

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201990136 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.05.31

(22) Дата подачи заявки
2017.06.27

(51) Int. Cl. C07K 16/26 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ, ПРИМЕНИМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

(31) 62/355,175

(32) 2016.06.27

(33) US

(86) PCT/US2017/039585

(87) WO 2018/005551 2018.01.04

(71) Заявитель:

ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУЗ ОФ
ГАРВАРД КОЛЛЕДЖ (US)

(72) Изобретатель:

Хотамислигил Гёкхан С., Калай Эдиз,
Тирош Амир, Тункман Гуrol, Секия
Мотохиро (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложен способ идентификации и применения соединений для ингибирования отклоняющейся от нормы или нарушенной продукции глюкозы в печени, которая приводит к повышенным уровням глюкозы в крови и ассоциированным нарушениям обмена веществ. Изобретение основано на неожиданном открытии того, что глюкагон образует облигатный связывающий комплекс с aP2, который необходим для активации сопряженного с G-белком рецептора глюкагона.

A1

201990136

201990136

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-553810ЕА/081

СОЕДИНЕНИЯ, ПРИМЕНИМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Заявление о государственном интересе

Настоящее изобретение было сделано при поддержке правительства США в соответствии с контрактами DK064360 и DK097145, выданными Национальными Институтами Здравоохранения США. Правительство США обладает некоторыми правами на настоящее изобретение.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/355,175, поданной 27 июня 2016 года. Все содержание этой предварительной заявки настоящим включено посредством отсылки во всех отношениях.

Включение посредством отсылки

Содержание текстового файла под именем "15020-017W01_SEQID_TXT_ST25", который был создан 27 июня 2017 года и имеет размер 61 КБ, настоящим полностью включено посредством.

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем изобретении предложены соединения и способы идентификации соединений, применимых в ингибировании отклоняющейся от нормы или нарушенной продукции глюкозы в печени, которая приводит к повышенным уровням глюкозы в крови и ассоциированным нарушениям обмена веществ.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ожирение, которое характеризуется ростом жировой ткани, увеличивает риск возникновения группы заболеваний, включающей диабет 2-го типа (T2D), неалкогольную жировую болезнь печени (НЖБП) и дислипидемию, которые, в свою очередь, повышают показатели смертности при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ) (Prospective Studies Collaboration, (2009) The Lancet 373, 1083-1096; Shimomura et al., (2000) Molecular cell 6, 77-86). Ожирение представляет собой комплексное нарушение аппетита и/или обмена веществ, приводящее к избыточному накоплению массы жировой ткани. Ожирение является важной клинической проблемой и становится эпидемическим заболеванием в западных странах,

поражая более трети взрослого населения в США. По некоторым оценкам, 97 миллионов взрослых в США имеют избыточный вес или ожирение. Ожирение дополнительно связано с преждевременной смертью и значительным увеличением заболеваемости и смертности от инсульта, инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца и внезапной смерти. Основными целями терапии при ожирении являются снижение избыточной массы тела, улучшение или предотвращение связанной с ожирением патологии и смертности, и сохранение длительного снижения веса.

Диабет – это заболевание, при котором нарушается способность организма вырабатывать или реагировать на гормон инсулин, что приводит к нарушению обмена углеводов и повышенному уровню глюкозы в крови и моче. Инсулин является гормоном, который регулирует поступление глюкозы в клетки. Существует два разных типа диабета. При сахарном диабете 1-го типа (T1D) поджелудочная железа не вырабатывает или вырабатывает мало инсулина. Около 1,25 миллиона жителей США имеют T1D, при этом ежегодно T1D диагностируют у примерно 40000 человек. Диабет 2-го типа (T2D), также известный как инсулиннезависимый диабет, является хроническим заболеванием, которое влияет на то, как организм метаболизирует глюкозу. При диабете 2-го типа организм либо резистентен к действию инсулина, либо не вырабатывает достаточного количества инсулина для поддержания нормального уровня глюкозы. Без достаточного количества инсулина уровень глюкозы в крови остается высоким. Около 27,9 миллиона жителей США или 9,3% населения имеют T2D. Диабет остается 7-й основной причиной смерти в США в 2010 году, при этом в 69071 свидетельстве о смерти диабет указан в качестве основной причины смерти, и в общей сложности в 234051 свидетельствах о смерти диабет перечислен в качестве основной или одной из причин смерти. Осложнения и сопутствующие патологии при диабете включают гипогликемию, гипергликемию, гипертензию, дислипидемию, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), инфаркт миокарда, инсульт, слепоту и ретинопатию, заболевание почек и ампутации.

Гипогликемия, как и гипергликемия, могут вызывать

повреждения у людей и других млекопитающих. Тело человека развило множество гормональных ответов для борьбы с гипогликемией таким образом, чтобы поддерживать критические функции организма, такие как деятельность мозга, который преимущественно потребляет глюкозу (Tesfaye N, Seaquist ER. Neuroendocrine responses to hypoglycemia. Ann N Y Acad Sci. 2010 Nov;1212:12-28; Marty N, Dallaporta M, Thorens B. Brain Glucose Sensing, Counterregulation, and Energy Homeostasis. Physiology. 2007 Aug 1; 22(4):241-251; Eigler N, Sacca L, Sherwin RS. Synergistic Interactions of Physiologic Increments of Глюкагон, Epinephrine, and Cortisol in the Dog. Journal of Clinical Investigation. 1979 Jan 1; 63(1):114-123). Нарушение секреции этих гормонов, например глюкагона, в значительной степени способствует развитию нарушений обмена веществ, связанных с избыточным уровнем глюкозы в крови (Unger RH, Cherrington AD. Глюкагонocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. J Clin Invest. 2012 Jan 3; 122(1):4-12). Гипергликемия, как видно из развития диабета, может приводить к серьезным осложнениям, в том числе повреждению почек, неврологическому поражению, сердечно-сосудистым повреждениям и повреждению сетчатки или повреждению ступней и ног. Диабетическая нейропатия может быть результатом длительной гипергликемии.

Другие осложнения, связанные с избыточным уровнем глюкозы в крови, включают полифагию (частый голод, в особенности выраженный голод), полидипсию (частую жажду, в особенности избыточную жажду), полиурию (увеличение объема мочевыделения (не частоты мочеиспускания)), нечеткость зрения, усталость, плохое или замедленное заживление ран (порезов, царапин и т.д.), покалывание в ногах или пятках, эректильную дисфункцию, рецидивирующие инфекции, сердечную аритмию, нарушение показателей глюкозы натощак, нарушение толерантности к глюкозе, дислипидемию, ожирение, нефропатию, ретинопатию, катаракту, инсульт, атеросклероз, диабетический кетоацидоз, гипергликемический гиперосмолярный синдром, периоперационную гипергликемию, гипергликемию у пациента в отделении интенсивной

терапии, синдром инсулинорезистентности и метаболический синдром.

Существующие методики лечения повышенных уровней глюкозы в крови, в том числе хронической гипергликемии, направлены на поддержание глюкозы в крови на уровне, максимально близком к нормальному, посредством комбинации правильного питания, регулярных занятий физкультурой и применения инсулина или другого лекарственного средства, такого как метформин. Тем не менее, несмотря на эти методы лечения, нарушения, связанные с избыточными уровнями глюкозы в крови, остаются основной проблемой всемирного здравоохранения.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП), включая ее более агрессивную форму - неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), также растет в эпидемических масштабах, параллельно с эпидемией ожирения (Sowers et al., (2011) *Cardiorenal Med.* 1:5-12). Вероятно, резкий рост числа случаев ожирения и НЖБП, отчасти, вызван западным стилем питания (WD), содержащим большое количество жира и сахара (например, сахарозы или фруктозы), так как за последние три десятилетия потребление фруктозы в США выросло более чем вдвое (Barrera et al., (2014) *Clin. Liver Dis.* 18:91-112). НЖБП характеризуется макровезикулярным стеатозом печени, который наблюдается у людей, мало употребляющих или неупотребляющих алкоголь. Гистологический спектр НЖБП включает присутствие стеатоза отдельно, жировую дистрофию печени и воспаление. НАСГ является более тяжелым хроническим заболеванием печени, которое характеризуется избыточным накоплением жира в печени, которое, по пока не полностью понятным причинам, вызывает хроническое воспаление, которое приводит к прогрессирующему фиброзу, который может приводить к циррозу, гепатоцеллюлярной карциноме и, как следствие, печеночной недостаточности и смерти (Brunt et al., (1999) *Am. J. Gastroenterol.*, 94:2467-2474; Brunt et al., (2001) *Semin. Liver Dis.*, 21:3-16; Takahashi et al., (2012) *World J. Gastroenterol.*, 18:2300-2308).

Несмотря на то, что НАСГ становится все более распространенным, поражая 2-5% жителей США и 2-3% людей во всем

мире (Neuschwander-Tetri et al., (2005) Am. J. Med. Sci., 330:326-3350), его основная причина до сих пор не ясна. Чаще всего он встречается у людей среднего возраста с избыточным весом или ожирением. У многих пациентов с НАСГ повышены уровни липидов в крови (например, холестерина и триглицеридов), наблюдается гиперинсулинемия, инсулинорезистентность, при этом многие из них имеют диабет или преддиабет. Не у всех лиц, страдающих ожирением, или каждого больного диабетом присутствует НАСГ. Кроме того, некоторые пациенты с НАСГ не страдают ожирением, не имеют диабета и имеют нормальный уровень холестерина и липидов в крови. НАСГ может возникать без какого-либо очевидного фактора риска и может возникать даже у детей. Таким образом, НАСГ вызван не только ожирением. В настоящее время специфических методов лечения НАСГ не существует. Важнейшими рекомендациями для людей с этим заболеванием являются физические упражнения, изменение диеты и пищевого поведения и снижение их веса.

Несмотря на постоянные успехи, сохраняется неудовлетворенная потребность в дополнительных исследованиях молекулярных механизмов, которые лежат в основе ожирения и его последствий, а также новых подходов к его лечению. Аналогичным образом, сохраняется острая необходимость в выявлении новых соединений и способов лечения и предотвращения НЖБП у пациентов с диабетом и без диабета.

Целью изобретения является определение новых соединений и их применение и композиции для лечения повышенных уровней глюкозы в крови, которые способствуют ожирению, неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), неалкогольному стеатогепатиту (НАСГ) и диабету (I и II типа).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии, что глюкагон проявляет свою активность в отношении рецептора глюкагона (GCGR) посредством комплекса, в котором глюкагон связан с белком адипоцитов, связывающим жирные кислоты (aP2). Как впервые описано в настоящем документе, было обнаружено, что циркулирующий aP2 является обязательным партнером по связыванию

глюкагона, поддерживая связанные с метаболизмом глюкозы активности в печени. Открытие этого белкового комплекса обеспечивает новый путь лечения для модуляции нарушений метаболизма глюкозы.

Как впервые описано в настоящем документе, циркулирующий аР2 усиливает действие глюкагона через сопряженный с G-белком рецептор глюкагона, как в моделях на культурах клеток, так и *in vivo*, где связывание комплекса глюкагона/аР2 с глюкагоновым рецептором приводит к активации аденилатциклазы, что вызывает повышение внутриклеточного цАМФ, усиливает гликогенолиз и повышает экспрессию глюконеогенных ферментов, в том числе фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK), фруктозо-1,6-бисфосфатазы (FBPase-1) и глюкозо-6-фосфатазы (G-6-Pase). Кроме того, сигнализация глюкагона активирует гликогенфосфорилазу и ингибирует гликогенсинтазу. Это приводит к продукции глюкозы в печени и повышению уровня глюкозы в крови.

На основе этого неожиданного открытия, в настоящем документе представлены способы идентификации соединений, которые нейтрализуют способность агониста глюкагонового рецептора глюкагона в комплексе с его облигатным партнером по связыванию, липидсвязывающим белком адипоцитов (аР2), вызывать сигнализацию глюкагонового рецептора. Кроме того, в настоящем документе предложены способы применения идентифицированных соединений для лечения нарушения, связанного с дисрегуляцией или отклонением от нормы продукции глюкозы в печени и повышенным уровнем глюкозы в крови, путем ингибирования связывания и индукции рецептора глюкагона агонистом глюкагонового рецептора глюкагоном в комплексе с его облигатным партнером по связыванию, липидсвязывающим белком адипоцитов (аР2).

В результате этого фундаментального открытия комплекса глюкагона/аР2, идентифицированы и созданы соединения, способные к нейтрализации активности комплекса глюкагона/белка аР2, например, антитело, которое предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/аР2. В одном варианте осуществления антитело селективно связывается с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2 или глюкагоном по отдельности. В одном варианте

осуществления антитело не связывается с GCGR. Такие антитела могут применяться при лечении заболеваний, опосредованных агонистическим взаимодействием глюкагона/aP2 с глюкагоновым рецептором.

В первом аспекте настоящего изобретения предложен способ идентификации соединения, способного связывать комплекс глюкагона/связывающего белка адипоцитов (глюкагона/aP2), включающий:

- i. контакт соединения с глюкагоном в комплексе с aP2 (глюкагоном/aP2); и
- ii. определение, связывается ли соединение с глюкагоном/aP2.

В одном варианте осуществления анализ проводят *in vitro* в отсутствие клеток. Способ может дополнительно включать введение соединения в анализ с aP2 и глюкагоном, или глюкагоном/aP2, и GCGR, и определение, связывается ли глюкагон/aP2 с GCGR, где отсутствие связывания глюкагона/aP2 с GCGR указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR. В другом варианте осуществления способ включает введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона, и/или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и измерение биологической активности GCGR. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие гепатоциты. В одном варианте осуществления соединение дополнительно подвергают конкурентному анализу связывания с целью идентификации соединения, которое предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и/или глюкагоном.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

- i. контакт соединения с aP2 и глюкагоном, и/или глюкагоном

в комплексе с aP2 (глюкагоном/aP2);

ii. определение, связывается ли соединение с aP2, глюкагоном или глюкагоном/aP2;

iii. введение соединения в анализ с aP2 и глюкагоном, или глюкагоном/aP2, и GCGR, и,

iv. определение, связывается ли глюкагон/aP2 с GCGR,

где отсутствие связывания глюкагона/aP2 с GCGR указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR. В одном варианте осуществления анализ проводят *in vitro* в отсутствие клеток. Способ может дополнительно включать введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона, и/или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и измерение биологической активности GCGR. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие гепатоциты. В одном варианте осуществления соединение дополнительно подвергают конкурентному анализу связывания с целью идентификации соединения, которое предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и/или глюкагоном.

В третьем аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. контакт aP2 и глюкагона, и/или глюкагона/aP2, с GCGR в присутствии соединения;

ii. контакт aP2 и глюкагона, и/или глюкагона/aP2, с GCGR в отсутствие соединения; и

iii. сравнение количества глюкагон/aP2, связавшегося с GCGR в присутствии соединения, с количеством глюкагона/aP2, связавшегося с GCGR в отсутствие соединения;

где уменьшение количества глюкагона/aP2, связывающегося с GCGR в присутствии соединения, указывает на соединение,

способное к нейтрализации агонистического взаимодействия с GCGR. В одном варианте осуществления анализ проводят *in vitro* в отсутствие клеток. В одном варианте осуществления соединение дополнительно подвергают конкурентному анализу связывания с целью определения соединения, которое предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и/или глюкагоном.

Способ измерения или идентификации связывания соединения с глюкагоном/aP2 или связывания глюкагона/aP2 с GCGR не ограничивается описанными иллюстративными вариантами осуществления. Примеры способов, которые могут применяться, описаны далее в настоящем документе и в Примерах, представленных ниже, и включают биослойную интерферометрию с прямым взаимодействием aP2 с биотинилированным глюкагоном (см. Пример 1; Фигуру 3A), сцинтилляционный анализ сближения, в котором ^{125}I -глюкагон взаимодействовал с биотинилированным aP2 (см. Пример 1; Фигуру 3B), изотермическую титрационную калориметрию, которая измеряет тепло, высвобождаемое в событиях связывания в растворе (см. Пример 1; Фигуру 3C) и микромасштабный термофорез (См. Пример 1 и изображает 4A-D).

В четвертом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

- i. введение aP2 и глюкагона, и/или глюкагона/aP2, в первый клеточный анализ, включающий клетки, экспрессирующие GCGR;
- ii. определение биологической активности GCGR в клетках в первом клеточном анализе;
- iii. представление aP2 и глюкагон и/или глюкагон/aP2 во второй клеточный анализ, включающий клетки, экспрессирующие GCGR, где aP2 и глюкагон, и/или глюкагон/aP2, вводят в присутствии соединения,
- iv. определение биологической активности GCGR в клетках во втором клеточном анализе; и
- v. сравнение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе с биологической активностью GCGR во втором

клеточном анализе, где уменьшение биологической активности GCGR во втором клеточном анализе по сравнению с биологической активностью GCGR в первом клеточном анализе указывает на соединение, которое нейтрализует агонистическое взаимодействие глюкагона/аР2 с GCGR. В одном варианте осуществления популяция клеток включает гепатоциты. В одном варианте осуществления популяция клеток включает человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяция клеток включает человеческие гепатоциты. В одном варианте осуществления соединения дополнительно подвергают конкурентному анализу связывания с целью идентификации соединения, которое предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2 и/или глюкагоном.

В пятом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/аР2 с GCGR, включающий:

i. введение соединения в первый клеточный анализ в присутствии аР2 и глюкагона, и/или глюкагон/аР2, и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где соединение присутствует в фиксированной концентрации, и где аР2 и глюкагон, и/или глюкагон/аР2, присутствуют в ненасыщающей концентрации;

ii. определение биологической активности GCGR в популяции клеток в первом клеточном анализе;

iii. введение соединения во второй клеточный анализ в присутствии аР2, глюкагона и/или глюкагона/аР2 и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где соединение присутствует в фиксированной концентрации, и где аР2 и глюкагон, и/или глюкагон/аР2, присутствуют в насыщающей концентрации;

iv. определение биологической активности GCGR в популяции клеток во втором клеточном анализе; и

v. сравнение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе с биологической активностью GCGR во втором клеточном анализе,

где уменьшение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе, превышающее уменьшение биологической активности GCGR во втором клеточном анализе, указывает на

соединение, которое нейтрализует агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR. В одном варианте осуществления популяция клеток включает гепатоциты. В одном варианте осуществления популяция клеток включает человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяция клеток включает человеческие гепатоциты.

В шестом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. введение соединения в первый клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона, и/или глюкагона в комплексе с aP2 (глюкагона/aP2), и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где соединение присутствует в фиксированной концентрации, и где aP2 и глюкагон, и/или глюкагон/aP2, присутствуют в первой концентрации;

ii. определение биологической активности GCGR в популяции клеток в первом клеточном анализе;

iii. введение соединения в серию дополнительных клеточных анализов в присутствии aP2 и глюкагона, и/или глюкагона в комплексе с aP2 (глюкагона/aP2), и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где серия дополнительных клеточных анализов включает соединение, присутствующее в фиксированной концентрации, и aP2, глюкагон и/или глюкагон/aP2 в последовательно повышающихся концентрациях по сравнению с первым клеточным анализом;

iv. определение биологической активности GCGR в популяции клеток в серии дополнительных клеточных анализов; и

v. сравнение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе с биологической активностью GCGR в серии дополнительных клеточных анализов,

где уменьшение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе, превышающее уменьшение биологической активности GCGR в серии дополнительных клеточных анализов, указывает на соединение, которое нейтрализует агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR. В одном варианте осуществления популяция клеток включает гепатоциты. В одном

варианте осуществления популяция клеток включает человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяция клеток включает человеческие гепатоциты.

В седьмом аспекте в настоящем документе предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

- i. контакт соединения с aP2; и
- ii. определение, связывается ли соединение с aP2 по аминокислоте Phe58, Asn60, Glu62 и/или Lys80 Seq. ID No. 1 или 2;

где связывание соединения с aP2 по аминокислоте Phe58, Asn60, Glu62 и/или Lys80 Seq. ID No. 1 или No. 2 указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR. В одном варианте осуществления анализ проводят *in vitro* в отсутствие клеток. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона, и/или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и измерение биологической активности GCGR. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие гепатоциты.

В восьмом аспекте в настоящем документе предложен способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

- i. контакт соединения с глюкагоном; и
- ii. определение, связывается ли соединение с глюкагоном по аминокислоте Phe22, Val23, Gln24, Trp25, Leu26, Met27, Asn28 и/или Thr29 Seq. ID No. 82;

где связывание соединения с aP2 по аминокислоте Phe22, Val23, Gln24, Trp25, Leu26, Met27, Asn28 и/или Thr29 Seq. ID No. 82 указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR. В одном

варианте осуществления анализ проводят *in vitro* в отсутствие клеток. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает введение соединения в клеточный анализ в присутствии аР2 и глюкагона, и/или глюкагона/аР2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и измерение биологической активности GCGR. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки. В одном варианте осуществления популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие гепатоциты.

В девятом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/аР2 с GCGR у субъекта, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/аР2 связываться с GCGR. В одном варианте осуществления соединение нейтрализует способность глюкагона образовывать комплекс с аР2 и, таким образом, связываться с GCGR, в результате связывания с аР2 по аминокислоте Phe58, Asn60, Glu62 и/или Lys80 Seq. ID No. 1 или No. 2. В одном варианте осуществления соединение нейтрализует способность глюкагона образовывать комплекс с аР2 и, таким образом, связываться с GCGR, в результате связывания с глюкагоном по аминокислоте Phe22, Val23, Gln24, Trp25, Leu26, Met27, Asn28 и/или Thr29 Seq. ID No. 82.

В десятом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/аР2 с GCGR у субъекта, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое ингибирует способность глюкагона/аР2 образовываться. В одном варианте осуществления соединение нейтрализует способность глюкагона/аР2 связываться с GCGR, в результате предпочтительного связывания с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2 и/или глюкагоном.

В одиннадцатом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ ингибирования продукции глюкозы в

печени у субъекта, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывает комплекс глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и/или глюкагоном. В одном варианте осуществления соединение не связывает GCGR.

В двенадцатом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ ингибирования печеночной селективной инсулинорезистентности у субъекта, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывает комплекс глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и/или глюкагоном. В одном варианте осуществления соединение не связывает GCGR.

В тринадцатом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ лечения субъекта с нарушением, опосредованным дисрегуляцией продукции глюкозы в печени, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывает комплекс глюкагона/aP2 по сравнению с aP2. В одном варианте осуществления соединение не связывается напрямую с aP2 и/или глюкагоном, но предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/aP2. При введении нуждающемуся в этом реципиенту, применение соединения, которое способно направленно воздействовать на взаимодействие комплекса глюкагона/aP2 с GCGR, обеспечивает уменьшение продукции глюкозы в печени и снижает уровень глюкозы в крови, что приводит к улучшенному профилю глюкозы. В одном варианте осуществления нарушение, опосредованное дисрегуляцией продукции глюкозы в печени, выбрано из алиментарного ожирения, диабета (1-го и 2-го типа), гипергликемии, диабетического кетоацидоза,

гипергликемического гиперосмолярного синдрома, сердечно-сосудистого заболевания, диабетической нефропатии или почечной недостаточности, диабетической ретинопатии, нарушения уровня глюкозы натощак, нарушенной толерантности к глюкозе, дислипидемии, ожирения, катаракты, инсульта, атеросклероза, замедленного заживления ран, периоперационной гипергликемии, гипергликемии у пациента в отделении интенсивной терапии, синдрома инсулинорезистентности, метаболического синдрома, фиброза, в том числе фиброза легких и печени, и неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), в том числе неалкогольного стеатогепатита (НАСГ). В одном варианте осуществления нарушение выбрано из алиментарного ожирения, диабета II типа и неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП). В одном варианте осуществления нарушение выбрано из гепатоцеллюлярной карциномы, цирроза, глюкагономы и некротической мигрирующей эритемы (НМЭ).

В четырнадцатом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ лечения субъекта с нарушением, опосредованным печеночной селективной инсулинорезистентностью, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывает комплекс глюкагона/ $\alpha P2$ по сравнению с $\alpha P2$. В одном варианте осуществления соединение не связывается напрямую с $\alpha P2$ и/или глюкагоном, но предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/ $\alpha P2$. В одном варианте осуществления нарушение является диабетом II типа.

В пятнадцатом аспекте настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ снижения уровней глюкозы в крови у субъекта, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывает комплекс глюкагона/ $\alpha P2$ по сравнению с $\alpha P2$. В одном варианте осуществления

соединение не связывает GCGR.

В одном варианте осуществления антитело, средство или фрагмент является слабым связывающим средством для aP2, например, с K_d больше 10^{-7} М.

В различных вариантах осуществления соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR действует посредством одного или более из следующего: (i) предотвращает или уменьшает связывание глюкагона с сопряженным с G-белком глюкагоновым рецептором таким образом, который обычно вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к повышению внутриклеточного цАМФ; (ii) предотвращает или уменьшает связывание aP2 с сопряженным с G-белком глюкагоновым рецептором таким образом, который обычно вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к повышению внутриклеточного цАМФ; (iii) предотвращает или уменьшает способность комплекса глюкагона/белка aP2 связываться с рецептором и активировать нисходящую сигнализацию; (iv) предотвращает или уменьшает aP2 аллостерическое связывание с сопряженным с G-белком глюкагоновым рецептором и изменение трехмерной конформации рецептора, в результате чего глюкагон не может связываться с рецептором, при этом связывание с глюкагоновым рецептором уменьшено, или связывание изменено таким образом, что блокируется эффективная внутриклеточная сигнализация цАМФ; (v) предотвращает или уменьшает связывание глюкагона с комплексом глюкагон/aP2 G-связанного рецептора таким образом, что предотвращается эффективная рецептор-опосредованная внутриклеточная сигнализация цАМФ; (vi) предотвращает или нарушает образование комплекса глюкагона/aP2 таким образом, что предотвращается эффективная рецептор-опосредованная внутриклеточная сигнализация цАМФ; и/или (vii) модифицирует комплекс глюкагона/белка aP2, вызывая конформационное изменение, которое препятствует эффективному связыванию комплекса глюкагона/aP2 с глюкагоновым рецептором. Любое или комбинация представленного выше указана в настоящем документе как "нарушение опосредованной комплексом глюкагона/aP2 активности глюкагонового рецептора". В одном варианте осуществления

соединение не связывает GCGR.

Соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR, может быть любым соединением, которое препятствует связыванию глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR или нарушает способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR, что приводит к снижению биологической активности GCGR. Биологическая активность GCGR обычно относится к любому наблюдаемому эффекту, который является результатом взаимодействия между GCGR и его агонистическому партнеру по связыванию, глюкагону/ $\alpha P2$. Биологическая активность может являться связыванием глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR, детектированием GCGR-опосредованной внутриклеточной передачи сигнала; или определением конечного физиологического эффекта. Репрезентативные, но не ограничивающие, примеры биологической активности GCGR при агонистической стимуляции глюкагоном/ $\alpha P2$ включают, без ограничения перечисленными, сигнализацию и регуляцию процессов, обсуждаемых в настоящем документе, например, ингибирование образования циклического АМФ, уменьшение продукции глюкозы в печени, сниженный гликогенолиз и сниженную экспрессию глюконеогенных ферментов, в том числе фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK), фруктозо-1,6-бисфосфатазы (FBPase-1) и глюкозо-6-фосфатазы (G-6-Pase). Кроме того, сигнализация глюкагона активирует гликогенфосфорилазу и ингибирует гликогенсинтазу. В одном варианте осуществления соединение является малой молекулой, лигандом, антителом, антигенсвязывающим средством или фрагментом антитела, который связывается с $\alpha P2$, глюкагоном и/или глюкагоном/ $\alpha P2$ и нейтрализует способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR. В одном варианте осуществления соединение не связывается напрямую с $\alpha P2$ и/или глюкагоном, но предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/ $\alpha P2$. Примеры анализов для обнаружения биологической активности GCGR дополнительно представлены в Примерах ниже и включают анализы, связанные с пониженной экспрессией глюконеогенных ферментов, включающих фосфоенолпируваткарбоксикиназу (PEPCK), фруктозо-1,6-бисфосфатазу (FBPase-1) и глюкозо-6-фосфатазу (G-6-Pase) (см.

Пример 1; Фигуры 1A и 1B; Фигуры 2A, 2C и 2D), сниженной продукцией глюкозы в печени (см. Пример 1; Фигуру 1C), сниженным гликогенолизом (см. Пример 1; Фигуру 1D) и ингибированием образования циклического АМФ (см. Пример 1; Фигуры 1E и 1F).

Эта ось жировой ткани-поджелудочной железы-печени имеет большое значение для лечения состояний, связанных с нарушением активности глюкагона или нарушением сигнализации глюкагона, например, нарушением продукции глюкозы в печени и повышенным уровнем глюкозы в крови, например, при таких нарушениях, как диабет. При направленном воздействии на комплекс глюкагона/белка аР2 было обнаружено, что можно модулировать активацию глюкагонового рецептора глюкагоном, можно ингибировать продукцию глюкозы в печени, при этом уровни глюкозы в крови приходят в норму в модели ожирения и диабета на мышах. Кроме того, при снижении продукции глюкозы в печени, контррегуляторные эффекты инсулина еще более усиливаются. В одном варианте осуществления комплекс глюкагона/белка аР2 связывается антителом или антигенсвязывающим средством, таким как фрагмент антитела, для снижения избыточных уровней глюкозы в крови у субъекта, предпочтительно человека, путем введения субъекту антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены взаимодействуют с циркулирующим комплексом глюкагона/белка аР2. В одном варианте осуществления образование комплекса глюкагона/белка аР2 нарушается антителом к аР2 или антигенсвязывающим средством, где антитело препятствует образованию комплекса глюкагона и аР2. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2 и/или глюкагоном. В одном варианте осуществления соединение не связывает GCGR.

В одном варианте осуществления любого из аспектов, описанных выше, антитело селективно связывается с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2. Способы идентификации предпочтительно связывающихся антител обычно известны в уровне техники. В одном варианте осуществления в настоящем документе представлен способ идентификации антитела, которое селективно связывает глюкагон/аР2 по сравнению с аР2, в общем включающий

введение животному, не относящемуся к человеку, например кролику, мыши, крысе или козе, гетерологичного комплекса глюкагона/белка аР2, например человеческого глюкагона/аР2, для индукции антител против гетерологичного комплекса глюкагона/аР2, выделение указанных антител, проведение в отношении указанных антител одного или более анализов связывания для измерения аффинности связывания с глюкагоном/аР2 и аР2 в отдельности, например, конкурентного анализа связывания, в котором антитела, которые предпочтительно связывают глюкагон/аР2 по сравнению с аР2, выделяют для применения для нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/аР2 с GCGR. В одном варианте осуществления предпочтительно связывающееся антитело к глюкагону/аР2 содержит CDR-области, направленные на человеческий глюкагон/аР2. В одном варианте осуществления предпочтительно связывающееся антитело к глюкагону/аР2 гуманизировано в соответствии с известными способами. Способы, в которых описано получение антител, в том числе гуманизация антител, включают в патенты США 7,223,392, 6,090,382, 5,859,205, 6,090,382, 6,054,297, 6,881,557, 6,284,471 и 7,070,775.

Предложен способ предотвращения или уменьшения тяжести нарушения у реципиента, такого как человек, опосредованного комплексом глюкагона/белка аР2, включающий введение эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который направленно воздействует на циркулирующий комплекс глюкагона/белка аР2, например, гуманизированного антитела, такого как моноклональное антитело против глюкагона/аР2, или антигенсвязывающего средства, описанного в настоящем документе, что приводит к уменьшению или ослаблению биологической активности глюкагона. В одном варианте осуществления предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2 и/или глюкагоном.

Неограничивающие примеры применений описанных антител против глюкагона/аР2 и антигенсвязывающих средств путем введения эффективного количества нуждающемуся в этом реципиенту включают одно из или комбинацию следующего:

- (i) Снижение уровней глюкозы в крови натощак;

- (ii) Снижение продукции глюкозы в печени;
- (iii) Улучшение метаболизма глюкозы;
- (iv) Снижение гиперинсулинемии;
- (v) Снижение стеатоза печени; и/или
- (vi) Увеличение чувствительности к инсулину.

В альтернативном аспекте в настоящем документе также предложена композиция, включающая глюкагон в комплексе с aP2, связанном с антителом, антигенсвязывающим средством или фрагментом антитела. В одном варианте осуществления антитело, антигенсвязывающее средство или фрагмент антитела обычно не присутствуют в организме человека. В одном варианте осуществления глюкагон/aP2, связанный с антителом, является выделенным.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из нижеследующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1A-1B являются гистограммами, на которых показана нормализованная относительная экспрессия гена G6Pc (ФИГ. 1A) и Pck1 (ФИГ. 1B) в первичных гепатоцитах, выделенных у самцов мышей C57/BL6^j возрастом 12 недель, с параллельной или отдельной стимуляцией глюкагоном (100 нМ) и рекомбинантным aP2 (50 мкг/мл), как описано в Примере 1. Эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением аналогичных результатов. На гистограммах представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (s.d.), n=4-5 в группе. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, ***P $\leq$ 0,001, ****P $\leq$ 0,0001, незначимое P>0,05. Множественные сравнения между группами выполняли при использовании статистических методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки.

ФИГ. 1C является гистограммой, на которой показана продукция глюкозы *de novo*, которую исследовали в бессывороточной и безглюкозной среде с пируватом (1 мМ) и лактатом (2 мМ) при использовании глюкозооксидазы Amplex red через 4 часа после стимуляции aP2 и/или глюкагоном, как описано выше (Пример 1). Эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением

аналогичных результатов. На гистограммах представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (s.d) ., n=4-5 в группе. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$, незначимое $P > 0,05$. Множественные сравнения между группами выполняли при использовании статистических методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки.

ФИГ. 1D является линейным графиком, на котором показано высвобождение глюкозы, которое исследовали с помощью сцинтилляционного измерения через 24 часа после стимуляции. Линию клеток гепатомы человека HepG2-C3A инкубировали с гликогеном и 5 мМ глюкозы и 14C-U-глюкозой (0,5 мКи/лунка) в присутствии дексаметазона (1 мкМ) и инсулина (10 мкМ) в течение ночи (Пример 1). Эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением аналогичных результатов. На гистограммах представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (s.d) ., n=4-5 в группе. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$, незначимое $P > 0,05$. Множественные сравнения между группами выполняли при использовании статистических методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки.

ФИГ. 1E является линейным графиком, на котором показана люциферазная активность, которую исследовали через 4 часа после стимуляции в CHO-K1, стабильно трансфицированных человеческим GCGR-GFP и 4хсАМФ-чувствительным элементом, и стимулировали в присутствии 10 мкг/мл аР2 или глюкагона по отдельности в указанных концентрациях (Пример 1). Эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением аналогичных результатов. На гистограммах представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (s.d) ., n=4-5 в группе. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$, незначимое $P > 0,05$. Множественные сравнения между группами выполняли при использовании статистических методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки. На графиках данные представлены как средние $\pm$ среднеквадратическое отклонение (s.e.m.) с анализом при использовании двухфакторного дисперсионного анализа.

ФИГ. 1F является гистограммой, на которой показана люциферазная активность, которую исследовали через 3 часа после стимуляции в первичных гепатоцитах, которые инфицировали цАМФ репортерным аденовирусом (5 MOI) и стимулировали, как описано выше. Эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением аналогичных результатов. На гистограммах представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение (s.d)., n=4-5 в группе. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, ***P $\leq$ 0,001, ****P $\leq$ 0,0001, незначимое P>0,05. Множественные сравнения между группами выполняли при использовании статистических методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки. На графиках данные представлены как средние $\pm$ среднеквадратическое отклонение (s.e.m.) с анализом при использовании двухфакторного дисперсионного анализа.

ФИГ. 2A является гистограммой, на которой показана активность промотора Gбpc в клетках HepG2, которые были транзистентно трансфицированы люциферазой под контролем промотора GбPc в присутствии GCGR или контрольных векторов. После 4-часовой стимуляции активность секретируемой люциферазы определяли в средах. На графиках данные представлены как средние $\pm$ s.e.m. Все эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 2B является гистограммой, на которой показана кинетика связывания GCGR, в частности связывания GCGR-ecd с биотин-глюкагоном, иммобилизированным на стрептавидиновых сенсорах в присутствии или отсутствии aP2, которую определяли при помощи биослойной интерферометрии. На графиках данные представлены как средние $\pm$ s.e.m. Все эксперименты повторяли по меньшей мере два раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 2C-2D являются гистограммами, на которых показана нормализованная относительная экспрессия гена GбPc (ФИГ. 2C) и Psk1 (ФИГ. 2D) в первичных гепатоцитах, которые стимулировали глюкагоном или глюкагоном и aP2 в присутствии или отсутствии аллостерического ингибитора GCGR L-168,049 (100 нМ). На гистограммах представлены средние $\pm$ s.d., n=4-5 в группе. *P $\leq$ 0,05,

P≤0,01, *P≤0,001, ****P≤0,0001, незначимое P>0,05.

Множественные сравнения между группами выполняли при использовании статистических методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки.

ФИГ. 2Е и 2F являются гистограммами, на которых показано, что клетки, предварительно инкубированные с аллостерическим ингибитором глюкагонового рецептора, теряют способность отвечать на аР2 и глюкагон. На ФИГ. 3А показана аффинность связывания (нМ) немеченого аР2 с биотин-глюкагоном, иммобилизированным на стрептавидиновом сенсоре, при использовании биослойной интерферометрии. Две различных концентрации аР2 использовали для связывания с насыщенным глюкагоном сенсором, которое затем анализировали при использовании моделей общей аппроксимации. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 3В является линейным графиком, на котором показано связывание ^{125}I -глюкагона с аР2. Биотинилированный аР2 инкубировали с ^{125}I -меченым глюкагоном в присутствии различных количеств холодного глюкагона в качестве конкурента. Люминесценцию, испускаемую покрытыми сцинтиллятором планшетами, считывали и модель конкурентного ингибитора с одним сайтом использовали для аппроксимации кривых. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов. На графике данные представлены как средние±s.e.m.

На ФИГ. 3С показаны результаты изотермы связывания немеченого аР2 и глюкагона в эксперименте изотермической титрационной калориметрии. Тепло, выделяемое после каждой инъекции глюкагона за временной ряд, представлено слева. Справа показано интегрирование этих значений с получением кривой связывания. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 3D является гистограммой, на которой показана иммунореактивность глюкагона в сыворотке, выделенной у дикого типа, или в аР2 дефицитной сыворотке, которую инкубировали с покрытыми моноклональным антителом против аР2 магнитными

гранулами для захвата аР2-ассоциированных комплексов в присутствии или отсутствии избытка холодного антитела (сыворотка дикого типа) или рекомбинантного восстановленного аР2 (200 нг/мл). После промывок комплекс инкубировали с HRP-конъюгированным моноклональным антителом к глюкагону для обнаружения сигнала глюкагона. На гистограмме представлены средние $\pm$ s.d., n=5 в группе. * $P \leq 0,05$. Парный t-критерий использовали для сравнения лечения в группах, стандартный однофакторный дисперсионный анализ использовали для множественных сравнений между группами. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 3Е и 3F являются гистограммами, на которых показано, что глюкагон и аР2 могут быть обнаружены в сыворотке в виде комплекса при использовании методов иммунопреципитации. Предварительное инкубирование сыворотки дикого типа с СА33 препятствует коиммунопреципитации.

ФИГ. 3G является кривой связывания лиганда аР2 с GCGR-ECD.

ФИГ. 3H является кривой связывания лиганда аР2 с глюкагоном.

ФИГ. 3I является кривой связывания лиганда глюкагона с GCGR-ECD.

ФИГ. 3J показано влияние СА33 на кривые связывания лиганда аР2 с глюкагоном.

ФИГ. 3K представляет собой Вестерн-блот, на котором показано связывание различных усеченных вариантов глюкагона у мышей дикого типа и аР2-дефицитных мышей.

ФИГ. 3L представляет собой Вестерн-блот, на котором показано, что биотинилированный глюкагон захватывает эндогенный аР2 из лизатов органов у мышей дикого типа и аР2-дефицитных мышей.

ФИГ. 4A является кривой связывания глюкагона с глюкагоновым рецептором у мышей дикого типа и GCGR рецептор-дефицитных мышей в присутствии повышаемых концентраций аР2.

ФИГ. 4B-4D представляют собой гистограммы, на которых показано, что связывание глюкагона с GCGR рецептором требует

присутствия аР2 *in vivo*. ^{125}I -меченный глюкагон вводили в хвостовую вену дикого типа, аР2 дефицитных, GCGR дефицитных и аР2 дефицитных в комбинации с рекомбинантным аР2. Органы забирали через 5 мин после введения и детектировали радиацию с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика.

ФИГ. 4В является гистограммой, на которой показано включение ^{125}I глюкагона во все органы вместе.

ФИГ. 4С является гистограммой, на которой показано включение ^{125}I глюкагона в определенные собранные органы.

ФИГ. 4D и 4Е являются гистограммами, на которых показано связывание ^{125}I глюкагона с выделенной мембраной-SPA в зависимости от массы тела.

ФИГ. 4F представляет собой Вестерн-блот, на котором показано, что аР2 увеличивает связывание GCGR-ECD (внеклеточного домена) с глюкагоном.

ФИГ. 4G представляет собой Вестерн-блот, на котором показано, что аР2 связывается с GCGR

ФИГ. 4H является гистограммой, на которой показан сигнал аР2 в осадке и супернатанте.

ФИГ. 4I представляет собой Вестерн-блот, на котором показано, что аР2 увеличивает связывание GCGR-ECD с глюкагоном.

ФИГ. 5A является кривой связывания, определенной на основе взаимодействия FABP4 и глюкагона, полученного из экспериментов микромасштабного термофореза.

ФИГ. 5B является кривой связывания, определенной на основе взаимодействия GCGR-ECD и глюкагона, полученного из экспериментов микромасштабного термофореза.

ФИГ. 5C является кривой связывания, определенной на основе взаимодействия GCGR-ECD с меткой и hFABP4, полученного из экспериментов микромасштабного термофореза.

ФИГ. 5D является кривой связывания, определенной на основе взаимодействия GCGR-ECD без метки и hFABP4, полученного из экспериментов микромасштабного термофореза.

ФИГ. 5E является кривой связывания, определенной на основе взаимодействия аР2 и глюкагона.

ФИГ. 6A является репрезентативной моделью связывания аР2 и

глюкагона, в которой принято стехиометрическое отношение между молекулами один к одному.

ФИГ. 6В является репрезентативной моделью множества субъединиц $\alpha P2$ на молекулу глюкагона.

На ФИГ. 6С показано частотное картирование моделей, полученных при использовании серверов прогнозирования для получения карты наиболее вероятных сайтов взаимодействия между $\alpha P2$ и глюкагоном. Более темные пятна на карте соответствуют более высокой частоте взаимодействия между представленными моделями. На основе этого анализа наиболее вероятными сайтами взаимодействия оказался С-конец глюкагона с потенциальными сайтами связывания с $\alpha P2$, сгруппированными вокруг первой альфа-спирали и около остатков 57 и 76 (две бета-складчатые петли). Кристаллические структуры, используемые для этого анализа, включали 1GCN для глюкагона и 3P6C и 1LIC для димерного $\alpha P2$.

ФИГ. 7А является линейным графиком, на котором показана гликемия (мг/дл) в зависимости от времени (минуты) во время глюкозотолерантного теста. Анализ проводили на 12-недельных однопометных самцах мышей дикого типа или $\alpha P2$ -дефицитных мышей, у которых на 4 часа забирали корм перед введением синтетического глюкагона (16 мкг/кг), $\alpha P2$ (50 мкг) или их комбинации. На графиках данные показаны как средние $\pm$ s.e.m. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 7В является гистограммой, на которой показана площадь под кривой, определенная в глюкозотолерантном тесте на ФИГ. 7А. Стандартный однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки использовали для множественных сравнений между группами. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 7С является гистограммой, на которой показаны уровни гликогена, которые измеряли через 3 часа после 24-часового голодания и возобновления кормления у мышей на ФИГ. 7А, для исключения каких-либо различий, которые могли быть вызваны постпрандиальным состоянием. На гистограммах представлены

средние $\pm$ s.d., n=4-5 в группе. *P $\leq$ 0,05, n.s. незначимый. Непарный t-критерий использовали для сравнения лечения между двумя группами. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 7D является гистограммой, на которой показана активность DPP IV у мышей на ФИГ. 7A, которую измеряли при использовании флуорогенного субстрата из крови (Promega). На гистограммах представлены средние $\pm$ s.d., n=4-5 в группе. *P $\leq$ 0,05, n.s. незначимый. Непарный t-критерий использовали для сравнения лечения между двумя группами. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

На ФИГ. 7E печень забирали так же, как описано на ФИГ. 7C, гомогенизировали в буфере RIPA и подвергали Вестерн-блоттингу с последующим ДСН-ПААГЭ. Гистограммы нормализованной интенсивности сигнала, определенной в Вестерн-блоттинге, показаны на нижней панели. На гистограммах представлены средние $\pm$ s.d., n=4-5 в группе. *P $\leq$ 0,05, n.s. незначимый. Непарный t-критерий использовали для сравнения лечения между двумя группами. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов.

ФИГ. 7F является линейным графиком, на котором показано, что уровень глюкозы в крови (мг/дл) в зависимости от времени (минуты) в яремной вене катетеризованных однопометных мышей дикого типа или aP2-дефицитных мышей, которых обездвигивали и вводили соматостатин для исключения каких-либо панкреатических эффектов и изначальных различий между генотипами, и инсулин на базальном уровне (0,5 мЕ/кг/мин), с фармакологическими дозами глюкагона (1 мг/кг/мин). Мыши дикого типа отвечали на глюкагон увеличением гликемии, а aP2-дефицитные мыши – нет. В конце этого 60-мин периода, aP2-дефицитным мышам требовалась инфузия глюкозы поддержания у них нормогликемии, тогда как у мышей дикого типа наблюдали дальнейшее увеличение гликемии. На графиках данные показаны как средние $\pm$ s.e.m. Все эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных результатов. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза с получением аналогичных

результатов.

ФИГ. 7G является линейным графиком, измеряющим толерантность к глюкозе у аР2-дефицитных мышей и мышей дикого типа, которым вводили PBS, глюкагон или глюкагон и аР2. На оси X указано время, а на оси Y – колебание уровня глюкозы, измеряемого в мг/дл.

ФИГ. 7H является гистограммой, измеряющей AUC глюкозы у аР2-дефицитных мышей и мышей дикого типа, которым вводили PBS, глюкагон или глюкагон и аР2. На оси X указаны различные схемы лечения, а на оси Y – AUC.

ФИГ. 7I является гистограммой, на которой показано содержание гликогена на начало исследования в печени аР2-дефицитных мышей. Ось X соответствует мышам дикого типа и аР2-дефицитным мышам, и ось Y – гликоген (мг)/сухой вес печени (мг).

ФИГ. 7J является гистограммой, на которой показано содержание гликогена в момент усыпления в печени аР2-дефицитных мышей. Ось X – мыши дикого типа и аР2-дефицитные мыши, и ось Y – гликоген (мг)/сухой вес печени (мг).

ФИГ. 7K является линейным графиком, на котором показано измерение цАМФ у мышей дикого типа и аР2-дефицитных мышей после введения глюкагона. Ось X – время в минутах после введения глюкагона, и ось Y – пмоль цАМФ на мкг ДНК.

ФИГ. 8A является гистограммой, на которой показаны уровни HGP (мг/кг/мин) у находящихся в сознании катетеризованных в яремной вене аР2-дефицитных мышей, которых обездвигивали и вводили высокую дозу инсулина (3 МЕ/кг/мин). Для исследования контррегуляторных эффектов гормонов, группам вводили PBS, глюкагон (1 мг/кг/мин), аР2 и базальный уровень глюкагона (8 мкг/кг/мин аР2, 0,1 мг/кг/мин) или высокий уровень глюкагона и аР2 вместе. Только комбинаторное введение высоких уровней глюкагона и аР2 противодействовало эффектам инсулина (последняя группа, как показано незначимой супрессией продукции глюкозы в печени). n=6-9 в группе. *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001, ****P≤0,0001, незначимое P>0,05. Множественные сравнения групп в условиях клэмпа производили при использовании статистических

методов однофакторного дисперсионного анализа с апостериорной поправкой Тьюки. Базальные и клэмп условия между группами сравнивали при использовании двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений с поправкой Шидака. На графиках данные показаны как средние $\pm$ s.e.m.

ФИГ. 8В является линейным графиком эксперимента панкреатического клэмпа на живых мышах. При постоянной инфузии глюкагона продукция глюкозы в ответ на глюкагон у аР2-дефицитных мышей отсутствует. Ось X – время инфузии глюкагона, и ось Y – глюкоза в крови, измеряемая в мг/дл.

ФИГ. 9А представляет собой таблицу, в которой перечислены аффинности связывания (K_d (M)) моноклональных антител против аР2 (СА33, СА13, СА15, СА23 и Н3) в отношении человеческого и мышинного аР2 при определении с помощью анализа биомолекулярного взаимодействия при использовании системы BiaCore T200.

ФИГ. 9В является гистограммой, на которой показаны уровни глюкозы в крови (мг/дл) в неделю 0 (незакрашенные столбики) или неделю 4 (закрашенные столбики) у мышей с ожирением на рационе с высоким содержанием жиров (HFD), получавших растворитель или моноклональные антитела против аР2 СА33, СА13, СА15, СА23 или Н3. Уровни глюкозы в крови измеряли через 6 часов после дневного ограничения питания. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

ФИГ. 9С является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) в зависимости от времени (минуты) во время глюкозотолерантного теста (ГТТ). Анализ проводили у мышей с ожирением, получавших HFD, после 2 недель лечения растворителем (ромбы) или моноклональными антителами против аР2 (0,75 г/кг глюкозы) (СА33; квадраты) (СА15; треугольники). * $p < 0,05$.

ФИГ. 10А является гистограммой взаимодействия сигналов (нм) при определении с помощью анализа Octet для антител против аР2 СА33 и Н3 против аР2 (черные столбики) по сравнению с родственными белками FABP3 (серые столбики) и FABP5/Mal1 (светло-серые столбики).

ФИГ. 10В представляет собой таблицу перекрестного

блокирования антител H3 в сравнении с CA33, CA13, CA15 и CA23 по данным анализа BiaCore. ++=полное блокирование; +=частичное блокирование; -=нет перекрестного блокирования.

На ФИГ. 10С показана последовательность эпитопа из остатков aP2, участвующих во взаимодействии с CA33 и H3, определенная с помощью масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX). Взаимодействующие остатки подчеркнуты.

ФИГ. 10D представляет собой наложенное изображение Fab-фрагмента CA33, сокристаллизованного с aP2, и Fab-фрагмента H3, сокристаллизованного с aP2.

ФИГ. 10E представляет собой картирование высокого разрешения эпитопа CA33 на aP2. Взаимодействующие остатки указаны на обеих молекулах. Водородные связи показаны пунктирными линиями. Боковая цепь K10 в aP2 формирует гидрофобное взаимодействие с фенильной боковой цепью Y92.

ФИГ. 10F является линейным графиком, на котором показано связывание паринаровой кислоты aP2 (относительная флуоресценция) в зависимости от pH в присутствии контрольного IgG антитела (круги) или антитела CA33 (квадраты).

ФИГ. 10G является графиком, на котором показано связывание ^{125}I глюкагона, как обсуждается в Примере 2. Гранулы SPA против мышного IgG инкубировали с сывороткой мышей дикого типа или aP2-нокаутных мышей с ^{125}I глюкагоном. На оси X показано связывание глюкагона различных антител против aP2 у мышей дикого типа и aP2-дефицитных мышей с вычитанием фона CPM.

ФИГ. 10H является графиком, на котором показано связывание ^{125}I глюкагона, как обсуждается в Примере 2. Гранулы СПА против мышного IgG инкубировали с сывороткой мышей дикого типа или aP2-нокаутных мышей с ^{125}I глюкагоном. На оси X показано связывание глюкагона различных антител против aP2 у мышей дикого типа и aP2-дефицитных мышей в процентах от вводимого количества.

ФИГ. 11A является гистограммой, на которой показан уровень глюкозы в крови (мг/дл) натошак у aP2-/-мышей с HFD-индуцированным ожирением до (незакрашенные столбики) и после лечения антителом CA33 или растворителем в течение трех недель

(закрашенные столбики).

ФИГ. 11В является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) у аР2-/- мышей с HFD-индуцированным ожирением в зависимости от времени (минуты) во время глюкозотолерантного теста (ГТТ). Анализ проводили после 2 недель лечения растворителем (треугольники) или антителом СА33 (квадраты) у аР2-/- мышей.

ФИГ. 11С является гистограммой, на которой показаны уровни глюкозы в крови (мг/дл) натощак у об/об мышей до (незакрашенные столбики) и после (закрашенные столбики) 3 недель лечения антителом СА33 или растворителем (n=10 мышей в группе). **p<0,01.

ФИГ. 11D является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) у мышей об/об в зависимости от времени (минуты) во время глюкозотолерантного теста (ГТТ). Анализ проводили после 2 недель лечения растворителем (треугольники) или антителом СА33 (квадраты) у аР2-/- мышей. *p<0,05.

ФИГ. 11Е является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) у мышей об/об в зависимости от времени (минуты) во время глюкозотолерантного теста (ГТТ). Анализ проводили после 3 недель лечения растворителем (треугольники) или антителом СА33 (квадраты) у аР2-/- мышей.

ФИГ. 11F является гистограммой, на которой показаны уровни АУС глюкозы у мышей об/об в зависимости от времени (минуты) во время глюкозотолерантного теста (ГТТ). Анализ проводили после 3 недель лечения растворителем (треугольники) или антителом СА33 (квадраты) у аР2-/- мышей.

ФИГ. 12А является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) в зависимости от времени (минуты) в глюкозотолерантном тесте (ГТТ) после двух недель лечения селективными антителами при использовании высокоаффинных антител (СА13, СА15, СА23 и Н3) в сравнении с контрольным растворителем у мышей на рационе с высоким содержанием жира.

ФИГ. 12В является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) в зависимости от времени (минуты) в инсулинотолерантном тесте (ИТТ) после трех недель лечения

селективными антителами при использовании высокоаффинных антител (CA13, CA15, CA23 и H3) в сравнении с контрольным растворителем у мышей на рационе с высоким содержанием жира.

ФИГ. 12С является линейным графиком, на котором показано, что введение аР2 аР2-нокаутным мышам с глюкагоном устраняет невосприимчивость к глюкагону, а предварительное инкубирование с СА33 и аР2 препятствует этому.

ФИГ. 12D является гистограммой, на которой показано, что введение аР2 аР2-нокаутным мышам с глюкагоном устраняет невосприимчивость к глюкагону, а предварительное инкубирование с СА33 и аР2 препятствует этому.

На ФИГ. 13 представлены фрагменты перевернутой области каппа легкой цепи гуманизированных антител против комплекса глюкагона/аР2 человека, где последовательность 909 является последовательностью перевернутой области легкой цепи кролика, и последовательности 909 gL1, gL10, gL13, gL50, gL54 и gL55 являются гуманизированными перевернутыми вариантами перевернутой области легкой цепи 909 с использованием IGKV1-17 зародышевой линии человека в качестве акцепторного каркаса. CDR-области выделены полужирным шрифтом/подчеркнуты, тогда как применяемые донорные остатки выделены полужирным шрифтом/курсивом и цветом: 2В, 3В, 63К и 70D. Мутация в CDRL3 для удаления остатка цистеина выделена полужирным шрифтом/подчеркнута и выделена цветом: 90А.

На ФИГ. 14А представлены фрагменты перевернутой области тяжелой цепи гуманизированных антител против глюкагона/аР2 человека, где последовательность 909 является последовательностью перевернутой области тяжелой цепи кролика, и последовательности 909 gH1, gH14, gH15, gH61 и gH62 являются гуманизированными перевернутыми вариантами перевернутой области тяжелой цепи 909 с использованиемIGHV4-4 зародышевой линии человека в качестве акцепторного каркаса. CDR-области выделены полужирным шрифтом/подчеркнуты. Пропуск двух остатков в каркасной области 3, в петле между бета-складчатой цепью D и E, выделен цветом в gH1: 75 и 76. Применяемые донорные остатки выделены полужирным шрифтом/курсивом и цветом: 23Т, 67F, 71К, 72А, 73, 74Т, 77Т, 78В, 79D, 89Т и 91F. Мутация в CDRH2 для

удаления остатка цистеина выделена полужирным шрифтом/подчеркнута и выделена цветом: 59. Мутация в CDRH3 для удаления потенциального сайта изомеризации аспартата выделена полужирным шрифтом/подчеркнута и выделена цветом: 98E. N-концевой остаток глутамин заменен глутаминовой кислотой и выделен полужирным шрифтом и цветом: 1E.

ФИГ. 14B является гистограммой, на которой показано, что инкубирование aP2 с CA33 блокирует потенцирующий эффект aP2 в отношении глюкагона, как в данном случае было показано ответом цАМФ на глюкагон. Ось X включает различные антитела против aP2, и ось Y – люминесценция.

ФИГ. 14C является гистограммой, на которой показано, что сериновый мутант (C2S) не уменьшает действие aP2, как в данном случае было показано ответом цАМФ на глюкагон. Ось X – aP2 дикого типа и мутантные aP2, и ось Y – люминесценция.

ФИГ. 15 является линейным графиком, на котором показаны уровни глюкозы (мг/дл) в зависимости от времени (минуты) во время теста с нагрузкой глюкагоном у мышей с алиментарным ожирением, получавших растворитель или моноклональное антитело против aP2-глюкагона.

ФИГ. 16 является графиком, на котором показана аффинность связывания (нМ) в зависимости от времени (секунды) связанного aP2 с глюкагоном, моноклональным антителом (мАт) или глюкагоном плюс мАт.

ФИГ. 17A-17B являются полученным с помощью микроскопа изображением живых клеток U2-OS, которые экспрессируют GCGR-GFP, через 15 минут после обработки aP2, но без глюкагона. Без обработки глюкагоном наблюдали минимальную интернализацию aP2 в клетки (Пример 6).

ФИГ. 17C-17E являются полученным с помощью микроскопа изображением живых клеток U2-OS, которые экспрессируют GCGR, через 30 минут после обработки глюкагоном и aP2. Колокализация сигнала GCG-GFP и сигнала aP2 показана белым цветом. Интернализация aP2 была значимо повышена в присутствии стимуляции глюкагоном (Пример 6).

ФИГ. 17F является графиком, на котором сравниваются

полученные с помощью микроскопа изображения островковой области клетки из $\alpha P2^{+/+}$ и $\alpha P2^{-/-}$ клеточных линий. Различие в количестве пикселей не было значимым между этими двумя линиями клеток. Как обсуждается в Примере 7, дефицит $\alpha P2$ не вызывает гиперплазию альфа-клеток. Две линии клеток показаны на оси X, и количество пикселей показано на оси Y.

ФИГ. 17G является графиком, на котором сравниваются полученные с помощью микроскопа изображения глюкагон-положительного окрашивания в клетке из $\alpha P2^{+/+}$ и $\alpha P2^{-/-}$ клеточных линий (Пример 7). Различие в количестве пикселей не было значимым между этими двумя линиями клеток. Две линии клеток показаны на оси X, и количество пикселей показано на оси Y.

ФИГ. 17H является графиком, на котором сравниваются полученные с помощью микроскопа изображения глюкагон-положительного окрашивания и островковой области в клетке из $\alpha P2^{+/+}$ и $\alpha P2^{-/-}$ клеточных линий (Пример 7). Различие в количестве пикселей не было значимым между этими двумя линиями клеток. Две линии клеток показаны на оси X, и количество пикселей показано на оси Y.

ФИГ. 17I является полученным с помощью микроскопа изображением живой клетки из $\alpha P2^{+/+}$ клеточной линии, как обсуждается в Примере 7.

ФИГ. 17J является полученным с помощью микроскопа изображением живой клетки из $\alpha P2^{-/-}$ клеточной линии. По сравнению с клеткой из $\alpha P2^{+/+}$ клеточной линии (ФИГ. 17I), $\alpha P2^{-/-}$ клетка не демонстрирует гиперплазию (Пример 7). Гиперплазия является результатом антагонизма глюкагонового рецептора, признаком, отличным от дефицита $\alpha P2$.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на открытии, что глюкагон образует комплекс с $\alpha P2$ в качестве облигатного партнера по связыванию, который активирует глюкагоновый рецептор и, в конечном счете, способствует продукции глюкозы в печени. В одном варианте осуществления изменение способности комплекса глюкагона- $\alpha P2$ связываться с глюкагоновым рецептором приводит к нарушению сигнальной активности глюкагона и модуляции избыточной

продукции глюкозы в печени, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови. Такое открытие обеспечивает новые способы контроля хронических повышенных уровней глюкозы в крови у субъектов, например людей, и новые способы идентификации соединений, применимых для лечения нарушений, связанных с хроническими повышенными уровнями глюкозы в крови.

