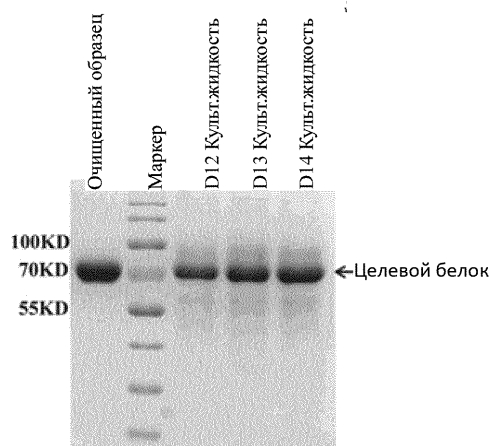
Фиг. 12



Фиг. 13

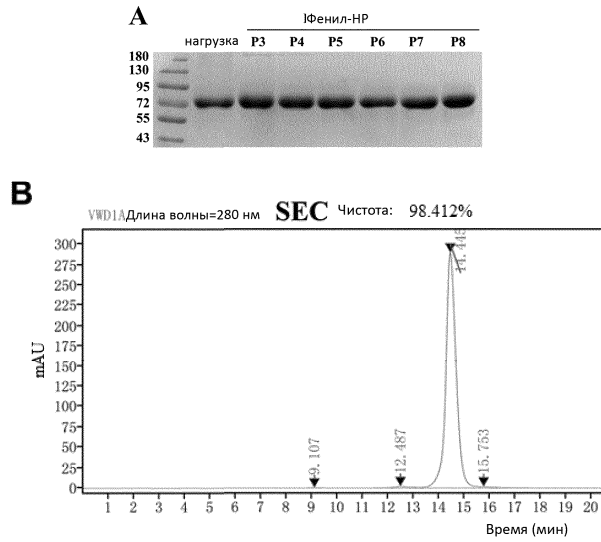


Фиг. 14

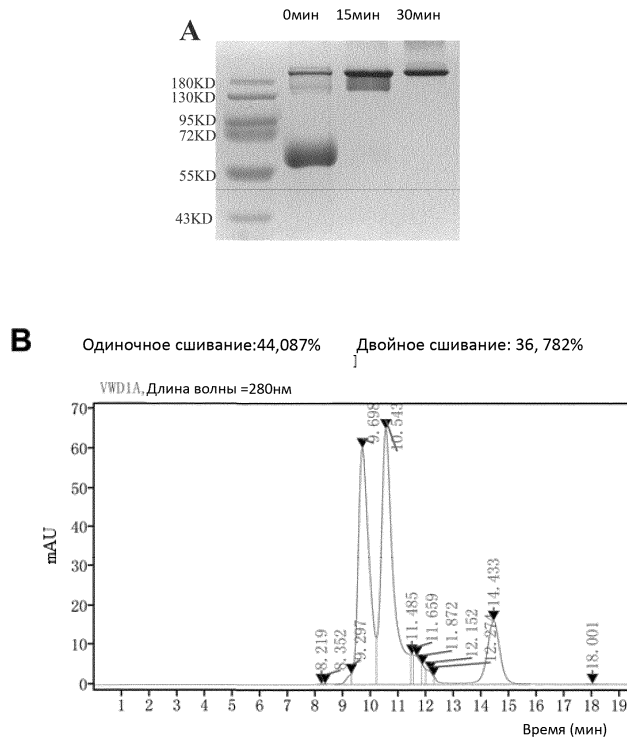


Фиг. 15

044650

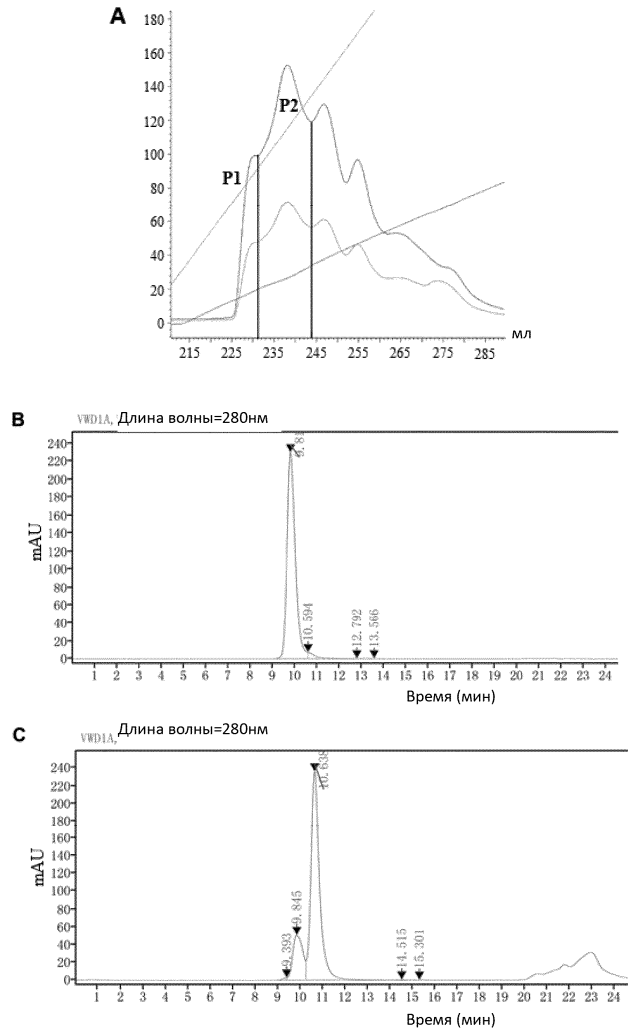


Фиг. 16

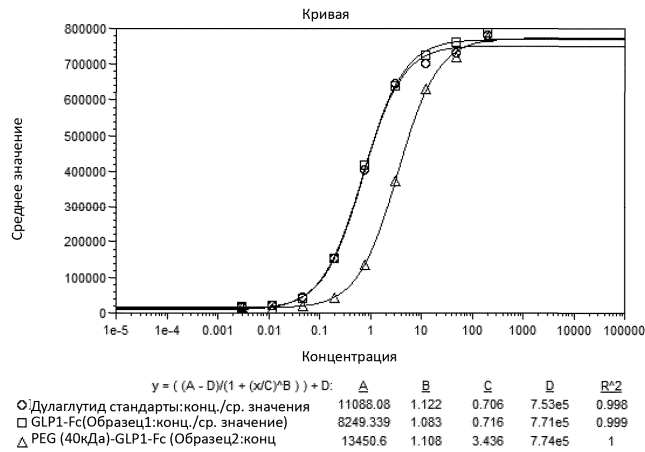


Фиг. 17

044650

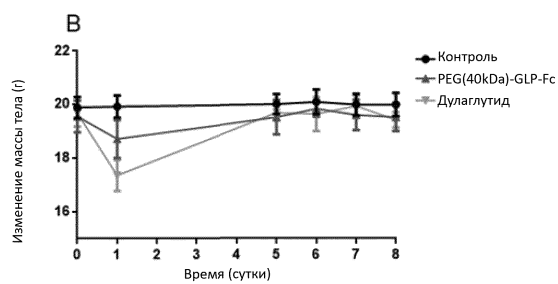