На основе этого открытия предложены способы идентификации соединений, способных блокировать способность комплекса глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с глюкагоновым рецептором (GCGR). Такие соединения способны снижать сигнальную активность глюкагона у человека или другого млекопитающего путем воздействия на комплекс глюкагона/белка $\alpha P2$. В одном варианте осуществления соединение является антителом, связывающим средством на основе антитела или фрагментом. В одном варианте осуществления соединение предпочтительно связывает комплекс глюкагона/ $\alpha P2$ по сравнению с $\alpha P2$ и/или глюкагоном. В одном варианте осуществления антитело, средство или фрагмент являются слабым связывающим средством $\alpha P2$, например, с K_d больше 10^{-7} М.

При введении реципиенту, нуждающемуся в этом, антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела, направленно воздействующие на комплекс глюкагона/белка $\alpha P2$, нейтрализуют активность глюкагона, связанного с $\alpha P2$, и обеспечивают снижение продукции глюкозы в печени, и/или снижение уровня глюкозы в крови, и/или уменьшение возникновения хронической гипергликемии. Таким образом, с помощью направленного воздействия на взаимодействие $\alpha P2$ с глюкагоном, можно лечить метаболические нарушения, связанные с повышенным уровнем глюкозы в крови, включающие, без ограничения перечисленными, диабет (1-го и 2-го типа), гипергликемию, диабетический кетоацидоз, гипергликемический гиперосмолярный синдром, сердечно-сосудистые заболевания, диабетическую нефропатию или почечную недостаточность, диабетическую ретинопатию, нарушение показателей глюкозы натощак, нарушенную толерантность к глюкозе, дислипидемию, ожирение, катаракту, инсульт, замедленное заживление ран, периоперационную гипергликемию, гипергликемию у пациента в отделении интенсивной

терапии и синдром инсулинорезистентности. В некоторых вариантах осуществления при введении субъекту, нуждающемуся в этом, антитело или антигенсвязывающее средство могут применяться для уменьшения жировой массы, стеатоза печени, улучшения профилей липидов в сыворотке и/или уменьшения образования или сохранения атерогенных бляшек у субъекта. Таким образом, антитела и антигенсвязывающие средства, описанные в настоящем документе, особенно полезны для лечения метаболических нарушений, связанных с нарушением активности глюкагона, которые приводят к отклоняющимся от нормы или избыточным уровням глюкозы в крови, включающих, без ограничения перечисленными, диабет (1-го и 2-го типа), гипергликемию, ожирение, жировую болезнь печени или дислипидемию.

Таким образом, в настоящем изобретении предложено, по меньшей мере, следующее:

(a) Способ идентификации соединений, которые модулируют/воздействуют и, предпочтительно, нейтрализуют, агонистическую активность глюкагона/aP2 в отношении GCGR для применения в терапии, описанной в настоящем документе.

(b) Способ модуляции сигнальной активности глюкагонового рецептора путем введения антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который направленно взаимодействует с комплексом глюкагон/белок aP2, как описано в настоящем документе, или его описанного варианта или конъюгата, который вызывает нарушение опосредованной комплексом глюкагона/aP2 активности сопряженного с G-белком рецептора.

(c) Способ лечения субъекта и, в частности, человека с опосредованным повышенным глюкагоном нарушением путем введения субъекту антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, или его описанного варианта или конъюгата, который вызывает нарушение опосредованной комплексом глюкагона/aP2 активности сопряженного с G-белком рецептора.

(d) Способ лечения субъекта и, в частности, человека с повышенными уровнями глюкозы в крови путем введения субъекту антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, или его описанного варианта или конъюгата,

который вызывает нарушение опосредованной комплексом глюкагона/aP2 активности сопряженного с G-белком рецептора.

(е) Композиция, включающая глюкагон в комплексе с aP2, связанным с антителом, антигенсвязывающим средством или фрагментом антитела.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Общие определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно известно специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут применяться при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, указанные в настоящем документе, полностью включены посредством отсылки. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не должны считаться ограничивающими.

Если иное не следует из контекста, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Кроме того, такие термины, как "элемент" или "компонент", охватывают как элементы, так и компоненты, включающие одну единицу, а также элементы и компоненты, которые включают больше одной субъединицы, если прямо не указано иное.

Как правило, номенклатура, используемая в сочетании с, и методики культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, а также химии и гибридизации белков и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем

документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Способы и методики согласно настоящему изобретению обычно проводят в соответствии со стандартными методами, хорошо известными в уровне техники, и как описано в различных общих и более специализированных источниках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. Ферментативные реакции и методики очистки могут проводить в соответствии со спецификациями производителя, как обычно практикуют в данной области техники, или как описано в настоящей заявке. Номенклатура, используемая в сочетании с, и лабораторные процедуры и методики аналитической химии, химии органического синтеза, а также медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящей заявке, хорошо известны и широко применяются в данной области. Стандартные методики используются для химического синтеза, химического анализа, изготовления лекарственных форм, производства и доставки лекарственных средств, а также лечения пациентов.

Для более полного понимания настоящего изобретения, отдельные термины определены ниже.

Термин "реципиент", "субъект" или "пациент" при использовании в настоящем документе обычно относится к человеку и, в частности, к случаю, когда человеческая или гуманизированная каркасная область используется в качестве акцепторной структуры. При лечении другого реципиента специалистам в данной области будет очевидно, что может потребоваться, чтобы антитело или антигенсвязывающее средство были адаптированы для такого реципиента, чтобы избежать отторжения или для более высокой совместимости. Известно, как следует использовать CDR-области в настоящем изобретении и как их встраивать в подходящую каркасную или пептидную последовательность для обеспечения необходимой доставки и функциональности в ряде реципиентов. Другие реципиенты могут включать другие виды млекопитающих или позвоночных. Таким образом, термин "реципиент" в альтернативе может относиться к животным, таким как мыши, обезьяны, собаки, свиньи, кролики, домашние свиньи (свиньи и боровы), жвачные животные, лошади,

домашняя птица, кошачьи, мышинные, бычьи, собачьи и т.п., где антитело или антигенсвязывающее средство, в случае необходимости, сконструированы надлежащим образом для совместимости с реципиентом.

Термин "полипептид" при использовании в настоящем документе относится к любой полимерной цепи аминокислот. Термины "пептид" и "белок" используются попеременно с термином полипептид и также относятся к полимерной цепи из аминокислот. Термин "полипептид" охватывает нативные или искусственные белки, фрагменты белков и полипептидные аналоги белковой последовательности. Полипептид может быть мономерным или полимерным.

Термин "человеческий белок aP2" или "человеческий белок FABP4/aP2" при использовании в настоящем документе относится к белку, кодируемому Seq. ID. No. 1, и его природным вариантам, как описано в Ваха, С. А., Sha, R. S., Buelte, M. K., Smith, A. J., Matarese, V., Chinander, L. L., Boundy, K. L., Bernlohr, A. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry* 28: 8683-8690, 1989.

Термин "мышинный белок aP2" или "мышинный белок FAB4P/aP2" при использовании в настоящем документе относится к белку, кодируемому Seq. ID. No. 2, и его природным вариантам. Указанный мышинный белок зарегистрирован в Swiss-Prot под номером P04117.

"Антигенсвязывающие средства" при использовании в настоящем документе включает одноцепочечные антитела (т.е. полную тяжелую цепь и легкую цепь); Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, однодоменные антитела (например, VH или VL, или VHH), например, как описано в WO 2001090190, scFv, би, трех или тетравалентные антитела, бис-scFv, диатела, тритела, триатела, тетратела и эпитоп-антигенсвязывающие средства любого из вышеуказанных (см., например, Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Способы создания и производства таких фрагментов антител известны в уровне техники (см., например, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Формат

Fab-Fv изначально был раскрыт в WO2009/040562, а его дисульфид-стабилизированные варианты, Fab-dsFv, изначально были раскрыты в WO2010/035012. Другие фрагменты антител для применения в настоящем изобретении включают Fab и Fab'-фрагменты, описанные в международных заявках на патент WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Мультивалентные антитела могут включать множественную специфичность, например биспецифичные, или могут быть моноспецифичными (см., например, WO 92/22583 и WO05/113605). Одним таким примером последних является три-Fab (или TFM), как описано в WO92/22583.

Типичная молекула Fab' включает пару тяжелой и легкой цепей, в которой тяжелая цепь включает переменную область VH, константный домен CH1 и природную или модифицированную шарнирную область, и легкая цепь включает переменную область VL и константный домен CL.

Димер Fab' с образованием F(ab')₂, например при димеризации, может быть получен с природной последовательностью шарнирной области, описанной в настоящем документе, или ее производного, или синтетической последовательностью шарнирной области.

Термины "специфичное связывание" или "специфично связывающий" при использовании в настоящем документе в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида с другим химическим соединением означают, что взаимодействие зависит от присутствия определенной структуры (например, "антигенной детерминанты" или "эпитопа", как определено ниже) на химических соединениях; например, антитело распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело является специфичным в отношении эпитопа "А", присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, содержащей меченый А и антитело, будет уменьшать количество меченого А, связанного с антителом.

Термин "антитело" при использовании в настоящем документе относится в широком смысле к любой молекуле иммуноглобулина (Ig), состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, или ее любому функциональному

фрагменту, мутанту, варианту или производному, которое сохраняет, по меньшей мере, некоторую часть эпитопсвязывающих свойств молекулы Ig, позволяющих ее специфично связываться с aP2. Такой форматы мутанта, варианта или производного антитела известны в уровне техники и описаны ниже. Неограничивающие варианты осуществления обсуждаются ниже. Говорят, что антитело "способно связывать" молекулу, если оно способно специфически взаимодействовать с молекулой, в результате чего молекула связывается с антителом.

Термин "моноклональное антитело" при использовании в настоящем документе относится к препарату молекул антитела, которые имеют одинаковую аминокислотную последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, или их любому функциональному фрагменту, мутанту, варианту или производному, которое сохраняет, по меньшей мере, эпитопсвязывающие свойства легкой цепи молекулы Ig, в отличие от "поликлональных" препаратов антител, которые содержат смесь разных антител. Моноклональные антитела могут быть получены несколькими известными технологиями, такими как фаговый, бактериальный, дрожжевой или рибосомный дисплей, а также классическими способами, примерами которых является получение антител с применением гибридом (например, антитело, секретируемое гибридомой, полученной с помощью гибридной технологии, такие как стандартная методика получения гибридом Колера и Мильштейна (Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497)).

В полноразмерном антителе каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно именуемой в настоящем документе как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из четырех доменов - CH1, шарнирной области, CH2 и CH3 (тяжелые цепи γ , α и δ), или CH1, CH2, CH3 и CH4 (тяжелые цепи μ и ϵ). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно именуемой в настоящем документе как LCVR или VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть

дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR-областей и четырех FR-областей, расположенных от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекулы иммуноглобулинов могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или субклассу.

Термин "конструкция антитела" при использовании в настоящем документе относится к полипептиду, включающему один или более антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, соединенные линкерным полипептидом или константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды включают два или более аминокислотных остатка, которые соединены пептидными связями и используются для соединения одного или более антигенсвязывающих фрагментов. Такие линкерные полипептиды известны в уровне техники (см., например, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи, например, к константным доменам IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. Аминокислотные последовательности константных доменов тяжелой цепи и легкой цепи известны в уровне техники.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной при ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или фрагмента антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают применение коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и применение остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

Части антител, такие как Fab и F(ab')₂-фрагменты, могут быть получены из полных антител с применением стандартных методик, таких как расщепление папаином или пепсином, соответственно, полных антител. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с применением стандартных технологий рекомбинантных ДНК, как описано в настоящем документе.

Термин "CDR-перевитое антитело" относится к антителам, которые включают последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи из одного биологического вида, но в которых последовательности одной или более CDR-областей VH и/или VL заменены CDR-последовательностями из другого биологического вида, таким как антитела, имеющие человеческие вариабельные области тяжелой и легкой цепи, в которых одна или более человеческих CDR-областей (например, CDR3) были заменены мышиными CDR-последовательностями.

Термины "нумерация Кэбата", "определения Кэбата" и "маркировка Кэбат" используются в настоящем документе попеременно. Эти термины, которые известны в уровне техники, относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более вариабельными (т.е. гипервариабельными) по сравнению с другими аминокислотными остатками в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 and, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В случае вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область согласно системе нумерации Кэбата начинается с аминокислотных положений 31-35 (CDR-H1), остатков 50-65 (CDR-H2) и остатков 95-102 (CDR-H3). Однако, согласно Чотиа (Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, начинается с остатка 26 - остатка 32. Таким образом, если не указано иное, "CDR-H1", при использовании в настоящем документе относится к остаткам 26-35, как описано согласно комбинации системы нумерации Кэбата и

топологического определения петель Чотиа. В случае вариабельной области легкой цепи гипервариабельная область начинается с аминокислотных положений 24-34 для CDRL1, аминокислотных положений 50-56 для CDRL2 и аминокислотных положений 89-97 для CDRL3.

При использовании в настоящем документе термины "акцептор" и "акцепторное антитело" относятся к антителу или последовательности нуклеиновой кислоты, дающей или кодирующей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100% аминокислотных последовательностей одной или более каркасных областей. В некоторых вариантах осуществления термин "акцептор" относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты антитела, дающей или кодирующей константную область(и). В еще одном варианте осуществления термин "акцептор" относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты антитела, дающей или кодирующей одну или более каркасных областей и константных областей. В определенном варианте осуществления термин "акцептор" относится к человеческой аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты антитела, которая дает или кодирует по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100% аминокислотных последовательностей одной или более каркасных областей. В соответствии с этим вариантом осуществления, акцептор может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, наименьшее количество 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, которые не присутствуют в одном или более определенных положениях человеческого антитела. Акцепторная каркасная область и/или акцепторная константная область(и) может быть, например, получена из гена антитела зародышевой линии, гена зрелого антитела, функционального антитела (например, антител, известных в уровне техники, разрабатываемых антител или антител, доступных в продаже).

При использовании в настоящем документе термин "CDR"

относится к определяющей комплементарность области в переменных последовательностях антител. В каждой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи присутствуют три CDR-области, которые обозначены CDRH1, CDRH2 и CDRH3 для CDR-областей тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 для CDR-областей легкой цепи. Термин "набор CDR" при использовании в настоящем документе относится к группе из трех CDR-областей, которые присутствуют в одной переменной области, способной связывать антиген. Точные границы этих CDR-областей были определены по-разному согласно разным системам. Система, описанная Кэбатом (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))), не только обеспечивает однозначную систему нумерации остатков, применимую к любой переменной области антитела, но также обеспечивает точные границы остатков, определяющих эти три CDR-области. Такие CDR-области могут быть указаны как CDR-области Кэбата. Чотиа с сотрудниками (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) и Chothia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)) установили, что некоторые субфрагменты в CDR-областях Кэбата принимают практически идентичные конформации пептидного скелета, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Такие субфрагменты были обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области могут быть указаны как CDR-области Чотиа, которые имеют границы, которые перекрываются с CDR-областями Кэбата. Другие границы, определяющие CDR-области, которые перекрываются с CDR-областями Кэбата, были описаны Падланом (Padlan, *FASEB J.* 9:133-139 (1995)) и Маккаллумом (MacCallum, *J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Другие определения границ CDR могут нестрого соответствовать одной из вышеуказанных систем, но при этом перекрываются с CDR-областями Кэбата, хотя они могут быть укорочены или удлинены на основе предположений или экспериментальных результатов, что конкретные остатки или группы остатков, или даже полные CDR-области не оказывают значительного влияния на связывание антигена. Способы, применяемые в настоящем

документе, могут использовать CDR-области, определенные согласно любой из этих систем, хотя в предпочтительных вариантах осуществления используются CDR-области, определенные согласно Кэбату или Чотиа, или их комбинации.

При использовании в настоящем документе термин "канонический" остаток относится к остатку в CDR-области или каркасной области, который определяет конкретную каноническую структуру CDR, как определено в публикациях Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), включенных в настоящий документ посредством отсылки). Согласно Чотиа с соавт., важные участки CDR-областей многих антител имеют практически идентичные конформации пептидного скелета, несмотря на большое разнообразие на уровне аминокислотной последовательности. Каждая каноническая структура определяет, прежде всего, набор углов вращения пептидного скелета для непрерывного сегмента аминокислотных остатков, формирующих петлю.

При использовании в настоящем документе термины "донор" и "донорное антитело" относятся к антителу, предоставляющему одну или более CDR-областей. В предпочтительном варианте осуществления донорное антитело является антителом из биологического вида, отличающегося от вида, из которого получены каркасные области антитела. В контексте гуманизированного антитела термин "донорное антитело" относится к нечеловеческому антителу, предоставляющему одну или более CDR-областей.

При использовании в настоящем документе термин "каркасный" или "каркасная последовательность" относится к оставшимся последовательностям вариабельной области без CDR-областей. Поскольку точное определение CDR-последовательности может быть сделано с помощью разных систем, значение каркасной последовательности соответственно подлежит различным интерпретациям. Шесть CDR-областей (CDR-L1, -L2 и -L3 легкой цепи и CDR-H1, -H2 и -H3 тяжелой цепи) также делят каркасные области на легкой цепи и тяжелой цепи на четыре субобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, где CDR1 расположена между FR1 и FR2, CDR2 - между FR2 и FR3, и CDR3 - между FR3 и FR4. Нет

четкого указания таких конкретных субобластей, как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, как указано другими, представляет собой комбинированные FR в варибельной области одной, природной иммуноглобулиновой цепи. При использовании в настоящем документе FR представляет собой одну из четырех субобластей, и FR-области представляют собой две или более из четырех субобластей, составляющих каркасную область.

Человеческие акцепторные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи известны в уровне техники.

При использовании в настоящем документе термин "ген антитела зародышевой линии" или "фрагмент гена" относится к последовательности иммуноглобулина, кодируемой нелимфоидными клетками, которые не подвергались процессу созревания, который приводит к генетической перестройке и мутации для экспрессии конкретного иммуноглобулина. См., например, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001). Одно из преимуществ, обеспечиваемых различными вариантами осуществления настоящего изобретения, заключается в том, что гены антител зародышевой линии с большей вероятностью, чем гены зрелых антител, сохраняют важные структуры аминокислотных последовательностей, характерные для особей данного вида, и, следовательно, с меньшей вероятностью распознаются как чужеродный источник при терапевтическом применении у этого вида.

При использовании в настоящем документе термин "ключевые" остатки относится к некоторым остаткам в варибельной области, которые оказывают большее влияние на специфичность связывания и/или аффинность антитела, в частности гуманизированного антитела. Ключевой остаток включает, без ограничения перечисленным, одно или более из следующего: остаток, который примыкает к CDR, потенциальный сайт гликозилирования (может быть сайтом N- или O-гликозилирования), редкий остаток, остаток, способный взаимодействовать с антигеном, остаток, способный взаимодействовать с CDR, канонический остаток, контактный остаток между варибельной областью тяжелой цепи и варибельной областью легкой цепи, остаток в зоне Верньер и остаток в

области, которая перекрывается между определением Чотиа CDR1 вариабельной области тяжелой цепи и определением Кэбата первой каркасной области тяжелой цепи.

Термин "гуманизированное антитело" обычно относится к антителам, которые включают последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи из не относящегося к человеку вида (например, кролика, мыши и т.д.), но в которых, по меньшей мере, часть последовательности VH и/или VL была изменена так, чтобы она стала более "похожей на человеческую", то есть более сходной с вариабельными последовательностями зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированного антитела является CDR-перевитое антитело, в котором CDR-последовательности человека вводят в нечеловеческие последовательности VH и VL для замены соответствующих нечеловеческих CDR-последовательностей. Другим типом гуманизированного антитела является CDR-перевитое антитело, в котором по меньшей мере одну нечеловеческую CDR вставляют в человеческую каркасную область. Последнее обычно является предметом настоящего изобретения.

В частности, термин "гуманизированное антитело" при использовании в настоящем документе является антителом или его вариантом, производным, аналогом или фрагментом, которые иммуноспецифично связываются с представляющим интерес антигеном и который содержит каркасную (FR) область, имеющую по существу аминокислотную последовательность человеческого антитела, и определяющую комплементарность область (CDR), имеющую по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого антитела. При использовании в настоящем документе термин "по существу" в контексте CDR относится к CDR, имеющей аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности CDR нечеловеческого антитела. В одном варианте осуществления гуманизированное антитело имеет CDR-область, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, вставок и/или делеций по сравнению с CDR

нечеловеческого антитела. Кроме того, нечеловеческая CDR может быть подвергнута генно-инженерной модификации так, чтобы она была более "похожей на человеческую" или совместимой с организмом человека, при использовании известных методов. Гуманизированное антитело включает по существу все из по меньшей мере одного, и, как правило, два переменных домена (Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂C, Fv), в которых все или по существу все CDR-области соответствуют CDR-областям нечеловеческого иммуноглобулина (то есть донорного антитела), и все или по существу все каркасные области являются каркасными областями из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Предпочтительно гуманизированное антитело также содержит, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно константной области человеческого иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит как легкую цепь, так и, по меньшей мере, переменный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать CH1, шарнирную область, CH2 и CH3 или CH1, CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированный переменный домен легкой цепи и/или гуманизированную тяжелую цепь.

Гуманизированное антитело может быть выбрано из иммуноглобулинов любого класса, в том числе IgY, IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, в том числе, без ограничения, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированное антитело может включать последовательности больше чем одного класса или изотипа, и конкретные константные домены могут быть выбраны для оптимизации требуемых эффекторных функций с применением способов, известных в уровне техники.

Каркасные и CDR-области гуманизированного антитела не должны обязательно точно соответствовать исходным последовательностям, например, CDR донорного антитела или

консенсусный каркас могут быть подвергнуты мутации с заменой, вставкой и/или делецией по меньшей мере одного аминокислотного остатка, чтобы остаток CDR или каркасной области на том участке не соответствовал точно донорному антителу или консенсусному каркасу. В предпочтительном варианте осуществления такие мутации, тем не менее, не будут неограниченными. Обычно по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% остатков гуманизированного антитела будут соответствовать остаткам исходных FR и CDR последовательностей. В одном варианте осуществления одна или более (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, вставок и/или делеций могут присутствовать в гуманизированном антителе по сравнению с исходными FR и CDR последовательностями. При использовании в настоящем документе термин "консенсусный каркас" относится к каркасной области в консенсусной последовательности иммуноглобулина. При использовании в настоящем документе термин "консенсусная последовательность иммуноглобулина" относится к последовательности, сформированной из наиболее часто встречающихся аминокислот (или нуклеотидов) в семействе родственных иммуноглобулиновых последовательностей (см., например, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)). В семье иммуноглобулинов каждое положение в консенсусной последовательности занимает аминокислота, наиболее часто встречающаяся в этом положении в данном семействе. Если две аминокислоты встречаются одинаково часто, в консенсусную последовательность может быть включена любая из них.

При использовании в настоящем документе зона "Верньер" относится к подгруппе каркасных остатков, которые могут корректировать структуру CDR и точно регулировать соответствие антигену, как описано в публикации Foote and Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, 1992, которая включена в настоящий документ посредством отсылки. Остатки зоны Верньер формируют слой, лежащий в основе CDR-областей, и могут влиять на структуру

CDR-областей и аффинность антитела.

При использовании в настоящем документе термин "нейтрализация" относится к нейтрализации биологической активности комплекса глюкагона/белка аР2, когда соединение специфично блокирует способность комплекса глюкагона/белка аР2 агонистически взаимодействовать с GCGR. Предпочтительно нейтрализующий связывающий белок, например антитело, является связывающим белком, который связывается с аР2, глюкагоном и/или комплексом глюкагона/белка аР2, что приводит к нейтрализации биологической активности комплекса глюкагона/белка аР2. Предпочтительно нейтрализующий связывающий белок уменьшает биологическую активность комплекса глюкагона/белка аР2 по меньшей мере на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 80%, 85% или больше. Нейтрализацию биологической активности комплекса глюкагона/белка аР2 нейтрализующим антителом можно оценивать путем измерения одного или более индикаторов биологической активности комплекса глюкагона/белка аР2, описанных в настоящем документе.

"Нейтрализующее моноклональное антитело" при использовании в настоящем документе относится к препарату молекул антитела, которые при связывании с комплексом глюкагона/белка аР2 способны ингибировать или снижать биологическую активность комплекса глюкагона/белка аР2, то есть способность комплекса глюкагона/белка аР2 активировать глюкагоновый рецептор, частично или полностью.

Термин "уровень глюкозы в крови" должен означать концентрацию глюкозы в крови. В некоторых вариантах осуществления уровень глюкозы в крови является уровнем глюкозы в плазме. Глюкоза плазмы может быть определена, например, в соответствии с Etgen et al., (2000) *Metabolism*, 49(5): 684-688 или вычислена путем преобразования концентрации глюкозы в цельной крови в соответствии с D'Orazio et al., (2006) *Clin. Chem. Lab. Med.*, 44(12): 1486-1490.

Термин "нормальные уровни глюкозы" относится к средним значениям глюкозы в плазме у людей меньше чем приблизительно 100 мг/дл для уровней натощак и меньше 145 мг/дл для уровней через 2

часа после приема пищи, или 125 мг/дл для случайного измерения глюкозы. Термин "повышенный уровень глюкозы в крови" или "повышенные уровни глюкозы в крови" должны означать повышенный уровень глюкозы в крови, такой как у субъекта, демонстрирующего клинически неприемлемую базальную и постпрандиальную гипергликемию, или такой как у субъекта в пероральном глюкозотолерантном тесте (ПГТТ), с "повышенными уровнями глюкозы в крови" выше 100 мг/дл при анализе натощак и выше чем приблизительно 200 мг/дл при анализе через 1 час.

При использовании в настоящем документе термин "ослабление", "ослаблять" и т.п. относится к уменьшению или снижению тяжести симптома или состояния, вызванного повышенными уровнями глюкозы в крови.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" включает любую детерминанту полипептида, способную к специфичному связыванию с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления детерминанты эпитопа включают химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорил или сульфонил, и, в некоторых вариантах осуществления, могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики и/или специфические зарядовые характеристики. Эпитоп является областью антигена, которую связывает антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело специфично связывает антиген, если оно предпочтительно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул.

Термин "Kd" при использовании в настоящем документе относится к аффинности (или константе аффинности), которая является показателем скорости связывания (ассоциации и диссоциации) между антителом и антигеном, определяющим специфическую силу связывания в реакции связывания антитела.

При использовании в настоящем документе термин "предпочтительно связывается с глюкагоном/aP2" означает, что соединение обладает большей аффинностью к глюкагону/aP2 в комплексе, чем к aP2, глюкагону и/или GCGR по отдельности. Например, аффинность соединения к глюкагону/aP2 может быть на 1-

2 порядка больше, чем его аффинность к глюкагону, аР2 и/или GCGR по отдельности. Таким образом, в одном варианте осуществления соединения, которые предпочтительно связывают глюкагон/аР2 по сравнению с аР2, глюкагоном и/или GCGR, обладают аффинностью, которая на 1 порядок величины выше, чем их аффинность связывания с аР2, глюкагоном и/или GCGR по отдельности. В одном варианте осуществления соединения, которые предпочтительно связывают глюкагон/аР2 по сравнению с аР2, глюкагоном и/или GCGR, обладают аффинностью, которая на 2 порядка величины больше, чем их аффинность связывания с аР2, глюкагоном и/или GCGR по отдельности. В одном варианте осуществления соединения, которые предпочтительно связывают глюкагон/аР2 по сравнению с аР2, глюкагоном и/или GCGR, обладают аффинностью, которая на 3 порядка величины больше, чем их аффинность связывания с аР2, глюкагоном и/или GCGR по отдельности. В случае антитела, антигенсвязывающего средства или фрагмента антитела аффинность может быть измерена как равновесная константа диссоциации (K_D), отношение k_{off}/k_{on} , между антителом и его антигеном. K_D и аффинность обратно пропорциональны друг другу. Значение K_D относится к концентрации антитела (количеству антитела, необходимому для конкретного эксперимента), и, таким образом, чем ниже значение K_D (более низкая концентрация), тем выше аффинность антитела. В одном варианте осуществления соединение имеет значение K_D в отношении комплекса глюкагона/аР2 меньше 10^{-7} и значение K_D в отношении аР2, глюкагона или GCGR больше 10^{-7} . В одном варианте осуществления значение K_D соединения, связанного с глюкагоном/аР2, составляет от приблизительно 10^{-10} до 10^{-8} , тогда как значение K_D для соединения, связанного с глюкагоном, аР2 и/или GCGR, составляет больше 10^{-8} . В одном варианте осуществления значение K_D для соединения, связанного с аР2, глюкагоном или GCGR, превышает 10^{-7} .

Термины "кристалл" и "кристаллизованный" при использовании в настоящем документе относятся к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые существуют в форме кристалла. Кристаллы являются одной из форм твердого состояния вещества, которая отличается от других форм, таких как аморфное

твердое состояние или жидкокристаллическое состояние. Кристаллы состоят из регулярных, повторяющихся, трехмерных матриц атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных блоков (например, комплексов антигена/антитела). Такие трехмерные структуры упорядочены согласно определенным математическим отношениям, которые хорошо известны в данной области. Основную единицу или стандартный блок, который повторяется в кристалле, называют асимметричной единицей. Повторение асимметричной единицы в структуре, которая соответствует данной, четко определенной кристаллографической симметрии, обеспечивает "элементарную ячейку" кристалла. Повтор элементарной ячейки при регулярных переносах во всех трех измерениях дает кристалл. См. Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, N.Y., (1999).

При использовании в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству терапии, которое является достаточным для снижения или уменьшения тяжести и/или продолжительности нарушения или его одного или более симптомов, предотвращения прогрессии нарушения, инвертировать прогрессию нарушения, предотвращать рецидив, развитие, начало или прогрессию одного или более симптомов, связанных с нарушением, обнаружения нарушения или увеличения или улучшения профилактического или терапевтического действия другой терапии (например, профилактического или терапевтического средства).

Глюкагон и глюкагоновый рецептор (GCGR)

Глюкагон – гормон, состоящий из 29 аминокислот, процессируемый из препроформы в альфа-клетках поджелудочной железы в результате клеточно-специфической экспрессии прогормон-конвертазы 2 (PC2), нейроэндокринно-специфической протеазы, участвующей во внутриклеточном созревании прогормонов и пронеуропептидов (Furuta et al., (2001) J. Biol. Chem. 276: 27197-27202). *In vivo*, глюкагон является главным контррегуляторным гормоном действия инсулина. Во время перерыва между приемами пищи секреция глюкагона увеличивается в ответ на

снижение уровней глюкозы. Увеличение секреции глюкагона стимулирует продукцию глюкозы, вызывая печеночный гликогенолиз и глюконеогенез (Dunning and Gerich (2007) *Endocrine Reviews* 28: 253-283). Таким образом, глюкагон уравнивает действие инсулина при поддержании нормальных уровней глюкозы у животных.

Аминокислотная последовательность глюкагона является следующей:

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ. ID. No. 82.)

Биологическое действие глюкагона опосредовано через связывание и последующую активацию специфического рецептора клеточной поверхности, глюкагонового рецептора. Рецептор глюкагона (GCGR) является членом подсемейства секретина (семейства В) сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR). Рецепторы GPCR представляют собой семиспиральные трансмембранные рецепторы, расположенные в клеточной мембране, которые связывают внеклеточные вещества и передают сигналы к внутриклеточной молекуле, называемой G-белком, который, как правило, либо активирует путь сигнала цАМФ, либо путь сигнала фосфатидилинозитола. Человеческий GCGR является GPCR с последовательностью из 477 аминокислот, причем аминокислотная последовательность GCGR высококонсервативна между различными видами (Mayo et al., (2003) *Pharmacological Rev.* 55:167-194). Рецептор глюкагона преимущественно экспрессируется в печени, где он регулирует продукцию глюкозы, на почках и на островковых β -клетках, что отражает его роль в глюконеогенезе, гладкой мускулатуре кишечника, головном мозге и жировой ткани. Активация глюкагоновых рецепторов в печени стимулирует активность аденилатциклазы и обмен фосфоинозитола, что впоследствии приводит к повышению уровней продукции глюкозы в печени, повышению внутриклеточного цАМФ, повышению гликогенолиза и повышению экспрессии глюконеогенных ферментов, включающих фосфоенолпируваткарбоксикиназу (PEPCK) фруктозо-1,6-бисфосфатазу (FBPase-1) и глюкозо-6-фосфатазу (G-6-Pase). Кроме того, сигнализация глюкагона активирует гликогенфосфорилазу и ингибирует гликогенсинтазу. Исследования показали, что

повышенные базальные уровни глюкагона и отсутствие супрессии постпрандиальной секреции глюкагона способствуют развитию диабетических состояний у людей (Muller et al., (1970) NEJM 283: 109-115). Недавно предположили, что именно избыток активности глюкагона, а не дефицит инсулина, ответственен за диабетический фенотип (Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. J Clin. Invest. 2012 Jan 3; 122(1):4-12).

Белок адипоцитов 2 (aP2)

Человеческий липидсвязывающий белок адипоцитов (aP2), также известный как связывающий жирные кислоты белок 4 (FABP4), относится к семейству внутриклеточных липидсвязывающих белков, участвующих в транспорте и накоплении липидов (Banzszak et al., (1994) Adv. Protein Chem. 45, 89-151). Белок aP2 участвует в расщеплении жира и липогенезе и был отмечен при болезнях обмена липидов и энергетического обмена, таких как диабет, атеросклероз и метаболические синдромы. Также aP2 был отмечен при интеграции систем метаболических и воспалительных реакций (Ozcan et al., (2006) Science 313(5790):1137-40; Makowski et al., (2005) J Biol Chem. 280 (13):12888-95; и Erbay et al., (2009) Nat Med. 15(12):1383-91). Недавно было показано, что aP2 дифференцированно экспрессируется в некоторых опухолях мягких тканей, таких как некоторые липосаркомы (Kashima et al., (2013) Virchows Arch. 462, 465-472).

В адипоцитах aP2 экспрессируется на высоком уровне и регулируется агонистами активируемого пролифератором пероксисом гамма-рецептора (PPAR-гамма), инсулином и жирными кислотами (Hertzel et al., (2000) Trends Endocrinol. Metab. 11, 175-180; Hunt et al., (1986) PNAS USA 83, 3786-3790; Melki et al., (1993) J. Lipid Res. 34, 1527-1534; Distel et al., (1992) J. Biol. Chem. 267, 5937-5941). Исследования у aP2-дефицитных мышей (FABP4-/-) указывают на защиту от развития инсулинорезистентности, связанной с генетически обусловленным или алиментарным ожирением, и улучшенный профиль липидов в жировой ткани с повышенными уровнями C16:1n7-пальмитолеата, сниженным гепатостеатозом и улучшенным контролем продукции

глюкозы в печени и периферической утилизацией глюкозы (Hotamisligil et al., (1996) *Science* 274, 1377-1379; Uysal et al., (2000) *Endocrinol.* 141, 3388-3396; Cao et al., (2008) *Cell* 134, 933-944).

Кроме того, генетический обусловленный дефицит или фармакологическая блокада аР2 уменьшают ранние и распространенные атеросклеротические поражения в модели на аполипопротеине Е-дефицитных (ApoE-/-) мышцах (Furuhashi et al., (2007) *Nature*, June 21; 447 (7147):959-65; Makowski et al., (2001) *Nature Med.* 7, 699-705; Layne et al., (2001) *FASEB* 15, 2733-2735; Boord et al., (2002) *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vas. Bio.* 22, 1686-1691). Кроме того, недостаточность аР2 приводит к заметной защите от раннего и распространенного атеросклероза у мышечей с дефицитом аполипопротеина Е (ApoE-/-) (Makowski et al., (2001) *Nature Med.* 7, 699-705; Fu et al., (2000) *J. Lipid Res.* 41, 2017-2023). Следовательно, аР2 играет решающую роль во многих аспектах развития нарушения обмена веществ в доклинических моделях.

В последние два десятилетия биологические функции белков FABP в целом и аР2 в частности в первую очередь связывали с их действием в качестве внутриклеточных белков. Поскольку содержание белка аР2 в адипоцитах чрезвычайно высокое, достигая нескольких процентов от суммарного клеточного белка (Cao et al., (2013) *Cell Metab.* 17 (5):768-78), терапевтическое направленное воздействие на аР2 с применением традиционных подходов было сложным, при этом многообещающие успехи, достигнутые в доклинических моделях (Furuhashi et al., (2007) *Nature* 447, 959-965; Won et al., (2014) *Nature Mat.* 13, 1157-1164; Cai et al., (2013) *Acta Pharm. Sinica* 34, 1397-1402; Hoo et al., (2013) *J. of Hepat.* 58, 358-364), медленно продвигались к клиническому применению.

В дополнение к его присутствию в цитоплазме, недавно было показано, что аР2 активно секретируется из жировой ткани по неклассическому регулируемому пути (Cao et al., (2013) *Cell Metab.* 17(5), 768-778; Ertunc et al., (2015) *J. Lipid Res.* 56, 423-424). Секретируемая форма аР2 действует как новый адипокин и

регулирует продукцию глюкозы в печени и системный гомеостаз глюкозы у мышей в ответ на сигналы голода и сигналы, связанные с голоданием. Уровни аР2 в сыворотке у мышей с ожирением значительно повышены, при этом блокирование циркулирующего аР2 улучшает гомеостаз глюкозы у мышей с алиментарным ожирением (Cao et al., (2013) *Cell Metab.* 17(5):768-78). Важно отметить, что такие же закономерности также наблюдались в группах людей, у которых уровни секретируемого аР2 повышены при ожирении и сильно коррелируют с метаболическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями в многочисленных независимых исследованиях на людях (Xu et al., (2006) *Clin. Chem.* 53, 405-413; Yoo et al., (2011) *J. Clin. Endocrin. & Metab.* 96, 488-492; von Eynatten et al., (2012) *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vas. Bio.* 32, 2327-2335; Suh et al., (2014) *Scandinavian J. Gastro.* 49, 979-985; Furuhashi et al., (2009) *Metabolism: Clinical and Experimental* 58, 1002-1007; Kaess et al., (2012) *J. Endocrin. & Metab.* 97, E1943-47; Cabre et al., (2007) *Atherosclerosis* 195, e150-158). Наконец, люди, несущие аллель гаплонедостаточности, что приводит к пониженной экспрессии аР2, защищены от диабета и сердечно-сосудистых заболеваний (Tuncman et al., (2006) *PNAS USA* 103, 6970-6975; Saksi et al., (2014) *Circulation, Cardiovascular Genetics* 7, 588-598). В WO 2010/102171, озаглавленной "Секретируемый аР2 и способы его ингибирования", President and Fellows of Harvard University, и в WO 2016/176656, озаглавленной "Антитела против аР2 и антигенсвязывающие средства для лечения нарушений обмена веществ", President and Fellows of Harvard University and UCB Biopharma SPRL, описано применение антител, направленно воздействующих на циркулирующий аР2, для модуляции нарушений обмена веществ.

Связывающие жирные кислоты белки (FABP) являются членами суперсемейства липидсвязывающих белков (LBP). На сегодняшний день идентифицировано девять различных FABP, каждый из которых демонстрирует относительное обогащение тканей: L (печень), I (кишечник), H (мышца и сердце), A (адипоцит), E (эпидермальный), Il (илеальный), B (головной мозг), M (миелин) и T (яичко). Основная роль всех членов семейства FABP заключается в регуляции

захвата и внутриклеточного транспорта жирных кислот. Структуры всех FABP похожи – основным мотивом, характеризующим эти белки, является β -бочка и жирнокислотный лиганд или лиганды (например, жирная кислота, холестерин или ретиноид), связываемые в их внутренней, заполненной водой полости.

В WO2016/176656, President and Fellows of Harvard University, озаглавленной "Антитела против aP2 и антигенсвязывающие средства для лечения нарушений обмена веществ", описаны моноклональные антитела, направленные на aP2, для применения в лечении таких нарушений, как диабет, ожирение, сердечно-сосудистое заболевание, жировая болезнь печени и/или рак, помимо прочих.

Человеческий белок aP2 представляет собой внутриклеточный и внеклеточный (секретируемый) липидсвязывающий белок массой 14,7 кДа, который состоит из 132 аминокислот, включающих аминокислотную последовательность (Seq. ID No. 1) в Таблице 1. Последовательность кДНК человеческого aP2 ранее была описана в публикации Ваха, С. А., Sha, R. S., Buelte, M. K., Smith, A. J., Matarese, V., Chinander, L. L., Boundy, K. L., Bernlohr, A. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. Biochemistry 28: 8683-8690, 1989, и представлена в Seq. ID No. 5. Человеческий белок зарегистрирован в базе Swiss-Prot под номером P15090.

Таблица 1: Последовательности белка и кДНК aP2

Белок или кДНК	Seq. ID No.	Последовательность
Связывающий жирные кислоты белок, адипоцитов (FABP4/aP2) [H. sapiens]	1	MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATR KVAGMAKP NMIISVNGDVITIKSESTFKNTEISFILGQEFDEVTADD RKVKSTITLDGGVLVHVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVE CVMKGVSTRVYERA
Связывающий жирные кислоты белок, адипоцитов (FABP4/aP2 [M. musculus])	2	MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATR KVAGMAKP NMIISVNGDLVTIRSESTFKNTEISFKLGVEFDEITADD RKVKSIITLDGGALVQVQKWDGKSTTIKRKRDGDKLVE CVMKGVSTRVYERA
Аминокислотная последовательность ядерной локализации aP2	3	KEVGVGFATR K
Аминокислотная последовательность связывающего жирные кислоты домена aP2	4	RVY
Связывающий жирные кислоты белок, адипоцитов (FABP4/aP2) [H. sapiens]	5	ATGTGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAACTGTCTCC AGTGAACCTTTGATGATTATATGAAAGAAGTAGGAGTG GGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCT AACATGATCATCAGTGTGAATGGGGATGTGATCACCATT

Белок или кДНК	Seq. ID No.	Последовательность
кДНК		AAATCTGAAAGTACSTTTAAAAATACTGAGATTTCTTC ATACTGGGCCAGGAATTTGACGAAGTCACTGCAGATGAC AGGAAAGTCAAGAGCACCATAACSTTAGATGGGGGTGTC CTGGTACATGTGCAGAAATGGGATGG AAAATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATGATAA ACTGGTGGTGGGAATGCGTCATGAAAGGCGTCACTTCCAC GAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Связывающий жирные кислоты белок, адипоцитов (FABP4/aP2 [M. musculus]) кДНК	6	ATGTGTGATGCSTTTGTGGGAACCTGGAAGCTTGTCTCC AGTGAAAACTTCGATGATTACATGAAAGAAGTGGGAGTG GGCTTTGCCACAAGGAAAGTGGCAGGCATGGCCAAGCCC AACATGATCATCAGCGTAAATGGGGATTTGGTCACCATC CGGTCAGAGAGTACTTTTAAAAACACCGAGATTTCTTC AAACTGGGCGTGGGAATTCGATGAAATCACCGCAGACGAC AGGAAGGTGAAGAGCATCATAACCCCTAGATGGCGGGGCC CTGGTGCAGGTGCAGAAGTGGGATGGAAGTCGACCACA ATAAAGAGAAAACGAGATGGTGACAAGTGGTGGTGGAA TGTGTTATGAAAGGCGTGA CTTCACAAAGATTTATGAA AGGGCATGA

Способы идентификации соединений, которые нейтрализуют агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR

Один аспект настоящего изобретения относится к способу идентификации соединений, которые модулируют/влияют на, и предпочтительно нейтрализуют, агонистическую активность глюкагона/aP2 в отношении GCGR, для применения в терапии, описанной в настоящем документе. В одном варианте осуществления соединения взаимодействуют с глюкагоном, aP2 и/или глюкагоном/aP2, без прямого антагонистического воздействия на GCGR. Соединения согласно настоящему изобретению могут включать, в качестве неограничивающего примера, пептиды, полученные в результате экспрессии подходящей последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине или при использовании методов органического химического синтеза (например, антитела, фрагменты антител или антигенсвязывающие средства), или непептидные малые молекулы, полученные с помощью стандартных методов органического химического синтеза, известных в уровне техники. Идентифицирующие анализы могут быть автоматизированными для облегчения одновременной идентификации большого количества малых молекул.

Способы, используемые для идентификации соединений, могут быть клеточными или бесклеточными. В одном варианте осуществления скрининг бесклеточный, и соединения подвергают скринингу для определения их способности взаимодействовать или связываться с aP2, глюкагоном и/или глюкагоном/aP2. Например,

соединение подвергают контакту с аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2, и затем проводят анализ для обнаружения связывания соединения с аР2, глюкагоном и или глюкагоном/аР2. В других вариантах осуществления соединение может быть подвергнуто контакту с аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2 в присутствии GCGR, и связывание указанного глюкагона/аР2 с GCGR могут измерять и сравнивать со связыванием указанного глюкагона/аР2 без присутствия соединения.

Анализы для обнаружения связывания соединений известны в уровне техники, например, как описано в публикациях McFedries, et al, *Methods for the Elucidation of Protein-Small Molecule Interactions. Chemistry & Biology* (2013); Vol. 20(5):667-673; Pollard, *A Guide to Simple and Informative Binding Assays, Mol. Biol. Cell* (2010) Vol. 21, 4061-4067, полностью включенных в настоящее описание посредством отсылки.

Например, в анализе могут измерять образование комплексов между аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2 и тестируемым соединением, или оценивать степень, в которой соединение препятствует образованию комплекса между глюкагоном/аР2 и GCGR. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы идентификации соединений, включающие контакт соединения с аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2 и анализ (i) на присутствие комплекса между аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2 и соединением или (ii) на присутствие комплекса между глюкагоном/аР2 и GCGR. В таких анализах конкурентного связывания аР2, глюкагон и/или глюкагон/аР2 могут быть помечены. Свободный глюкагон/аР2 отделяется от присутствующего в комплексе, и количество свободной (то есть не связанной в комплексе) метки измеряет связывание тестируемого соединения с аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2 или его нарушение связывания глюкагона/аР2 с GCGR? соответственно. Примеры анализов конкурентного связывания, которые можно использовать, включают биослойную интерферометрию с прямым взаимодействием аР2 с биотинилированным глюкагоном (см. Пример 1; Фигуру 3а), сцинтилляционный анализ сближения, в котором ¹²⁵I-глюкагон взаимодействует с биотинилированным аР2 (см. Пример 1; Фигуру 3b), изотермическую

титрационную калориметрию, в которой измеряют тепло, высвобождаемое в событиях связывания в растворе (см. Пример 1; Фигуру 3с), и микромасштабный термофорез (см. Пример 1; Фигуру 4А-4D).

Идентификацию соединения, способного нейтрализовать агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR, также можно подтверждать в дополнительных анализах, например, в клеточных биологических анализах или бесклеточных анализах фосфорилирования. Последовательность для облегчения обнаружения или очистки связанного комплекса глюкагона/aP2:GCGR или комплекса глюкагона/aP2:соединения, такая как последовательность, содержащая остаток гистидина или его непрерывную последовательность (поли-His), неполный пептид с-Myc (Myc-tag), неполный пептид гемагглютинаина (HA-tag), неполный пептид Flag (Flag-tag), глутатион-S-трансферазу (GST), мальтозосвязывающий белок (MBP), ботинилирование, мечение флуоресцентным веществом (такое как флуоресцеин), Eu хелат, хромофор, люминофор, фермент или радиоизотоп (такой как ^{125}I или тритий); или связывание соединения, имеющего гидроксисукцинимидный остаток, винилпиридиновый остаток и т.д., для облегчения связывания с твердой фазой (такой как контейнер или носитель), может быть введено на N-конец, C-конец или в промежуточную область аминокислотной последовательности aP2, GCGR, глюкагона или соединения, если соединение является антителом или его фрагментом, причем такие белки могут использоваться во время скрининга.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации соединений, способных нейтрализовать агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR, с применением эукариотических клеток, экспрессирующих GCGR, и анализа биологических эффектов соединения в отношении агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR. Такие клетки в живой или фиксированной форме могут использоваться для стандартных анализов связывания. Например, в анализе могут измерять образование комплексов между глюкагоном/aP2 и GCGR в присутствии соединения или исследовать степень, в которой

соединение нарушает биологическую активность GCGR в присутствии глюкагона/aP2. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы идентификации соединений, включающие контакт соединения и aP2, глюкагона и/или глюкагона/aP2 и анализ (i) на присутствие комплекса между глюкагоном/aP2 и GCGR или (ii) на ингибирование агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR путем измерения биологического эффекта GCGR. Влияние соединения на биологическую активность GCGR может быть определено с помощью способов, хорошо известных в данной области. В таких анализах активности биологическую активность GCGR обычно отслеживают путем введения репортерной системы. Например, это может включать введение природного или синтетического субстрата, который генерирует детектируемый сигнал пропорционально степени, в которой на него воздействует биологическая активность стимуляции GCGR, например, измерение образования циклического АМФ, уровней экспрессии глюконеогенных ферментов, включая фосфоенолпируваткарбоксикиназу (PEPCK), фруктозо-1,6-бисфосфатазу (FBPase-1) и глюкозо-6-фосфатазу (G-6-Pase), измерение гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы, продукции глюкозы в печени и гликогенолиза.

Клеточный анализ включает клетку, которая экспрессирует GCGR, эндогенно или рекомбинантно. При экспрессии, GCGR может находиться в состоянии мономера, димера или мультимера, при условии, что он способен оказывать измеримое биологическое воздействие при стимуляции в результате связывания глюкагона/aP2. GCGR может быть получен из любого организма, такого как человек, мышь, крыса, крупный рогатый скот, свинья или кролик. В одном варианте осуществления экспрессируемый GCGR имеет человеческое происхождение и получен из эндогенного человеческого белка GCGR (UniProtKB-P47871 (GLR_HUMAN)). GCGR может быть выделен из клетки или ткани, существующей в природе, и может быть выделен из клетки или ткани, которая экспрессирует субъединицу в результате применения методики генной инженерии. GCGR может быть очищенным или неочищенным. GCGR, полученный с помощью методики генной инженерии, имеющей указанную аминокислотную последовательность или вариант аминокислотной

последовательности, полученный в результате генетической мутации, может использоваться при условии, что она по существу сохраняет активность.

В одном варианте осуществления анализ является бесклеточным анализом, и соединения приводят в контакт с аР2, глюкагоном и/или глюкагоном/аР2 в жидкой фазе, или, в альтернативе, аР2, глюкагон и/или глюкагон/аР2 фиксируют на твердой фазе (такой как колонка), а затем подвергают контакту с соединением. Например, глюкагон/аР2 может быть фиксирован на твердой фазе с помощью биотина/стрептавидина при использовании реакционноспособной аминокислоты, такой как гидроксисукцинимидная группа, с использованием реакционноспособной карбоксильной группы на поверхности, такой как гидразиновая группа, или при использовании группы, способной реагировать с тиольной группой на поверхности, такой как винилпиридиновая группа. Например, глюкагон/аР2 может быть фиксирован на твердой фазе (такой как колонка) путем прикрепления к твердой фазе, состоящей из полистирольной смолы или стекла, при использовании электростатической силы притяжения или межмолекулярной силы, путем связывания глюкагона/аР2 с твердой фазой, полученной путем иммобилизации антитела против аминокислотной последовательности, добавленной к аР2 и/или глюкагону/аР2 (такой как поли-His, Мус-метка, HA-метка, Flag-метка, GST или MBP), путем связывания глюкагона/аР2, прикрепленного поли-His меткой к твердой фазе, имеющей на поверхности хелат металла, путем связывания глюкагона/аР2, прикрепленного GST меткой к твердой фазе, имеющей на поверхности глутатион, или путем связывания глюкагона/аР2, прикрепленного MBP меткой к твердой фазе, имеющей на поверхности сахар, такой как мальтозу. Глюкагон/аР2 также может быть прикреплен к твердой фазе другим общеизвестным способом.

Этап контакта соединения с глюкагоном/аР2 может быть проведен, например, путем смешивания раствора, содержащего их. В альтернативе, если, например, глюкагон/аР2 или, в альтернативе, соединение, фиксировано на твердой фазе, такой как колонка, пробирка или многоруночный планшет, добавление раствора, содержащего несвязанное соединение.

Соединения, которые, как обнаружено, связываются с $\alpha P2$, глюкагоном и/или глюкагоном/ $\alpha P2$, могут быть дополнительно протестированы в бесклеточном анализе для определения способности препятствовать связыванию глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR. Например, в одном варианте осуществления связывание глюкагона/ $\alpha P2$, содержащегося в жидкой фазе или прикрепленного к твердой фазе (такой как колонка, контейнер или носитель), с GCGR может быть измерено в присутствии и отсутствии соединения, соответственно, при этом наблюдают изменение связывания в зависимости от добавления соединения для оценки ингибирующего эффекта соединения в отношении связывания глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR. Связывание глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR может быть измерено с разделением или без их разделения. Например, глюкагон/ $\alpha P2$, GCGR и глюкагон/ $\alpha P2$, связанный с GCGR (глюкагон/ $\alpha P2$:GCGR), может быть разделен с помощью метода гель-фильтрации, колоночного метода с использованием аффинной смолы, ионообменной смолы и т.д., метода центрифугирования или метода промывки. Например, количество глюкагона/ $\alpha P2$, связавшегося с GCGR, или количество глюкагона/ $\alpha P2$, не связавшегося с GCGR, может быть измерено после отделения глюкагона/ $\alpha P2$, связавшегося с GCGR, GCGR и несвязанного глюкагона/ $\alpha P2$ в жидкой фазе с помощью метода гель-фильтрации или колоночного метода (аффинная смола, ионообменная смола и т.д.). В случае фиксации глюкагона/ $\alpha P2$ на твердой фазе (такой как колонка, контейнер или носитель), твердая фаза (такая как колонка, контейнер или носитель) может быть отделена от жидкой фазы с помощью центрифугирования, промывки, распределительного разделения, осаждения и т.д., как в присутствии, так и в отсутствие соединения. В этом случае связываемое количество может быть получено непосредственно путем измерения количества GCGR, связанного с выделенной твердой фазой (такой как колонка, контейнер или носитель), или опосредованно, путем измерения количества GCGR, оставшегося в жидкой фазе, как в присутствии, так и в отсутствие соединения. GCGR в жидкой фазе может быть отделен с помощью метода иммунопреципитации при использовании белка или антитела, специфично реагирующего с GCGR, а также метода гель-фильтрации,

колоночного метода с использованием аффинной смолы, ионообменной смолы и т.д., метода центрифугирования или метода промывки. Связывающееся количество глюкагона/aP2 и GCGR может быть получено непосредственно при измерении количества выделенного глюкагона/aP2 или GCGR, или опосредованно, при измерении количества глюкагона/aP2 или GCGR, содержащегося во фракции, отделенной от фракций, содержащих связанный глюкагон/AP2 и GCGR.

В описанных выше способах количество глюкагона/aP2:GCGR и глюкагона/aP2:соединения, содержащихся в растворе, может быть измерено при использовании, например, глюкагона/aP2, меченного биотином, радиоизотопом, флуорофором, хромофором или хемилюминесцентной группой. Например, количество меченного биотином глюкагона/aP2 может быть измерено при использовании белка, способного связываться с биотином с высокой аффинностью, такого как авидин, стрептавидин или их вариант (далее именуемый авидинами), при этом авидины помечены радиоизотопом, флуорофором, люминофором или ферментом, которые можно легко детектировать, и связаны с меченым биотином соединением. Радиоактивное вещество может быть измерено при помощи обычного устройства для измерения излучения, такого как сцинтилляционный счетчик, гамма-счетчик или счетчик Гейгера-Мюллера. Флуорофор, хромофор и люминофор могут быть измерены при помощи прибора для измерения флуоресценции, абсорбциометра и прибора для измерения люминесценции, соответственно. Количество меченного ферментом соединения может быть легко измерено с помощью соединения, которое превращается ферментом в хромогенное, флуоресцентное или люминесцентное соединение.

Количество глюкагона/aP2, связавшегося или несвязавшегося, содержащегося в растворе, может быть измерено следующим образом. Например, глюкагон/aP2, меченный биотином, флуоресцентным веществом (таким как флуоресцеин), Eu-хелатом, хромофором, люминофором или радиоизотопом (таким как ^{125}I или тритий), может быть измерен так же, как указано выше. Биотинилированный глюкагон/aP2 может быть измерен методом иммунопреципитации, методом Вестерн-блоттинга, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ферментного иммуно-сорбентного

анализа: ИФА) или сэндвич-анализа, такого как радиоиммуноанализ, с использованием белка, такого как стрептавидин; антитела против глюкагона/aP2; антитела против аминокислотной последовательности, добавленной к aP2 (такой как поли-His, Мус-метка, HA-метка, Flag-метка, GST или MBP); молекулы, содержащей хелат металла против глюкагона/aP2 с добавлением поли-His; молекулы, содержащей глутатион против глюкагона/aP2 с добавлением GST; молекулы, содержащей сахар, такой как мальтозу, против глюкагона/aP2 с добавлением MBP; и т.п.

В более конкретном примере глюкагон/aP2, содержащий последовательность Мус-метки, подвергают контакту с меченым тритием GCGR при использовании 96-луночного планшета в присутствии/отсутствии соединения в присутствии антитела против Мус (мышинного моноклонального антитела) и гранулы SPA с фиксированным антителом против мышинного иммуноглобулина, и по истечении некоторого периода времени связывающееся количество глюкагона-aP2 и меченного тритием GCGR измеряют с использованием сцинтилляционного счетчика, после чего сравнивают полученные подсчитанные значения в присутствии/отсутствии соединения, в результате чего измеряют ингибирующий эффект соединения против связывания глюкагона/aP2 с GCGR.

Способ измерения ингибирующей активности соединения против связывания глюкагона/aP2 с GCGR специально не ограничен. Например, ингибирующая активность может быть измерена путем фиксации глюкагона/aP2 на твердой фазе; контакта глюкагона/aP2 с GCGR в присутствии или в отсутствие соединения; и измерения количества GCGR, связанного с глюкагоном/aP2 на твердой фазе, для измерения ингибирующей активности соединения в отношении связывания глюкагона/aP2 с GCGR. В альтернативе способ включает фиксацию GCGR на твердой фазе; контакт GCGR с глюкагоном/aP2 в присутствии или в отсутствие соединения; и измерение количества глюкагона/aP2, связанного с твердой фазой, для измерения ингибирующей активности соединения в отношении связывания глюкагона/aP2 с GCGR. Еще один альтернативный вариант включает контакт глюкагона/aP2 с GCGR в присутствии или в отсутствие соединения; и измерение количества связывания глюкагона/aP2 и

GCGR для измерения ингибирующей активности соединения против связывания глюкагона/аР2 с GCGR. Например, в любом из вышеуказанных способов связывающееся количество, полученное при контакте в присутствии соединения, можно сравнивать со связывающимся количеством, полученным при контакте в отсутствие соединения, для измерения ингибирующей активности соединения в отношении связывания глюкагона/аР2 с GCGR.

В одном варианте осуществления анализ является клеточным анализом, где в способе идентификации соединения путем измерения ингибирующей активности соединения в отношении связывания глюкагона/аР2 с GCGR используют клетку, ткань или их экстракт, содержащий GCGR. Клетка или ткань, по существу содержащая GCGR, может быть получена из любого организма и может являться любой клеткой или тканью, хотя предпочтительно является клеткой или тканью млекопитающего, в том числе клеткой или тканью человека. Клетка или ткань может быть клеткой, в которой GCGR эндогенно экспрессируется или экспрессируется в результате генно-инженерной манипуляции.

В одном варианте осуществления популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, подвергают контакту с раствором, содержащим глюкагон, аР2 и/или глюкагон/аР2, и измеряют биологическую активность GCGR в присутствии и в отсутствие соединения. Биологическая активность GCGR в общем относится к любому наблюдаемому эффекту, возникающему в результате взаимодействия между GCGR и его агонистическим партнером по связыванию, глюкагоном/аР2. Биологическая активность может быть связыванием глюкагона/аР2 с GCGR, обнаружением GCGR-опосредованной внутриклеточной передачи сигнала; или определением конечного физиологического эффекта. Репрезентативные, но не ограничивающие, примеры биологической активности GCGR при агонистической стимуляции глюкагоном/аР2 включают, без ограничения перечисленным, сигнализацию и регуляцию процессов, обсуждаемых в настоящем документе, например, ингибирование образования циклического АМФ, уменьшение гликогенолиза, снижение экспрессии глюконеогенных ферментов, в том числе фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK), фруктозо-1,6-

бисфосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы, инактивацию гликогенфосфорилазы и повышенную активность гликогенсинтазы. В одном варианте осуществления соединение является малой молекулой, лигандом, антителом, антигенсвязывающим средством или фрагментом антитела, который связывается с $\alpha P2$, глюкагоном и/или глюкагоном/ $\alpha P2$ и нейтрализует способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR. Способы измерения биологического эффекта стимуляции GCGR известны в данной области техники, и неограничивающие примеры анализов для определения биологической активности GCGR дополнительно представлены в Примере ниже и включают анализы, связанные с пониженной экспрессией глюконеогенных ферментов, в том числе фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK) фруктоза-1,6-бисфосфатазы (FBPase-1) и глюкозо-6-фосфатазы (G-6-Pase) (см. Пример 1; Фигуры 1A и 1B; Фигуры 2A, 2C и 2D), сниженной продукцией глюкозы в печени (См. Пример 1; Фигуру 1C), снижением гликогенолиза (см. Пример 1; Фигуру 1D) и ингибированием образования циклического АМФ (см. Пример 1; Фигуры 1E и 1F).

В одном неограничивающем иллюстративном примере клеточный анализ можно проводить при разных концентрациях глюкагона/ $\alpha P2$, GCGR и/или соединения для подтверждения, например, эффективности способности соединения блокировать агонистическое взаимодействие глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR. Например, как описано в пятом аспекте изобретения выше, первый клеточный анализ пятого аспекта настоящего изобретения может быть проведен следующим образом. 1 эквивалент представляющего интерес соединения добавляют к раствору клеток, экспрессирующих GCGR, в присутствии 1 эквивалента $\alpha P2$ и 1 эквивалента глюкагона. Затем активность GCGR измеряют с применением любого способа, описанного в настоящем документе или известного в данной области. В типичном варианте осуществления концентрация представляющего интерес соединения выше или равна концентрации $\alpha P2$ и глюкагона в клеточном анализе. В одном варианте осуществления концентрация представляющего интерес соединения составляет примерно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 эквивалентов, а концентрация $\alpha P2$ и глюкагона составляет примерно 1 эквивалент. Способы измерения активности GCGR в

присутствии представляющего интерес соединения включают способы, описанные в настоящем документе и обсуждаемые в статье Thomas D. Pollard "A Guide to Simple and Informative Binding Assays", MBOC; 2010; vol. 21 no. 23 4061.

В одном неограничивающем иллюстративном примере второй клеточный анализ пятого аспекта настоящего изобретения может быть проведен следующим образом. 1 эквивалент представляющего интерес соединения добавляют к раствору клеток, экспрессирующих GCGR, в присутствии 20 эквивалентов аР2 и 20 эквивалентов глюкагона. Затем активность GCGR измеряют с применением любого способа, описанного в настоящем документе или известного в данной области. В типичном варианте осуществления концентрация представляющего интерес соединения меньше концентрации аР2 и глюкагона в клеточном анализе (то есть аР2 и глюкагон присутствуют в избытке по отношению к представляемому интерес соединению). В одном варианте осуществления концентрация аР2 и глюкагона составляет примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 эквивалентов, а концентрация представляющего интерес соединения составляет 1 эквивалент.

В одном варианте осуществления эквивалентность представляющего интерес соединения по отношению к глюкагону и аР2 не известна, и вместо этого используется концентрация соединения.

В одном неограничивающем иллюстративном примере клеточные анализы шестого аспекта настоящего изобретения могут проводить следующим образом. 0,5 эквивалента представляющего интерес соединения добавляют к раствору клеток, экспрессирующих GCGR, в присутствии 1 эквивалента аР2 и 1 эквивалента глюкагона. Затем активность GCGR измеряют с применением любого способа, описанного в настоящем документе или известного в данной области. После этого анализ серийно повторяют, используя 1 эквивалент представляющего интерес соединения, затем 1,5 эквивалента, 2 эквивалента и т.д. В одном варианте осуществления вышеуказанную процедуру проводят посредством серийного разведения, начиная с наибольшей концентрации соединения и его повторного разведения с получением наименьшей концентрации.

Способы измерения активности GCGR в присутствии представляющего интерес соединения включают способы, описанные в настоящем документе и обсуждаемые в статье Thomas D. Pollard "A Guide to Simple and Informative Binding Assays", MBOC; 2010; vol. 21 no. 23 4061. В одном варианте осуществления концентрация представляющего интерес соединения изменяется логарифмически, например, 100 эквивалентов, 10 эквивалентов, 1 эквивалент и 0,1 эквивалента соединения. В другом варианте осуществления эквиваленты соединения неизвестны, и вместо этого может изменяться концентрация соединения, например, могут использоваться концентрации 100 мМ, 10 мМ, 1 мМ, 100 нМ, 10 нМ и 1 нМ.

Также предложены способы отбора соединения, например антитела, которое селективно связывается с глюкагоном/aP2 по сравнению с aP2 в отдельности. Способы идентификации предпочтительно связывающихся антител обычно известны в данной области. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ идентификации антитела, которое селективно связывает глюкагон/aP2 по сравнению с aP2, в общем включающий введение животному, не относящемуся к человеку, например кролику, мыши, крысе или козе, гетерологичного комплекса глюкагона/белка aP2, например, человеческого глюкагона/aP2, для получения антител против гетерологичного глюкагона/aP2 в комплексе, выделение указанных антител, исследование указанных антител в одном или более анализах связывания, измеряющих аффинность связывания с глюкагоном/aP2 и aP2 в отдельности, например, в анализе конкурентного связывания, в котором антитела, которые предпочтительно связывают глюкагон/aP2 по сравнению с aP2, выделяют для применения с целью нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR. Например, антитела к глюкагону/aP2 могут быть получены с использованием гибридом, получаемых с помощью стандартных методик, хорошо известных специалистам в области иммунологии. Предпочтительные способы определения специфичности и аффинности мАт с помощью конкурентного ингибирования можно найти в Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), а также Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983), которые полностью включены в настоящее описание посредством отсылки.

Линии клеток партнеров по слиянию и способы слияния и отбора гибридом и скрининга мАт хорошо известны в данной области. Глюкагон/аР2-специфичные мАт могут быть получены в больших количествах путем инъекции клеток гибридом или трансфектом, секретирующих антитело, в брюшную полость мышей и, по истечении соответствующего времени, сбора асцитной жидкости, которая содержит высокий титр мАт, и выделения из нее мАт. Для такого получения мАт *in vivo* с помощью немьшиной гибридомы (например, крысиной или человеческой), клетки гибридомы предпочтительно выращивают у облученных или бестимусных голых мышей. В альтернативе антитела могут быть получены при культивировании клеток гибридомы или трансфектомы *in vitro* и выделения секретируемого мАт из среды культивирования клеток или рекомбинантно, в эукариотических или прокариотических клетках.

Следует отметить, что способы идентификации соединений, описанные выше, считаются иллюстративными и не являются ограничивающими.

Соединения, нейтрализующие аР2 и/или комплекс глюкагона-аР2

В одном аспекте изобретения предложены способы модуляции сигнализации GCGR, которые включают введение субъекту соединения, которое нейтрализует агонистическое действие глюкагона/аР2 в отношении GCGR путем ингибирования образования комплекса глюкагона/аР2 или взаимодействия комплекса глюкагона/аР2 с GCGR посредством прямого направленного воздействия на глюкагон/аР2, глюкагон или аР2, эффективно нейтрализуя способность глюкагона/аР2 стимулировать GCGR. В одном варианте осуществления соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством против аР2 и/или против комплекса глюкагона/аР2, включающим, например моноклональное антитело, фрагмент антитела или

антигенсвязывающее средство. В одном варианте осуществления соединение является гуманизированным моноклональным антителом или антигенсвязывающим средством. В одном варианте осуществления антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающее средство предпочтительно связывается с глюкагоном/aP2 по сравнению с aP2 и глюкагоном. В одном варианте осуществления антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающее средство предпочтительно связывается с глюкагоном/aP2 по сравнению с aP2 и глюкагоном. В одном варианте осуществления антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающее средство не связывается с GCGR.

Способы получения антител, фрагментов антитела или антигенсвязывающих средств известны в уровне техники. См., например, US2011/0129464. Например, поликлональные антитела предпочтительно индуцируют у животных путем многократных, подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта, например, aP2, глюкагона или, предпочтительно, глюкагона в комплексе с aP2 (глюкагона/aP2). Может быть предпочтительным конъюгирование соответствующего антигена с белком, который является иммуногенным в иммунизируемых видах, например, гемоцианином большого морского блюдечка *Megathura crenulata*, сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои, при использовании бифункционального или дериватизирующего агента, например, сложного эфира малеимидобензоил сульфосукцинимиды (конъюгирование через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимиды (конъюгирование через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 , $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R₁ являются разными алкильными группами.

Например, животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или их производных, объединяя, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с тремя объемами полного адъюванта Фрейнда и производя инъекции полученного раствора внутрикожно в разные участки. Через один месяц животных подвергают вторичной иммунизации путем введения от $1/5$ до $1/10$ исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда в подкожных

инъекциях в разные участки. Через 14 дней у животных производят забор крови и исследуют сыворотку для определения титра антител. Животных подвергают повторной иммунизации до тех пор, пока титр антител не перестанет расти. Предпочтительно животных повторно иммунизируют конъюгатом того же антигена, но конъюгированного с другим белком и/или с помощью другого сшивающего агента. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в форме слитых белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа предпочтительно могут использоваться агрегирующие вещества, такие как алюминиевые квасцы.

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в малых количествах. Таким образом, определение "моноклональный" указывает на то, что антитело не является смесью разных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены при использовании гибридного метода, впервые описанного Келером с соавт. (Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)), или могут быть получены с помощью технологии рекомбинантных ДНК (патент США 4,816,567). В методе гибридом мышь или другое подходящее животное, например хомяка, иммунизируют, как описано выше, для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфично связываются с белком, используемым для иммунизации. В альтернативе лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты подвергают слиянию с клетками миеломы при использовании подходящего агента, вызывающего слияние клеточных мембран, такого как полиэтиленгликоль, с получением клетки гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Клетки гибридом, полученные таким образом, сеют и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, ингибирующих рост и выживание неслитых, исходных клеток миеломы. Например, если исходные клетки миеломы не имеют фермента гипоксантин-

гуанинфосфорибозилтрансферазы (ГГФТ или ГФТ), в культуральную среду для роста гибридомных клеток обычно добавляют гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ), которые препятствуют росту ГГФТ-дефицитных клеток.

Предпочтительными миеломными клетками являются такие клетки, которые эффективно подвергаются слиянию, поддерживают стабильно высокий уровень продукции антител отобранными антителопродуцирующими клетками и чувствительны к среде, такой как среда НАТ. Из таких клеток предпочтительными линиями клеток миеломы являются линии клеток миеломы мыши, такие как полученные из мышинных опухолей МОРС-21 и МРС-11, доступных в Клеточном центре Института Солка (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA), и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, которые могут быть получены в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA). Человеческие миеломные и мышинные-человеческие гетеромиеломные клеточные линии также были описаны для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); and Brodeur et. al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, исследуют на продукцию моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, например, радиоиммуноанализа (РИА) или иммуноферментного анализа (ИФА).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть, например, определена с помощью анализа Скэтчарда, описанного в публикации Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После идентификации клеток гибридом, продуцирующих антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут субклонировать методом предельного разведения и выращивать при использовании стандартных методов (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press,

1986)). Подходящая культуральная среда для этих целей включает, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридом могут выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей в организме животного.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, выделяют из среды культивирования, асцитной жидкости или сыворотки с применением стандартных методик очистки антител, таких как, например, белка А-сефарозы, хроматографии на гидроксипатите, гель-электрофореза, диализа или аффинной хроматографии.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, выделяют и секвенируют с помощью стандартных методик (например, при использовании олигонуклеотидных зондов, способных специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые или легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридом служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения, ДНК могут вводить в векторы экспрессии, которыми затем трансформируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, которые в иных условиях не продуцируют белки антител, для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи, посвященные рекомбинантной экспрессии ДНК, кодирующей антитела, в бактериях включают публикации Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

В другом варианте осуществления моноклональные антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, полученных с применением методик, описанных в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). В публикациях Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) описано выделение мышинных и человеческих антител, соответственно, с использованием фаговых библиотек. В следующих публикациях описано получение высокоаффинных (нМ диапазона) человеческих антител путем перестановки цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторное инфицирование и рекомбинация *in vivo* в качестве стратегии для конструирования очень больших

фаговых библиотек (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методики являются достойными альтернативами традиционным методам получения моноклональных антител с применением гибридной технологии для выделения моноклональных антител.

ДНК также может быть модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности человеческими константными доменами тяжелой и легкой цепи вместо гомологичных мышиных последовательностей (патент США 4,816,567; и Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)] или путем ковалентного соединения с последовательностью, кодирующей иммуноглобулин, всей или части последовательности, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид.

Как правило, такие неиммуноглобулиновые полипептиды используют вместо константных доменов антитела или переменных доменов антигенсвязывающего участка антитела с целью создания химерного бивалентного антитела, включающего один антигенсвязывающий участок, обладающий специфичностью в отношении одного антигена, и другой антигенсвязывающий участок, обладающий специфичностью в отношении другого антигена.

Способы гуманизации нечеловеческих антител были описаны в уровне техники. Предпочтительно, гуманизированное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который имеет нечеловеческое происхождение. Такие нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют "импортированными" остатками, которые обычно получают из "импортированного" переменного домена. Гуманизация по существу может быть выполнена согласно способу, предложенному Уинтером с сотрудниками (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей гиперпеременных областей соответствующими последовательностями человеческого антитела. Таким образом, подобные "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (патент США 4,816,567), в которых существенно меньше чем интактный человеческий переменный домен был заменен

соответствующей последовательностью из не относящегося к человеку вида. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и возможно некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных участков в антителах грызунов.

Выбор человеческих вариабельных доменов, как легкой, так и тяжелой цепей, которые предполагают использовать для получения гуманизированных антител, очень важен для уменьшения антигенности. Согласно так называемому методу "наилучшего соответствия", последовательность вариабельного домена антитела грызуна подвергают скринингу против полной библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных доменов. Человеческая последовательность, наиболее близкая к последовательности грызуна, затем используется в качестве человеческой каркасной области (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). В другом способе используют определенную каркасную область, полученную на основе консенсусной последовательности всех человеческих антител определенной подгруппы легких и тяжелых цепей. Одна и та же каркасная последовательность может использоваться для получения различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности в отношении антигена и других ценных биологических свойств. Для достижения этой цели, согласно предпочтительному способу, гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов при использовании трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и хорошо известны специалистам в данной области. Также доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры

выбранных последовательностей кандидатных иммуноглобулинов. Просмотр таких изображений позволяет выполнять анализ вероятной роли остатков в функционировании последовательности кандидатных иммуноглобулинов, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связываться со своим антигеном. Таким образом, FR остатки могут быть отобраны и скомбинированы из реципиентных и "импортированных" последовательностей, в результате чего получают требуемые свойства антител, такие как повышенную аффинность в отношении антигена(ов)-мишени(ей). Как правило, остатки гипервариабельных областей непосредственно и наиболее существенно влияют на связывание антигена. Рассматриваются различные формы гуманизированного антитела или антитела с созревшей аффинностью. Например, гуманизированное антитело или антитело с созревшей аффинностью может быть фрагментом антитела, таким как Fab, который необязательно конъюгирован с одним или более цитотоксическими средствами, с получением иммуноконъюгата. В альтернативе гуманизированное антитело или антитело с созревшей аффинностью может быть интактным антителом, таким как интактное IgG1 антитело.

В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены человеческие антитела. Например, в настоящее время стало возможным получение трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации способны синтезировать полный репертуар антител человека при отсутствии эндогенной продукции иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена соединительной области тяжелой цепи (JH) у химерных и мутантных по генам зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антител. Перенос генов зародышевой линии иммуноглобулинов человека таким мутантным по генам зародышевой линии мышам приводит к продукции человеческих антител при соответствующей иммунизации антигеном. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); и патенты США 5,591,669, 5,589,369 и 5,545,807.

В альтернативе технология фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) может использоваться для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro*, на основе репертуара генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов иммунизированных доноров. В соответствии с этой технологией гены V-домена антитела клонируют в единой рамке считывания с генами большого и малого белков оболочки нитчатого фага, например, M13 или fd, при этом функциональные фрагменты антител экспонируются на поверхности фаговой частицы. Поскольку натчатая частица содержит копию одноцепочечной ДНК фагового генома, отборы на основе функциональных свойств антитела также приводят к отбору гена, кодирующего антитело, демонстрирующее такие свойства. Таким образом, бактериофаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговый дисплей можно проводить в различных форматах; соответствующий обзор см., например, в Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993). Для фагового дисплея могут использоваться несколько источников сегментов V-генов. Клэксон с соавт. (Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)) выделили набор разнообразных антител против оксазолна из небольшой рандомизированной комбинаторной библиотеки V-генов, полученной из селезенки иммунизированных мышей. Может быть сконструирован репертуар V-генов иммунизированных доноров, при этом антитела к набору разнообразных антигенов (в том числе аутоантигенов) могут быть выделены по существу согласно методикам, описанным в публикациях Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), or Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Также см. патенты США 5,565,332 и 5,573,905.

Как обсуждали выше, человеческие антитела также могут быть продуцированы *in vitro* активированными В-клетками (см. патенты США 5,567,610 и 5,229,275).

Для получения фрагментов антител были разработаны различные технологии. Обычно такие фрагменты получают путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)).

Однако в настоящее время фрагменты антител могут быть получены напрямую при использовании рекомбинантных клеток-хозяев. Например, фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. В альтернативе Fab'-SH фрагменты могут быть выделены из *E. coli* и соединены химически с получением F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу, F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методики получения фрагментов антител будут известны специалисту в данной области. В других вариантах осуществления предпочтительным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патент США 5,571,894 и патент США 5,587,458. Фрагмент антитела может быть "линейным антителом", например, как описано в патенте США 5,641,870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

Методики создания антител были описаны выше. При необходимости также можно отбирать антитела с определенными биологическими свойствами, например, предпочтительным связыванием с комплексом глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и/или глюкагоном/и/или GCGR.

Для определения антитела, которое ингибирует агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с рецептором GCGR, можно определять способность антитела к лиганду глюкагону/aP2 связываться с клетками, экспрессирующими GCGR. Например, клетки, естественно экспрессирующие или трансфицированные для экспрессии рецепторов GCGR, можно инкубировать с антителом и затем подвергать контакту с меченым глюкагоном/aP2. При этом можно оценивать способность антитела против глюкагона/aP2 блокировать связывание с GCGR.

Например, ингибирование связывания глюкагона/aP2 с GCGR в гепатоцитах моноклональными антителами против глюкагона/aP2 может быть выполнено при использовании монослойных культур гепатоцитов во льду в формате 24-луночного планшета. Моноклональные антитела против глюкагон/aP2 можно добавлять в каждую лунку и инкубировать в течение 30 минут. Затем может быть добавлен ¹²⁵I-меченный глюкагон или aP2 или глюкагон/aP2, и

инкубирование может быть продолжено в течение 4-16 часов. Кривые зависимости дозы-эффекта могут быть построены, и вычислено значение IC₅₀ может представляющего интерес антитела. В одном варианте осуществления антитело, которое блокирует активацию лигандом рецептора GCGR, будет иметь IC₅₀ для ингибирования связывания глюкагона/aP2 с клетками гепатоцитов в этом анализе приблизительно 50 нМ или меньше, более предпочтительно 10 нМ или меньше. Если антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fab-фрагмент, IC₅₀ для ингибирования связывания глюкагона/aP2 с GCGR на клетках гепатоцитов в этом анализе может, например, составлять приблизительно 100 нМ или меньше, более предпочтительно 50 нМ или меньше.

В альтернативе или дополнительно может быть оценена способность антитела против глюкагона/aP2 блокировать стимулируемую лигандом глюкагоном/aP2 продукцию цАМФ через GCGR. Например, клетки, эндогенно экспрессирующие GCGR или трансфицированные для экспрессии GCGR, можно инкубировать с антителом и затем исследовать на глюкагон/aP2 лиганд-зависимую активность цАМФ.

В одном варианте осуществления вводимые антитела и фрагменты содержат легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие переменную область, где указанная переменная область включает одну, две или три CDR, независимо выбранные из Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8 и Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12 и Seq. ID No. 13. В альтернативе одна или более раскрытых и выбранных CDR-областей могут быть изменены путем замены одной или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот), которая не оказывает негативное влияние или которая улучшает свойства антитела или антигенсвязывающего средства, как далее описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления выбранную CDR-область (и) помещают в каркасную область иммуноглобулина человека. В одном варианте осуществления каркасная область иммуноглобулина человека дополнительно модифицирована или изменена для сохранения специфичности аффинности связывания

перевитой CDR-области.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающее средство вводят субъекту, где антитело включает по меньшей мере одну или больше одной из CDR-областей, представленных в Таблице 2.

Таблица 2: Определяющие комплементарность области антитела против аР2/комплекса белка аР2-глюкагона

Белок	Seq. ID No.	Последовательность
CDRL1	7	QASEDISRYLV
CDRL1 вариант 1	22	SVSSSISSSNLH
CDRL2	8	KASTLAS
CDRL2 вариант 1	23	GTSNLAS
CDRL3	9	QCTYGTAGSFFYS
CDRL3 вариант 1	10	QATYGTAGSFFYS
CDRL3 вариант 2	11	QQTYGTAGSFFYS
CDRL3 вариант 3	12	QHTYGTAGSFFYS
CDRL3 вариант 4	13	QQASHYPLT
CDRL3 вариант 5	24	QQWSHYPLT
CDRH1	14	GFSLSTYYMS
CDRH1 вариант 1	15	GYTFTSNAIT
CDRH1 вариант 2	25	GYTFTSNWIT
CDRH2	16	IIYPSGSGTYCASWAKG
CDRH2 вариант 1	17	IIYPSGSGTYSASWAKG
CDRH2 вариант 2	18	DISPGSGSTTNNEKFKS
CDRH2 вариант 3	26	DIYPSGSGSTTNNEKFKS
CDRH3	19	PDNDGTSGYLSGFGL
CDRH3 вариант 1	20	PDNEGTSYLSGFGL
CDRH3 вариант 2	21	LRGFYDYFDF
CDRH3 вариант 3	27	LRGYDYFDF

В одном варианте осуществления нейтрализующее антитело к глюкагону/аР2 или антигенсвязывающий фрагмент является моноклональным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, включающим легкую цепь, где переменный домен включает одну, две или три CDR, независимо выбранные из CDRL1 (QASEDISRYLV) (Seq. ID No. 7), CDRL1 варианта 1 (SVSSSISSSNLH) (Seq. ID No. 22), CDRL2 (KASTLAS) (Seq. ID No. 8), CDRL2 варианта 1 (GTSNLAS) (Seq. ID No. 23), CDRL3 (QCTYGTAGSFFYS) (Seq. ID No. 9), CDRL3 варианта 1 (QATYGTAGSFFYS) (Seq. ID No. 10), CDRL3 варианта 2 (QQTYGTAGSFFYS) (Seq. ID No. 11), CDRL3 варианта 3

(QHTYGTYAGSFFYS) (Seq. ID No. 12), CDRL3 варианта 4 (QQASHYPLT) (Seq. ID No. 13) или CDRL3 варианта 5 (QQWSHYPLT) (Seq. ID No. 24). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8) и CDRL3 (Seq. ID No. 9). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8) и CDRL3 вариант 1 (Seq. ID No. 10). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8) и CDRL3 вариант 2 (Seq. ID No. 11). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8) и CDRL3 вариант 3 (Seq. ID No. 12).

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL3 вариант 4 (Seq. ID No. 13), где антитело имеет K_d приблизительно $\geq 10^{-7}$ М. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL1 вариант 1 (Seq. ID No. 22), CDRL2 вариант 1 (Seq. ID No. 23) и CDRL3 вариант 4 (Seq. ID No. 13). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает переменную область легкой цепи, включающую CDRL3 вариант 4 (Seq. ID No. 13), и переменную область тяжелой цепи, включающую CDRH1 вариант 1 (GYTFTSNAIT) (Seq. ID No. 15), CDRH2 вариант 2 (DISPGSGSTTNNEKFKS) (Seq. ID No. 18) и, в одном варианте осуществления, CDRH3 вариант 2 (LRGFYDYFDF) (Seq. ID No. 21).

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает одну, две или три CDR, выбранные из CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 вариант 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 вариант 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 вариант 3 (Seq. ID No. 12) и CDRL3

вариант 4 (Seq. ID No. 13), и имеет K_d приблизительно $\geq 10^{-7}$ М. В одном варианте осуществления CDR-последовательности, определенные выше, перевиты в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена, например, в зоне Верньер, для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает легкую цепь, где переменный домен включает одну, две или три CDR, независимо выбранные из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% гомологична с CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 вариантом 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 вариантом 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 вариантом 3 (Seq. ID No. 12) или CDRL3 вариантом 4 (Seq. ID No. 13). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство имеет K_d приблизительно $\geq 10^{-7}$ М. В одном варианте осуществления CDR-последовательности, определенные выше, перевиты в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена, например, в зоне Верньер, для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает легкую цепь, где переменный домен включает одну, две или три CDR, независимо выбранные из аминокислотной последовательности, которая имеет одну или более (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, вставок или делеций по сравнению с CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 вариантом 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 вариантом 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 вариантом 3 (Seq. ID No. 12) или CDRL3 вариантом 4 (Seq. ID No. 13).

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает легкую цепь, где

вариабельный домен включает одну, две или три CDR, выбранные из CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 варианта 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 варианта 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 варианта 3 (Seq. ID No. 12) или CDRL3 варианта 4 (Seq. ID No. 13), и одну, две или три CDR, выбранные из CDRH1 (GFSLSTYYMS) (Seq. ID No. 14), CDRH1 варианта 1 (Seq. ID No. 15), CDRH1 варианта 2 (GYTFTSNWIT) (Seq. ID No. 25), CDRH2 (IIYPSGSTYCASWAKG) (Seq. ID No. 16), CDRH2 варианта 1 (IIYPSGSTYSASWAKG) (Seq. ID No. 17), CDRH2 варианта 2 (Seq. ID No. 18), CDRH2 варианта 3 (DIYPSGSGSTTNNEKFKS) (Seq. ID No. 26), CDRH3 (PDNDGTSGYLSGFGL) (Seq. ID No. 19), CDRH3 варианта 1 (PDNEGTSYLSGFGL) (Seq. ID No. 20), CDRH3 варианта 2 (Seq. ID No. 21) или CDRH3 варианта 3 (LRGYDYDFDFW) (Seq. ID No. 27). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDRH1 вариант 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 вариант 2 (Seq. ID No. 18) и CDRH3 вариант 3 (Seq. ID No. 27). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDRH1 вариант 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 вариант 2 (Seq. ID No. 18) и CDRH3 вариант 2 (Seq. ID No. 21). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство имеет K_d приблизительно $\geq 10^{-7}$ М. В одном варианте осуществления CDR-последовательности, определенные выше, перевиты в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена, например, в зоне Верньер, для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает одну, две или три CDR, выбранные из CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 варианта 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 варианта 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 варианта 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 варианта 1 (Seq. ID No. 20) или CDRH3 варианта 2 (Seq. ID

№. 21), и имеет KD приблизительно $\geq 10^{-7}$ М. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает CDR-области CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH2 (Seq. ID No. 16) и CDRH3 (Seq. ID No. 19). В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает CDR-области CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH2 вариант 1 (Seq. ID No. 17) и CDRH3 вариант 1 (Seq. ID No. 20). В одном варианте осуществления антитело включает CDR-области CDRH1 вариант 1 (Seq. ID No. 15) и CDRH2 вариант 2 (Seq. ID No. 18). В одном варианте осуществления антитело включает CDR-области CDRH1 вариант 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 вариант 2 (Seq. ID No. 18) и CDRH3 вариант 2 (Seq. ID No. 21). В одном варианте осуществления CDR-последовательности, определенные выше, перевиты в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена, например, в зоне Верньер, для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает одну, две или три CDR, выбранные из аминокислотной последовательности, которая имеет одну или более (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных замен, вставок или делеций по сравнению с CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 вариантом 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 вариантом 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 вариантом 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 вариантом 1 (Seq. ID No. 20) или CDRH3 вариантом 2 (Seq. ID No. 21).

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство включает тяжелую цепь, где переменный домен включает одну, две или три CDR, выбранные из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90% или 95% гомологична с CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 вариантом 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 вариантом 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 вариантом 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 вариантом 1 (Seq. ID No. 20) или CDRH3 вариантом 2 (Seq. ID No. 21). В одном варианте

осуществления антитело или антигенсвязывающее средство имеет K_d приблизительно $\geq 10^{-7}$ М. В одном варианте осуществления CDR-последовательности, определенные выше, перевиты в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена, например, в зоне Верньер, для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области.

CDR-области могут быть изменены или модифицированы для обеспечения улучшенной аффинности связывания, минимизации потери аффинности связывания при перевивании в другой каркас или уменьшения нежелательных взаимодействий между CDR и гибридной каркасной областью, как дополнительно описано ниже.

В одном аспекте настоящего изобретения антитела и фрагменты для введения гуманизированы.

Конструирование CDR-перевитых антител в общем виде описано в европейской заявке на патент EP 0239400, в которой раскрыт процесс, в котором CDR-области моноклонального антитела мыши перевиты на каркасные области переменных доменов человеческого иммуноглобулина с помощью сайт-направленного мутагенеза при использовании длинных олигонуклеотидов, и включено в настоящее описание. CDR-области определяют антигенсвязывающую специфичность антител и являются относительно короткими пептидными последовательностями, расположенными на каркасных областях переменных доменов.

Классификация подсемейства зародышевой линии тяжелой и легкой цепи человека может быть получена на основе обозначений подгрупп зародышевой линии согласно Кэбату: VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6 или VH7 для конкретной последовательности VH и JH1, JH2, JH3, JH4, JH5 и JH6 для конкретной соединительной группы переменной области тяжелой цепи для каркасной области 4; VK1, VK2, VK3, VK4, VK5 или VK6 для конкретной последовательности каппа VL для каркасной области 1, 2 и 3, и JK1, JK2, JK3, JK4 или JK5 для конкретной соединительной группы каппа цепи для каркасной области 4; или VL1, VL2, VL3, VL4, VL5, VL6, VL7, VL8,

VL9 или VL10 для конкретной последовательности VL лямбда цепи для каркасной области 1, 2 и 3, и JL1, JL2, JL3 или JL7 для конкретной соединительной группы лямбда цепи для каркасной области 4.

Общая структура легкой цепи включает структуры, выбранные из FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4 и FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4-CL, и их варианты, где CDR-области выбраны по меньшей мере из одной вариабельной CDR легкой цепи, выбранной из Seq. ID No. 7-13, каркасные области выбраны либо из каркасной области вариабельной каппа легкой цепи иммуноглобулина, либо из каркасной области вариабельной лямбда легкой цепи иммуноглобулина, и константная область легкой цепи иммуноглобулина выбрана из константной области каппа легкой цепи, когда каркасная область является каркасной областью вариабельной каппа легкой цепи, или из константной области лямбда легкой цепи, когда каркасная область является каркасной областью вариабельной лямбда легкой цепи.

В одном варианте осуществления общая структура областей тяжелой цепи, рассматриваемых в настоящем документе, включает структуры, выбранные из FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-шарнир-CH2 для иммуноглобулина классов IgG, IgD и IgA и FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-CH2 для иммуноглобулина классов IgM и IgE, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-шарнир-CH2-CH3 для иммуноглобулина классов IgG, IgD и IgA, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-CH2-CH3 для иммуноглобулина классов IgM и IgE и FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-CH2-CH3-CH4 для иммуноглобулина классов IgM и IgE, а также их варианты, где CDR-области выбраны по меньшей мере из одной CDR вариабельной тяжелой цепи, выбранной из Seq. ID No. 14-21, и каркасные области выбраны из каркасных областей вариабельной тяжелой цепи и константных областей тяжелой цепи. Классы IgA и IgM могут дополнительно включать соединительный полипептид, который служит для связывания двух мономерных единиц IgM или IgA вместе, соответственно. В случае IgM, соединенный J-цепью димер является нуклеирующей единицей для пентамера IgM, а

в случае IgA он индуцирует более крупные полимеры.

Домены константной области молекулы антитела для введения, если таковые присутствуют, могут быть выбраны с учетом предполагаемой функции молекулы антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены константной области могут быть доменами IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В конкретных вариантах осуществления могут использоваться домены константной области человеческого IgG, в особенности изотипов IgG1 и IgG3, если молекула антитела предназначена для терапевтического применения и требуются эффекторные функции антитела. В альтернативе изотипы IgG2 и IgG4 могут использоваться, если молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не требуются.

В одном варианте осуществления вводимое антитело включает переменную легкую цепь, выбранную из Seq. ID No. 28-36 или 37-40 (Таблица 3 ниже). В одном варианте осуществления вводимое антитело включает переменную тяжелую цепь, выбранную из Seq. ID No. 41-51 (Таблица 4 ниже). В одном варианте осуществления вводимое антитело включает переменную легкую цепь, выбранную из Seq. ID No. 28-36 или 487-490 и/или переменную тяжелую цепь, выбранную из Seq. ID No. 41-51, или последовательность антитела, которая на 80% сходна или более идентична Seq. ID No. 28-36, 37-40, и/или переменную тяжелую цепь, выбранную из Seq. ID No. 41-51, например, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с частью или всей соответствующей последовательностью, например, последовательность переменной области, CDR-последовательность или последовательность переменной области, кроме CDR-областей.

Таблица 3. Последовательности гуманизированных областей легкой цепи против aP2/глюкагона/aP2 белкового комплекса

Белок	Seq. ID No.	Последовательность
VL-область Ат 909 кролика	28	DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASEDISRYLVWYQQKPGQPPKRLIYKASTLASGVPSRFRKSGSGTDFTLTISDLCDAAATYYCQCTYGTYAGSFFYSEFGGTEVVVE

VL-область 909 gL1	29	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
VL+CL-область 909 gL1	30	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VL-область 909 gL10	31	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
VL+CL-область 909 gL10	32	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VL-область 909 gL54	33	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
VL+CL-область 909 gL54	34	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VL-область 909 gL55	35	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
VL+CL-область 909 gL55	36	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VL-область 909 gL13	37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
VL+CL-область 909 gL13	38	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VL-область 909 gL50	39	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYAQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
VL+CL-область 909 gL50	40	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQKPGKAPKRLIIYKASTLASGVPSRFKGSQSGTDFTLTISSLQPEDFATYYAQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 4. Последовательности гуманизированных областей тяжелой цепи к α P2/глюкагон/ α P2 белковому комплексу

Белок	Seq. ID No.	Последовательность
VH-область Ат 909 кролика	41	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYYMSWVRQAPGKGL EWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTTVDLKITSPTTEDTA TYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGLTVTVSS

909gH1 VH- область	42	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCTVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTTVDLKLSSVTAADT ATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVTVSS
VH+человеческая γ-4Р константная область 909gH1 IgG4	43	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCTVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTTVDLKLSSVTAADT ATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK SLSLSLGK
VH-область 909gH14	44	EVQLQESGPG LVKPSGTLSTCAVSGFSLSTYYMSWVRQP PGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTKNTVDLKLSS VTAADTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVTVSS
VH+человеческая γ-4Р константная область 909gH14 IgG4	45	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTKNTVDLKLSSVTAA DTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK
VH-область 909 gH15	46	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCTVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRFTISKASTKNTVDLKLSSVTAA DTATYFCARPDNEGTSYLSGFGLWGQGTLVTVSS
VH+человеческая γ-4Р константная область 909gH15 IgG4	47	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCTVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRFTISKASTKNTVDLKLSSVTAA DTATYFCARPDNEGTSYLSGFGLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK
VH-область 909 gH61	48	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVTVSS
VH+человеческая γ-4Р константная область 909gH61 IgG4	49	EVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK

VH-область 909gH62	50	EVQLQESGPGGLVKPSGTLSTLCAVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCARPDNEGTSGYLSGFGFWGQGTTLVTVSS
VH+человеческая γ-4P константная область 909gH62 IgG4	51	EVQLQESGPGGLVKPSGTLSTLCAVSGFSLSTYYMSWVRQPPGKG LEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAA DTAVYYCARPDNEGTSGYLSGFGFWGQGTTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK

В одном варианте осуществления вводимая молекула антитела является Fab, Fab' или F(ab')₂ фрагментом антитела, включающим переменную область легкой цепи, выбранную из Seq. ID No. 29, 31, 37, 38, 33 или 35, и переменную область тяжелой цепи, выбранную из Seq. ID No. 42, 44, 46, 48 или 50.

В одном варианте осуществления молекула антитела согласно настоящему описанию является полноразмерным антителом IgG1, включающим переменные области, показанные в Seq. ID No. 29, 31, 37, 38, 33 или 35 для легкой цепи и Seq. ID No. 42, 44, 46, 48 или 50 для тяжелой цепи.

В одном варианте осуществления молекула антитела согласно настоящему описанию является полноразмерным антителом IgG4, включающим переменные области, показанные в Seq. ID No. 29, 31, 37, 38, 33 или 35 для легкой цепи и Seq. ID No. 42, 44, 46, 48 или 50 для тяжелой цепи.

В одном варианте осуществления молекула антитела согласно настоящему описанию является полноразмерным антителом IgG4P, включающим переменные области, показанные в Seq. ID No. 29, 31, 37, 38, 33 или 35 для легкой цепи и Seq. ID No. 42, 44, 46, 48 или 50 для тяжелой цепи.

В одном варианте осуществления вводимый слитый белок включает два доменных антитела, например, в виде переменной тяжелой (VH) и переменной легкой (VL) пары, необязательно связанной дисульфидной связью.

Вводимый фрагмент антитела может включать Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, диатело, scFAB, dFv, однодоменные антитела легкой цепи, dsFv, пептид, включающий CDR, и т.п.

Способы лечения нарушений, связанных с агонистическим воздействием на GCGR

Предложены способы нейтрализации агонистического воздействия комплекса глюкагона/aP2 (глюкагона/aP2) на GCGR в печени, где он регулирует продукцию глюкозы в печени, на почке, и на островковых β -клетках, отражая его роль в глюконеогенезе, гладкой мускулатуре кишечника, головном мозге и жировой ткани. Из-за заметной роли, которую комплекс глюкагона/aP2 играет в индукции выработки глюкозы в печени при агонистическом воздействии на GCGR, нейтрализация, полная или частичная, агонистического взаимодействия с GCGR позволяет модулировать тяжесть первичных состояний и нарушений, ассоциированных с дисрегуляцией стимуляции GCGR. В одном варианте осуществления соединение, которое препятствует образованию комплекса глюкагона/aP2 или способности комплекса глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, вводят субъекту, имеющему первичное состояние или нарушение, ассоциированное с избыточной или разрегулированной стимуляцией GCGR. В одном варианте осуществления моноклональное антитело, описанное в настоящем документе, применяется для нейтрализации способности глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR.

Антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка aP2, в том числе гуманизированное антитело против комплекса глюкагона/белка aP2, антигенсвязывающее средство или связывающие фрагменты антитела, могут применяться для лечения метаболических нарушений, связанных с дисрегуляцией сигнализации глюкагона, приводящих к хроническим повышенным уровням глюкозы в крови, включающих, без ограничения перечисленными, диабет (I типа и II типа), ожирение и неалкогольную жировую болезнь печени (НЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), нарушения обмена веществ, сердечно-сосудистые заболевания, атеросклероз, фиброз, цирроз, гепатоцеллюлярную карциному, инсулинорезистентность, дислипидемию, гипергликемию, гиперглюканемию, гиперинсулинемию.

Например, антитело против комплекса глюкагона/белка аР2, антигенсвязывающее средство или связывающие фрагменты антитела, описанные в настоящем документе, способны связываться с секретлируемым аР2 и/или комплексом глюкагона/белка аР2 с низкой аффинностью связывания, которые при введении нуждающемуся в этом реципиенту нейтрализуют активность глюкагонового рецептора и обеспечивают более низкие уровни глюкозы в крови натошак, улучшают системный метаболизм глюкозы, повышают системную чувствительность к инсулину, уменьшают жировую массу, стеатоз печени, улучшают профили липидов в сыворотке и/или снижают образование атерогенных бляшек у реципиента.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения, вызванного дисрегуляцией активности глюкагона, приводящего к отклоняющемуся от нормы уровню избыточной глюкозы в крови реципиента, путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2. В одном варианте осуществления нарушение является нарушением обмена веществ. В одном варианте осуществления нарушение является диабетом. В одном варианте осуществления нарушение является диабетом I типа. В одном варианте осуществления нарушение является диабетом II типа. В одном варианте осуществления нарушение является гипергликемией. В одном варианте осуществления нарушение является ожирением. В одном варианте осуществления нарушение является дислипидемией. В одном варианте осуществления нарушение является неалкогольной жировой болезнью печени (НЖБП). В одном варианте осуществления нарушение является неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ).

Диабет

Сахарный диабет является наиболее распространенным нарушением обмена веществ во всем мире. Ежедневно в США диагностируют 1700 новых случаев диабета, при этом по меньшей мере одна треть из 16 миллионов жителей США, больных диабетом, не знают о нем. Диабет – главная причина слепоты, почечной недостаточности и ампутаций нижних конечностей у взрослых и является главным фактором риска возникновения сердечно-

сосудистого заболевания и инсульта.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения диабета путем введения реципиенту эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2. В одном варианте осуществления нарушением является диабет I типа. В одном варианте осуществления нарушением является диабет II типа.

Диабет I типа развивается в результате аутоиммунного разрушения бета-клеток поджелудочной железы, что приводит к дефициту инсулина. Сахарный диабет II типа или инсулиннезависимый сахарный диабет (NIDDM) является причиной >90% случаев и характеризуется устойчивостью к действию инсулина на захват глюкозы в периферических тканях, особенно в скелетных мышцах и адипоцитах, нарушением ингибирования инсулином продукции глюкозы в печени и нарушенной секрецией инсулина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ лечения диабета I типа у реципиента путем введения реципиенту эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2, в комбинации или поочередно с инсулином. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ лечения диабета I типа у реципиента путем введения реципиенту эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2, в комбинации или поочередно с синтетическим аналогом инсулина.

Некоторые люди, страдающие диабетом II типа, могут достигать целевого уровня сахара в крови с помощью диеты и физических упражнений, но многие также нуждаются в лекарственной терапии диабета или инсулиновой терапии. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в настоящем документе предложен способ лечения диабета типа II у реципиента путем введения реципиенту эффективного количества антитела,

антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с диабетом, путем введения реципиенту эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2. Заболевания и состояния, связанные с сахарным диабетом, могут включать, без ограничения перечисленными, гипергликемию, гиперинсулинемию, гиперлипидемию, инсулинорезистентность, нарушение метаболизма глюкозы, ожирение, диабетическую ретинопатию, макулодистрофию, катаракту, диабетическую нефропатию, гломерулосклероз, эректильную дисфункцию, предменструальный синдром, сосудистый рестеноз и язвенный колит. Кроме того, заболевания или состояния, связанные с сахарным диабетом, включают, без ограничения перечисленными: ишемическую болезнь сердца, артериальную гипертензию, стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, заболевания кожи и соединительной ткани, язвы стопы, метаболический ацидоз, артрит, остеопороз и, в частности, состояния нарушения толерантности к глюкозе.

Нарушения массы тела

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения ожирения вследствие дисрегуляции активности глюкагона у реципиента путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2. Ожирение представляет собой наиболее распространенное нарушение массы тела, поражающее примерно 30–50% населения среднего возраста в западных странах.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения ожирения у реципиента путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка аР2. В одном варианте осуществления предложен способ уменьшения или ингибирования увеличения веса,

вызванного дисрегуляцией активности глюкагона у реципиента, путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП)

Существует потребность в композициях и способах лечения и профилактики развития жирового гепатоза и состояний, обусловленных жировым гепатозом, таких как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), воспаление печени, цирроз и печеночная недостаточность, вызванные дисрегуляцией глюкагона и хронической гипергликемией. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения НЖБП у реципиента путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$.

Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ)

Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), который является распространенной формой неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП), относится к накоплению гепатостеатоза не из-за избыточного употребления алкоголя. НАСГ – заболевание печени, характеризующееся воспалением печени с параллельным накоплением жира. НАСГ часто также обнаруживается у больных диабетом и ожирением и связан с метаболическим синдромом. НАСГ является прогрессирующей формой относительно доброкачественной неалкогольной жировой болезни печени, поскольку он может медленно ухудшаться, вызывая накопления фиброза в печени, которое приводит к циррозу (см. обзор Smith et al., (2011), Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 48(3):97-113). В настоящее время одобренных методов лечения НАСГ не существуют.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения НАСГ у реципиента путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$.

Глюкагонома и некротическая мигрирующая эритема

Глюкагонома – редкая опухоль из альфа-клеток поджелудочной железы, которая приводит к избыточной продукции гормона глюкагона. Основной физиологический эффект глюкагономы – избыточная продукция пептидного гормона глюкагона. Некролитическая мигрирующая эритема (НМЭ) является классическим симптомом, наблюдаемым у пациентов с глюкагономой, и в 70% случаев представляет серьезную проблему (van Beek et al., (November 2004). "The glucagonoma syndrome and necrolytic migratory erythema: a clinical review". Eur. J. Endocrinol. 151 (5): 531-7). Ассоциированная НМЭ характеризуется распространением эритематозных пузырей и припухлостью на участках, подвергающихся большему трению и давлению, включая нижнюю часть живота, ягодицы, промежность и пах.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения глюкагономы и/или некролитической мигрирующей эритемы (НМЭ) у реципиента путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка aP2. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство содержит легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие вариабельную область, где указанная вариабельная область включает одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR-области), независимо выбранные из Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8 и Seq. ID No. 9. В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство, вводимые субъекту, включает легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие вариабельную область, где указанная вариабельная область включает одну, две или три CDR, независимо выбранные из Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, Seq. ID No. 13, Seq. ID No. 22, Seq. ID No. 23 или Seq. ID No. 24. В другом варианте осуществления вводимое антитело или антигенсвязывающее средство включает легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие вариабельную область, где указанная вариабельная область включает одну, две или три CDR, независимо выбранные из Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8 и Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, Seq. ID No. 13, Seq.

ID No. 22, Seq. ID No. 23 или Seq. ID No. 24. В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство, вводимые субъекту, включают легкую цепь или фрагмент легкой цепи, имеющие переменную область, где указанная переменная область включает Seq. ID No. 7, Seq. ID. No. 8 и по меньшей мере одну CDR, выбранную из Seq. ID. No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, Seq. ID No. 13, Seq. ID No. 22, Seq. ID No. 23 или Seq. ID No. 24. В альтернативе одна или более из раскрытых и выбранных CDR-областей могут быть изменены путем замены одной или более аминокислот, которая не оказывает негативного влияния или которая улучшает свойства антитела или антигенсвязывающего средства, как далее описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления выбранную CDR-область(и) помещают в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области. В одном варианте осуществления вводимое антитело или антигенсвязывающее средство имеет KD в отношении человеческого $\alpha P2 \geq 10^{-7}$ М.

В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающее средство, вводимое субъекту, включает по меньшей мере одну CDR, выбранную из Seq. ID No. 7-13 или Seq. ID No. 22-24, и по меньшей мере одну CDR, выбранную из CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 варианта 1 (Seq. ID No. 15), CDRH1 варианта 2 (Seq. ID No. 25), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 варианта 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 варианта 2 (Seq. ID No. 18), CDRH2 варианта 3 (Seq. ID No. 26), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 варианта 1 (Seq. ID No. 20), CDRH3 варианта 2 (Seq. ID No. 21) или CDRH3 варианта 3 (Seq. ID No. 27), где CDR-последовательности перевиты в каркасную область человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления каркасная область человеческого иммуноглобулина дополнительно модифицирована или изменена для сохранения специфичности аффинности связывания перевитой CDR-области.

В некоторых вариантах осуществления вводимое антитело или антигенсвязывающее средство включает, по меньшей мере, последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL1 (Seq. ID No. 29), последовательность легкой цепи VL+CL 909 gL1 (Seq. ID No. 30), последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL10 (Seq. ID No. 31), последовательность легкой цепи VL+CL 909 gL10 (Seq. ID No. 32), последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL13 (Seq. ID No. 37), последовательность легкой цепи VL+CL 909 gL13 (Seq. ID No. 39), последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL50 (Seq. ID No. 38), последовательность легкой цепи VL+CL 909 gL50 (Seq. ID No. 40), последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL54 (Seq. ID No. 33), последовательность легкой цепи VL+CL 909 gL54 (Seq. ID No. 34), последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL55 (Seq. ID No. 35) или последовательность легкой цепи VL+CL 909 gL55 (Seq. ID No. 36).

В других вариантах осуществления вводимое антитело или антигенсвязывающее средство включает последовательность вариабельной легкой цепи, выбранную из 909 gL1 (Seq. ID No. 29), 909 gL10 (Seq. ID No. 31), 909 gL13 (Seq. ID No. 37), 909 gL50 (Seq. ID No. 38), 909 gL54 (Seq. ID No. 33) или 909 gL55 (Seq. ID No. 35), и последовательность вариабельной тяжелой цепи, выбранную из 909 gH1 (Seq. ID No. 42), 909 gH14 (Seq. ID No. 44), 909 gH15 (Seq. ID No. 46), 909 gH61 (Seq. ID No. 48) или 909 gH62 (Seq. ID No. 50). Например, антитело или антигенсвязывающее средство могут включать, по меньшей мере, последовательность вариабельной легкой цепи 909 gL1 (Seq. ID No. 29) и последовательность вариабельной тяжелой цепи 909 gH1 (Seq. ID No. 42).

Нарушения обмена веществ

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения нарушения обмена веществ у реципиента, опосредованного дисрегуляцией активности глюкагона, путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка aP2. Нарушение обмена веществ включает нарушение, заболевание или состояние, которое вызвано или

характеризуется нарушением метаболизма (то есть химических изменений в живых клетках, в результате которых обеспечивается энергия для жизненно важных процессов и функций) у субъекта. Нарушения обмена веществ включают заболевания, нарушения или состояния, связанные с гипергликемией. Нарушения обмена веществ могут отрицательно влиять на клеточные функции, такие как клеточную пролиферацию, рост, дифференцировку или миграцию, клеточную регуляцию гомеостаза, меж- или внутриклеточную коммуникацию; функцию тканей, такую как функция печени, функция почек или функция адипоцитов; системные ответы в организме, такие как гормональные ответы (например, секреция глюкагона). Примеры нарушений обмена веществ включают ожирение, диабет, гиперфагию, эндокринные нарушения, болезнь накопления триглицеридов, синдром Барде-Бидля, синдром Лоренса-Муна, синдром Прадера-Лабхарта-Вилли и нарушения метаболизма липидов.

Способы уменьшения тяжести опосредованного глюкагоновым рецептором нарушения

Предложен способ предотвращения или лечения заболевания или нарушения, вызванного дисрегуляцией активности глюкагона, приводящей к отклоняющемуся от нормы уровню избыточной глюкозы в крови реципиента, как правило человека, путем введения реципиенту терапевтически эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$. Антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела вводят в дозе, достаточной для ингибирования или уменьшения биологической активности комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$, частично или полностью.

В одном аспекте предложен способ предотвращения или уменьшения тяжести опосредованного глюкагоном нарушения у реципиента путем введения эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$, приводящего к снижению или ослаблению биологической активности глюкагона и уменьшению связанных физиологических эффектов дисрегуляции глюкагона, например, снижению уровней

глюкозы в крови натощак, уровней жировой массы, продукции глюкозы в печени, липолиза адипоцитов, гиперинсулинемии и/или стеатоза печени. В одном варианте осуществления ослабление биологической активности глюкагона приводит к увеличению чувствительности к инсулину, усилению метаболизма глюкозы и/или предотвращению гибели, дисфункции или потери островковых β -клеток.

В других аспектах настоящего изобретения предложены способы:

снижения уровней глюкозы в крови натощак;
 снижения уровней жировой массы;
 снижения продукции глюкозы в печени;
 снижения липолиза адипоцитов;
 снижения гиперинсулинемии;
 снижения стеатоза печени;
 увеличения метаболизма глюкозы;
 увеличения чувствительности к инсулину;
 предотвращения гибели, дисфункции или потери β -клеток; и/или
 определения уровней циркулирующего секретированного aP2 у реципиента;

включающие введение эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, которые направлены против комплекса глюкагона/белка aP2, реципиенту, как правило, человеку, нуждающемуся в этом.