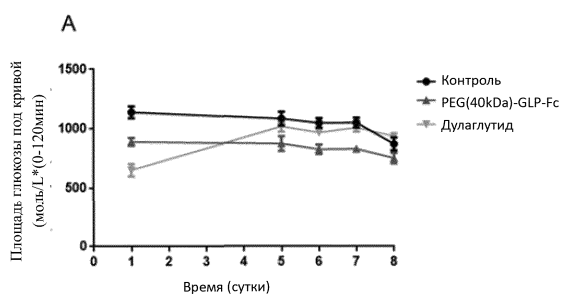


Фиг. 18

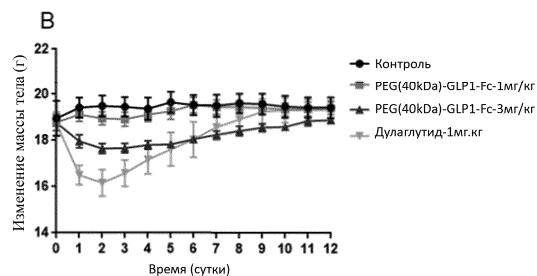
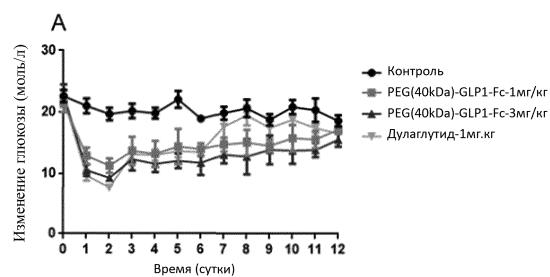


	EC50	Относительная активность	Наклон	Коэффициент наклона
Дулаглутид	0,765	/	1,122	/
GLP1-Fc	0,749	112,24%	1,083	0,97
PEG(40кДа)-GLP1-Fc	3,521	21,51%	1,108	0,99

Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