Комбинированная терапия

Соединение, способное нарушать агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR, может применяться для лечения первичного нарушения, опосредованного избыточным агонистическим воздействием на GCGR. В одном варианте осуществления соединение вводят нуждающемуся в этом субъекту в комбинации или поочередно с дополнительным действующим веществом.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы, в которых применяется комбинированная терапия, где соединение, способное нарушать агонистическое

взаимодействие глюкагона/аР2 с GCGR, вводят субъекту с другим терапевтическим средством. Примеры дополнительных терапевтических средств, которые могут вводить в комбинации с соединением согласно настоящему изобретению, и либо вводят отдельно, либо в одной и той же фармацевтической композиции, включают, без ограничения перечисленными:

(а) противодиабетические средства, такие как (1) агонисты PPAR γ , такие как глитазоны (например, циглитазон; драглитазон; энглитазон; изаглитазон (MCC-555); пиоглитазон (ACTOS); росиглитазон (Авандия); троглитазон; ривоглитазон, BRL49653; CLX-0921; 5-BTZD, GW-0207, LG-100641, R483 и LY-300512, и т.п., и соединения, раскрытые в WO97/10813, 97/27857, 97/28115, 97/28137, 97/27847, 03/000685 и 03/027112, а также SPPARMS (селективные модуляторы PPAR гамма), такие как T131 (Amgen), FK614 (Fujisawa), нетоглитазон и метаглитасен; (2) бигуаниды, такие как буформин; метформин; и фенформин, и т.п.; (3) ингибиторы протеинтирозинфосфатазы-1B (PTP-1B), такие как ISIS 113715, A-401674, A-364504, IDD-3, IDD 2846, KP-40046, KR61639, MC52445, MC52453, C7, OC-060062, OC-86839, OC29796, TTP-277BC1, а также средства, раскрытые в WO 04/041799, 04/050646, 02/26707, 02/26743, 04/092146, 03/048140, 04/089918, 03/002569, 04/065387, 04/127570 и US 2004/167183; (4) производные сульфонилмочевины, такие как ацетогексамид; хлорпропамид; диабинез; глибенкламид; глипизид; глибурид; глимепирид; гликлазид; глипентид; гликвидон; глизоламид; толазамид и толбутамид и т.п.; (5) меглитиниды, такие как репаглинид, метиглинид (GLUFAST) и натеглинид, и т.п.; (6) ингибиторы альфа-глюкозидгидролаз, такие как акарбозу; адипозин; камиглибозу; эмиглитат; миглитол; воглибозу; прадимицин-Q; сальбостатин; CKD-711; MDL-25,637; MDL-73,945 и MOR 14, и т.п.; (7) ингибиторы альфа-амилазы, такие как тендамистат, трестатин и Al-3688, и т.п.; (8) стимуляторы секреции инсулина, такие как линоглирид, натеглинид, митиглинид (GLUFAST), ID1101, A-4166 и т.п.; (9) ингибиторы окисления жирных кислот, такие как кломоксир и этомоксир, и т.п.; (10) антагонисты A2, такие как мидаглизол; изаглидол; дериглидол;

идазоксан; эароксан и флупароксан, и т.п.; (11) инсулин или миметики инсулина, такие как биота, LP-100, новарапид, инсулин детемир, инсулин лиспро, инсулин гларгин, инсулин деглудек, инсулин-цинк суспензию (ленте и ультраленте); инсулин Lys-Pro, GLP-1 (17-36), GLP-1 (73-7) (инсулинтропин); GLP-1 (7-36)-NH₂ эксенатид/эксендин-4, эксенатид LAR, линаглутид, AVE0010, CJC 1131, BIM51077, CS 872, TH0318, BAY-694326, GP010, ALBUGON (GLP-1, слитый с альбумином), HGX-007 (агонист Ерас), S-23521, а также соединения, раскрытые в WO 04/022004, WO 04/37859, и т.п.; (12) соединения, не относящиеся к тиазолидиндионам, такие как JT-501 и фарглитазар (GW-2570/GI-262579), и т.п.; (13) двойные агонисты PPAR α/γ , такие как AVE 0847, CLX-0940, GW-1536, GW1929, GW-2433, KRP-297, L-796449, LBM 642, LR-90, LY510919, MK-0767, ONO 5129, SB 219994, TAK-559, TAK-654, 677954 (GlaxoSmithkline), E-3030 (Eisai), LY510929 (Lilly), AK109 (Asahi), DRF2655 (Dr. Reddy), DRF8351 (Dr. Reddy), MC3002 (Maxocore), TY51501 (ToaEiyo), алеглитазар, фарглитазар, навеглитазар, мураглитазар, пелиглитазар, тезаглитазар (GALIDA), реглитазар (JTT-501), хиглитазар, и соединения, раскрытые в WO 99/16758, WO 99/19313, WO 99/20614, WO 99/38850, WO 00/23415, WO 00/23417, WO 00/23445, WO 00/50414, WO 01/00579, WO 01/79150, WO 02/062799, WO 03/033481, WO 03/033450, WO 03/033453; и (14) инсулин, миметики инсулина и другие инсулинсенсibiliзирующие средства; (15) агонисты рецептора VPAC₂; (16) модуляторы GLK, такие как PSN105, RO 281675, RO 274375, и соединения, раскрытые в WO 03/015774, WO 03/000262, WO 03/055482, WO 04/046139, WO 04/045614, WO 04/063179, WO 04/063194, WO 04/050645, и т.п.; (17) ретиноидные модуляторы, такие как описанные в WO 03/000249; (18) ингибиторы GSK 3-бета/GSK 3, такие как 4-[2-(2-бромфенил)-4-(4-фторфенил-1H-имидазол-5-ил)пиридин, CT21022, CT20026, CT-98023, SB-216763, SB410111, SB-675236, CP-70949, XD4241, и соединения, раскрытые в WO 03/037869, 03/03877, 03/037891, 03/024447, 05/000192, 05/019218, и т.п.; (19) ингибиторы гликогенфосфорилазы (HGLPa), такие как AVE 5688, PSN 357, GPi-879, соединения, раскрытые в WO 03/037864, WO 03/091213, WO 04/092158, WO 05/013975, WO

05/013981, US 2004/0220229 и JP 2004-196702, и т.п.; (20) средства, усиливающие потребление АТФ, такие как соединения, раскрытые в WO 03/007990; (21) фиксированные комбинации агонистов PPAR γ и метформина, такие как AVANDAMET; (22) пан-агонисты PPAR, такие как GSK 677954; (23) GPR40 (G-белок-сопряженный рецептор 40), также называемый SNORF 55, такой как BG 700, и соединения, раскрытые в WO 04/041266, 04/022551, 03/099793; (24) GPR119 (также называемый RUP3; SNORF 25), такой как RUP3, HGPRBMY26, PFI 007, SNORF 25; (25) антагонисты аденозинового рецептора 2B, такие как ATL-618, ATI-802, E3080, и т.п.; (26) ингибиторы карнитинпальмитоилтрансферазы, например ST 1327 и ST 1326, и т.п.; (27) ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы, например CS-917, MB7803, и т.п.; (28) антагонисты глюкагона, например AT77077, BAY 694326, GW 4123X, NN2501, и соединения, раскрытые в WO 03/064404, WO 05/00781, US 2004/0209928, US 2004/029943, и т.п.; (30) ингибиторы глюкозо-6-фосфатазы; (31) ингибиторы фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK); (32) активаторы киназы пируватдегидрогеназы (PDK); (33) агонисты RXR, такие как MC1036, CS00018, JNJ 10166806, и соединения, раскрытые в WO 04/089916, патенте США 6,759,546, и т.п.; (34) ингибиторы SGLT, такие как AVE 2268, KGT 1251, T1095/RWJ 394718; (35) BLX-1002; (36) ингибиторы альфа-глюкозидазы; (37) агонисты глюкагоновых рецепторов; (38) активаторы глюкокиназы; 39) GIP-1; 40) средства, усиливающие секрецию инсулина; 41) агонисты GPR-40, такие как TAK-875, 5-[4-[[[(1R)-4-[6-(3-гидрокси-3-метилбутоксид)-2-метилпиридин-3-ил]-2,3-дигидро-1H-инден-1-ил]окси]фенил]-изотиазол-3-ол 1-оксид, 5-(4-((3-(2,6-диметил-4-(3-(метилсульфонил)пропокси)-фенил)фенил)-метокси)фенил)изо, 5-(4-((3-(2-метил-6-(3-гидроксипропокси)пиридин-3-ил)-2-метилфенил)метокси)фенил)изотиазол-3-ол 1-оксид и 5-[4-[[[3-[4-(3-аминопропокси)-2,6-диметилфенил]фенил]метокси]фенил]изотиазол-3-ол 1-оксид), а также раскрытые в WO 11/078371; 42) ингибиторы SGLT-2, такие как канаглифлозин, дапаглифлозин, тофоглифлозин, эмпаглифлозин, ипраглифлозин, лузеоглифлозин (TS-071), эртуглифлозин (PF-04971729) и ремоглифлозин; и 43)

ингибиторы SGLT-1/SGLT-2, такие как LX4211;

(b) средства, снижающие уровень липидов, такие как (1) секвестранты желчных кислот, такие как холестирамин, колесевелам, колестипол, диалкиламиноалкил-производные сшитого декстрана; Colestid®; LoCholest® и Questran®, и т.п.; (2) ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, такие как аторвастатин, итавастатин, питаваастатин, флувастатин, ловаастатин, правастатин, ривастатин, симвастатин, розуваастатин (ZD-4522) и другие статины, в особенности симвастатин; (3) ингибиторы ГМГ-КоА-синтазы; (4) ингибиторы абсорбции холестерина, такие как FMVP4 (Forbes Medi-Tech), KT6-971 (Kotobuki Pharmaceutical), FM-VA12 (Forbes Medi-Tech), FM-VP-24 (Forbes Medi-Tech), сложные эфиры станола, бета-ситостерин, гликозиды стеринов, такие как тиквезид; и азетидиноны, такие как эзетимиб, и соединения, раскрытые в WO 04/005247, и т.п.; (5) ингибиторы ацил-КоА-холестерин-ацилтрансферазы (ACAT), такие как авасимиб, эфлюцимиб, пакtimiб (KY505), SMP 797 (Sumitomo), SM32504 (Sumitomo), и соединения, раскрытые в WO 03/091216, и т.п.; (6) ингибиторы CETP, такие как анацетрапиб, JTT 705 (Japan Tobacco), торцетрапиб, CP 532,632, BAY63-2149 (Bayer), SC 591, SC 795, и т.п.; (7) ингибиторы скваленсинтетазы; (8) антиоксиданты, такие как пробукол и т.п.; (9) агонисты PPAR α , такие как беклофибрат, бензафибрат, ципрофибрат, клофибрат, этофибрат, фенофибрат, гемкабен и гемфиброзил, GW 7647, BM 170744 (Kowa), LY518674 (Lilly), GW590735 (GlaxoSmithkline), KRP-101 (Kyorin), DRF10945 (Dr. Reddy), NS-220/R1593 (Nippon Shinyaku/Roche), ST1929 (Sigma Tau), MC3001/MC3004 (MaxoCore Pharmaceuticals), гемкабен-кальций, другие производные фиброевой кислоты, такие как Atromid®, Lopid® и Tricor®, а также соединения, раскрытые в патенте США 6548538, и т.п.; (10) модуляторы рецептора FXR, такие как GW 4064 (GlaxoSmithkline), SR 103912, QRX401, LN-6691 (Lion Bioscience), и соединения, раскрытые в WO 02/064125, WO 04/045511, и т.п.; (11) модуляторы рецептора LXR, такие как GW 3965 (GlaxoSmithkline), T9013137 и XTC0179628 (X-Cepto Therapeutics/Sanyo), и соединения, раскрытые в WO 03/031408, WO

03/063796, WO 04/072041, и т.п.; (12) ингибиторы синтеза липопротеинов, такие как ниацин; (13) ингибиторы системы ренин-ангиотензин; (14) частичные агонисты PPAR- δ , такие как соединения, раскрытые в WO 03/024395; (15) ингибиторы реабсорбции желчных кислот, такие как BARI 1453, SC435, PHA384640, S8921, AZD7706, и т.п., и секвестранты желчных кислот, такие как колесевелам (WELCHOL/CHOLESTAGEL), колестипол, холестирамин и диалкиламиноалкил-производные сшитого декстрана, (16) агонисты PPAR- γ , такие как GW 501516 (Ligand, GSK), GW 590735, GW-0742 (GlaxoSmithkline), T659 (Amgen/Tularik), LY934 (Lilly), NNC610050 (Novo Nordisk), и соединения, раскрытые в WO97/28149, WO 01/79197, WO 02/14291, WO 02/46154, WO 02/46176, WO 02/076957, WO 03/016291, WO 03/033493, WO 03/035603, WO 03/072100, WO 03/097607, WO 04/005253, WO 04/007439 и JP10237049 и т.п.; (17) ингибиторы синтеза триглицеридов; (18) ингибиторы микросомального транспорта триглицеридов (MTTP), такие как имплитапид, LAB687, JTT130 (Japan Tobacco), CP346086, а также соединения, раскрытые в WO 03/072532, и т.п.; (19) модуляторы транскрипции; (20) ингибиторы скваленэпоксидазы; (21) индукторы рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛПНП); (22) ингибиторы агрегации тромбоцитов; (23) ингибиторы 5-LO или FLAP; и (24) агонисты никотиновых рецепторов, в том числе агонисты HM74A; (25) модуляторы PPAR, такие как раскрытые в WO 01/25181, WO 01/79150, WO 02/79162, WO 02/081428, WO 03/016265, WO 03/033453; (26) ниацин-связанный хром, как раскрыто в WO 03/039535; (27) замещенные производные кислот, раскрытые в WO 03/040114; (28) ЛПВП для инфузии, такие как LUV/ETC-588 (Pfizer), APO-A1 Milano/ETC216 (Pfizer), ETC-642 (Pfizer), ISIS301012, D4F (Bruin Pharma), синтетический тримерный ApoA1, Bioral Apo A1, направленные на пенистые клетки, и т.п.; (29) ингибиторы IBAT, такие как BARI143/HMR145A/HMR1453 (Sanofi-Aventis, PHA384640E (Pfizer), S8921 (Shionogi) AZD7806 (AstraZeneca), AK105 (Asahi Kasei) и т.п.; (30) ингибиторы Lp-PLA2, такие как SB480848 (GlaxoSmithkline), 659032 (GlaxoSmithkline), 677116 (GlaxoSmithkline) и т.п.; (31) другие средства, которые влияют

на липидный состав, в том числе ETC1001/ESP31015 (Pfizer), ESP-55016 (Pfizer), AGI1067 (AtheroGenics), AC3056 (Amylin), AZD4619 (AstrZeneca); и

(с) антигипертензивные средства, такие как: (1) диуретики, такие как тиазиды, в том числе хлорталидон, хлортиазид, дихлорфенамид, гидрофлуметиазид, индапамид и гидрохлортиазид; петлевые диуретики, такие как буметамид, этакриновую кислоту, фуросемид и торсемид; калийсберегающие средства, такие как амилорид и триамтерен; и антагонисты альдостерона, такие как спиронолактон, эпиренон и т.п.; (2) бета-адреноблокаторы, такие как ацебутолол, атенолол, бетаксолол, бевантолол, бисопролол, бопиндолол, картеолол, карведилол, целипролол, эсмолол, инденолол, метапролол, надолол, небиволол, пенбутолол, пиндолол, пропанолол, соталол, тертатолол, тилизолл и тимолол, и т.п.; (3) блокаторы кальциевых каналов, такие как амлодипин, аранидипин, азелнидипин, барнидипин, бенидипин, бепридил, циналдипин, клевидипин, дилтиазем, эфонидипин, фелодипин, галлопамил, израдипин, лацидипин, лемилдипин, лерканидипин, никардипин, нифедипин, нилвадипин, нимодепин, низолдипин, нитрендипин, манидипин, пранидипин и верапамил, и т.п.; (4) ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), такие как беназеприл; каптоприл; цилазаприл; делаприл; эналаприл; фозиноприл; имдаприл; лозиноприл; моэксиприл; квинаприл; квинаприлат; рамиприл; периндоприл; периндроприл; кваниприл; спираприл; тенокаприл; трандолаприл и зофеноприл, и т.п.; (5) ингибиторы нейтральной эндопептидазы, такие как омапатрилат, кадоксатрил и экадотрил, фозидотрил, сампатрилат, AVE7688, ER4030 и т.п.; (6) антагонисты эндотелина, такие как тезозентан, A308165 и YM62899, и т.п.; (7) вазодилататоры, такие как гидралазин, клонидин, миноксидил и никотиниловый спирт, никотиновую кислоту или ее соль, и т.п.; (8) антагонисты рецепторов ангиотензина II, такие как кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лосартан, пратосартан, тазосартан, телмисартан, валсартан и EXP-3137, FI6828K и RNH6270, и т.п.; (9) α/β -адреноблокаторы, такие как нипрадилол, аротинолол и амосулолол,

и т.п.; (10) альфа1-блокаторы, такие как теразозин, урапидил, празозин, буназозин, тримазозин, доксазозин, нафтодипил, индорамин, WHIP 164 и XEN010, и т.п.; (11) альфа-2 агонисты, такие как лофексидин, тиаменидин, моксонидин, рилменидин и гуанобенз, и т.п.; (12) ингибиторы альдостерона и т.п.; (13) ангиопозтин-2-связывающие средства, такие как соединения, раскрытые в WO 03/030833; и

(d) средства против ожирения, такие как: (1) ингибиторы переносчика 5НТ (серотонина), такие как пароксетин, флуоксетин, фенфлурамин, флувоксамин, сертралин и имипрамин, и соединения, раскрытые в WO 03/00663, а также ингибиторы обратного захвата серотонина/норадреналина, такие как сибутрамин (Меридиа/REDUCTIL) и ингибитор захвата дофамина/ингибиторы захвата норадреналина, такие как радафаксина гидрохлорид, 353162 (GlaxoSmithkline) и т.п.; (2) ингибиторы переносчика НА (норадреналина), такие как GW 320659, деспирамин, талсупрам и номифензин; (3) антагонист CB1 (каннабиноидного рецептора CB1)/обратные агонисты, такие как римонабант (ACCOMPLIA Sanofi Synthelabo), SR-147778 (Sanofi Synthelabo), AVE1625 (Sanofi-Aventis), BAY 65-2520 (Bayer), SLV 319 (Solvay), SLV326 (Solvay), CP945598 (Pfizer), E-6776 (Esteve), 01691 (Organix), ORG14481 (Organon), VER24343 (Vernalis), NESS0327 (Univ of Sassari/Univ of Cagliari), и соединения, раскрытые в патентах США 4,973,587, 5,013,837, 5,081,122, 5,112,820, 5,292,736, 5,532,237, 5,624,941, 6,028,084, и 6,509,367; и WO 96/33159, WO 97/29079, WO 98/31227, WO 98/33765, WO98/37061, WO98/41519, WO 98/43635, WO 98/43636, WO 99/02499, WO 00/10967, WO 00/10968, WO 01/09120, WO 01/58869, WO 01/64632, WO 01/64633, WO 01/64634, WO 01/70700, WO 01/96330, WO 02/076949, WO 03/006007, WO 03/007887, WO 03/020217, WO 03/026647, WO 03/026648, WO 03/027069, WO 03/027076, WO 03/027114, WO 03/037332, WO 03/040107, WO 04/096763, WO 04/111039, WO 04/111033, WO 04/111034, WO 04/111038, WO 04/013120, WO 05/000301, WO 05/016286, WO 05/066126 и EP-658546, и т.п.; (4) агонисты/антагонисты грелина, такие как BVT81-97 (BioVitrum), RC1291 (Rejuvenon), SRD-04677 (Sumitomo), неацилированный грелин (TheraTechnologies), и

соединения, раскрытые в WO 01/87335, WO 02/08250, WO 05/012331, и т.п.; (5) антагонист/обратные агонисты H3 (гистамина H3), такие как тиоперамид, 3-(1H-имидазол-4-ил)пропил-N-(4-пентенил)карбамат), клобенпропит, иодофенпропит, имопроксифан, GT2394 (Gliatech) и A331440, и соединения, раскрытые в WO 02/15905; и O-[3-(1H-имидазол-4-ил)пропанол]карбаматы (Kies-Kononowicz, K. et al., Pharmazie, 55:349-55 (2000)), пиперидин-содержащие антагонисты рецептора гистамина H3 (Lazewska, D. et al., Pharmazie, 56:927-32 (2001)), производные бензофенона и родственные соединения (Sasse, A. et al., Arch. Pharm.(Weinheim) 334:45-52 (2001)), замещенные N-фенилкарбаматы (Reidemeister, S. et al., Pharmazie, 55:83-6 (2000)) и производные проксифана (Sasse, A. et al., J. Med. Chem. 43:3335-43 (2000)) и модуляторы рецептора гистамина H3, такие как описанные в WO 03/024928 и WO 03/024929; (6) антагонисты рецептора меланиноконцентрирующего гормона 1 (MCH1R), такие как T-226296 (Takeda), T71 (Takeda/Amgen), AMGN-608450, AMGN-503796 (Amgen), 856464 (GlaxoSmithkline), A224940 (Abbott), A798 (Abbott), ATC0175/AR224349 (Arena Pharmaceuticals), GW803430 (GlaxoSmithKline), NBI-1A (Neurocrine Biosciences), NGX-1 (Neurogen), SNP-7941 (Synaptic), SNAP9847 (Synaptic), T-226293 (Schering Plough), TPI-1361-17 (Saitama Medical School/University of California Irvine), и соединения, раскрытые в WO 01/21169, WO 01/82925, WO 01/87834, WO 02/051809, WO 02/06245, WO 02/076929, WO 02/076947, WO 02/04433, WO 02/51809, WO 02/083134, WO 02/094799, WO 03/004027, WO 03/13574, WO 03/15769, WO 03/028641, WO 03/035624, WO 03/033476, WO 03/033480, WO 04/004611, WO 04/004726, WO 04/011438, WO 04/028459, WO 04/034702, WO 04/039764, WO 04/052848, WO 04/087680; а также в заявках на патент Японии JP 13226269, JP 1437059, JP2004315511, и т.п.; (7) агонист/антагонисты MCH2R (меланиноконцентрирующего гормона 2R); (8) антагонисты NPY1 (нейропептида Y Y1), такие как BMS205749, BIBP3226, J-115814, BIBO 3304, LY-357897, CP-671906 и GI-264879A; а также описанные в патенте США 6,001,836; и WO 96/14307, WO 01/23387, WO 99/51600, WO 01/85690, WO 01/85098, WO 01/85173 и WO 01/89528;

(9) антагонисты NPY5 (нейропептида Y Y5), такие как 152,804, S2367 (Shionogi), E-6999 (Esteve), GW-569180A, GW-594884A (GlaxoSmithkline), GW-587081X, GW-548118X; FR 235,208; FR226928, FR 240662, FR252384; 1229U91, GI-264879A, CGP71683A, C-75 (Fasgen) LY-377897, LY366377, PD-160170, SR-120562A, SR-120819A, S2367 (Shionogi), JCF-104 и H409/22; и соединения, раскрытые в патентах США 6,140,354, 6,191,160, 6,258,837, 6,313,298, 6,326,375, 6,329,395, 6,335,345, 6,337,332, 6,329,395 и 6,340,683; и EP-01010691, EP-01044970 и FR252384; а также в публикациях PCT WO 97/19682, WO 97/20820, WO 97/20821, WO 97/20822, WO 97/20823, WO 98/27063, WO 00/107409, WO 00/185714, WO 00/185730, WO 00/64880, WO 00/68197, WO 00/69849, WO 01/09120, WO 01/14376, WO 01/85714, WO 01/85730, WO 01/07409, WO 01/02379, WO 01/02379, WO 01/23388, WO 01/23389, WO 01/44201, WO 01/62737, WO 01/62738, WO 01/09120, WO 02/20488, WO 02/22592, WO 02/48152, WO 02/49648, WO 02/051806, WO 02/094789, WO 03/009845, WO 03/014083, WO 03/022849, WO 03/028726, WO 05/014592, WO 05/01493; и Norman et al., J. Med. Chem. 43:4288-4312 (2000);

(10) лептин, такой как рекомбинантный человеческий лептин (PEG-ОВ, Hoffman La Roche) и рекомбинантный человеческий метионил-лептин (Amgen); (11) производные лептина, такие как описанные в патентах США 5,552,524; 5,552,523; 5,552,522; 5,521,283; и WO 96/23513; WO 96/23514; WO 96/23515; WO 96/23516; WO 96/23517; WO 96/23518; WO 96/23519; и WO 96/23520; (12) опиоидные антагонисты, такие как налмефен (Revex®), 3-метоксиналтрексон, налоксон и налтрексон; и соединения, раскрытые в WO 00/21509;

(13) антагонисты орексина, такие как SB-334867-A (GlaxoSmithkline); и соединения, раскрытые в WO 01/96302, 01/68609, 02/44172, 02/51232, 02/51838, 02/089800, 02/090355, 03/023561, 03/032991, 03/037847, 04/004733, 04/026866, 04/041791, 04/085403 и т.п.; (14) агонисты BRS3 (рецептора бомбезина субтипа 3); (15) агонисты CCK-A (холецистокинина-A), такие как AR-R 15849, GI 181771, JMV-180, A-71378, A-71623, PD170292, PD 149164, SR146131, SR125180, бутабиндид, и соединения, раскрытые в патенте США 5,739,106; (16) CNTF

(цилиарные нейротрофические факторы), такие как Gl-181771 (Glaxo-SmithKline); SR146131 (Sanofi Synthelabo); бутабиндид; и PD 170,292, PD 149164 (Pfizer); (17) производные CNTF, такие как аксокин (Regeneron); и соединения, раскрытые в WO 94/09134, WO 98/22128 и WO 99/43813; (18) агонисты GHS (рецептора, стимулирующего секрецию гормона роста), такие как NN703, гексарелин, МК-0677, SM-130686, CP-424,391, L-692,429 и L-163,255, и соединения, раскрытые в патенте США 6,358,951, заявках на патент США 2002/049196 и 2002/022637; и WO 01/56592 и WO 02/32888; (19) агонисты 5HT_{2c} (рецептора серотонина 2c), такие как APD3546/AR10A (Arena Pharmaceuticals), ATH88651 (Athersys), ATH88740 (Athersys), BVT933 (Biovitrum/GSK), DPCA37215 (BMS), IK264; LY448100 (Lilly), PNU 22394; WAY 470 (Wyeth), WAY629 (Wyeth), WAY161503 (Biovitrum), R-1065, VR1065 (Vernalis/Roche) YM 348; и соединения, раскрытые в патенте США 3,914,250; и публикациях PCT 01/66548, 02/36596, 02/48124, 02/10169, 02/44152; 02/51844, 02/40456, 02/40457, 03/057698, 05/000849, и т.п.; (20) агонисты Mc3r (рецептора меланокортина 3); (21) агонисты Mc4r (рецептора меланокортина 4), такие как CHIR86036 (Chiron), CHIR915 (Chiron); ME-10142 (Melacure), ME-10145 (Melacure), HS-131 (Melacure), NBI72432 (Neurocrine Biosciences), NNC 70-619 (Novo Nordisk), TTP2435 (Transtech) и соединения, раскрытые в публикациях PCT WO 99/64002, 00/74679, 01/991752, 01/0125192, 01/52880, 01/74844, 01/70708, 01/70337, 01/91752, 01/010842, 02/059095, 02/059107, 02/059108, 02/059117, 02/062766, 02/069095, 02/12166, 02/11715, 02/12178, 02/15909, 02/38544, 02/068387, 02/068388, 02/067869, 02/081430, 03/06604, 03/007949, 03/009847, 03/009850, 03/013509, 03/031410, 03/094918, 04/028453, 04/048345, 04/050610, 04/075823, 04/083208, 04/089951, 05/000339, а также EP 1460069, US 2005049269 и JP2005042839, и т.п.; (22) ингибиторы обратного захвата моноаминов, такие как сибутрамин (Меридиа®/Reductil®) и его соли, а также соединения, раскрытые в патентах США 4,746,680, 4,806,570 и 5,436,272, и патентной публикации США 2002/0006964, а также WO 01/27068 и WO 01/62341; (23) ингибиторы

обратного захвата серотонина, такие как дексфенфлурамин, флуоксетин, и соединения, раскрытые в патенте США 6,365,633 и WO 01/27060 и WO 01/162341; (24) агонисты GLP-1 (глюкагоноподобного пептида 1); (25) топирамат (Топамакс®); (26) растительное лекарственное соединение 57 (CP 644,673); (27) ингибиторы ACC2 (ацетил-КоА-карбоксилазы-2); (28) агонисты β_3 (бета-3-адренергического рецептора), такие как рафебергтрон/AD9677/TAK677 (Dainippon/Takeda), CL-316,243, SB 418790, BRL-37344, L-796568, BMS-196085, BRL-35135A, CGP12177A, BTA-243, GRC1087 (Glenmark Pharmaceuticals), GW 427353 (солабегрона гидрохлорид), трекадрин, Zeneca D7114, N-5984 (Nisshin Kyorin), LY-377604 (Lilly), KT07924 (Kissei), SR 59119A, и соединения, раскрытые в патенте США 5,705,515, патенте США 5,451,677; и WO 94/18161, WO 95/29159, WO 97/46556, WO 98/04526 WO 98/32753, WO 01/74782, WO 02/32897, WO 03/014113, WO 03/016276, WO 03/016307, WO 03/024948, WO 03/024953, WO 03/037881, WO 04/108674 и т.п.; (29) ингибиторы DGAT1 (диацилглицеролацилтрансферазы 1); (30) ингибиторы DGAT2 (диацилглицеролацилтрансферазы 2); (31) ингибиторы FAS (синтазы жирных кислот), такие как церуленин и C75; (32) ингибиторы PDE (фосфодиэстеразы), такие как теофиллин, пентоксифиллин, запринаст, силденафил, амринон, милринон, цилостамид, ролипрам и циломиласт, а также соединения, раскрытые в WO 03/037432, WO 03/037899; (33) агонисты тиреоидного гормона β , такие как KB-2611 (KaroBioBMS), и соединения, раскрытые в WO 02/15845; и заявке на патент Японии JP 2000256190; (34) активаторы UCP-1 (разобщающего белка 1), 2 или 3, такие как фитановую кислоту, 4-[(E)-2-(5,6,7,8-тетрагидро-5,5,8,8-тетраметил-2-нафталенил)-1-пропенил]бензойную кислоту (TTNPB) и ретиноевую кислоту; и соединения, раскрытые в WO 99/00123; (35) ацилэстрогены, такие как олеоил-эстрон, раскрытый в del Mar-Grasa, M. et al., Obesity Research, 9:202-9 (2001); (36) антагонисты глюкокортикоидных рецепторов, такие как CP472555 (Pfizer), KB 3305, и соединения, раскрытые в WO 04/000869, WO 04/075864 и т.п.; (37) ингибиторы 11β HSD-1 (11-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 1 типа), такие как LY-2523199, BVT

3498 (AMG 331), BVT 2733, 3-(1-адамантил)-4-этил-5-(этилтио)-4Н-1,2,4-триазол, 3-(1-адамантил)-5-(3,4,5-триметоксифенил)-4-метил-4Н-1,2,4-триазол, 3-адамантил-4,5,6,7,8,9,10,11,12,3а-декагидро-1,2,4-триазоло[4,3-а][11]аннулен, и соединения, раскрытые в WO 01/90091, 01/90090, 01/90092, 02/072084, 04/011410, 04/033427, 04/041264, 04/027047, 04/056744, 04/065351, 04/089415, 04/037251 и т.п.; (38) ингибиторы SCD-1 (стеароил-КоА-десатуразы 1); (39) ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DPP-4), такие как изолейцин-тиазолидид, валин-пирролидид, ситаглиптин (Янувия), омариглиптин, саксаглиптин, алоглиптин, линаглиптин, NVP-DPP728, LAF237 (вилдаглиптин), P93/01, TSL 225, TMC-2A/2B/2C, FE 999011, P9310/K364, VIP 0177, SDZ 274-444, GSK 823093, E 3024, SYR 322, TS021, SSR 162369, GRC 8200, K579, NN7201, CR 14023, PHX 1004, PHX 1149, PT-630, SK-0403; и соединения, раскрытые в WO 02/083128, WO 02/062764, WO 02/14271, WO 03/000180, WO 03/000181, WO 03/000250, WO 03/002530, WO 03/002531, WO 03/002553, WO 03/002593, WO 03/004498, WO 03/004496, WO 03/005766, WO 03/017936, WO 03/024942, WO 03/024965, WO 03/033524, WO 03/055881, WO 03/057144, WO 03/037327, WO 04/041795, WO 04/071454, WO 04/0214870, WO 04/041273, WO 04/041820, WO 04/050658, WO 04/046106, WO 04/067509, WO 04/048532, WO 04/099185, WO 04/108730, WO 05/009956, WO 04/09806, WO 05/023762, US 2005/043292 и EP 1 258 476; (40) ингибиторы липазы, такие как тетрагидролипстатин (орлистат/Ксеникал), ATL962 (Alizyme/Takeda), GT389255 (Genzyme/Peptimmune) Triton WR1339, RHC80267, липстатин, теасапонин и диэтилумбеллиферил-фосфат, FL-386, WAY-121898, Bay-N-3176, валилактон, эстерацин, эбелактон А, эбелактон В и RHC 80267, и соединения, раскрытые в WO 01/77094, WO 04/111004 и в патентах США 4,598,089, 4,452,813, 5,512,565, 5,391,571, 5,602,151, 4,405,644, 4,189,438 и 4,242,453, и т.п.; (41) ингибиторы переносчиков жирных кислот; (42) ингибиторы переносчиков дикарбоксилата; (43) ингибиторы переносчиков глюкозы; и (44) ингибиторы переносчиков фосфата; (45) снижающие аппетит бициклические соединения, такие как 1426 (Aventis) и 1954 (Aventis), а также соединения, раскрытые в WO 00/18749, WO

01/32638, WO 01/62746, WO 01/62747 и WO 03/015769; (46) агонисты пептидов YY и PYY, такие как PYY336 (Nastech/Merck), AC162352 (IC Innovations/Curis/Amylin), TM30335/TM30338 (7TM Pharma), PYY336 (Emisphere Technologies), пэгилированный пептид YY3-36, соединения, раскрытые в WO 03/026591, 04/089279, и т.п.; (47) модуляторы метаболизма липидов, такие как маслиновую кислоту, эритродиол, урсоловую кислоту, уваол, бетулиновую кислоту, бетулин и т.п., и соединения, раскрытые в WO 03/011267; (48) модуляторы факторов транскрипции, такие как соединения, раскрытые в WO 03/026576; (49) модуляторы Mc5r (рецептора меланокортина 5), такие как соединения, раскрытые в WO 97/19952, WO 00/15826, WO 00/15790, US 20030092041, и т.п.; (50) нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), (51) модуляторы Mclr (рецептора меланокортина 1), такие как LK-184 (Proctor & Gamble) и т.п.; (52) антагонисты 5HT₆, такие как BVT74316 (BioVitrum), BVT5182c (BioVitrum), E-6795 (Esteve), E-6814 (Esteve), SB399885 (GlaxoSmithkline), SB271046 (GlaxoSmithkline), RO-046790 (Roche) и т.п.; (53) белок-переносчик жирных кислот 4 (FATP4); (54) ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC), такие как CP640186, CP610431, CP640188 (Pfizer); (55) С-концевые фрагменты гормона роста, такие как AOD9604 (Monash Univ/Metabolic Pharmaceuticals) и т.п.; (56) оксинтомодулин; (57) антагонисты рецептора нейропептида FF, такие как раскрытые в WO 04/083218 и т.п.; (58) агонисты амилина, такие как симлин/прамлинтид/AC137 (Amylin); (59) экстракты худии и трихокаулона; (60) BVT74713 и другие препараты для подавления аппетита на основе липидов; (61) агонисты допамина, такие как бупропион (WELLBUTRIN/GlaxoSmithkline); (62) зонисамид (Зонегран/Dainippon/Elan) и т.п.

(е) анорексигенные средства, подходящие для применения в комбинации с соединением настоящего изобретения, включают, без ограничения перечисленными, аминорекс, амфеклорал, амфетамин, бензфетамин, хлорфентермин, клобензорекс, клофорекс, кломинорекс, клортермин, циклекседрин, дексфенфлурамин, дексамфетамин, диэтилпропион, дифеметоксидин, N-этиламфетамин, фенбутразат, фенфлурамин, фенизорекс, фенпропорекс, флудорекс,

флуминорекс, фурфурилметиламфетамин, левамфетамин, левофацетоперан, мазиндол, мефенорекс, метамфепрамон, метамфетамин, норпсевдозефедрин, пенторекс, фендиметразин, фенметразин, фентермин, фенилпропаноламин, пицилорекс и сибутрамин; и их фармацевтически приемлемые соли. Наиболее подходящим классом анорексигенных средств являются галогенпроизводные амфетамина, в том числе хлорфентермин, клофорекс, клортермин, дексфенфлурамин, фенфлурамин, пицилорекс и сибутрамин; и их фармацевтически приемлемые соли. Конкретные галогенпроизводные амфетамина для применения в комбинации с соединением настоящего изобретения включают: фенфлурамин и дексфенфлурамин, а также их фармацевтически приемлемые соли;

(f) антагонисты/обратные агонисты CB1 (каннабиноидного рецептора 1), такие как римонабант (Acomplia; Sanofi), SR-147778 (Sanofi), SR-141716 (Sanofi), BAY 65-2520 (Bayer) и SLV 319 (Solvay), и раскрытые в патенте США 4,973,587, патенте США 5,013,837, патенте США 5,081,122, патенте США 5,112,820, патенте США 5,292,736, патенте США 5,532,237, патенте США 5,624,941, патенте США 6,028,084, патенте США 6,509,367, патенте США 6,509,367, WO96/33159, WO97/29079, WO98/31227, WO98/33765, WO98/37061, WO98/41519, WO98/43635, WO98/43636, WO99/02499, WO00/10967, WO00/10968, WO01/09120, WO01/58869, WO01/64632, WO01/64633, WO01/64634, WO01/70700, WO01/96330, WO02/076949, WO03/006007, WO03/007887, WO03/020217, WO03/026647, WO03/026648, WO03/027069, WO03/027076, WO03/027114, WO03/037332, WO03/040107, WO03/086940, WO03/084943 и EP658546;

(g) Антагонисты рецептора CB1, такие как аналоги 1,5-диарилпиразола, такие как римонабант (SR141716, Acomplia®, Bethin®, Monaslim®, Remonabent®, Riobant®, Slimona®, Rimoslim®, Zimulti® и Riomont®), суринабант (SR147778) и AM251; 3,4-диарилпиразолины, такие как SLV-319 (ибипинабант); 4,5-диарилимидазолы; 1,5-диарилпиррол-3-карбоксамиды, бициклические производные диарилпиразола и имидазолов, такие как CP-945,598 (отенабант); производные метилсульфонамид азетидина; TM38837; бета-лактамы модуляторы каннабиноидов; производные

бензофурана. Антагонисты рецептора CB1 могут включать или исключать аналоги 1,5-диарилпиразола, такие как римонабант (SR141716, Acomplia[®], Bethin[®], Monaslim[®], Remonabent[®], Riobant[®], Slimona[®], Rimoslim[®], Zimulti[®] и Riomont[®]), суринабант (SR147778) и AM251; 3,4-диарилпиразолины, такие как SLV-319 (ibipinabant); 4,5-диарилимидазолы; 1,5-диарилпиррол-3-карбоксамида, бициклические производные диарилпиразола и имидазолов, такие как CP-945,598 (отенабант); производные метилсульфонамид азетидина; TM38837; бета-лактамы модуляторы каннабиноидов; и производные бензофурана.

Фармацевтические композиции

Соединение, например, малая молекула, лиганд, антитело, антигенсвязывающее средство или фрагмент связывающего антитела, которое ингибирует агонистическое взаимодействие комплекса глюкагона/аР2 с GCGR, применяемое в лечении и/или профилактике патологического состояния, могут вводить в эффективном количестве в виде фармацевтической композиции, включающей соединение в комбинации с одним или более из фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, разбавителя или носителя. Композиция обычно будет поставляться как часть стерильной, фармацевтической композиции, которая будет обычно включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно включать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Соединение, нарушающее агонистическое взаимодействие комплекса глюкагона/аР2 с GCGR, может быть единственным действующим веществом в фармацевтической композиции или может присутствовать в комбинации с другими действующими веществами, включающими другие компоненты.

Фармацевтические композиции предпочтительно включают терапевтически эффективное количество соединения, которое блокирует агонистическое взаимодействие комплекса глюкагона/аР2 с GCGR. Термин "терапевтически эффективное количество" при использовании в настоящем документе относится к количеству терапевтического средства, требуемому для ингибирования

агонистического взаимодействия комплекса глюкагона/аР2 с GCGR таким образом, чтобы лечить, облегчать или предотвращать целевое заболевание или состояние, или производить поддающийся обнаружению терапевтический или профилактический эффект, опосредуемый GCGR. Для любого подходящего соединения терапевтически эффективное количество может быть оценено первоначально либо в тестах на культурах клеток, либо в моделях на животных, обычно на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Модель на животных также может использоваться для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация затем может использоваться для определения подходящих доз и путей введения для клинического применения.

Таким образом, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим эффективное количество соединения или фармацевтически приемлемой соли вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем, для любого из применений, описанных в настоящем документе. Фармацевтическая композиция может содержать соединение или соль в качестве единственного действующего вещества или, в альтернативном варианте, соединение и по меньшей мере одно дополнительное действующее вещество.

Вводимая дозировка, конечно, будет изменяться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические показатели конкретного средства, а также его способа и пути введения; возраста, здоровья и веса реципиента; характера и степени выраженности симптомов, типа параллельного лечения, частоты лечения и требуемого эффекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция находится в лекарственной форме, которая содержит от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг или от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг активного соединения и, необязательно, от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг или от

приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг дополнительного действующего вещества в единичной лекарственной форме. Примерами являются лекарственные формы, содержащие по меньшей мере 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 или 750 мг активного соединения или его соли. В качестве неограничивающего примера, лечение опосредованных GCGR патологий у людей или животных может быть предоставлено в виде ежедневного введения дозы моноклональных антител против глюкагона/aP2 согласно настоящему изобретению в количестве 0,1-100 мг/кг, например 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг, в день, по меньшей мере в один из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, или, в альтернативе, по меньшей мере, в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или их любой комбинации, при использовании однократной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа, или их любой комбинации.

Фармацевтическая композиция также может включать молярное отношение активного соединения и дополнительного действующего вещества. Например, фармацевтическая композиция может содержать молярное отношение приблизительно 0,5:1, приблизительно 1:1, приблизительно 2:1, приблизительно 3:1 или от приблизительно 1.5:1 до приблизительно 4:1 противовоспалительного или иммунодепрессивного средства. Соединения, раскрытые в настоящем документе, могут вводить перорально, наружно, парентерально, путем ингаляции или распыления, подъязычно, с помощью имплантата, в том числе глазного имплантата, трансдермально, путем буккального введения, ректально, в виде глазных капель, инъекции, в том числе инъекции склеры, внутривенно, внутриаортально, интракраниально, подкожно, внутрибрюшинно, подкожно, через нос, подъязычно или ректально, или другими способами, в единичных лекарственных формах, содержащих стандартные фармацевтически приемлемые носители.

Фармацевтическая композиция может быть изготовлена в виде любой фармацевтически применимой формы, например, в форме аэрозоля, крема, геля, пилюли, раствора для инъекции или инфузии, капсулы, таблетки, сиропа, трансдермального пластыря, подкожного патча, сухого порошка, лекарственной формы для ингаляции, в медицинском устройстве, суппозитория, лекарственной формы для буккального или подъязычного применения, парентеральной лекарственной формы или глазных капель. Некоторые лекарственные формы, такие как таблетки и капсулы, подразделяются на имеющие подходящий размер стандартные дозы, содержащие подходящие количества действующих веществ, например, эффективное количество для достижения требуемой цели.

Носители включают вспомогательные вещества и разбавители и должны иметь достаточно высокую чистоту и достаточно низкую токсичность, чтобы их можно было применять для введения пациенту, подвергаемому лечению. Носитель может быть инертным, или он сам может обладать фармацевтическими преимуществами. Количество носителя, применяемого в сочетании с соединением, является достаточным, чтобы обеспечить практическое количество материала для введения с каждой единичной дозой соединения.

Классы носителей включают, без ограничения перечисленными, связующие вещества, буферные вещества, красящие вещества, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, вкусовые добавки, скользящие вещества, смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, таблетирующие вещества и смачивающие вещества. Некоторые носители могут быть перечислены больше чем в одном классе, например, растительное масло может использоваться в качестве смазывающего вещества в некоторых лекарственных формах и разбавителя в других. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают сахара, крахмалы, целлюлозы, порошок трагаканта, солод, желатин; тальк и растительные масла. В фармацевтическую композицию могут быть включены необязательные действующие вещества, которые по существу не оказывают негативного влияния на активность соединения согласно настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции/комбинации могут быть

изготовлены для перорального введения. Эти композиции могут содержать любое количество активного соединения, которое обеспечивает достижение требуемого результата, например, от 0,1 до 99% по весу (вес. %) соединения и обычно по меньшей мере приблизительно 5 вес.% соединения. Некоторые варианты осуществления содержат от приблизительно 25 вес.% до приблизительно 50 вес.% или от приблизительно 5 вес.% до приблизительно 75 вес.% соединения.

Лекарственные формы, подходящие для ректального введения, как правило, представлены в форме суппозиториев единичной дозы. Они могут быть изготовлены путем смешивания активного соединения с одним или более стандартными твердыми носителями, например, маслом какао, и последующего формования полученной смеси.

Лекарственные формы, подходящие для наружного применения на коже, предпочтительно изготовлены в форме мази, крема, лосьона, пасты, геля, спрея, аэрозоля или масла. Носители, которые могут применяться, включают вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, спирты, усилители трансдермального проникновения и комбинации двух или более перечисленных.

Лекарственные формы, подходящие для трансдермального введения, могут быть представлены в виде дискретных пластырей, которые могут оставаться в непосредственном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного времени. Композиции, подходящие для трансдермального введения, также могут быть доставлены с помощью ионтофореза (см., например, *Pharmaceutical Research* 3 (6):318 (1986)) и обычно изготовлены в форме необязательно забуференного водного раствора активного соединения. В одном варианте осуществления предусмотрены микроигольные пластыри или устройства для доставки лекарственных средств через или в биологическую ткань, в частности в кожу. Микроигольные пластыри или устройства обеспечивают доставку лекарственных средств с клинически соответствующей скоростью через или в кожу, или другие тканевые барьеры, с минимальным повреждением или без повреждения, болью или раздражением ткани.

Композиции, подходящие для введения в легкие, можно доставлять с применением целого ряда пассивных, работающих от

силы вдоха, и активных механических ингаляторов сухого порошка (DPI) для введения однократной дозы/многократных доз. Устройства, наиболее часто используемые для респираторной доставки, включают небулайзеры, дозирующие ингаляторы и ингаляторы сухого порошка. Доступны несколько типов небулайзеров, в том числе струйные небулайзеры, ультразвуковые небулайзеры и небулайзеры с вибрирующей сеткой. Выбор подходящего устройства для доставки в легкие зависит от таких параметров, как природа лекарственного средства и его лекарственная форма, участок действия и патофизиология легкого, дозированная форма, содержащая заранее определенное количество действующего вещества согласно изобретению на дозу.

Предпочтительно уровни агонистического взаимодействия глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR *in vivo* могут поддерживать на соответственно сниженном уровне путем введения последовательных доз соединения, которое блокирует агонистическое взаимодействие глюкагона/ $\alpha P2$ с GCGR согласно настоящему описанию.

Композиции могут вводить пациенту отдельно или могут быть вводить в комбинации (например, одновременно, последовательно или раздельно) с другими веществами, лекарственными средствами или гормонами.

В одном варианте осуществления соединение вводят непрерывно, например, соединение могут вводить с помощью безыгольного подкожного инъектора, такого как устройства, раскрытые, например, в патентах США 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 или 4,596,556. Примеры имплантатов и модулей, применимых в настоящем изобретении, включают: патент США 4,487,603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США 4,486,194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США 4,447,233, в котором раскрыт инфузионный насос для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США 4,447,224, в котором раскрыто имплантируемое инфузионное устройство переменного потока для непрерывной доставки лекарственного

средства; патент США 4,439,196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств, имеющая многокамерные отделения; и патент США 4,475,196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств. Известны многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули.

ПРИМЕРЫ

Дисрегуляция активности глюкагона и повышенные уровни глюкозы в крови, приводящие к хронической гипергликемии, вовлечены в патологию многих нарушений обмена веществ, таких как диабет.

Пример 1: Циркулирующий аР2 непосредственно взаимодействует с глюкагоном и необходим для биологических активностей глюкагона

Материалы

Синтез всех ДНК и олигонуклеотидов выполняли в IDT DNA Technologies. L-169,047 (Антагонист рецептора глюкагона II) приобретали в Tocris Biosciences. Все остальные реактивы и химикаты приобретали в Sigma-Aldrich и использовали в состоянии поставки за исключением случаев, где указано иное.

Измерения методом биослойной интерферометрии (BLI)

Аффинность связывания аР2 с биотином-глюкагоном измеряли с помощью системы биослойной интерферометрии BLItz (BLI, Fortebio Inc.) при 25°C. Биослойная интерферометрия измеряет изменение интерференционной картины света при связывании лиганда в растворе с иммобилизованной мишенью на биосенсорном элементе, с получением кажущейся K_d . Коротко, на кинетические биосенсорные элементы со стрептавидином BLItz Dip and Read™ (Fortebio Inc.) наносили 20 мкг/мл биотинилированного глюкагона в буфере PBS, промывали в буфере PBS и снимали базовые показания в течение 30 секунд в PBS. Снятие показаний фазы ассоциации для аР2 проводили в течение 200 секунд при концентрациях 3,4 мкМ и 34 мкМ в PBS с последующей фазой диссоциации в том же буфере в течение 300 секунд. Константу диссоциации получали путем глобальной аппроксимации кривой откликов с получением значения k_{on} и значения k_{off} , которые затем использовали для вычисления $K_{d_{app}}$. Фоновое связывание (кажущиеся аффинности) аР2,

взаимодействующего с сенсорами, на которые наносили имитацию образца, составляло менее 2% от связывания с зондами, на которые наносили альбумин, после чего фоновое связывание вычитали из общего связывания.

Сцинтилляционные анализы сближения

aP2 биотинилировали при использовании набора для аминокреативного биотинилирования Pierce. Меченный ^{125}I глюкагон (Perkin Elmer) инкубировали в покрытых стрептавидином планшетах FlashPlate (Perkin Elmer) в 5 mM MgCl_2 , 1 mM олеиновой кислоты, 5% глицерина PBS буфера в течение одного часа перед считыванием в BetaLux (Perkin Elmer).

Плазмиды и вирусные конструкции

Конструкцию человеческого глюкагонового рецептора-GFP приобретали в Origene. цАМФ-чувствительный элемент конструкции люциферазы клонировали путем амплификации четырех tandemных повторов цАМФ-чувствительного элемента, клонированного на проксимальном сайте минимального базального репортера nano-Luc. цАМФ-LUC аденовирус для первичных гепатоцитов приобретали в Vector Biolabs. Внеклеточный домен GCGR клонировали в челночный вектор pFastBac. Во время клонирования гексагистидин и протеазный сайты WELQ добавляли для очистки белка. Ген мышинового aP2 клонировали в вектор pet21+ после гексагистидиновой метки и протеазного сайта TEV для удобства очистки.

Выделение РНК и количественная ПЦР

РНК выделяли при использовании реактива Trizol (Invitrogen) согласно инструкциям производителя и количественную ПЦР проводили при использовании ранее опубликованных последовательностей праймеров (Cao et al., Cell Metab. 2013 May 7;17(5):768-778).

Животные и клетки

Животных содержали в виварии Гарвардского университета под контролем Министерства сельского хозяйства США в соответствии с федеральными, государственными, местными рекомендациями и рекомендациями NIH по уходу за животными. Самцов мышей C57BL/6 (10-12 недель) приобретали в Jackson Laboratory. Клетки HepG2-S3A получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Клетки культивировали в полной среде (DMEM, 4,5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Atlanta Bio)) с пируватом натрия МЕМ (1 мМ). Первичные гепатоциты выделяли у мышей C57BL/6J и культивировали с 100 Ед/мл пенициллина G натриевой соли и 100 мкг/мл стрептомицина (Pen/Strep). Клетки CHO/K1 культивировали в DMEM:F12 с 5% телячьей сыворотке Cosmic (Thermo Scientific). Все добавки для сред приобретали в Invitrogen.

Трансфекция клеток, получение стабильных клеточных линий и вирусная инфекция

Плазмиды трансфицировали при использовании Lipofectamine (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Транзиентно трансфицированные клетки выращивали с подходящей селекцией на антибиотиках в соответствующих случаях, для стабильного получения клеточных линий. После трех пассажей в селективных средах, одиночные колонии клеток отбирали и размножали для экспериментов после проверки.

Статистический анализ

На всех графиках показаны средние значения, и планки погрешностей указывают SEM для линейных графиков и SD для гистограмм. Сравнения средних значений для двух групп выполняли при использовании непарного *t*-критерия Стьюдента, если не указано иное. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным критерием Бонферрони использовали для сравнения >2 групп. Стандартный анализ повторных измерений проводили, если у одного животного проводили несколько измерений. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001, ns 'незначимый', если не указано иное. Статистический анализ выполняли при использовании программы GraphPad Prism v6.0 (San Diego, CA).

αP2 синергически активирует глюконеогенное программирование действий глюкагона

Хорошо известно, что гормоны, контррегулирующие гипогликемию, в основном глюкагон, адреналин, кортизол и гормон роста, действуют синергически и имеют общий бета-адренергический стимул для секреции (Bolli et al., Diabetes. 1982 Jul; 31(7):641-647). Также было отмечено, что липолитические сигналы после бета-адренергической активации способствуют такой

синергической активности (Souza et al., Braz J Med Biol Res. 1994 Dec; 27(12):2883-2887), однако инфузии липидов не приводят к этому (Haywood et al., Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Jul; 297(1): E50-56; и Antoniades et al., The Lancet. 1967 Mar; 289(7490):602-604), что позволяет предполагать, что полученный из жировой ткани фактор может уменьшать такие эффекты. Поскольку уровни циркулирующего $\alpha P2$ регулируются бета-адренергической сигнализацией (Cao et al., Cell Metab. 2013 May 7;17(5):768-778) и способствуют продукции глюкозы в печени (Cao et al., Cell Metab. 2013 May 7;17(5):768-778), предположили, что $\alpha P2$ синергически действует с глюкагоном, активируя продукцию глюкозы в печени.

Чтобы непосредственно проверить эту гипотезу, сначала исследовали эффекты основного контррегуляторного гормона инсулина, глюкагона, и комбинированное действие $\alpha P2$ и глюкагона в выделенных первичных гепатоцитах (Фигуры 1A и 1B). В таких условиях добавление $\alpha P2$ к глюкагону дополнительно увеличивало экспрессию глюконеогенных генов по сравнению с одним глюкагоном. Без ограничения какой-либо одной теорией, это подтверждает синергическую роль $\alpha P2$ в глюконеогенном программировании. Эта глюконеогенная экспрессия генов также согласуется с функциональными анализами, в которых продукция глюкозы в печени в первичных гепатоцитах (Фигура 1C) и гликогенолиз в линии клеток гепатомы (Фигура 1D) увеличиваются за счет синергического взаимодействия $\alpha P2$ с глюкагоном. Для дальнейшего изучения событий нисходящей сигнализации, вовлеченных в процесс, и для изучения влияния $\alpha P2$ на активность глюкагона, в клетках CHO-K1 сконструировали цАМФ-репортерную систему, экспрессирующую человеческий глюкагоновый рецептор. Как видно на Фигуре 1E, добавление $\alpha P2$ повышает активность глюкагона более чем на один порядок ($\text{Log}_{10} \text{EC}_{50}$ глюкагона $-8,215 \pm 0,1556$; глюкагон+ $\alpha P2$ $-9,698 \pm 0,1448 \text{ M} \pm \text{S.E.M.}$). Это наблюдение также согласуется с результатами в первичных гепатоцитах, когда активность цАМФ исследовали с использованием аденовирус-опосредованной цАМФ-репортерной люциферазы (Фигура 1F).

аР2 – аллостерический энхансер глюкагонового рецептора.

С учетом способности аР2 усиливать передачу сигнала глюкагона и метаболические активности, провели дальнейшие исследования с целью определить, играет ли аР2 вышестоящую роль в активации глюкагонового рецептора. Использовали анализ с репортером, направляемым промотором G6Pc. Как показано на Фигуре 2А, синергическое воздействие аР2 и глюкагона на активность промотора G6Pc присутствует только в том случае, когда репортерную плазмиду котрансфицируют с глюкагоновым рецептором. При использовании бакуловирусной системы экспрессии исследовали, может ли аР2 действовать как аллостерический энхансер для глюкагона на его рецепторе. Экспрессировали внеклеточный домен GCGR (GCGR-ecd) (Wu et al., Protein Expr Purif. 2013 Jun; 89(2):232-240), и влияние аР2 на кинетику связывания глюкагона с GCGR-ecd исследовали с использованием системы биослойной интерферометрии BLITZ. Добавление аР2 вызывало значимое увеличение скорости ассоциации и уменьшение скорости диссоциации глюкагона с GCGR-ecd (Фигура 2В), что приводило к уменьшению константы диссоциации на порядок величины ($K_{d_{app}}$ глюкагона $1,76e-007M$; $K_{d_{app}}$ глюкагона+аР2 $5,41e-008M$). Эти результаты согласуются с эффектом, который наблюдали для активности цАМФ *in vitro*. Без ограничения какой-либо одной теорией, это обеспечивает прямое подтверждение повышенной активности глюкагона в присутствии аР2 (Фигура 1Е). Для дальнейшего понимания роли аР2 как аллостерического модулятора активности глюкагона, аллостерический ингибитор глюкагонового рецептора, L-168,049 (Cascieri et al., J Biol Chem. 1999 Mar 26;274(13):8694-8697) оценивали на его способность ингибировать активность аР2. Добавление L-168,049 уменьшало синергическое воздействие аР2 на активность глюкагона на глюкагоновом рецепторе (Фигуры 2С и 2D). Добавление L-168,049 также вызывало потерю способности отвечать на аР2 и глюкагон. Без ограничения какой-либо одной теорией, это указывает, что аР2 может связываться с аллостерическим сайтом глюкагонового рецептора (Фигуры 2Е и 2F).

аР2 непосредственно взаимодействует с глюкагоном

Чтобы понять механизмы, с помощью которых аР2 усиливает

действие глюкагона, изучали возможность физического взаимодействия аР2 и глюкагона. Использовали серию анализов связывания. Сначала, при использовании биослойной интерферометрии, было продемонстрировано прямое взаимодействие аР2 с биотинилированным глюкагоном (Фигура 3А). Затем использовали сцинтилляционный анализ сближения, в котором ^{125}I -глюкагон взаимодействовал с биотинилированным аР2 (Фигура 3В). При использовании этих дополнительно меченых белков были получены аналогичные аффинности ($K_{d_{app}}$ 2,34 мкМ и 2,62 мкМ, соответственно). Для дальнейшего изучения этого белок-пептидного взаимодействия в системе без меток, в качестве золотого стандарта анализа связывания использовали изотермическую титрационную калориметрию, в которой измеряют тепло, выделяемое при связывании в растворе. Этот подход позволил выявить прямое связывание глюкагона/аР2 (Фигура 3С). Эти измерения также согласуются с ранее описанными исследованиями связывания. Чтобы определить физиологическую значимость этого взаимодействия, сначала предприняли попытку удалить эндогенный комплекс из кровотока. После инкубирования с магнитными гранулами, покрытыми антителом против аР2, сигнал глюкагона был обнаружен в сыворотке мышей дикого типа при использовании HRP-конъюгированного антитела против глюкагона (Фигура 3D, 3Е и 3F). В отсутствие аР2 (аР2^{-/-} сыворотка или обедненная антителом сыворотка дикого типа) наблюдали минимальную величину сигнала глюкагона (неотличимого от сигнала неспецифического связывания). Добавление рекомбинантного аР2 в аР2^{-/-} сыворотку приводило к значимо более высокому сигналу глюкагона, обнаруживаемому антителами против аР2, но не достигало статистической значимости. Эти результаты не зависели от соответствующих уровней глюкагона в сыворотке дикого типа и аР2^{-/-} сыворотке (189±20, 210±41 пг/мл, соответственно). Кроме того, биотинилированный глюкагон использовали в качестве ловушки для удаления эндогенного аР2 из сыворотки дикого типа и аР2^{-/-} сыворотки (Фигура 3М). В совокупности и без ограничения какой-либо одной теорией, эти результаты показывают, что способность аР2 связывать глюкагон

имеет физиологическое значение, и что комплекс глюкагона/белка $\alpha P2$ существует в естественных условиях. Микромасштабный термофорез (MST), который позволяет проводить анализ взаимодействия биомолекул с помощью термофореза, подтвердил отсутствие дополнительных адапторных белков *in vivo*. Изменения свойств молекул (например, размера, заряда и энтропии сольватации молекул) в результате связывания между молекулами изменяют термофорез молекул. MST позволяет измерять аффинность связывания между молекулами на основе термофоретического движения молекул при измерении взаимодействия непосредственно в растворе, без иммобилизации молекул на поверхности. При помощи MST было показано, что $\alpha P2$ связывается с глюкагоном (K_d приблизительно 214 нМ), глюкагон связывается с глюкагоновым рецептором (K_d приблизительно 36,7 нМ), и $\alpha P2$ связывается с глюкагоновым рецептором (K_d от приблизительно 15,4 до приблизительно 120 нМ) (Фигуры 5A-ED).

Чтобы дать исходную точку возможных остатков взаимодействия, инструменты биоинформатики использовали для введения точечных мутаций. Для абсолютно непредвзятого прогноза использовали несколько алгоритмов прогнозирования (Pierce et al., *Bioinformatics*. 2014 Mar 12; Cheng et al., *Proteins*. 2007 Aug 1; 68(2):503-515; Comeau et al., *Bioinformatics*. 2004 Jan 1; 20(1):45-50; and Jimenez-Garcia et al., *Bioinformatics*. 2013 Jul 1; 29(13):1698-1699), чтобы предоставить все возможные схемы прогнозирования. Более того, поскольку было представлено множество кристаллографических конформаций для $\alpha P2$ (LaLonde et al., *Biochemistry*. 1994 Apr 26; 33(16):4885-4895), возможность множественных стехиометрических отношений $\alpha P2$ и глюкагона также включали в поиски. Поскольку разные алгоритмы белок-белковых взаимодействий имеют разную эффективность прогнозирования различных третичных структур (Janin et al., *Proteins*. 2003 Jul 1; 52(1):2-9), подтверждали известные структуры $\alpha P2$ и глюкагона с известными партнерами по связыванию. Было обнаружено, что все три сервера, используемые для прогноза, предсказывали связывание $\alpha P2$ с глюкагоном со среднеквадратичным отклонением с 99,7% достоверностью или выше, что указывает на то, что прогнозы по

серверам будут давать результат, максимально приближенный к наблюдаемому взаимодействию. Из ~14000 прогнозов, сгенерированных между тремя серверами и двумя возможными коэффициентами взаимодействия, сервер CONS-COCOMAPS (Vangone et al., Bioinformatics. 2011 Aug 27; btr484) использовали для отображения частоты распределения возможных сайтов взаимодействия (Фигура 6C). Первая альфа-спираль и сайт Phe57 были идентифицированы в качестве потенциальных сайтов взаимодействия. Для дальнейшего выявления потенциальных сайтов взаимодействия был получен тройной мутант aP2 с тремя точечными мутациями (N59, E61 и K79). Кривые связывания строили с использованием человеческого aP2, мутантного aP2 с глюкогоном и антитела против aP2. Было показано, что этот мутантный белок обладает более низкой аффинностью связывания согласно измерению с помощью системы Octet (Фигуры 3G-3J). Кроме того, были получены усеченные варианты белка глюкогона, и было исследовано связывание с aP2 у мышей дикого типа и у aP2^{-/-} мышей. В этих экспериментах было показано, что остатки 22-29 глюкогона важны для связывания aP2 (Фигура 3L).

Для определения роли aP2 в связывании глюкогона с GCGR, обогащенные фракции плазматической мембраны из печени мышей дикого типа и GCGR-дефицитных мышей (GCGR^{fl/fl-Alb Cre}) выделяли с помощью дифференциального центрифугирования. Плазматическую мембрану инкубировали с фиксированной концентрацией биотинилированного глюкогона (20 нМ) и повышаемыми количествами aP2. Затем плазматическую мембрану и +/-aP2 и глюкогон инкубировали в планшетах, покрытых агглютинином зародышей пшеницы, после чего тщательно промывали для удаления несвязавшихся белков. HRP-конъюгированный стрептавидин использовали для обнаружения глюкогона (Фигура 4A). Чтобы показать, что для связывания глюкогона с рецептором GCGR требуется aP2 *in vivo*, меченный ¹²⁵I глюкогон вводили в портальную вену мышам дикого типа, aP2^{-/-} (с рекомбинантным aP2 и без него) и мышам GCGR^{fl/fl-Alb Cre}. Животных умерщвляли и перфузировали холодным PBS в течение 5 минут транскардиально, через 5 минут после введения. Органы собирали в конце перфузии,

расщепляли и считывали радиацию с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (Фигура 4B, 4C, 4D и 4E). Как показано на Фигуре 4F, аР2 увеличивает связывание GCGR-ecd с глюкагоном. Также проводили эксперименты с удалением. Удаление аР2 производили при использовании GCGR в качестве ловушки. Печень мышей дикого типа гомогенизировали в буфере для лизиса и инкубировали в течение ночи с рекомбинантным антителом к аР2 (10 мкг), глюкагону (1 мкг) и GCGR, связанным с магнитными гранулами. После центрифугирования измеряли сигнал аР2, глюкагона и глюкагона+аР2 в осадке и супернатанте (Фигура 4G и 4H). Затем GCGR удаляли при использовании биотинилированного глюкагона в качестве ловушки. Печень мышей дикого типа гомогенизировали в буфере для лизиса и инкубировали в течение ночи с рекомбинантным аР2 (10 мкг), биотин-глюкагоном (1 мкг) и магнитными гранулами, связанными с нейтравидином. Сигнал GCGR измеряли, и было показано, что он значительно выше с аР2 (Фигура 4I).

аР2 необходим для активности глюкагона *in vivo*

Глюкагон вводили мышам с дефицитом аР2 и мышам дикого типа и контролировали их гликемию в качестве показателя активности глюкагона (Gelling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003 Feb 4; 100(3):1438-1443). Неожиданно, но животные с дефицитом аР2 практически не реагировали на введение глюкагона и аР2 по отдельности, тогда как одновременная инъекция глюкагона и рекомбинантного аР2 мышам с нокаутом аР2 могла восстанавливать чувствительность к глюкагону (Фигуры 7A, 7B). На Фигурах 7G и 7H показан глюкозотолерантный тест у мышей с нокаутом аР2 и мышей дикого типа, получавших PBS, глюкагон или глюкагон и аР2. Без ограничения какой-либо одной теорией, это показывает, что мыши с нокаутом аР2 реагируют только на введение глюкагона с добавлением аР2. Никакого различия в содержании гликогена в печени на исходном уровне или экспрессии глюкагонового рецептора (Фигуры 7C, 7E и 7I) в печени мышей аР2^{-/-} не наблюдали, за исключением характерных дефектов в передаче сигнала глюкагона или содержании гликогена. На Фигуре 7J показан гликоген, оставшийся на момент усыпления. По сравнению с исходными

измерениями, отклонение уровня глюкозы, наблюдаемое на Фигуре 7G, связано с расщепление гликогена. Кроме того, после введения глюкагона уровни циркулирующего глюкагона достигали уровней, превышающих физиологические, как у мышей WT, так и у мышей с $\alpha P2$ -KO, исключая быструю деградацию или снижение биодоступности глюкагона в качестве объяснения слабого действия глюкагона у мышей с $\alpha P2$ -KO (неопубликованные результаты). Кроме того, активность DPP4, основной пептидазы глюкагона (Hinke et al., J Biol Chem. 2000 Feb 11; 275(6):3827-3834), не была повышена в сыворотках мышей с $\alpha P2$ -KO, что также исключает сценарий быстрой деградации (ФИГ. 7D). Кроме того, фармакологические дозы глюкагона в условиях панкреатического клэмпа вводили с базальными уровнями инсулина через катетер в яремную вену (Фигура 7F). В этих условиях у животных дикого типа наблюдали постоянное повышение уровня глюкозы в крови по сравнению с их нечувствительными однопаметными животными, дефицитными по $\alpha P2$, несмотря на увеличение гликемии в начале исследования. В совокупности и без ограничения какой-либо одной теорией, эти результаты исключают нарушения функции печени в качестве вероятного механизма гипореактивности по отношению к глюкагону, наблюдаемой у мышей с дефицитом $\alpha P2$.

Наконец, исследования гиперинсулинемического-панкреатического клэмпа проводили для измерения контррегуляторной активности глюкагона, $\alpha P2$ и глюкагона/ $\alpha P2$ на фоне дефицита $\alpha P2$ (Фигура 8A). На этой схеме значительного повышения продукции глюкозы в печени при введении только глюкагона или $\alpha P2$ по сравнению с введением растворителя не наблюдали, тогда как одновременное введение $\alpha P2$ и глюкагона полностью восстанавливало контррегуляторный ответ на инсулин. Кроме того, было показано, что даже при постоянной инфузии глюкагона у мышей с дефицитом $\alpha P2$ не происходит продукции глюкозы в ответ на глюкагон, что показывает, что $\alpha P2$ необходим для активности глюкагона *in vivo* (Фигура 8B).

Пример 2: Получение примерного моноклонального антитела, направленного против секретируемого $\alpha P2$ /комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$.

Животные

Уход за животными и экспериментальные процедуры выполняли с одобрения комиссии по уходу за животными Гарвардского университета. Самцов мышей (лептин-дефицитных мышей (ob/ob) и мышей с алиментарным ожирением (DIO) с фоном C57BL/6J) приобретали в Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) и содержали в условиях 12-часового цикла света/темноты. Мышей DIO с фоном C57BL/6J содержали на рационе с высоким содержанием жира (60% ккал жира, Research Diets, Inc., D12492i) в течение 12-15 недель до начала лечения, за исключением клэмп-исследований, для которых их держали на HFD в течение 20 недель. Лептин-дефицитных мышей (ob/ob) содержали на обычном рационе (RD, PicoLab 5058 Lab Diet). Используемые животные имели возраст от 18 до 31 недели для алиментарных моделей и от 9 до 12 недель для модели ob/ob. Во всех экспериментах использовали по меньшей мере 7 мышей в каждой группе, если в тексте не указано иное. Мыши получали 150 мкл PBS (растворитель) или 1,5 мг/мышь (~33 мг/кг) моноклонального антитела против $\alpha P2$ в 150 мкл PBS путем введения два раза в неделю подкожных инъекций в течение 3-5 недель. До и после введения производили забор крови из хвоста через 6 часов дневного ограничения питания. Вес тела измеряли еженедельно после еды. Уровни глюкозы в крови измеряли еженедельно после 6 часов ограничения питания или утром натощак через 16 часов после еды. Через 2 недели лечения проводили тесты на толерантность к глюкозе путем внутрибрюшинных инъекций глюкозы (0,75 г/кг для DIO, 0,5 г/кг для мышей ob/ob). Через 3 недели лечения у мышей DIO проводили тесты на толерантность к инсулину путем внутрибрюшинных инъекций инсулина (0,75 МЕ/кг). После 5 недель лечения проводили эксперименты с гиперинсулинемическим-эугликемическим клэмпом на мышцах DIO, как описано ранее (Furuhashi et al., (2007) Nature 447, 959-965; Maeda et al., (2005) Cell metabolism 1, 107-119).

В метаболической клетке (Oxymax, Columbus Instruments) проводили измерение общей жировой массы с помощью двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA; PIXImus), как описано ранее (Furuhashi et al., (2007) Nature

447, 959-965).

Получение и введение антител против аР2/комплекса глюкогона/белка аР2

CA13, CA15, CA23 и CA33 (кроличье антитело 909) получали и очищали в UCS. Белых новозеландских кроликов иммунизировали смесью, содержащей рекомбинантный человеческий и мышинный аР2 (полученный в собственной лаборатории в *E.coli*: рег. номера CAG33184.1 и CAJ18597.1, соответственно). Спленоциты, моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) и костный мозг получали от иммунизированных кроликов и хранили при -80°C . Культуры В-клеток иммунизированных животных получали при использовании метода, подобного описанному в Zubler et al., "Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction", J Immunol 134, 3662-3668 (1985). После 7-дневного инкубирования, лунки, содержащие антигенспецифичные антитела, определяли при использовании гомогенного иммунофлуоресцентного анализа с биотинилированным мышинным или человеческим аР2, иммобилизованным на сферах SuperavidinTM (Bangs Laboratories), и Fcγ-специфичного конъюгата Cy-5 антитела козы против IgG кролика (Jackson ImmunoResearch). Для определения, выделения и получения антигенспецифичной В-клетки из представляющих интерес лунок использовали метод флуоресцентных фокусов (Clargo et al., (2014) mAbs 6, 143-159). Этот метод включал сбор В-клеток из положительной лунки и смешивание с парамагнитными стрептавидиновыми сферами (New England Biolabs), покрытыми биотинилированным мышинным и человеческим аР2, и Fc-фрагмент-специфичным ФИТЦ-конъюгатом антитела козы против кролика (Jackson ImmunoResearch). После статического инкубирования при 37°C в течение 1 ч, антигенспецифичные В-клетки можно было определять по присутствию флуоресцентного ореола, окружающего такую В-клетку. Индивидуальные антигенспецифичные антителосекретирующие В-клетки наблюдали с помощью микроскопа Olympus IX70, отбирали с помощью микроманипулятора Eppendorf и помещали в ПЦР-пробирку. Гены варибельной области из этих одиночных В-клеток получали с

помощью ОТ-ПЦР при использовании праймеров, специфичных к переменным областям тяжелой и легкой цепи. Проводили два раунда ПЦР с вложенной 2° ПЦР, вводящей сайты рестрикции на 3' и 5'-концах, позволяющие клонирование переменной области в различные векторы экспрессии: мышинный $\gamma 1$ IgG, мышинный Fab, кроличий $\gamma 1$ IgG (VH) или мышинная каппа и кроличья каппа (VL). Конструкции тяжелых и легких цепей трансфицировали в клетки HEK-293 при использовании Fectin 293 (Invitrogen) и рекомбинантное антитело экспрессировали в 6-луночных планшетах. После 5 дней экспрессии собирали супернатанты и антитело подвергали дальнейшему скринингу с помощью анализа биомолекулярного взаимодействия при использовании системы BioCore для определения аффинности и эпитопной группы.

Мышиное моноклональное антитело H3 против aP2 была получено в Центральной лаборатории антител Института онкологии Даны-Фарбера. Самок мышей C57BL/6 aP2^{-/-}, 4-6 недель, иммунизировали инъекцией полноразмерного человеческого рекомбинантного белка aP2/FABP4-Gst, суспендированного в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) и эмульгированного с равным объемом полного адъюванта Фрейнда (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Селезенку забирали у иммунизированных мышей, приготавливали суспензии клеток и промывали PBS. Клетки селезенки подсчитывали и смешивали клетками миеломы SP 2/0 (ATCC CRL8-006, Rockville, MD), которые не могут секретировать тяжелые или легкие цепи иммуноглобулинов (Kearney et al., (1979) Journal of Immunology 123, 1548-1550), при соотношении селезенка:миелома 2:1. Клетки подвергали слиянию с использованием полиэтиленгликоля 1450 (ATCC) в 12 96-луночных планшетах для культур тканей в селективной среде HAT согласно стандартным методикам (Kohler et al., (1975) Nature 256, 495-497). Между 10 и 21 днем после слияния, колонии гибридом стали видимыми, и супернатанты культур собирали, после чего подвергали скринингу с помощью Вестерн-блоттинга на strep-His-human-aP2/FABP4. Вторичный скрининг 17 отобранных положительных лунок проводили при использовании 96-луночных планшетов EIA с высоким

связыванием белков (Costar/Corning, Inc. Corning, NY), покрытых 50 мкл/лунка 2 мкг/мл раствором (0,1 мкг/лунка) strep-His-human-aP2/FABP4 или нерелевантным Gst-белком и инкубировали в течение ночи при 4°C.). Положительные гибридомы субклонировали методом серийного разведения и подвергали скринингу с помощью ИФА. Супернатанты слитых клеток изотипировали при использовании набора Isostrip (RocheDiagnostic Corp., Indianapolis, IN).

Крупномасштабные транзистентные трансфекции проводили при использовании созданной в UCB линии клеток CHOSXE и электропоративной платформы экспрессии. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста в среде CDCHO (LifeTech) с добавкой 2 mM GlutaMax при 140 об/мин в шейкере-инкубаторе (Kuhner AG, Birsfelden, Switzerland) в присутствии 8% CO₂ при 37°C. Перед трансфекцией количество и жизнеспособность клеток определяли при использовании счетчика клеток CEDEX (Innovatis AG, Bielefeld, Германия) и 2×10⁸ клеток/мл центрифугировали при 1400 об/мин в течение 10 минут. Осажденные клетки промывали в буфере Hyclone MaxCyte (Thermo Scientific) и повторно центрифугировали еще 10 минут, после чего осадки снова ресуспендировали при плотности 2×10⁸ клеток/мл в свежем буфере. Затем добавляли плазмидную ДНК, очищенную при использовании набора QIAGEN Plasmid Plus Giga Kit®, в концентрации 400 мкг/мл. После электропорации при использовании прибора для проточной электропорации Maxcyte STX®, клетки переносили в среду ProCHO (Lonza), содержащую 2 mM GlutaMax и раствор антибиотика-антимитотического средства, и культивировали в пакете Wave (Cell Bag, GE Healthcare), помещенном на платформу биореактора, установленную на 37°C и 5% CO₂ с волновым движением, вызванным качанием при 25 об/мин.

Через двадцать четыре часа после трансфекции быстро добавляли подпитку и снижали температуру до 32°C, которую поддерживали в течение всего периода культивирования (12-14 дней). На 4 день к культуре добавляли 3 mM бутирата натрия (натриевой соли н-масляной кислоты, Sigma B-5887). В день 14 культуры центрифугировали в течение 30 минут при 4000 об/мин и полученные супернатанты фильтровали через фильтр 0,22 мкм SARTO

BRAN-P (Millipore), затем фильтр Gamma Gold 0,22 мкм. Собранные клетки CHOSXE, экспрессирующие мышинное моноклональное антитело (мАТ), кондиционировали добавлением NaCl (до 4 М). Образец наносили на колонку с белком A MabSelect Sure (GE-Health), уравновешенную 0,1 М глицином+4 М NaCl, pH 8,5, при 15 мл/мин. Образец промывали 0,1 М глицином+4 М NaCl, pH 8,5, и проводили дополнительную стадию промывки 0,15 М Na₂HPO₄, pH 9. Пик поглощения в УФ-области при A280 нм собирали при элюировании с колонки, используя в качестве элюирующего буфера 0,1 М цитрат натрия, pH 3,4. и затем нейтрализовали до pH 7,4 добавлением 2М трис-HCl, pH 8,5. Пул мАТ с белка А затем концентрировали до подходящего объема при использовании миниколонки для тангенциальной фильтрации Tangential Flow Filtration device с последующей очисткой на колонке для препаративной гель-фильтрации HiLoad XK 50/60 Superdex 200 (GE-healthcare). Собранные фракции затем исследовали методом аналитической гель-фильтрации на присутствие пика мономера и фракции чистого мономера объединяли в пулы в качестве конечного продукта. Образец конечного продукта затем исследовали с помощью ДСН-ПААГЭ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а также аналитической гель-фильтрации для окончательной проверки чистоты. Анализ образца на присутствие эндотоксинов при использовании метода LAL для измерения эндотоксинов показал отрицательный результат. В качестве конечного буфера для всех исследуемых мАТ использовали PBS. Для анализа *in vivo* очищенные антитела разводили в физиологическом растворе до 10 мг/мл и вводили в дозе 1,5 мг/мышь (33 мг/кг) мышам ob/ob и WT, получавшим рацион с высоким содержанием жира.

Измерение аффинности антител

Аффинность связывания антитела к aP2 с aP2 (рекомбинантно полученным в *E.coli*, как описано ниже) определяли с помощью анализа биомолекулярного взаимодействия с использованием системы Biacore T200 (GE Healthcare). AffiniPure, F(ab')₂-фрагмент козы против мышинного IgG, специфичный к Fc-фрагменту (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc.), в 10 mM NaAc буфере, pH 5, иммобилизовали на CM5 Sensor Chip с помощью химии сшивания

аминов до уровня захвата 4500–6000 единиц ответа (RU) с использованием HBS-EP+ (GE Healthcare) в качестве рабочего буфера. IgG против aP2 разводили до 1–10 мкг/мл в рабочем буфере. Для захвата на иммобилизованном антителе против мышинового IgG использовали 60 сек инъекцию IgG против aP2 со скоростью 10 мкл/мин, Fc, затем aP2 титровали с 25 нМ до 3,13 нМ над захваченным антителом к aP2 в течение 180 сек при 30 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 300 сек. Поверхность регенерировали 2×60 сек 40 мМ HCl и 1×30 сек 5 мМ NaOH при 10 мкл/мин. Данные анализировали при использовании программы для анализа данных Biacore T200 (версии 1.0) с использованием модели связывания 1:1 с локальным R_{max}. Для CA33, 60 сек инъекцию антитела при 10 мкл/мин использовали для захвата на иммобилизованном антителе против мышинового IgG, Fc, затем aP2 титровали с 40 мкМ до 0,625 мкМ над захваченным антителом к aP2 в течение 180 сек при 30 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 300 сек. Поверхность регенерировали 1×60 сек 40 мМ HCl, 1×30 сек 5 мМ NaOH и 1×60 сек 40 мМ HCl при 10 мкл/мин. Для определения значений аффинности использовали аппроксимацию в равновесном состоянии.

Перекрестное блокирование антител

Анализ проводили путем инъекции мышинового aP2 в присутствии или в отсутствие мышинового IgG против aP2 над захваченным кроличьим IgG против aP2. Анализ биомолекулярного взаимодействия проводили с использованием Biacore T200 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Супернатанты транзичентно экспрессированного IgG кролика против aP2 захватывали на поверхностях с иммобилизованным антителом против Fc кролика (один супернатант на проточную ячейку) при использовании скорости потока 10 мкл/мин и инъекции в течение 60 сек для получения уровней ответа выше 200RU. Затем мышинный aP2 в концентрации 100 нМ, 0 нМ или мышинный aP2 в концентрации 100 нМ плюс мышинный IgG против aP2 в концентрации 500 нМ пропускали в течение 120 сек с последующей диссоциацией в течение 120 сек. Поверхности регенерировали 2×60 сек 40 мМ HCl и 1×30 сек 5 мМ NaOH.

Перекрестная реактивность FABP

Рекомбинантные человеческие белки aP2 (полученные в UCSB в *E. coli* (метод см. ниже)), hFABP3 (Sino Biological Inc.) и hFABP5/hMal1 (Sino Biological Inc.) биотинилировали в 5-кратном молярном избытке EZ-Link® сульфо-NHS-LC-биотина (Thermo Fisher Scientific) и очищали от несвязавшегося биотина при использовании обессоливающей колонки Zeba (Thermo Fisher Scientific). Все исследования связывания проводили при 25°C с использованием системы ForteBio Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). После начальной стадии в течение 120 сек в PBS, содержащем 0,05% Tween 20, pH 7,4 (PBS-T), на биосенсоры Dip и Read™ стрептавидин (SA) (Pall ForteBio Corp.) наносили биотинилированный рекомбинантный haP2, hFABP3 или hFABP5/hMal1 в концентрации 60 нМ в течение 90 сек. После стадии стабилизации в течение 60 сек в PBS-T, каждый нагруженный FABP биосенсор переносили в образец моноклонального антитела в концентрации 800 нМ и измеряли ассоциацию в течение 5 мин. Затем биосенсоры переносили обратно в PBS-T на 5 мин для измерения диссоциации. Неспецифическое связывание антител контролировали с использованием ненагруженных наконечников биосенсора. Максимальную ассоциацию связывания, то есть после того, как сигнал выходит на плато, минус фоновое связывание, наносили на график для каждой комбинации антитело/FABP.

Экспрессия и очистка aP2

КДНК мышиноного (или человеческого) aP2, оптимизированную для экспрессии в *E. coli*, приобретали в DNA 2.0 (Menlo Park, California) и субклонировали непосредственно в модифицированный вектор pET28a (Novagen), содержащий N-концевую 10 His-метку в единой рамке считывания, с последующим сайтом протеазы из вирус гравировки табака (TEV). Белок экспрессировали в штамме *E. coli* BL21DE3 и очищали следующим образом. Как правило, клетки лизировали в охлаждаемом клеточном дезинтеграторе (Constant Systems Ltd.) в 50 мл лизисного буфера (PBS (pH 7,4), содержащем 20 мМ имидазола) на литр культуры *E. coli*, с добавкой таблетки смеси ингибиторов протеаз без ЭДТА (Roche, Burgess Hill). Затем

лизат осветляли с помощью скоростного центрифугирования (60000 g, 30 минут, 4°C). На 100 мл осветленного лизата добавляли 4 мл/Ni-NTA гранул (Qiagen) и перемешивали в течение 1 ч при 4°C. Гранулы наносили в колонку Tri-Corn (GE Healthcare), подсоединенную к АКТА FPLC (GE Life Sciences) и элюировали белок в буфере, содержащем 250 мМ имидазола. Фракции, содержащие целевой белок согласно гель-электрофорезу в 4-12% Bis/Tris NuPage (Life Technologies Ltd.), подвергали диализу для удаления имидазола и обрабатывали протеазой TEV в соотношении 1 мг на 100 мг белка. После инкубирования в течение ночи при 4°C образец повторно пропускали над гранулами Ni/NTA в колонке Tri-Corn. Немеченый (т.е. расщепленный TEV) белок aP2 не связывался с гранулами и был собран в проскоке с колонки. Белок концентрировали и наносили на гель-фильтрационную колонку S75 26/60 (GE healthcare), предварительно уравновешенную PBS с 1 мМ DTT. Пиковые фракции объединяли и концентрировали до 5 мг/мл. Шесть мл этого белка затем выделяли и осаждали ацетонитрилом в отношении 2:1 для удаления липидов. После центрифугирования при 16000 g в течение 15 мин, ацетонитрил+буфер удаляли для анализа исходного содержания липидов. Осадок денатурированного белка затем ресуспендировали в 6 мл 6М GuHCl PBS+2 мкмоля пальмитиновой кислоты (отношение пальмитиновой кислоты к aP2 5:1) и затем два раза диализировали против 5 л PBS в течение 20 часов при 4°C для проведения рефолдинга. После центрифугирования для удаления осадка (16000 g, 15 минут), белок подвергали гель-фильтрации при использовании колонки S75 26/20 в PBS для удаления агрегатов. Пиковые фракции объединяли в пулы и концентрировали до 13 мг/мл.

Кристаллография aP2

Очищенный мышинный aP2 связывали в комплекс с CA33 и H3 Fab (полученным в UCSB стандартными методами) следующим образом. Комплекс получали, смешивая 0,5 мл aP2 в концентрации 13 мг/мл либо с 0,8 мл CA33 Fab в концентрации 21,8 мг/мл, либо с 1,26 мл H3 Fab в концентрации 13,6 мг/мл (молярное отношение aP2:Fab 1,2:1). Белки инкубировали при КТ в течение 30 минут, затем

пропускали через гель-фильтрационную колонку S75 16/60 (GE Healthcare) в 50 mM Трис, pH 7,2, 150 mM NaCl+5% глицерина. Пиковые фракции объединяли в пулы и концентрировали до 10 мг/мл для кристаллографии.

Эксперименты по кристаллизации методом сидячей капли проводили при использовании коммерческих наборов для скрининга (QIAGEN). Кристаллы дифракционного качества получали непосредственно при первичном скрининге кристаллизации без какой-либо необходимости в оптимизации условий кристаллизации. Для комплекса aP2/CA33 луночный раствор содержал 0,1M Hepes, pH 7,5, 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 16% ПЭГ 4К и 10% изопропанола. Для комплекса aP2/H3 луночный раствор содержал 0,1M MES, pH 5,5, 0,15M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 24% ПЭГ 4К. Данные регистрировали на Diamond Synchrotron на i02 ($\lambda=0,97949$) с получением набора данных 2,9 Å для aP2/CA33 и набора данных 2,3 Å для aP2/H3. Структуры определяли путем молекулярного замещения при использовании Phaser (44) (CCP4) с исходными моделями aP2 и Fab-домена. Было обнаружено, что два комплекса находятся в асимметричной единице для aP2/CA33 и один для aP2/H3. Циклы уточнения и построения модели выполняли при использовании CNS (Brunger et al., (2007) Nature Protocols 2, 2728-2733) и coot (Emsley et al., (2004) Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132) (CCP4), пока все статистические данные уточнения не сходились для обеих моделей. Информация по эпитопам, описанная выше, была получена при исследовании атомов на расстоянии 4 Å на поверхности контакта aP2/Fab. Статистика сбора данных и уточнения приведена ниже. Значения в скобках относятся к оболочке высокого разрешения.

Структура	aP2-CA33	aP2-H3
Группа симметрии	P 1 2 ₁ 1	P 1 2 ₁ 1
Размеры ячейки		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	65,27, 101,95, 95,31	71,50, 66,04, 75,68
(°)	90,00, 90,03, 90,00	90,00, 111,67, 90,00
Разрешение (Å)	54,97-2,95 (3,09-2,95)	33,03-2,23 (2,37-2,23)
<i>R</i> _{sym} или <i>R</i> _{merge}	0,18 (1,169)	0,11 (0,352)
<i>I</i> / <i>I</i>	8,3 (2,9)	6,8 (1,7)
Полнота (%)	99,2 (98,9)	98,6 (98,4)
Избыточность	6,2(6,3)	2,6 (2,6)

Уточнение

Разрешение (Å)	54,97–2,95	33,02–3,00
Число отражений	24898	13077
R_{work}/R_{free}	0,21/0,28	0,22/0,27
Число атомов		
Белок	8632	4331
Вода	0	0
B-факторы		
aP2	(молекула 1) 58,3; (молекула 2) 64,6	27,5
Fab	(молекула 1) 52,9; (молекула 2) 52,5	22,5
Ср. кв. отклонение		
Длины связей (Å)	0,009	0,011
Углы связей (°)	1,42	1,67

Значения в круглых скобках относятся к оболочке с высоким разрешением.

$R_{sym} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, где I является наблюдаемой интегрированной интенсивностью, $\langle I \rangle$ является средней интегрированной интенсивностью, полученной из многократных измерений, при этом суммирование производили по всем наблюдаемым отражениям. $R_{work} = \sum ||F_{obs}| - k|F_{calc}|| / \sum |F_{obs}|$, где F_{obs} и F_{calc} – наблюдаемые и расчетные факторы структуры, соответственно. R_{free} вычислен как R_{work} при использовании 5% данных отражения, выбранных рандомизированно, и исключенных из вычислений уточнения. Информацию по эпитопам получали при исследовании атомов на расстоянии 4Å на поверхности контакта aP2/Fab.

Исследования методом гиперинсулинемического-эугликемического клэмпа и печеночные биохимические анализы

Гиперинсулинемические-эугликемические клэмп-тесты проводили при модификации описанной методики (Cao et al., (2013) Cell Metab. 17, 768–778). В частности, мышам клэмп делали через 5 часов после еды и вводили 5 мЕд/кг/мин инсулина. Образцы крови забирали с 10-минутными интервалами для немедленного измерения концентрации глюкозы в плазме, и 25% глюкозу вводили с разной скоростью, чтобы поддерживать глюкозу в плазме при базальных концентрациях. Исходную утилизацию глюкозы в организме оценивали при непрерывной инфузии [3-3H]-глюкозы (0,05 мКи/мин). После

этого проводили определение инсулин-стимулированной утилизации глюкозы в организме, при этом вводили [3-3H]-глюкозу при 0,1 мКи/мин.

Общие липиды печени выделяли в соответствии с методикой Блая-Дайера (Bligh et al., (1959) Canadian J. Biochem. И Phys. 37, 911-917) и колориметрический метод использовали для измерения содержания триглицеридов с помощью коммерческого набора в соответствии с инструкциями производителя (Sigma Aldrich). Активность глюконеогенного фермента Pck1 измеряли с помощью модификации описанного метода (Petrescu et al., (1979) Analytical Biochem. 96, 279-281). Активность глюкозо-6-фосфатазы (G6pc) измеряли с помощью модификации методики Sigma [EC 3.1.3.9]. Коротко, печень гомогенизировали в лизисном буфере, содержащем 250 мМ сахарозы, трис-HCl и ЭДТА. Лизаты центрифугировали на полной скорости в течение 15 мин и выделяли супернатант (преимущественно цитоплазму). Затем микросомальные фракции выделяли с помощью ультрацентрифугирования цитоплазматических образцов. Концентрации микросомальных белков измеряли с помощью коммерческого набора BCA (Thermo Scientific Pierce). 200 мМ глюкозо-6-фосфат (Sigma Aldrich) предварительно инкубировали в Bis-Tris. Добавляли 150 мкг микросомального белка или серийные разведения рекомбинантной G6P-азы и инкубировали в этом растворе в течение 20 минут при 37°C. Затем добавляли 20% ТХУ, перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Образцы центрифугировали на полной скорости при 4°C в течение 10 мин, и супернатант переносили в отдельный УФ-планшет. Добавляли цветной реагент и измеряли оптическую плотность при 660 нм и нормализовали по стандартной кривой, полученной с серийным разведением рекомбинантного фермента глюкозо-6-фосфатазы (G6pc).

ИФА анализы ap2, mal1, FABP3, адпонектина, глюкагона и инсулина в плазме

Кровь забирали у мышей при надрезе хвоста после 6 часов дневного или 16 часов ночного ограничения питания. Терминальные образцы крови собирали при кардиальной пункции или собирали из

хвостовой вены. Образцы центрифугировали в микроцентрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут при 4°C. Измерения уровней в плазме aP2 (Biovendor R&D), mall (Circulex Mouse Mall ELISA, CysLex Co., Ltd., Japan), FABP3 (Hycult Biotech, Plymouth Meeting, PA), глюкогона, адипонектина (Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN) и инсулина (ультрачувствительный ИФА на мышинный инсулин, Alpco Diagnostics, Salem, NH) проводили согласно инструкциям производителя.

Количественный анализ ПЦР в реальном времени

Ткани собирали после 6 часов дневного ограничения питания, немедленно замораживали и хранили при -80°C. Выделение РНК проводили при использовании Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) согласно протоколу производителя. Для синтеза первой цепи кДНК использовали 0,5-1 нг РНК и 5× iScript RT Supermix (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Количественную ПЦР в реальном времени (кПЦР) проводили при использовании готовой смеси Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY) и анализировали образцы при использовании амплификатора ViiA7 (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY). Для кПЦР использовали следующие праймеры:

36B4	5'- cactggtctaggacccgagaa-3' Seq. ID No. 52; 5'-aggggggagatgttcagcatgt-3' Seq. ID No. 53
FAS	5'-ggaggtggtgatag ccggtat-3' Seq. ID No. 54; 5'- tgggtaatccatagagcccag-3' Seq. ID No. 55
SCD1	5'-ttcttgcgatacactctggtgc-3' Seq. ID No. 56; 5'-cgggattgaatgttcttgtcgt- 3' Seq. ID No. 57
Pck1	5'-ctgcataacggtctggacttc-3' Seq. ID No. 58; 5'-cagcaactgcccgtactcc-3' Seq. ID No. 59
G6pc	5'-cgactcgctatctccaagtga-3' Seq. ID No. 60; 5'-gttgaaccagtctccgacca-3' Seq. ID No. 61
ACC1	5'-atgtctggcttgacctaagta-3' Seq. ID No. 62; 5'-ccccaaagcgagtaacaaattct -3' Seq. ID No. 63
TNF	5'-ccctcacactcagatcatcttct-3' Seq. ID No. 64; 5'-gctacgacgtgggctacag-3' Seq. ID No. 65
IL-1β	5'-gcaactgttcctgaactcaact-3' Seq. ID No. 66; 5'-atcttttgggggtccgtcaact-3' Seq. ID No. 67
IL-6	5'-acaaccacggccttcctactt-3' Seq. ID No. 68; 5'-cacgatttcccagagaacatgtg-3' Seq. ID No. 69
CCL2	5'-catccacgtgttggtca-3' Seq. ID No. 70;

	5'-gatcatcttgctggtgaatgagt-3' Seq. ID No. 71
CXCL1	5'-gactccagccacactccaac-3' Seq. ID No. 72; 5'-tgacagcgagctcattg-3' Seq. ID No. 73
F4/80	5'-tgactcaccttggtggtcctaa-3' Seq. ID No. 74; 5'-cttcccagaatccagtcctttcc-3' Seq. ID No. 75
CD68	5'-tgtctgatcttgctaggaccg-3' Seq. ID No. 76; 5'-gagagtaacggcctttttgtga-3' Seq. ID No. 77
TBP	5'-agaacaatccagactagcagca-3' Seq. ID No. 78; 5'-gggaacttcacatcacagctc-3' Seq. ID No. 79

Статистический анализ

Результаты представлены как средние $\pm$ SEM. Статистическую значимость определяли при использовании дисперсионного анализа с повторными измерениями или t-критерия Стьюдента, * означает значимость при $p < 0,05$, ** означает значимость при $p < 0,01$.

Создание и скрининг моноклонального антитела против аР2/комплекса глюкагона/белка аР2

Ожирение связано с повышением уровня циркулирующего аР2, который способствует повышению продукции глюкозы в печени и уменьшению периферической утилизации глюкозы и инсулинорезистентности, характерным для диабета 2-го типа. Следовательно, нейтрализация сывороточного аР2 или блокирование активации глюкагонового рецептора комплексом глюкагона/белка аР2 представляет собой эффективный подход к лечению диабета и, возможно, других нарушений обмена веществ.

Мышиные и кроличьи-мышинные гибридные моноклональные антитела, полученные против человеческих и мышинных пептидов аР2, получали и подвергали скринингу. Оценка аффинности связывания с помощью анализа биомолекулярного взаимодействия при использовании системы Biacore продемонстрировала широкий диапазон аффинности для этих антител, от микромолярного до низкого наномолярного диапазона (Фигура 9А). Интересно то, что СА33 также значительно снижал уровень глюкозы в крови натощак (Фигура 9В), тогда как другие протестированные антитела не улучшали гликемию. Без ограничения какой-либо одной теорией, это указывает на то, что СА33 снижает резистентность к инсулину, связанную с HFD, и улучшает метаболизм глюкозы. Системное улучшение метаболизма глюкозы дополнительно подтверждали с

помощью глюкозотолерантного теста (ГТТ). Терапия СА33 привела к значительному улучшению толерантности к глюкозе (Фигура 9С), тогда как другие антитела не повышали толерантность к глюкозе, и кривые утилизации глюкозы не отличались по сравнению с растворителем (Фигура 12А). Кроме того, только лечение СА33 заметно повышало чувствительность к инсулину, как было продемонстрировано в тестах на толерантность к инсулину, тогда как другие протестированные антитела были аналогичны растворителю (Фигура 12В). Кроме того, введение аР2 мышам с нокаутом аР2 вместе с глюкагоном устраняет невосприимчивость к глюкагону, а предварительное инкубирование СА33 с аР2 препятствует этому (Фигуры 12С и 12D). В совокупности и без ограничения какой-либо одной теорией, эти результаты продемонстрировали, что СА33 обладает уникальными противодиабетическими свойствами.

СА33 – низкоаффинное антитело, которое нейтрализует активность аР2/комплекса глюкагона/белка аР2

СА33 дополнительно исследовали для более полного изучения его уникальных терапевтических свойств. В анализе связывания Octet все протестированные антитела демонстрировали насыщающее связывание с аР2. Наблюдали измеримое, но слабое взаимодействие с родственным белком FABP3 (~25% взаимодействия аР2/FABP4) и незначительное взаимодействие с Mal1/FABP5, которое было подобно контрольному IgG (Фигура 10А).

В экспериментах по перекрестному блокированию, чтобы начать исследование сайтов-мишеней, обнаружили, что СА33 частично блокировало связывание неэффективного мышинового антитела НЗ с аР2, тогда как связывание НЗ было полностью блокировано гибридными антителами СА13 и СА15 (Фигура 10В). В последующем анализе идентификация эпитопов, основанная на экспериментах масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена, например, как описано в публикации Pandit et al. (2012) J. Mol. Recognit. Mar; 25(3):114-24 (включенной в настоящее описание посредством отсылки), указывает на взаимодействие СА33 с первой альфа-спиралью и первым бета-слоем аР2 по остаткам 9-17, 20-28 и 118-132, которые частично перекрываются с эпитопом,

идентифицированным для НЗ (Фигура 10С). Затем проводили сокристаллизацию Fab-фрагментов СА33 и НЗ с аР2 (Фигура 10D). Анализ кристаллов показал, что СА33 связывает эпитоп, распределенный по элементам вторичной структуры бета1 и бета10 и случайным областям спирали, связывающим альфа2 с бета2 и бета3 с бета4, и включает аминокислоты аР2 57Т, 38К, 11L, 12V, 10К и 130Е (Фигура 10Е). Несмотря на частичное блокирование НЗ антителом СА33, наблюдали, что прямого перекрывания их эпитопов фактически нет. Вместо этого значительное перемещение области вокруг аР2 Phe58 может частично блокировать связывание одного антитела другим в конкурентных экспериментах. Кроме того, низкую аффинность Fab СА33 можно объяснить кристаллической структурой. Необычно то, что только одна аминокислота в тяжелой цепи СА33 участвует в контакте с аР2, при этом большая часть контактов проходит через легкую цепь (Фигуры 10D и 10Е). Напротив, контакт НЗ-аР2 является более стандартным, так как обе цепи Fab взаимодействуют с аР2. Структура также показала, что СА33 не связывается с "крышкой" β -бочки (14S-37A), которая, как было установлено, контролирует доступ липидов в связывающий карман или "шарнир", который содержит E15, N16 и F17. Кроме того, было обнаружено, что связывание липидов (паринаровая кислота) с аР2 по существу не изменялось в присутствии СА33 (Фигура 10F). НЗ связывается непосредственно с "крышкой", но обладает ограниченной активностью. Связывание СА33 с липид-связанным аР2 или аР2 без липида также исследовали с использованием биохимического анализа (Biacore). СА33 связывается как с липид-связанным аР2, так и аР2 без липида со следующей аффинностью:

Мышиный аР2	Kd
Связанный с липидом	9,3 мкМ
Делипидированный	4,7 мкМ

Кроме того, SPA гранулы с антителом против мышинового IgG инкубировали с сывороткой мышей дикого типа или мышей с нокаутом аР2 с ^{125}I глюкагоном, что показало, что аР2 взаимодействует с ^{125}I глюкагоном в физиологически релевантных условиях/сыворотке животного (Фигуры 10G и 10H). Без ограничения какой-либо теорией, эти результаты указывают, что активность СА33 может не

зависеть от связывания aP2 с липидами.

С учетом относительно низкой аффинности СА33 в отношении aP2, исследовали нецелевые эффекты. Изучали эффект лечения СА33 у aP2^{-/-}-мышей на рационе HFD. В этих экспериментах терапия антителом не вызывала изменений массы тела или уровней глюкозы натощак в этой модели (Фигура 11A). Кроме того, СА33 не влияло на глюкозотолерантность у мышей aP2^{-/-} с ожирением (Фигура 11B), четко продемонстрировав, что действие антитела вызвано направленным взаимодействием с aP2.

Наконец, исследовали эффект СА33 во второй модели тяжелого генетически обусловленного ожирения и инсулинорезистентности с использованием лептин-дефицитных мышей ob/ob. Неожиданно, гипергликемия у мышей ob/ob нормализовалась у получавших СА33 мышей по сравнению с контрольными животными (Фигура 11C). Нормальные уровни глюкозы и более низкие уровни инсулина указывают на улучшенный метаболизм глюкозы после нейтрализации aP2. Действительно, после введения экзогенной глюкозы, получавшие СА33 мыши ob/ob также показали значительно более высокую глюкозотолерантность по сравнению с мышами, получавшими растворитель, несмотря на присутствие выраженного ожирения (Фигура 11D). Также было показано, что лечение СА33 притупляет реакцию глюкагона у мышей ob/ob через 3 недели лечения (Фигуры 11E и 11F) и имитирует дефицит aP2, блокируя действие глюкагона.

Пример 3: Гуманизация СА33

Кроличье антитело 909 (СА33) гуманизировали путем графтинга CDR-областей из V-области гибридного антитела антитела с CDR-областями кролика/каркасной областью мыши на каркасные области V-области антитела зародышевой линии человека. Для сохранения активности антитела, ряд остатков каркасной области из гибридной кроличьей/мышинной V-области также сохраняли в гуманизированной последовательности. Эти остатки подбирали при использовании методики, описанной в Adair et al. (1991) (Humanized antibodies, WO 91/09967). Выравнивание последовательностей V-области гибридного кроличьего/мышинного антитела (донора) с последовательностями человеческой V-области зародышевой линии (акцептора) показано на Фигуре 13 (VL) и Фигуре 14A (VH) вместе

со сконструированными гуманизированными последовательностями. CDR, перевитые из донорной в акцепторную последовательность, соответствуют определению Кэбата (Kabat et al., 1987), за исключением CDRH1, где используется комбинированное определение Чотиа/Кэбата (см. Adair et al., 1991 Humanized antibodies, WO 91/09967).

Гены, кодирующие несколько вариантов последовательностей тяжелой и легкой цепей V-области, были созданы и сконструированы с использованием подхода автоматического синтеза, разработанного DNA 2.0 Inc. Другие варианты V-областей тяжелой и легкой цепей были созданы путем модификации генов VH и VK с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза, включающего, в некоторых случаях, мутации в CDR-областях для модификации потенциальных сайтов изомеризации аспарагиновой кислоты или для удаления непарных остатков цистеина. Эти гены клонировали в векторы для обеспечения экспрессии гуманизированных антител IgG4P 909 (IgG4 человека, содержащего стабилизирующую шарнирную область мутацию S241P, Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30 (1): 105-8) в клетках млекопитающих. Варианты цепей гуманизированных антител и их комбинации экспрессировали и оценивали на активность в сравнении с исходным антителом, их биофизические свойства и пригодность для последующей переработки, в результате чего отобрали перевитые варианты тяжелой и легкой цепи.

Человеческая V-область IGKV1-17 (A30) плюс J-область JK4 была выбрана в качестве акцептора CDR-областей легкой цепи антитела 909. Все остатки каркасной области легкой цепи в перевитых вариантах gL1 (Seq. ID No. 29), gL10 (Seq. ID No. 31), gL54 (Seq. ID No. 33) и gL55 (Seq. ID No. 35) были получены из гена зародышевой линии человека, за исключением остатков 2, 3, 63 и 70 (нумерация по Кэбату), где были сохранены донорные остатки валин (2V), валин (3V), лизин (63K) и аспарагиновая кислота (70D), соответственно. Сохранение остатков 2, 3, 63 и 70 было важным для полной активности гуманизированного антитела. Остаток 90 в CDRL3 перевитого варианта gL10, перевитого варианта gL54 и перевитого варианта gL55 подвергали мутации с заменой цистеина (90C) на остатки серина (90S), глутамина (90Q) и

гистидина (H90), соответственно, в результате чего был удален непарный остаток цистеина из последовательности gL10, gL54 и gL55.

Человеческая V-область IGHV4-4 плюс J-область JH4 была выбрана в качестве акцептора для CDR-областей тяжелой цепи антитела 909. Как и во многих кроличьих антителах, ген VH антитела 909 короче, чем выбранный человеческий акцептор. При выравнивании с человеческой акцепторной последовательностью в каркасной области 1 VH-области антитела 909 (Seq. ID No. 41) отсутствует N-концевой остаток, который сохраняется в гуманизированном антителе (Фигура 14A). В каркасной области 3 VH-области кроличьего 909 также отсутствуют два остатка (75 и 76) в петле между цепями D и E бета-слоя: в перевитом варианте gH1 (Seq. ID No. 42) пропуск в каркасной области 3 сохраняется, тогда как в перевитом варианте gH14 (Seq. ID No. 44), gH15 (Seq. ID No. 46), gH61 (Seq. ID No. 48) и gH62 (Seq. ID No. 50) пропуск заполнен соответствующими остатками (лизина 75, 75K; аспарагина 76, 76N) из выбранной человеческой акцепторной последовательности (Фигура 14A). Все каркасные остатки тяжелой цепи в перевитых вариантах gH1 и gH15 происходят из гена зародышевой линии человека, за исключением остатков 23, 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 89 и 91 (нумерация по Кэбату), где донорные остатки треонина (23T), фенилаланина (67F), лизина (71K), аланина (72A), серина (73S), треонина (74T), треонина (77T), валина (78V), аспарагиновой кислоты (79D), треонина (89T) и фенилаланина (91F) были сохранены, соответственно. Каркасные остатки тяжелой цепи в перевитом варианте gH14 происходят из гена зародышевой линии человека, за исключением остатков 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 89 и 91 (нумерация по Кэбату), где донорные остатки треонина (23T), фенилаланина (67F), лизина (71K), аланина (72A), серина (73S), треонина (74T), треонина (77T), валина (78V), аспарагиновой кислоты (79D), треонина (89T) и фенилаланина (91F) были сохранены, соответственно. Каркасные остатки тяжелой цепи в перевитых вариантах gH61 и gH62 происходят из гена человеческой зародышевой линии, за исключением остатков 71, 73 и 78 (нумерация по Кэбату), где

донорные остатки лизина (71K), серина (73S) и валина (78V) были сохранены, соответственно. Остаток глутамина в положении 1 человеческой каркасной области был заменен глутаминовой кислотой (1E), чтобы обеспечить экспрессию и очистку гомогенного продукта: широко описано превращение глутамина в пироглутамат на N-конце антител и фрагментов антител. Остаток 59 в CDRH2 (Seq. ID No. 19) перевитого варианта gH15 и перевитого варианта gH62 подвергали мутации с заменой цистеина (59C) на остаток серин (59S), удалив, таким образом, неспаренный остаток цистеина из последовательности gH15. Остаток 98 в CDRH3 (Seq. ID No. 20) перевитого варианта gH15 и перевитого варианта gH62 подвергали мутации с заменой аспарагиновой кислоты (98D) на остаток глутаминовой кислоты (98E), удалив, таким образом, потенциальный сайт изомеризации аспарагиновой кислоты из последовательности gH15.

Для экспрессии гуманизированного Ат 909 в клетках млекопитающих, ген гуманизированной V-области легкой цепи соединяли с последовательностью ДНК, кодирующей C-каппа константную область человека (аллотип K1m3), с получением непрерывного гена легкой цепи. Ген гуманизированной V-области тяжелой цепи соединяли с последовательностью ДНК, кодирующей гамма-4 константную область тяжелой цепи человека со стабилизирующей шарнирную область мутацией S241P (Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1):105-8), с получением непрерывного гена тяжелой цепи. Гены тяжелой и легкой цепей клонировали в вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, 1235-pGL3a(1)-SRNa(3)-SRLa(3)-DHFR(3) (Cellca GmbH).

Для дополнительного изучения нисходящих сигнальных событий, на которые влияет ингибирование антителами против аР2, использовали экспрессирующую глюкагоновый рецептор человека цАМФ репортерную систему, сконструированную в клетках CHO-K1. На Фигуре 14В показано влияние ингибирования аР2 на люциферазную активность, которую анализировали через 4 часа после стимуляции в CHO-K1, стабильно трансфицированных человеческим GCGR-GFP и 4хцАМФ-чувствительным элементом, и стимулировали в присутствии 1 мкг/мл аР2, 25 нМ глюкагона и 20 мкг/мл CA33 и CA15. На фигуре

14C показано, что мутация остатка цистеина с заменой на серин в аР2 не влияет на люциферазную активность, что показывает то, что эффект, наблюдаемый на Фигуре 14В, не связан с индуцированной цистеином димеризацией.

Пример 4: Влияние *in vivo* нейтрализации аР2 на секрецию глюкагона

Нейтрализация циркулирующего аР2 приводит к снижению активности глюкагона у мышей с алиментарным ожирением. Мыши получали рацион с высоким содержанием жира в течение 20 недель до начала эксперимента. Начиная с 20-й недели, мышам вводили растворитель или мАт против аР2 в дозе 33 мг/кг, в/б два раза в неделю в течение 3 недель. В конце трех недель проводили тест с нагрузкой глюкагоном, в котором мышам вводили с 150 мкг/кг глюкагона через 4 часа после еды. Мыши, получавшие мАт против аР2, показали значительно более низкую реакцию на инъекцию глюкагона, чем мыши, которым вводили растворитель (Фигура 15). Нейтрализация циркулирующего аР2 является, таким образом, эффективным подходом к снижению активности глюкагона.

Пример 5: СА33 способно связывать комплекс глюкагона/аР2

Исследования аффинности связывания проводили при использовании прибора Blitz (Pall Life Sciences, Menlo Park, CA). Биотинилированный аР2 присоединяли к стрептавидиновым сенсорам. Затем аффинность связывания фиксированного аР2 исследовали в растворах глюкагона, моноклонального антитела (мАт) (СА33) или глюкагона плюс мАт (Фигура 16). Глюкагон демонстрировал связывание с аР2 самостоятельно, и моноклональное антитело показало сильное связывание с комплексом глюкагона/аР2. Без ограничения какой-либо теорией, возможно, что связывание моноклонального антитела с комплексом глюкагона/аР2 является главным элементом противодиабетического действия моноклонального антитела и способности снижать активность глюкагона.

Пример 6. Лечение глюкагоном улучшает интернализацию аР2

Визуализацию живых клеток проводили на клетках U2-OS, трансфицированных GCGR-GFP после обработки аР2 или обработки аР2+глюкагоном. Как показано на Фигуре 17А и Фигуре 17В, без обработки клеток глюкагоном наблюдали минимальную интернализацию

аР2 в клетки. Когда клетки стимулировали глюкагоном (Фигуры 17С-17Е), интернализация аР2 была значительно увеличена. Колокализация сигнала GCGR-GFP и сигнала аР2 на фотографиях показана белым цветом.

Пример 7. Дефицит аР2 отличается от антагонистического воздействия на глюкагоновый рецептор

Отличительным признаком антагонизма рецептора глюкагона является гиперплазия альфа-клеток, однако дефицит аР2 не вызывает гиперплазию альфа-клеток, как показано на Фигурах 17F-17J. Полученные при помощи микроскопа изображения клетки из аР2^{+/+} клеточной линии и аР2^{-/-} клеточной линии и островковой области клетки из аР2^{+/+} клеточной линии и аР2^{-/-} клеточной линии, при измерении в пикселях, не были значимо различными. При окрашивании на глюкагон, изображения этих двух линий клеток также не были значимо различными. Изображения двух клеток показаны на Фигуре 17I (линия аР2^{+/+} клеток) и Фигуре 17J (линия аР2^{-/-} клеток).

Настоящее изобретение было описано со ссылкой на варианты осуществления изобретения. Однако для специалиста в данной области техники является очевидным, что различные модификации и изменения могут быть внесены без отступления от объема изобретения, изложенного в формуле изобретения ниже. Таким образом, настоящее описание следует рассматривать в иллюстративном, а не в ограничительном смысле, при этом все такие модификации должны быть включены в объем изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> President and Fellows of Harvard University
 <120> СОЕДИНЕНИЯ, ПРИМЕНИМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ
 <130> 15020-017WO1
 <160> 82
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 132
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Cys Asp Ala Phe Val Gly Thr Trp Lys Leu Val Ser Ser Glu Asn
 1 5 10 15

Phe Asp Asp Tyr Met Lys Glu Val Gly Val Gly Phe Ala Thr Arg Lys
 20 25 30

Val Ala Gly Met Ala Lys Pro Asn Met Ile Ile Ser Val Asn Gly Asp
 35 40 45

Val Ile Thr Ile Lys Ser Glu Ser Thr Phe Lys Asn Thr Glu Ile Ser
 50 55 60

Phe Ile Leu Gly Gln Glu Phe Asp Glu Val Thr Ala Asp Asp Arg Lys
 65 70 75 80

Val Lys Ser Thr Ile Thr Leu Asp Gly Gly Val Leu Val His Val Gln
 85 90 95

Lys Trp Asp Gly Lys Ser Thr Thr Ile Lys Arg Lys Arg Glu Asp Asp
 100 105 110

Lys Leu Val Val Glu Cys Val Met Lys Gly Val Thr Ser Thr Arg Val
 115 120 125

Tyr Glu Arg Ala
 130

<210> 2
 <211> 132
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Cys Asp Ala Phe Val Gly Thr Trp Lys Leu Val Ser Ser Glu Asn
 1 5 10 15

Phe Asp Asp Tyr Met Lys Glu Val Gly Val Gly Phe Ala Thr Arg Lys
20 25 30

Val Ala Gly Met Ala Lys Pro Asn Met Ile Ile Ser Val Asn Gly Asp
35 40 45

Leu Val Thr Ile Arg Ser Glu Ser Thr Phe Lys Asn Thr Glu Ile Ser
50 55 60

Phe Lys Leu Gly Val Glu Phe Asp Glu Ile Thr Ala Asp Asp Arg Lys
65 70 75 80

Val Lys Ser Ile Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Leu Val Gln Val Gln
85 90 95

Lys Trp Asp Gly Lys Ser Thr Thr Ile Lys Arg Lys Arg Asp Gly Asp
100 105 110

Lys Leu Val Val Glu Cys Val Met Lys Gly Val Thr Ser Thr Arg Val
115 120 125

Tyr Glu Arg Ala
130

<210> 3
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Glu Val Gly Val Gly Phe Ala Thr Arg Lys
1 5 10

<210> 4
<211> 3
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотная последовательность связывающего жирные кислоты домена aP2
<400> 4

Arg Val Tyr
1

<210> 5
<211> 399
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 5

atgtgtgatg cttttgtagg tacctggaaa cttgtctcca gtgaaaactt tgatgattat	60
atgaaagaag taggagtggg ctttgccacc aggaaagtgg ctggcatggc caaacctaac	120
atgatcatca gtgtgaatgg ggatgtgatc accattaaat ctgaaagtac ctttaaaaat	180
actgagattt ctttcatact gggccaggaa tttgacgaag tcaactgcaga tgacaggaaa	240
gtcaagagca ccataacctt agatgggggt gtcctggtac atgtgcagaa atgggatgga	300
aatcaacca ccataaagag aaaacgagag gatgataaac tgggtggtgga atgcgtcatg	360
aaaggcgtca cttccacgag agtttatgag agagcataa	399

<210> 6
 <211> 399
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

atgtgtgatg cttttgtggg aacctggaag cttgtctcca gtgaaaactt cgatgattac	60
atgaaagaag tgggagtggg ctttgccaca aggaaagtgg caggcatggc caagcccaac	120
atgatcatca gcgtaaatgg ggatttggtc accatccggt cagagagtac ttttaaaaac	180
accgagattt ctttcaaact gggcgtggaa ttcgatgaaa tcaccgcaga cgacaggaag	240
gtgaagagca tcataaccct agatggcggt gccctggtgc aggtgcagaa gtgggatgga	300
aagtcgacca caataaagag aaaacgagat ggtgacaagc tgggtggtgga atgtgttatg	360
aaaggcgtga cttccacaag agtttatgaa agggcatga	399

<210> 7
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL1

<400> 7

Gln	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val
1				5					10	

<210> 8
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDRL2

<400> 8

Lys	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 9
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL3

<400> 9

Gln Cys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala Gly Ser Phe Phe Tyr Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL3 вариант 1

<400> 10

Gln Ala Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala Gly Ser Phe Phe Tyr Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL3 вариант 2

<400> 11

Gln Gln Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala Gly Ser Phe Phe Tyr Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL3 вариант 3

<400> 12

Gln His Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala Gly Ser Phe Phe Tyr Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRL3 вариант 4

<400> 13

Gln Gln Ala Ser His Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 14

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1

<400> 14

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1 вариант 1

<400> 15

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn Ala Ile Thr
1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2

<400> 16

Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2 вариант 1

<400> 17

Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 18

<211> 17

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH2 вариант 2

<400> 18

Asp	Ile	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 19
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH3

<400> 19

Pro	Asp	Asn	Asp	Gly	Thr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Gly	Phe	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 20
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH3 вариант 1

<400> 20

Pro	Asp	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Gly	Phe	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 21
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH3 вариант 2

<400> 21

Leu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Phe
1				5					10

<210> 22
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL1 вариант 1

<400> 22

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL2 вариант 1

<400> 23

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRL3 вариант 5

<400> 24

Gln Gln Trp Ser His Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 25

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH1 вариант 2

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn Trp Ile Thr
1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDRH2 вариант 3

<400> 26

Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asn Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 27
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDRH3 вариант 3

<400> 27

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asp Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 28
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL-область кроличьего Ат 909

<400> 28

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Glu
100 105 110

<210> 29
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL-область 909 gL1

<400> 29

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30

<211> 219

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL + CL-область 909 gL1

<400> 30

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly	Ser	Phe	Phe	Tyr	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100				105						110				
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu		
			115				120						125				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe		
			130				135						140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln		
145						150						155			160		
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser		
			165						170						175		
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu		
			180						185						190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser		
			195						200						205		
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
210						215											
<210>		31															
<211>		112															
<212>		БЕЛОК															
<213>		Искусственная последовательность															
<220>																	
<223>		VL-область 909 gL10															
<400>		31															
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5				10						15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Tyr		
			20						25						30		
Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile		
			35						40						45		
Tyr	Lys	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly		
50						55						60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65						70						75			80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Thr	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Ala		
				85								90				95	

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 32

<211> 219

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL + CL-область 909 gL10

<400> 32

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 33
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL-область 909 gL54

<400> 33

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 219
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL + CL-область 909 gL54

<400> 34

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 35

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-область 909 gL55

<400> 35

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 36
<211> 219
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL + CL-область 909 gL55

<400> 36

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 37
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL-область 909 gL13

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 219

<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL + CL-область 909 gL13

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 39
<211> 112
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-область 909 gL50

<400> 39

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Ala Gln Ala Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 40
<211> 219
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL + CL-область 909 gL50

<400> 40

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Ala Gln Ala Thr Tyr Gly Thr Tyr Ala
85 90 95

Gly Ser Phe Phe Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 41
<211> 120
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH-область кроличьего Ат 909

<400> 41

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Asp
85 90 95

Asn Asp Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 121

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-область 909gH1

<400> 42

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Leu
65 70 75 80

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Pro
85 90 95

Asp Asn Asp Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH 909gH1 IgG4 + человеческая γ -4P константная область

<400> 43

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Leu
65 70 75 80

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Pro
85 90 95

Asp Asn Asp Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 44

<211> 123

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-область 909gH14

<400> 44

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Lys Asn Thr Val Asp Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Pro Asp Asn Asp Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45
 <211> 450
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH 909gH14 IgG4 + человеческая γ-4P константная область

<400> 45

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Lys Asn Thr Val Asp Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg	Pro	Asp	Asn	Asp	Gly	Thr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Gly	Phe	Gly	Leu	100	105	110
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	325	330	335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 46
<211> 123
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH-область 909 gH15

<400> 46

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Lys Asn Thr Val Asp Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Pro Asp Asn Glu Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47
 <211> 450
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH 909gH15 IgG4 + человеческая у-4Р константная область

<400> 47

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Lys Asn Thr Val Asp Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Pro Asp Asn Glu Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	325	330	335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	370	375	380
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	385	390	395
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	405	410	415
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	420	425	430
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	435	440	445

Gly Lys
450

<210> 48
<211> 123
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH область 909 gH61

<400> 48

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Cys Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Pro Asp Asn Asp Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 450
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH 909gH61 IgG4 + человеческая γ -4P константная область

<400> 49

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys
	50					55					60				
Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Pro	Asp	Asn	Asp	Gly	Thr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Gly	Phe	Gly	Leu
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
		115					120					125			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser
	130					135					140				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
145					150					155					160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				165					170					175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180					185					190		
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
		195					200					205			
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys
	210				215						220				
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly
225				230						235					240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245					250					255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu
			260					265					270		
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275					280					285			

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 50
<211> 123
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH-область 909 gH62

<400> 50

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Pro Asp Asn Glu Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 450

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH 909gH62 IgG4 + человеческая γ -4P константная область

<400> 51

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Pro Asp Asn Glu Gly Thr Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Phe Gly Leu
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	210	215	220	
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	225	230	235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255	
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	260	265	270	
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315	320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	325	330	335	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	370	375	380	

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 52
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 36В4 прямой

<400> 52
cactggtcta ggacccgaga a 21

<210> 53
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 36В4 обратный

<400> 53
aggggggagat gttcagcatg t 21

<210> 54
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> FAS прямой

<400> 54
ggaggtggtg atagccggtg t 21

<210> 55
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FAS обратный
 <400> 55
 tgggtaatcc atagagccca g 21

<210> 56
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> SCD1 прямой
 <400> 56
 cgggattgaa tgttcttgtc gt 22

<210> 57
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> SCD1 обратный
 <400> 57
 cgggattgaa tgttcttgtc gt 22

<210> 58
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Psk1 прямой
 <400> 58
 ctgcataacg gtctggactt c 21

<210> 59
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Psk1 обратный
 <400> 59
 cagcaactgc csgtactcc 19

<210> 60
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> G6pc прямой
 <400> 60
 cgactcgcta tctccaagtg a 21

<210>	61	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	G6pc обратный	
<400>	61	
	gttgaaccag tctccgacca	20
<210>	62	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	ACC1 прямой	
<400>	62	
	atgtctggct tgcacstagt a	21
<210>	63	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	ACC1 обратный	
<400>	63	
	ccccaagcag agtaacaaat tct	23
<210>	64	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	TNF прямой	
<400>	64	
	ccctcacact cagatcatct tct	23
<210>	65	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	TNF обратный	
<400>	65	
	gctacgacgt gggctacag	19
<210>	66	
<211>	22	

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	IL-1b прямой	
<400>	66	
	gsaactgttc ctgaactcaa ct	22
<210>	67	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	IL-1b обратный	
<400>	67	
	atctttttggg gtccgtcaac t	21
<210>	68	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	IL-6 прямой	
<400>	68	
	asaaccacgg cttccctac tt	22
<210>	69	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	IL-6 обратный	
<400>	69	
	cacgatttcc cagagaacat gtg	23
<210>	70	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	CCL2 прямой	
<400>	70	
	catccacgtg ttggctca	18
<210>	71	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		

<223> CCL2 обратный	
<400> 71 gatcatcttg ctggtgaatg agt	23
<210> 72 <211> 20 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> CXCL1 прямой	
<400> 72 gactccagcc acactccaac	20
<210> 73 <211> 18 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> CXCL1 обратный	
<400> 73 tgacagcgca gctcattg	18
<210> 74 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> F4/80 прямой	
<400> 74 tgactcacct tgtggtccta a	21
<210> 75 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> F4/80 обратный	
<400> 75 cttcccagaa tccagtcttt cc	22
<210> 76 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> CD68 прямой	
<400> 76 tgtctgatct tgctaggacc g	21

<210> 77
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CD68 обратный

<400> 77
gagagtaacg gcctttttgt ga 22

<210> 78
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ТВР прямой

<400> 78
agaacaatcc agactagcag ca 22

<210> 79
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ТВР обратный

<400> 79
gggaacttca catcacagct c 21

<210> 80
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGKV1-17

<400> 80

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 113
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IGHV4-4

<400> 81

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 82
<211> 29
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 82

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
			20					25				

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации соединения, способного связывать комплекс глюкагона/связывающего белка адипоцитов (глюкагона/aP2), включающий:

i. контакт соединения с глюкагоном в комплексе с aP2 (глюкагоном/aP2); и

ii. определение, связывается ли соединение с глюкагоном/aP2.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий:

i. введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона и/или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих рецептор глюкагона (GCGR); и

ii. измерение биологической активности GCGR.

3. Способ по п.2, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты.

4. Способ по пп.2 или 3, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

5. Способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. контакт соединения с aP2 и глюкагоном или глюкагоном в комплексе с aP2 (глюкагоном/aP2);

ii. определение, связывается ли соединение с aP2, глюкагоном или глюкагоном/aP2;

iii. введение соединения в анализ с aP2 и глюкагоном, или глюкагоном/aP2, и GCGR; и

iv. определение, связывается ли глюкагон/aP2 с GCGR;

где отсутствие связывания глюкагона/aP2 с GCGR указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR.

6. Способ по п.5, дополнительно включающий:

i. введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона или глюкагон/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и

ii. измерение биологической активности GCGR.

7. Способ по п.6, где популяцией клеток, экспрессирующих

GCGR, являются гепатоциты.

8. Способ по пп.6 или 7, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

9. Способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. контакт aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2 с GCGR в присутствии соединения;

ii. контакт aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2 с GCGR в отсутствие соединения; и

iii. сравнение количества глюкагон/aP2, связавшегося с GCGR в присутствии соединения, с количеством глюкагона/aP2, связавшегося с GCGR в отсутствие соединения;

где сниженное количество глюкагона/aP2, связывающегося с GCGR в присутствии соединения, указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического воздействия на GCGR.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий:

i. введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и

ii. измерение биологической активности GCGR.

11. Способ по п.10, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты.

12. Способ по пп.10 или 11, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

13. Способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. введение aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2 в первый клеточный анализ, включающий клетки, экспрессирующие GCGR;

ii. определение биологической активности GCGR в клетках в первом клеточном анализе;

iii. введение aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2 во второй клеточный анализ, включающий клетки, экспрессирующие GCGR, где aP2 и глюкагон или глюкагон/aP2 вводят в присутствии соединения;

iv. определение биологической активности GCGR в клетках во

втором клеточном анализе; и

v. сравнение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе с биологической активностью GCGR во втором клеточном анализе;

где снижение биологической активности GCGR во втором анализе по сравнению с биологической активностью GCGR в первом анализе указывает на соединение, которое нейтрализует агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR.

14. Способ по п.13, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты.

15. Способ по пп.13 или 14, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

16. Способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. введение соединения в первый клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона, или глюкагона/aP2, и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где соединение присутствует в фиксированной концентрации, и где aP2 и глюкагон или глюкагон/aP2 присутствуют при ненасыщающей концентрации;

ii. определение биологической активности GCGR в популяции клеток в первом клеточном анализе;

iii. введение соединения во второй клеточный анализ в присутствии aP2, глюкагона, или глюкагон/aP2, и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где соединение присутствует в фиксированной концентрации, и где aP2 и глюкагон или глюкагон/aP2 присутствуют при насыщающей концентрации;

iv. определение биологической активности GCGR в популяции клеток во втором клеточном анализе; и

v. сравнение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе с биологической активностью GCGR во втором клеточном анализе;

где снижение биологической активности GCGR в первом анализе, большее, чем снижение биологической активности GCGR во втором анализе, указывает на соединение, которое нейтрализует агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR.

17. Способ по п.16, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты.

18. Способ по пп.16 или 17, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

19. Способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. введение соединения в первый клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона, или глюкагона/aP2, и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где соединение присутствует в фиксированной концентрации, и где aP2 и глюкагон или глюкагон/aP2 присутствуют в первой концентрации;

ii. определение биологической активности GCGR в популяции клеток в первом клеточном анализе;

iii. введение соединения в серию дополнительных клеточных анализов в присутствии aP2 и глюкагона, или глюкагона/aP2, и популяции клеток, включающей клетки, экспрессирующие GCGR, где серия дополнительных клеточных анализов включает соединение, присутствующее в фиксированной концентрации, и aP2, глюкагон или глюкагон/aP2 в последовательно увеличивающихся концентрациях по сравнению с первым клеточным анализом;

iv. определение биологической активности GCGR в популяции клеток в серии дополнительных клеточных анализов; и

v. сравнение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе с биологической активностью GCGR в серии дополнительных клеточных анализов,

где снижение биологической активности GCGR в первом клеточном анализе, большее, чем снижение биологической активности GCGR в серии дополнительных клеточных анализов, указывает на соединение, которое нейтрализует агонистическое взаимодействие глюкагона/aP2 с GCGR.

20. Способ по п.19, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты.

21. Способ по пп.19 или 20, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

22. Способ идентификации соединения, способного к

нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

- i. контакт соединения с aP2; и
- ii. определение, связывается ли соединение с aP2 по аминокислоте Phe58, Asn60, Glu62 или Lys80 Seq. ID No. 1 или No. 2;

где связывание соединения с aP2 по аминокислоте Phe58, Asn60, Glu62 или Lys80 Seq. ID No. 1 или No. 2 указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR.

23. Способ по п.22, дополнительно включающий:

- i. введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR; и
- ii. измерение биологической активности GCGR.

24. Способ по п.23, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются гепатоциты.

25. Способ по пп.23 или 24, где популяцией клеток, экспрессирующих GCGR, являются человеческие клетки.

26. Способ нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR у субъекта, включающий введение субъекту соединения, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 связываться с GCGR, и где соединение предпочтительно связывает глюкагон/aP2 по сравнению с aP2.

27. Способ по пп.25 или 26, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

28. Способ нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR у субъекта, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое ингибирует способность образования глюкагона/aP2.

29. Способ по п.28, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

30. Способ ингибирования продукции глюкозы в печени у субъекта, включающий введение субъекту соединения, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается с GCGR

непосредственно, и где соединение предпочтительно связывает глюкагон/aP2 по сравнению с aP2.

31. Способ по п.30, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

32. Способ ингибирования печеночной селективной инсулинорезистентности у субъекта, включающий введение субъекту соединения, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR, и где соединение предпочтительно связывает глюкагон/aP2 по сравнению с aP2.

33. Способ по п.32, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

34. Способ лечения субъекта с нарушением, опосредованным дисрегуляцией продукции глюкозы в печени, включающий введение субъекту соединения, включающего, без ограничения, антитело, которое нейтрализует способность глюкагона/aP2 агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR, и где соединение предпочтительно связывает глюкагон/aP2 по сравнению с aP2.

35. Способ по п.34, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

36. Способ по п.34 или 35, где нарушение выбрано из диабета 1-го типа, диабета 2-го типа, гипергликемии, диабетического кетоацидоза, гипергликемического гиперосмолярного синдрома, сердечно-сосудистого заболевания, диабетической нефропатии или почечной недостаточности, диабетической ретинопатии, нарушенного уровня глюкозы натощак, нарушенной толерантности к глюкозе, дислипидемии, ожирения, катаракты, инсульта, атеросклероза, замедленного заживления ран, гипергликемии, послеоперационной гипергликемии, синдрома инсулинорезистентности, метаболического синдрома, фиброза печени, фиброза легких, неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП) и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), гепатоцеллюлярной карциномы, цирроза, глюкагономы и некролитической мигрирующей эритемы (НМЭ).

37. Способ лечения субъекта с нарушением, опосредованным печеночной селективной инсулинорезистентностью, включающий

введение субъекту соединения, которое нейтрализует способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR, и предпочтительно связывает глюкагон/ $\alpha P2$ по сравнению с $\alpha P2$.

38. Способ по п.37, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

39. Способ по п.37 или 38, где нарушением является диабет II типа.

40. Способ модуляции дислипидемии у субъекта, включающий введение субъекту соединения, которое нейтрализует способность глюкагона/ $\alpha P2$ агонистически взаимодействовать с GCGR, где соединение не связывается напрямую с GCGR.

41. Способ по п.40, где соединение является антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим средством.

42. Способ модуляции сигнальной активности глюкагона у субъекта, включающий введение субъекту антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом глюкагона/ $\alpha P2$ активности GCGR.

43. Способ по п.42, где субъектом является человек.

44. Способ по п.42, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением связывания глюкагона с GCGR таким образом, который обычно вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к повышению внутриклеточного цАМФ.

45. Способ по п.42, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением связывания $\alpha P2$ с GCGR таким образом, который обычно вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к повышению внутриклеточного цАМФ.

46. Способ по п.42, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением способности комплекса глюкагона/белка $\alpha P2$ участвовать в связывании с рецептором, вызывающем внутриклеточную сигнализацию.

47. Способ по п.42, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением аллостерического связывания $\alpha P2$ с GCGR и изменением трехмерной структуры рецептора таким

образом, что глюкагон не может связываться с GCGR, связывание с GCGR уменьшается или связывание изменяется таким образом, что предотвращается эффективная внутриклеточная сигнализация цАМФ.

48. Способ по п.42, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением связывания глюкагона с комплексом глюкагона/aP2-GCGR таким образом, что предотвращается эффективная рецептор-опосредованная внутриклеточная сигнализация цАМФ.

49. Способ по п.42, где блокирование вызвано предотвращением или нарушением образования комплекса глюкагона/aP2 таким образом, что предотвращается эффективная рецептор-опосредованная внутриклеточная сигнализация цАМФ.

50. Способ по п.42, где блокирование вызвано модификацией комплекса глюкагона/белка aP2 в результате конформационного изменения, которое препятствует эффективному связыванию комплекса глюкагона/aP2 с GCGR.

51. Способ по любому из пп.26-50, где соединение предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/aP2 по сравнению с aP2.

52. Способ по любому из пп.26-50, где субъектом является человек.

53. Способ модуляции сигнальной активности глюкагона у субъекта, включающий введение субъекту антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом aP2-глюкагона активности сопряженного с G-белком рецептора.

54. Способ по п.53, где субъектом является человек.

55. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением связывания глюкагона с глюкагоновым рецептором, сопряженным с G-белком, таким образом, который обычно вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к повышению внутриклеточного цАМФ.

56. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением связывания aP2 с глюкагоновым рецептором, сопряженным с G-белком, таким образом, который обычно

вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к повышению внутриклеточного цАМФ.

57. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением способности белкового комплекса аР2-глюкагона к связыванию с рецептором, вызывающему внутриклеточную сигнализацию.

58. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением аллостерического связывания аР2 с глюкагоновым рецептором, сопряженным с G-белком, и изменением трехмерной структуры рецептора таким образом, что глюкагон не может связываться с рецептором, связывание с глюкагоновым рецептором уменьшается или связывание изменяется таким образом, что предотвращается эффективная внутриклеточная сигнализация цАМФ.

59. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано предотвращением или уменьшением связывания глюкагона с комплексом аР2-глюкагона и сопряженного с G-белком рецептора таким образом, что предотвращается эффективная рецептор-опосредованная внутриклеточная сигнализация цАМФ.

60. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано предотвращением или нарушением образования комплекса аР2-глюкагона таким образом, что предотвращается эффективная рецептор-опосредованная внутриклеточная сигнализация цАМФ.

61. Способ по пп.53-54, где блокирование вызвано модификацией белкового комплекса аР2-глюкагона в результате конформационного изменения, которое препятствует эффективному связыванию комплекса аР2-глюкагона с глюкагоновым рецептором.

62. Способ по пп.53-61, где антитело является моноклональным антителом, которое предпочтительно связывается с комплексом глюкагона/аР2 по сравнению с аР2 и глюкагоном.

63. Способ лечения субъекта, имеющего глюкагоному, включающий введение субъекту эффективного количество антитела или антигенсвязывающего средства, включающего:

(а) переменную область легкой цепи, включающую одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR-L), независимо выбранных из аминокислотной последовательности

области CDR-L1, аминокислотной последовательности области CDR-L2 или аминокислотной последовательности области CDR-L3,

где аминокислотной последовательностью области CDR-L1 является Seq. ID No. 7;

где аминокислотной последовательностью области CDR-L2 является Seq. ID No. 8; и

где аминокислотная последовательность области CDR-L3 выбрана из Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11 или Seq. ID No. 12; и

(b) вариабельную область тяжелой цепи, включающую одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR-H), независимо выбранных из аминокислотной последовательности области CDR-H1, аминокислотной последовательности области CDR-H2 или аминокислотной последовательности области CDR-H3,

где аминокислотной последовательностью области CDR-H1 является Seq. ID No. 14;

где аминокислотной последовательностью области CDR-H2 является Seq. ID No. 16 или Seq. ID No. 17; и

где аминокислотная последовательность области CDR-H3 выбрана из Seq. ID No. 19 или Seq. ID No. 20.

64. Способ модуляции способности глюкагона активировать глюкагоновый рецептор для лечения нарушения, ассоциированного с повышенными уровнями глюкозы в крови, включающий введение субъекту с повышенными уровнями глюкозы в крови эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом aP2-глюкагона активности сопряженного с G-белком рецептора, где антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела предпочтительно связывают комплекс глюкагона/aP2 по сравнению с aP2 и глюкагоном.

65. Способ по п.64, где субъектом является человек.

66. Способ по пп.64 или 65, где антитело является моноклональным антителом.

67. Способ по пп.64-66, где нарушение, ассоциированное с повышенными уровнями глюкозы в крови, является нарушением обмена веществ.

68. Способ по пп.64-67, где нарушение обмена веществ выбрано из группы, состоящей из диабета 1-го типа, диабета 2-го типа, гипергликемии, диабетического кетоацидоза, гипергликемического гиперосмолярного синдрома, сердечно-сосудистого заболевания, диабетической нефропатии или почечной недостаточности, диабетической ретинопатии, нарушенного уровня глюкозы натощак, нарушенной толерантности к глюкозе, дислипидемии, ожирения, катаракты, инсульта, атеросклероза, замедленного заживления ран, послеоперационной гипергликемии, гипергликемии у пациента в палате интенсивной терапии, синдрома инсулинорезистентности, метаболического синдрома и жировой болезни печени.

69. Способ снижения уровней глюкозы в крови натощак, включающий введение субъекту с повышенными уровнями глюкозы в крови натощак эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом аР2-глюкагона активности сопряженного с G-белком рецептора, где антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела предпочтительно связывается с глюкагоном/аР2 по сравнению с аР2.

70. Способ по п.69, где субъектом является человек.

71. Способ по пп.69-70, где антитело является моноклональным антителом.

72. Способ снижения гиперинсулинемии, включающий введение субъекту с гиперинсулинемией эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом аР2-глюкагона активности сопряженного с G-белком рецептора, где антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела предпочтительно связывается с глюкагон/аР2 по сравнению с аР2.

73. Способ по п.72, где субъектом является человек.

74. Способ по пп.72-73, где антитело является моноклональным антителом.

75. Способ снижения стеатоза печени, включающий введение

субъекту со стеатозом печени эффективного количества антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом аР2-глюкагона активности сопряженного с G-белком рецептора, где антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела предпочтительно связывается с глюкагон/аР2 по сравнению с аР2.

76. Способ по п.75, где субъектом является человек.

77. Способ по пп.75-76, где антитело является моноклональным антителом.

78. Способ повышения чувствительности к инсулину у субъекта, включающий введение субъекту антитела, антигенсвязывающего средства или связывающего фрагмента антитела, который вызывает блокирование опосредованной комплексом аР2-глюкагона активности сопряженного с G-белком рецептора, где антитело, антигенсвязывающее средство или связывающий фрагмент антитела предпочтительно связывается с глюкагон/аР2 по сравнению с аР2.

79. Способ по п.78, где субъектом является человек.

80. Способ по пп.78-79, где антитело является моноклональным антителом.

81. Способ лечения субъекта, имеющего некротическую мигрирующую эритему (НМЭ), включающий введение субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего средства, включающего:

(а) вариабельную область легкой цепи, включающую одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR-L), независимо выбранные из аминокислотной последовательности области CDR-L1, аминокислотной последовательности области CDR-L2 или аминокислотной последовательности области CDR-L3,

где аминокислотной последовательностью области CDR-L1 является Seq. ID No. 7;

где аминокислотной последовательностью области CDR-L2 является Seq. ID No. 8; и

где аминокислотная последовательность области CDR-L3 выбрана из Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11 или

Seq. ID No. 12; и

(b) вариабельную область тяжелой цепи, включающую одну, две или три определяющих комплементарность области (CDR-H), независимо выбранные из аминокислотной последовательности области CDR-H1, аминокислотной последовательности области CDR-H2 или аминокислотной последовательности области CDR-H3,

где аминокислотной последовательностью области CDR-H1 является Seq. ID No. 14;

где аминокислотной последовательностью области CDR-H2 является Seq. ID No. 16 или Seq. ID No. 17; и

где аминокислотная последовательность области CDR-H3 выбрана из Seq. ID No. 19 или Seq. ID No. 20.

82. Способ по п.22, где способ дополнительно включает введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и измерение биологической активности GCGR.

83. Способ идентификации соединения, способного к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR, включающий:

i. контакт соединения с глюкагоном; и

ii. определение, связывается ли соединение с глюкагоном по аминокислоте, выбранной из Phe22, Val23, Gln24, Trp25, Leu26, Met27, Asn28 и Thr29 Seq. ID No. 82;

где связывание соединения с aP2 по аминокислоте Phe22, Val23, Gln24, Trp25, Leu26, Met27, Asn28 или Thr29 Seq. ID No. 82, или их комбинации, указывает на соединение, способное к нейтрализации агонистического взаимодействия глюкагона/aP2 с GCGR.

84. Способ по п.83, дополнительно включающий введение соединения в клеточный анализ в присутствии aP2 и глюкагона или глюкагона/aP2, где клеточный анализ включает популяцию клеток, экспрессирующих GCGR, и измерение биологической активности GCGR.

85. Способ по п.63, где субъектом является человек.

86. Способ по пп.22-62 и 64-80, где соединение не связывает GCGR.

87. Способ по пп.1, 5, 9, 22 и 83, где способ выполняют *in vitro* в отсутствие клеток.

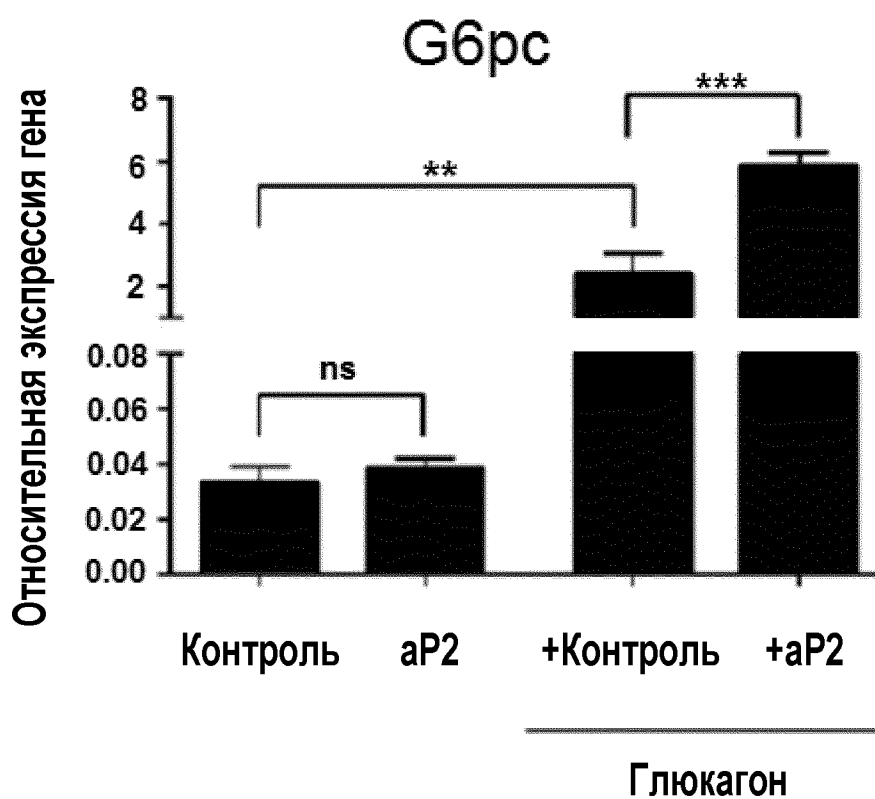
88. Композиция, включающая глюкагон в комплексе с aP2, связанный с антителом, антигенсвязывающим средством или фрагментом антитела.

89. Композиция по п.88, где антитело, антигенсвязывающее средство или фрагмент антитела обычно не присутствуют в организме человека.

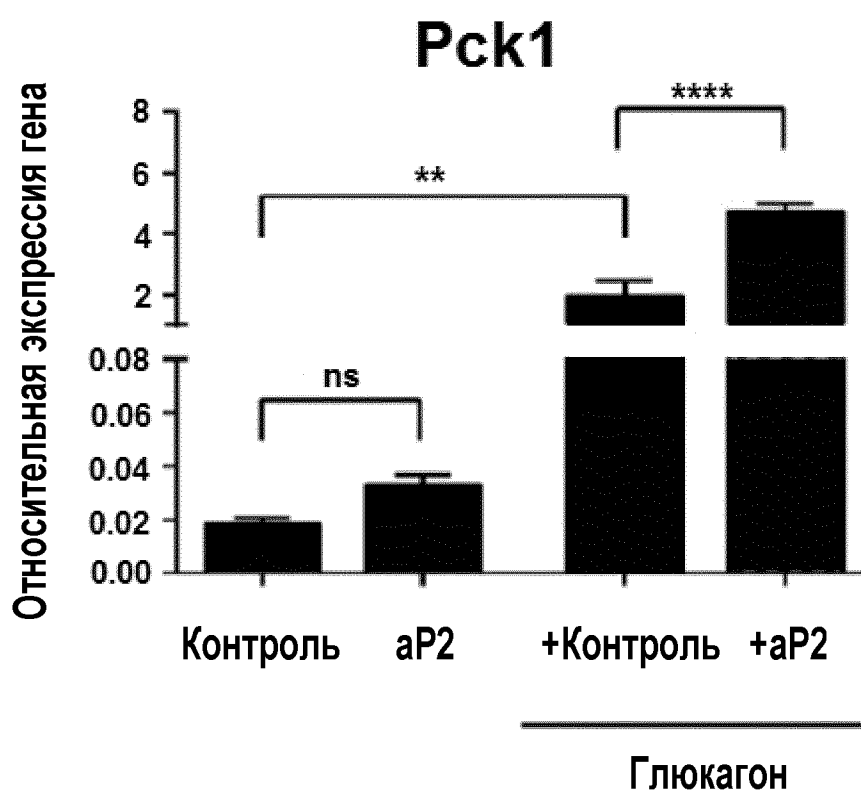
90. Композиция по пп.88 или 89, где глюкагон/aP2, связанный с антителом, антигенсвязывающим средством или фрагментом антитела, является выделенным.

По доверенности

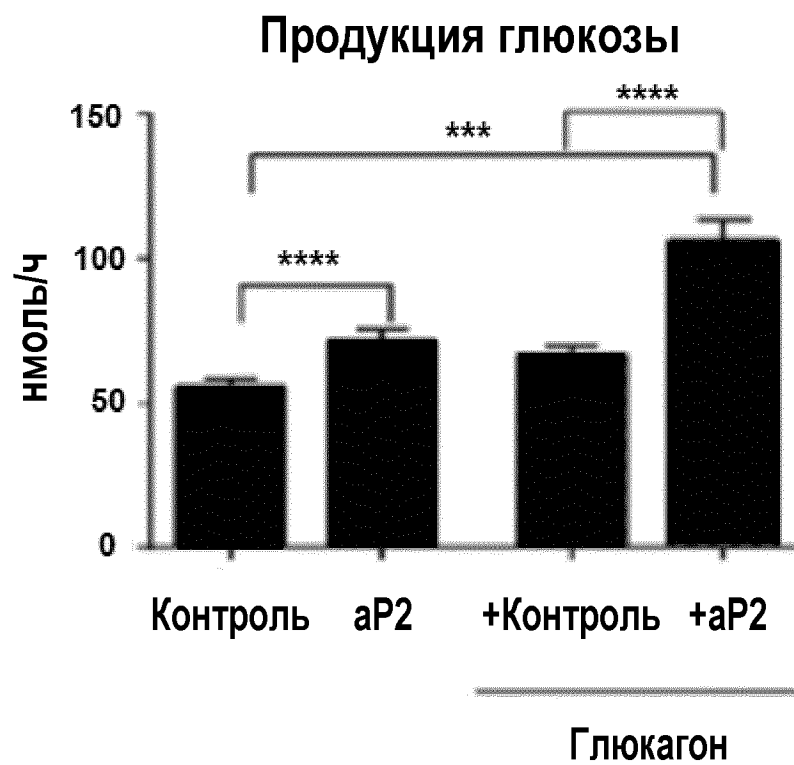
ФИГ.1А



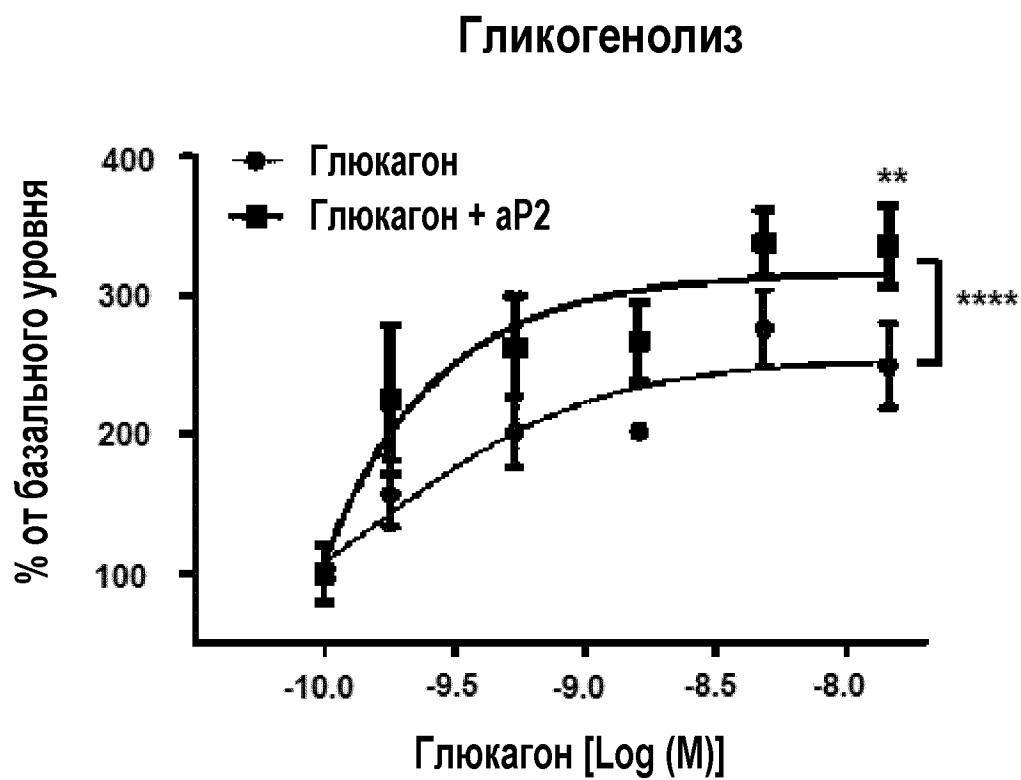
ФИГ.1В



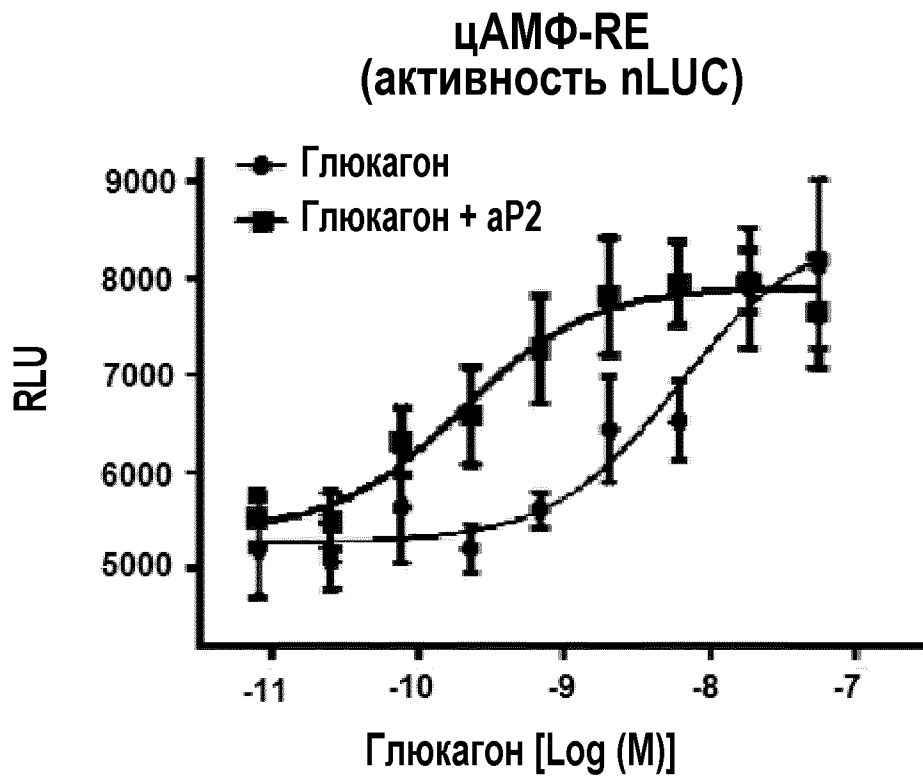
ФИГ.1С



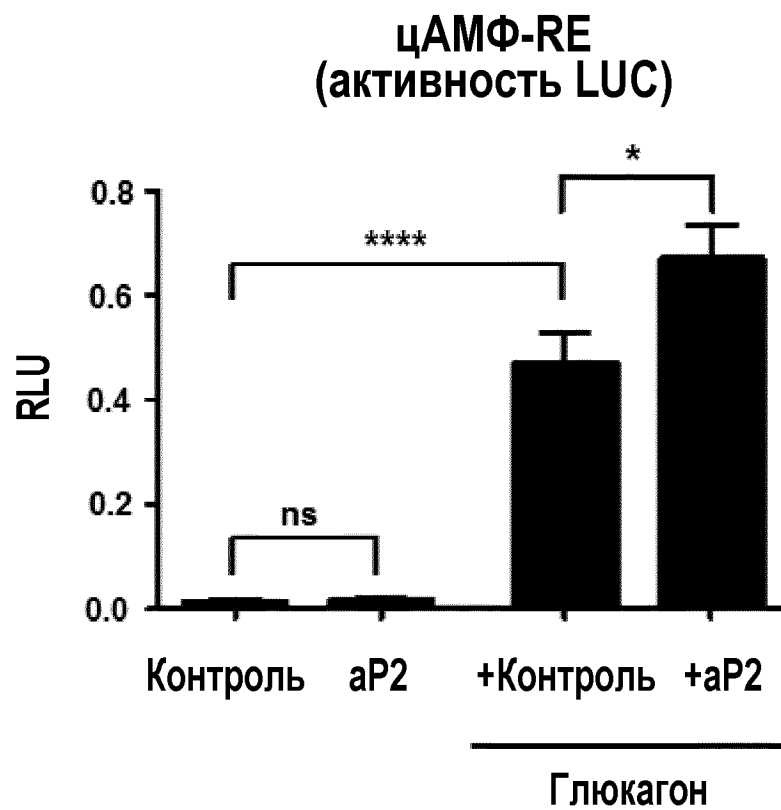
ФИГ.1D



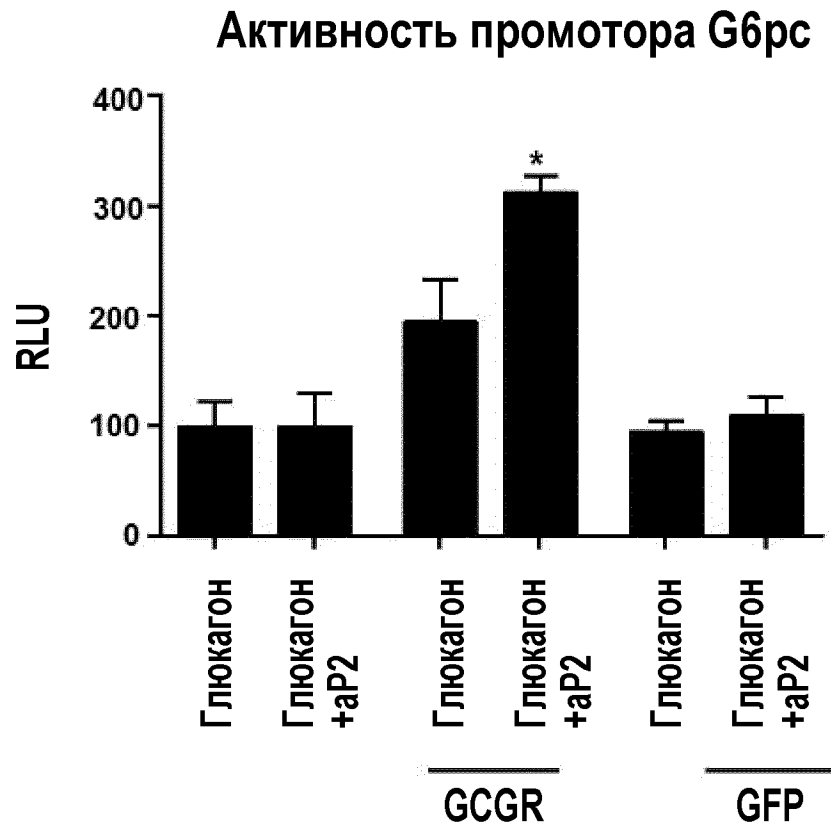
ФИГ.1Е



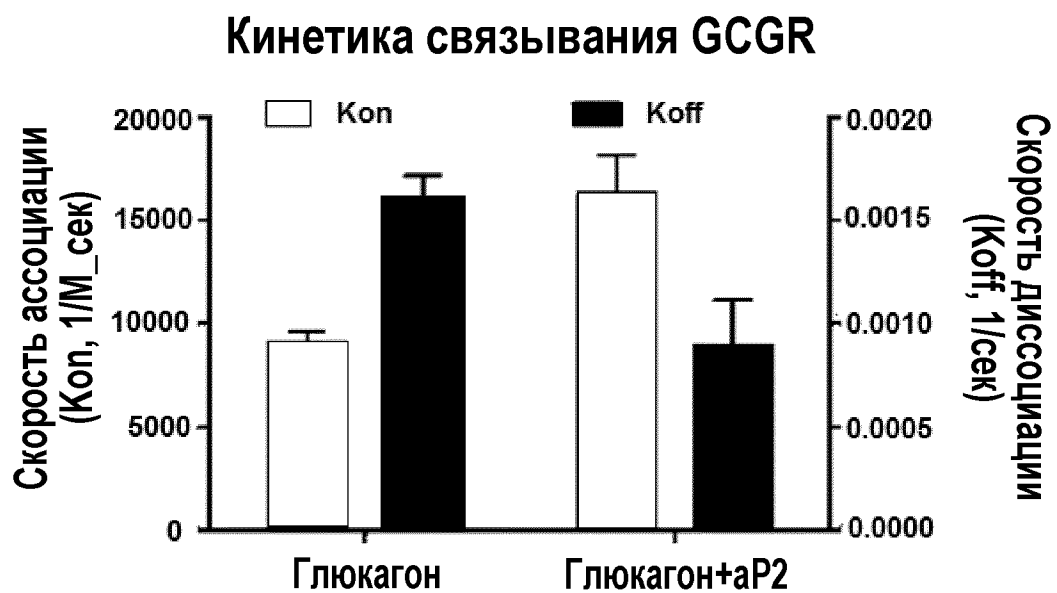
ФИГ.1F



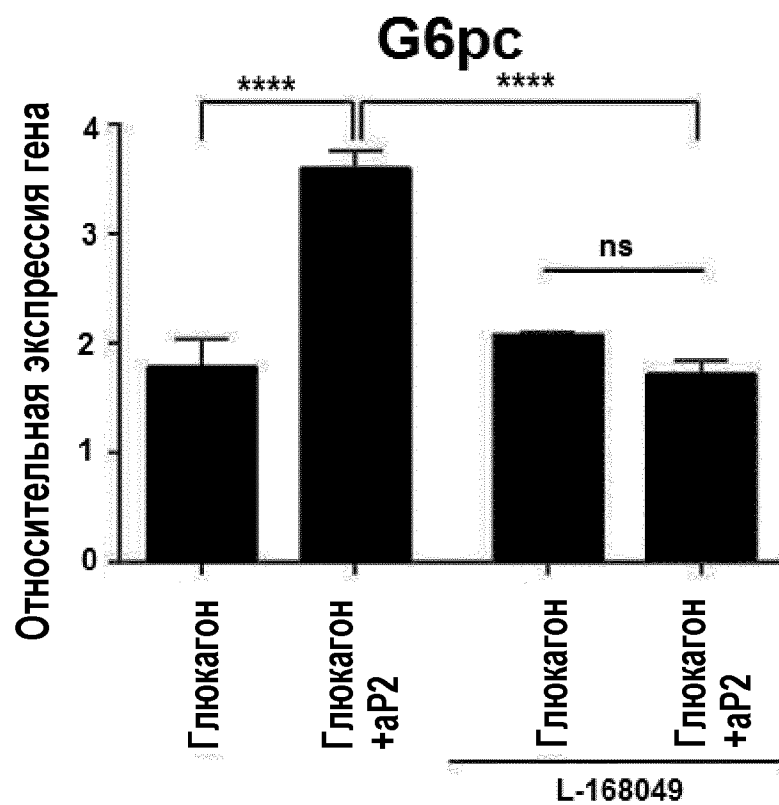
ФИГ.2А



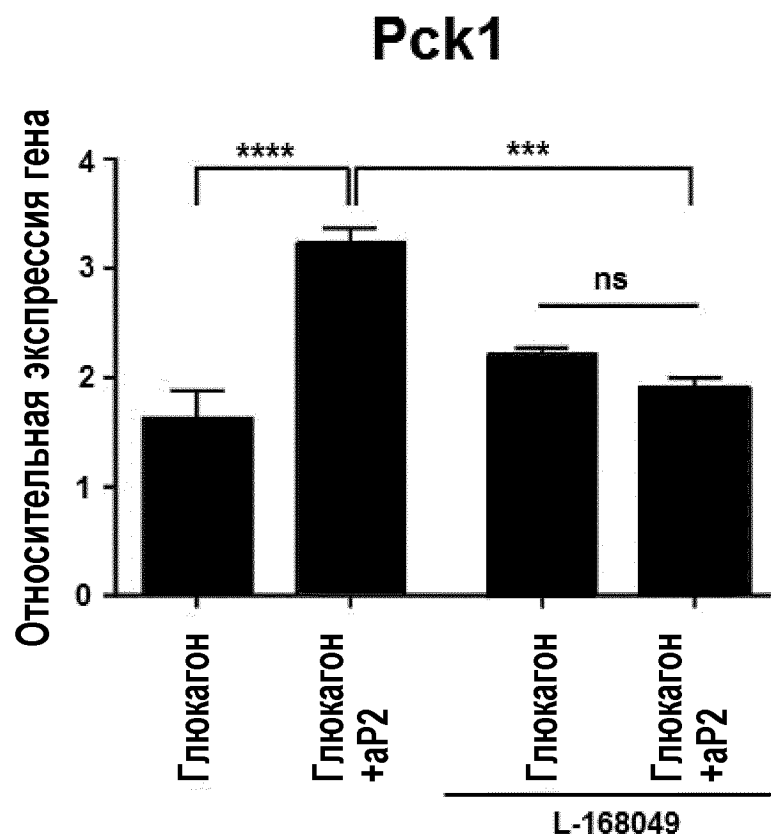
ФИГ.2В



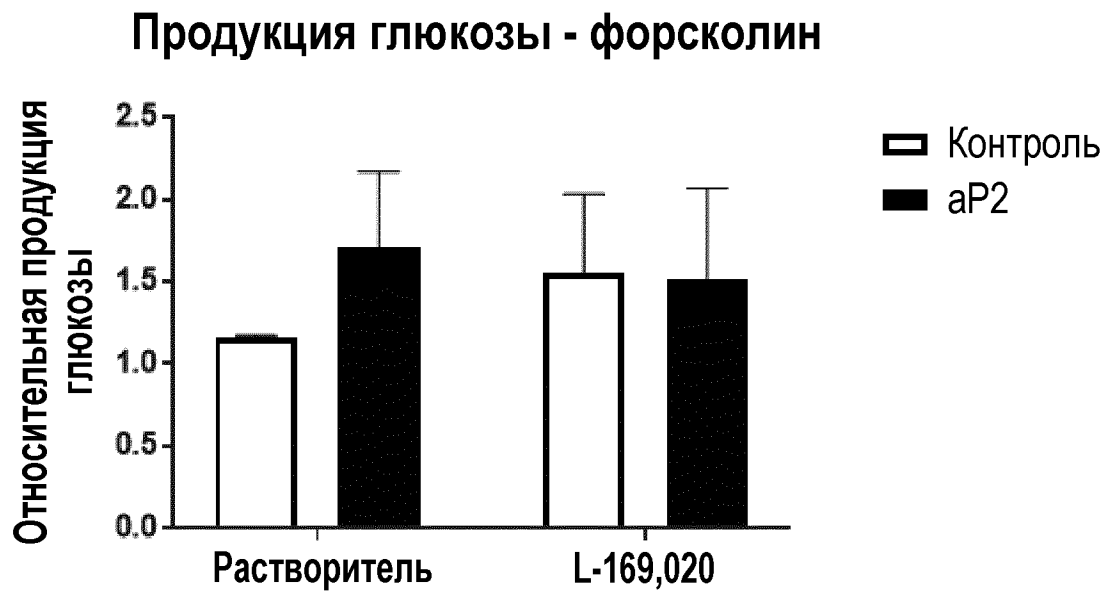
ФИГ.2С



ФИГ.2D



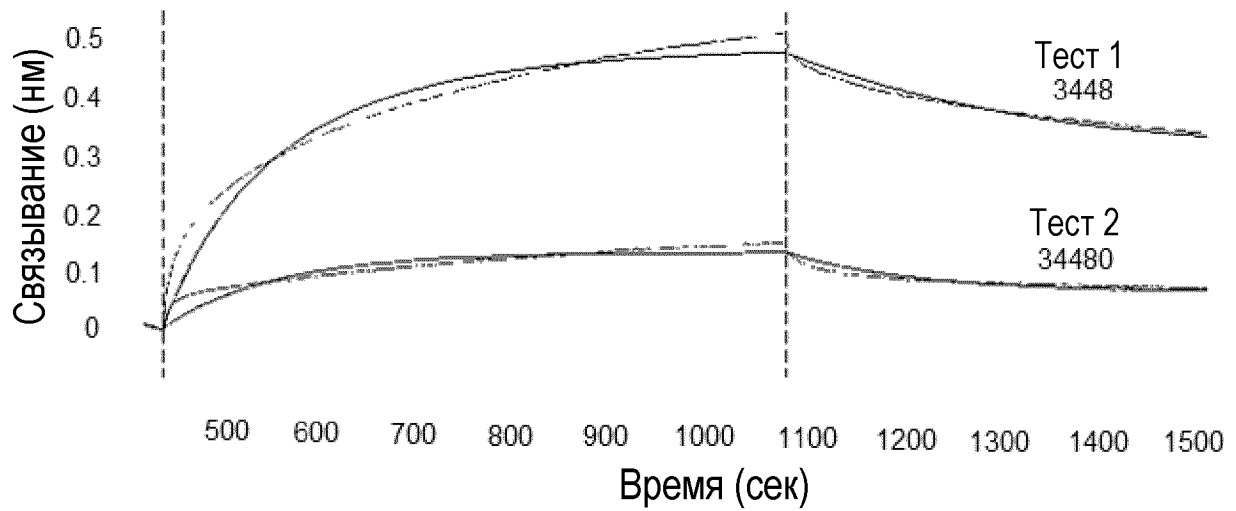
ФИГ.2Е



ФИГ.2F



ФИГ.3А

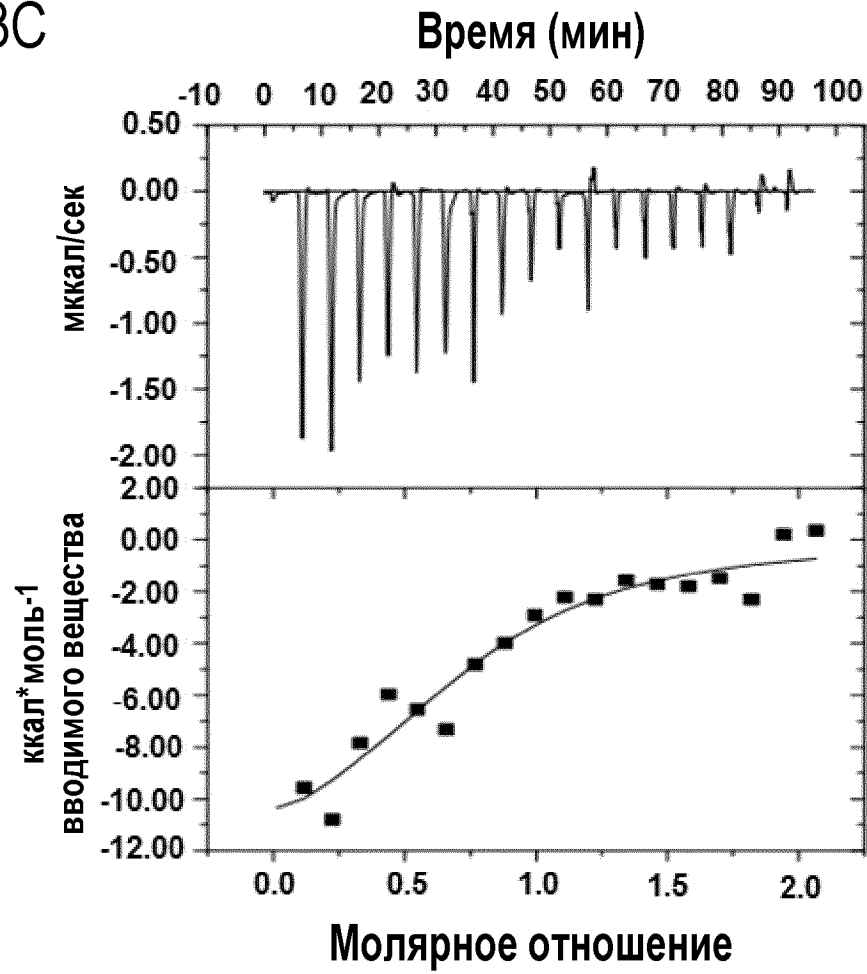


ФИГ.3В

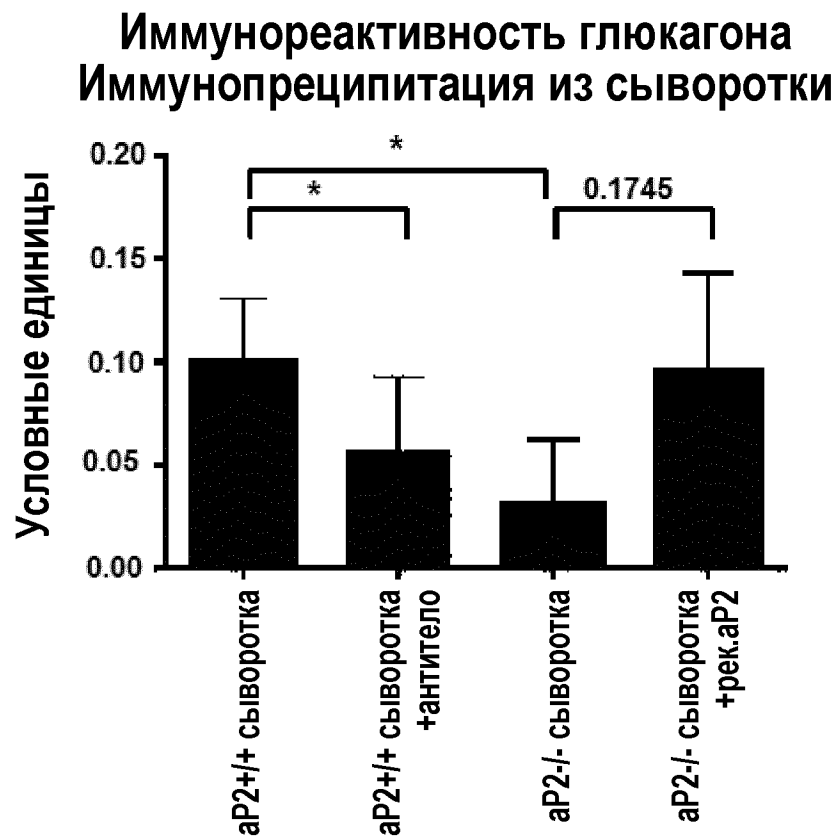
Связывание ^{125}I -глюкагона с αP2
(сцинтилляционный анализ сближения)



ФИГ.3С

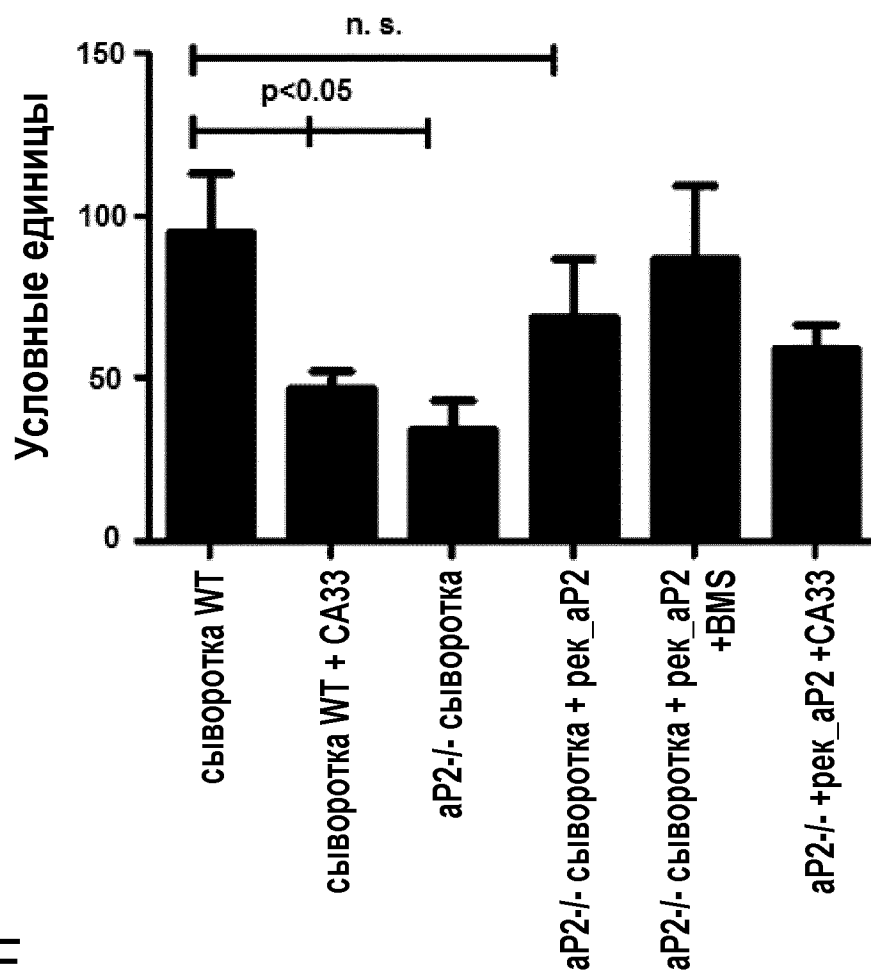


ФИГ.3D

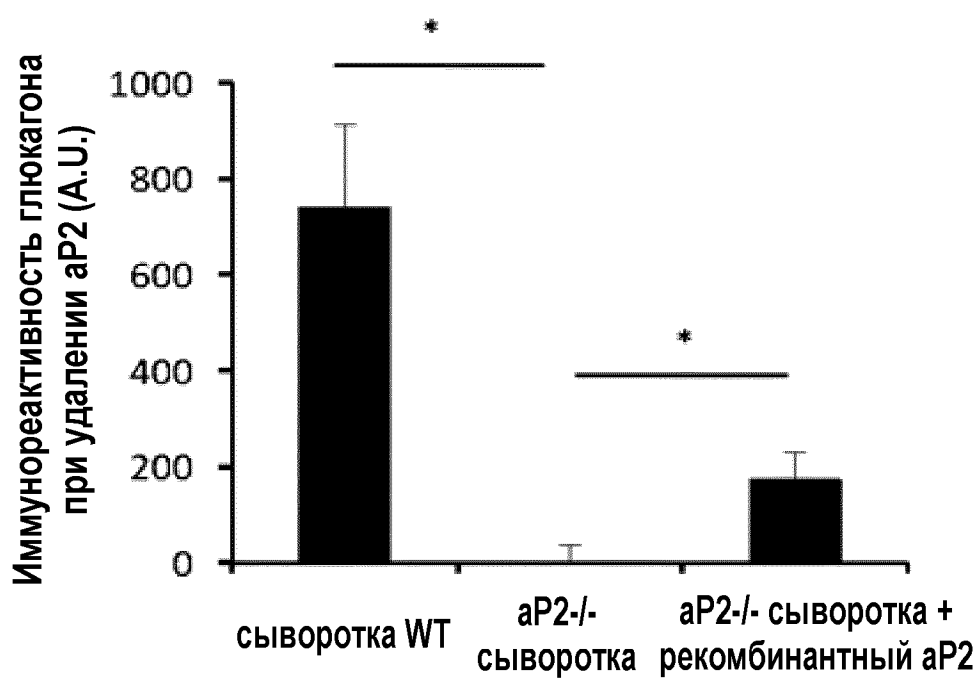


ФИГ.3Е

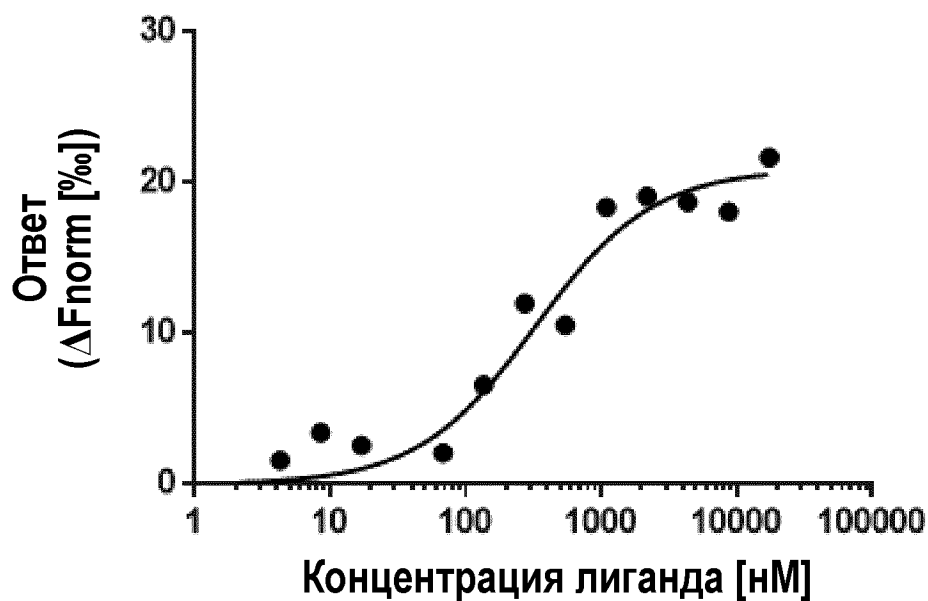
Иммунореактивность глюкагона Иммунопреципитация из сыворотки



ФИГ.3F



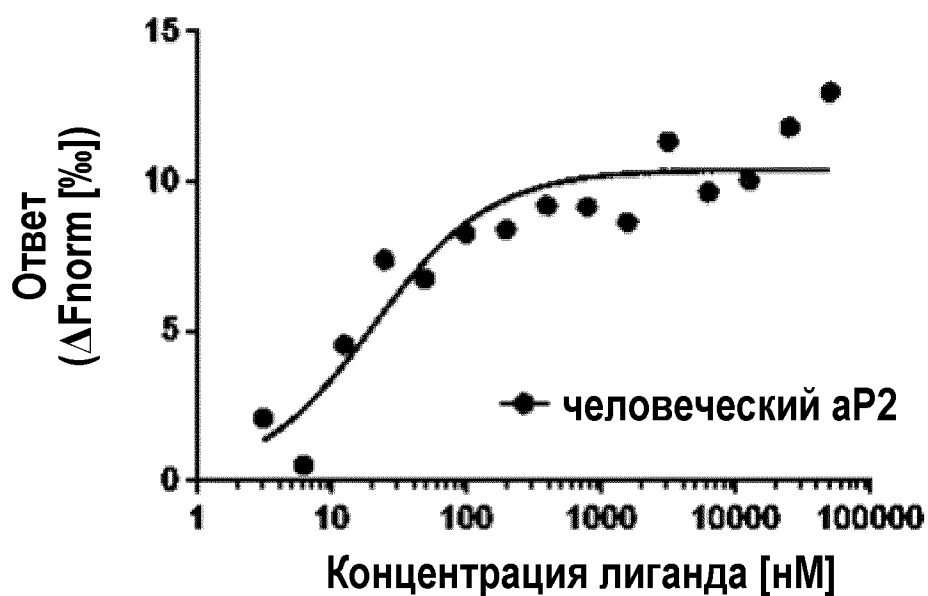
ФИГ.3Г

aP2-GCGR_{Recd}

EC50	326.9
logEC50	2.514
Диапазон	20.94

ФИГ.3Н

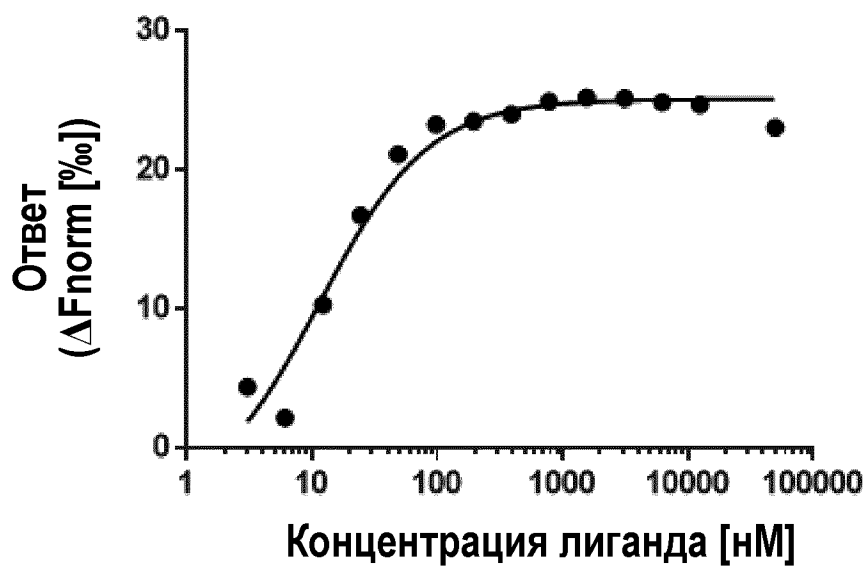
aP2-Глюкагон



EC50	20.32
logEC50	1.308
Диапазон	10.4

ФИГ.3I

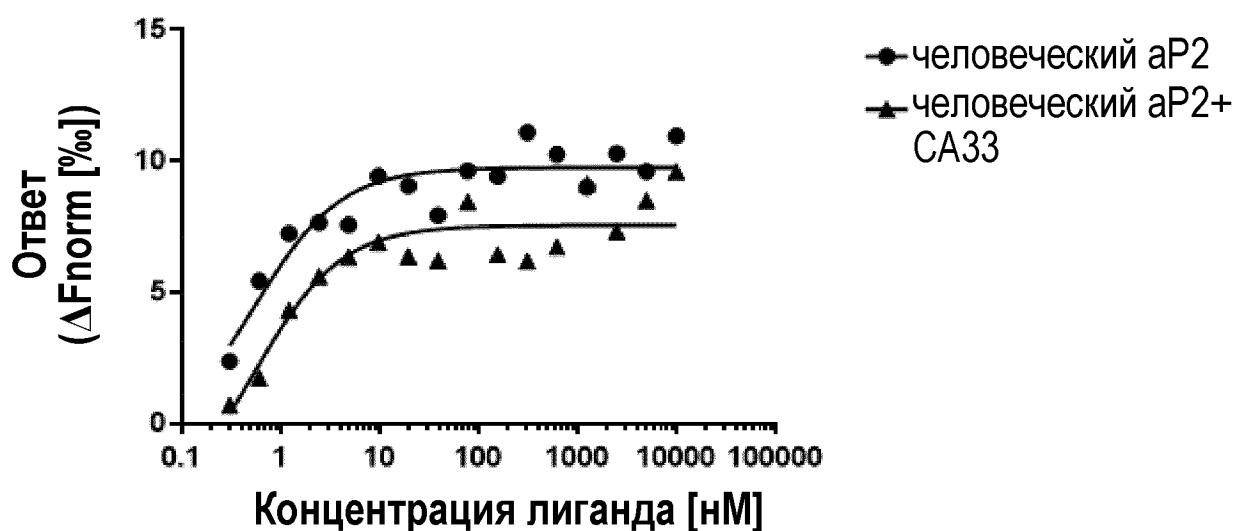
GCGRecd-Глюкагон



EC50	11.41
logEC50	1.057
Диапазон	29.4

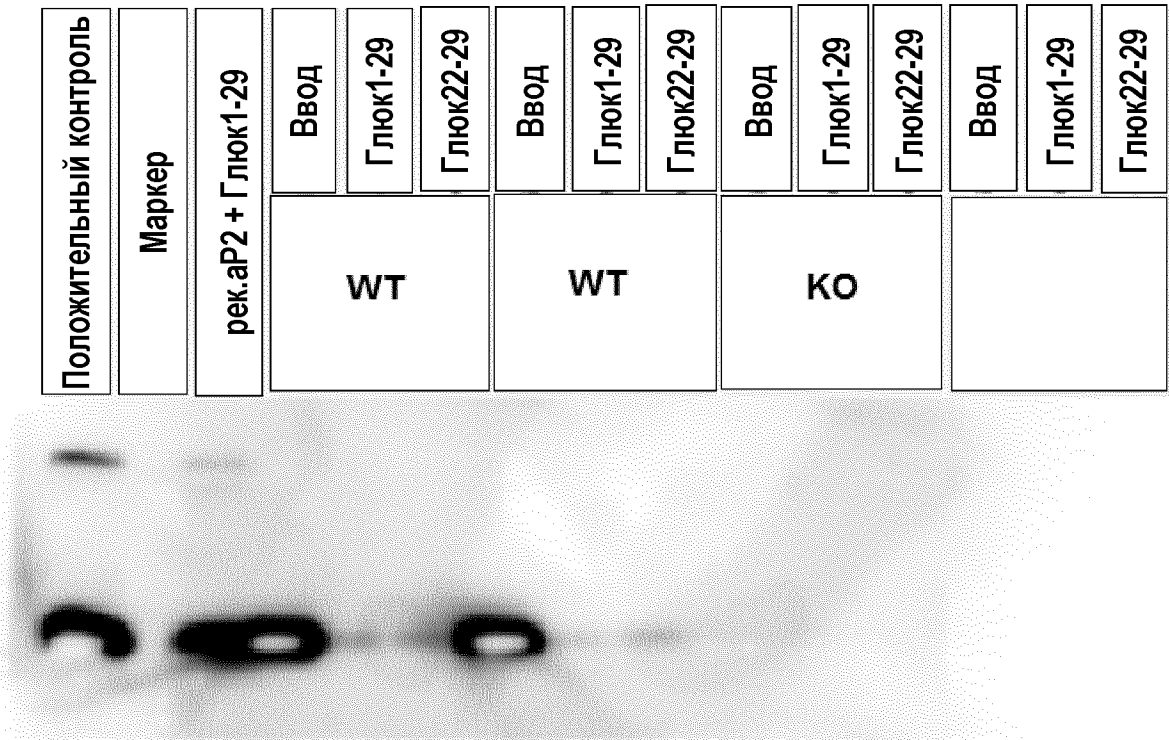
ФИГ.3J

GCGRecd-Глюкагон+антитело

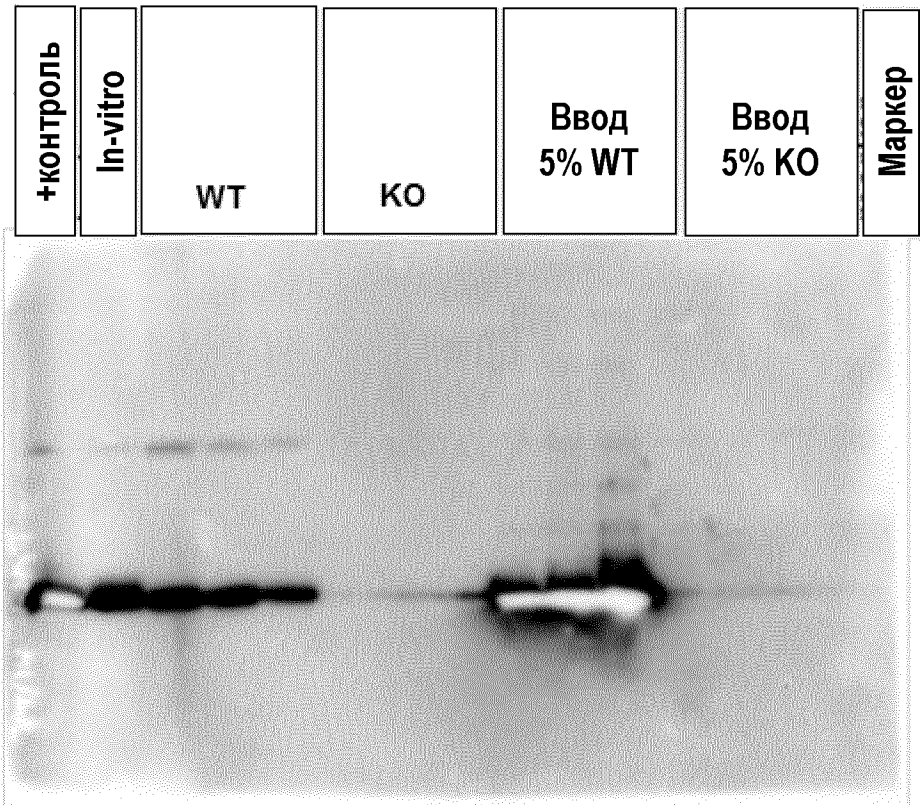


Сравнение соответствия	
Нулевая гипотеза	
Альтернативная гипотеза	
P-значение	
Вывод (альфа=0,05)	
Предпочтительная модель	
F (DFn, DFd)	

ФИГ.3К

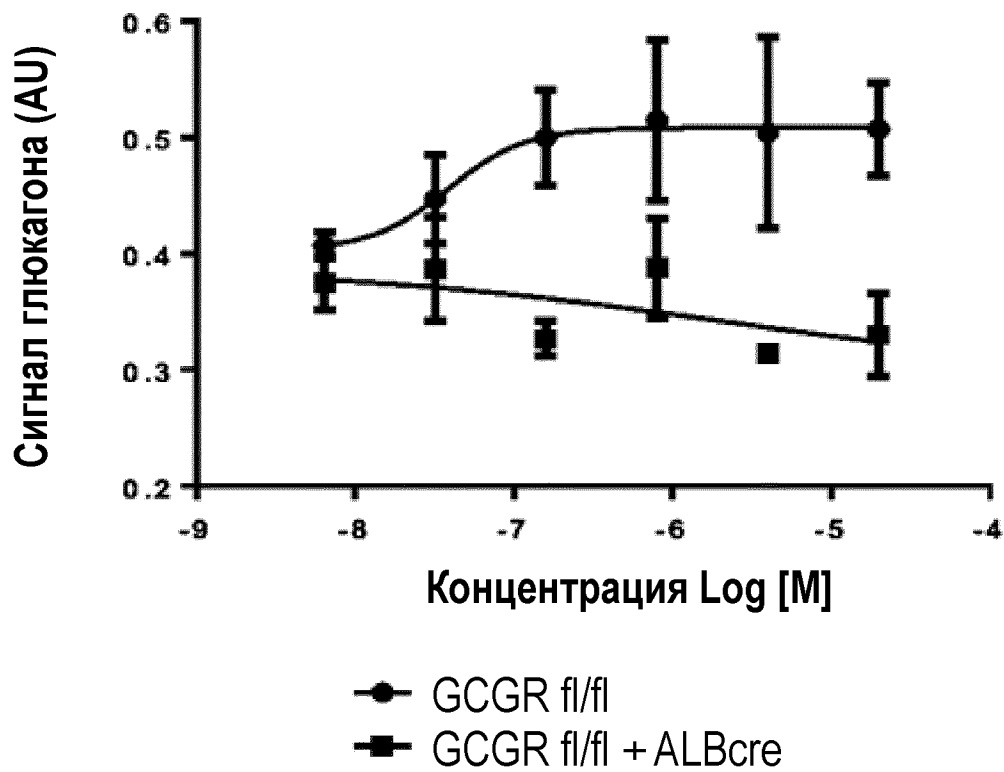


ФИГ.3L

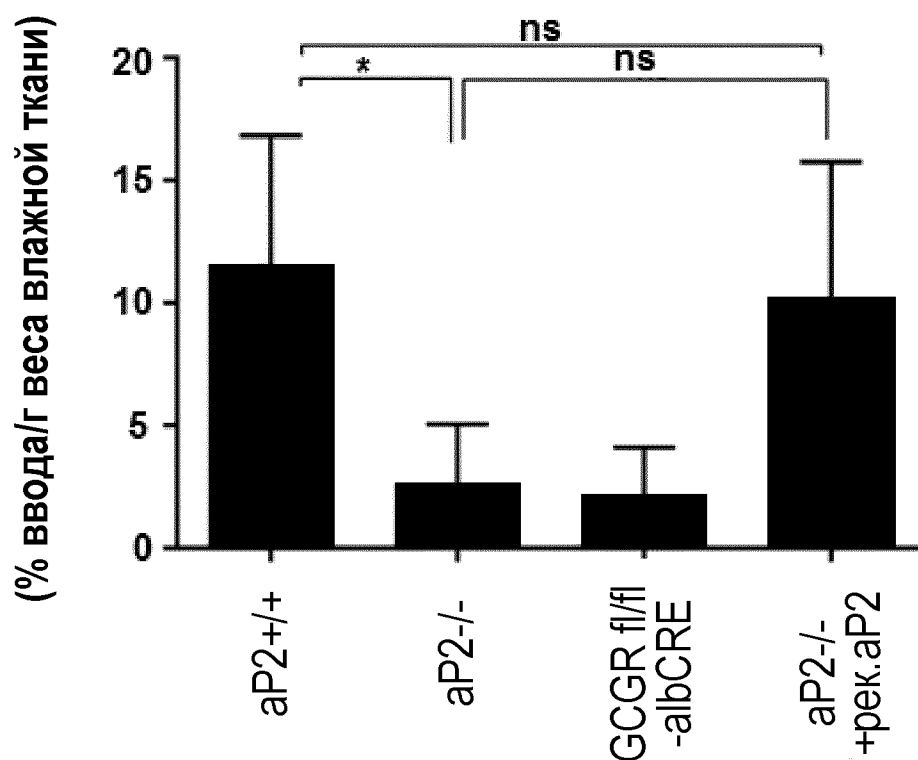


ФИГ.4А

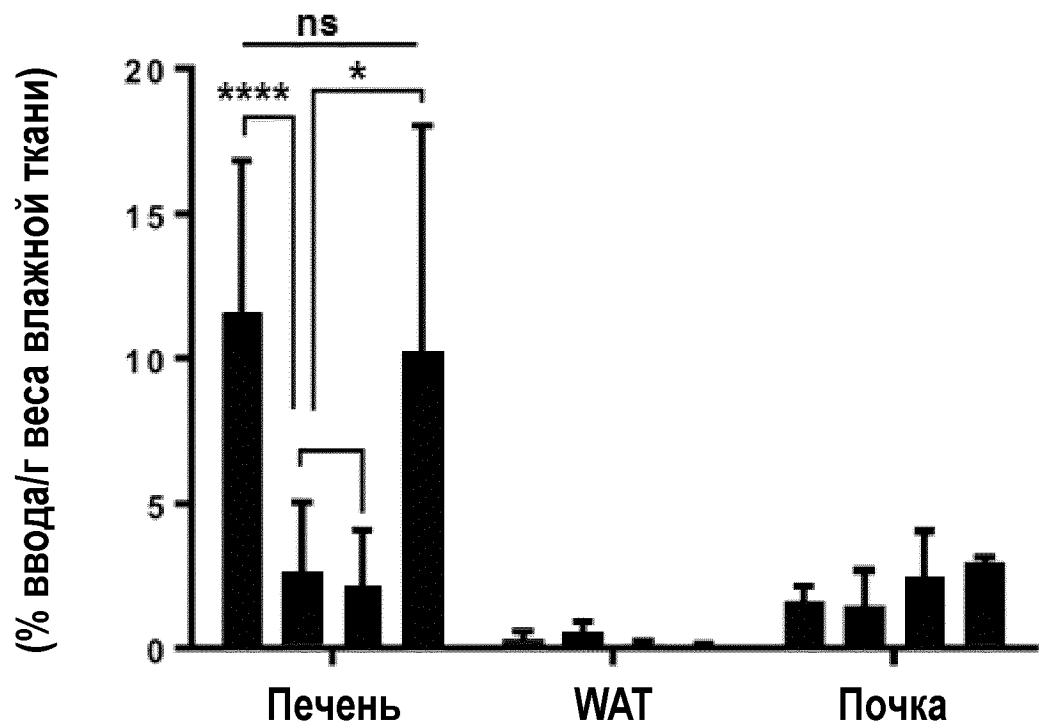
Связывание GCGR-глюкагона



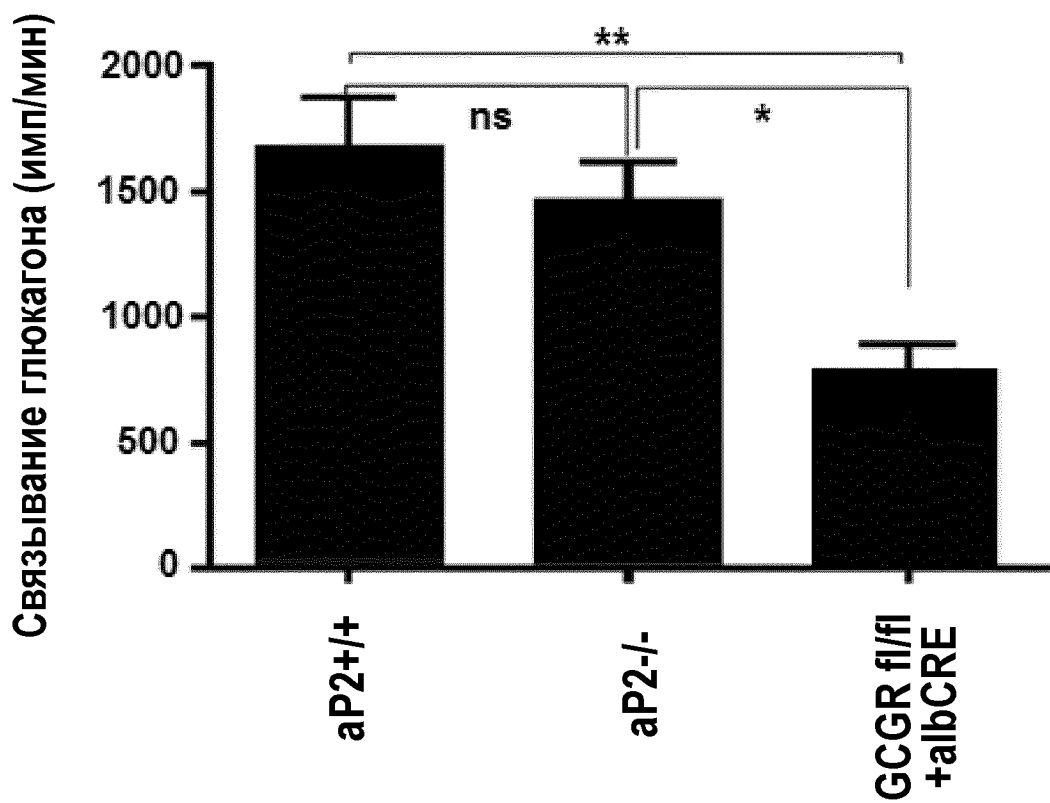
ФИГ.4В



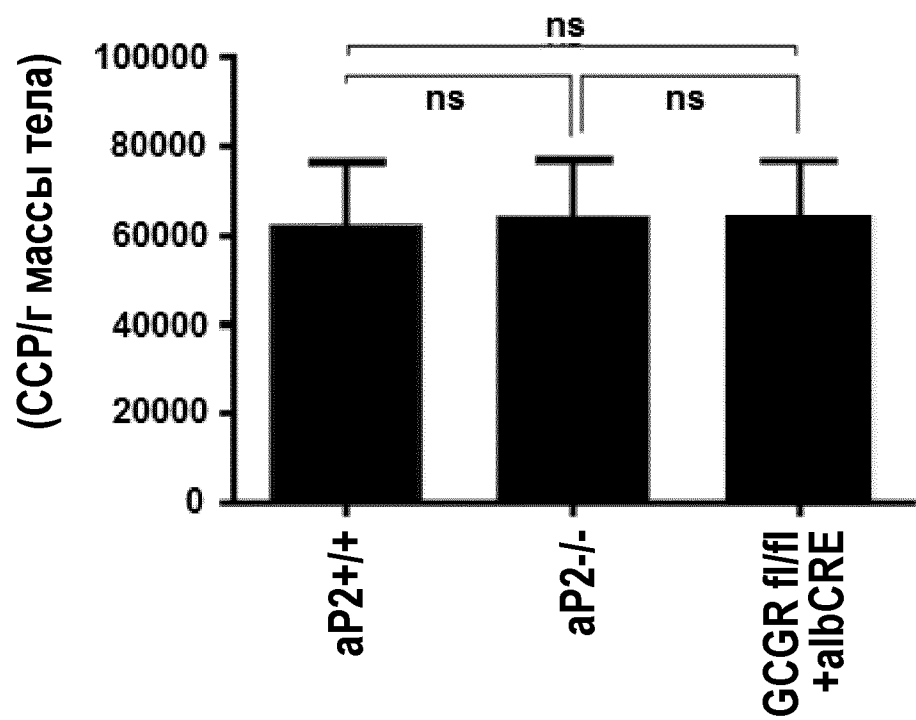
ФИГ.4С



ФИГ.4D

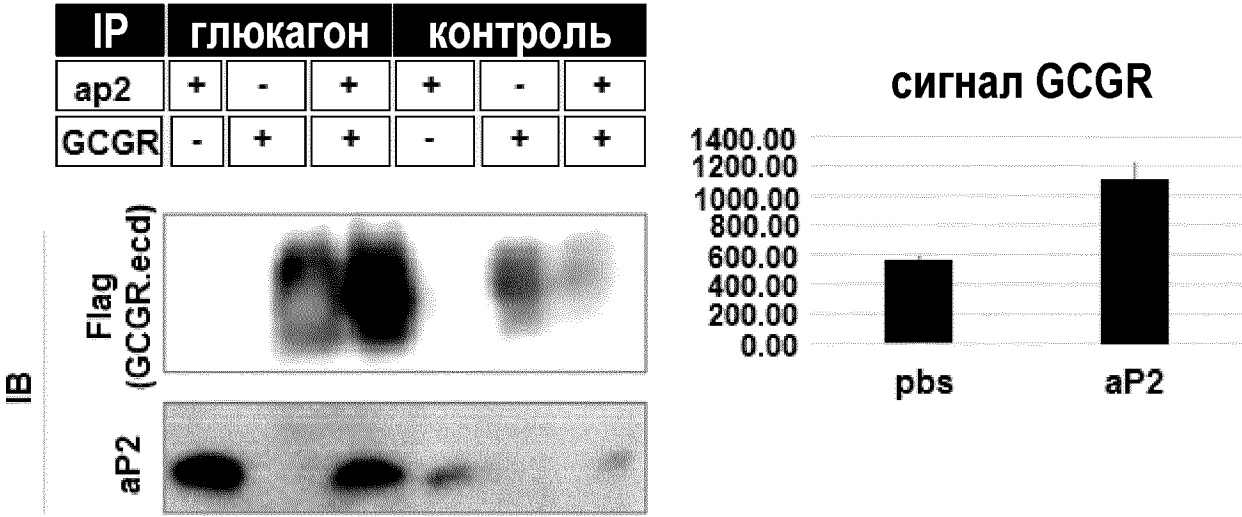


ФИГ.4Е

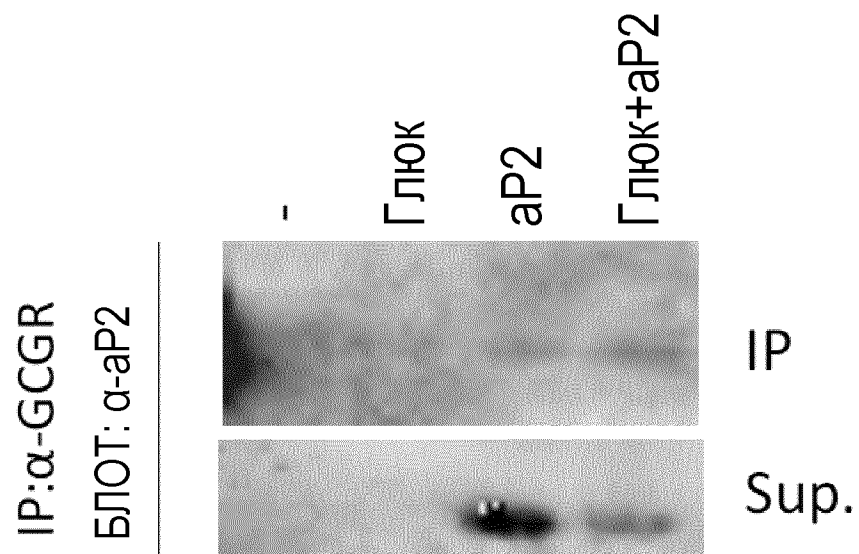


ФИГ.4F

FIG. 4E

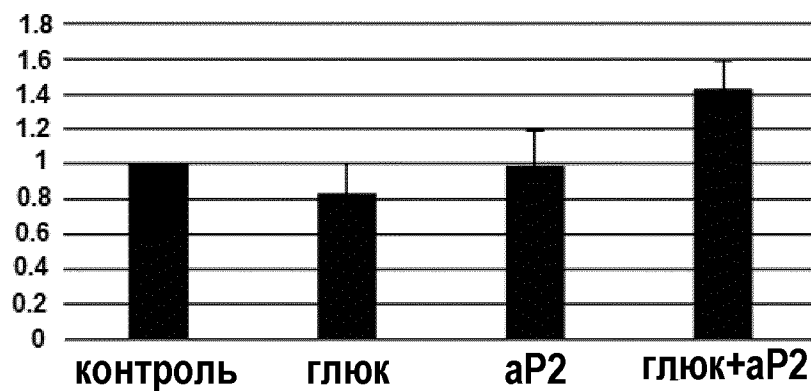


ФИГ.4G

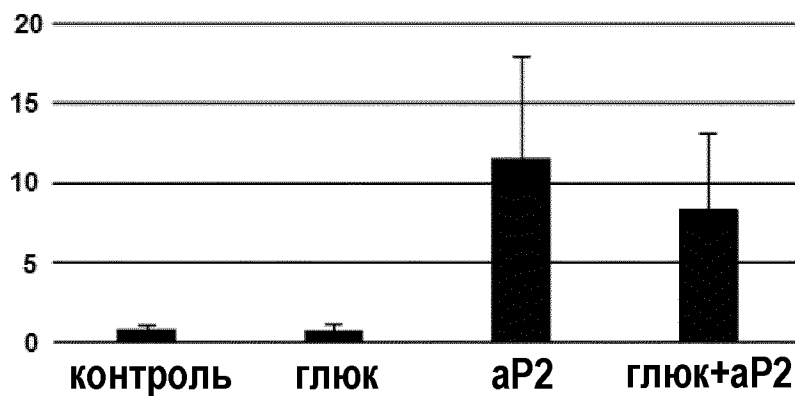


ФИГ.4H

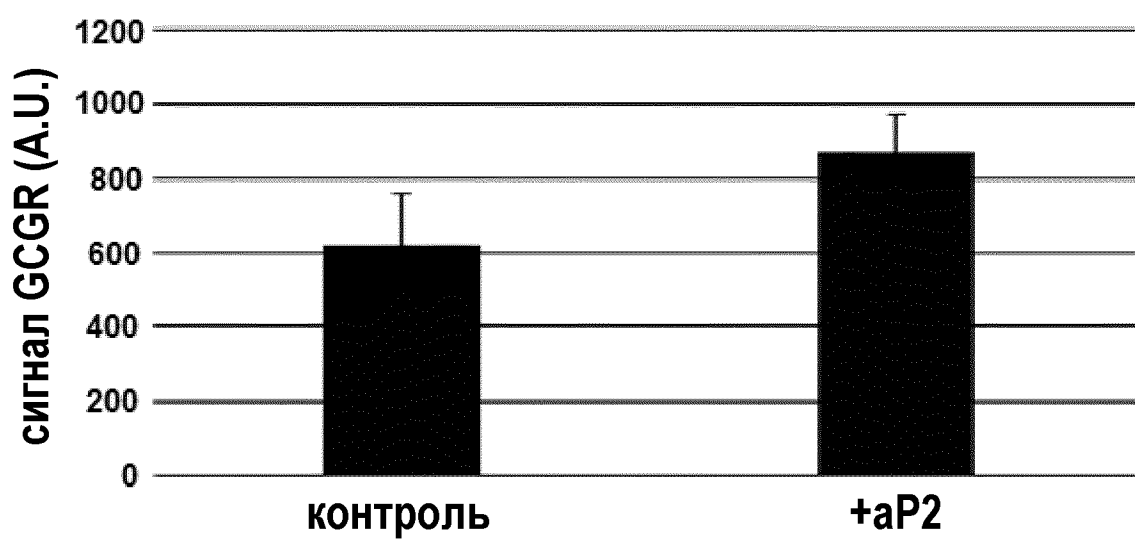
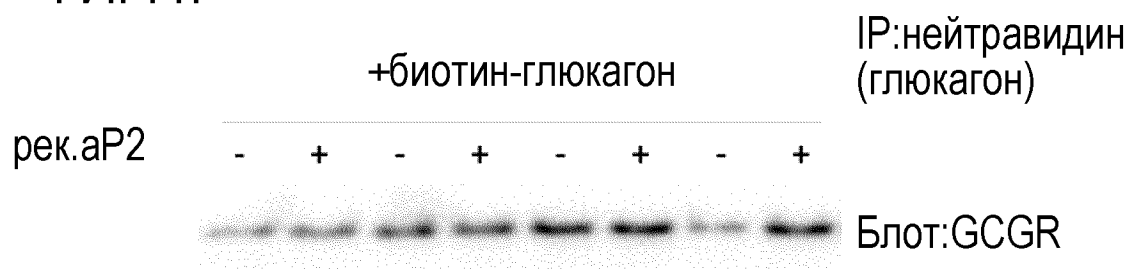
Сигнал aP2 в осадке (S/N)



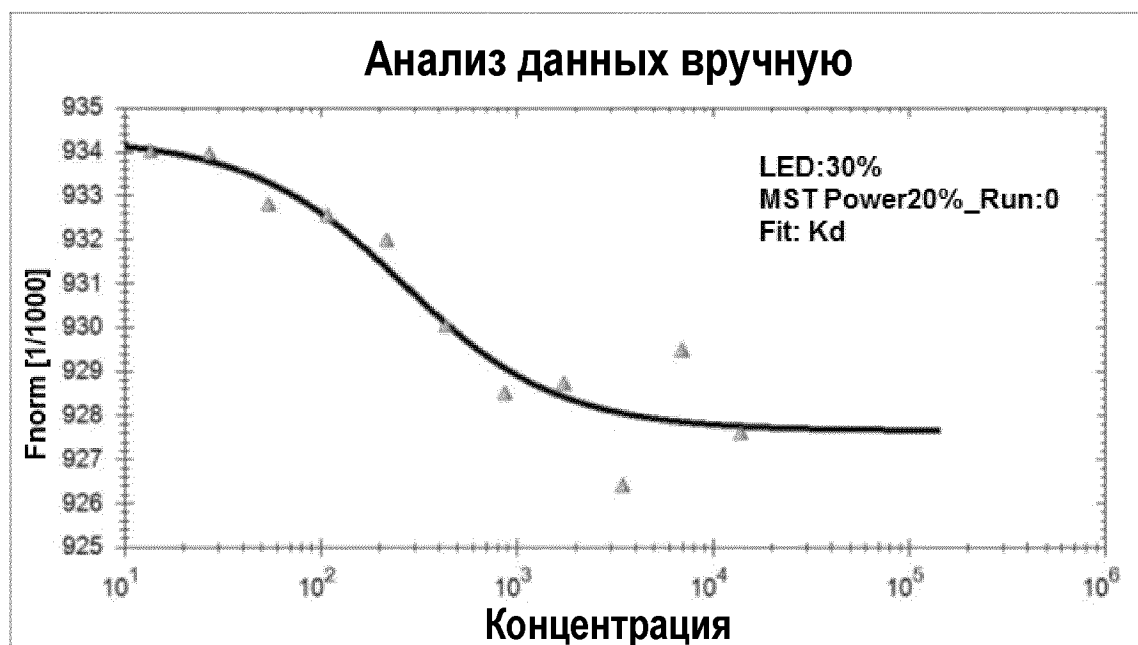
Сигнал aP2 в супернатанте



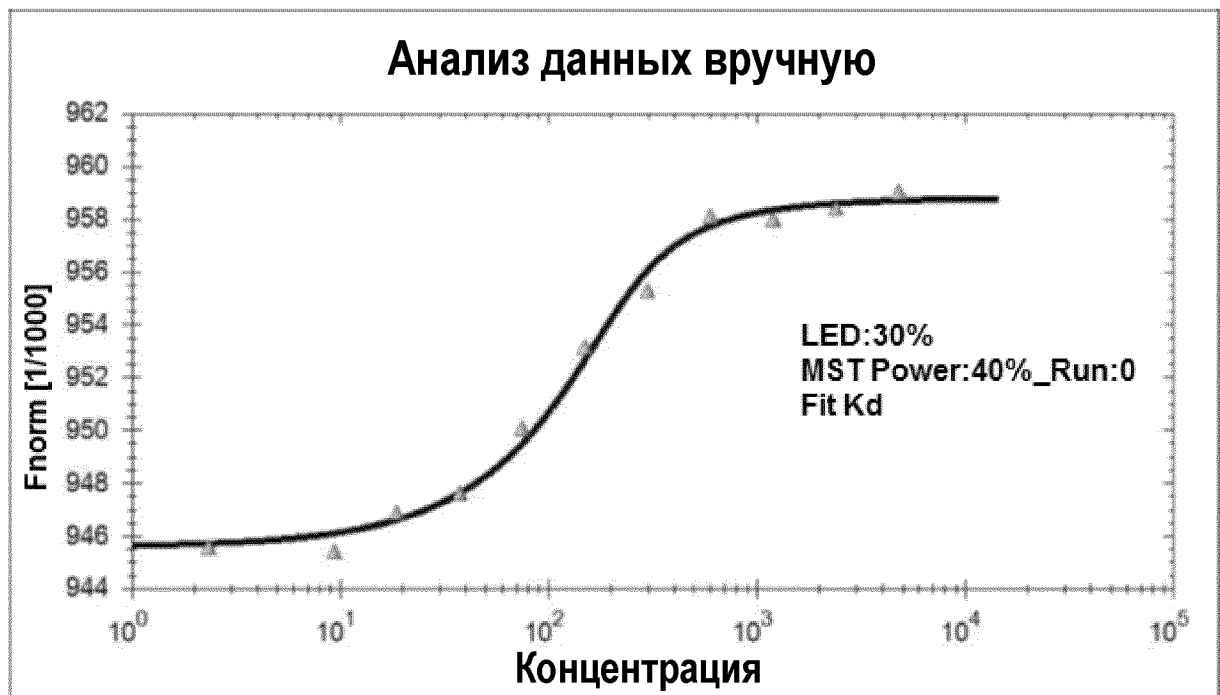
ФИГ.4I



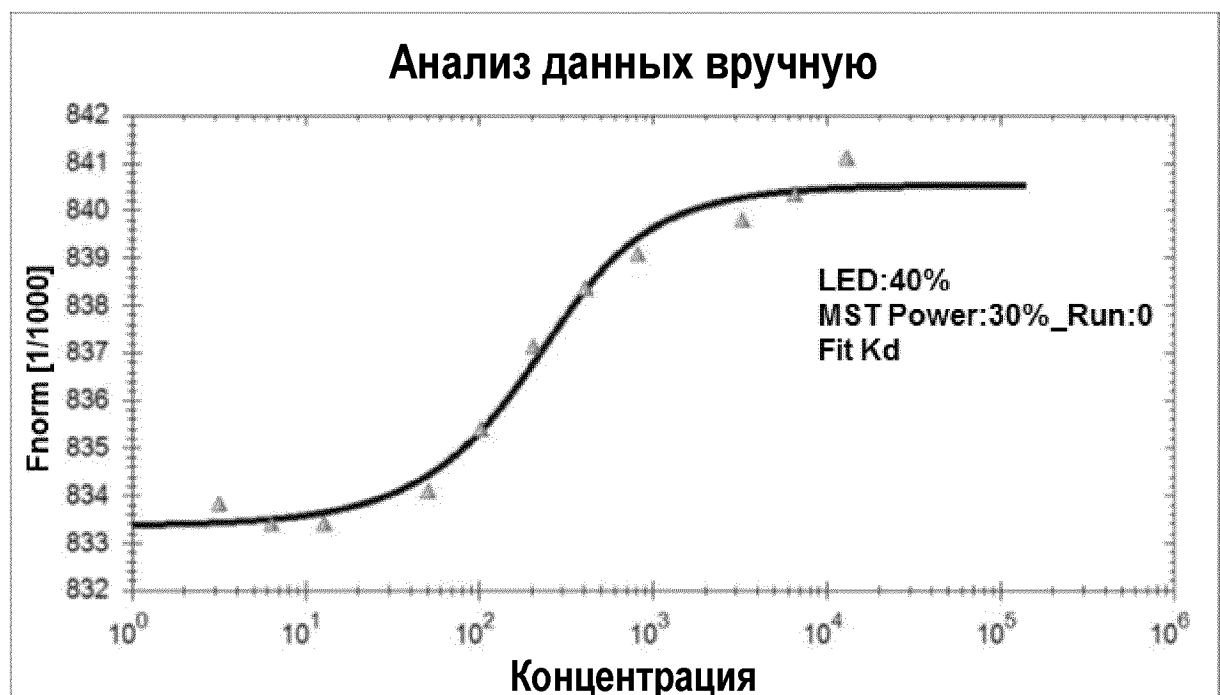
ФИГ.5A



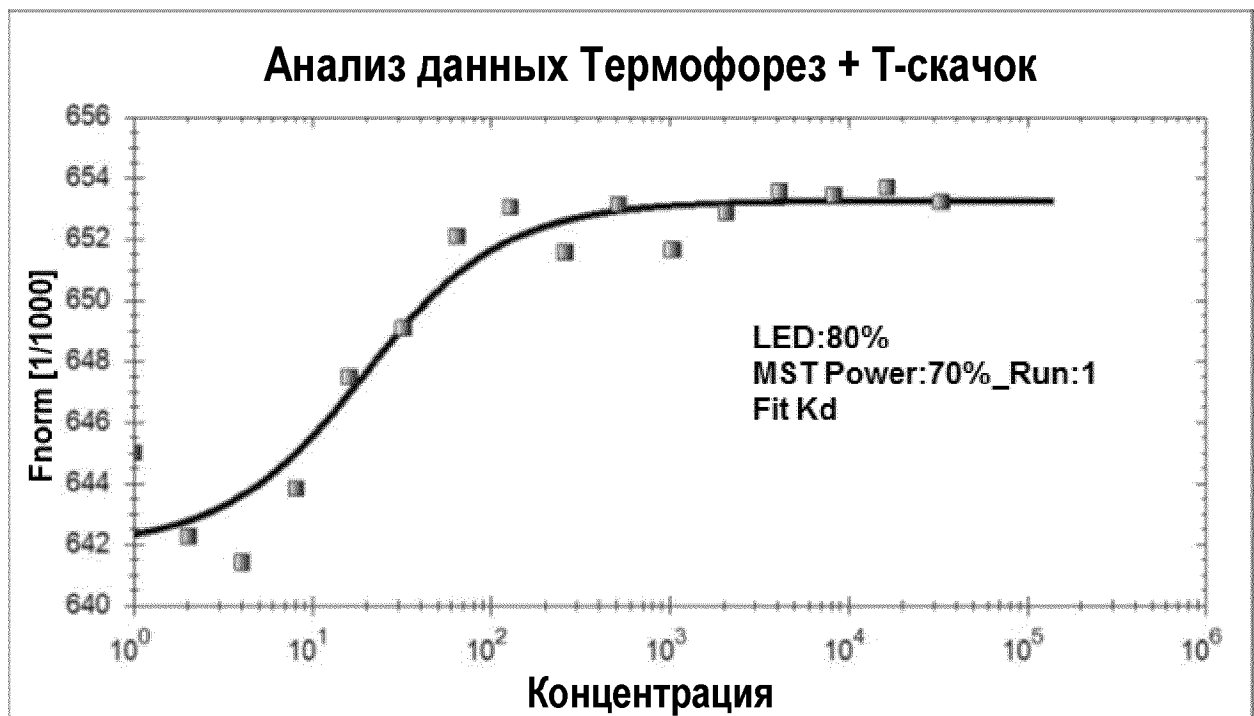
ФИГ.5В



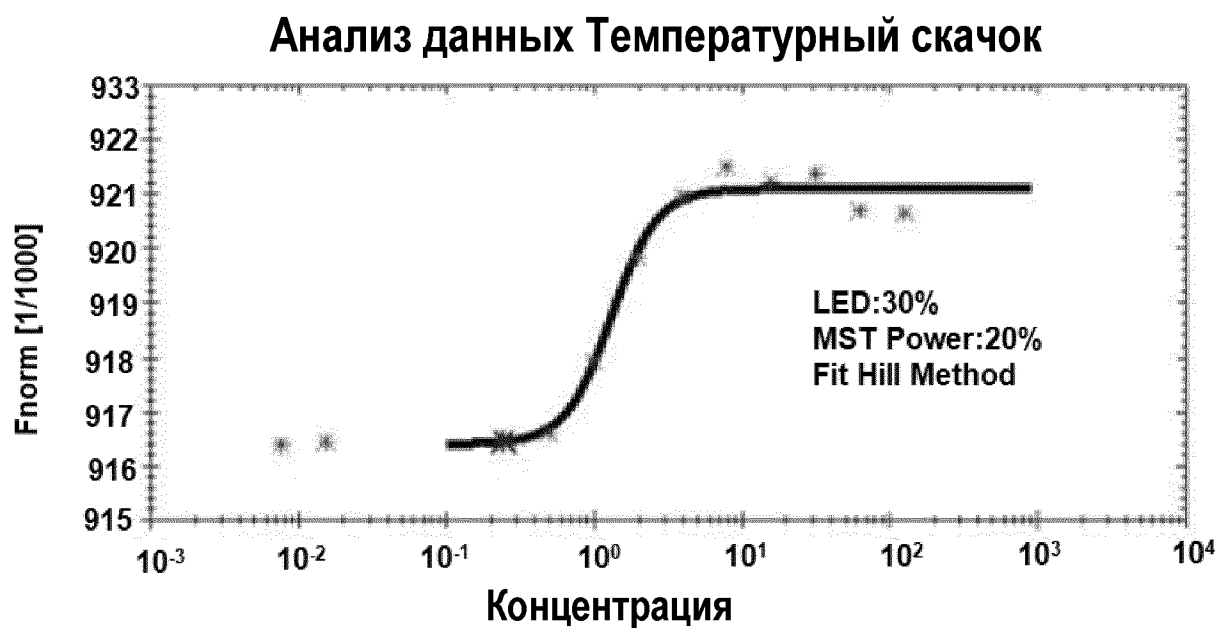
ФИГ.5С



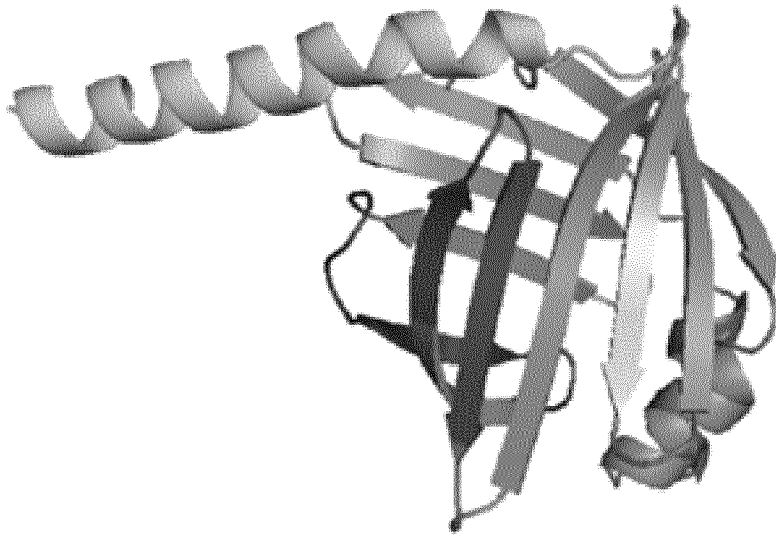
ФИГ.5D



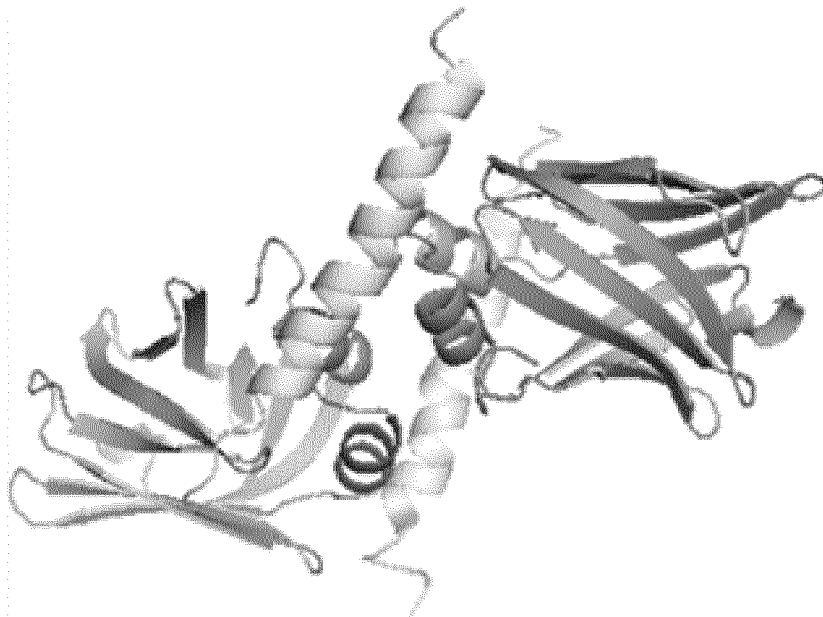
ФИГ.5E



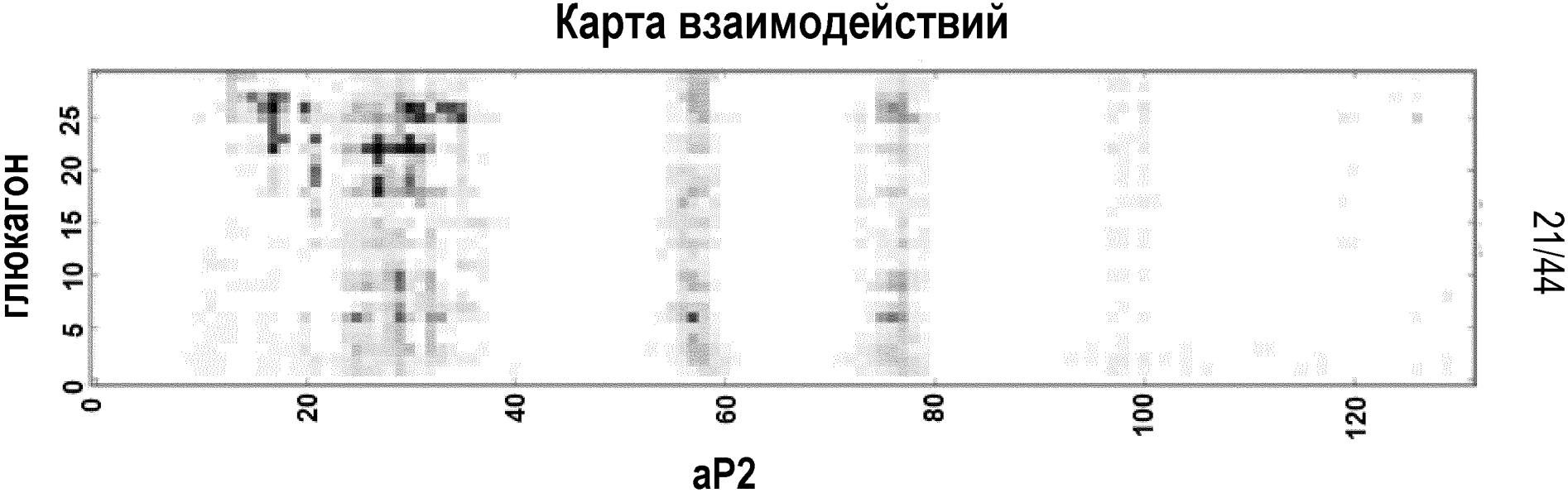
ФИГ.6А



ФИГ.6В

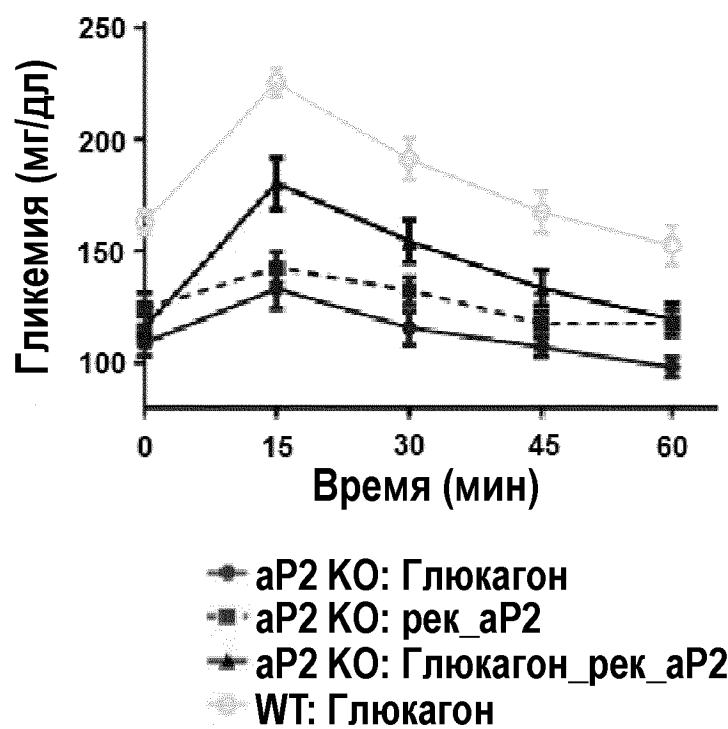


ФИГ.6С



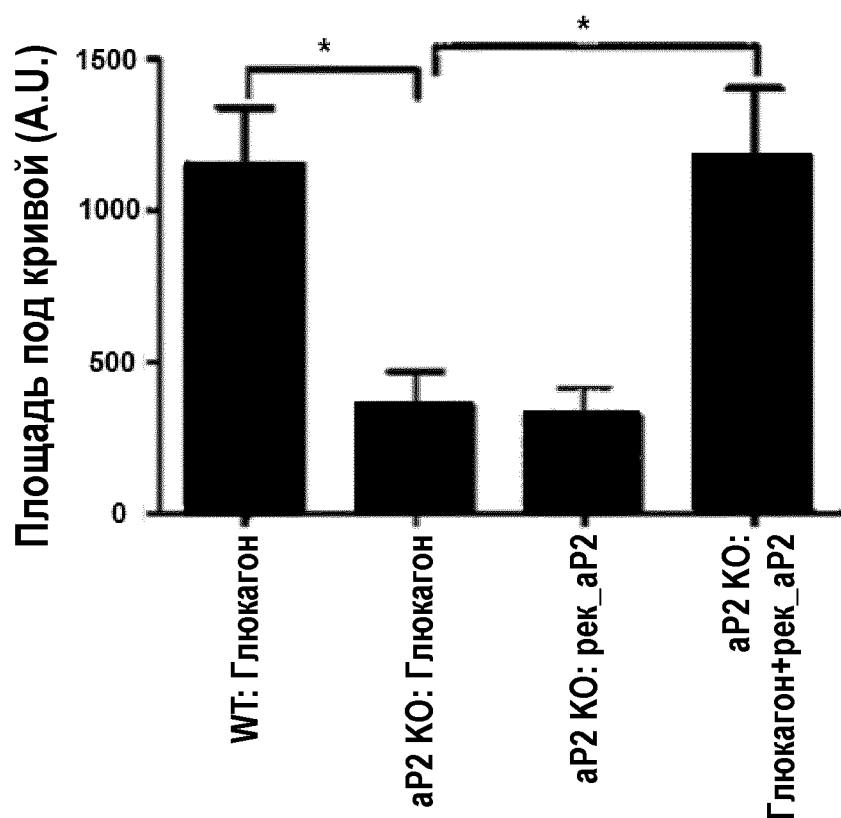
ФИГ.7А

Тест на толерантность к глюкагону

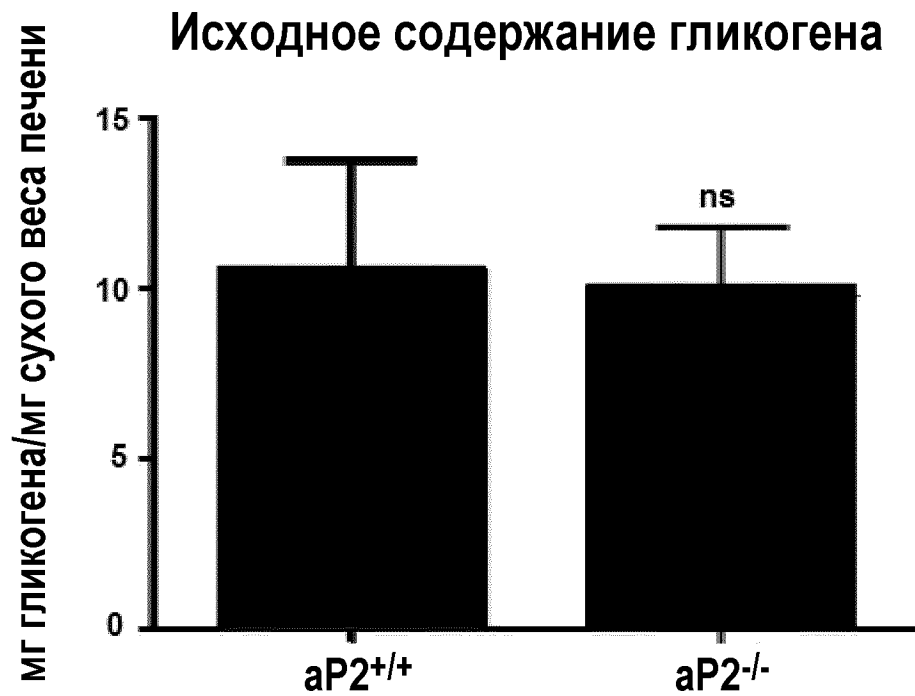


ФИГ.7В

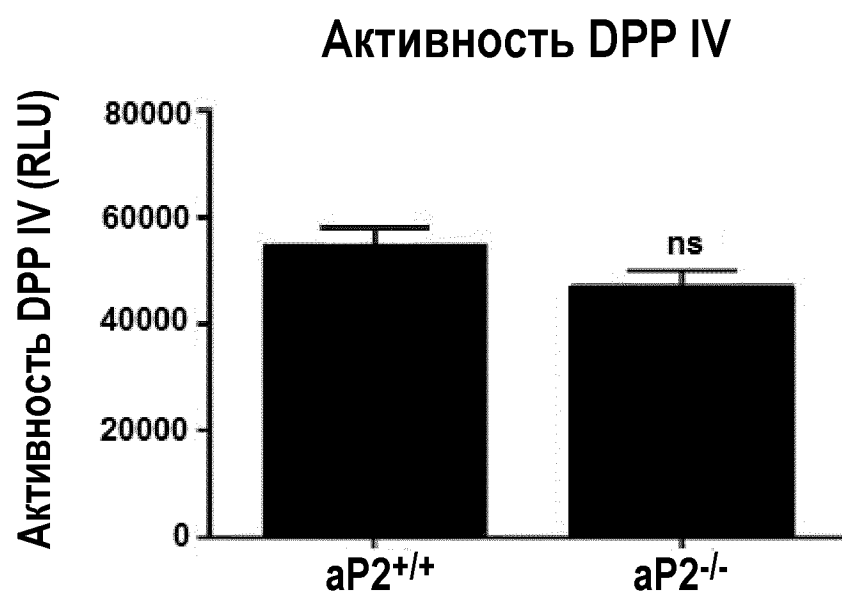
Глюкагон-ТТ - общая АUC пиков



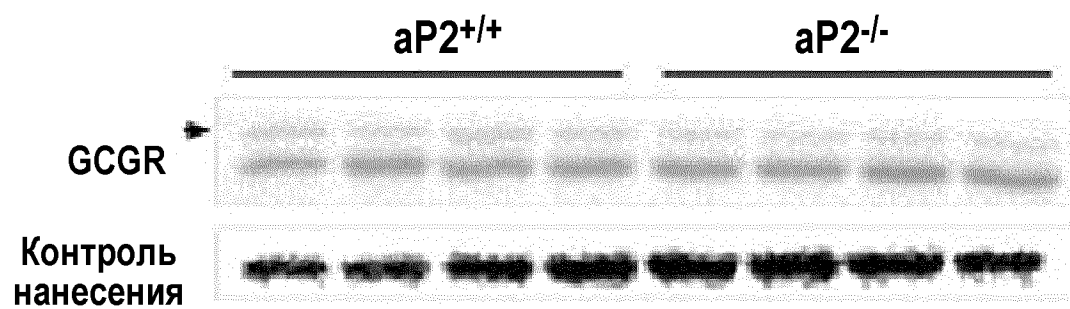
ФИГ.7С



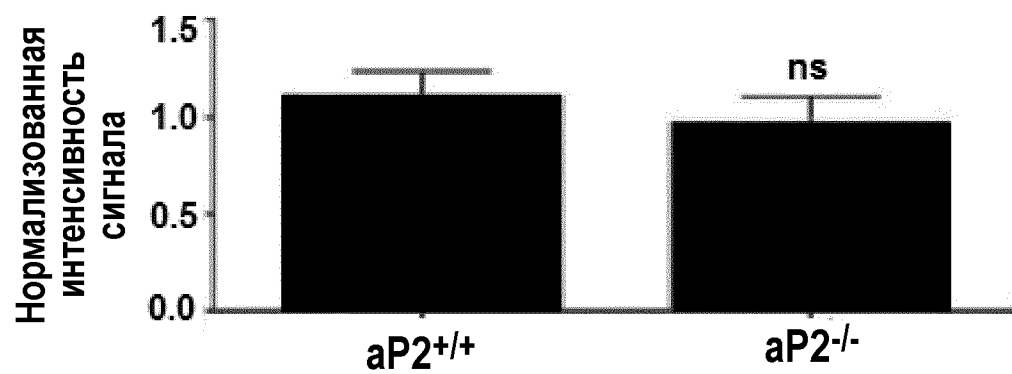
ФИГ.7D



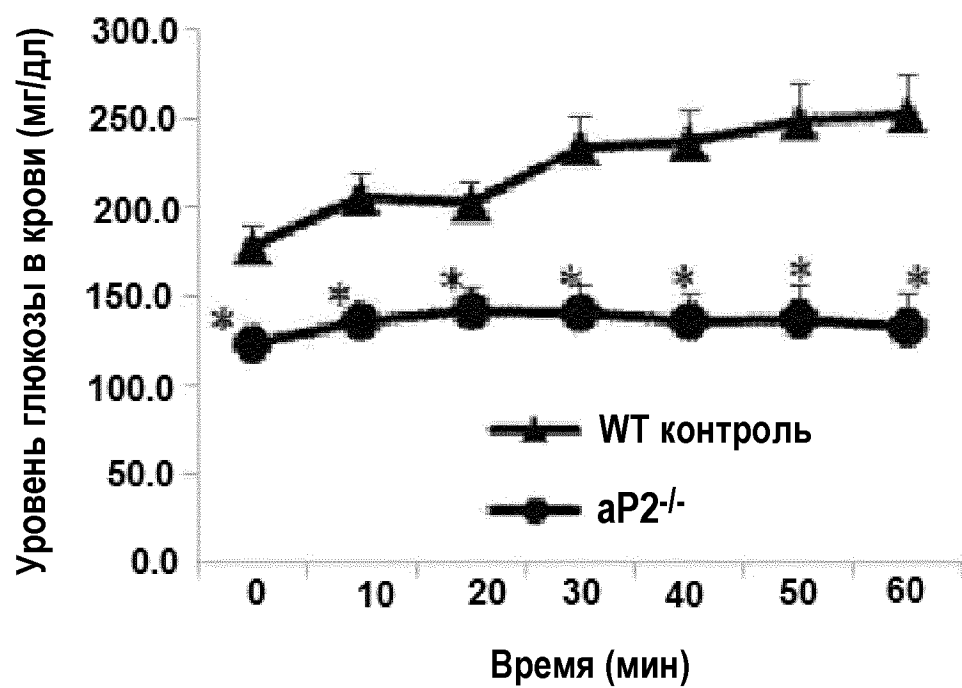
ФИГ.7Е



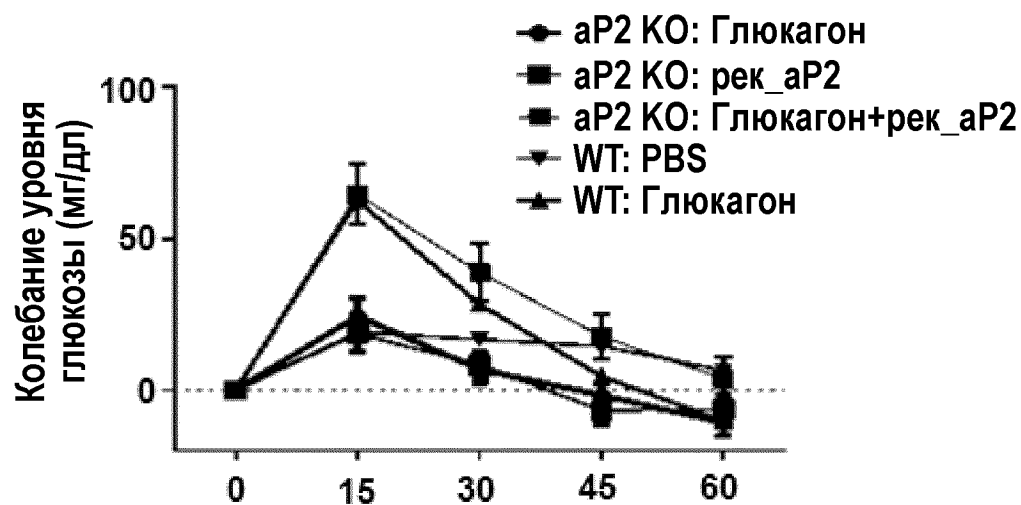
Вестерн-блот GCGR



ФИГ.7F

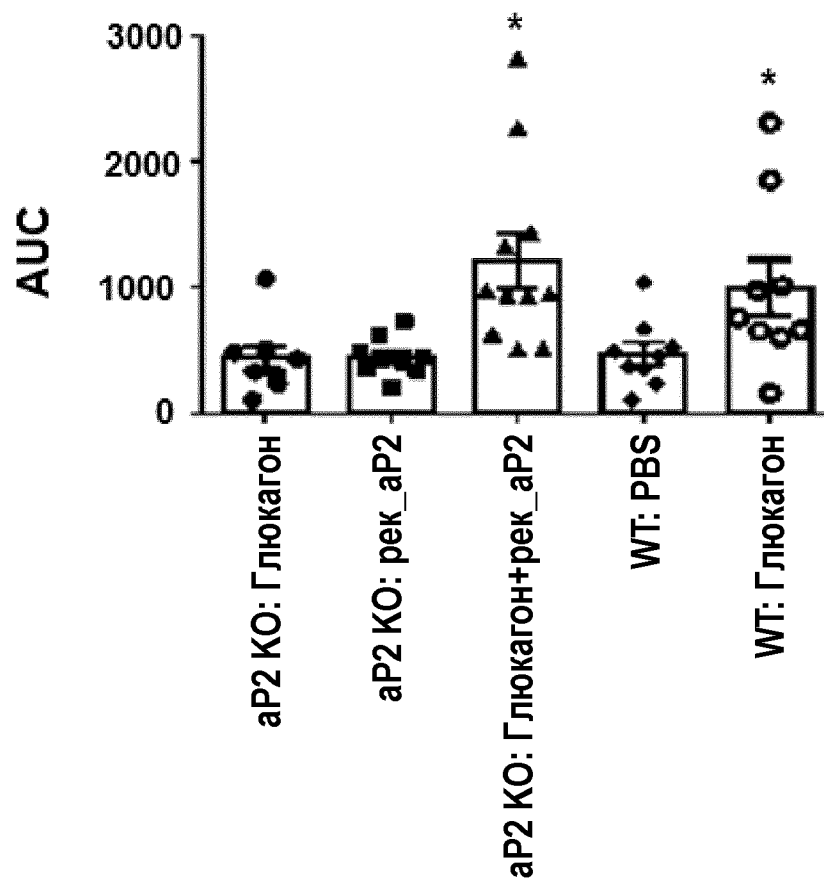


ФИГ.7G



ФИГ.7H

Общая площадь



ФИГ.7I

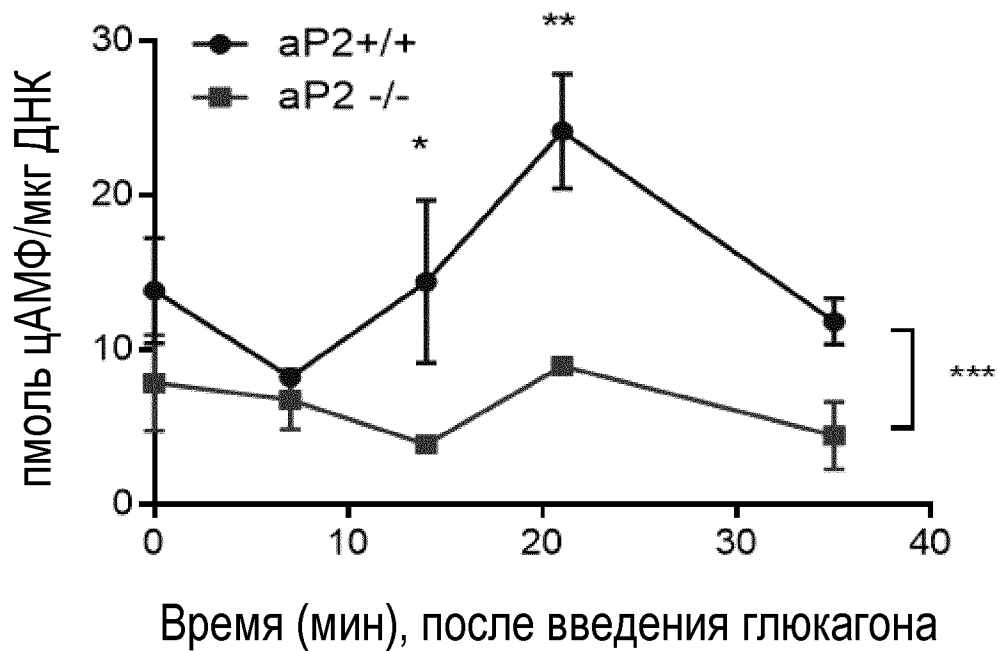


ФИГ.7J



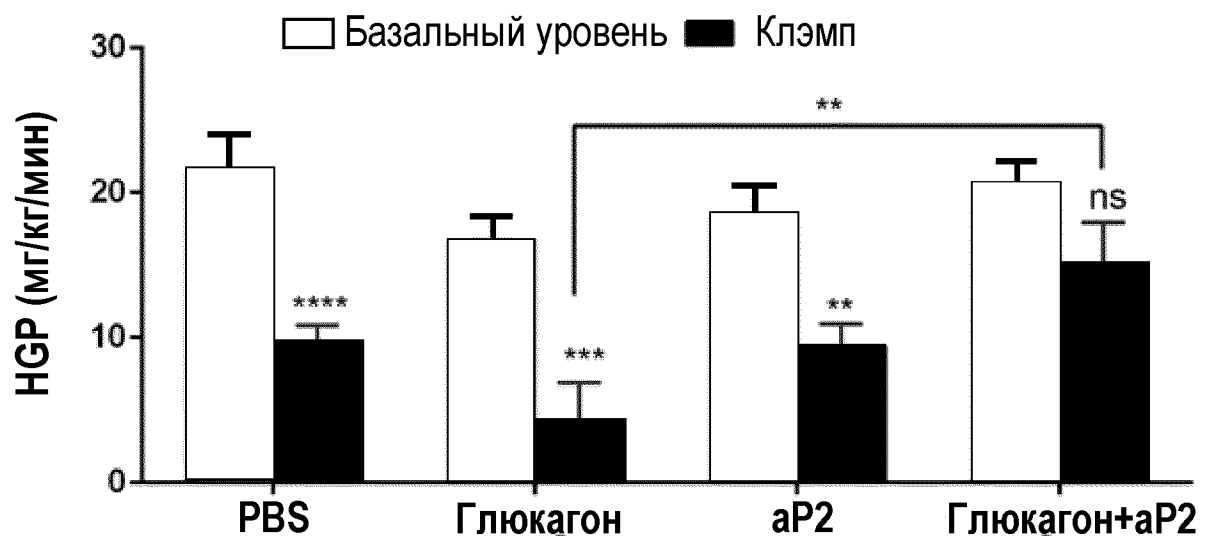
ФИГ.7К

Измерение цАМФ в печени

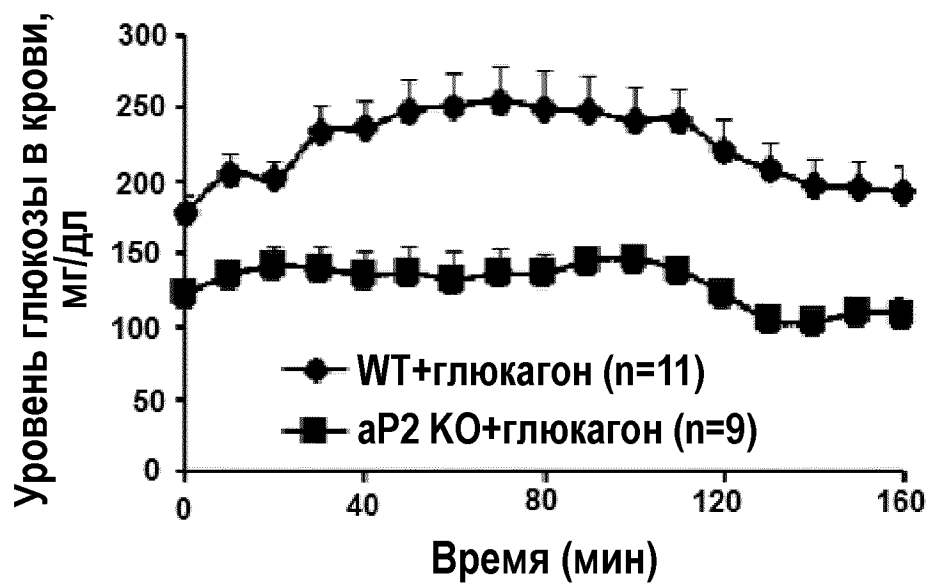


ФИГ.8А

Гиперинсулинемический-эугликемический клэмп



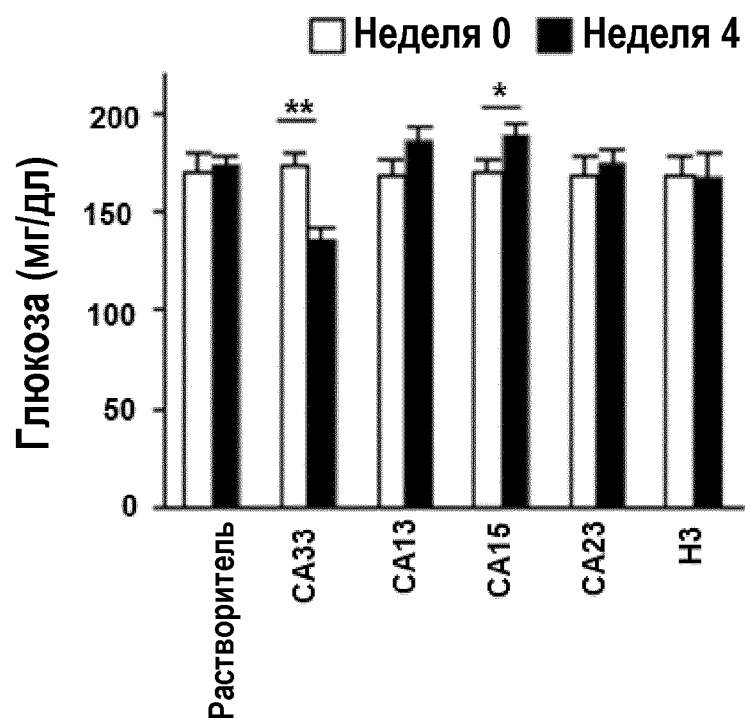
ФИГ.8В



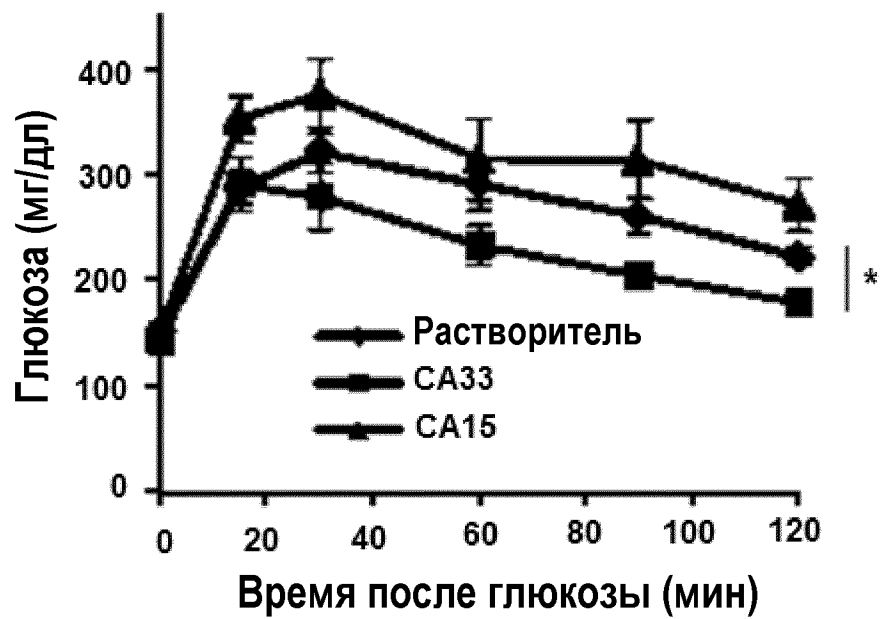
ФИГ.9А

	Человеческий aP2	Мышиный aP2
	KD (M)	KD (M)
CA33	2.831E-06	4.131E-06
CA13	1.37E-09	1.12E-09
CA15	2.43E-09	1.84E-09
CA23	7.48E-10	7.51E-10
H3	1.10E-09	1.78E-09

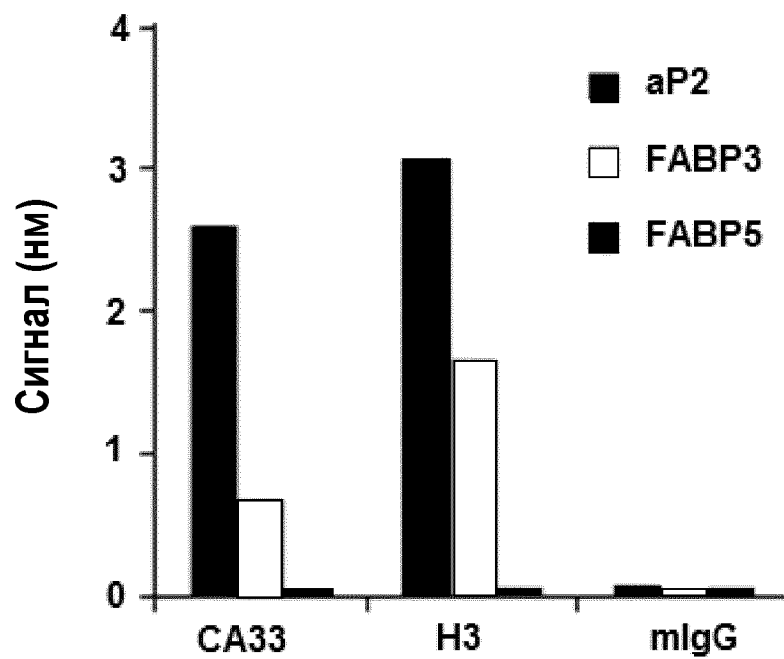
ФИГ.9В



ФИГ.9С



ФИГ.10А



ФИГ.10В

	H3
CA33	+
CA13	++
CA15	++
CA23	-

ФИГ.10С

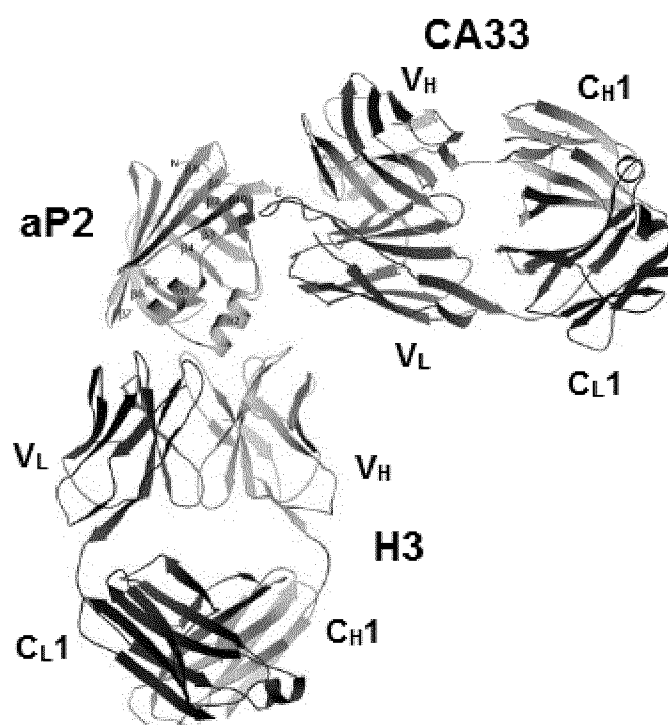
1MCDAFVGWKLVSSENF
DDYMKEVGVGFATRKV....
118CVMKGVTSRVERA130

Эпитоп CA33
согласно HDX

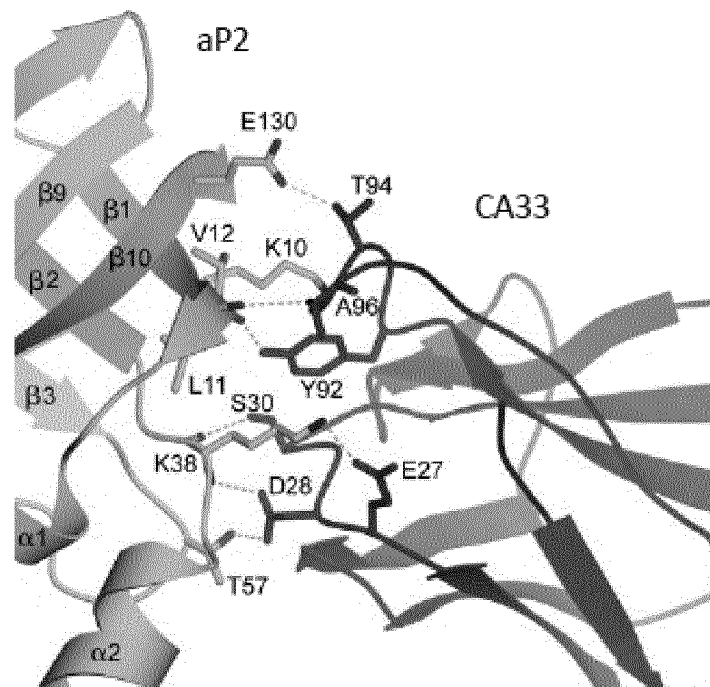
1MCDAFVGWKLVSSENF
DDYMKEVGVGFATRKVAG
MAKPNMIISVNG...

Эпитоп H3
согласно HDX

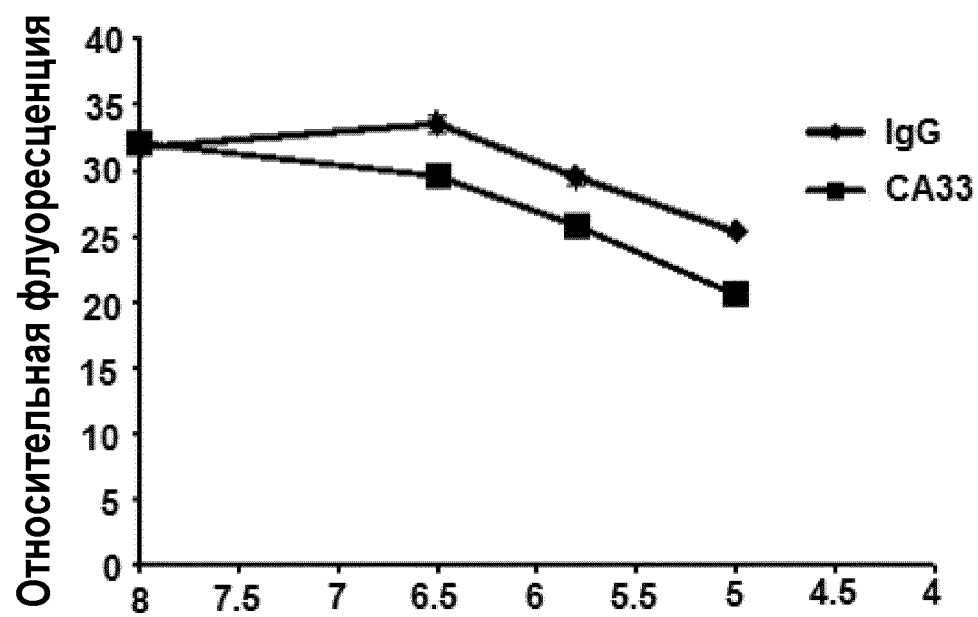
ФИГ.10D



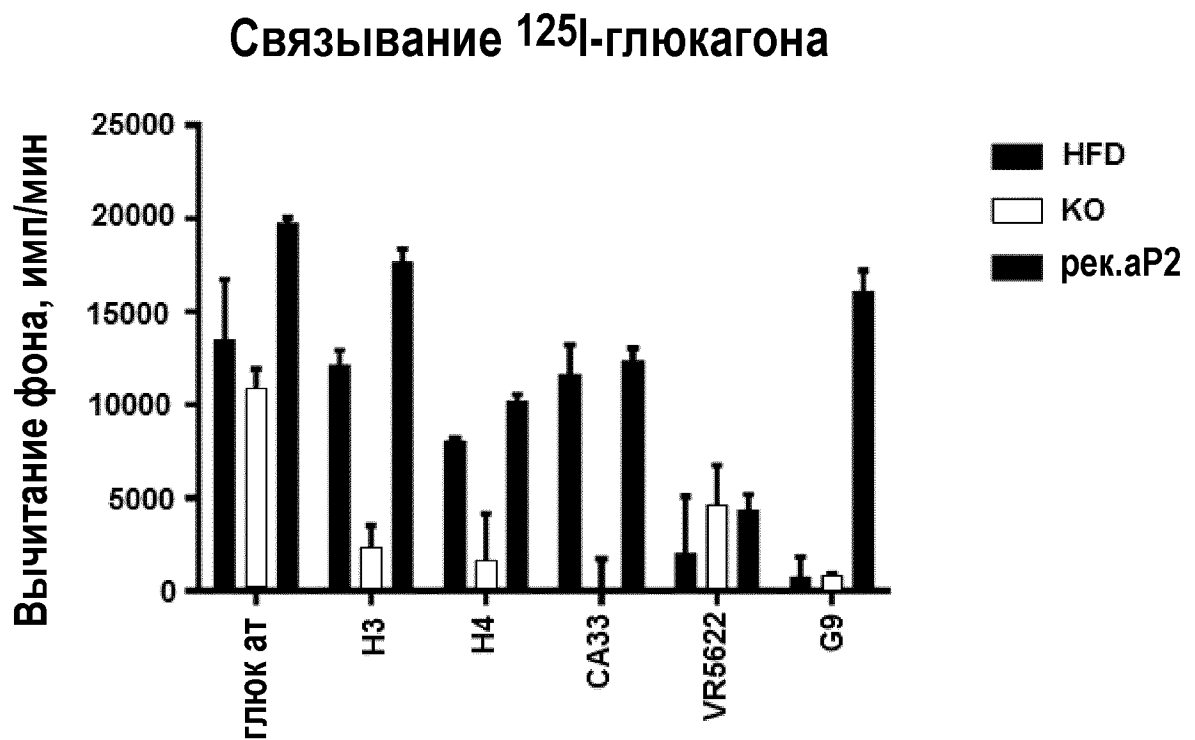
ФИГ.10Е



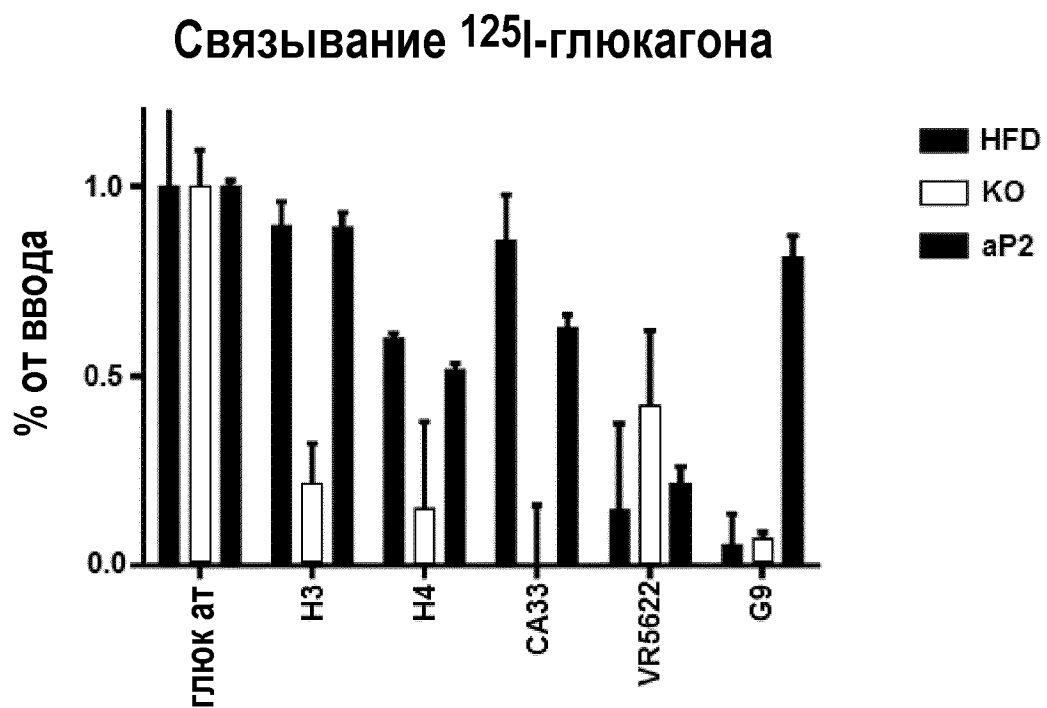
ФИГ.10F



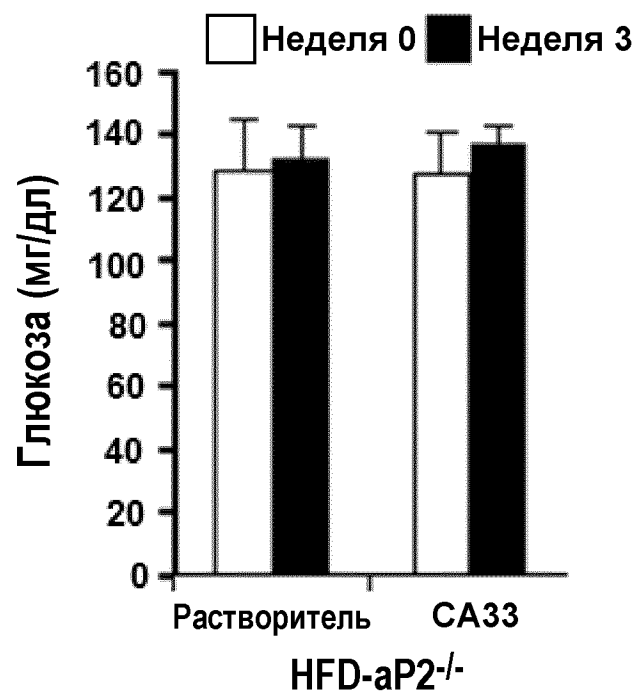
ФИГ.10G



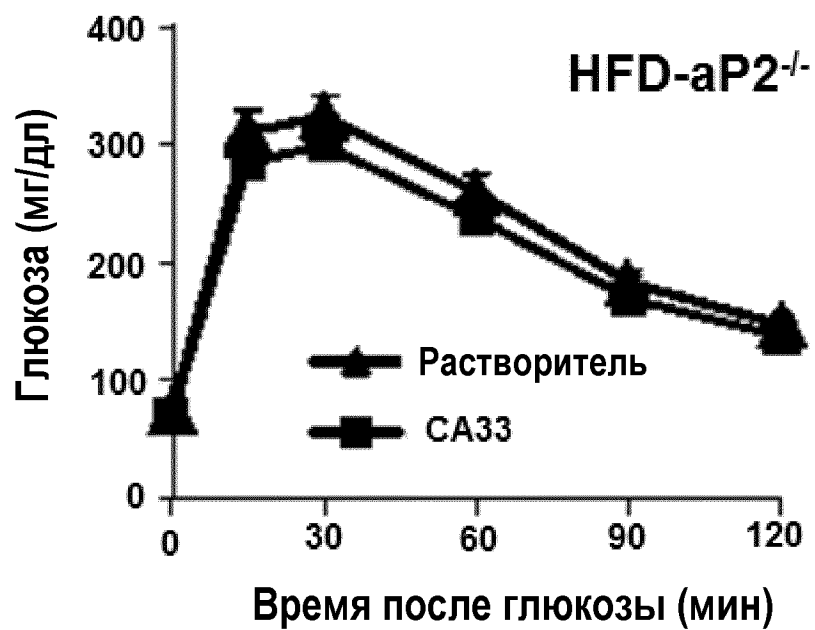
ФИГ.10H



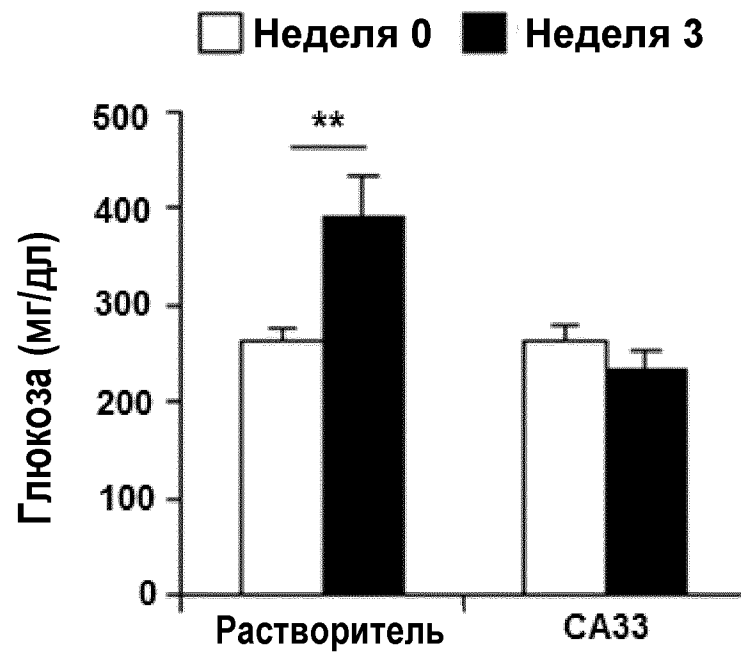
ФИГ.11А



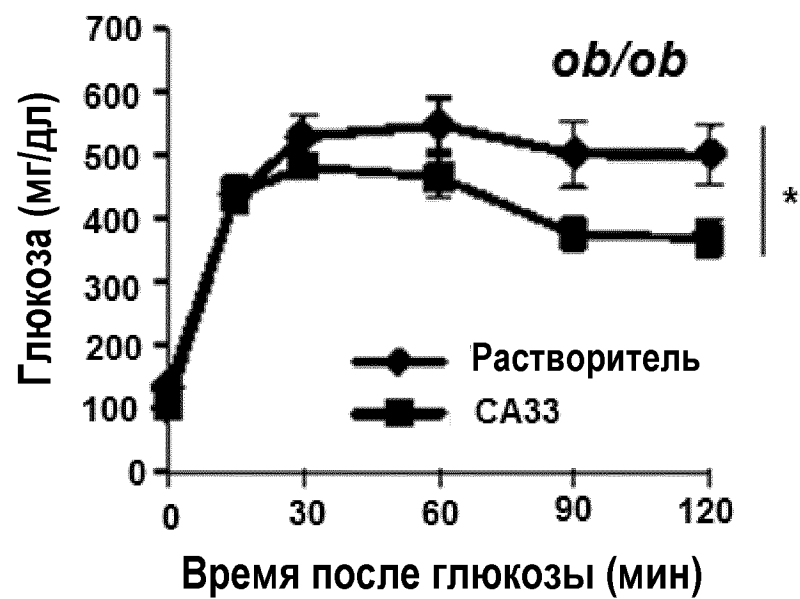
ФИГ.11В



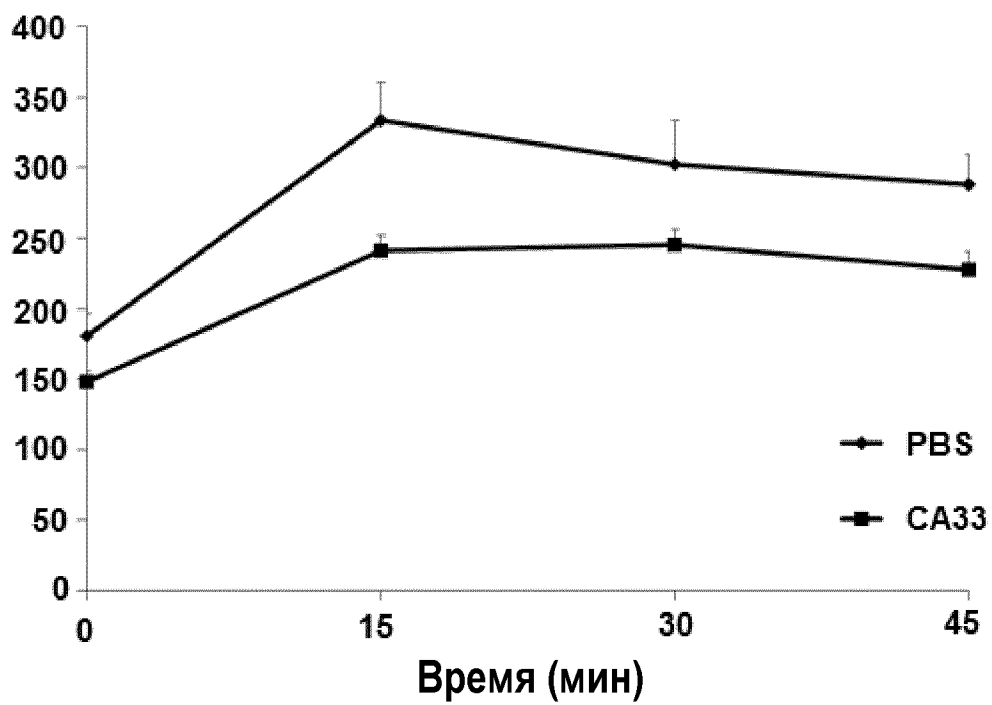
ФИГ.11С



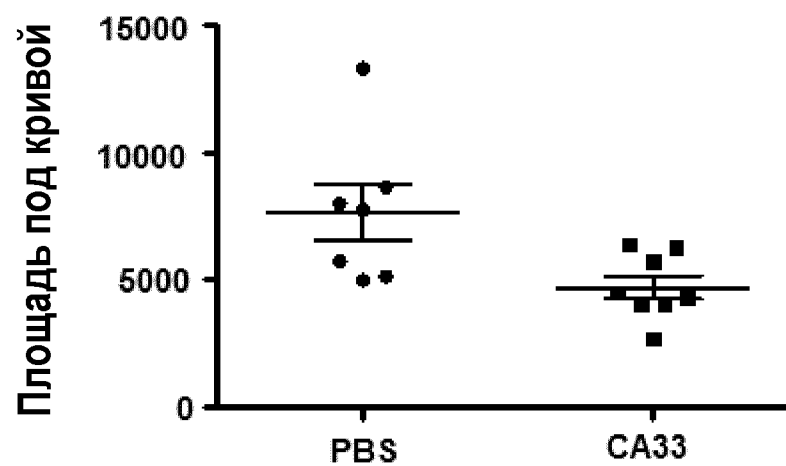
ФИГ.11D



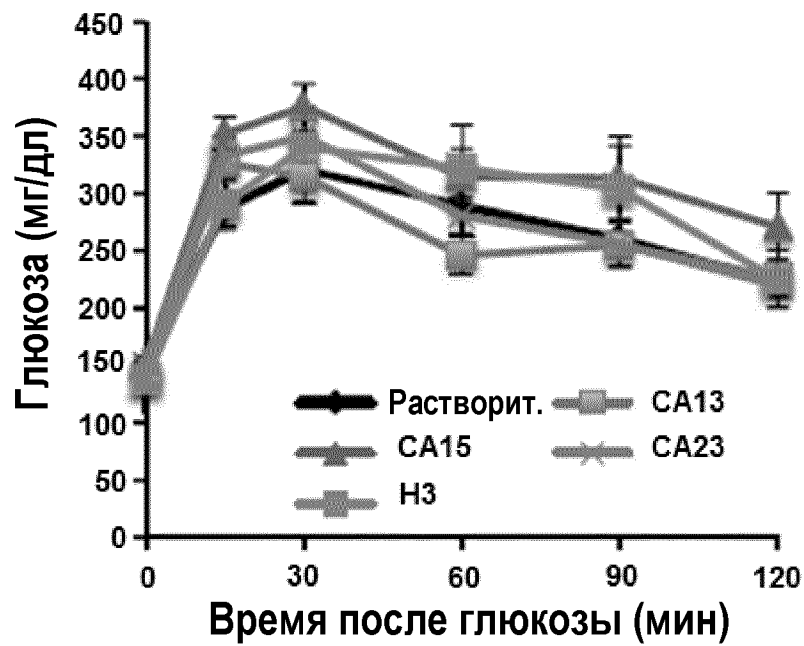
ФИГ.11Е



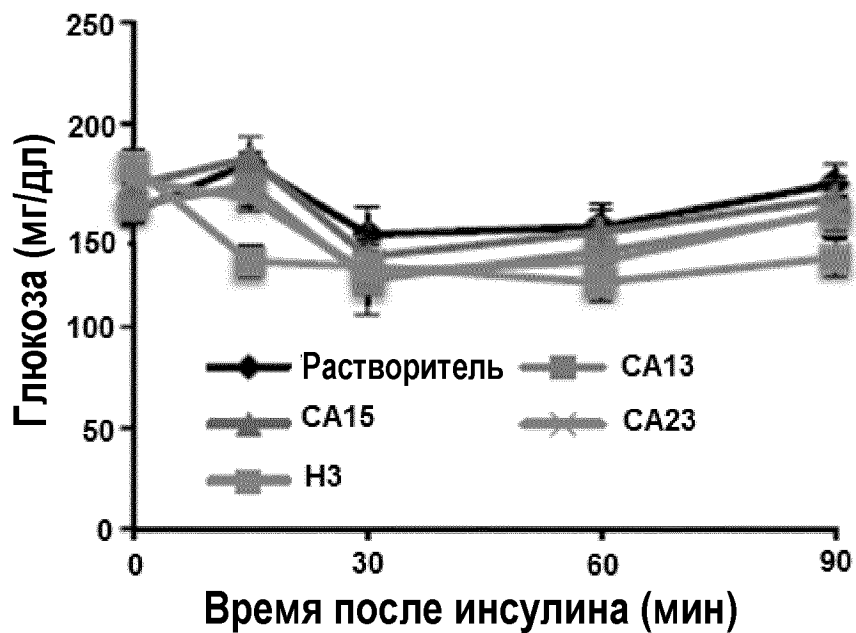
ФИГ.11F



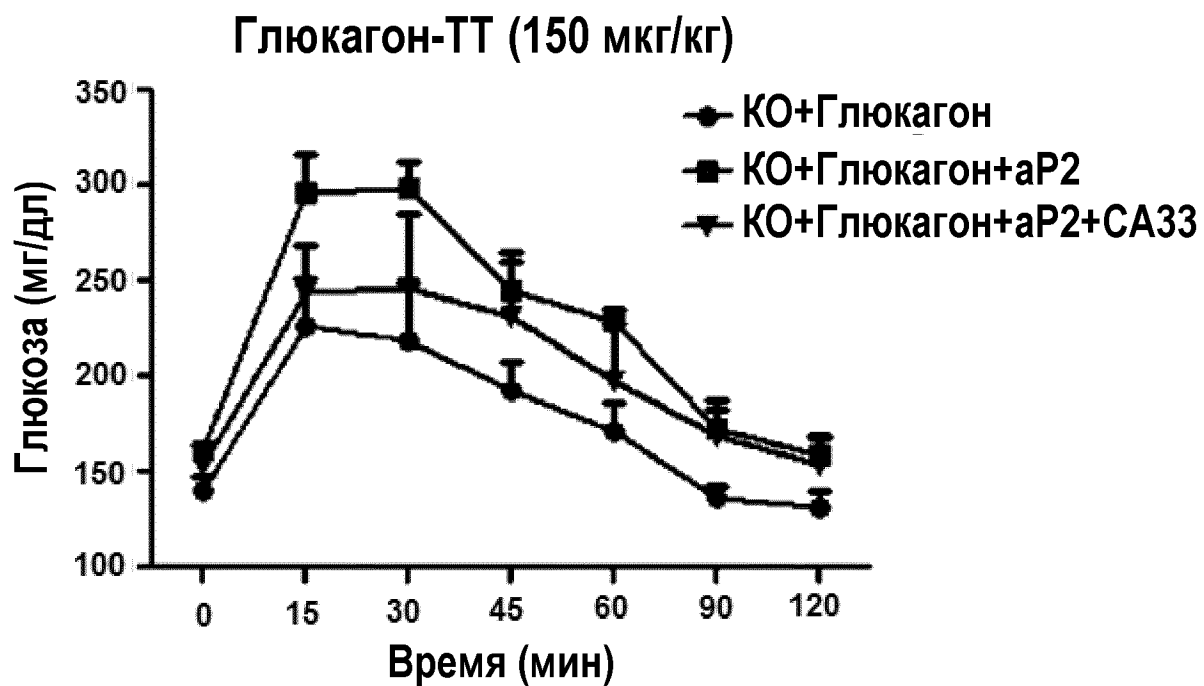
ФИГ.12А



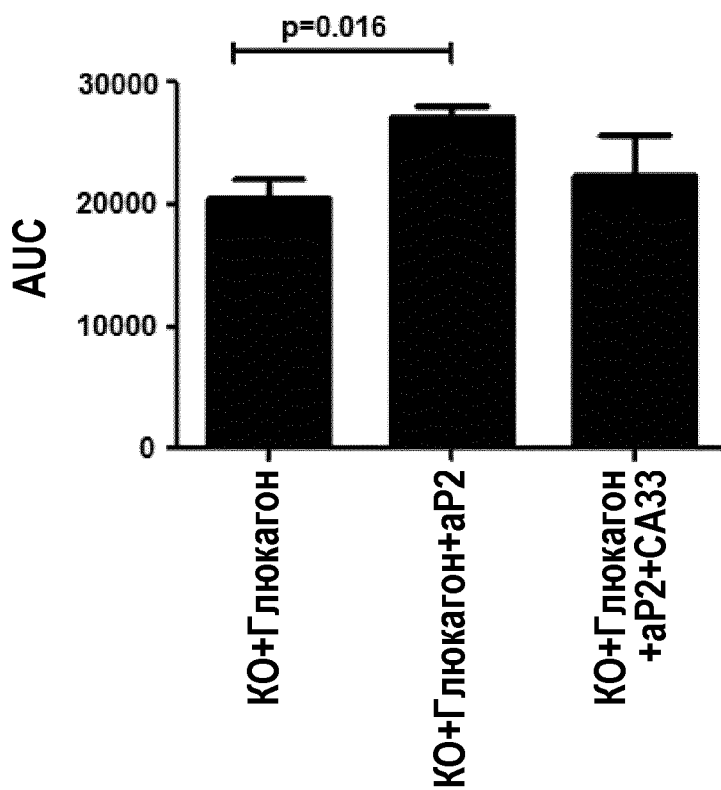
ФИГ.12В



ФИГ.12С



ФИГ.12D



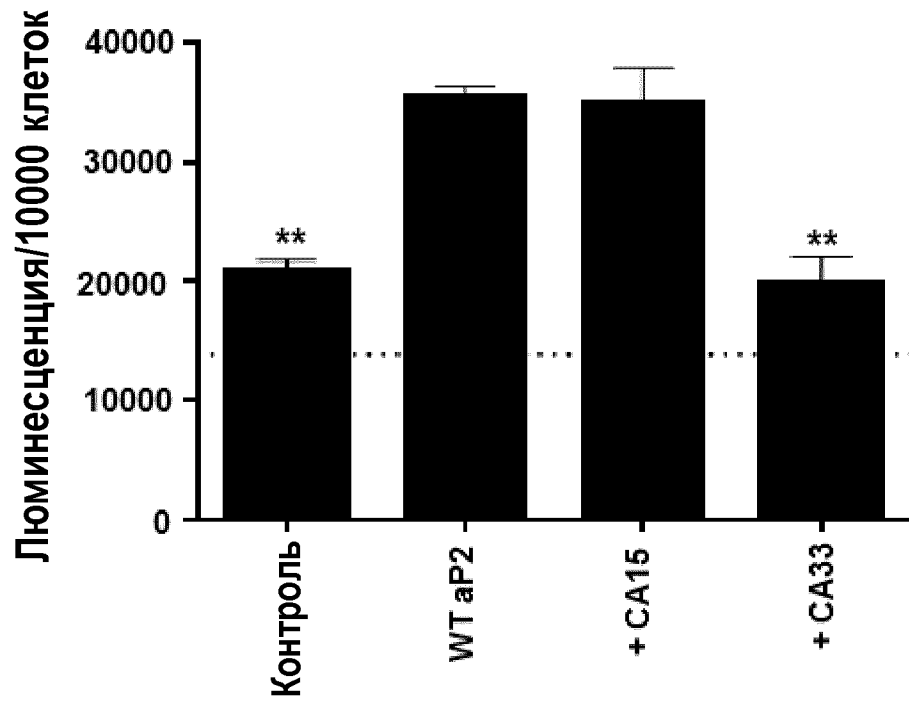
ФИГ.13

Леткая 909	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105																																																																																												
	D	V	V	M	T	Q	T	P	A	S	V	E	P	V	G	G	T	V	T	I	K	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	D	L	E	C	D	D	A	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>O</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	E	V	V	V	E		(Seq. ID 28)				
IGKV1-17	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	G	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>L</u>	<u>Q</u>	H	----	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K		(Seq. ID 80)				
909 gL1	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>O</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		(Seq. ID 29)	
909 gL10	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		(Seq. ID 31)	
909 gL13	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		(Seq. ID 37)	
909 gL50	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		(Seq. ID 38)
909 gL54	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>O</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		(Seq. ID 33)	
909 gL55	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	R	L	I	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	A	S	G	V	P	S	R	F	K	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>H</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K		(Seq. ID 35)	

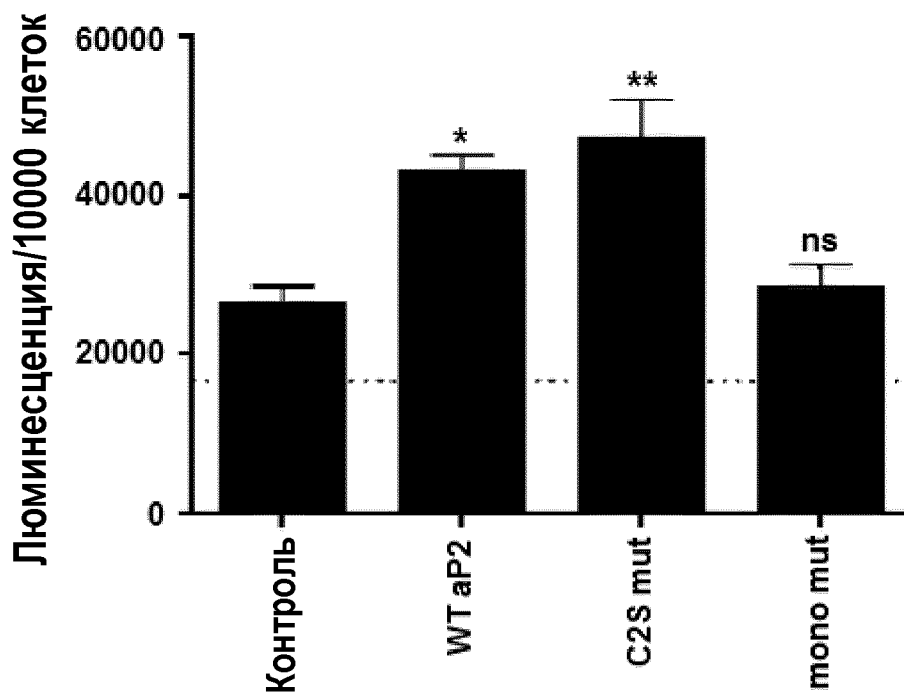
ФИГ.14А

	1	5	10	15	20	25	30	a	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	abc	85	90	95	100		105	110																																																																																																
Тяжелая 909	-	Q	S	V	E	S	G	G	R	L	V	T	P	G	T	P	L	T	L	T	C	T	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	-	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	G	R	E	T	I	S	K	A	S	T	--	T	V	D	L	K	I	T	S	P	T	T	E	D	A	T	Y	F	C	A	R	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 41)			
IGHV4-4	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	G	T	L	S	L	T	C	A	V	S	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>W</u>	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	S	R	V	T	I	S	V	D	K	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>Y</u>	-----	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 81)									
909gH1	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	G	T	L	S	L	T	C	T	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	-	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	G	R	E	T	I	S	K	A	S	T	-	T	V	D	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	Y	F	C	A	R	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 42)			
909gH15	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	G	T	L	S	L	T	C	T	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	-	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	G	R	E	T	I	S	K	A	S	T	-	T	V	D	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	Y	F	C	A	R	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 46)			
909gH14	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	G	T	L	S	L	T	C	A	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	-	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	G	R	E	T	I	S	K	A	S	T	-	T	V	D	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	Y	F	C	A	R	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 44)			
909gH61	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	G	T	L	S	L	T	C	A	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	-	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	G	R	E	T	I	S	K	D	S	S	K	N	Q	V	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 48)
909gH62	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	G	T	L	S	L	T	C	A	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	-	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	S	W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	G	R	E	T	I	S	K	D	S	S	K	N	Q	V	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S		(Seq. ID 50)

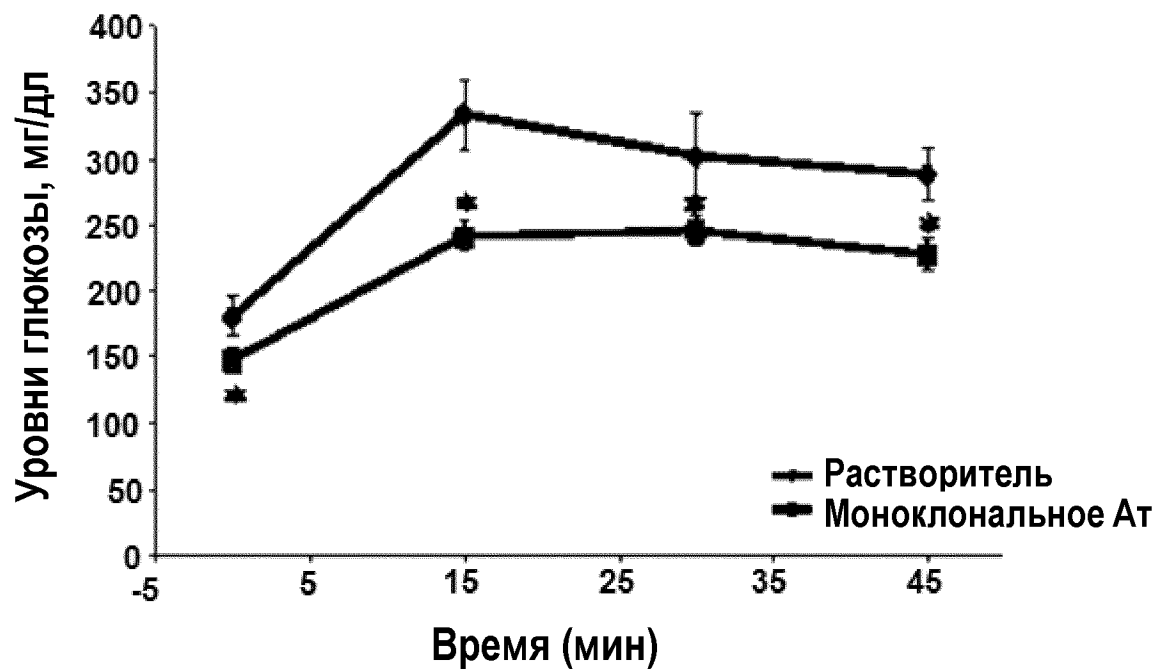
ФИГ.14В



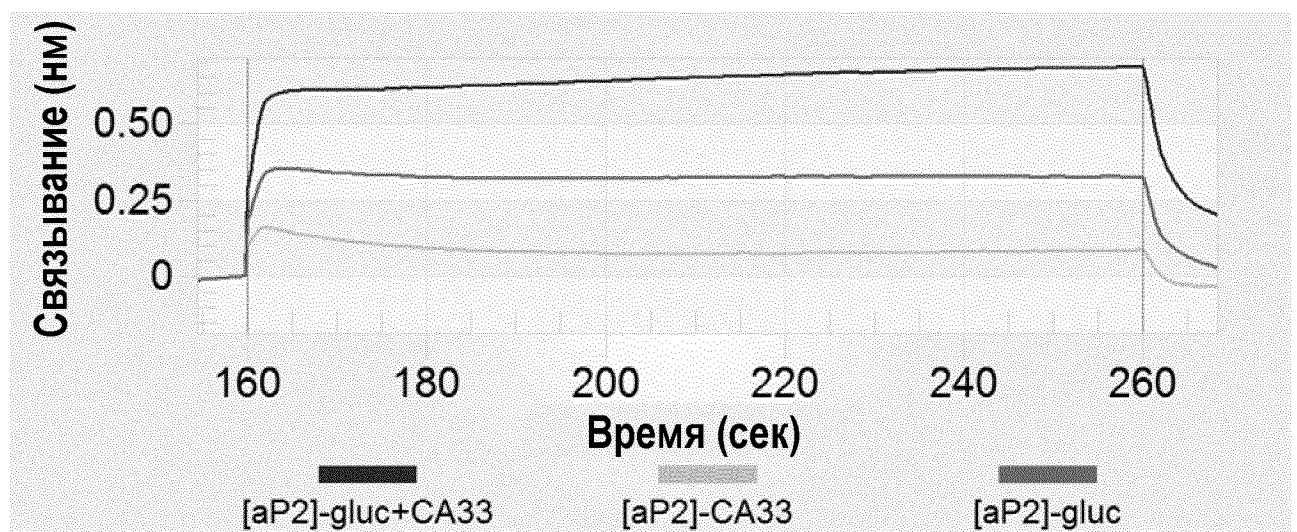
ФИГ.14С



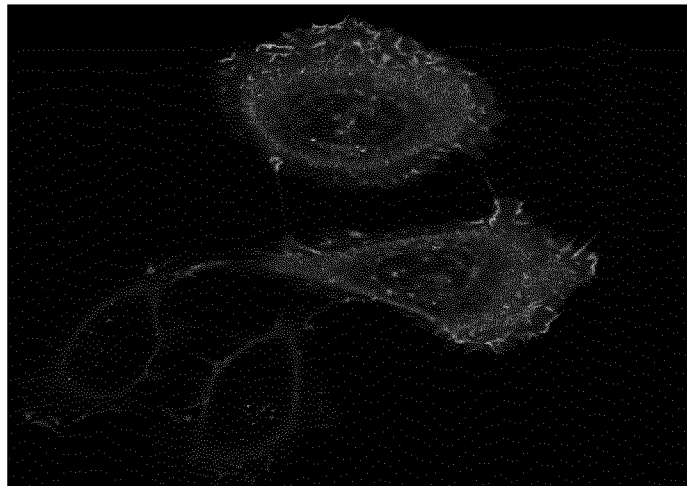
ФИГ.15



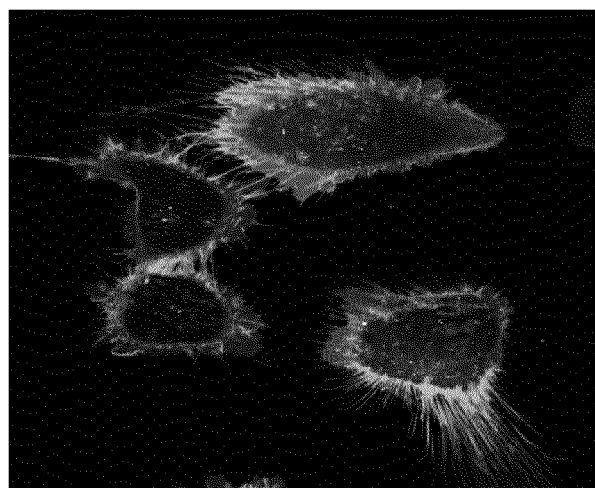
ФИГ.16



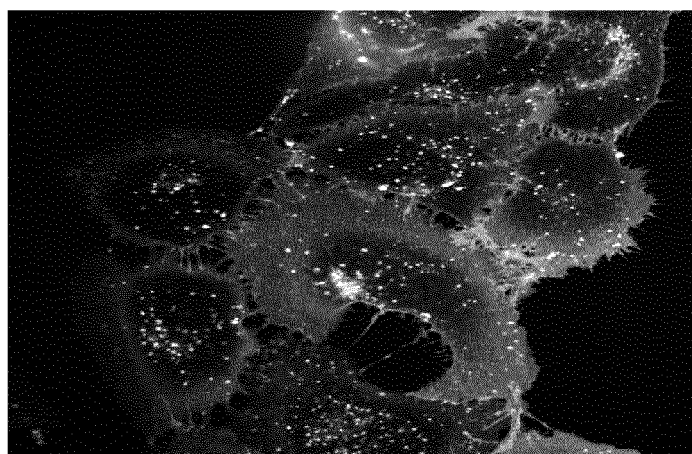
ФИГ.17А



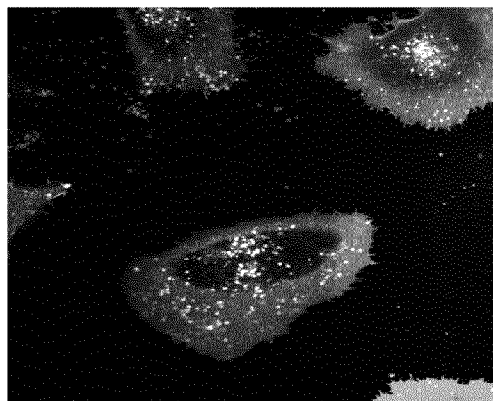
ФИГ.17В



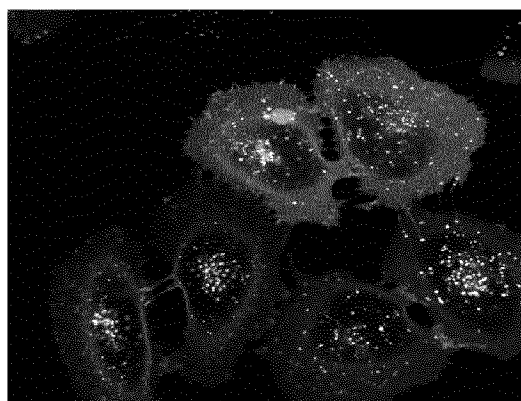
ФИГ.17С



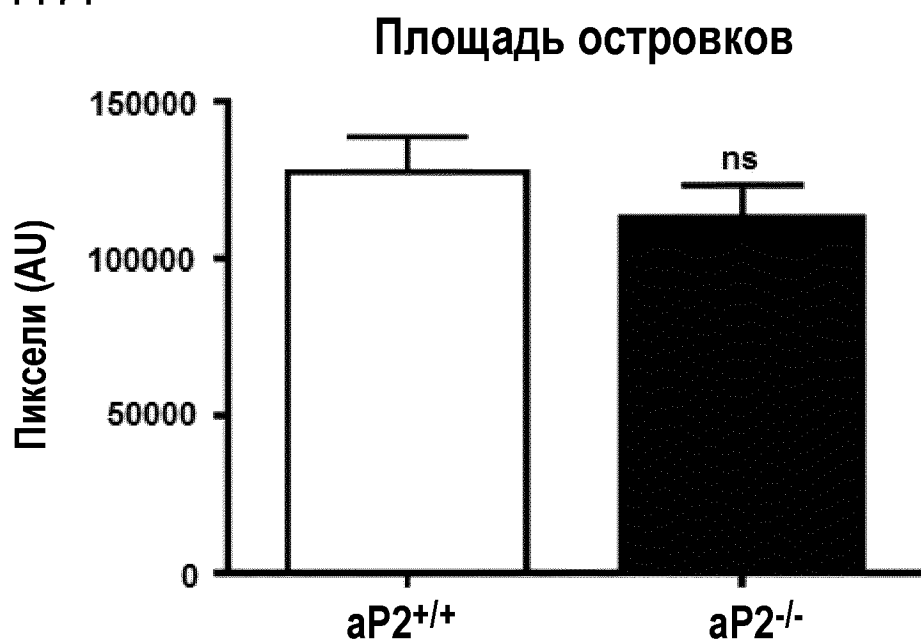
ФИГ.17D



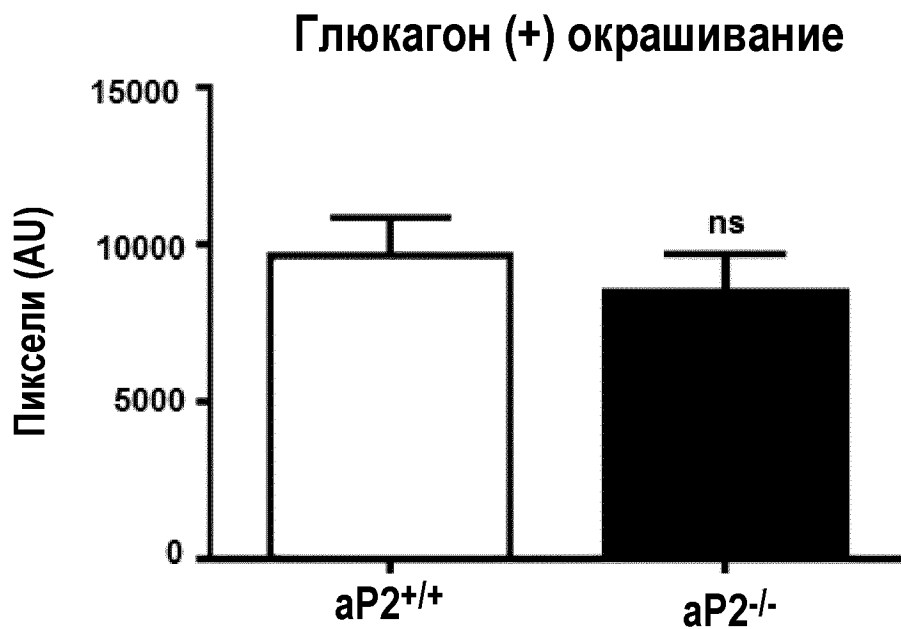
ФИГ.17E



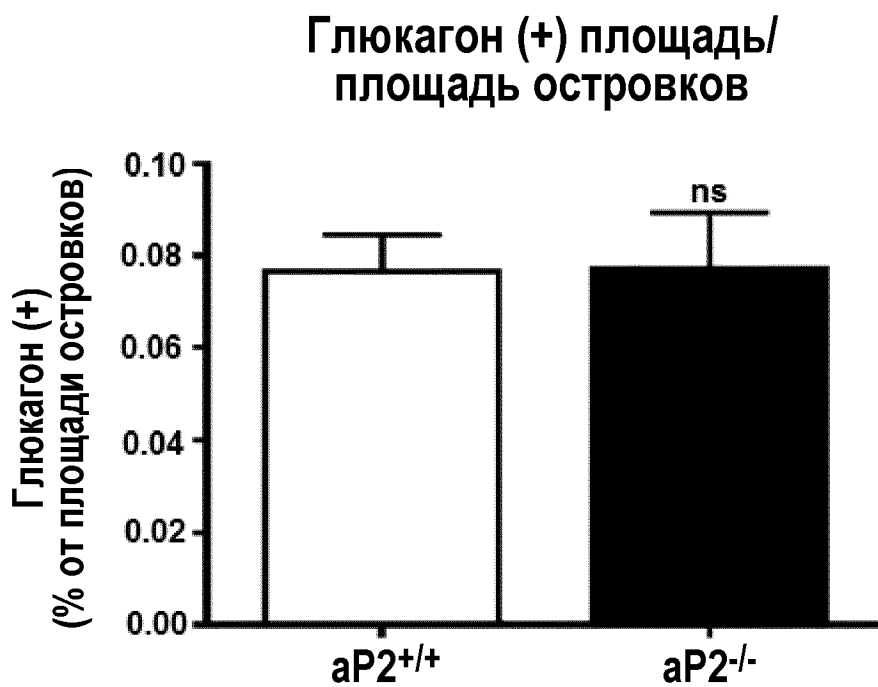
ФИГ.17F



ФИГ.17G

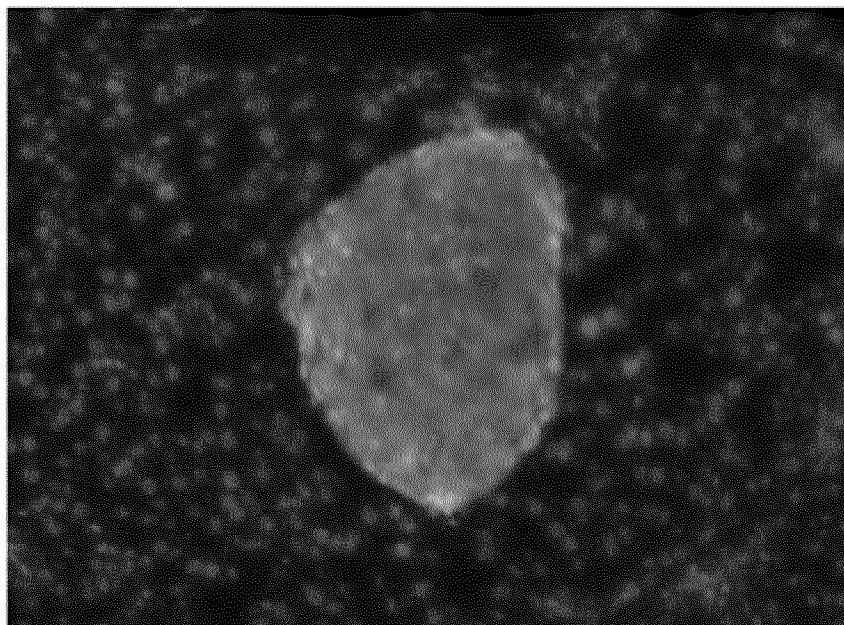


ФИГ.17H



ФИГ.17I

aP2^{+/+}



ФИГ.17J

aP2^{-/-}

